

## 靶向性荧光示踪间充质干细胞治疗急性肺损伤

刘耕龙, 吕海金, 易小猛, 安玉玲, 魏旭霞, 周朝荣, 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】通过构建小鼠急性肺损伤(ALI)模型,示踪间充质干细胞(MSC)治疗急性肺损伤。【方法】以MSC表面神经节苷脂(GD2)特异性抗原靶向的单克隆抗体 Anti-GD2为载体,与荧光菁染料(Cy7)共价结合,得到新型荧光分子探针 Anti-GD2-Cy7。将合成的荧光分子探针 Anti-GD2-Cy7通过抗原抗体反应标记在MSC上。本研究取84只Balb/c雄性小鼠,随机抽取其中48只平均分成三组:假手术组( $n=16$ )、MSC+ALI组( $n=16$ )和NS+ALI组( $n=16$ )。建立ALI模型后,在24 h、48 h时间点进行肺组织形态学观察和病理评分、检测肺湿/干质量(W/D)比值和肺微血管通透性改变。剩余36只Balb/c雄性小鼠随机分为正常组( $n=12$ )、假手术组( $n=12$ )和MSC+ALI组( $n=12$ ),将标记上的MSC-GD2-Cy7通过尾静脉注入假手术组和MSC+ALI组小鼠。分别在尾静脉注射后的30 min及1 d、3 d、7 d各时间点麻醉解剖小鼠后;取其肺在小动物荧光成像仪下进行检测。【结果】模型制备达到ALI水平,无论是治疗后的24 h还是48 h, MSC + ALI组在肺组织的病理及评分、肺组织的水肿程度和肺血管的通透性明显比NS+ALI组轻。荧光检测显示MSC + ALI组在各时间点肺部平均荧光强度显著高于假手术组[( $3.37 \pm 0.02$ ) $\times 10^{-4}$  vs ( $2.05 \pm 0.04$ ) $\times 10^{-4}$  scaled counts/s; ( $35.54 \pm 0.47$ ) $\times 10^{-4}$  vs ( $25.29 \pm 1.48$ ) $\times 10^{-4}$  scaled counts/s; ( $11.17 \pm 0.75$ ) $\times 10^{-4}$  vs ( $6.09 \pm 0.62$ ) $\times 10^{-4}$  scaled counts/s; ( $3.10 \pm 0.14$ ) vs ( $0.00 \pm 0.00$ ) $\times 10^{-4}$  scaled counts/s; 且 $P$ 均小于0.05]。【结论】间充质干细胞在注射后的30 min即可迁移到正常肺和损伤肺中,且在第1天大量的聚集在损伤肺中并持续到第7天;这表明MSC具有在损伤部位聚集的作用。

**关键词:** 荧光探针; 示踪; 间充质干细胞; 急性肺损伤; 聚集

中图分类号: R563

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2017)03-0332-09

### Application of Targeted Fluorescent Visualization Technique to Study Mesenchymal Stem Cells in Treating Acute Lung Injury

LIU Geng-long, LÜ Hai-jin, YI Xiao-meng, AN Yu-ling, WEI Xu-xia, ZHOU Zhao-rong, YI Hui-min

(Surgical Intensive Care Unit, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Corresponding to: YI Hui-min, E-mail: ylhmin@hotmail.com

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the mesenchymal stem cells (MSC) in treating acute lung injury (ALI) via ALI mouse model. 【Methods】 By monoclonal antibody Anti-GD2 of specific antigen ganglioside (GD2) only expressed on MSC as a carrier, new fluorescent molecule probe were synthesized through covalently coupling Anti-GD2 and fluorescent group CyDye mono-reactive NHS Esters (Cy7). Synthetic Anti-GD2-Cy7 and MSC were labeled by the specific binding of antigen and antibody in vitro. Total 84 balb/c male mice were selected and randomly selected 48 mice were divided into three groups: sham group ( $n=16$ ), MSC+ALI group ( $n=16$ ), NS + ALI group ( $n=16$ ). The lung histopathology and scores, lung W/D ratio and permeability of lung microvasculature were examined at 24 h, 48 h after ALI mouse model. Other 36 mice were randomly divided into three groups: normal group ( $n=12$ ), sham group ( $n=12$ ), MSC + ALI group ( $n=12$ ). Labeled MSC-GD2-Cy7 were transplanted into MSC+ALI group and sham group mice via tail vein injection. At 30 min, 1 d, 3 d, and 7 d post-MSC-GD2-Cy7 injection, the mice were sacrificed after anesthesia and then the lung was removed. Excised lung was detected on small animal fluorescent imager. 【Results】 Contrast to NS+ALI group, the lung histopathology and scores, lung W/D ratio and permeability of lung microvasculature of MSC + ALI group were

收稿日期: 2016-12-23

基金项目: 广东省科技计划项目(2014A020211010); 广州市天河区科技计划项目(2013kw028)

作者简介: 刘耕龙, 硕士研究生, E-mail: m15626405844@163.com; 易慧敏, 通信作者, E-mail: ylhmin@hotmail.com

more greatly improved at both 24 h and 48 h. Fluorescent results showed that the signal intensity in the lung of MSC + ALI group was significantly higher than that of sham group at each time point [ $(3.37 \pm 0.02) \times 10^{-4}$  vs  $(2.05 \pm 0.04) \times 10^{-4}$  scaled counts/s;  $(35.54 \pm 0.47) \times 10^{-4}$  vs  $(25.29 \pm 1.48) \times 10^{-4}$  scaled counts/s;  $(11.17 \pm 0.75) \times 10^{-4}$  vs  $(6.09 \pm 0.62) \times 10^{-4}$  scaled counts/s;  $(3.10 \pm 0.14)$  vs  $(0.00 \pm 0.00) \times 10^{-4}$  scaled counts/s; all  $P < 0.05$ ].【Conclusion】 Our study showed that a proportion of cells migrated into normal and injured lungs 30 min after cell transplantation, and the cells started to recruit and largely gather in injured lungs at day 1 and persisted to day 7, these results suggest that MSC possess the ability to home into injured tissues.

