

胎牛肺间充质干细胞对脂多糖介导 小鼠急性肺损伤治疗的研究

殷佳辉¹, 王 琪^{2,3}, 孙宇辰⁴, 朱晓峰¹, 乔 峰¹, 邹志田¹

(1.佳木斯大学附属第一医院心胸外科,黑龙江 佳木斯 154002;

2.佳木斯大学基础医学院,黑龙江 佳木斯 154002;

3.佳木斯传染病医院检验科,黑龙江 佳木斯 154002;

4.佳木斯大学生命科学学院,黑龙江 佳木斯 154002)

摘要:目的 探讨胎牛肺间充质干细胞的生物学特性及其对脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤的治疗修复作用。方法 采用脂多糖(LPS)对小鼠进行直接腹腔灌注,造小鼠急性肺损伤模型,采用胎牛肺间充质干细胞(LMSCs)对小鼠进行注射治疗,通过观察组织学切片及血清学检测对小鼠肺损伤程度及预后进行评估。结果 成功分离出胎牛 LMSCs,细胞形态多呈长梭形或纺锤形,核质比大,边缘不规则。RT-PCR 检测显示,胎牛 LMSCs 阳性表达 CD29、CD44、CD166 和 CD73,不表达 CD31。免疫荧光检测显示,胎牛 LMSCs 阳性表达 CD29、CD73、CD44 和 CD166。病理学切片显示,对照组小鼠肺泡壁结构完整,肺泡间质无渗出大小相近,存在正常的肺泡结构,无炎症细胞出现在管壁及周围,无胶原蛋白沉淀;损伤组小鼠肺组织出现大面积肺泡结构受损,大多数正常肺泡结构消失,肺泡腔改变可见变形闭塞,大量炎症细胞浸润,结构变性和异常的胶原蛋白沉淀,损伤作用时间越长,损伤程度加重;治疗组小鼠在 LMSCs 移植治疗后肺损伤病变面积和损伤程度较损伤组下降,可见炎症细胞浸润减少、间质有所增厚及胶原少量沉积,肺切片更接近于正常肺组织肺泡形态。ELISA 血清检测显示,损伤组 6、24、48 h 血清 TNF- α 、IL-4、IL-6 水平高于治疗组和对照组,且治疗组高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 胎牛 LMSCs 在体外培养体系中可以稳定的保持其生物学特性,低代次 LMSCs 具有良好的增殖活性及分泌细胞因子的能力,可以有效降低 LPS 诱导的小鼠急性肺损伤血清中 TNF- α 水平,参与调控 IL-4、IL-6 的分泌及免疫应答作用,对急性炎症反应有一定治疗作用。

关键词:肺间充质干细胞;脂多糖;急性肺损伤

中图分类号:R363.2+2

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2021.10.022

文章编号:1006-1959(2021)10-0078-05

Research on Fetal Bovine Lung Mesenchymal Stem Cells on Lipopolysaccharide-induced Acute Lung Injury in Mice

YIN Jia-hui¹, WANG Qi^{2,3}, SUN Yu-chen⁴, ZHU Xiao-feng¹, QIAO Feng¹, ZOU Zhi-tian¹

(1.Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154002, Heilongjiang, China;

2.School of Basic Medicine, Jiamusi University, Jiamusi 154002, Heilongjiang, China;

3.Department of Laboratory Medicine, Jiamusi Infectious Disease Hospital, Jiamusi 154002, Heilongjiang, China;

4.College of Life Sciences, Jiamusi University, Jiamusi 154002, Heilongjiang, China)

