

## 间充质干细胞通过诱导M2型巨噬细胞治疗急性肺损伤

孙 瑶, 吕海金, 易小猛, 郭 俊, 易慧敏  
(中山大学附属第三医院外科ICU, 广东 广州 510630)

**摘要:**【目的】研究间充质干细胞(MSC)是否可以通过诱导肺泡巨噬细胞向M2型极化来改善急性肺损伤。【方法】①贴壁法提取脐带MSC,用流式细胞仪分析细胞表型,细胞化学染色法观察细胞体外成骨和成脂能力。②小鼠肺泡巨噬细胞系(MH-S细胞)加入脂多糖(LPS)刺激,和MSC隔离共培养,并加入MSC可溶性因子抑制剂,设置LPS组、LPS+MSC组和MSC抑制剂组,共培养48h后用流式和qPCR技术分析巨噬细胞极化状态。③30只ballb/c雄性小鼠随机均分成control组、ALI组、ALI+MSC组(均 $n=10$ ),LPS滴鼻法建立小鼠急性肺损伤(ALI)模型,用MSC治疗48h后,肺组织苏木素-伊红(HE)染色进行损伤评估;提取肺泡灌洗液(BALF),其中细胞用流式和qPCR检测M2型巨噬细胞marker CD206、IL-10和Arg1的表达;ELISA检测BALF上清M1型巨噬细胞marker TNF- $\alpha$ 。【结果】MSC呈贴壁生长,具有成骨成脂分化能力。MSC可以诱导MH-S细胞向M2型极化,CD206阳性比例明显升高( $P<0.05$ ),前列腺素E2(PGE2)抑制剂可以逆转该作用。小鼠ALI模型成功,MSC治疗后,肺组织病理及评分明显减轻。BALF中巨噬细胞CD206阳性细胞的比例,ALI+MSC组较ALI组明显升高。在CD206和IL-10的mRNA水平上,ALI+MSC组高于ALI组( $P<0.05$ )。BALF中炎症因子TNF- $\alpha$ 浓度ALI+MSC组较ALI组明显降低( $P<0.05$ )。【结论】脐带MSC通过PGE2诱导巨噬细胞向M2型极化途径有效缓解LPS诱导的小鼠急性肺损伤。

**关键词:**急性肺损伤;间充质干细胞;巨噬细胞

**中图分类号:**R563 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2019)03-0393-08

## Mesenchymal Stem Cells Attenuate Acute Lung Injury Through Inducing M2 Macrophage Polarization

SUN Yao, LV Hai-jin, YI Xiao-meng, GUO Jun, YI Hui-min  
(SICU, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)  
Correspondence to: YI Hui-min, E-mail: ylhmin@hotmail.com

**Abstract:**【Objective】To investigate whether mesenchymal stem cells (MSC) can alleviate acute lung injury by inducing alveolar macrophages to polarize to M2 phenotype. 【Methods】Umbilical cord MSC was extracted by adherent method and cell phenotypes were analyzed by flow cytometry. The differentiation along osteogenic and adipogenic pathways were assessed by histological staining in vitro. Mouse alveolar macrophage cell line (MH-S cells) which was stimulated by LPS was isolated co-culture with MSC and MSC soluble factor inhibitor was added. We set up three groups (LPS, LPS+MSC, and MSC inhibitor). After being cultured for 48 hours, the macrophage polarization was analyzed by flow cytometry and qPCR. Thirty ballb/c male mice were randomly divided into control group ( $n=10$ ), ALI group ( $n=10$ ), and ALI+MSC group ( $n=10$ ). LPS was instilled intranasally to establish acute lung injury model in mice. After treatment with MSC for 48 hours, HE staining of lung tissue was performed for damage assessment. The alveolar lavage fluid (BALF) was obtained and the cells in BALF were analyzed by flow cytometry and qPCR to detect the expression of M2-type macrophage markers including CD206, IL10 and Arg1. The concentration of M1-type macrophage marker TNF- $\alpha$  in the supernatant was measured by ELISA. 【Results】MSC showed adherent growth and had the ability of osteogenic

收稿日期:2018-12-24

基金项目:广东省科技计划项目(2014A020211010)

作者简介:孙瑶,硕士研究生,E-mail:sunyao\_92@163.com;易慧敏,通信作者,E-mail:ylhmin@hotmail.com

and adipogenic differentiation. MSC can induce MH-S cells to polarize to M2 type and with a significant increase of CD206 positive proportion cells ( $P<0.05$ ). Prostaglandin E2 (PGE2) inhibitors can reverse this effect. Mouse ALI model was successful. After treatment with MSC, the pathology and lung injury score was significantly improved. The proportion of CD206 positive macrophages in alveolar lavage fluid in ALI+MSC group was significantly higher than that in ALI group. The expression of CD206 and IL-10 in mRNA level was significantly higher in ALI+MSC group than that in ALI group. The concentration of inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  in alveolar lavage fluid was significantly lower in the ALI+MSC group than in the ALI group ( $P<0.05$ ). 【Conclusion】 Umbilical cord mesenchymal stem cells can effectively alleviate acute lung injury induced by LPS in mice via PEG2 to induce macrophage to polarize to M2 type.

