

骨髓间充质干细胞对高氧肺损伤大鼠的治疗作用

张红珊, 方建培, 苏浩彬, 吴燕云
(中山大学孙逸仙纪念医院儿科, 广东 广州 501020)

摘要:【目的】: 观察骨髓间充质干细胞(MSC)对新生大鼠高氧肺损伤的治疗作用。【方法】贴壁法体外培养扩增大鼠骨髓 MSC, 利用携带 GFP 基因的慢病毒液对骨髓 MSC 进行转染; SD 新生大鼠随机分为 A、B、C、D、E 五组, A、B 两组高氧暴露 7 d 后尾静脉分别注射(1×10^5 /只和 1×10^4 /只)骨髓 MSC, C 组注射磷酸盐缓冲液(PBS), D、E 两组为空气组, 分别注射骨髓 MSC 和 PBS, 观察骨髓 MSC 在大鼠肺组织的分布情况、大鼠的体质量增长、肺系数、放射性肺泡计数(RAC)及肺组织的病理改变。【结果】A、B、D 组肺组织中均可见 GFP⁺ 细胞; MSCs 干预 3、7 d, A、B 两组 GFP⁺ 细胞占总细胞数的比例高于 D 组($31.3 \pm 2.6\%$ vs. $11.8 \pm 1.3\%$, A 组 vs. D 组, $22.7 \pm 1.3\%$ vs. $11.8 \pm 1.3\%$, B 组 vs. D 组, $P < 0.05$); A 组治疗第 3、7、14 天 GFP⁺ 细胞占总细胞数的比例高于 B 组, $P < 0.05$; A、B 两组治疗后体质量增长加快(66 ± 9 g vs. 48 ± 7 g, A 组 vs. C 组, $P < 0.05$), 肺系数降低($2.26 \pm 0.23\%$ vs. $2.9 \pm 0.4\%$, A 组 vs. C 组, $P < 0.05$), RAC 值明显增加(9.2 ± 0.7 vs. 7.4 ± 0.4 , A 组 vs. C 组, $P < 0.05$), 肺部炎性反应减轻; A 组对高氧肺损伤的治疗作用优于 B 组, $P < 0.05$ 。【结论】两种剂量的骨髓 MSC 均可以减轻高氧肺损伤, 高剂量组对高氧肺损伤的治疗效果更明显。

关键词: 间充质干细胞; 高氧; 肺损伤

中图分类号: R722

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2013)03-0351-07

Therapeutic Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Rat Hyperoxic Lung Injury

ZHANG hong-shan, FANG jian-pei, SU hao-bin, WU yan-yun

(Department of Pediatrics, Sun Yat-Sen Memorial Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract:【Objective】To investigate the therapeutic effect of bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) in hyperoxic lung injury of neonatal rats.【Methods】Bone marrow MSC cultures were prepared from bone marrow of SD rats by adherent culture, and were transfected by lentiviral vector carrying GFP gene. Newborn rat pups from four different litters were randomized to A, B, C, D, and E groups. Different dose of bone marrow MSC (1×10^5 per pup or 1×10^4 per pup) were injected via the tail vein respectively for A and B groups after 7 days oxygen exposure, and phosphate buffered saline (PBS) for C group. MSCs and PBS were injected respectively for D and E groups as normoxia groups. The engraftment of MSCs in neonatal rat lungs, weight gaining, lung coefficient, radical alveolar counts and lung histology were assessed.【Results】GFP positive cells were found in rats lungs of A, B, D groups; the ratio of GFP-positive cells in A and B groups were higher than that of D group ($31.3 \pm 2.6\%$ vs $11.8 \pm 1.3\%$, A group vs D group, $22.7 \pm 1.3\%$ vs $11.8 \pm 1.3\%$, B group vs D group, $P < 0.05$); the ratio of A group was also higher than that of B group, $P < 0.05$). Bone marrow MSC exerted their therapeutic benefit of improving weight gaining (66 ± 9 g vs 48 ± 7 g, A group vs C group, $P < 0.05$), radical alveolar counts (9.2 ± 0.7 vs 7.4 ± 0.4 , A group vs C group, $P < 0.05$), decreasing lung coefficient ($2.26 \pm 0.23\%$ vs $2.9 \pm 0.4\%$, A group vs C group, $P < 0.05$) and suppressing lung inflammation of neonatal rats, and which were significant better in the high dose group of MSCs treatment than that of low dose group.【Conclusion】Both two doses of bone marrow MSC treatment could attenuate hyperoxia-induced lung injury in newborn rats, and the therapeutic effect of high dose group was more obviously.