Abstract: **Objective** To investigate the biological characteristics of fetal bovine lung mesenchymal stem cells and their therapeutic and repair effects on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **Methods** Lipopolysaccharide (LPS) was used to infuse mice directly into the abdominal cavity to create a mouse model of acute lung injury. The mice were injected with fetal bovine lung mesenchymal stem cells (LMSCs). The histological sections and serological examinations were carried out. The degree of lung injury and prognosis of mice were evaluated. **Results** The fetal bovine LMSCs were successfully isolated, and the cell morphology was mostly long fusiform or spindle-shaped, with large nucleus to cytoplasmic ratio and irregular edges. RT-PCR detection showed that fetal bovine LMSCs positively expressed CD29, CD44, CD166 and CD73, but did not express CD31. Immunofluorescence detection showed that fetal bovine LMSCs positively expressed CD29, CD73, CD44 and CD166. The pathological section showed that the structure of the alveolar wall of the mice in the control group was intact, the alveolar interstitium had no exudation of similar size, there was a normal alveolar structure, no inflammatory cells appeared on and around the tube wall, and there was no collagen precipitation. The lung tissues of the mice in the injury group showed large areas of alveolar structure damage, most of the normal alveolar structure disappeared, the alveolar cavity changes showed deformation and occlusion, a large number of inflammatory cell infiltration, structural degeneration and abnormal collagen precipitation. The longer the damage action time, the more severe the damage. After LMSCs transplantation, the area and extent of lung injury of the mice in the treatment group were lower than those in the LPS group. The infiltration of inflammatory cells was reduced, the interstitium was thickened, and the collagen was slightly deposited. The lung slices were closer to the alveolar morphology of normal lung tissue. ELISA serum test showed that the serum levels of TNF- α , IL-4, and IL-6 in the injury group were higher than the treatment group and the control group at 6, 24, and 48 h, and the treatment group was higher than the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Fetal bovine LMSCs can maintain their biological characteristics stably in an in vitro culture system. Low-passage LMSCs have good proliferation activity and cytokine secretion ability, which can effectively reduce TNF- α in serum of mice with acute lung injury induced by LPS. It participates in the regulation of IL-4 and IL-6 secretion and immune response, and has a certain therapeutic effect on acute inflammatory reactions.

Key words: Pulmonary mesenchymal stem cells; Lipopolysaccharide; Acute lung injury

基金项目:黑龙江省卫健委科研课题(编号:2020-336)

作者简介:殷佳辉(1986.2-),男,黑龙江佳木斯人,硕士研究生,主要从事胸部疾病及干细胞治疗工作

通讯作者:邹志田(1962.5-),男,黑龙江佳木斯人,博士,主任医师,教授,硕士生导师,主要从事胸部疾病微创治疗工作

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是一种具有自我更新能力和多向分化能力的多能干细胞^[1-4]。病理状态下,间充质干细胞可以在炎症介质的刺激下,通过迁移和归巢作用参与损伤部分的修复^[5],也可以通过静脉或局部注射路径迁移到损伤部位,进而发挥一系列生物效应^[6]。因 MSCs 表面表达低水平 I 型白细胞抗原(HLA),不表达 II 型主要组织相容性抗原(MHC-II)和 T 细胞共刺激分子,具有低免疫原性,可为异体 MSCs 治疗提供理论依据^[7]。急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是急性肺损伤(ALI)最严重的形式,病死率较高,目前尚无特异有效的治疗措施^[8],因此研究的重点仍是寻找有效的治疗方法。本研究对胎牛肺间充质干细胞 (lung-derived mesenchymal stem cells, LMSCs) 进行分离培养及鉴定,并通过腹腔注射 LPS 造小鼠急性肺损伤模型,然后将 LMSCs 移植到急性肺损伤的小鼠体内,观察 LMSCs 对急性肺损伤治疗作用,为异源干细胞进行临床治疗提供实验理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源 本实验对象 3 个月龄胎牛购自中国农科院家畜实验基地,6 周龄雄性小鼠购自北京华阜康生物有限公司。LPS 购自北京索莱宝科技有限公司, α -MEM 培养基、胎牛血清(FBS)、山羊血清、谷氨酰胺购自美国 GIBCO 公司;胰蛋白酶(Trypsin 1:

250)、Triton X-100IV 型胶原酶、PI 购自美国 Sigma 公司;多聚甲醛和青链霉素购自北京化工厂;小鼠抗牛抗体购自 Abcam 公司产品;FITC 标记兔抗小鼠二抗购自中杉金桥;RNA 提取试剂盒 TRI reagent、反转录试剂盒和 extap 酶购自 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 胎牛 LMSCs 的分离培养 取 3 月龄流产胎牛肺脏,在准备间初步消毒后移至细胞间无菌操作台内,连同取样工具一同紫外照射 15 min,剖开胎牛胸腔,完整取出胎牛肺脏至培养皿内,然后用无菌眼科镊子、眼科剪缓慢剥离胸膜,将肺组织及支气管用 PBS 反复冲洗 10 遍,去除血细胞等杂质,将清洗干净的肺组织及支气管剪成约 1~3 mm² 组织碎块,转移至新养皿中,加入 10 ml 0.2% IV 型胶原酶,移至 37 ℃ 的 5% CO₂ 培养箱中酶消 30 min~1 h,直至组织出现匀浆时取出,终止消化,过筛,离心,重悬,制单细胞悬液,接种到新皿,CO₂ 培养箱培养,标记 P0 代,定期换液当细胞达 90% 融合时可细胞传代,传代比例为 1 传 2。