**Key words:** acute lung injury; mesenchymal stem cells; macrophage

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2019, 40(3):393-400]

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)和/或急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是由多种病因导致的一种危重性呼吸衰竭,是常见的危重症之一<sup>[1-2]</sup>,缺乏有效的治疗手段,病死率高达30%~40%<sup>[3-4]</sup>。因此,寻找一种新的有效的治疗手段十分有必要。间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)具有自我更新及多向分化能力<sup>[5]</sup>,免疫原性低,有着强大的免疫抑制功能及抗炎能力,被应用到各种疾病的治疗研究中。目前已经有许多研究证明在各种急性肺损伤动物模型中,MSC可以提高存活率,增强细菌清除能力,能有效减轻肺部炎症,缓解急性肺损伤<sup>[6-7]</sup>。但其治疗及保护的具体机制目前仍不是很清楚。急性肺损伤时肺泡巨噬细胞是呼吸道的重要防线,也是损伤时的主要效应细胞,巨噬细胞的极化一般分为M1型和M2型。M1型巨噬细胞具有促炎作用,一般在急性炎症期占主要部分,可以由脂多糖(LPS)和 $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )单独或联合诱导极化,能产生促炎因子如肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )等。M2型巨噬细胞具有抑炎作用,可以由白介素4(IL-4)诱导极化,能产生抑炎因子白介素10(IL-10)和转化生长因子(TGF- $\beta$ ),一般在炎症消散期占主要部分<sup>[8-9]</sup>。当小鼠巨噬细胞向M1型极化时,可以使其诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和CD86的表达上调,向M2型极化时可以使CD206和Arg1的表达上调。从富含M1的巨噬细胞向富含M2的巨噬细胞转移可减轻炎症过程,促进组织修复和再生。控制肺部的过度炎症反应,维持促炎反应和抑炎反应平衡在急性肺损伤的治疗中起关键作用<sup>[10]</sup>。那么在MSC治疗过程中对肺泡巨噬细胞的状态是否有影响呢,是否可以通过调控肺泡巨噬细胞的极化发挥治疗效

果呢。本研究探究MSC在治疗急性肺损伤时对肺泡巨噬细胞的影响,为治疗方向提供新的靶点。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 实验动物 6~8周龄,SPF级balb/c雄性小鼠,由广东省医学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(粤)2013-0002。实验动物的管理及处置遵循广东省动物管理委员会准则及动物福利准则。

1.1.2 仪器 多维高清流式细胞分析仪(BD, LSRFortessa);荧光定量PCR仪(罗氏 LightCycler96);Transwell小室(Millipore, 0.4  $\mu$ m);显微手术器械(广州医药公司医疗器械批发中心);动静脉穿刺针(德国贝朗,18~20 g)。

1.1.3 试剂 脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)(Sigma, L4524);anti-mouse流式抗体F4/80 APC(BioLegend, 123116)、CD86 PE(BioLegend, 105007)、CD206 FITC(BioLegend, 141704)、INOS(BioLegend);anti-human流式抗体CD29、CD73、CD90、CD105、CD34、CD45、CD166、CD44(BD);qPCR引物(北京擎科新业生物技术有限公司);吡咯美辛[前列腺素E2(PGE2)抑制剂]、LY2157299[转化生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ )抑制剂]、NLG-8189[2,3双加氧酶(IDO)抑制剂](Sigma);mouse ELISA KIT, TNF- $\alpha$ (eBioscience/BMS607)。

### 1.2 人脐带MSC的分离、培养及鉴定

1.2.1 人脐带MSC的分离、培养 在产妇及其家属知情同意下及医院伦理委员会批准下,无菌条件下获取健康足月剖宫产脐带5~8 cm。冲洗干净,剔除脐静脉及脐动脉后,剪碎成约1 mm<sup>3</sup>的小块。取适量组织小块到10 cm的细胞培养皿中,

加入 10 mL MSC 完全培养基,放入培养箱中培养,待有细胞爬出贴壁时,更换培养基,1 周后取出组织块,继续培养,待细胞融合到 80%~90%,按 1:3 比例进行传代接种。第 3~6 代用于体内外实验。

**1.2.2 脐带 MSC 的鉴定** ①表型鉴定:第 4 代 MSC,吸去培养基,PBS 洗两遍,用 2.5 g/L 胰酶消化下来,300 ×g 离心 5 min,弃上清,用 PBS 重悬并计数。每管细胞约 10<sup>6</sup> 个,用 100 μL PBS 重悬,分别标记 anti-human CD29、CD73、CD90、CD105、CD34、CD45、CD166、CD44 等抗体,涡旋,4 ℃ 孵育 30 min,后每管加 2 mL PBS 洗两遍,洗去未结合的抗体,最后用 250 μL PBS 重悬,涡旋后上机进行流式检测。②成骨诱导分化:将第 4 代脐带 MSC 接种于 6 孔板中,待细胞融合达到 90%,吸掉旧培养基,加入成骨诱导完全培养基,每 3 d 换液,诱导 14 d 后用茜红素染色观察钙结节形成情况。③成脂诱导分化:同上,加入成脂诱导 A 液,诱导 3 d 后换液加入成脂诱导 B 液诱导 1 d,反复 7 个循环后,进行油红染红观察脂滴形成情况。

