

· 论 著 ·

## BMDCs 多途径参与肺损伤修复的实验研究\*

罗 丹<sup>1</sup>, 刘登群<sup>2</sup>, 刘国祥<sup>1</sup>

(1. 第三军医大学西南医院呼吸科, 重庆 400038; 2. 第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室/全军复合伤研究所/创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400038)

**摘要:**目的 观察骨髓来源细胞(BMDCs)通过多途径在不同时间点参与肺损伤修复的作用。方法 构建 FVB/NJ 小鼠博来霉素诱导肺损伤模型, 24 h 或 21 d 后接受 BMDCs 或空培养基尾静脉注射, 第 7、14、21 和 28 天取材, 行 HE 染色、马森染色、羟脯氨酸含量检测和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的 Western blot 检测。同时构建 GFP 骨髓嵌合小鼠模型, 放射性肺损伤 1 个月 after 肺组织取材进行免疫荧光双标。结果 早期输入 BMDCs 能明显缓解博来霉素导致的肺组织炎细胞浸润和肺泡破坏等病理改变, 降低各个时间点的羟脯氨酸含量至第 21 天达到最低值( $P < 0.05$ ), 在第 7 天明显下调肺内 TNF- $\alpha$  的含量( $P < 0.05$ )。推迟 BMDCs 输入的肺组织病理改变与对照组无差异。放射性肺损伤后 1 月, 骨髓嵌合鼠中可见绿色荧光蛋白(GFP)与广谱细胞角蛋白(PCK)双阳性的 BMDCs 来源支气管上皮细胞和 GFP 与表面蛋白 C(SPC)双阳性的 BMDCs 来源 II 型肺泡上皮。结论 早期输入 BMDCs 能通过多途径明显缓解放疗引起的肺损伤。晚期输入 BMDCs 没有加重肺纤维化, 对肺损伤也无缓解作用。

**关键词:**骨髓来源细胞; 肺损伤; 小鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.21.008

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)21-2102-02

## Contribution of BMDCs to lung repair through multipath after lung injury\*

Luo Dan<sup>1</sup>, Liu Dengqun<sup>2</sup>, Liu Guoxiang<sup>1</sup>

(1. Department of Respiratory Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 2. State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract:** **Objective** To observe the contribution of BMDCs to lung repair through multipath after lung injury. **Methods** FVB/NJ mice after bleomycin-induced lung injury received infusion of BMDCs 24 h or 21 d after lung injury. The mice were sacrificed at days 7, 14, 21, 28, and HE stain, Martius Scarlet Blue stain, quantification of hydroxyproline and Western blot with TNF- $\alpha$  antibody were used. Meanwhile, a GFP chimeric mouse model was introduced to track BMDCs and induce irradiation lung injury, and immunofluorescent double labeling was carried one month after lung injury. **Results** Administration of BMDCs 24 h after lung injury attenuated the infiltrate of inflammatory cells and lesion of alveoli wall. The content of hydroxyproline in lung tissue decreased gradually and reached the lowest at days 21 ( $P < 0.05$ ). TNF- $\alpha$  expression was suppressed at days 7 ( $P < 0.05$ ). Administration of BMDCs 21 d after lung injury did not attenuate the histological damage. PCK<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> cells and SPC<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> cells were found in lung one month after irradiation. **Conclusion** Early administration of BMDCs could attenuate the lung injury induced by bleomycin and irradiation. Advantage or disadvantage of late administration were not observed.