Key word: mesenchymal stem cells; hyperoxia; lung injury

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(3):351-357]

收稿日期: 2013-01-15

基金项目: 广东省自然科学基金博士启动项目(S2012040008063)

作者简介: 张红珊, 博士, 主治医师, E-mail: zhhosh@126.com

氧疗是临床治疗新生儿低氧血症最常用方法,但较长时间的高浓度给氧会导致急慢性肺损伤,出现呼吸窘迫、顽固性低氧血症和支气管肺发育不良。如何防治高氧肺损伤是当前国内外新生儿领域研究的难点。近年来干细胞研究不断进展,干细胞技术在肺损伤领域的基础研究和临床应用前景也越来越受到关注。已有研究发现静脉注射骨髓间充质干细胞(MSC)对博莱霉素、细菌脂多糖和内毒素等诱导的肺损伤具有保护作用^[1-8]。骨髓 MSC 能否减轻新生大鼠高氧肺损伤?目前仍不清楚,值得深入研究。为此,我们建立新生大鼠高氧肺损伤模型,经尾静脉注射不同剂量骨髓 MSC,利用荧光标记示踪方法,观察肺组织的病理改变及 MSC 在大鼠肺组织的分布情况,探讨骨髓 MSC 对高氧肺损伤大鼠的治疗作用,为寻求高氧肺损伤新的有效治疗手段奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 动物

骨髓取自4~6周龄,体质量100~150 g,雌雄不限的健康SD大鼠骨髓,由中山大学医学动物实验中心提供。实验动物选取SD清洁级新生大鼠,3日龄,雌雄不限,体质量8~15 g,广东省动物实验中心提供。

1.2 主要试剂

DMEM/F12培养基(Gibco公司),100 mL/L 优质胎牛血清(Gibco公司),0.25%胰蛋白酶-0.02% EDTA(Gibco公司),100 U/mL青/链霉素(Gibco公司),CD29 (BioLegend公司),CD44 (Serotec公司),CD45 (BioLegend公司),CD34 (Santa Cruz公司),聚凝胺 Polybrene(Sigma公司),携带绿色荧光蛋白(GFP)基因的Lentivirus(lentiviral vector: pLV/EX2D-Neo-EF1A-eGFP; virus titre: 1×10^8 TU/mL); Cyagen公司构建。氧气购自广州气体厂。CYES-II型O₂、CO₂气体测定仪CY-100数字测氧仪购自浙江省建德市利达仪器厂。自制25 cm × 25 cm × 35 cm的密封箱:顶部一进气孔(直径0.5 cm),侧面有等大的排气孔,进

气孔持续通入纯氧。

1.3 方法

1.3.1 骨髓 MSC 体外分离培养及慢病毒转染

详见本实验室前期研究^[9]。从SD大鼠股骨提取骨髓细胞,采用全骨髓培养加贴壁选择法进行骨髓间充质干细胞分离、扩增。取融合达90%的第4代(Passage4,P4)MSC,置成 1×10^6 /mL的单细胞悬液,分装于Ep管内,分别加入荧光标记的抗体:PE anti-rat/mouse CD29、PE anti-rat CD44、PE anti-rat CD45、PE anti-rat CD34,应用流式细胞仪分析样本中细胞相应标记抗原的阳性表达率。将P3代约90%融合的细胞传代,按照 2×10^5 /孔密度接种到六孔板中,待细胞融合度已有40%~60%,吸去细胞的培养液,加入1 mL新鲜间充质干细胞完全培养液。在1 mL培养液中加入1 μ L浓度为6 mg/mL聚凝胺(polybrene)。在含有polybrene的培养液中加入慢病毒液,设置3个梯度的病毒添加量15、25和35 μ L,以及一个空白对照孔,以确定转染的最佳感染复数(multiplicity of infection, MOI)。转染16 h后,吸去含病毒的上清液,换对应的细胞完全培养液培养。48 h后,荧光倒置显微镜下开始观察细胞的转染效果,计算转染率。

