

骨髓间充质干细胞对小鼠急性肺损伤治疗作用的研究

张丹丹¹⁾, 邵文琳²⁾, 赵 珍³⁾, 李艳荣¹⁾, 王殿华¹⁾

(1) 昆明医学院云南省天然药物药理重点实验室, 云南昆明 650031; 2) 昆明医学院第二附属医院检验科, 云南昆明 650101; 3) 昆明医学院学报编辑部, 云南昆明 650031)

[摘要] **目的** 探讨输入外源性骨髓间充质干细胞 (MSCs) 对脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠急性肺损伤 (ALI) 的治疗作用. **方法** 实验随机分为 3 组 (n = 10): 对照组、ALI 组和 MSCs 治疗组. 健康小鼠 LPS 气管滴入方法建立 ALI 模型, 尾静脉输入全骨髓培养法分离纯化的 MSCs. 流式细胞分析鉴定 MSCs. HE 染色组织切片观察输入 MSCs 前后肺组织病理形态学改变, W/D 比值和髓过氧化物酶 (MPO) 活性评价肺水肿和炎症反应程度. ELISA 检测肺组织匀浆中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白介素-6 (IL-6) 的含量. **结果** 流式细胞分析鉴定: 培养 MSCs 表面标记 CD105 为阳性, CD34 为阴性. 肺组织病理学显示: ALI 组小鼠肺组织呈现典型的炎症病理变化, 包括肺泡充血、出血、水肿, 肺泡腔和血管壁中性粒细胞浸润, 肺泡壁增厚等肺损伤性病变; MSCs 治疗组小鼠肺组织损伤程度明显减轻. 肺 W/D 比值、肺组织 MPO 活性及 TNF- α 和 IL-6 含量: ALI 组小鼠肺 W/D 比值、肺组织 MPO 活性及 TNF- α 和 IL-6 含量高于对照组 ($P < 0.05$); MSCs 治疗组肺 W/D 比值、肺组织 MPO 活性及 TNF- α 和 IL-6 含量低于 ALI 组 ($P < 0.05$). **结论** 输入 MSCs 能够减轻脂多糖致急性肺损伤程度, 其作用可能与降低肺 W/D 比值和肺组织 MPO 活性、IL-6 及 TNF- α 含量有关.

[关键词] 间充质干细胞; 急性肺损伤; 脂多糖; 炎症因子

[中图分类号] R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 03 - 0008 - 05

The Treatment Effect of Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells on LPS-induced Acute Lung Injury in Mice

ZHANG Dan - dan¹⁾, TAI Wen - lin²⁾, ZHAO Zhen³⁾, LI Yan - rong¹⁾, WANG Dian - hua¹⁾

(1) Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031; 2) Dept. of Clinical Laboratory, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101; 3) Editorial Department of Journal of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031, China)

[Abstract] **Objective** To study treatment effects of extrinsic mesenchymal stem cells (MSCs) on mice with acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Thirty mice was divided randomly into 3 groups (n = 10): control group, ALI group and MSCs therapy group. Healthy mice were given lipopolysaccharide (LPS) intratracheally to cause acute lung injury, MSCs from mouse bone marrow were isolated, cultured and amplified in vitro, and the MSCs were given to mice via caudal vein. MSCs marker were identified by flow cytometry. Pathomorphological changes of mouse lung were observed under light microscope after Hematoxylin-Eosin staining. The lung wet to dry weight ratio and the lung tissue MPO activity were determined to assess lung edema and inflammatory degree. The concentrations of IL-6 and TNF- α in lung tissue homogenate

[基金项目] 云南省教育厅科学研究基金 (2011J038); 昆明医学院博士创新基金 (2011D02); 云南省科技厅 - 昆明医学院联合专项项目基金 (2011FB194)

[作者简介] 张丹丹 (1988~), 女, 河南汝州市人, 在读硕士研究生, 主要从事药理学研究工作. 邵文琳与张丹丹对本文有同等贡献.

[通讯作者] 王殿华. E-mail:wangdianhuakm@126.com

were measured by ELISA. Results Fow cytometer analysis showed that the cultured MSCs displayed a positive CD105 and a negative CD34. Histopathological evaluation showed that typical pathological inflammation lesions in the lung were observed in ALI group, including alveolar congestion, hemorrhage, edema, infiltration of neutrophils in the airspace or vessel wall, thickness of the alveolar wall; pathological changes were relieved obviously in MSCs therapy group. The changes of lung W/D weight ratio and the lung tissue MPO activity, IL-6 and TNF- α content of lung tissues homogenate in mice in ALI group were all higher than those in control group ($P < 0.05$); the lung W/D weight ratio, IL-6 and TNF- α content in MSCs groups were all lower than those in ALI group ($P < < 0.05$).