1.2.2 胎牛肺 LMSCs 的生长曲线 选取 P5、P10 及 P15 代 LMSCs,以 1.0×10^4 个/ml 密度接种到 24 孔板培养,取对数生长期 LMSCs 用血球计数板进行细胞计数。

1.2.3 RT-PCR 鉴定 登录 NCBI 网站,检索获取 LMSCs 基因序列并设计引物(表 1),对 LMSCs 进行基因学鉴定。

表 1 LMSCs 基因引物序列

基因名称	引物序列	产物长度	退火温度(℃)	登录号
CD29	F:GGAAACGTTTTTGCCCCAC R:CTTCTGGCTGCAGCTTCTCT	362	60	XM_025000308.1
CD44	F:AACCCAGGCACCCACTACTA R:CGAGCCGTAGTCTCGAGTTG	379	60	XM_015474840.1
CD73	F:TGGGAGGAATTCACGTGGTG R:TGGATCCGACCTTCAACTGC	286	60	XM_019967401.1
CD166	F:GCCATGTGGAAGGTTTTCCG R:TCTTTGTTTTTCATTAGCAGAGACAT	217	59	XM_019974232.1
GAPDH	F:GGTCGCCGCATCTCCG R:GCAGGACTTGCCCTTGATCT	340	60	XM_024981197.1
CD31	F:CCGGCGGGTGCCAGATTA R:AAGCCCCCGTTTTGCAGTA	469	62	NM_002006.5

1.2.4 免疫荧光鉴定 取 P5 代纯化后的 LMSCs, LMSCs 生长达皿底 70% 左右时弃旧培养基, PBS 反复冲洗, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 0.25% Triton X-100 通透 10 min, PBS 漂洗, 10% 山羊血清阻断非特异性抗体, 加一抗(鼠抗牛 CD29、CD44、CD73、CD166)避光孵育 1 h, PBS 漂洗, 滴加 FITC 标记兔抗鼠 IgG 二抗 30 min, PBS 漂洗后 DAPI 染色 1 h, 加少量 PBS 移至共聚焦显微镜下观察。

1.2.5 动物模型准备 准备 72 只雄性小鼠, 随机分为 3 组, 标记为对照组、损伤组(LPS 组)及治疗组(LPS+LMSCs 组), 小鼠需进行 2 周适应性饲养。对照组行腹腔注射生理盐水, 剂量为 10 mg/kg, 损伤组行腹腔注射 LPS(10 mg/kg), 治疗组先行腹腔注射 LPS 后立即给予移植 LMSCs, 移植密度 1×10^6 /皿。在每组中设置 3 个时间节点: 6、24、48 h 处理小鼠, 每个时间节点设置 3 组平行组。

1.2.6 小鼠模型 ELISA 检测 采血管收集小鼠血清,在 2℃~8℃ 环境下静置 1~2 h, 3000 r/min 离心 15 min, 取上清液备 ELISA 检测。

1.3 统计学方法 利用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析并绘制图表。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间比较采用 Student's *t* 检验, 多组间比较采用 One-way ANOVA with Tukey's post hoc 检验。当 $P < 0.05$ 时表示差异有统计学意义。

