

第二军医大学

博士学位论文

骨髓间充质干细胞移植对慢性阻塞性肺病气道及肺实质损伤的
修复作用

姓名：宋小莲

申请学位级别：博士

专业：内科学 呼吸系病

指导教师：白冲

20090501

摘 要

骨髓间充质干细胞移植对慢性阻塞性肺病 气道及肺实质损伤的修复作用

慢性阻塞性肺病（COPD）是人类的常见病，是世界范围内第四位的死亡原因。近年来，随着环境污染等因素的加重，其发病率有逐年增高的趋势。COPD 以不完全可逆的气流受限为特征，病情呈进行性发展，其发病机制复杂，病理学改变则累及肺脏的多级结构，包括中央及周围的气道、肺实质乃至肺血管。目前认为，COPD 的病理损伤属于不可逆性病变，依靠机体自身的能力无法达到组织的完全修复。因此，迫切需要寻找到一种参与肺部组织结构的修复和重建的有效方法。

研究认为，骨髓中的造血干细胞 (hematopoietic stem cells, HSC) 和间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSC) 都具有多向分化的潜能，其中 MSC 由于取材方便、来源丰富、容易培养、增殖力旺盛而日益成为干细胞研究的热点。近年来大量研究显示，间充质干细胞在治疗诸如糖尿病、心肌梗塞、移植抗宿主反应等多种疾病方面具有广阔的临床应用前景。

之前有研究已证实，骨髓 MSC 可以在体内、体外分化为肺实质细胞，在炎症等因素的趋化下，外源的骨髓 MSC 有向肺损伤部位汇集的现象。外源 MSC 可能通过两方面参与肺的损伤修复：1. 在局部微环境作用下诱导分化为肺泡上皮和支气管上皮细胞等结构细胞，参与组织的修复过程；2. 通过免疫调节作用，为损伤修复提供的有利环境。

但目前而言，应用 MSC 干预治疗 COPD 的相关研究十分少见，现有的关于肺部疾病干细胞治疗的有限相关研究，主要集中在急性肺实质损伤和肺纤维化方面。而且，对于不同移植条件对干细胞治疗效果也没有相应的对比研究。因此，本课题经过严格的对比和系统的观察，研究观察了移植的骨髓 MSC 在 COPD 动物模型肺局部的定植存活情况，了解 MSC 移植的治疗效果。本研究包括三部分内容，分述如下。

一、大鼠骨髓间充质干细胞的体外培养和生物学特性

目的：分离和培养大鼠 MSC(rMSC)，研究其生物学特征，为动物实验做准备。

方法：取 6-8 周龄正常雄性 Wistar 大鼠的股骨和肱骨，无菌状态下冲洗骨髓腔，收集骨髓细胞悬液，接种于塑料培养皿，使用 10%FBS/DMEM-LG 的培养基，在 37℃、5%CO₂ 和 100%饱和湿度条件下进行培养，每 3-4d 按照 1:3 进行常规方法传代；倒置显微镜下观察细胞形态学特点；MTT 法绘制细胞生长曲线；流式细胞仪检测细胞表面标记和细胞周期；定向诱导 rMSC 在体外向成骨细胞和脂肪细胞分化；裸鼠皮下注射 rMSC 检测其成瘤性。

结果：体外培养的 rMSC 大部分呈梭形的成纤维细胞样形态，细胞呈辐射状排列。在体外观察传代 20 代，细胞形态和生长速度无明显改变；生长汇合率达 30%-40%和 90%时的 P5 代 rMSC, G0/G1 期细胞的百分比分别为 53.07%和 85.24%，S+G2+M 期细胞的百分比分别为 46.93%和 14.76%；P5 代细胞高表达 CD29、CD44 和 Sca-1, 而不表达造血干细胞的标记 CD34、CD117 和 CD45, 不表达 Flk-1、MHC-II；在体外诱导培养下，rMSC 可向成骨细胞和脂肪细胞分化，具有多向分化潜能；裸鼠背部种植 rMSC, 3 个月未见成瘤现象。

结论：全骨髓贴壁法可成功分离和培养出大鼠骨髓间充质干细胞，分离所得的细胞性状稳定、状态良好，形态学和表型符合间充质干细胞特点，具有多向分化潜能且无明显成瘤性。

二、COPD 模型的构建和鉴定

目的：研究建立合理的慢性阻塞性肺病(COPD)大鼠模型的有效方法。

方法：8 周龄健康 Wistar 大鼠 15 只，随机分入健康对照组 (C 组) 和两个 COPD 模型组。用两次气管内注入脂多糖 (LPS 200 $\mu\text{g}/\text{次}$) 加熏香烟 1 个月的复合刺激法 (A 组) 和单纯熏烟法 (B 组) 分别建立大鼠 COPD 模型，然后行病理学检测造模效果，包括平均内衬间隔 (MLI) 和平均肺泡数 (MAN) 的测定；观察实验动物一般情况；检测动物的外周血常规和支气管肺泡灌洗液 (BALF) 细胞计数与分类。

结果：两 COPD 模型组大鼠纳差消瘦，伴有间歇咳嗽和气促。病理学检查显示两模型组均具有慢性支气管炎和肺气肿的典型病变。两模型组外周血和 BALF 中的白细胞总数及中性粒细胞百分比均较健康对照组显著增高($P<0.01$)；两模型组 MLI 较对照组有显著性增高，而 MAN 较对照组显著性下降($P<0.01$)；但 A、B 两组间无显著差异($P>0.05$)。病理学切片上，A 组比 B 组各级支气管及肺组织的炎症浸润更明显，上皮细胞损伤和腺体增生明显；而 B 组更突出表现为肺泡的过度扩大融合。

结论：用单纯熏烟法和两次气管内注入脂多糖 (LPS 200 $\mu\text{g}/\text{次}$) 加熏香烟的方法，均可成功制备大鼠 COPD 模型，其病理生理改变与人类 COPD 类似，后者比前者更符合 COPD 自然发病过程。