Conclusion MSCs can alleviate injury degree of ALI induced by LPS in mice, the mechanism of action may correlate with decreasing the lung W/D weight ratio and MPO activity, IL-6 and TNF- α content in lung tissue.

[**Key words**] Mesenchymal stem cells; Acute lung injury; LPS; Inflammatory factor

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是以肺部炎症、肺通透性增加和肺功能下降为特征的综合症^[1]. ALI 临床上死亡率达 40%, 目前对 ALI 的治疗仍然缺乏有效地手段, 寻找新的治疗措施是目前 ALI 研究的重点. 骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 属于成体干细胞, 具有取材方便、容易体外培养增殖、抗原性小、组织修复能力强等特征, 已用于治疗多种复杂疾病的研究^[2].

本研究在内毒素 (lipopolysaccharide, LPS) 致小鼠 ALI 模型上, 尾静脉输入 MSCs, 旨在探讨 MSCs 对小鼠急性肺损伤治疗作用, 为 ALI 的防治提供新的策略和方法.

1 材料与方法

1.1 实验动物

4 周龄昆明小鼠, 雄性, 体重 18 ~ 22 g, 由昆明医学院实验动物研究中心提供. 在标准动物饲养间内, 给予无菌水和食物饲养. 实验动物随机分为 3 组 ($n = 10$): (1) 对照组, 气管内注入无热源的生理盐水, 同时尾静脉注入 100 μ L PBS; (2) ALI 组, 气管内注入 LPS, 同时尾静脉注入 100 μ L PBS; (3) MSCs 治疗组, 气管内注入 LPS, 同时尾静脉注入 100 μ L 含有 10^6 个间充质干细胞的 PBS.

1.2 小鼠急性肺损伤模型复制

腹腔注射 3% 戊巴比妥钠麻醉小鼠, 颈部皮肤消毒后于颈前正中切口 0.5 cm, 暴露气管, 气管内

缓慢滴注 2.5 mg/kg 内毒素溶液 50 μ L, 消毒缝合切口.

1.3 小鼠间充质干细胞制备与鉴定

MSCs 制备: 颈部脱臼处死昆明小鼠, 75% 酒精消毒全身, 无菌操作取出后肢胫骨和股骨, 用 PBS 反复冲洗 3 次; 从中间剪断胫骨和股骨, 收集骨髓悬液, 制备成单细胞悬液; 接种于含 5 mL L-DMEM 培养基的 60 mm² 的培养皿中, 放置 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 培养箱中培养; 以后每隔 2 ~ 3 d 换液 1 次, 扩增培养纯化 MSCs.

MSCs 鉴定: 取第 4 代细胞, 分别加入抗小鼠的 CD34、CD105 单克隆抗体, 置室温孵育 30 min, PBS 洗涤 2 次, 上流式细胞仪鉴定.

1.4 各项指标的检测

1.4.1 肺组织形态学观察 取出肺组织, 4% 多聚甲醛固定液固定 24 h, 常规石蜡包埋, 连续切片, 肺组织切片厚度为 5 μ m. 苏木精染色 7 min, 伊红染色 2 min, 脱水, 封片, HE 染色光镜下观察肺损伤程度.

1.4.2 肺湿干 (W/D) 比值测定 各实验组小鼠处死后, 立即开胸取肺, 用滤纸吸干肺表面水分和血迹后称重, 为湿重 (W), 置于 85 $^{\circ}$ C 恒温烘箱内, 干燥 48 h 至恒重, 再次称重, 为干重 (D). 计算肺 W/D 比值.

1.4.3 肺组织髓过氧化物酶活力测定 按南京建成生物工程研究所提供的 MPO 测试盒说明书操作, 计算 MPO 活力单位 /L. MPO 活力单位计算公式, Δ : 11.3 为斜率的倒数:

$$\text{MPO 活力单位} / \text{g 湿片} = \frac{\text{测定管 OD 值} - \text{对照管 OD 值}}{11.3^{\Delta} \times \text{取样量 (g)}^{**}}$$

每克组织湿片在 37 $^{\circ}$ C 的反应体系中 H₂O₂ 被分解 1 μ mol 为 1 个酶活力单位.

1.4.4 肺组织 IL-6 和 TNF- α 含量测定 按 ELISA 试剂盒 (ebioscience 公司) 说明书操作, 测

定小鼠肺组织匀浆中 IL-6 和 TNF- α 的含量, 计量单位: μ g/g.