1.3.2 新生大鼠高氧肺损伤动物模型的建立及实验分组 将新生大鼠(连同母鼠)生后即置于密封箱中持续输入氧气,维持FiO₂ > 95%(测氧仪监测),CO₂ < 0.5%(用钠石灰吸收CO₂),温度22~27℃,湿度50%~70%(用变色硅胶吸收水分),空气对照组则置于相同体积的饲养舱内,除吸入气为空气外,其余条件与高氧组相同。每天定时上午九点开箱1 h,喂水及饲料,更换垫料。高氧组与空气对照组交换母鼠以避免因氧中毒导致喂养能力下降。每天观察记录新生大鼠的存活率、体质量及状态。SD新生大鼠随机分为A、B、C、D、E 5组。A组:高氧暴露7 d后经尾静脉注射MSC, 1×10^5 /只;B组:高氧暴露7 d后经尾静脉注射MSC; 1×10^4 /只;C组:高氧暴露7 d后经尾静脉注射PBS(0.1 mL);经上述处理后以上动物全部置于空气环境中。D、E组均置于空气中,7 d后D组每只经

尾静脉注射 MSC, 1×10^5 /只, E 组每只注射 PBS (0.1 mL)。每组大鼠分别于尾静脉注射 MSC 后 1、3、7、14 d (尾静脉注射后 1 d 每组各 3 只, 其余每个时间点每组各 8 只), 腹腔注射 30 g/L 戊巴比妥钠过度麻醉 1 mL/kg (30 mg/mL) 处死。记录肺湿重, 计算肺系数 (肺重量/体质量 $\times 100\%$) 以反应肺水肿程度。大鼠左上肺常规 HE 染色, 观察肺组织结构的变化。左下肺行冰冻切片 (25 μm), DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) 染细胞核, 荧光显微镜观察下骨髓 MSC 的分布情况。右肺液氮速冻后存于 -80°C 冰箱。

1.3.3 骨髓 MSC 在肺组织分布情况 冰冻切片 DAPI 室温湿盒避光孵育 5 min, 于荧光显微镜下计数每个视野中荧光细胞数。结果判定标准为: 每张切片计数 10 个高倍视野 (400 $\times$) 中同时具有蓝色胞核和绿色荧光的细胞数占 DAPI 染色的细胞核总数的比例。(-) 表示未发现绿色荧光细胞。

1.3.4 放射性肺泡计数 (RAC) 组织切片采用 HE 染色进行光镜检查 RAC 值。每张切片于光镜下 ($\times 100$) 从呼吸性细支气管中心至远端胸膜引一垂直线, 该直线上的肺泡数量即为 RAC, 随机选取 10 个视野, 计算其 RAC 平均值

1.4 统计学分析

应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。计量资料采用均数、标准差表示, 两组资料的均数比较采用 t 检验, 多组资料的均数比较采用 one-way ANOVA 分析; 检验水准设 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 骨髓 MSC 的分离培养与标记

骨髓 MSC 体外分离培养和标记结果详见本实验室前期研究^[9]。分离传代后的 MSC 呈梭形, 贴附于培养瓶, 90% 以上细胞融合, 呈漩涡状、辐射状或鱼群样排列。MSC 传至第 4 代左右, 杂质细胞基本消失。流式细胞术检测结果显示第 4 代 MSC CD29、CD44 表达阳性, 而 CD34、CD45 表达阴性。利用慢病毒对 MSC 进行转染, 转染后的细胞表达 GFP。

2.2 高氧肺损伤新生大鼠一般情况

新生大鼠高氧暴露第 1、2 天时反应好, 脱离氧气后无呼吸困难。第 3 天时进食减少, 离氧后呼吸稍加快。第 7 天时反应差, 少吃少动, 离氧后烦躁不安、呼吸急促、发绀, 恢复供氧可缓解, 死亡率为 8.33%。A、B 组新生大鼠经尾静脉注射骨髓 MSC, C 组新生大鼠经尾静脉注射 PBS。MSC 干预后新生大鼠呼吸困难逐渐缓解, 发绀减轻, 活动度改善, 进食增加, A、B 组新生大鼠的死亡率分别为 9.1% 和 25%。C 组置于空气环境后精神萎靡, 呼吸困难加重, 进食减少, 死亡率高达 54.5%。而 D、E 两组均生长发育正常, 没有上述表现。

表 1 大鼠的体质量增长情况
Table 1 Weight gaining of rats (g, $\bar{x} \pm sD$)