三、MSC 在 COPD 大鼠模型肺部的定植分化与治疗作用

目的：观察 rMSC 移植在 COPD 动物肺部的定植和分化及其治疗作用。

方法：选健康雌性 Wistar 大鼠 36 只，随机分为 5 组：rMSC 小剂量/单次尾静脉移植组 (A 组，12 只，COPD 大鼠，尾静脉输注 rMSC $1 \times 10^6/1\text{ml}$)；rMSC 大剂量/两次尾静脉移植组 (B 组，12 只，COPD 大鼠，尾静脉输注 rMSC $1 \times 10^6/1\text{ml} \times 2$ 次)；rMSC 对照组 (C 组，4 只，正常大鼠，处理同 A 组)；COPD 模型组 (D

组, 4 只, 尾静脉输注生理盐水 1ml); 健康对照组 (E 组, 4 只)。体外培养扩增雄性 Wistar 大鼠来源的 rMSC, 以 CM-Dil 标记细胞后将其经尾静脉注入用熏烟加 LPS 气管注入法制作的同系雌性 COPD 大鼠模型体内, 在注射后的 1d、7d、15d、30d 分别处死动物, 取新鲜肺组织冰冻切片荧光显微镜下观察 Dil 阳性细胞定植、分布和存活时间; 原位杂交法检测肺组织中外源细胞的定位、定植效率, 以及形态学观察和在肺外脏器的分布; CM-Dil 联合免疫组化法检测 rMSC 在肺组织的转分化情况; 观察肺组织病理学变化以及血常规、肺泡灌洗液(BALF)细胞计数与分类; 使用双抗夹心 ELISA 方法检测 COPD 大鼠 BALF 和外周血中 IL-10、TNF- α 和 G-CSF 的表达情况。实验数据采用 SSPS13.0 软件进行统计学分析, 检验水平为 $\alpha=0.05$ 。

结果: (1) 荧光显微镜观察发现, A、B 两组在进行 rMSC 移植后, 肺组织内有较多的 CM-Dil 阳性细胞 (红色荧光) 进入, 主要分布于肺间质、肺泡和气道壁, 并可在肺局部存留 30d 以上; 而 C 组肺组织内偶见少量荧光阳性细胞; 未经 rMSC 移植的 D、E 组肺组织内未见阳性细胞。(2) 原位杂交结果与 CM-Dil 检测结果类似, 并可见原位杂交阳性的细胞光镜下呈现 II 型肺泡上皮和气管粘膜上皮形态, 血管平滑肌细胞也可见少量阳性细胞; 心脏、骨骼肌和肝脏等肺外组织未见或极少见外源细胞; A、B 两组肺组织内的外源细胞定植效率无明显差异。(3) CM-Dil 染色联合免疫组化检测提示, 部分 CM-Dil 阳性细胞同时有免疫组化检测 SPC 或 CC16 表达阳性, 提示外源细胞部分分化为 II 型肺泡上皮和气管粘膜上皮。(4) A、B 组外周血和 BALF 中的白细胞总数及中性粒细胞分类较 D 组有显著降低($P<0.01$), 但仍高于 C 和 E 组($P<0.01$), 提示 rMSC 移植后 COPD 炎症水平有所下调。(5) A、B 组外周血和 BALF 中的 IL-10 较 D 组有显著性升高($P<0.01$), 但低于 C 和 E 两组($P<0.01$); TNF- α 和 G-CSF 低于 D 组($P<0.01$), 但高于 C 和 E 两组($P<0.01$)。 (6) HE 染色显示, A、B 组肺气肿和气管病变较 D 组明显减轻, 但与 C、E 组比较, COPD 病变仍较明显; 说明 MSC 使大鼠 COPD 病理改变得到一定程度的改善。

结论: 经尾静脉注射的 rMSC 能在大鼠 COPD 模型的肺组织内定植并长期存留, 改善 COPD 肺部的病理学损伤, 调节局部及全身的炎症因子水平, 且无明显致瘤性和成纤维化倾向; 在一定范围内, 这种治疗效果无明显量效关系。

关键词: 慢性阻塞性肺病, 动物模型, 骨髓间充质干细胞, 大鼠, 移植

Abstract

Reparation of mesenchymal stem cells transplantation on airway and lung injury in chronic obstructive pulmonary disease

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is one of the most common disease and the 4th leading cause of death in the world. The morbidity has been rising even in recent years due to several factors such as environmental pollution. COPD is a disease state characterized by airflow limitation that is not fully reversible. The airflow limitation is usually progressive. The pathogenesis of COPD is complicated and its pathobiology involve s multilevel structures in the lung, including central and peripheral airways, lung parenchyma,even blood vessel, which is regarded as irreversible. The injure of COPD can not be fully repaired by itself or drugs. Thus, we need badly to explore a new way of structural reparation and reestablishment of the lung.

Recently, many studies have identified that bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSC) and hematopoieticstemcells (HSCs) have the potency of multi-directional differentiation. Because of the abundant resource, convenient isolation, easy cultivation and vigorous proliferative ability, MSC has become increasingly common in stem cell research. By far, the MSC transplantation was widely used on the treatment study of different diseases and presented as a promising clinical application to them, including diabetes mellitus, myocardial infarction, graft-versus-host disease, and so on.

Bone marrow derived MSC can differentiate into some lung parenchymal cells in vivo and in vitro, as confirmed by several studies, which observed that MSC could be guided to location of lungs by inflammation and injury. Exogenous MSC might repair the lesions in two ways: induction and cell differentiation into alveolar epithelium or tracheal epithelium under the local microenvironment, and immunological regulation of MSC for the advantageous repairing conditions.

Nevertheless, studies on the application of MSC in COPD is few. Most researchs focused on the use of MSC in the acute pulmonary parenchyma injury or pulmonary fibrosis. Moreover, therapeutic efficacy of different stem cells transplantation program also need to be studied. This research was designed to explore the field planting and survivorship of exogenous bone marrow derived MSC in the lungs of the COPD model

rats after transplantation, understanding the therapeutic efficacy of MSC on COPD models via systematical observation.