1.5 统计学分析

采用 SPSS 软件进行统计分析, 数据以均数 \pm

标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验的方法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MSCs 的培养与鉴定

全骨髓贴壁培养结果: 培养小鼠骨髓 MSCs 原代培养 10 d 左右可见大量细胞贴壁; 典型的 MSCs 细胞体积较小, 成梭形, 不规则形, 细胞核明显, 细胞多呈集落样生长, 紧密堆积在一起, 形似鸟巢 (见图 1)。流式细胞分析鉴定: MSCs 可表达 CD105, 但不表达造血细胞表面标志物 CD34, 细胞纯度达到 95% 以上 (见图 2)。

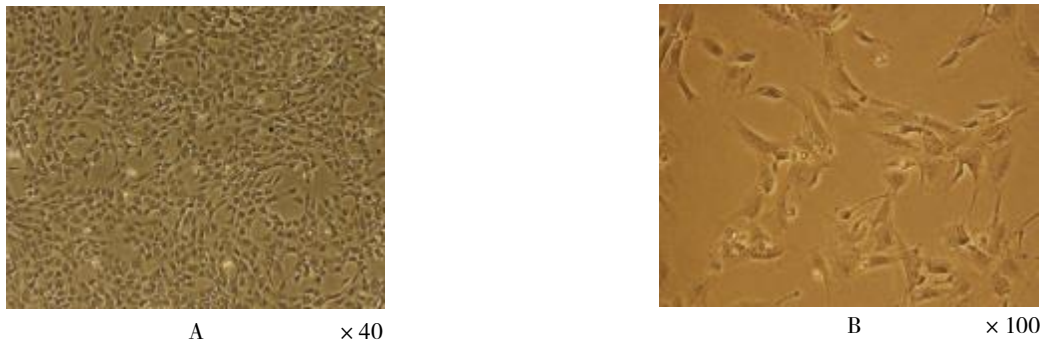


图 1 第 4 代 MSCs

Fig. 1 MSCs appearance of the passage 4

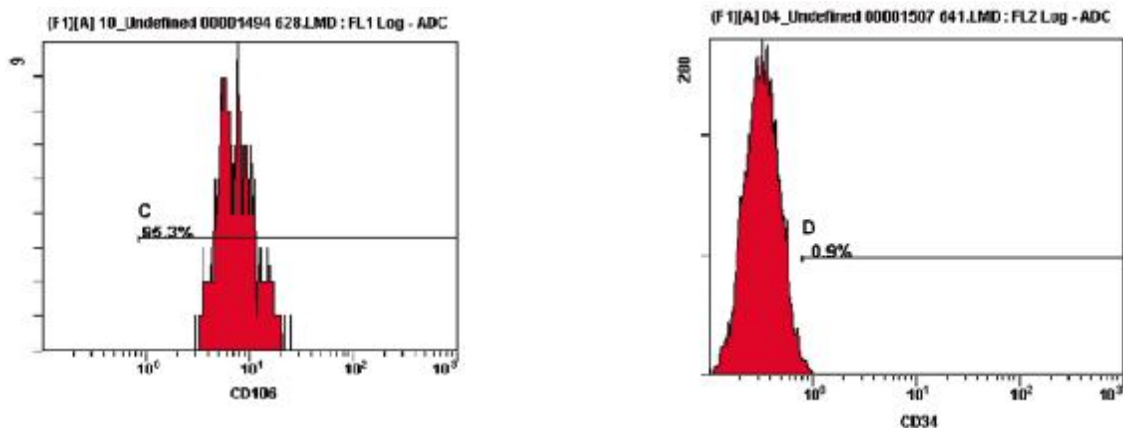


图 2 流式细胞分析第 4 代 MSCs 的表型

Fig. 2 The phenotype of the passage 4 MSC cells identified by flow cytometer analysis

2.2 肺组织形态学

对照组小鼠肺泡结构清晰, 肺泡腔完整, 肺泡壁未见增厚, 肺间质无渗出, 无肿胀、充血、水肿等炎症 (见图 3A); ALI 组小鼠肺组织出现明显的炎性细胞浸润, 毛细血管充血, 肺泡管、肺泡腔内可见透明膜形成, 肺泡正常结构消失, 几乎全部被炎性细胞充斥, 呈现典型的急性肺损伤病理改变 (见图 3B); MSCs 治疗组小鼠肺组织肺泡内炎症细胞浸润、出血和水肿程度减轻 (见图 3C)。

2.3 肺 W/D 比值

ALI 组小鼠肺 W/D 比值明显高于对照组 ($P <$

0.05); MSCs 治疗组小鼠肺 W/D 比值明显低于 ALI 组 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.4 肺组织 MPO 活力