Group	Postinjection D3	Postinjection D7	Postinjection D14
A	20 $\pm$ 4 ¹⁾	29 $\pm$ 5 ¹⁾	66 $\pm$ 9 ¹⁾²⁾³⁾
B	18.5 $\pm$ 1.6 ¹⁾	26 $\pm$ 7 ¹⁾	53 $\pm$ 7 ¹⁾
C	18 $\pm$ 5 ¹⁾	25 $\pm$ 4 ¹⁾	48 $\pm$ 7 ¹⁾
D	33 $\pm$ 6	46 $\pm$ 8	82 $\pm$ 11
E	32 $\pm$ 4	45 $\pm$ 7	80 $\pm$ 11
F	25.100	28.290	22.214

A: High dose MSC- treated hyperoxic group; B: Low dose MSC- treated hyperoxic group; C: PBS- treated hyperoxic group; D: MSC- treated normoxic group; E: PBS- treated normoxic group. 1) $P < 0.05$ each group versus PBS- treated normoxic group; 2) $P < 0.05$ MSC- treated hyperoxic group versus PBS- treated hyperoxic group. 3) $P < 0.05$ high dose MSCs- treated hyperoxic group versus low dose MSC- treated hyperoxic group.

2.3 新生大鼠的体质量增长情况

新生大鼠高氧暴露后出现生长障碍, 体质量减少, 与空气组比较, $P < 0.05$ 。A 组 (1×10^5 /只) 的体质量增长加快, 治疗 14 d 的体质量高于 C 组及 B 组 (1×10^4 /只), $P < 0.05$, 但仍低于 D 和 E 组, $P < 0.05$; B 组的体质量与 C 组的体质量比较, 差别无统计学意义, $P > 0.05$, D 和 E 组不同时间点的体质量比较, 差别无统计学意义, $P > 0.05$ 。

2.4 新生大鼠的肺系数

高氧组不同时间点的肺系数高于空气组, $P < 0.05$; A、B 组第 7、14 天新生大鼠的肺系数均低于

表 2 大鼠的肺系数

Table 2 Lung coefficient of rats (% , $\bar{x} \pm s$)

Group	Postinjection D3	Postinjection D7	Postinjection D14
A	3.6 ± 0.4 ¹⁾	2.26 ± 0.23 ¹⁾²⁾³⁾	1.37 ± 0.29 ¹⁾²⁾³⁾
B	3.8 ± 0.3 ¹⁾	2.6 ± 0.3 ¹⁾²⁾	1.9 ± 0.4 ¹⁾²⁾
C	3.9 ± 0.4 ¹⁾	2.9 ± 0.41)	2.24 ± 0.25 ¹⁾
D	2.06 ± 0.28	1.48 ± 0.18	1.03 ± 0.10
E	2.04 ± 0.24	1.52 ± 0.20	1.06 ± 0.08
F	64.960	43.629	30.766

A: High dose MSC- treated hyperoxic group; B: Low dose MSC- treated hyperoxic group; C: PBS- treated hyperoxic group; D: MSC - treated normoxic group; E: PBS- treated normoxic group. 1) $P < 0.05$ each group versus PBS- treated normoxic group; 2) $P < 0.05$ MSC- treated hyperoxic group versus PBS- treated hyperoxic group. 3) $P < 0.05$ high dose MSC- treated hyperoxic group versus low dose MSC- treated hyperoxic group.

C 组, $P < 0.05$;但仍高于 D 和 E 组, $P < 0.05$ 。A 组第 7、14 天的肺系数亦低于 B 组, $P < 0.05$;D 和 E 组不同时间点的肺系数比较,差别无统计学意义, $P > 0.05$ 。

2.5 新生大鼠的 RAC 计数

高氧组不同时间点的 RAC 计数低于空气组, $P < 0.05$;A 组治疗第 7、14 天的 RAC 计数高于 C 组, $P < 0.05$;但仍低于 D 和 E 组, $P < 0.05$ 。B 组治疗第 14 天 RAC 计数高于 C 组, $P < 0.05$,A 组治疗第 7、14 天的 RAC 计数亦高于 B 组, $P < 0.05$;D 和 E 组不同时间点的 RAC 计数比较,差别无统计学意义, $P > 0.05$ 。

2.6 新生大鼠肺组织的病理改变

高氧暴露 7 d 大鼠肺组织外观可见散在小片状或点状出血,分布于一叶或多叶;光镜下毛细血管扩张、充血、炎性细胞浸润加重,肺组织结构紊乱,肺泡大小不均,有些肺泡融合(图 1A)。两组空气组肺组织外观未见明显改变,7 d 时光镜下可见肺泡结构清楚,大小均一,无液体和炎性渗出;随日龄的增加,肺泡数量增多(图 1B,C)。骨髓 MSC 治疗 14 d 新生大鼠肺组织炎性细胞浸润较 PBS 对照组减轻,无明显肺出血,肺组织肺泡结构较清楚,肺泡数目增加(图 1D)。PBS 对照组仍有炎症细胞浸润,部分有肺出血表现,小肺泡数量减少,