The experiment consists of three parts described as follows:

1. Isolation, culture in vitro and study of biological characteristic of the rat bone marrow derived mesenchymal stem cells.

Objective To isolate the bone marrow derived mesenchymal stem cells and culture them in vitro. To study the biological characteristics of rMSC.

Methods and materials Under aseptic condition, bone marrow cells were collected by flushing the femurs and tibias from 6-8-week-old healthy male Wistar rats with PBS. All the mononuclear cells from bone marrow were plated in the plastic culture dish. The cells was maintained in a incubator with humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ at 37°C, using DMEM-LG medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), and was splitted as 1:3 every 3 or 4 days. The morphological features were observed under the invert microscope; Cell growth curve was determined by MTT method; cell cycle and phenotype were taken by flow cytometry. Moreover, their abilities to differentiate along osteoplastic and adipocytic pathways were also investigated. Tumor genesis were observed in BALB/c-nu/nu nude mice which received rMSC subcutaneously.

Results The cells cultured in vitro showed spindle-shaped appearance like fibroblast, spreading radiatly. Up to 20 passages of rMSC were observed and no visible morphologic or growth velocity change was detected. Cell cycle anaylises revealed that 53.07% and 85.24% of the cells at G0/G1 phase, 46.93% and 14.76% at S+G2+M phase when they attached to 30%-40% and 90% confluences, respectively. Flow cytometric analysis showed that the rMSC were high positive for CD29、CD44 and Sca-1 and negative for CD34、CD117,CD45, Flk-1 and MHC-II. The rMSC could be differentiated into adipocyte and osteoblast cells in vitro. No tumor formation were observed in nude mice during those 3 months.

Conclusions The rMSC can be isolated and cultured by all bone marrow cells adherence successfully. The cell population we harvested expressed morphology and phenotype of mesenchymal stem cells, significant renewal capacity, biological stabilities, multi-potentiality and free from tumorigenesis in vitro.

2. Establishment and assessment of the rat COPD model.

Objective To explore an effective and reasonable way of establishing a rat model for chronic obstructive pulmonary disease(COPD).

Methods and materials A total of 15 8-week-old healthy Wistar rats were divided into 2 model groups and the control group(Group C) randomly. The rat COPD models was established by two ways, intratracheal instillation of lipopolysaccharide (LPS) twice + exposure to cigarette smoke for 1 month(Group A), and cigarette smoke inhalation for 80 days only(Group B). The pathologic characteristics of animal models, including the mean lining interval(MLI) and the mean alveoli number(MAN), were determined to assess the model quality. The general state of health of those rats were observed. The total and different white blood cell counts of bronchoalveolar lavage fluid(BALF) were determined. The comparison between the two model groups were also carried out.

Results In the two model groups, the rats presented cough or breathlessness periodically, and amplification of weight were reduced than that of control group($P<0.01$). Rats in Group A and B shared specific pathological features in tracheobronchial and lung tissues with that of human chronic bronchitis and obstructive emphysema. Significant increase in total white blood cells and neutrophils in BALF and peripheral blood was found in Group A and B ($P<0.01$) than those of Group C. MLI in Group A and B were significantly higher in comparison with Group C, while MAN was reversely much lower(both $P<0.01$). But there were no statistical difference between Group A and B on those measurements. The histology of Group A showed showed more often inflammatory cells infiltrating in the bronchial and lung tissue and the secretion of airway than Group B. The latter was charactered on the ruptured and enlarged alveoli.

Conclusions By intratracheal instillation of LPS twice+exposure to cigarette smoke and by cigarette inhalation only for more time both successfully established the rat COPD models, which shared many characteristics of human COPD including the pathological and pathophysiological feature.

3. Implantation and differentiation of rMSC in the lungs of COPD model rats and its therapeutical effect.

Objective To observe the implantation and differentiation of rMSC in the lungs of COPD rats, to study the therapeutical effect of rMSC.

Methods and materials The rMSC from the bone marrow of male rats were cultured in vitro and labeled with CM-Dil before implantation into rats. The recipient Wistar rats,

totally 36 female rats, were divided randomly into five groups: low-dosed/one-timed transplantation group (Group A, n=12, COPD model rats, intravenous infusion of 1×10^6 /1ml CM-Dil-labeled rMSC after model establishment); large-dosed/twice transplantation group (Group B, n=12, COPD model rats, intravenous infusion of 1×10^6 /1ml CM-Dil-labeled rMSC twice in the same day after model establishment); rMSC control group (Group C, n=4, the same amounts of rMSC as Group A were injected into the normal female rats); COPD model rats group (Group D, n=4, COPD model rats, intravenous infusion of 1ml NS after model establishment) and normal control group (Group E, n=4). The COPD models were established by smoke inhalation + LPS perfused intratracheally. The rats in Group A and B were sacrificed at d1, d7, d15 and d30 after the intravenous infusion of rMSC. The frozen sections of fresh lung tissues samples were viewed under a fluorescence microscope to observe the implantation, distribution and survivorship of the CM-Dil positive cells. Hybridization in situ (ISH) and histopathological analysis were carried out to detect the localization, implantation efficiency and morphology of foreign cells in the lungs and other organs. CM-Dil label combined immunohistochemistry was used to identify the transdifferentiation of rMSC in the lung. Peripheral blood (PB) and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were harvested for cell counting and classification and the measurement of IL-10, TNF- α and G-CSF levels by ELISA. Statistical comparison were tested with single-factor variance analyses. The reported P value was 2-sided ($\alpha=0.05$). Calculations were performed using the software SSPS13.0.