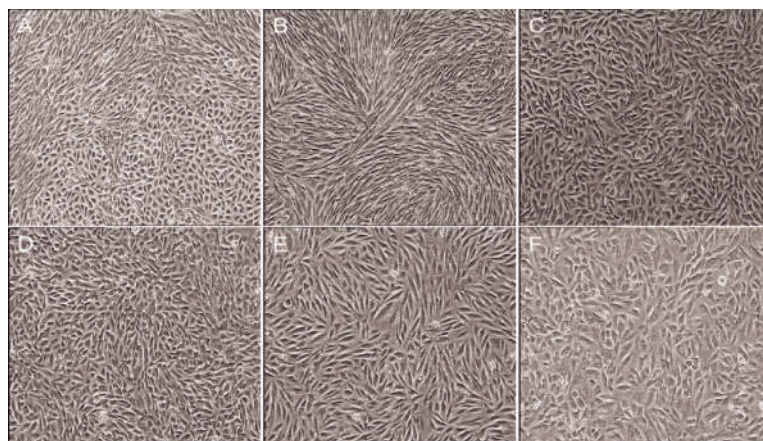
2 结果

2.1 胎牛 LMSCs 的形态观察 利用倒置显微镜观察, 采用酶消化及贴壁法分离培养出的贴壁生长的 LMSCs 形态, 可见原代初期细胞生长缓慢成团生长, P3 以后细胞形态整体稳定, 立体感减弱, 细胞多呈长梭形或纺锤形, 核质比大, 边缘不规则。胎牛肺间充质干细胞至少可传至 15 代以上, P15 以后生长速度减

缓, 细胞形态出现扁平不规则样生长。研究证明体外分离、培养的胎牛肺间充质干细胞在适宜的培养条件下可以增殖并维持干细胞生长特性, 见图 1。

2.2 生长曲线测定 利用血球计数板对 P5、P10、P15 的 LMSCs 进行细胞计数, 由生长曲线可见 LMSCs 增殖均依次经历潜伏期、对数生长期及平台期。潜伏 1~2 d 后细胞增殖迅速, 约 7 d 增殖减慢进入平台期。群体倍增时间随代次增高而延长。考虑细胞增殖速度与细胞活力相关, 本实验后期选用纯化后的 P5 代细胞进行 LMSCs 的移植治疗, 以期最佳治疗修复作用, 见图 2。

2.3 RT-PCR 检测表面标记物 经 RT-PCR 鉴定, 细胞表达 CD29、CD44、CD73、CD166, 不表达 CD31, 证明分离培养的细胞确定是 LMSCs, 见图 3。



注: A~B: P0; C: P3; D: P5; E: P10; F: P15

图 1 LMSCs 的形态学观察($\times 40$)

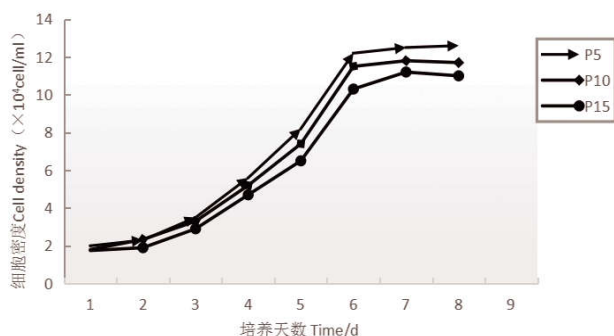
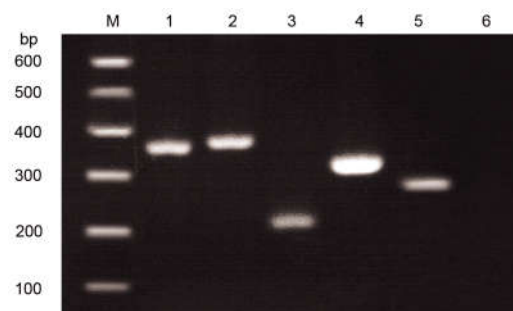


图 2 LMSCs 生长曲线

2.4 免疫荧光检测表面标记物 LMSCs 阳性表达 CD29、CD44、CD73 和 CD166, 证明所分离培养的细胞为 LMSCs, 见图 4。

2.5 病理学切片观察 镜下观察对照组小鼠肺泡壁结构完整, 肺泡间质无渗出大小相近, 存在正常的肺泡结构, 无炎症细胞出现在管壁及周围, 无胶原蛋白沉淀。损伤组小鼠肺组织出现大面积肺泡结构受损, 大多数正常肺泡结构消失, 肺泡腔改变可见变形闭塞, 大量炎症细胞浸润, 结构变性和异常的胶原蛋白