大小不均,部分肺泡融合,肺泡腔扩大(图 1E),提示高氧可导致新生大鼠肺组织损伤,两种剂量的 MSC(1×10^5 /只与 1×10^4 /只)均可以减轻高氧肺损伤,对正常新生大鼠无明显影响。

表 3 大鼠的 RAC 计数

Table 3 RAC of rats ($\bar{x} \pm s$)

Group	Postinjection D3	Postinjection D7	Postinjection D14
A	7.2 ± 0.6 ¹⁾	9.2 ± 0.7 ¹⁾²⁾³⁾	12.5 ± 0.4 ¹⁾²⁾³⁾
B	7.0 ± 0.3 ¹⁾	8.1 ± 1.3 ¹⁾	11.3 ± 0.8 ¹⁾²⁾
C	6.8 ± 0.6 ¹⁾	7.4 ± 0.4 ¹⁾	9.6 ± 0.4 ¹⁾
D	9.3 ± 0.6	11.5 ± 0.6	13.3 ± 0.8
E	9.5 ± 0.6	11.5 ± 0.5	13.3 ± 0.7
F	46.497	52.760	49.909

A: High dose MSC- treated hyperoxic group; B: Low dose MSC- treated hyperoxic group; C: PBS- treated hyperoxic group; D: MSC - treated normoxic group; E: PBS- treated normoxic group. 1) $P < 0.05$ each group versus PBS- treated normoxic group; 2) $P < 0.05$ MSC- treated hyperoxic group versus PBS- treated hyperoxic group. 3) $P < 0.05$ high dose MSC- treated hyperoxic group versus low dose MSC- treated hyperoxic group.

表 4 GFP+ 细胞在肺组织的分布

Table 4 Intensity of fluorescent GFP+ in frozen section (%)

Group	Postinjection D1	Postinjection D3	Postinjection D7	Postinjection D14
A	33.7 ± 2.3	27.8 ± 1.6 ¹⁾²⁾	16.4 ± 1.2 ¹⁾²⁾	9.7 ± 1.1 ²⁾
B	31.3 ± 2.6	22.7 ± 1.3 ¹⁾	11.8 ± 1.3 ¹⁾	5.7 ± 0.7
C	-	-	-	-
D	30.2 ± 2.3	12.3 ± 2.6	4.7 ± 0.8	+/-
E	-	-	-	-
F	1.733	51.120	82.873	32.015

A: High dose MSC- treated hyperoxic group; B: Low dose MSC- treated hyperoxic group; C: PBS- treated hyperoxic group; D: MSC- treated normoxic group; E: PBS- treated normoxic group. 1) $P < 0.05$ each group versus MSC- treated normoxic group; 2) $P < 0.05$ high dose MSC- treated hyperoxic group versus low dose MSC- treated hyperoxic group.