Results (1) Many CM-Dil positive cells (red fluorescence) were observed in the lung tissues of Group A and B, mainly located in the interstitium, pulmonary alveoli and airway walls, even 30 days after the intravenous infusion of rMSC. Only a few CM-Dil positive cells were found in Group C, and none was detected in Group D and E, which were infused NS instead of rMSC. (2) The results of ISH were similar as those above. Moreover, some ISH positive cells presented with the morphology of type II alveolar epithelium, bronchial epithelium or vascular smooth muscle cell. None or few foreign cell was detected in other organs like the heart, the skeletal muscle and the liver. The implantation efficiency of rMSC in Group B were close to that in Group A. (3) Some CM-Dil positive cells also showed immunohistochemical positivity of SPC (molecular marker for type II alveolar epithelium) or CC16 (molecular marker for Clara cell) in the same time. (4) The total white blood cells and neutrophil percentage in the PB and

BALF of Group A and B were significantly lower, comparing to those of Group D($P<0.01$),but still higher than those of Group C and E($P<0.01$). (5) The IL-10 level of the PB and BALF in Group A and B were significantly higher than that of Group D, while the level of TNF- α and G-CSF were higher(all $P<0.01$), even the IL-10 level of Group A and B were still much lower than those of Group C and E, and the TNF- α , G-CSF levels were higher reversely (all $P<0.01$). (6) HE-stained sections revealed obviously pathologic improvement in Group A and B in comparison with Group D, which implied the therapeutic effect of rMSC.

Conclusions The rMSC infused from caudal vein can implant into the lungs of COPD model rats and be permanent planting there, improving the pathology of the recipient rats and regulating the local and systemic inflammatory factor level. The therapeutic efficacy of rMSC transplantation showed dose-independent to some extent.

KEY WORDS: chronic obstructive pulmonary disease, animal model, bone marrow derived mesenchymal stem cell, rat, transplantation

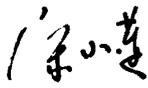
英文缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
BALF	bronchoalveolarlavage fluid	支气管肺泡灌洗液
BM	Bone marrow	骨髓
CD	Cluster of differentiation	白细胞分化抗原
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease	慢性阻塞性肺病
DAB	Diaminobenzidin	二氨基联苯胺
DDW	Double distilled water	双蒸水
DEPC	Diethyl Pyrocarbonate	二乙基焦碳酸
DMEM-LG	Dulbecco's Modified Eagle Medium-low glucose	低糖 DMEM 培养基
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	二甲基亚砷
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	乙二胺四乙酸
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附测定
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
FCM	Flowcytometry	流式细胞术
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor	粒细胞集落刺激因子
HE	Haematoxylin Eosin	苏木素-伊红
IHC	Immunohistochemistry	免疫组织化学
IGF	insulin-like growth factor	胰岛素样生长因子
IL	Interleukin	白细胞介素
ISH	In situ hybridization	原位杂交
LPS	lipopolysaccharide	脂多糖
MLI	Mean lining interval	平均内衬间隔
MAN	Mean alveoli number	平均肺泡数
MSC	mesenchymal stem cells	间充质干细胞
MTT	Methyl thiazolyl tetrazolium	四甲基偶氮唑蓝比色法
rMSC	rat bone marrow derived mesenchymal stem cells	大鼠间充质干细胞
OD	optical density	光密度
P	passage	代

缩略词	英文全称	中文全称
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase Chain Reaction	多聚酶链式反应
PE	Phycoerthrin	巯基化藻红蛋白
PI	propidium iodide	碘化丙啶
Rpm	revolutions per minute	转/分
SABC	StrePt-avidinbiotin-enzyme complex	链酶亲和素-卵白素-生物素-酶复合物
Sry	Sex-determining region on the Y chromosome	Y染色体上性别决定区
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane	三羟甲基氨基甲烷
TNF- α	Tissue necrosis factor α	肿瘤坏死因子 α
WBC	White blood cell	白细胞
ml	Millilitre	毫升
μ l	Microlitre	微升
mg	Milligram	毫克
pg	Picogram	皮克
h	Hour	小时
min	Minute	分钟
μ g	Microgram	微克
d	Day	天
w	Week	周

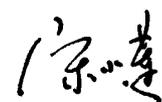
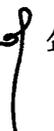
独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是我个人在导师指导下进行的研究工作。除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。本人承担本声明的法律责任。

学位论文作者签名：  签字日期：  年 5 月 26 日

学位论文使用授权书声明

本人完全了解第二军医大学有关保留、使用学位论文的规定，有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权第二军医大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

学位论文作者签名：  导师签名： 
签字日期：  年 5 月 26 日 签字日期：  年 5 月 26 日

前 言

慢性阻塞性肺病(Chronic Obstructive Pulmonary Diseases, COPD)是一种以不完全可逆性气流阻塞为特征的慢性疾病,主要累及肺,但也可引起全身(或称肺外)的不良反应,病情呈进行性发展,与肺部对香烟烟雾等有害气体和有害颗粒的异常炎症反应有关。从全球的情况来看目前 COPD 的发病率和死亡率均居第四位,且随着大气污染加剧和女性吸烟人数的增加,发病率有逐年增高的趋势^[1]。近期城市调查显示,我国 COPD 患病率占 40 岁以上人群的 8.2%^[2]。

COPD 的病理改变累及中央气道、外周气道、肺实质及肺血管各级部位,且目前认为属于不可逆性病变^[1]。因此,能寻找到一种参与肺部组织结构修复和重建的有效方法,将具有极其重要的意义。目前关于 COPD 相关研究主要有两方面:1.稳定和加重期 COPD 气道炎症的分子学和细胞学基础;2.基于发病机理的药物研发。而关于 COPD 病理损伤的修复及多能干细胞在其中的作用知之甚少,缺乏系统的相关研究。

近年来,随着对干细胞认识的不断深入,基于干细胞的细胞治疗研究正受到越来越多的关注。大量研究表明,干细胞,尤其是间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC),在治疗诸如糖尿病、心肌梗塞、帕金森氏病等人类重大疾病方面具有诱人前景^[3,4]。在利用 MSC 治疗关节损伤、心脏疾病等方面已进入临床(前)评价^[5,6]。