**Key words:** fluorescent probe; visualization; mesenchymal stem cells; acute lung injury; gather

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(3):332-340]

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)和急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)在危重患者中具有高的发病率和死亡率,多由胃酸吸入、感染、创伤、脂肪栓塞等引起,感染是最常见原因<sup>[1-3]</sup>。由于发病机制复杂,目前尚缺乏有效的治疗措施,无论何种原因所致急性肺损伤,炎症反应在其病理生理改变中起了重要的作用<sup>[4]</sup>。ALI是多种炎性细胞和炎症因子参与的全身炎性反应综合征,因此调节机体内在或外在的免疫反应,实现促炎与抑炎的平衡对ALI的治疗十分关键<sup>[5]</sup>。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)为多能成体干细胞具有多向分化潜力及强大的免疫调节功能<sup>[6]</sup>。研究证实, MSC可在ALI动物模型中发挥抗炎、免疫调节和抗凋亡等作用,改善肺功能,提高生存率<sup>[7]</sup>。但MSC输入后其在ALI治疗过程中的分布、趋化和定植等生物学行为仍不清晰。目前分子光学成像在科研上得到广泛运用,代表光学探针中的荧光分子探针标记特定的分子或者细胞,其空间分辨率可达mm级。本实验拟采用荧光集团Cy7属于菁染料,其对细胞无毒性<sup>[8]</sup>,无种属、组织和位置特异性,通过标记感兴趣的分子构建成荧光探针并利用灵敏的光学检测仪器示踪细胞的空间和时间分布,从而了解其相关生物学过程;且具有极高的灵敏度、快捷、方便、低成本、相对高通量等诸多优点<sup>[9-11]</sup>,因而近几年发展迅猛。研究发现MSC表面特异性大量表达神经节苷脂(ganglioside, GD2)<sup>[12]</sup>。本研究拟用GD2单克隆抗体为靶向基团,连接于荧光基团,形成荧光探针就可以通过抗原-抗体反应原理,直接识别MSC<sup>[13]</sup>。通过构建小鼠急性肺损伤(ALI)模型,示踪MSC治疗ALI从而探索其治疗过程中的代谢、定植等生物学行为的初步规律,为MSC向临床治疗转化提供一些实验数据支持和科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 实验动物 4~6周龄雄性小鼠Ballb/c 84只,由南方医科大学实验动物中心(许可证号:SCXK(粤)2011-0015)提供。在中山大学北校区实验动物中心SPF级环境中,实验动物的处置方法符合动物伦理学标准。

1.1.2 试剂 Cy7-羟基琥珀酰亚胺酯(Cy7-NHS,北京富百科生物技术有限公司);鼠抗人的GD2单克隆抗体(美国BD公司);LPS(B.E.coli O111:B4 美国Sigma公司);伊文思蓝(Evans blue dye 美国Sigma公司);DMEM/F12培养基(美国Gibco公司);胰蛋白酶(Trypsin 美国Sigma公司);苏木素-伊红(HE 中山大学附属第三医院病理组化室配制);磷酸盐缓冲液(PBS)为自制。

1.1.3 仪器 PD-10柱(美国GE公司);紫外/可见分光光度计(美国Beckman公司);流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司);石蜡切片机(德国SLEE);荧光显微镜(德国Carl Zeiss. Inc公司);酶标仪(瑞士TECAN公司);小动物光学成像系统(美国CRi Maestro)。

本试验中所需的间充质干细胞(MSC)(人脐带间充质干细胞)由中山大学附属第三医院岭南医院生物治疗中心提供,获取冻存细胞后进行解冻、培养、传代;在前期研究中已证实在体内或体外特定诱导条件下具有向脂肪细胞、软骨细胞、骨细胞的分化潜能<sup>[14]</sup>。

### 1.2 Cy7-GD2制备、纯化及鉴定

1.2.1 Cy7-GD2合成及纯化 Cy7-NHS与Anti-GD2的连接参照文献<sup>[15]</sup>方法并略有修改:1 mL 1 mg/mL Anti-GD2加入到预先配好的0.1 mol/L 100  $\mu$ L碳酸氢钠溶液中,该溶液pH约8.3。在1 mL

蛋白溶液中缓慢加入适量染料溶液(蛋白:染料摩尔比=1:30),在暗处常温缓慢搅拌1 h。提前用去离子水填装PD-10柱过夜,使其膨胀,打开孔状结构,加入PBS溶液使其与装填至近满,缓慢的加入荧光蛋白液,用适合大小的EP管收集滤液。

1.2.2 Cy7-GD2的表征及连接到GD2的菁染料Cy7的数目测定(F/P值测定) 分别取Anti-GD2, Cy7-NHS和产物Cy7-GD2样品溶液50  $\mu\text{L}$ 在紫外/可见分光光度计下测定吸收光谱。并测定其在280 nm和750 nm处的吸光度即 $D_{280}$ 、 $D_{750}$ 。已知Cy7和Anti-GD2的摩尔吸光系数分别为250 000和203 000;通过计算样品中的蛋白浓度:蛋白摩尔浓度= $[D_{280}-(D_{750}\times 0.04)]\times$ 稀释倍数/203 000,计算标记比例:F/P=每摩尔蛋白结合的染料摩尔数= $D_{750}\times$ 稀释倍数/(240 000 $\times$ 蛋白摩尔浓度)。

### 1.3 GD2抗原的流式细胞术分析

将冻存间充质干细胞(MSC)解冻、传代,调整细胞密度为 $4\times 10^6/\text{mL}$ ,用4个流式专用管分装细胞悬液,离心8 min弃液后用纸巾吸干流式管口后,在其中2管中加入5  $\mu\text{L}$  Cy7-GD2,在4  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育30 min后加入1 mL PBS液(洗去多余的抗体);再次离心8 min后弃液用纸巾吸干流式管口并拍打加入300~400  $\mu\text{L}$  PBS送检。