ALI 组小鼠肺组织 MPO 活力明显高于对照组 ($P < 0.05$); MSCs 治疗组小鼠 MPO 活力明显低于 ALI 组 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.5 肺组织 IL-6 和 TNF- α 含量

ALI 组小鼠肺组织 IL-6 和 TNF- α 含量明显高于对照组 ($P < 0.05$); MSCs 治疗组小鼠肺组织 IL-6 和 TNF- α 含量明显低于 ALI 组 ($P < 0.05$), 见表 1。

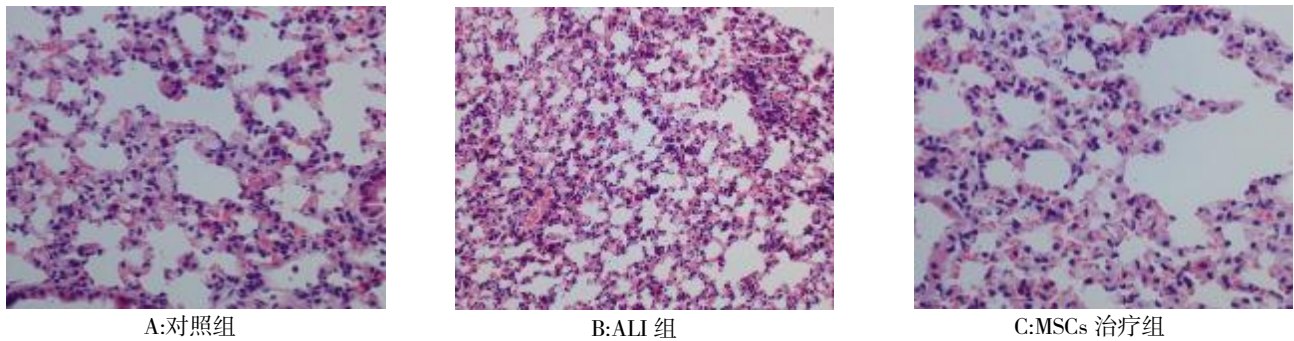


图3 小鼠肺组织病理形态学变化 (HE × 200)

Fig. 3 The pathomorphological changes in mouse lung (HE × 200)

表1 肺 W/D 比值和肺组织 MPO 活力及 IL-6、TNF- α 含量变化 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 1 The changes of lung W/D ratio and MPO activity, IL-6 and IL-10 content of lung tissues in mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	W/D 比值	MPO (U/g)	IL-6 ($\mu\text{g/g}$)	TNF- α ($\mu\text{g/g}$)
对照组	10	4.71 \pm 0.43	1.37 \pm 0.04	97.8 \pm 16.1	34.04 \pm 13.8
ALI 组	10	7.53 \pm 1.02*	5.47 \pm 0.07*	376.6 \pm 66.3*	482.48 \pm 83.4*
MSCs 治疗组	10	5.15 \pm 0.57 Δ	3.38 \pm 0.12 Δ	157.4 \pm 27.8 Δ	184.56 \pm 21.4 Δ

与对照组相比, * $P < 0.05$; 与 ALI 组相比, $\Delta P < 0.05$.

3 讨论

本研究主要发现, 输入外源性 MSCs 能够减轻脂多糖致急性肺损伤程度, 其作用可能与降低肺 W/D 比值和肺组织 MPO 活性、IL-6 及 TNF- α 含量有关. 这一发现提示输入外源性 MSCs 可能为 ALI 的治疗提供新的策略和方法.

脂多糖是革兰氏阴性细菌细胞壁外膜的主要成分, 临床上 40%~50% 的急性肺损伤是感染或脓毒血症所致, 特别是革兰氏阴性细菌 (gram negative bacillus, GNB) 感染^[3]. 而 GNB 感染的主要致病因素就是脂多糖. 因而本研究选用 LPS 复制小鼠 ALI 模型, 具有重要的临床意义.

ALI 的主要病理变化是: 以中性粒细胞为主的大量炎性细胞的浸润和炎性介质的释放, 引起肺组织炎症反应、肺出血和肺水肿等. 肺 W/D 比值是评价肺水肿常用的指标. 肺组织 MPO 是中性粒细胞 (PMN) 嗜天青颗粒释放的过氧化物酶类, 测定 MPO 活性可作为反映 PMN 浸润的证据^[4]. IL-6 和 TNF- α 是炎症反应早期最重要的炎症介质, 主要由活化的嗜中性粒细胞和巨噬细胞等释放, 可直接损伤肺上皮和血管内皮细胞, 增加其通透性, 引起炎症反应和 ALI 的发生^[5]. 本实验研究表明, 气管内滴注 LPS 致小鼠 ALI 损伤表现有典型的肺损伤病理形态学改变, 肺 W/D 比值和肺组织 MPO 活性、

IL-6 和 TNF- α 含量增加.