MSC 是一种存在于骨髓等多种组织中的具有多向分化能力的干细胞,具有很强的可塑性,可以移行进入组织,在适宜条件下可分化成为多种中胚层来源的组织细胞如骨细胞、软骨细胞、肌细胞、脂肪细胞等间质类细胞。有实验证明, MSC 也可在特定的体内或体外环境中跨胚层分化为神经元细胞、肝细胞、胰岛细胞以及肾小管上皮细胞、肺上皮细胞等^[7-13]。此外,不仅 MSC 本身免疫原性很弱, MSC 还具有明显的免疫抑制作用,例如,利用 MSC 移植预防造血干细胞移植病人的移植物抗宿主反应已经进入临床评价阶段^[14]。这些特性都使得 MSC 成为非常有应用潜力的成体干细胞。正是由于 MSC 具有这种多能潜质,且容易采集、容易体外培养、性能稳定、连续传代和冷冻保存后仍可自我更新和多向分化,加之其在多种组织器官中的显示出的修复作用,为组织器官的体外培养再造以及以 MSC 为载体的基因治疗开辟了广阔的前景。

有报道表明 MSC 可以分化为肺实质细胞,并可以参与肺的损伤修复,这为 MSC 移植在肺脏组织疾病治疗中的应用提供了思路。最近研究表明,外源 MSC 可以通过以下两个方面参与肺的损伤修复^[15,16]。首先,肺损伤所造成的局部微环境可以诱导移植的 MSC 向损伤部位聚集,并分化为 I 和 II 型肺泡上皮细胞、内皮细胞、肺

间质细胞和支气管上皮细胞等结构细胞修复组织损伤；第二，作为具有免疫调节功能的细胞，MSC 移植后可以减轻肺局部的免疫反应，为损伤修复提供有利的微环境^[15,16]。除此之外，MSC 可能还具有维持肺实质细胞功能的作用，但尚需进一步证实。值得一提的是，在上述体内移植实验中都观察到了移植的 MSC 有向肺损伤部位汇集的现象；而宫内移植实验也显示了 MSC 似乎对肺有特殊的亲和性：将绵羊的 MSC 移植到子宫内胎羊的腹腔后，流式细胞术分析表明 MSC 在肺部的嵌入比例表达最高，达到为 3.2%；远高于脾脏(0.8%)，肝脏和脑(0.6%)以及骨髓(0.4%)的嵌入比例^[17]。这显示了利用 MSC 治疗肺部疾病的优越性。

本课题以熏烟加脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 COPD 大鼠模型为实验对象，通过观察外源性的 MSC 对模型鼠肺脏组织的病理和生化指标的影响，系统的研究移植的 MSC 在肺损伤部位的分化命运和组织修复情况，借以了解 MSC 在 COPD 治疗中的价值；并观察不同剂量的 MSC 对模型鼠肺脏组织的病理和生化指标影响差异，为利用 MSC 治疗肺损伤性疾病提供实验依据。

本研究主要分为三个部分进行：

1. 大鼠骨髓间充质干细胞 (rBMD-MSC) 的分离、体外培养和鉴定 观察体外培养 rBMD-MSC 的相关生物学特性，建立稳定生长和传代的 rMSC 细胞株；
2. COPD 大鼠模型的建立 以单纯熏烟法和熏烟加脂多糖气道滴注结合法制备大鼠 COPD 模型，并用病理方法对模型进行检验；
3. 同种 rBMD-MSC 移植治疗 COPD 模型大鼠 检测外源的 rMSC 细胞在受体大鼠肺脏的分布和定植，分化以及寿命等问题，同时观察移植的 MSC 在受体大鼠全身分布情况；初步探讨和比较不同数量的 rMSC 的移植效果，了解移植治疗实验的量效关系；初步探讨 rBMD-MSC 移植对 COPD 的治疗机制。

第一部分

大鼠骨髓间充质干细胞的体外培养和生物学特性

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells MSC) 是一种来源于中胚层的成体干细胞, 它具有干细胞的基本特性: 自我更新能力和多向分化潜能。在适当的培养条件下, MSC 可以向三个胚层分化。研究表明, 在一定条件下它可分化为内胚层的肝细胞^[18]和胰岛 B 细胞^[11]; 分化为中胚层的间充质细胞如脂肪、骨、软骨细胞; 以及外胚层的视网膜细胞^[19]和神经细胞^[20]等。同样有研究表明, MSC 可以分化成为呼吸系统的支气管上皮细胞或肺泡上皮细胞等^[13]。它的这一分化潜能为多种疾病的治疗提供了一个全新的探索空间。

MSC 来源广泛, 身体许多组织, 例如血液、脂肪组织、关节软骨乃至肺脏^[21]当中均可分离出 MSC。但 MSC 最常见最经典的组织来源之一是骨髓。骨髓间充质干细胞 (BMD-MSC) 是目前研究最多最深入, 应用最广泛和最成熟的组织干细胞之一。

分离、纯化和培养是 MSC 应用性实验研究的第一步。恰当有效的 MSC 分离方法和培养条件能获得状态良好、纯度较高而数量充足的 MSC 以供下一步实验使用。目前用于分离 BMD-MSC 的方法主要有四种: 密度梯度离心法、贴壁分离法、流式细胞仪分离法和免疫磁珠分离法。

本实验第一部分采用的是全骨髓细胞贴壁分离法分离大鼠骨髓 MSC 并进行体外培养, 观察大鼠 MSC (rMSC) 一般生物学特性和稳定性, 为进一步的研究打下良好的基础。

材料和方法

一、实验材料

(一) 实验动物:

清洁级 6 周龄 Wistar 大鼠 4 只, 雄性, 体重 180-200g, 由上海中科院斯莱克动物实验中心提供, 单独饲养观察, 1 周后使用[生产证号: SCXK(沪)2007-0003; 实验证号: SYXK(沪)2007-0003]。

(二) 实验主要试剂:

1. 培养基: DMEM-LG 培养基, Hyclone 公司产品;
2. 胎牛血清: Gibco 公司产品;