2.7 骨髓 MSC 在肺组织分布情况

MSC 用 GFP 标记后,荧光显微镜下显示为绿色,将标记的 MSC 注入新生大鼠体内,24 h 内 MSC 治疗组肺组织均可见 GFP+ 细胞,细胞分布散

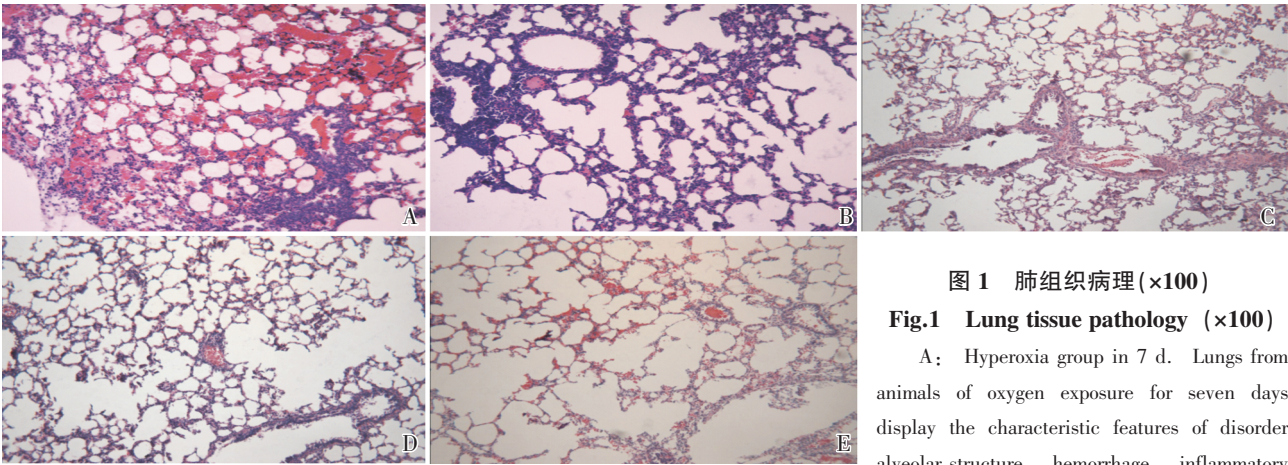


图 1 肺组织病理(×100)

Fig.1 Lung tissue pathology (×100)

A: Hyperoxia group in 7 d. Lungs from animals of oxygen exposure for seven days display the characteristic features of disorder alveolar structure, hemorrhage, inflammatory cell infiltration and interstitial edema. B: Normoxia group in 7 d. Lungs from normoxic animals for seven days appeared normal with clear alveolar structure, uniform size, no liquid and inflammatory exudation. C: PBS-treated normoxia group in 14d.Lungs from animals in the normoxia group who had received PBS appeared normal with numerous small alveoli and thin alveolar septa without lung inflammation. D: High dose MSC-treated hyperoxia group in 14 d. Lungs from high dose MSC-treated hyperoxia group have smaller and more numerous alveoli, thinner septa, and less inflammation. E: PBS-treated hyperoxic group in 14 d Lungs from animals in the hyperoxia group who had received PBS demonstrated enlarged simplified alveoli and lung inflammation.

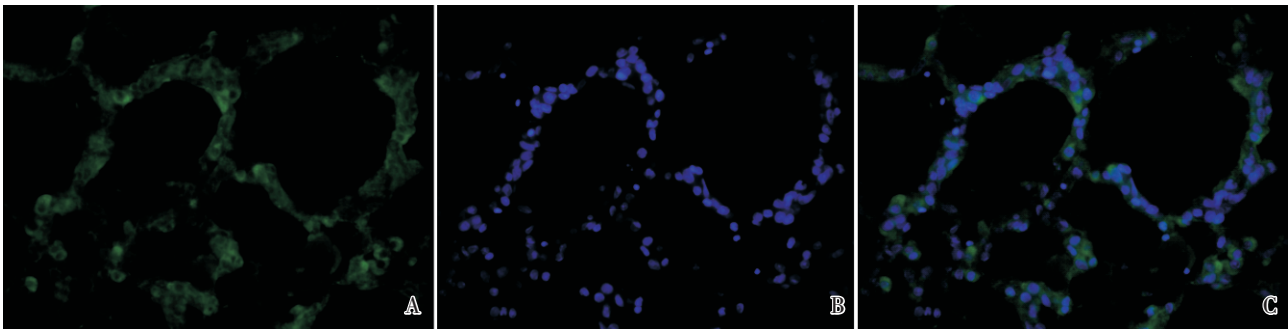


图 2 肺组织免疫荧光图(×400)

Fig.2 Immunofluorescence of frozen lung sections (×400)

A: GFP⁺ cell in lung of high dose MSCs-treated hyperoxia group in 1d; B: DAPI nuclear staining; C: GFP⁺ cell (green) with DAPI nuclear staining (blue).Immunofluorescence of frozen lung sections examined by fluorescence microscopy reveals nuclear staining (DAPI) and colocalization of MSCs in hyperoxic pups within 24 hours after transplantation. GFP⁺ cells with DAPI for nuclear chromatin were found in a same field of fluorescence microscope.