### 1.3 建立小鼠急性肺损伤(ALI)模型

参考 Danchuk<sup>[11]</sup>和 Mei<sup>[12]</sup>的方法,采用 LPS 滴鼻法进行 ALI 造模。具体为:采用氯胺酮/甲苯噻嗪(Ketamin/Xylazine)混合麻醉剂 90/7.5 mg/kg 腹腔注射麻醉小鼠,将麻醉好的小鼠以上面两颗门牙为勾悬挂于 4 号线上,将小鼠舌头轻轻向一侧拉出,保持气道开放。根据体质量滴入相应的 LPS (5 mg/kg) 或等量的 PBS。滴完后静止 3~5 min,观察呼吸无异常后,将小鼠置于双手掌心,左右翻转使滴入液体在小鼠肺内分布均匀。

### 1.4 肺组织病理评分

取完整肺组织用 40 g/L 多聚甲醛固定,固定后取左肺叶行病理切片和苏木素-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色。光学显微镜下观察肺组

织的病理改变,并进行肺损伤评分<sup>[13]</sup>。在光学显微镜下,每张片随机选 5 个高倍镜视野,对以下 4 个项目进行评分:①肺泡充血,②出血,③肺泡和肺间质炎症(肺间隙中性粒细胞集聚或浸润),④肺水肿程度(肺泡壁增厚或透明膜形成)。评分标准 0 分:最轻微损害,1 分:轻度损害,2 分:中度损害,3 分:重度损害,4 分:最严重损害,总分相加即为病理评分。

### 1.5 肺泡灌洗液的获取

经尾静脉注射 MSC 及 PBS 后 48 h,采用 10% 水合氯醛深度麻醉小鼠,取仰卧位并固定四肢,使用动静脉置管进行气管穿刺,用 1 mL 注射器连接动静脉置管口,每次 1 mL PBS,反复灌洗 3 次,回收的液体即为肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)。300 ×g, 5 min 离心后上清冻于 -80 ℃ 度冰箱进行 ELISA 检测,离心得到的细胞,若红细胞较多可裂红,裂红后用 PBS 重悬计数。计数完后,剩下的细胞离心,用于流式检测及提取 RNA。

### 1.6 肺泡灌洗液细胞和 MH-S 细胞流式检测

分别从体内及体外获得肺泡灌洗液细胞和 MH-S 细胞的单细胞悬液,细胞总数在 (0.5~1) × 10<sup>6</sup> 个细胞之间。将细胞重悬在 100 μL PBS 中,分别标记 anti-mouse F4/80 APC、CD86 PE、CD206 FITC 流式抗体,方法同上 MSC 流式检测。

### 1.7 荧光定量 PCR(qPCR)检测巨噬细胞 CD86、TNF-α、CD206、IL-10、Arg-1 的 mRNA 表达水平

根据 Trizol 使用说明书提取细胞总 RNA,测浓度,取 1 μg RNA 用 Takara 逆转录试剂盒按照说明书操作,将 RNA 逆转录为 cDNA。进行荧光定量 PCR 时,以 GAPDH 作为内参。采用 SYBR Green Master(Rox)(Roche)在罗氏 LightCycler96 仪器上完成操作。实验中所用的引物序列如表 1 所示。每组实验重复 3 次。

表 1 用于定量 RT-PCR 的基因名称和引物序列

Table 1 Gene names and primer sequence used for quantitative RT-PCR

Gene names	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
<i>GAPDH</i>	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
<i>TNF-α</i>	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
<i>CD86</i>	TGTTTCCGTGGAGACGCAAG	TTGAGCCTTTGTAATGGGCA
<i>CD206</i>	CTCTGTTACGCTATTGGACGC	CGGAATTTCTGGGATTCAGCTTC
<i>IL-10</i>	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG
<i>Arg-1</i>	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG	AGGAGCTGTCATTAGGGACATC

### 1.8 ELISA 检测

小鼠肺泡灌洗液  $300 \times g$ , 5 min 离心后得到上清, 根据 ELISA 试剂盒说明书操作, 检测小鼠 TNF- $\alpha$  因子的浓度, 每组重复 3 次。

### 1.9 统计学方法

采用 SPSS 20 软件分析数据, 呈正态分布的计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间的比较采用两独立样本  $t$  检验或  $t'$  检验或秩和检验, 多个样本均数采用 ANOVA 分析或 Kruskal-Wallis  $H$  检验, 以 Bonferroni 法检验进行均数间多重比较; 检验水准  $\alpha=0.05$ , 当  $P < 0.05$  时, 认为差异有统计学意义。