3. 培养基添加剂: 抗生素 (青霉素/链霉素)、L-谷氨酰胺、牛胰岛素、维生素 C、地塞米松、吲哚美辛、1-甲基-3-异丁基-黄嘌呤 (IBXM) 等, 为 Sigma 公司产品;
4. 胰酶、DMSO 和 MTT: Sigma 公司产品;
5. 抗体: 荧光标记抗大鼠单抗 CD34-PE, Serotec 公司产品;
荧光标记抗大鼠单抗 CD29-PE、CD44-PE、CD117-PE、Sca-1-PE、Flk-1-PE、CD45-PE/Cy5、MHC-II-PE, Biologend 公司产品;
6. 试剂盒: DAB 显色试剂盒, 北京中杉公司产品;
S-P 法免疫组化检测试剂盒, 北京中杉公司产品;
7. 其他试剂: 油红染料, Chroma 公司产品, 上海化学品采购公司分装; NaCl、KCl、 NaH_2PO_4 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 NaHCO_3 等, 为国产分析纯; 无水乙醇、95%乙醇、80%乙醇等, 上海化学试剂四厂;

(三)主要实验仪器和设备:

-20℃及4℃冰箱	中国 Haier 公司
Milli-Q labconco 纯水仪	美国 Millipore 公司
超低温冰箱 (Forma Scientific)	美国 Forma Scientific.Inc
倒置相差显微镜、普通光学显微镜	日本 OLYMPUS 公司
FA1004N 电子天平	上海精密科学仪器有限公司
TH-880 超净台	苏州群众医电设备厂
E70 TF-3 微波炉	广东微波制品有限公司
FACSCalibur 流式细胞仪	美国 Beckton Dickson 公司
电热干燥箱	上海医疗器械总厂
Mettler Toledo 320-PH 计	上海 Mettler Toledo 器械公司
微型漩涡混合仪	上海沪西分析仪器厂
37℃恒温 CO ₂ 孵箱	德国 Heraeus 公司
BIO-RAD Model550 酶联免疫检测仪	日本 BIO-RAD 公司
冻存管、培养瓶、培养板	美国 Corning 公司
电热恒温水浴槽	上海医疗器械七厂
血球计数板	浙江玉环县求精医用仪器厂
手掀计数器	绍兴市医疗器械一厂
TGL-16C 离心机	上海安亭科学仪器厂
微量加样器	德国 GILSON 公司
磁力搅拌器	常州国华 (79-2 型)

此外，流式管、聚丙烯管（50ml）、10cm 及 15cm 玻璃平皿、40 孔铝质金属试管架、量筒（100ml、1000ml）、烧杯、滴管、手套、酒精灯、三角烧瓶（100ml、250ml、1000ml）以及样品储存盒等均由本实验室提供。

(四)主要试剂的配置:

1. PBS 溶液

① 0.1M PBS 溶液: NaCl 8.8g, KCl 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.488g, KH_2PO_4 0.2g, 加三蒸去离子水定容至 1000ml, 用 1M NaOH 调整 pH 值至 7.4, 高压蒸汽灭菌, 4℃ 保存。

② 0.01M PBS 溶液:

A 液 1000ml $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 31.2g

B 液 1000ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.632g

工作液: A 液 19ml+B 液 81ml+NaCl 17.18g+DDW 至 2000ml

调整 PH 值: 7.2—7.4, 分装入干净玻璃瓶, 高温高压灭菌, 封口标记, 4℃ 保存。

2. rMSC 维持培养基: DMEM-LG 培养基, 10%FBS, 4mM L-谷胺酰胺, 100IU/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素。

3. 0.25%胰蛋白酶消化液: 分析天平称取蛋白酶 250mg, 用 D-Hank's 溶液 100ml 溶解, 微孔滤膜过滤;

4. D-Hank's 溶液: 含 NaCl 8.00g/L, KCl 0.40g/L, NaHPO_4 0.06g/L, KH_2PO_4 0.06g/L, NaHCO_3 0.35g/L, 葡萄糖 1.00g/L, 酚红 0.02g/L;

5. 0.2%EDTA 消化液: 分析天平称取 EDTA 粉末 20mg, 用 D-Hank's 溶液 100ml 溶解, 微孔滤膜过滤, 高压灭菌;

6. 细胞冻存液: 30-40%FBS(胎牛血清)、10%DMSO、50-60%培养液混合;

7. 脂肪细胞诱导培养基: 10%FBS/DMEM-LG 培养基内含 4mM L-谷胺酰胺, 加入 10 μ g/ml 牛胰岛素, 0.25 μ M 地塞米松, 50 μ M 吡喹美辛, 0.5 mM IBXM, 100IU/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素。

8. 成骨细胞诱导培养基: 5%FBS/DMEM-LG 培养基内含 10^{-8} M 地塞米松, 0.2 mM 维生素 C, 10 mM β -甘油磷酸钠, 100IU/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素。

9. 饱和油红 O 染液: 用双蒸水稀释异丙醇成 60%(V/V), 加入油红 O 直至不再溶解为止, 37℃水浴, 继续加入油红 O, 水浴后仍不再溶解即达到饱和, 室温避光保存。
10. 碘化丙啶 (PI) 贮存液: 粉剂 100mg, 以 2ml PBS 溶解, 浓度为 50mg/ml, 4℃冰箱避光保存。
11. 细胞周期染色液: 含 PI 终浓度为 50 μ g/ml, 配方为 PI 5mg、RNA 酶 2mg、Triton X-100 1ml、生理盐水 65ml、枸橼酸钠 100mg, 加蒸馏水至 100ml, 调整 pH 值至 7.2-7.6, 4℃冰箱避光保存。
12. 10%中性缓冲甲醛: 37-40%甲醛溶液 90ml, 加入 0.1M PBS 溶液 10ml, 混匀备用。
13. 1M NaOH: 称取 4g NaOH 加入到 100ml 双蒸水中, 搅拌混匀。
14. 1M HCl: 8.5ml 浓盐酸加入 91.5ml 双蒸水。