**Key words:** bone marrow-derived cells; lung injury; mice

各种理化因素均能导致肺损伤, 而临床肿瘤患者中常见的肺损伤主要来自化疗药物引起的不良反应和胸腔肿瘤放疗导致的放射性肺损伤。目前, 临床上针对此类肺损伤的治疗仍是难点。骨髓来源细胞(bone marrow derived cells, BMDCs)蕴含多种重要干细胞, 不仅具有多项分化潜能和分泌多种重要细胞因子的生物学活性<sup>[1-3]</sup>, 且具备在损伤发生时特异性趋化至损伤组织的特点<sup>[4-5]</sup>, 因此, 在创伤修复方面的作用日益受到关注。为了深入评估 BMDCs 参与肺损伤修复的作用方式和机制, 本研究同时观察了 BMDCs 在化疗药物和放射诱导的肺损伤后不同时间点通过多途径参与肺损伤修复的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 构建博来霉素诱导肺损伤模型** SPF 级健康雌性 FVB/NJ 小鼠(第三军医大学实验动物中心提供), 体质量 18~22 g, 8 周龄。小鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠麻醉, 仰卧固定, 颈部去毛后乙醇消毒, 眼科镊切开皮肤, 钝性分离暴露气管, 将微量注射器经气管软骨环间隙于气管平行方向刺入气管, 匀速推入 20  $\mu$ L, 5 mg/mL 博来霉素溶液, 迅速退针, 将小鼠垂直竖起、轻轻旋转, 呼吸平稳后逐层缝合。待小鼠苏醒后常规饲养。

**1.2 骨髓单个核细胞分离与输入** 颈椎脱臼法处死 FVB/NJ 小鼠, 分离其股骨和胫骨, 乙醇消毒 10 min。用 1 mL 注射器吸取 DMEM/F12 培养基, 于冰浴中反复冲洗骨髓腔至发白。使用 200 目筛网过滤骨髓细胞悬液。2 500 r/min 离心 20 min 后吸取中间白膜层。加入红细胞裂解液作用 1 min, 磷酸盐缓冲液(PBS)终止, 离心后培养基重悬细胞。细胞计数仪计数所获取的骨髓单个核细胞密度为  $3.6 \times 10^7$  /mL。

博来霉素致肺损伤后小鼠, 随机分为 BMDCs 早期输入组、BMDCs 延迟输入组与对照组, BMDCs 早期输入组与对照组每组 12 只小鼠, BMDCs 延迟输入组每组 6 只小鼠。BMDCs 输入组经尾静脉注射骨髓单个核细胞悬液 0.3 mL/只, 对照组注入 DMEM/F12 培养基 0.3 mL/只。放回常规饲养, 分别于博来霉素支气管灌注后第 7、14、21 和 28 天取材。BMDCs 延迟输入组于第 28 天取材。

**1.3 肺组织病理学检查和马森染色** 取材后于 4% 多聚甲醛固定 72 h, 脱水、石蜡包埋、切片(4  $\mu$ m), 进行 HE 染色和马森染色后于光镜下观察肺组织病理改变和胶原沉积。每只小鼠分别随机取 6 个肺组织 HE 染色片和马森染色片, 每片在 100

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30871123); 国家自然科学基金资助项目(81071728)。

倍视野下,随机取 6 个视野对比观察。

**1.4 羟脯氨酸含量检测** 用羟脯氨酸试剂盒(凯基生物)测定肺组织羟脯氨酸含量,步骤按说明书严格进行。羟脯氨酸在氧化剂的作用下所产生的氧化产物与二甲氨基苯甲醛作用呈现紫红色,测定 550 nm 处的吸光度,根据公式计算羟脯氨酸含量。

**1.5 TNF- $\alpha$  的 Western blot 检测** 按常规 Western blot 检测步骤进行。使用抗体为兔来源 TNF- $\alpha$  一抗(Abcam 公司)和山羊抗兔 IgG/HRP(Abcam 公司)。阳性条带以 Gel pro4.0 版凝胶光密度分析软件进行分析,测其 IOD 值。

**1.6 构建骨髓移植与放射性肺损伤模型** 受体鼠为 SPF 级雌性 FVB/NJ 小鼠(第三军医大学实验动物中心提供),体质量 18~22 g,8 周龄。于第三军医大学辐照研究中心采用<sup>60</sup>Co 放射源进行全身  $\gamma$  射线照射,照射剂量为 10 Gy。照射后 4 h 之内对受体鼠进行骨髓移植,骨髓单个核细胞分离同前,随机抽取 6 只小鼠接受尾静脉注射绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)小鼠(FVB/NJ 背景,第三军医大学实验动物中心<sup>[6]</sup>)骨髓移植,另外 6 只小鼠接受相同量的 FVB/NJ 野生型小鼠骨髓移植,作为对照组。