## 2 结果

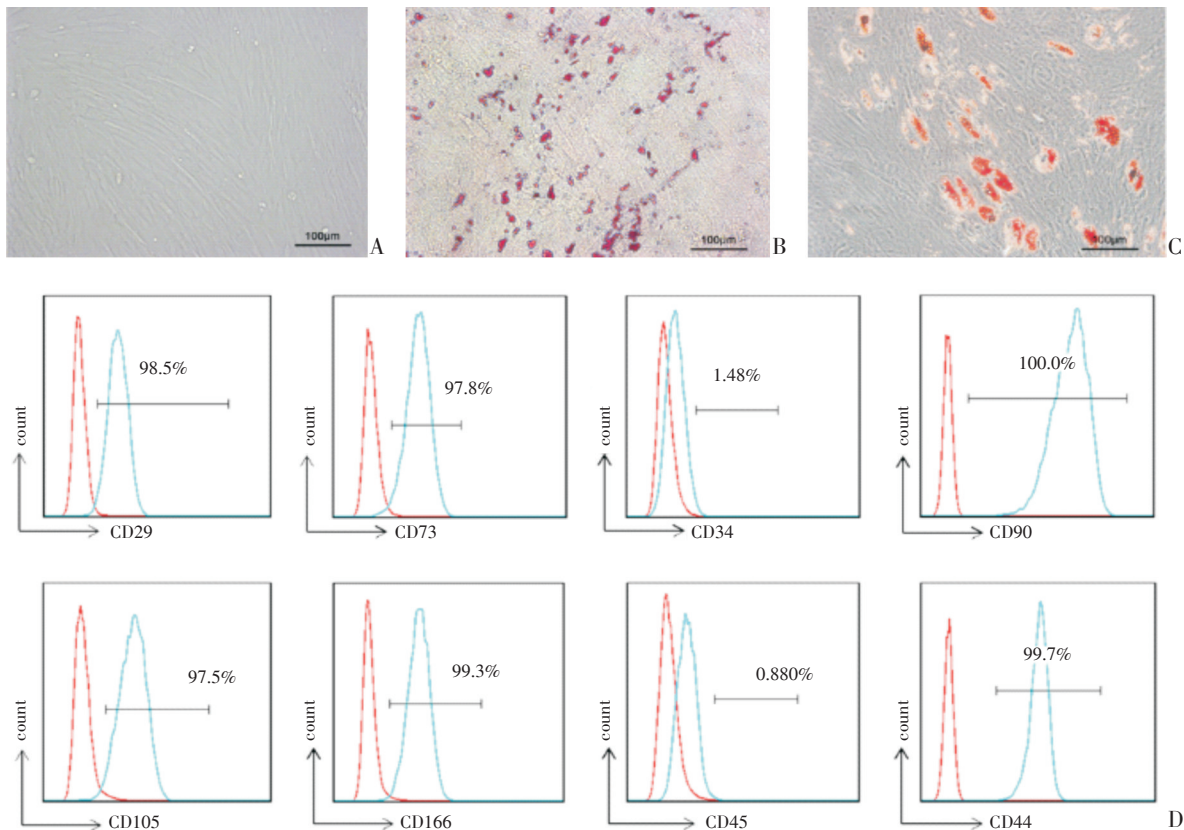
### 2.1 脐带间充质干细胞形态、成骨成脂分化能力鉴定及表型鉴定

MSC 细胞呈贴壁生长, 倒置显微镜下可见细

胞呈长梭形, 平行排列或旋涡状(图 1A)。第 4 代 MSC 成骨诱导 14 d 后进行茜素红染色, 可见细胞爬片上出现红色钙结节(图 1B); 成脂诱导 28 d 后行油红染色可见红色的脂滴(图 1C)。用第 4 代的 MSC 进行表面 markers 标记, 流式结果显示为 CD29、CD90、CD73、CD105、CD166、CD44 呈强阳性表达, CD45、CD34 呈阴性表达(图 1D)。

### 2.2 MSC 在体外诱导小鼠肺泡巨噬细胞系 (MH-S 细胞) 向 M2 型极化, 该作用可以被 PGE2 抑制剂能逆转

将巨噬细胞和 MSC 共培养后, 检测 M2 型巨噬细胞 marker CD206、IL-10、Arg1。发现 MSC 可以诱导 MH-S 细胞向 M2 型极化, LPS+MSC 组 ( $n=3$ ) CD206 阳性细胞的比例较 LPS 组 ( $n=3$ ) 明显升高(图 2A;  $19.7\% \pm 0.6\%$  vs  $11.4\% \pm 0.7\%$ ,  $t = 8.936$ ,  $P < 0.001$ ), 差异具有统计学意义(图 2B)。在 mRNA 水平上, LPS+MSC 组 *IL-10* 和 *Arg1* 水平也较 LPS 组明显升高, 差异具有统计学意义(表 2, 图 2C、D)。我



A: Adherent and spindle-shaped cells of MSC,  $\times 200$ . B: Alizarin red staining,  $\times 200$ . C: Oil red staining,  $\times 200$ . D: Flow cytometry showed that CD29, CD73, CD90, CD105, CD166, CD44 were expressed on the surface of hUMSC cells, and CD34, CD45 were not expressed.