二、实验方法

(一) 大鼠骨髓间充质干细胞的分离、培养和保存

1. 大鼠骨髓单个核细胞取材、分离和培养

- 1) 6 周龄雄性 Wistar 大鼠四只, 颈椎脱臼法处死, 用 75%的酒精浸泡 10min 后移至洁净工作台; 用消毒剪刀剪开皮肤, 无菌条件下取双侧股骨和胫骨, 剔除肌肉和筋膜, 置于无菌 PBS 液中并清洗数次, 转移到预先放入无血清 DMEM-LG 培养基的玻璃培养皿中;
- 2) 用无菌眼科剪剪去骨头两端, 用 5ml 注射器吸取 DMEM-LG 培养基, 将针头从骨头的一端插入, 将骨髓轻柔吹出, 重复吹打多次, 直至骨头发白, 用枪头将吹出物吹散成悬液;
- 3) 用 200 目滤网滤除去成团的组织, 轻轻吸取上层悬液至另一个离心管, 1500rpm 离心 5-8min; 弃上清液, 用 10%FBS/DMEM-LG 培养基重悬细胞并计数;
- 4) 将重悬后的单个核细胞以 $1-2 \times 10^6/\text{cm}^2$ 的密度接种到塑料培养瓶;
- 5) 将培养瓶置入 37℃、5%CO₂ 和 100%饱和湿度条件下的恒温细胞培养箱中, 视细胞贴壁情况于培养 24-48h 后完全换液, 去除所有未贴壁的细胞, 然后用 PBS 稍做冲洗, 以 10%FBS/DMEM-LG 继续培养, 每 2-3d 换液一次;
- 6) 通常 7-10d 即可长出明显的克隆, 待原代细胞生长融合达 80%时, 用 0.25%胰酶-0.02%EDTA 消化贴壁细胞, 合并所有克隆, 重新接种于培养瓶, 密度为 $5-10 \times 10^3/\text{cm}^2$; 此标记为 P1;

2. rBMD-MSC 的传代

- 1) P1 代 rMSC 细胞生长融合达 80%-90%时, 取培养瓶放入超净台, 轻摇数次后吸出培养基, PBS 洗 2 次(充分摇匀), 加入 0.25%胰酶-0.02%EDTA 消化(每个 25cm² 培养皿约 0.5ml), 在倒置显微镜下观察, 当多数细胞收缩变成圆形时弃胰酶, 加入含 10%FBS 的 DMEM-LG 培养基 5ml 吹打混匀, 均分到 3 个同等培养瓶中(按 1: 3 传代), 加入足量培养基混匀, 标记后送入培养箱继续培养;
- 2) 以后每 48-72h 消化传代一次, 按 1: 3 传代; 延续传代所用的培养液、消化液不变;

3. rBMD-MSC 的冻存和复苏

- 1) 冻存: 每代细胞除延续培养和做相关实验所需之外, 全部冻存。取对数生长期细胞(冻存前一日换液), 0.25%的胰酶消化制成细胞悬液, 计数并离心, 弃上清, 加入适量冻存液, 调整细胞浓度为 $1-5 \times 10^6$ /ml, 吹打均匀制成细胞悬液。转移至冻存管, 1-1.5ml/管, 标记封口, 4℃ 1h, -20℃ 3h, -80℃ 过夜, 而后置液氮中保存。

- 2) 复苏: 将冻存于液氮的的一管 rBMD-MSC 细胞取出, 迅速置于 37℃ 水浴不断轻轻晃动, 于 30s 内融化

↓
融化后在超净台无菌条件下用 75%乙醇将冻存管的盖沿擦拭干净

↓
将复苏的细胞悬液移入消毒灭菌的离心管, 加入 8-10ml 10%FBS/DMEM-LG, 混匀后 1000rpm 离心 5min, 弃上清

↓
将细胞用 10ml 10%FBS/DMEM-LG 重悬, 轻轻吹打均匀

↓
转入 75cm² 培养瓶中, 5% CO₂ 孵箱 37℃ 培养

↓
24h 左右换液, 去除未贴壁细胞

(二) rBMD-MSC 细胞的鉴定和生物学特性观察

1. rBMD-MSC 的形态学观察

每日在倒置显微镜下观察细胞的形态，拍照记录。

2. 细胞生长曲线的描绘

- 1) 分别取 P5、P10 及 P15 代细胞, 0.25% 的胰蛋白酶消化, 用 10% FBS/DMEM-LG 培养基配成单细胞悬液, 以每孔 500 个细胞的密度接种 96 孔板 (每组接种 7 块 96 孔板), 每个 96 孔板接种 5 个复孔, 每孔 200 μ l;
- 2) 将细胞移入 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 和 100% 饱和湿度的细胞培养箱培养;
- 3) 第 1-7d 每天各组取 1 块 96 孔板, 每孔加入 MTT 溶液(5mg/ml) 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 继续孵育 4h, 终止培养;
- 4) 小心吸弃孔内培养上清液, 每孔加入 150 μ l DMSO, 置于振荡器振荡 15min, 使结晶充分溶解;
- 5) 选择 490nm 波长, 在酶联免疫测定仪上测定各孔吸光度值(A₄₉₀ 值);
- 6) 以时间为横轴, A₄₉₀ 值为纵轴绘制细胞生长曲线;

3. 细胞周期测定

将 P5 代 rBMD-MSc 接种于 2 个 6 孔板, 分别在细胞生长融合达 30%-40% 和 90% 时取 1 板细胞, 经胰酶消化和 PBS 洗涤后离心, 逐滴加入 70% 的冰乙醇 3ml 重悬固定 (边加边摇匀), 放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱固定过夜。固定后的细胞离心 400g \times 10min, PBS 洗涤 1-2 次, 加入 RNA 酶 10 μ g 和细胞周期染色液 0.3ml 重悬细胞, 4 $^{\circ}$ C 冰箱固定 30min 后上流式细胞仪检测。CELLQUEST 软件采集数据, ModfitLT2.0 软件分析细胞周期。

4. 细胞表面标志的测定

取 P5 代细胞经胰酶消化、PBS 洗涤 1 次后, 离心收集细胞制成的 1 \times 10⁶/ml 单细胞悬液。每个样本取 0.1ml 细胞悬液, 分别加入荧光标记的单抗 CD34-PE、CD29-PE、CD44-PE、CD117-PE、Sca-1-PE、Flk-1-PE、CD45-PE/Cy5、MHC-II-PE, 室温避光孵育 30min, 加入 PBS 2-3ml 洗去未标记抗体, 再加入 0.3ml PBS 重悬细胞, FCM 上机测试 rMSC 的表面标记; 设置空白/阴性对照。