**1.7 免疫荧光染色** 肺组织石蜡切片脱蜡,热修复 20 min。用 10% 正常山羊血清室温下封闭 15 min。滴加 1:100 稀释的一抗(小鼠抗 PCK 抗体,博士德;或小鼠抗 SPC 抗体,Santa Cruz),放入湿盒内 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。0.01 M PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次,加入 1:200 稀释的 Cy3 标记羊抗小鼠荧光二抗(碧云天),室温下避光孵育 1 h,0.01 M PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次。加入 1:100 稀释的兔抗 GFP 一抗(碧云天),放入湿盒内 37  $^{\circ}$ C 孵育 3 h,0.01 M PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次。加入 1:200 稀释的 FITC 标记的羊抗兔二抗工作液(碧云天),室温避光孵育 1 h,0.01 M PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次。室温避光下加入 DAPI 工作液(Vector Laboratories)胞核染色 1 min,0.01 M PBS 漂洗 5 min。水溶性封片剂封片,于 Leica LCS SP5 激光共聚焦显微镜下观察。

**1.8 统计学处理** 采用 SPSS16.0 统计软件,单因素方差分析和 *t* 检验比较各组之间相关数据的统计学差异,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 早期输入 BMDCs 缓解博来霉素诱导的小鼠肺病理性损伤** 本研究采用 HE 染色检测小鼠肺组织的病理学改变。发现在对照组,支气管灌注博来霉素后 7~21 d,肺组织均有大量炎症细胞浸润,肺内淤血,细胞壁破坏(彩插 III 图 1A~C),至 28 d 炎细胞减少,但成纤维细胞增生,肺泡间隔增厚(彩插 III 图 1D)。而 BMDCs 早期(气管灌注博来霉素后 24 h)输入组,肺组织的病理学改变在博来霉素灌注后 7~28 d 均有明显差异,可见炎症细胞浸润明显减少,肺内淤血明显减轻,至第 28 天虽也可见肺泡结构破坏,但成纤维细胞增生和肺泡间隔增厚明显较轻(彩插 III 图 1E~H)。与之不同的是,BMDCs 延迟(支气管灌注博来霉素后第 21 天)输入组,肺组织第 28 天的病理学改变与对照组无明显差异(彩插 III 图 1)。

**2.2 早期输入 BMDCs 抑制博来霉素诱导的小鼠肺内胶原沉积** 本研究采用马森染色和羟脯氨酸检测联合评估小鼠肺组织的胶原沉积程度。结果显示在对照组,支气管灌注博来霉素后第 7 天即开始有羟脯氨酸升高,至第 28 天达到高峰。而 BMDCs 早期输入组,在各时间点的羟脯氨酸含量均明显降低,至第 21 天达到最低值( $P < 0.05$ )(彩插 III 图 2A)。马森染色亦可见对照组第 21 天胶原沉积明显(彩插 III 图 2B),第 28 天最重(彩插 III 图 2C)。而 BMDCs 早期输入组在各时间点的胶原沉积明显缓解(彩插 III 图 2D~E)。

**2.3 早期输入 BMDCs 降低博来霉素肺损伤后小鼠肺内 TNF- $\alpha$  水平** TNF- $\alpha$  为急性炎症早期的主要炎症因子。本研究发现在博来霉素灌注后第 7 天,对照组肺内 TNF- $\alpha$  含量最

高,后逐渐降低至第 28 天达最低值。而 BMDCs 早期输入组,在博来霉素灌注后第 7 天能明显降低肺内 TNF- $\alpha$  的水平( $P < 0.05$ ),第 14 天和第 21 天两组无明显差异( $P > 0.05$ ),但第 28 天 TNF- $\alpha$  的含量却有所升高( $P < 0.05$ ),见彩插 IV 图 3。