### 1.4 模型制备及实验动物分组

1.4.1 模型制备 SPF级4~6周龄雄性小鼠Balb/c 48只。按照Danchuk等<sup>[16]</sup>报道以脂多糖(LPS)诱导急性肺损伤模型。ALI制膜过程(鼻滴法):用10 mL/kg氯胺酮腹腔注射麻醉小鼠,将麻醉好的老鼠以两颗上门牙为勾,悬挂于凹槽线上;先用移液枪将半用量LPS(5 mg/kg)滴于一侧鼻腔,滴完后迅速将小鼠置于双手掌心,左右倾斜45 $^{\circ}$ 来回10次,3 min后再滴另一侧鼻腔,滴完后同上做法,以便LPS在肺中均匀分布。假手术组麻醉后用等量生理盐水(NS)鼻滴处理。

1.4.2 实验动物分组 将实验动物随机平均分成三组,每一组分成24 h、48 h两个时间点,每一组每一时间点8只:假手术组、MSC+ALI组、NS+ALI组,每一组分成两个时间点;在制膜后的4 h假手术组、MSC+ALI组尾静脉注射间充质干细胞( $1\times 10^6$  cells/只重悬于200  $\mu\text{L}$  NS),NS+ALI组在4 h后均尾静脉注射200  $\mu\text{L}$  NS。

### 1.5 模型评估及MSC治疗其有效性的评估

在间充质干细胞(或者生理盐水)注射后的

24 h,48 h麻醉解剖取其肺脏进行评估即:肺组织的病理及形态学评分,肺湿/干质量(W/D)比值测定,肺微血管通透性检测。

1.5.1 肺组织的病理及形态学评分 取右肺下叶,以40 g/L多聚甲醛溶液固定 $\rightarrow$ 脱水机脱水 $\rightarrow$ 石蜡包埋 $\rightarrow$ 切成5  $\mu\text{m}$ 厚度的切片 $\rightarrow$ 苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肺组织病理改变。光学显微镜下根据以下4个项目进行评分:①肺泡充血,②出血,③血管壁肺间隙中性粒细胞集聚或浸润,④肺泡壁增厚或透明膜形成。每一个项目参照的评分标准0分:最轻微损害,1分:轻微损害,2分:中度损害,3分:重度损害,4分:最严重损害,总分作为肺组织的病理评分<sup>[17]</sup>。

1.5.2 肺湿/干质量(W/D)比值测定 取左肺组织,电子天平上称取其湿质量,75  $^{\circ}\text{C}$ 烤箱烤72 h,至质量不再变化,称取其干质量,计算肺组织湿重/干重(W/D)。

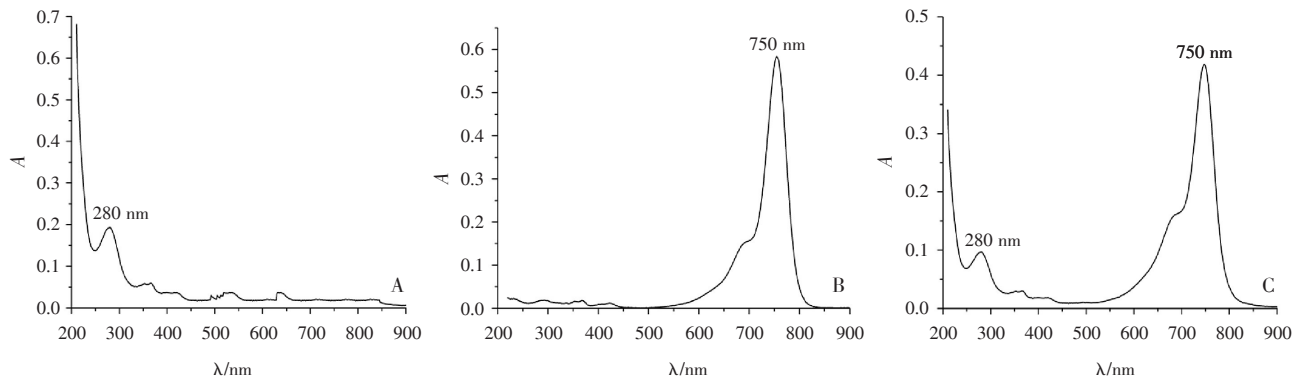
1.5.3 肺微血管通透性检测 采用伊文思蓝荧光(EBD)法检测肺组织微血管通透性法<sup>[18]</sup>,各组动物于设定时间点尾静脉注射伊文思(Evans)蓝(20 mg/kg),30 min后开胸取出肺脏,剪去肺部周围多余的软组织,将肺浸泡于盛有4 mL甲酰胺溶液的EP管中,在60  $^{\circ}\text{C}$ 温箱中温育48 h,使组织中色素与浸泡液中色素达到一致;离心,取上清液,用酶标仪检测其在620 nm下的吸光光度值,根据标准曲线计算Evans蓝含量,用吸光度与肺组织重量之比反映肺血管通透性的变化,结果以肺组织中的染料含量( $\mu\text{g}/\text{g}$ )表示。

### 1.6 体外标记间充质干细胞

将冻存间充质干细胞(MSC)解冻、传代。将其制成细胞悬液,细胞密度 $10^6$  cells/mL,加20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Cy7-GD2于细胞培养皿中,于37  $^{\circ}\text{C}$ ,含体积分数为5%的培养箱中培养孵育1.5 h。用2 mL EP管收集细胞,离心后弃液。加入PBS液重悬标记细胞,离心弃液重复3次。

### 1.7 荧光成像示踪

取SPF级4~6周龄雄性小鼠Balb/c 36只,将其随机分为正常组( $n=12$ )、假手术组( $n=12$ )和MSC+ALI组( $n=12$ )。MSC+ALI组采用LPS鼻滴法制作急性肺损伤模型,假手术组用生理盐水(NS)鼻滴。制膜4 h后将上述标记上的MSC-GD2-Cy7( $1\times 10^6$  cells/只重悬于200  $\mu\text{L}$  NS)通过尾静脉注射入假手术组和MSC+ALI组小鼠,正常



A: Maximum absorption peak of Anti-GD2 only at 280 nm; B: Maximum absorption peak of Cy-NHS only at 750 nm; C: Maximum absorption peak of Cy7-GD2 at 280 nm.