MSCs 是骨髓来源的除造血干细胞以外的另一种成体干细胞, 广泛分布于各种不同的组织中, 具有高度自我更新能力和多向分化潜能. MSCs 在形态上呈纺锤形的成纤维细胞样, 能附着在塑料或玻璃培养皿上生长, 形成均匀的集落或贴壁的融合层^[6]. Dominici 等^[7]认为 MSCs 应具有一定表面标志物 (如 CD73、CD90、CD105 等) 的阳性表达, 而代表造血系统细胞谱系的标志物 (如 CD34) 为阴性. MSCs 具有取材方便、组织修复能力强、免疫调节等特点, 已用于治疗多种复杂疾病的研究. 研究表明, MSCs 能够定植在损伤的肺组织中, 发挥免疫调节的作用, 可降低肺内细胞因子的表达和肺水肿, 提高小鼠生存率^[8,9]. 本实验发现 MSCs 尾静脉输入给 LPS 诱导的 ALI 小鼠体内, 小鼠肺组织损伤程度明显减轻, 肺 W/D 比值、肺组织 MPO 活性及 TNF- α 和 IL-6 含量降低. 提示输入 MSCs 能够减轻 LPS 致急性肺损伤的程度, 其作用可能与降低肺 W/D 比值和肺组织 MPO 活性、IL-6 及 TNF- α 含量有关.

有关 MSCs 的抗炎作用机制不清楚. 一些研究认为^[10], MSCs 的抗炎作用是一种拟药理学的效应, 表现暂时的释放抗炎因子, 刺激内源性的修复. Popov B V 等^[11]认为 MSCs 的本质作用机制可能源自它能分泌一些液体分子来调节免疫反应. 本实验仅初步探讨了 MSCs 对小鼠 ALI 的治疗作用, 今

后还需进一步的深入研究 MSCs 的定植及抗炎作用的机制, 为 ALI 的防治的新策略和方法提供理论和实验依据。

[参考文献]

- [1] BUCKLEY SUE, LORA BARSKY, et al. Apoptosis and DNA damage in type II alveolar epithelial cells cultured from hyperoxic rats[J]. *Am J Physiol*, 1998, 274(5):714 – 720.
- [2] MCLINTOSH K R. Stromal cell modulation of the immune system: A potential role for mesenchymal stem cell [J]. *Graft*, 2000, 3:324 – 328.
- [3] CAMPAGOLI C, ROBERTS I A, KUMARUS, et al. Identification of mesenchymal stem cells in human first trimester fetal blood, liver, and bone marrow[J]. *Blood*, 2001, 98 (8):2 396 – 2 398.
- [4] MARTIN T R, NAKAMURA M, MATUTE-BELLO G. The role of apoptosis in acute lung injury [J]. *Crit Care Med*, 2003, 31(4Suppl): 184 – 188.
- [5] DOMINICI M, LEBLANCK, MUELLER I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stem cells. the international society for cellular therapy position statement[J]. *Cytotherapy*, 2006, 8:315–317.
- [6] VERNOOY J H, DENTENER M A, SUYLEN R J, et al. Intratracheal instillation of lipopolysaccharide in mice induces apoptosis in bronchial epithelial cells [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 24(5):569 – 576.
- [7] CRESTANI B, CORNILLET P, DEHOUX M, et al. Alveolar type II epithelial cells produce interleukin-6 in vitro and in vivo regulation by alveolar macrophage secretory products [J]. *J Clin Invest*, 1994, 94(2): 731 – 740.
- [8] ROJAS M, XU J, WOODS C R, et al. Bone marrow derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung[J]. *Am J Respir Cell Mol Bio*, 2005, 33:145 – 152.
- [9] GUPTA N, SU X, POPOV B, et al. Intrapulmonary delivery of bone marrow derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice [J]. *J Immunol*, 2007, 179 (3) : 1 855 – 1 863.
- [10] NEMETH K, LEE A, YUEN P S, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E2-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production[J]. *Nat Med*, 2009, 5:42 – 49.
- [11] NAVEEN GUPTA, XIAO SU, BORIS POPOV, et al. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice [J]. *The Journal of Immunology*, 2007, 179:1 855 – 1 863.

(2012 – 01 – 15 收稿)