**2.4 BMDCs 参与肺损伤后肺上皮形成** 为了明确 BMDCs 是否通过直接形成肺上皮细胞参与肺损伤修复,本研究对野生型小鼠进行全身致死剂量放射,破坏其原有骨髓造血的同时造成其肺放射性损伤,然后经尾静脉输入同背景 GFP 小鼠的 BMDCs,重建其骨髓造血。骨髓移植后 1 个月,采用 GFP 与 PCK 免疫荧光双标检测肺组织,发现部分支气管上的上皮细胞表达 GFP 与 PCK 双阳性(彩插 IV 图 4A)。SPC 是 II 型肺泡上皮细胞的特异性蛋白,GFP 与 SPC 免疫荧光双标显示,部分 SPC 阳性的细胞亦为 GFP 与 SPC 双阳性(彩插 IV 图 4B)。提示 BMDCs 在放射性肺损伤后可直接分化为支气管上皮和 II 型肺泡上皮参与肺上皮修复。

## 3 讨 论

放疗诱发的肺损伤是临床肿瘤患者中常见的肺损伤。而 BMDCs 在创伤修复方面的作用日益受到关注。此外,BMDCs 也被认为是肿瘤基因治疗领域最有希望的基因载体<sup>[7-8]</sup>。如果 BMDCs 能对肺癌治疗中出现的肺损伤不良反应具有防治作用,将在临床上有更广阔的应用前景。

本研究对肺损伤后 7~28 d 不同时间点的观察发现,早期输入 BMDCs 可通过抑制肺损伤后前期的 TNF- $\alpha$  升高、炎症细胞浸润和后期的成纤维细胞增生、胶原沉积明显缓解肺急性损伤和肺纤维化。同时 BMDCs 在肺损伤后亦可作为支气管上皮细胞和 II 型肺泡上皮细胞的来源之一重建肺上皮的完整。文献报道此模型的肺纤维化一般从用药后 14~28 d 开始<sup>[9]</sup>,而有观点认为 BMDCs 中的间充质干细胞可能作为成纤维细胞的来源<sup>[10]</sup>,因此,本研究增加了在用药后 21 d 注入 BMDCs 的观察,并没有发现肺内成纤维细胞增多和肺纤维化加重,同时也证明晚期输入 BMDCs 对肺损伤无缓解作用。

BMDCs 是由多种细胞组成的一类细胞群,主要包含两大类干细胞群:造血干细胞和间充质干细胞。目前较多报道的是间充质干细胞对肺损伤的作用<sup>[11]</sup>。而本研究采用的是全 BMDCs 输入,虽然其中间充质干细胞的比例很低,但仍能发挥明显的促修复作用,说明 BMDCs 中其他细胞也可能参与其中。此外,全 BMDCs 中包含的多种干细胞和祖细胞使其具有比单一的干细胞更全面的分化潜能。Macpherson 等<sup>[12]</sup>的研究报道了 BMDCs 能分化为支气管上皮细胞,而 Abe 等<sup>[13]</sup>的研究发现 BMDCs 在放射性肺损伤后只能分化为 I 型肺泡上皮细胞。在本研究中,同时发现 BMDCs 来源的支气管上皮细胞和 II 型肺泡上皮细胞。结果差异可能正是由于上述两项研究输入的是 BMDCs 中的边界细胞,而本研究采用的是全 BMDCs 输入。但 BMDCs 成分的复杂性也引发其免疫调节的多向性<sup>[14]</sup>,正如本研究观察到 BMDCs 输入使肺内 TNF- $\alpha$  水平在早期降低的同时,后期反而有所升高,是否为 BMDCs 后期自分泌 TNF- $\alpha$  有待进一步证实,这种作用对肺损伤后期的影响需要后续更长时间的评估。