图 1 脐带 MSC 的形态、成骨和成脂分化能力鉴定及表面标记鉴定

Fig.1 Identification of morphological, osteogenic and adipogenic differentiation capacity and surface markers of umbilical cord MSC

们在MSC和巨噬细胞共培养体系中加入MSC可溶性因子的抑制剂,发现加入PGE2 inhibitor ( $n = 3$ )时CD206阳性细胞比例明显低于LPS+MSC组 ( $n = 3$ ;  $8.4\% \pm 0.9\%$  vs  $18.5\% \pm 1.4\%$ ,  $t = 6.137$ ,  $P < 0.01$ )。加入TGF- $\beta$ 抑制剂、IDO抑制剂,CD206阳性细胞比例差异没有统计学意义(图2E)。

### 2.3 MSC有效改善小鼠ALI模型

接下来,我们利用LPS成功诱导了急性肺损伤模型;光镜下观察可见control组肺组织结构基本正常,病理评分低;ALI组有较多肺泡结构破坏,肺泡破裂、融合,肺泡有较明显的充血及出血,间质增宽,肺泡腔及间质有大量炎性细胞浸润,肺组织病理评分高;ALI+MSC组肺损伤程度明显减轻,炎性细胞浸润明显减少(图3A)。ALI组病理评分较高,ALI+MSC组( $n=5$ )病理评分较ALI组( $n = 5$ )明显降低( $4.2 \pm 0.4$  vs  $13.4 \pm 0.5$ ,  $t = 14.55$ ,  $P < 0.001$ ;图3B)。

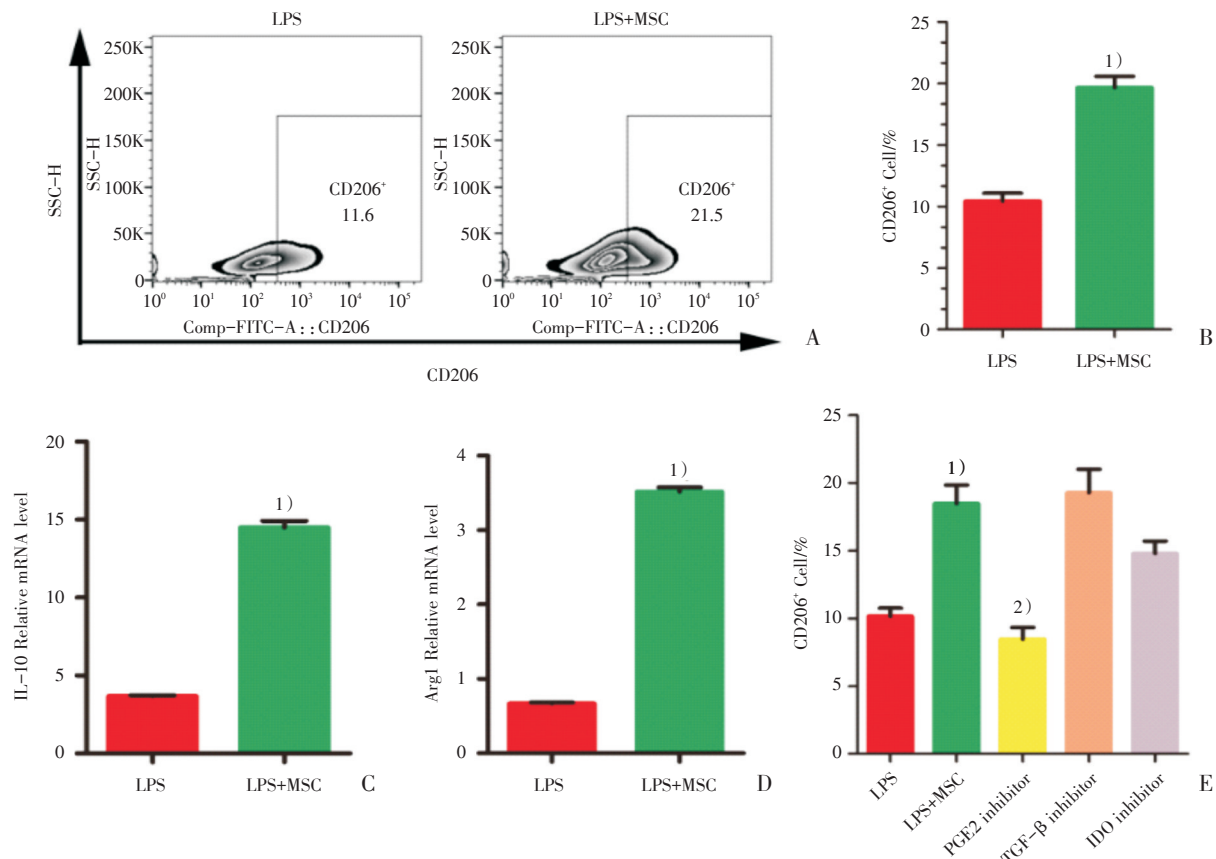
表2 MH-S细胞的IL-10和Arg1 mRNA相对表达水平  
Table 2 Relative expression levels of IL-10 and Arg1 mRNA in MH-S cells

Groups	n	IL-10	Arg1
LPS	3	3.68±0.05	0.67±0.01
LPS+MSC	3	14.50±0.43	3.52±0.56
t		24.74(t')	49.48
P		0.001	<0.0001

LPS: lipopolysaccharide; MSC: mesenchymal stem cell.