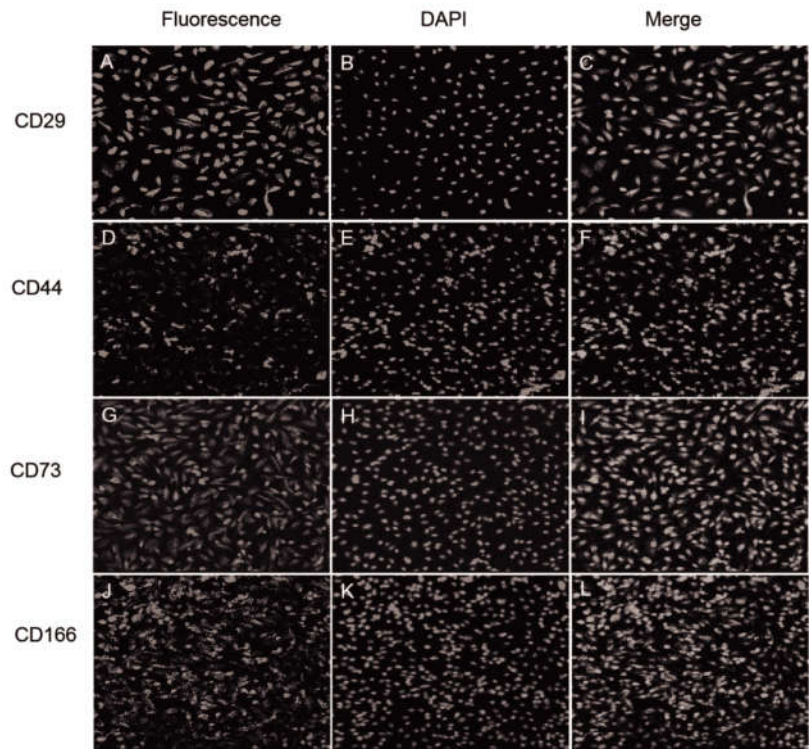


注: M: Marker; 1: CD29; 2: CD44; 3: CD166; 4: GAPDH; 5: CD73; 6: CD31

图 3 LMSCs 的 RT-PCR 检测

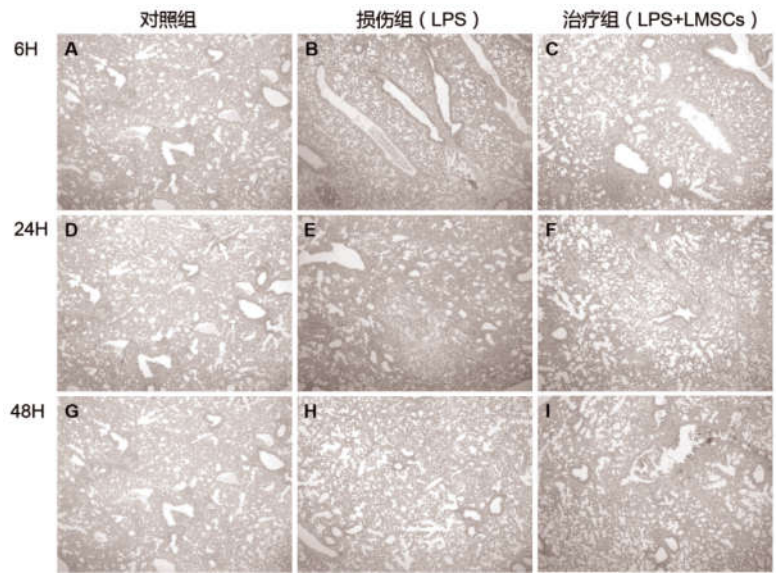
沉淀, 损伤作用时间越长, 损伤程度加重。治疗组小鼠在 LMSCs 移植治疗后观察肺损伤病变面积和损伤程度较 LPS 组下降, 可见炎症细胞浸润减少、间质有所增厚及胶原少量沉积, 肺切片更接近于正常肺组织肺泡形态, 见图 5。

2.6 ELISA 血清检查结果分析 损伤组 6、24、48 h 血清 TNF- α 、IL-4、IL-6 水平高于治疗组和对照组, 且治疗组高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 6。