图1 Anti-GD2、Cy-NHS 和 Cy7-GD2 吸光光谱图

Fig.1 Absorption spectra of Anti-GD2, Cy-NHS and Cy7-GD2

组尾静脉注射 200  $\mu$ L NS。分别在尾静脉注射后的 30 min、1 d、3 d、7 d 各时间点麻醉后解剖小鼠；取其肺脏在小动物荧光成像仪下进行检测。并用系统自带 Maestro 2.10.0 软件采集图片及计算荧光灰度值 (scaled counts/s)。

### 1.8 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件分析数据,计数资料采用均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,两组之间均数比较采用独立样本 *t* 检验;多个样本均数采用 ANOVA 分析,以 Bonferroni 法检验进行均数间多重比较;以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 荧光分子探针 Cy7-GD2 的表征

由于每种分子都有自己独特的特征谱线,不同物质的分子结构不同,其吸光光谱表现出相应的特殊性,因此可以通过光谱分析来鉴别物质。众所周知,含有共轭双键的色氨酸、酪氨酸等芳香族氨基酸组成的蛋白质分子,其紫外吸收光谱大约在 280 nm 波长处出现最大吸收峰<sup>[19]</sup>,由于绝大多数蛋白质都含有色氨酸和酪氨酸,可以通过紫外吸收法是分析溶液中蛋白质的浓度和性质。基于上述原理,在全波长激发下分别测定 Anti-GD2 (图 1A)、Cy-NHS (图 1B) 及 Cy7-GD2 (图 1C) 吸光度。从图 1 吸光光谱图可以看出 Anti-GD2 (图 1A)、Cy-NHS (图 1B) 它们分别在 280 nm 及 750 nm 处有最大吸光度。而 Cy7-GD2 在 280 nm 及 750 nm 处均出现了最大吸收峰。说明

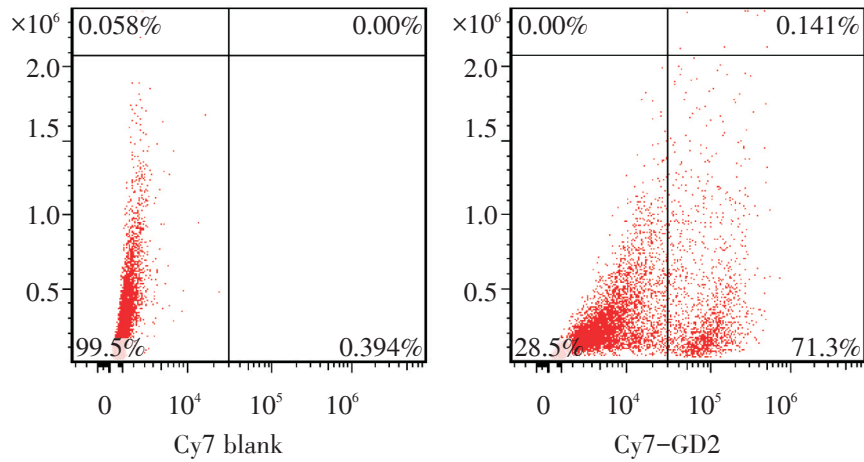
由荧光菁染料 Cy7 和靶向基团 Anti-GD2 共价耦合的产物 Cy7-GD2 很好地保持了两者的特性,并未因两者的连接反应而使其化学结构及生物学特性发生改变。根据 Cy7-GD2 吸光度检测知  $D_{280} = 0.096\ 69$ ,  $D_{750} = 0.415\ 29$ ;  $[Cy7\ dye] = D_{750}/250\ 000 = 0.415\ 29/250\ 000 = 1.66 \times 10^{-6}\ M$   $[peptide] = (D_{280} - 0.04 \times D_{750})/203\ 000 = (0.096\ 69 - 0.04 \times 0.415\ 29)/203\ 000 = 3.9 \times 10^{-7}\ M$   $F/P = [Cy7\ dye]/[peptide] = 4.256$ 。

### 2.2 Cy7-GD2 标记间充质干细胞流式细胞结果

采用流式细胞术检测间充质干细胞表面 GD2 的标记情况。激光波长为 638 nm,收集 710 nm 之后的红色荧光讯号,检测结果显示间充质干细胞的 GD2 抗原的阳性表达率达 71.3% (图 2)。这表明单克隆抗体 Anti-GD2 能通过抗原抗体反应的原理结合到间充质干细胞上且荧光分子探针 Cy7-GD2 对间充质干细胞有较高的标记效率。说明新合成的荧光分子 Cy7-GD2 标记间充质干细胞具有可行性。