### 2.4 MSC治疗急性肺损伤模型伴随巨噬细胞向M2型极化

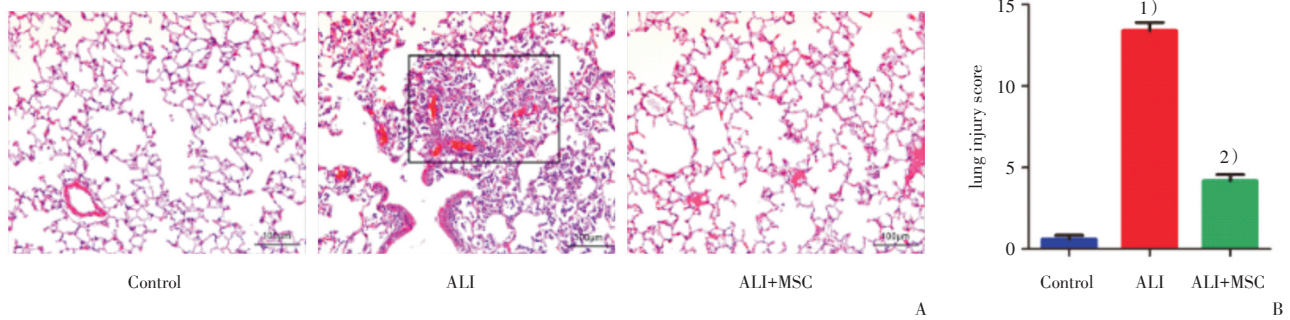
进一步为了研究MSC在体内对肺泡巨噬细胞的影响,通过对肺泡灌洗液流式检测发现,ALI+MSC组( $n = 3$ )CD206阳性细胞比例明显高于ALI组( $n = 3$ ;  $37.6\% \pm 1.4\%$  vs  $8.5\% \pm 0.4\%$ ,  $t = 20.09$ ,



A-B: Contrast to LPS group, the proportion of CD206 positive cells increased significantly. C-D: The level of IL10 and Arg1 mRNA in ALI+MSC group is significantly higher. E: The proportion of CD206 positive cells in the PGE2 inhibitor group was significantly lower than that in the LPS+MSC group. 1)  $P < 0.05$  vs LPS group. 2)  $P < 0.01$  vs LPS +MSC group.

图2 MSC在体外诱导MH-S细胞向M2型极化,前列腺素E2抑制剂能逆转该作用

Fig.2 MSC induce MH-S cells to polarize to M2 phenotype in vitro and prostaglandin E2 inhibitor can reverse the effect



A: Hematoxylin and eosin staining of representative lung section from each group ( $\times 200$ ). B: The lung injury score was significantly lower in ALI+MSC group. 1)  $P < 0.001$  vs control group; 2)  $P < 0.01$  vs ALI group.

图3 MSC对LPS诱导的小鼠急性肺损伤病理学改变的影响

Fig.3 The effects of MSC on histopathological changes in LPS-induced ALI in mouse

$P < 0.001$ ; 图4A、B), ALI+MSC组( $n=3$ )中INOS阳性细胞比例较ALI组( $n=3$ )明显降低( $5.90\% \pm 0.16\%$  vs  $40.27\% \pm 5.87\%$ ,  $t' = 5.86$ ,  $P = 0.028$ ; 图4C、D)。肺泡灌洗液细胞中的TNF- $\alpha$ 和CD86的mRNA表达水平较ALI组明显降低, CD206和IL-10的mRNA表达水平ALI+MSC组较ALI组明显升高(表3, 图4E)。ELISA结果显示ALI组( $n=3$ )TNF- $\alpha$ 明显升高, ALI+MSC组( $n=3$ )TNF- $\alpha$ 浓度明显降低( $412.3 \pm 6.5$  vs  $527.4 \pm 5.6$ ,  $t = 13.4$ ,  $P < 0.001$ ; 图4F)。

### 3 讨论

急性肺损伤发病诱因复杂, 发病机制不明确, 缺乏有效的治疗手段。在急性肺损伤病程中, 肺泡巨噬细胞可以抵御呼吸道病原体, 并在远端支气管及肺泡中参与炎症反应<sup>[14]</sup>, 是主要的效应细胞<sup>[15]</sup>。但因其根据所处微环境的改变具有向不同表型极化的特性, 使其在急性肺损伤病程中成为一把双刃剑<sup>[16]</sup>。