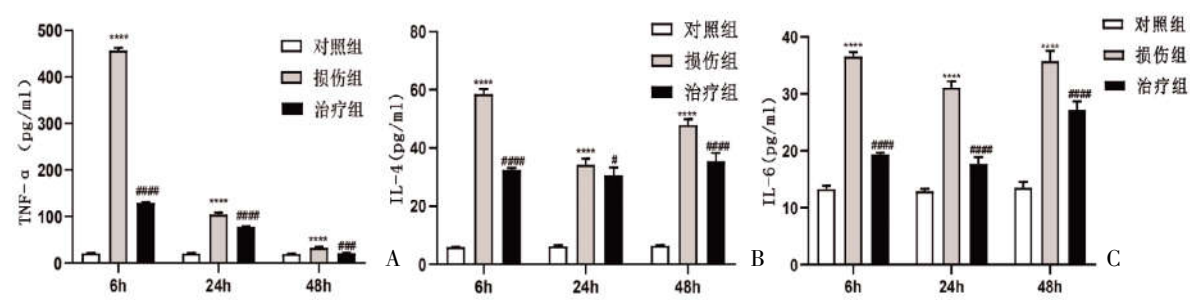
注:A、D、G、J:荧光 FITC 胞质染色;B、E、H、K:DAPI 胞核染色;C、F、I、L:FITC 与 DAPI 的叠加图

图 4 LMSCs 表面标记荧光表达(×40)



注:A、D、H:对照组 6、24、48 h 时间节点;B、E、H:损伤组 6、24、48 h 时间节点;C、F、I:治疗组 6、24、48 h 时间节点

图 5 小鼠急性肺损伤模型 HE 染色病理学改变(×40)



注:A:小鼠血清 TNF-α 浓度;B:小鼠血清 IL-4 浓度;C:小鼠血清 IL-6 浓度;*表示对照组和损伤组比较,#表示损伤组和治疗组相比较

图 6 小鼠模型 ELISA 血清学检查结果

3 讨论

目前 MSCs 已从骨髓、脂肪组、脐带血组织等组织中成功分离并用于相关动物实验及临床试验当中,但鲜有 LMSCs 用于 ALI 治疗的研究报道,本实验成功从 3 个月胎龄牛肺中分离出 LMSCs,在体外培养过程中,当细胞传至第 P5 代,已经基本获得纯化的 LMSCs。低代次的间充质干细胞增殖速度较快,随着代次的增加,增殖速度逐渐降低。低代次的 LMSCs 细胞形态稳定,多呈纺锤形或长梭形,随着培养代次的逐渐升高,LMSCs 的形态可见分叉样等改变。在细胞传至 P15 代以上时,生长速度逐渐放缓,高代次 LMSCs 生长活力下降。通过 RT-PCR 和免疫荧光化学鉴定手段对 LMSCs 进行鉴定,LMSCs 表达基因 CD29、CD44、CD73、CD166,不表达 CD31,证明本实验通过体外分离培养技术得到的目的细胞是 LMSCs,且其保持间充质干细胞的生物学特性。

急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 是急性肺损伤 (ALI) 最严重的形式,肺部的感染性疾病尤其是细菌性肺炎是 ARDS 最常见的病因。肺炎进展过程中, TNF- α 、IL-4 及 IL-6 等因子释放,促进大量中性粒细胞渗出聚集在肺泡周围,激活并释放活性氧、蛋白酶、白三烯等介质,进一步加重损伤。本研究结果显示,损伤组 6、24、48 h 血清 TNF- α 、IL-4、IL-6 水平高于治疗组和对照组,且治疗组高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。有研究发现^[9],角质细胞生长因子 7 (KGF-7) 在内皮细胞再生和损伤修复中具有重要作用,可减轻 ALI 动物模型的肺泡水肿。过表达 KGF-7 的 MSCs 改善了微血管通透性,抑制了 TNF- α 等促炎因子的释放,保护正常肺组织。IL-6 可加剧肺部损伤,研究表明^[10,11],其作用机制是参与中性粒细胞在肺部的聚集,而 TNF- α 具有促进 IL-6 分泌的作用,LMSCs 通过抑制 TNF- α 促炎因子的释放,间接抑制 IL-6 的分泌,从而达到降低肺部炎症反应的效果。IL-4 可刺激肺内成纤维细胞增生,引起肺纤维化^[12]。本研究中治疗组小鼠 IL-4 水平较损伤组降低,降低了肺纤维化程度,起到了保护肺组织的作用。目前已有 3 项已完成的 MSCs 治疗 ARDS 的临床试验,一项干细胞来源是异体脂肪来源的 MSCs^[13],其余两项是骨髓来源的 MSCs^[14,15],但 MSCs 的最佳来源、合理剂量、给药时间及给予方式仍无统一标准,如何进一步优化 MSCs 的疗效仍是未来研究的重点。