### 2.3 急性肺损伤模型建立及 MSC 治疗其有效性的评估

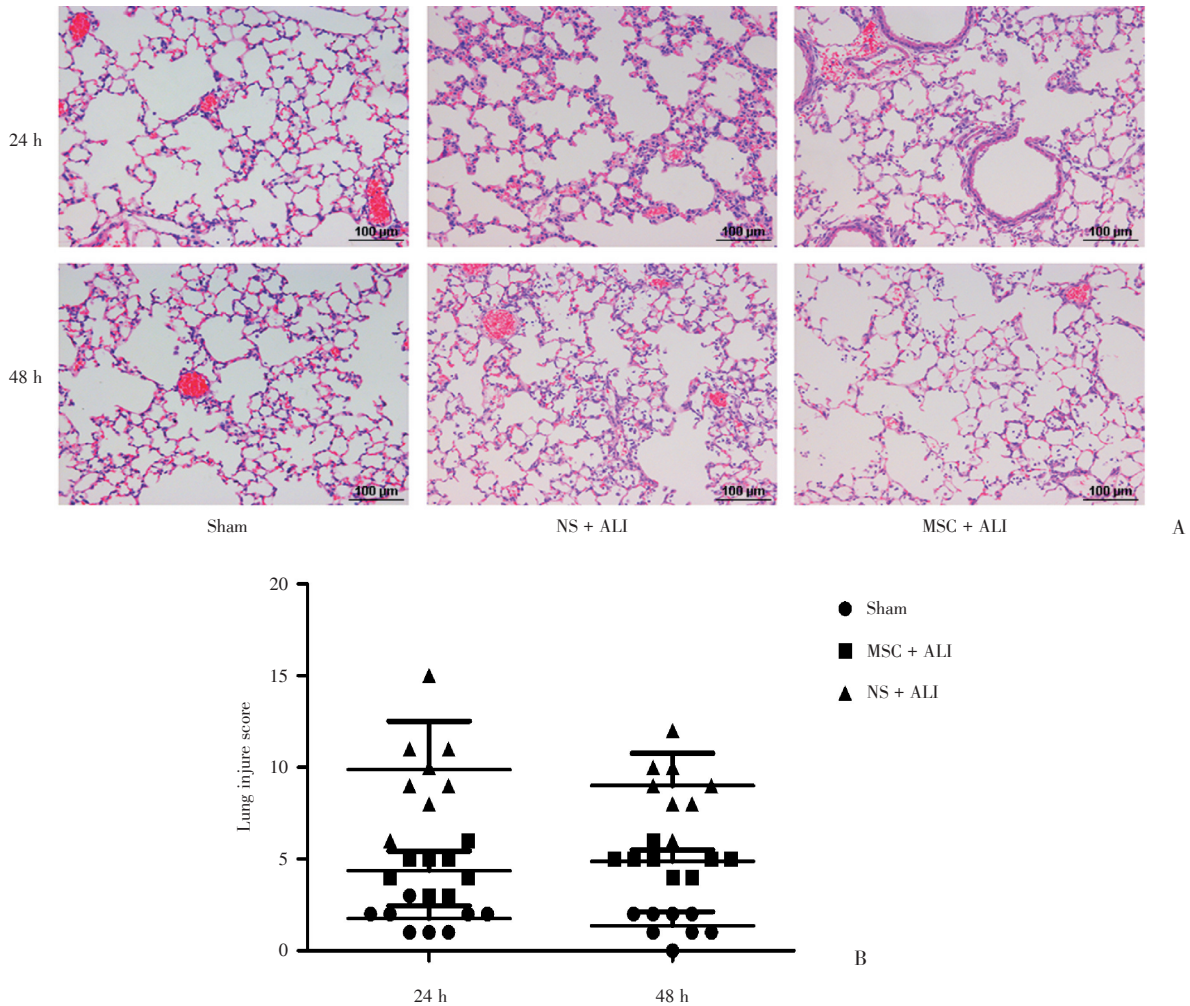
2.3.1 肺组织病理变化和病理评分 各组分别在处理后的 24 h、48 h 分别收集病理标本,将肺组织进行 HE 染色。在光镜下观察病理改变,并进行肺组织病理评分 (图 3)。光镜下观察假手术组小鼠肺组织结构基本正常,肺泡结构清晰,未见明显的充血及出血现象且肺组织病理评分低。NS + ALI 组肺泡腔内可见少量脱落的上皮细胞,肺间质中性粒细胞浸润及增宽,肺泡可见充血及出血,



Flow cytometry figure showing GD2 high expression and marked by MSC(Cy7-GD2 vs Cy7 blank)

图2 流式细胞术检测 Cy7-GD2 标记间充质干细胞

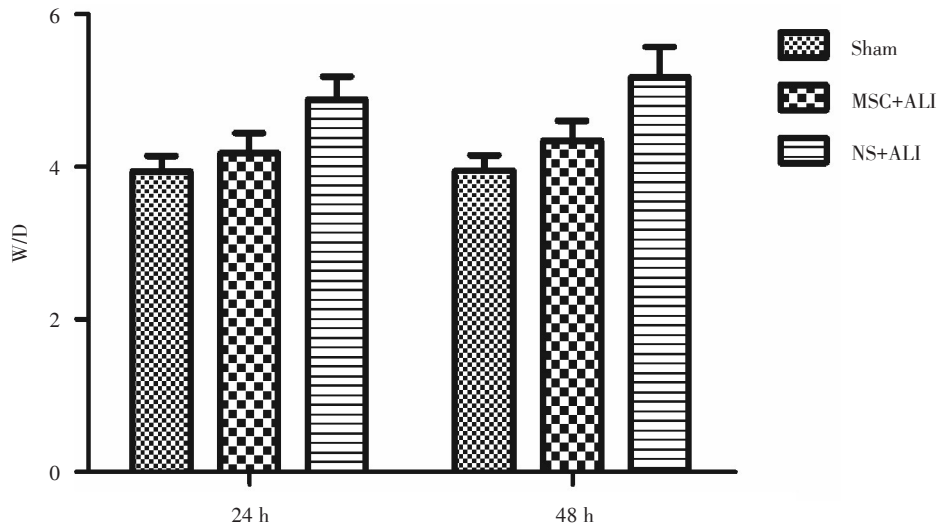
Fig.2 Cy7-GD2 labeled mesenchymal stem cells (MSC) detected by flow cytometry



A: Lung histology assessment of representative lung sections after 24, 48 h by hematoxylin and eosin stained from sham group, NS + ALI group and MSC + ALI group  $\times 20$ . B: H&E staining of lung sections from MSC + ALI group had significantly less injury compared with NS+ALI group at both 24 h and 48 h ( $n = 8$ ). Each point corresponds to the  $\bar{x} \pm s$ .  $P < 0.05$ .

图3 各组在各时间点肺部病理改变及病理评分

Fig.3 Histopathological changes and lung injury score of every group at each time point



MSC + ALI group showed a trend toward lower lung wet-to-dry weight ratio compared with NS + ALI group at both 24 h and 48 h ( $n = 8$ ), Each point corresponds to the  $\bar{x} \pm s$ .  $P < 0.05$ .