综上所述,早期输入 BMDCs 不仅能缓解肺损伤后炎症细胞浸润、炎症因子释放和胶原沉积,还可作为多种肺上皮细胞的来源之一,直接参与肺上皮重建,从而阻止肺纤维化进程。晚期输入 BMDCs 没有加重肺纤维化,对肺损伤也无缓解作用。

## 参考文献:

- [1] Kucia M,Reca R,Dawn B,et al. Bone marrow as a home of heterogenous populations of nonhematopoietic stem cells[J]. Leukemia,2005,19(7):1118-1127.
- [2] Kucia M,Ratajczak J,Ratajczak MZ. Are(下转第 2124 页)

胞经油红 O 染色后,脂滴被亲脂的油红 O 着色而呈红色,细胞质不着色(彩插 IV 图 2)。 $10^{-8}$ 、 $10^{-10}$  维生素 D 组的细胞内脂滴较多, $10^{-4}$ 、 $10^{-6}$  维生素 D 组细胞内脂滴明显减少,但均少于分化组,而未分化组无着色。1,25-二羟基维生素 D 是以剂量依赖的方式抑制人大网膜脂肪细胞的分化。

### 3 讨 论

在正常个体中,脂肪组织内的脂肪细胞数目基本保持在一个相对稳定的范围内,脂肪细胞的增殖分化与衰老死亡处在一个动态的平衡中<sup>[7]</sup>。而肥胖患者体内的这种平衡被打乱,脂肪细胞出现异常增殖和分化,或者是脂肪细胞衰老死亡减少,最终出现脂肪细胞数目的增加和体积的增大,临床上表现为肥胖<sup>[8]</sup>。当个体的体质量增加时,其脂肪组织的体积增加显著,而骨骼和肌肉体积几乎无明显变化<sup>[9]</sup>。这一方面是由于过多的能量在体内被合成三酰甘油,并储存于脂肪细胞,而三酰甘油的不断积累则会使脂肪细胞体积增大。有研究发现 1,25-二羟基维生素 D 通过 VDR 抑制脂肪形成过程中的关键分子过氧化物酶体增殖物活化受体  $\gamma$  及 CCAAT 增强子结合蛋白仅来调节脂肪形成<sup>[10]</sup>。本实验发现,前体脂肪细胞的形态与成纤维细胞相似,经适当分化诱导剂的刺激,其细胞骨架和细胞外基质逐渐发生变化,细胞开始进入由不成熟脂肪细胞向成熟脂肪细胞的转变。此时,细胞形态由椭圆型逐渐趋于圆形或类圆形,胞体逐渐增大,胞质中开始出现小脂滴,标志脂质开始积累,小脂滴不断增多并融合为较大的脂滴,可经油红特殊染色呈红色,获得成熟脂肪细胞的形态特征。一般来说,分化进展越好,脂质含量越高,使用油红染色时着色越多。本研究证实维生素 D 是以剂量依赖的方式抑制人大网膜前脂肪细胞的分化。1,25-二羟基维生素 D 呈剂量依赖性地抑制体外培养的细胞三酰甘油的积聚。细胞油红染色显示,由于 1,25-二羟基维生素 D 的作用,细胞着色明显减少,表明 1,25-二羟基维生素 D 可以抑制细胞向成熟脂肪细胞分化。这也许可以拓宽科研人员对维生素 D 药理作用的认识,在临床上为给予肥胖人群提供维生素 D 提供理论支持。

### 参考文献:

[1] 位风芝,宋晶,段竹梅,等.肥胖婴儿与亚临床佝偻病的关

系[J].中国妇幼保健,2009,24(33):4676-4677.