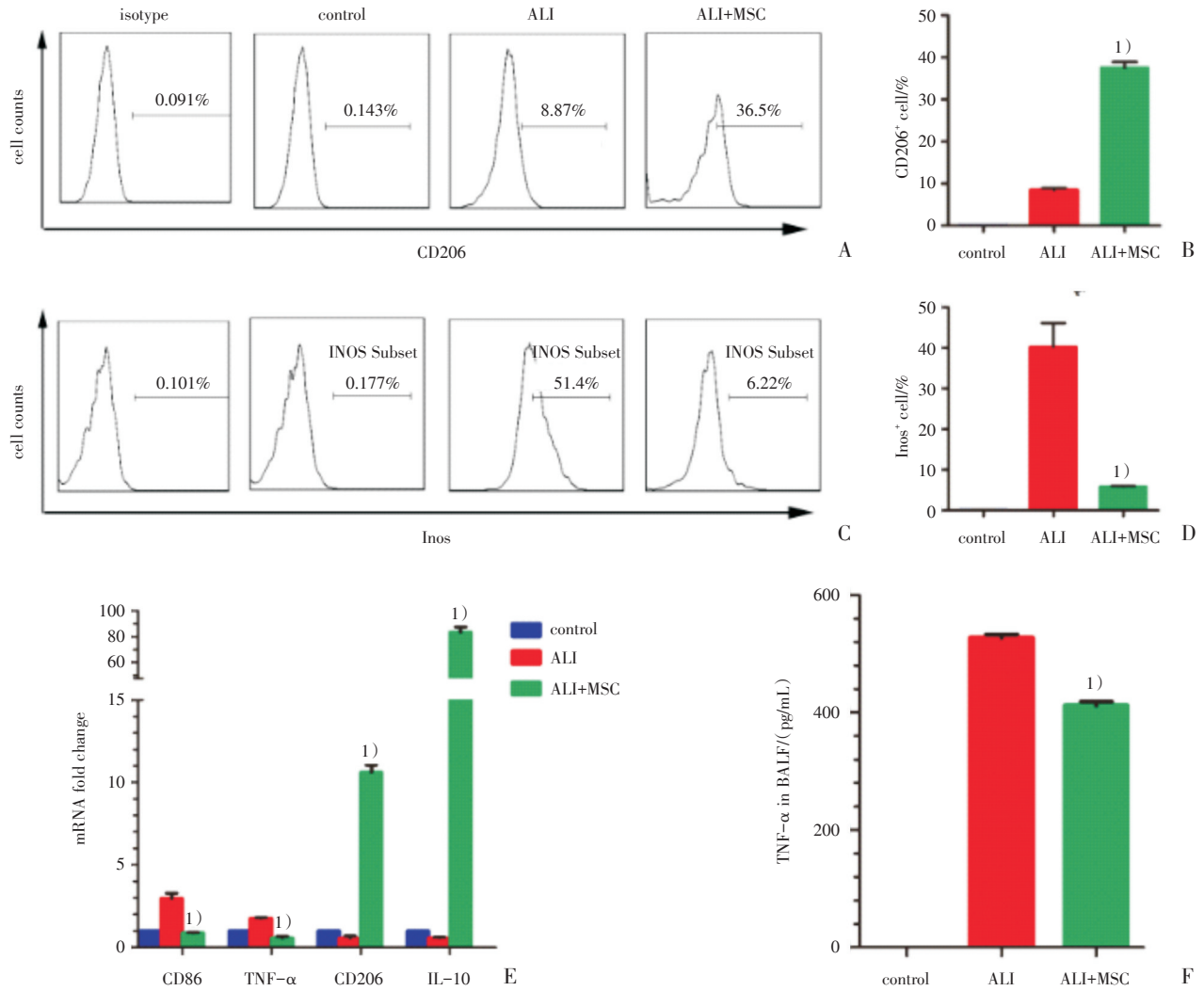
已有研究证实, 输注MSC治疗后可以减少促炎因子的产生, 并能与巨噬细胞相互作用诱导产生IL-10<sup>[16]</sup>。并且MSC可以增强巨噬细胞的吞噬功能及杀菌功能<sup>[14]</sup>, 但是MSC与巨噬细胞之间的相互作用目前并不明确。我们用MSC在体外和小鼠肺泡巨噬细胞系(MH-S细胞)隔离共培养时, 发现MSC可以诱导CD206阳性的细胞增多, 并且IL-10的表达水平也比LPS刺激组明显增加。说明MSC发挥作用并不通过与巨噬细胞直接接触, 而是通过旁分泌途径。许多研究已经证明MSC可以分泌多种可溶性因子, PGE2是其中的一种强效的免疫调节作用的因子。有文献报道, 创伤时, PGE2能促进伤口处的巨噬细胞向M2极化从而促进伤口的修复<sup>[17]</sup>, 也有研究指出在小鼠过敏气道炎症模型中, 当血液中PGE2浓度升高时, 肺中的巨噬细胞向M2极化增多, 并且这种增多可以被PGE2的抑制剂阻止。我们在MH-S和MSC共培养培养体系中加入PGE2、TGF- $\beta$ 、IDO的抑制剂, 发现只有PGE2抑制剂可以明显逆转MSC对M2型巨噬细胞的诱导。有研究证明PGE2

表3 BALF中细胞CD86、TNF- $\alpha$ 、CD206和IL-10 mRNA相对表达水平

Table 3 Relative expression levels of CD86, TNF- $\alpha$ , CD206 and IL-10 mRNA in BALF cells ( $\bar{x} \pm s$ )

Groups	n	CD86	TNF- $\alpha$	CD206	IL-10
ALI	3	2.97 $\pm$ 0.31	1.76 $\pm$ 0.05	0.56 $\pm$ 0.12	0.59 $\pm$ 0.03
ALI+MSC	3	0.88 $\pm$ 0.03	0.57 $\pm$ 0.10	10.62 $\pm$ 0.43	83.33 $\pm$ 4.05
t		6.695 (t')	10.49	22.13	20.41 (t')
P		0.021	0.0005	<0.0001	0.002

ALI: acute lung injury; MSC: mesenchymal stem cell.