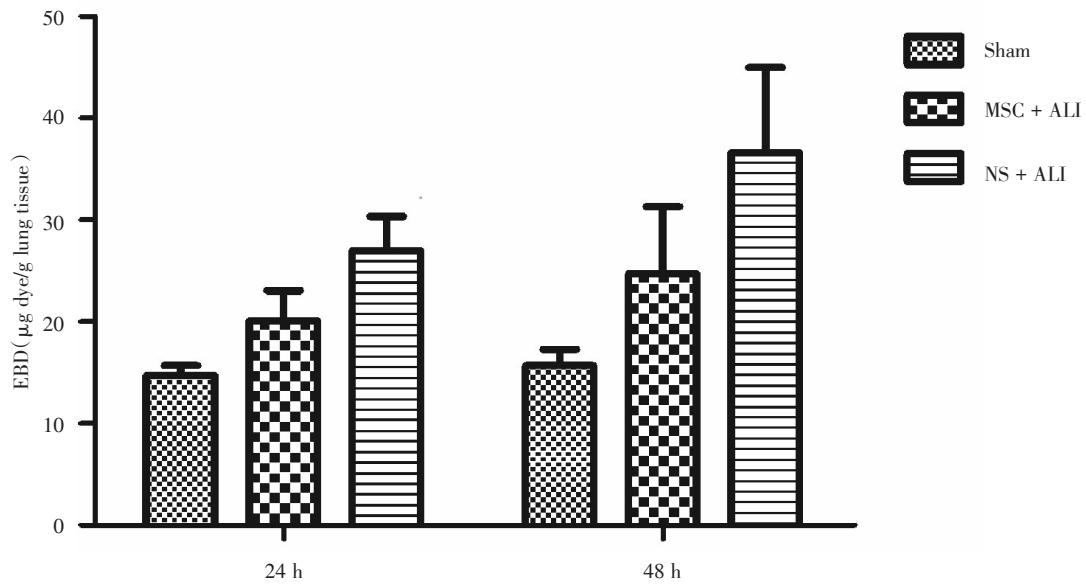
图4 各组在各时间点肺组织湿/干比

Fig.4 Lung wet/dry rate of every group at each time point

少许可见透明膜的形成,部分肺泡壁结构破坏严重。与NS + ALI组相比较,MSC + ALI组肺损伤明显减轻,中心粒细胞浸润明显减少,肺泡壁结构基本完整。24 h、48 h各组肺组织病理评分不同 ( $F = 47.94, P < 0.001$ ;  $F = 85.12, P < 0.001$ ), 差异有统计学意义。NS+ALI组肺组织病理评分与假手术组相比较明显增加,无论24 h ( $P < 0.001$ )还

是48 h ( $P < 0.001$ );而MSC + ALI组与NS + ALI相比肺组织病理评分相对低,无论24 h ( $P < 0.001$ )还是48 h ( $P < 0.001$ )。

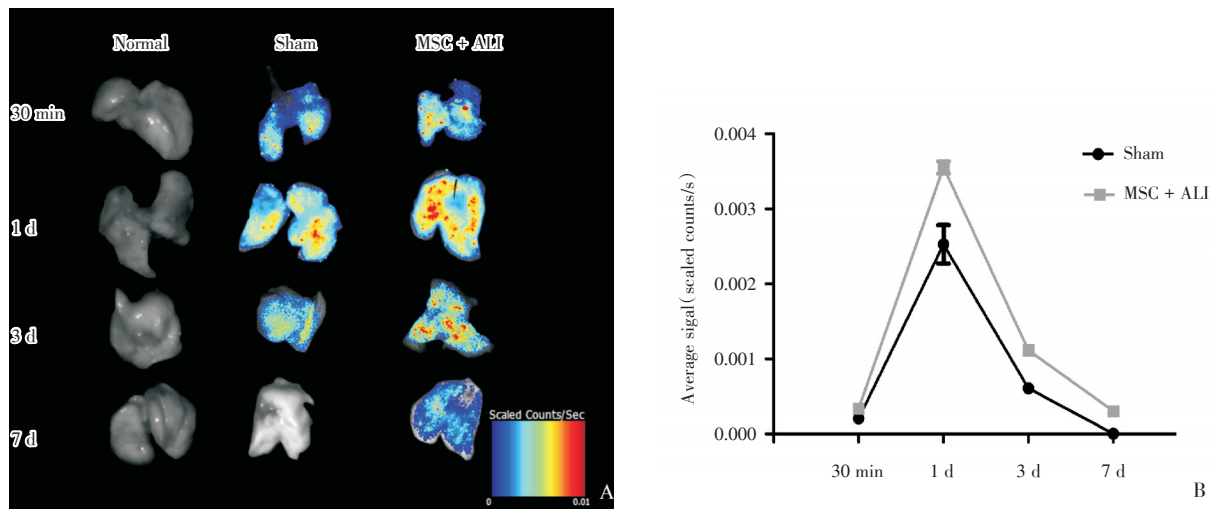
2.3.2 肺湿/干质量(W/D)比值的变化 肺W/D比值用来评估肺水肿的严重程度。24 h、48 h各组肺湿/干质量(W/D)比值不同 ( $F = 25.12, P < 0.001$ ;  $F = 32.49, P < 0.001$ ), 差异有统计学意义。



Contrast to NS+ALI group, the pulmonary microvascular permeability of MSC+ALI group improved significantly at both 24 h and 48 h ( $n = 8$ ). Each point corresponds to the  $\bar{x} \pm s$ .  $P < 0.05$ .

图5 各组在各时间点肺微血管通透性改变

Fig.5 Pulmonary vascular permeability change of every group at each time point



Changes in fluorescence intensity of mouse using optical imaging. A: Near infrared color-coded fluorescence images of mice' lung tissue at 30 min, 1 d, 3 d, and 7 d post-MSCT transplantation. B: The value of the average fluorescent signal intensities in the lung was measured from 30 min to 7 d, each point corresponds to the  $\bar{x} \pm s$ .  $P < 0.05$ .