总之,胎牛 LMSCs 在体外培养体系中可以稳定的保持其生物学特性,低代次 LMSCs 具有良好的增殖活性及分泌细胞因子的能力,可以有效降低 LPS 诱导的小鼠急性肺损伤血清中 TNF- α 水平,参与调控 IL-4、IL-6 的分泌及免疫应答作用,提示胎牛 LMSCs 对急性炎症反应有一定治疗作用。

参考文献:

- [1] Mortada I, Mortada R. Epigenetic changes in mesenchymal stem cells differentiation [J]. Eur J Med Genet, 2018, 61 (2): 114-118.
- [2] Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro [J]. Nat Biotechnol, 2000, 18(4): 399-404.
- [3] Thompson BT, Chambers RC, Liu KD. Acute Respiratory Distress Syndrome [J]. N Engl J Med, 2017, 377(6): 562-572.
- [4] 梁瑞宁, 郑险峰, 田秀芝, 等. 北京鸭肾脏间充质干细胞对 LPS 诱导小鼠急性损伤免疫反应的研究 [J]. 牡丹江师范学院学报 (自然科学版), 2019(3): 48-53.
- [5] Shi Y, Su J, Roberts AI, et al. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses [J]. Trends Immunol, 2012, 33(3): 136-143.
- [6] Nitzsche F, Müller C, Lukomska B, et al. Concise Review: MSC Adhesion Cascade - Insights into Homing and Transendothelial Migration [J]. Stem Cells, 2017, 35(6): 1446-1460.
- [7] Masterson C, Jerkic M, Curley GF, et al. Mesenchymal stromal cell therapies: potential and pitfalls for ARDS [J]. Minerva Anestesiol, 2015, 81(2): 179-194.
- [8] Kellner M, Noonepalle S, Lu Q, et al. ROS Signaling in the Pathogenesis of Acute Lung Injury (ALI) and Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) [J]. Adv Exp Med Biol, 2017 (967): 105-137.
- [9] Chen J, Li C, Gao X, et al. Keratinocyte growth factor gene delivery via mesenchymal stem cells protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e83303.
- [10] Cardoso GH, Petry DM, Probst JJ, et al. High-Intensity Exercise Prevents Disturbances in Lung Inflammatory Cytokines and Antioxidant Defenses Induced by Lipopolysaccharide [J]. Inflammation, 2018, 41(6): 2060-2067.
- [11] Gupta S, Khajuria V, Wani A, et al. Murayanine Attenuates Lipopolysaccharide-induced Inflammation and Protects Mice from Sepsis-associated Organ Failure [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2019, 124(4): 351-359.
- [12] Su S, Zhao Q, He C, et al. miR-142-5p and miR-130a-3p are regulated by IL-4 and IL-13 and control profibrogenic macrophage program [J]. Nat Commun, 2015(6): 8523.
- [13] Zheng G, Huang L, Tong H, et al. Treatment of acute respiratory distress syndrome with allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells: a randomized, placebo-controlled pilot study [J]. Respir Res, 2014, 15(1): 39.
- [14] Simonson OE, Mougiakakos D, Heldring N, et al. In Vivo Effects of Mesenchymal Stromal Cells in Two Patients With Severe Acute Respiratory Distress Syndrome [J]. Stem Cells Transl Med, 2015, 4(10): 1199-1213.
- [15] Wilson JG, Liu KD, Zhuo H, et al. Mesenchymal stem (stromal) cells for treatment of ARDS: a phase 1 clinical trial [J]. Lancet Respir Med, 2015, 3(1): 24-32.

收稿日期: 2020-11-29; 修回日期: 2020-12-15

编辑/杜帆