A-D: Flow cytometric analysis of percentage of CD206 and INOS positive cells in BALF macrophage. 1)  $P < 0.001$  vs ALI group. E: Detection of CD86, TNF- $\alpha$ , CD206 and IL-10 mRNA in BALF macrophage. 1)  $P < 0.05$  vs ALI group. F: Concentration of TNF- $\alpha$  in BALF. 1)  $P < 0.01$  vs ALI group.

图4 MSC能诱导急性肺损伤小鼠肺泡灌洗液中的M2型巨噬细胞增多

Fig.4 MSC can induce M2 macrophage increase in bronchoalveolar lavage fluid of mice with ALI

部分通过激活 cAMP 途径增强巨噬细胞细胞向 M2 极化,但潜在的机制尚不清,是否还通过其他途径来诱导 M2 极化,仍需我们进一步深入研究。

在本研究中,我们成功建立了小鼠急性肺损伤模型,输注脐带 MSC 后的确能缓解 LPS 诱导的小鼠急性肺损伤症状。MSC 治疗组肺泡巨噬细胞 CD206 阳性的细胞比例明显升高,并且 IL-10 和 Arg1 的表达也是明显升高的。我们从体内体外均

证明 MSC 能抑制炎症反应,促进抑炎因子的产生,在体外可以通过旁分泌途径诱导巨噬细胞向 M2 型极化。并且 MSC 发挥这种治疗作用是通过 PGE2 途径诱导巨噬细胞向 M2 型极化途径,但巨噬细胞发生这种表型改变的具体机制仍需要进一步研究。由此可以为 MSC 用于临床治疗 ALI 提供新的靶点和理论基础。

参考文献:

[1] Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome[J]. N Engl J Med, 2000, 342(18):

1334-1349.

[2] Sweeney RM, McAuley DF. Acute respiratory distress syndrome [J]. Lancet, 2016, 388(10058): 2416-2430.

- [3] Wiedemann HP, Wheeler AP, Bernard GR, et al. Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury[J]. *N Engl J Med*, 2006, 354(24): 2564-2575.
- [4] Horie S, Masterson C, Devaney J, et al. Stem cell therapy for acute respiratory distress syndrome: a promising future?[J]. *Curr Opin Crit Care*, 2016, 22(1): 14-20.
- [5] Hayes M, Curley G, Ansari B, et al. Clinical review: Stem cell therapies for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome—hope or hype?[J]. *Crit Care*, 2012, 16(2): 205.
- [6] Chen X, Zhang Y, Wang W, et al. Mesenchymal stem cells modified with heme oxygenase-1 have enhanced paracrine function and attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory and oxidative damage in pulmonary microvascular endothelial cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(1): 101-122.
- [7] Soliman MG, Mansour HA, Hassan WA, et al. Mesenchymal stem cells therapeutic potential alleviate lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rat model [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2018, 32(11): e22217.
- [8] Morrison TJ, Jackson MV, Cunningham EK, et al. Mesenchymal stromal cells modulate macrophages in clinically relevant lung injury models by extracellular vesicle mitochondrial transfer[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 196(10): 1275-1286.
- [9] Kotas ME, Matthay MA. Mesenchymal stromal cells and macrophages in sepsis: new insights [J]. *Eur Respir J*, 2018, 51(4). doi: 10.1183/13993003.00510-2018.
- [10] Herold S, Mayer K, Lohmeyer J. Acute lung injury: how macrophages orchestrate resolution of inflammation and tissue repair [J]. *Front Immunol*, 2011, 2: 65.
- [11] Danchuk S, Ylostalo JH, Hossain F, et al. Human multipotent stromal cells attenuate lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice via secretion of tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced protein 6 [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2011, 2(3): 27.
- [12] Mei SH, McCarter SD, Deng Y, et al. Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by mesenchymal stem cells overexpressing angiopoietin 1 [J]. *PLoS Med*, 2007, 4(9): e269.
- [13] Mikawa K, Nishina K, Takao Y, et al. ONO-1714, a nitric oxide synthase inhibitor, attenuates endotoxin-induced acute lung injury in rabbits [J]. *Anesth Analg*, 2003, 97(6): 1751-1755.
- [14] Gao S, Mao F, Zhang B, et al. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce macrophage M2 polarization through the nuclear factor- $\kappa$ B and signal transducer and activator of transcription 3 pathways [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2014, 239(3): 366-375.
- [15] Wang Y, Xu Y, Zhang P, et al. Smiglaside A ameliorates LPS-induced acute lung injury by modulating macrophage polarization via AMPK-PPAR $\gamma$  pathway [J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 156: 385-395.
- [16] Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system [J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(5): 383-396.
- [17] Zhang S, Liu Y, Zhang X, et al. Prostaglandin E2 hydrogel improves cutaneous wound healing via M2 macrophages polarization [J]. *Theranostics*, 2018, 8(19): 5348-5361.

(编辑 孙慧兰)