在,部分沿着肺泡壁分布,DAPI 染细胞核后可见蓝色的细胞核,MSC 治疗组大鼠肺组织内可见同时具有蓝色胞核和 GFP⁺ 细胞,图 2 为荧光倒置显微镜下同一视野。而 PBS 干预组大鼠肺组织均未见 GFP⁺ 细胞。MSC 干预 3、7 d,A,B 两组 GFP⁺ 细胞占总细胞数的比例高于 D 组, $P<0.05$;A 组治疗第 3、7、14 天 GFP⁺ 细胞占总细胞数的比例高于 B 组, $P<0.05$;但随着时间延长,A,B,D 组 GFP⁺ 细胞均逐渐减少。

3 讨 论

在肺发育的关键时期,新生动物长时间高氧暴露可阻碍肺泡间隔形成,使肺泡数目减少、肺泡炎和肺血管损伤,表现为肺发育受阻现象^[10-12]。肺发育成熟的重要标志是体积大、数量少的囊泡向体积小和数量多的肺泡转化,因此通常把 RAC 作为评价肺泡发育程度的重要指标。Dauger 等^[13]证实,新生大鼠暴露 90%以上氧浓度 1 周,可导致肺

发育停滞。Warner 等^[14]曾给新生鼠吸入 85% 的氧 28 d, 结果第 7 天就可见鼠模型肺泡分隔受阻、增殖减少, 同时促炎因子白细胞介素-1 α 等表达上调, 提示高浓度氧可为独立的致病因素。高氧肺损伤是一个极其复杂的病理生理过程, 其损伤机制涉及细胞凋亡、血管生成、炎性水肿、细胞外基质重建和组织异常修复等多种因素, 且这多种因素相互影响。高氧肺损伤发病机制尚未完全阐明, 亦无有效的防治措施, 探索其病理机制、寻找更好的治疗手段对提高肺损伤患儿的存活率和改善其生存质量具有重要的意义。近年研究发现, MSC 可以在肺损伤中发挥修复作用。Ortiz 等^[1,2,15]研究发现 MSC 能够减轻博来霉素诱导的肺纤维化。Yamamda 等^[16]认为 MSC 对脂多糖诱导的肺损伤具有保护作用。Xu J 等^[5-6,17]直接气道腔注射 MSC, 发现 MSC 可以提高小鼠的生存率, 减轻内毒素诱导的急性肺损伤。这些研究结果为高氧肺损伤的治疗提供了新思路。骨髓来源间充质干细胞具有高度增殖、自我更新和多向分化潜能, 具有趋向炎症及损伤部位的特性及强大的免疫调节作用, 有望成为高氧肺损伤新的有效治疗手段。

本研究结果显示, 高氧组新生鼠出现生长发育障碍。高氧除了对生长发育的影响, 更主要和直接的是对肺的损害, 由于机体的情况各不相同, 因而在氧中毒的表现上存在着个体间差异, 严重者因肺水肿和出血死亡。高氧造成新生大鼠肺组织发育阻滞, 同时肺部存在肺水肿及炎症反应。脱离高氧环境后, 新生大鼠存在相对缺氧状态, 肺损害还在继续发生, 出现进行性呼吸困难, 发绀, 同时机体逐渐进行自身修复, 但在大多数情况下, 已经受损的肺组织并不能完全恢复至正常状态, 严重者导致死亡。存活的大鼠反应迟钝, 活动度降低。新生大鼠高氧暴露 7 d 后经尾静脉注射骨髓 MSC, 我们发现其体质量增长加快, 肺系数降低, RAC 值明显增加, 肺部炎症反应减轻, 而两组空气组的体质量、肺系数、RAC 值及肺组织的病理改变均无明显差别, 提示静脉注射骨髓 MSC 可以减轻肺水肿和肺部炎症, 改善肺泡发育, 而对正常新生大鼠无影响。有关 MSC 治疗肺损伤的合适剂量尚

无定论。目前 MSC 干预肺损伤的研究剂量范围在 $10^4 \sim 10^6$ 之间。不同的诱导方式、动物和疾病状态, 其用量选择可能不同。肺微血管网中毛细血管的直径为 $10 \sim 15 \mu\text{m}$, 而 MSC 的直径为 $20 \sim 24 \mu\text{m}$, MSC 剂量过多容易引起肺栓塞而死亡。另有研究报道过量 MSC 可能在肺间质中炎症细胞所分泌的某些趋化因子的作用下进入肺间质, 在局部微环境的诱导下分化为肌成纤维细胞加重肺纤维化^[18]。我们研究发现两种剂量的骨髓 MSC (1×10^5 /只与 1×10^4 /只) 均可以减轻高氧肺损伤, 高剂量组对高氧肺损伤的效果更明显, 表明骨髓 MSC 对肺损伤的修复作用与治疗剂量有一定关系, 但更高剂量是存在量效关系还是加重肺纤维化有待更深入研究。