图6 各时间点肺部荧光示踪图片及荧光灰度值的变化

Fig.6 Changes in fluorescent visualization and fluorescence intensity of every group at each time point

NS + ALI组 W/D 与假手术组相比较明显增加, 无论 24 h ( $P < 0.001$ ) 还是 48 h ( $P < 0.001$ ); 而 MSC + ALI 组与 NS + ALI 相比 W/D 显著减少, 无论 24 h ( $P < 0.001$ ) 还是 48 h ( $P < 0.001$ , 图 4)。

**2.3.3 肺微血管通透性检测** 采用 Evans Blue 法检测肺组织微血管通透性。24 h、48 h 各组 EBD 值不同 ( $F = 42.86, P < 0.001$ ;  $F = 23.16, P < 0.001$ ), 差异有统计学意义。NS+ALI 组肺微血管通透性较假手术组显著增加无论 24 h ( $P < 0.001$ ) 还是 48 h ( $P < 0.001$ ), MSC+ALI 组与 NS+ALI 相比肺微血管通透性也有明显改善, 无论 24 h ( $P < 0.001$ ) 还是 48 h ( $P = 0.003$ , 图 5)。

#### 2.4 荧光成像示踪

荧光示踪显示在间充质干细胞移植后的 30 min 即可在正常肺和损伤肺中检测到。在检测的各个时间点收集示踪图片及计算荧光灰度值(图 6)可知 MSC + ALI 组在各时间点肺部平均荧光强度显著高于假手术组即:  $[(3.37 \pm 0.02) \times 10^{-4} \text{ vs } (2.05 \pm 0.04) \times 10^{-4} \text{ scaled counts/s}, t = 52.92, P < 0.001; (35.54 \pm 0.47) \times 10^{-4} \text{ vs } (25.29 \pm 1.48) \times 10^{-4} \text{ scaled counts/s}, t = 6.60, P = 0.003; (11.17 \pm 0.75) \times 10^{-4} \text{ vs } (6.09 \pm 0.62) \times 10^{-4} \text{ scaled counts/s}, t = 8.94, P < 0.001; (3.10 \pm 0.14) \text{ vs } (0.00 \pm 0.00) \times 10^{-4} \text{ scaled counts/s}, t = 38.87, P < 0.001]$ 。

### 3 讨论

间充质干细胞(MSC)是一种容易贴壁的梭型细胞, 不仅具有多向分化潜能来修复受损伤的组织, 而且具有强大的免疫调节能力能够实现促炎与抑炎的平衡<sup>[20-21]</sup>。因此, 间充质干细胞移植可为在临床上各种疾病提供一种有前景的治疗方法<sup>[22]</sup>。本研究的目的在于运用一种合适的、无侵入性的示踪方法追踪间充质干细胞治疗急性肺损伤的过程。我们合成了一种新型的荧光分子探针且其有效地连接在间充质干细胞上, 用其对间充质干细胞治疗急性肺损伤过程中的代谢、定植等生物学行为的进行了初步研究。我们实验同时证实了 MSC 可有效地减少了急性肺损伤小鼠肺部炎症细胞浸润, 减轻了肺组织的损伤程度, 对炎症性肺损伤具有肺保护作用。从肺组织的病理及形态学评分, 肺湿/干质量(W/D)比值测定和肺微血管通透性检测三方面进行评估。结果显示: 无论是治疗后的 24 h 还是 48 h, MSC + ALI 组在肺组织的病理、肺组织的水肿程度和肺血管的通透性明显比 NS+ALI 组轻。这与之前的研究<sup>[23-24]</sup>是一致的。

目前, 间充质干细胞(MSC)示踪方法大致可

分为核素成像、核磁共振成像、可见光成像、其中可见光成像包括生物发光与荧光成像两种技术<sup>[25]</sup>。MRI是通过对细胞标记超顺磁氧化铁纳米粒子(SPIO)实现示踪,具有极高空间分辨率<sup>[26]</sup>。但是基于核磁共振成像原理,肺组织内H1质子密度很低,信号很弱及灵敏度低,成像效果不能令人满意。核素显像存在对细胞有辐射损伤作用,对细胞及组织的毒性较大甚至存在癌变的风险。而代表光学成像的荧光成像则具有高灵敏度、无毒、无侵入性、快速简便等诸多优点,为一种合适可行的示踪方法。本研究中,Cy7经羧基琥珀酰胺亚胺活化,成开环结构,含有自由氨基结构,通过其酰化作用与Anti-GD2共价结合,形成Cy7-GD2化合物。利用全光谱紫外/可见分光光度计检测及计算可知新型探针Cy7-GD2既保持了Cy7的光学特性,又未改变单克隆抗体Anti-GD2的免疫活性,且每个蛋白标记上了4.25个荧光分子处于最佳标记状态(F/P值在4~9之间是最合适)。通过流式细胞术进行检测荧光探针标记间充质干细胞效率达71.3%,说明新合成的分子探Cy7-GD2标记间充质干细胞具有可行性。

大量的研究证实间充质干细胞在治疗急性肺损伤的过程中主要存在两种不同的修复方式即直接修复方式和间接修复方式,直接方式:干细胞迁移至损伤部位,分化成受损组织细胞,替代凋亡或已坏死的细胞;间接方式:通过分泌多种细胞因子,从而促进受损组织的自身修复和再生<sup>[27]</sup>。然而,目前这两种修复方式谁占主导地位及具体机制仍然不是很清楚。我们的研究发现间充质干细胞移植后30 min即可在迁移至正常肺和损伤肺中,在损伤肺中第1天达高峰然后逐渐的下降并持续到第7天,而在正常肺部第1天出现了峰值后就快速的下降,到第7天就已经消失了。同时,实验组在各时间点肺部间充质干细胞的浓度显著高于假手术组。这结果说明间充质干细胞有向损伤部位迁移及聚集的能力。可能的原因是MSC输注到急性肺损伤模型后,损伤肺所分泌的一系列细胞因子、趋化因子能招募MSC向受损组织归巢从而对其进行修复。

综上,间充质干细胞(MSC)可有效地减少急性肺损伤小鼠肺部炎症细胞浸润,减轻肺组织的损伤程度,对炎症性肺损伤具有肺保护作用。间充质干细胞在注射后的30 min即可迁移到正常肺和