- [2] 李瑞珍,马新瑜,陈寿康,等.儿童单纯性肥胖与糖、脂代谢及脂肪肝[J].临床儿科杂志,2008,26(12):1035-1037.
- [3] Tabara Y, Osawa H, Kawamoto R, et al. Reduced high-molecular weight adiponectin and elevated high-sensitivity C-reactive protein are synergistic risk factors for metabolic syndrome in a large scale middle-aged to elderly population; the shimanami health promoting program study[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2008, 93(12): 715-722.
- [4] Lenders CM, Feldman HA, Von Scheven E, et al. Relation of body fat indexes to vitamin D status and deficiency among obese adolescents[J]. Am J Clin Nutr, 2009, 90(3): 459-467.
- [5] 徐洪,宋旭东,李莹,等.贴壁细胞在载玻片上爬片的新方法[J].中国应用生理学杂志,2009,25(2):283-285.
- [6] Murry LT, Toubro S, Astrup A. PPARgamma agonists in the treatment of type II diabetes; is increased fatness commensurate with long-term efficacy? [J]. Int J Obes Relat Metab Disord, 2003, 27(2): 147-161.
- [7] Milanski M, Degasperi G, Coope A, et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus; implications for the pathogenesis of obesity[J]. J Neurosci, 2009, 29(2): 359-370.
- [8] 黄鹏,孙玉倩,高萍. C-反应蛋白对脂肪细胞脂联素表达的影响[J].生物学杂志,2009,27(1):7-9.
- [9] 曹贵方.补充钙和维生素 D 有助于纠正肥胖患者的脂质代谢紊乱[J].中华医学杂志,2007,8(18):1229-1230.
- [10] 雪景,缪珩.维生素 D 与肥胖[J].国际内分泌代谢杂志,2010,30(3):168-170.

(收稿日期:2010-11-25 修回日期:2011-03-22)

(上接第 2103 页)

- bone marrow stem cells plastic or heterogenous-That is the question[J]. Exp-Hematol, 2005, 33(6): 613-623.
- [3] Shin SY, Nam JS, Lee YH, et al. TNF $\alpha$ -exposed bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote locomotion of MDA-MB-231 breast cancer cells through transcriptional activation of CXCR3 ligand chemokines[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(40): 30731-30740.
  - [4] Akihama S, Sato K, Habuchi T, et al. Bone marrow-derived cells mobilized by granulocyte-colony stimulating factor facilitate vascular regeneration in mouse kidney after ischemia/reperfusion injury[J]. Tohoku J Exp Med, 2007, 213(4): 341-349.
  - [5] Abbott JD, Huang Y, Giordano FJ, et al. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury [J]. Circulation, 2004, 110(21): 3300-3305.
  - [6] Wang Y, Song YT, Wei H, et al. Quantitative analysis of lentiviral transgene expression in mice over seven generations[J]. Transgenic Res, 2010, 19: 775-784.
  - [7] Bergfeld SA, DeClerck YA. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment[J].

Cancer Metastasis Rev, 2010, 29(2): 249-261.

- [8] Ciesielski MJ, Apfel L, Fenstermaker RA, et al. Antitumor effects of a xenogeneic survivin bone marrow derived dendritic cell vaccine against murine GL261 gliomas[J]. Cancer Immunol Immunother, 2006, 55(12): 1491-1503.
- [9] 刘珊,范桂香,杨建业,等.两种小鼠肺纤维化造模方法的比较[J].西安交通大学学报,2004,25(3):244-249.
- [10] Ishii G, Sangai T, Ochiai A, et al. In vivo characterization of bone marrow-derived fibroblasts recruited into fibrotic lesions[J]. Stem Cells, 2005, 23: 699-706.
- [11] 王莉,方妮,刘兵,等.骨实质来源间质干细胞对博来霉素诱导小鼠肺损伤的保护作用[J].解放军医学杂志,2008, 33(10): 1220-1224.
- [12] Macpherson H, Keir P, Dorin J, et al. Bone marrow-derived sp cells can contribute to the respiratory tract of mice in vivo[J]. J Cell Sci, 2005, 118: 2441-2450.
- [13] Abe S, Boyer C, Rennard SI, et al. Cells derived from the circulation contribute to the repair of lung injury[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2004, 170: 1158-1163.
- [14] 汤勇,王帅,周训平.间充质干细胞免疫活性调节作用研究进展[J].重庆医学,2010,39(4):488-491.

(收稿日期:2010-10-13 修回日期:2011-01-19)