骨髓 MSC 对新生动物高氧肺损伤的保护作用是与其植入肺脏及分化的能力有关还是通过对细胞因子和肺部微环境的免疫调控作用? MSC 在高氧损伤的肺中能否转分化为目标细胞替代损伤的细胞? 这些问题仍不清楚。我们利用荧光标记示踪方法, 观察 MSC 在大鼠肺组织的分布情况, 发现 MSC 治疗组肺组织均可见 GFP⁺ 细胞沿肺泡壁散在分布。而 PBS 干预组大鼠肺组织均未见 GFP⁺ 细胞。高氧组 GFP⁺ 细胞占总细胞数的比例高于空气组, 且高剂量组 GFP⁺ 细胞的比例亦高于低剂量组, 但随着时间延长, 三组 GFP⁺ 细胞均逐渐减少。由于没有对 MSC 在肺脏的定植和分化情况进行流式细胞技术定量检测, 我们只能推测高氧肺损伤时肺组织炎症细胞浸润有可能趋化骨髓 MSC, 使 MSC 进入肺组织及肺泡腔内; 但在肺部的病变过程中, MSC 在肺内的定植水平远不足代替损伤的肺泡上皮细胞, 对细胞因子和机体微环境的调控比替代坏死细胞可能占据更为重要的位置, 其确切机制还需要进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Rojas M, Xu J, Woods CR, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung [J]. *Am J Respir cell Mol Biol*, 2005, 33 (2): 145-152.
- [2] Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, et al. Mesenchymal

- stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(14): 8407–8411.
- [3] Spees JL, Whitney MJ, Sullivan DE, et al. Bone marrow progenitor cells contribute to repair and remodeling of the lung and heart in a rat model of progressive pulmonary hypertension [J]. *FASEB J*, 2008, 22(4): 1226–1236.
- [4] 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.
- [5] Xu J, Woods CR, Mora AL, et al. Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 293(1): L131–141.
- [6] 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]. *Immunol*, 2007, 179(3): 1855–1863.
- [7] Lee JW, Gupta N, Serikov V, et al. Potential application of mesenchymal stem cells in acute lung injury [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2009, 9(10): 1259–1270.
- [8] Lee JW, Fang X, Gupta N, et al. Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of *E. coli* endotoxin-induced acute lung injury in the perfused human lung [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(38): 16357–16362.
- [9] 张红珊, 方建培, 苏浩彬, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞体外培养与慢病毒转染方法的建立 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2011, 19(6): 1472–1476.
- ZHANG hong-shan, FANG jian-pei, SU hao-bin, et al. Culture in vitro and lentivirus transfection of rat mesenchymal stem cells [J]. *J Exper Hemat*, 2011, 19(6): 1472–1476.
- [10] Christou H, Brodsky D. Lung injury and bronchopulmonary dysplasia in newborn infants [J]. *Intensive Care Med*, 2005, 20(2): 76–87.
- [11] Aslam M, Baveja R, Liang OD, et al. Bone marrow stromal cells attenuate lung injury in a murine model of neonatal chronic lung disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 180(11): 1122–1130.
- [12] van Haaften T, Byrne R, Bonnet S, et al. Airway delivery of mesenchymal stem cells prevents arrested alveolar growth in neonatal lung injury in rats [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 180(11): 1131–1142.
- [13] Dager S, Ferkdadj L, Saumon G, et al. Neonatal exposure to 65% oxygen durably impairs lung architecture and breathing pattern in adult mice [J]. *Chest*, 2003, 123(2): 530–538.
- [14] Warner BB, Stuart LA, Papes RA, et al. Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice [J]. *Am J Physiol*, 1998, 275(1): L110–L117.
- [15] Ortiz LA, Dutreil M, Fattman C, et al. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(26): 11002–11007.
- [16] Yamada M, Kubo H, Kobayashi S, et al. Bone marrow-derived progenitor cells are important for lung repair after lipopolysaccharide-induced lung injury [J]. *Immunol*, 2004, 172(2): 1266–1272.
- [17] Kim ES, Chang YS, Choi SJ, et al. Intratracheal transplantation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells attenuates *Escherichia coli*-induced acute lung injury in mice [J]. *Respir Res*, 2011, 12(1): 108–110.
- [18] James AF, Quanfu M, Sravanthi G, et al. Fate and effects of adult bone marrow cells in lungs of normoxic and hyperoxic newborn mice [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009, 40(5): 575–587.

(编辑 张思健)