损伤肺中,且在第1天大量的聚集在损伤肺中并持续到第7天;这表明间充质干细胞(MSC)具有向损伤部位聚集的作用。

#### 参考文献

- [1] Zimmerman JJ, Akhtar SR, Caldwell E, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury [J]. *Pediatrics*, 2009, 124 (1): 87-95.
- [2] Sheu CC, Gong MN, Zhai R, et al. Clinical characteristics and outcomes of sepsis-related vs non-sepsis-related ARDS [J]. *Chest*, 2010, 138(3): 559-567.
- [3] Hu X, Qian S, Xu F, et al. Incidence, management and mortality of acute hypoxemic respiratory failure and acute respiratory distress syndrome from a prospective study of Chinese paediatric intensive care network [J]. *Acta Paediatrica*, 2010, 99(5): 715-721.
- [4] Ware LB, Koyama T, Billheimer DD, et al. Prognostic and pathogenetic value of combining clinical and biochemical indices in patients with acute lung injury [J]. *Chest*, 2010, 137(2): 288-296.
- [5] Prockop DJ, Oh JY. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation [J]. *Mol Ther*, 2012, 20(1): 14-20.
- [6] Ren G, Chen X, Dong F, et al. Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues [J]. *Stem Cells Trans Med*, 2012, 1(1): 51-58.
- [7] Ho MS, Mei SH, Stewart DJ. The Immunomodulatory and Therapeutic Effects of Mesenchymal Stromal Cells for Acute Lung Injury and Sepsis [J]. *J Cellular Physiology*, 2015, 230(11): 2606-2617.
- [8] 吴雨龙, 吴向华, 张敦林. 菁染料五甲川菁的遗传毒研究 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2016, 26(2): 135-139. Wu YL, Wu XH, Zhang DL. The genetic toxicity of 5-polymethine cyanine [J]. *Carcinogens, Teratogens & Mutagens*, 2016, 26(2): 135-139.
- [9] Kim DE, Schellingerhout D, Jaffer FA, et al. Near-infrared fluorescent imaging of cerebral thrombi and blood-brain barrier disruption in a mouse model of cerebral venous sinus thrombosis [J]. *J Cereb Blood Flow Metabolism*, 2005, 25(2): 226-233.
- [10] Park K. Polysaccharide-based near-infrared fluorescence nanoprobes for cancer diagnosis [J]. *Quant Imaging Med Surgery*, 2012, 2(2): 106-113.
- [11] Rao J, Dragulescu-Andrasi A, Yao H. Fluorescence imaging in vivo: recent advances [J]. *Current Opinion*

- Biotech, 2007, 18(1):17-25.
- [12] Martinez C, Hofmann TJ, Marino R, et al. Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs [J]. *Blood*, 2007, 109(10): 4245-4248.
- [13] Pang P, Wu C, Shen M, et al. An MRI-visible non-viral vector bearing GD2 single chain antibody for targeted gene delivery to human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *PloS one*, 2013, 8(10): e76612.
- [14] Pan GZ, Yang Y, Zhang J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate hepatic ischemia/reperfusion injuries via inactivation of the MEK/ERK signaling pathway in rats [J]. *J Surgical Research*, 2012, 178(2):935-948.
- [15] 林新峰, 朱华, 洪业, 等. CD20 靶向 Cy7-Rituximab 分子探针的制备及在小鼠活体荧光成像中的应用 [J]. *高等化学学报*, 2013, 34(9): 2139-2145.
- Lin XF, Zhu H, Hong Y, et al. The preparation and application in vivo fluorescence imaging in mice of targeted CD20 Cy7-Rituximab molecular probe [J]. *Chem J chin univ*, 2013, 34(9): 2139-2145.
- [16] 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 therapy*, 2011, 2(3):27.
- [17] 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. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice [J]. *J Immuno*, 2007, 179(3):1855-1863.
- [18] 刘坚, 吕海金, 安玉玲, 等. 间充质干细胞抑制 MEK/ERK 信号通路改善盲肠结扎穿孔所致急性肺损伤中肺泡 II 型上皮细胞的凋亡 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2016, 37(3):367-375.
- Liu J, Lv HJ, An YL, et al. Mesenchymal stem cell protects apoptosis of aec II from cecal ligation and puncture induced acute lung injury via inhibition of MEK/ERK-mediated pathway [J]. *J SUN Yat-sen univ (med sci)*, 2016, 37(3):367-375.
- [19] 朱元荣, 吴丰昌, 林樱. 紫外吸收光谱积分法分析蛋白质浓度以碱性磷酸酶为例 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2013, 33(7):1845-1849.
- Zhu YR, Wu RC, Lin Y. The ultraviolet absorption spectrum integral method analysis protein concentration - a case study of alkaline phosphatase [J]. *Spectrosc and Spect Anal*, 2013, 33(7):1845-1849.
- [20] Zhang B, Liu R, Shi D, et al. Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2-dependent regulatory dendritic cell population [J]. *Blood*, 2009, 113(1):46-57.
- [21] Li H, Guo Z, Jiang X, et al. Mesenchymal stem cells alter migratory property of T and dendritic cells to delay the development of murine lethal acute graft-versus-host disease [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(10):2531-2541.
- [22] Garbern JC, Lee RT. Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration [J]. *Stem Cell*, 2013, 12(6):689-698.
- [23] Tong L, Zhou J, Rong L, et al. Fibroblast Growth Factor-10 (FGF-10) Mobilizes Lung-resident Mesenchymal Stem Cells and Protects Against Acute Lung Injury [J]. *Sci Reports*, 2016, 6:21642.
- [24] Maron-Gutierrez T, Silva JD, Asensi KD, et al. Effects of mesenchymal stem cell therapy on the time course of pulmonary remodeling depend on the etiology of lung injury in mice [J]. *Critical Care Med*, 2013, 41(11):319-333.
- [25] Nguyen PK, Riegler J, Wu JC. Stem cell imaging: from bench to bedside [J]. *Stem Cell*, 2014, 14(4):431-444.
- [26] Wu C, Li J, Pang P, et al. Polymeric vector-mediated gene transfection of MSCs for dual bioluminescent and MRI tracking in vivo [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(28):8249-8260.
- [27] Wang YY, Li XZ, Wang LB. Therapeutic implications of mesenchymal stem cells in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome [J]. *Stem Cell Res Therapy*, 2013, 4(3):45.

(编辑 王晓鹰)