5. 诱导分化

1) 向脂肪细胞的诱导分化

取 P10 代 rBMD-MSc 以 1 \times 10⁴/孔的密度接种于 6 孔板, 每孔预先放入经清
洁消毒灭菌处理的盖玻片, 待细胞生长到密度达约 70% 时加入脂肪细胞诱导液

(如前述配方)，对照组则继续以 rMSC 培养基培养，每 3d 换液一次，第 7d 和第 14d 时取出细胞爬片做鉴定。

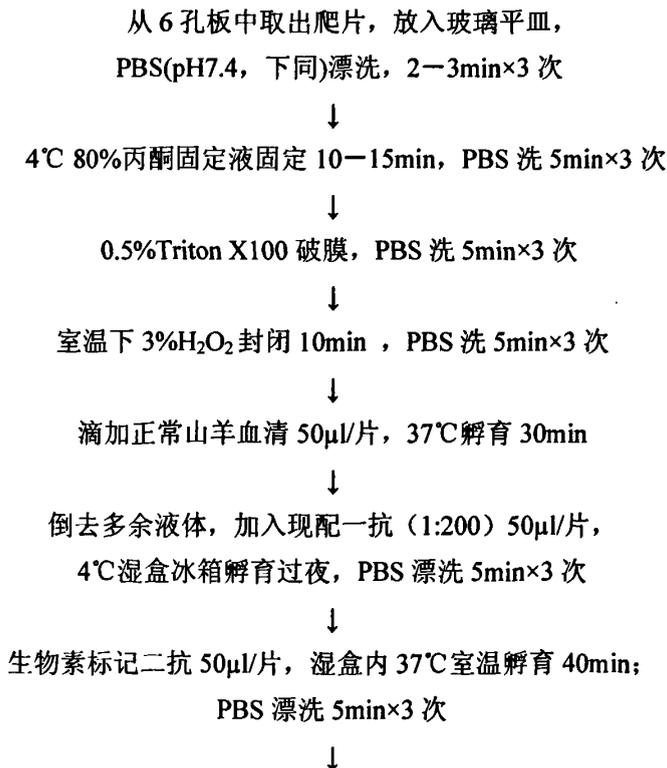
油红 O 染色鉴定：取出细胞爬片，PBS 漂洗 2 次，加 10% 甲醛固定 10min；将固定液倒去 20s 后，加入染液染色 20-30min，60% 异丙醇洗去多余染液，蒸馏水洗，镜下观察；照相。

2) 向成骨细胞的诱导分化

取 P10 代 rBMD-MSK 以 $3-5 \times 10^3$ /孔的密度接种于 6 孔板，每孔预先放入经清洁消毒灭菌处理的盖玻片，24h 后更换为成骨诱导培养液（如前述配方），对照组则继续以 rMSC 培养基培养，每 2d 换液一次，第 14d 时取出细胞爬片做鉴定。

①碱性磷酸酶(AKP)染色：取出细胞爬片，去离子水漂洗 3 次，加入 4℃ 预冷固定液(柠檬酸 40 μ l 十去离子水 2ml 十丙酮 3ml)固定 30s，去离子水冲洗，晾干；配制新鲜工作液，将二甲基甲酰溶解底物倒入缓冲液，再加入固紫 B 混匀；把固定后的盖玻片放入工作液，放于 37℃ 保温 45min，去离子水洗 3 次；1% 苏木素复染 3min，去离子水洗，晾干，光镜观察。

②I 型胶原的免疫组化染色：



滴加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液 (S-A/HRP) 50 μ l/片,
湿盒内 37 $^{\circ}$ C 孵育 40min; PBS 漂洗 5min \times 4 次

↓

滴加新配 DAB 溶液 40 μ l/片, 避光, 镜下观察显色 10min 左右,
自来水冲洗终止反应

↓

苏木素轻微复染 1~2min, 自来水冲洗, 盐酸酒精分化, 光镜观察

↓

梯度酒精脱水、透明、封片、镜检

对照设置: 以 PBS 替代特异性一抗作空白对照;

光镜下观察, 阳性细胞的胞浆呈棕黄色。

6. rBMD-MSc 成瘤性检测

1) BALB/c-nu/nu 裸鼠 (由中科院上海实验动物中心提供), 4 周龄, 雌雄兼用, 随机编号分成 3 组, 阴性对照组、阳性对照组和实验组每组 5 只, 共 15 只裸鼠, 在裸鼠室饲养一周适应新环境。

2) 消化收集对数生长期 P10 代 rMSC, PBS 洗 1 次, 充分吹匀制成单细胞悬液, 以 5.0×10^6 /0.2ml PBS/只在无菌条件下接种于实验组裸鼠背部脊柱右侧皮下; 阳性对照组给予肺癌 A549 细胞 2.5×10^6 /0.2ml PBS/只同部位脊柱两侧注射, 阴性对照组给予 0.2ml PBS 同部位注射;

3) 继续放进裸鼠室内的超净生物层流架中无菌饲养, 持续观察小鼠一般情况及接种位点变化, 接种 3 个月后处死裸鼠, 检查接种部位是否成瘤, 患肿瘤濒死死亡小鼠随时处死, 瘤体标本经 10% 中性福尔马林固定, 常规脱水包埋, HE 染色。

7. 数据分析

利用 SPSS13.0 软件进行数据统计。所有数据输入 SPSS 软件, 计量资料用 $\bar{X} \pm s$ 表示, 用 t 检验或方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、大鼠骨髓间充质干细胞的形态学观察

全骨髓悬液贴壁法接种 24h 后,倒置显微镜下观察,可见部分细胞已贴壁生长,纺锤形或星形,其中混杂着未完全分离的无核、扁圆的红细胞,体积明显小于有核细胞;首次换液(1-2d)后大部分红细胞被去除,剩下的贴壁细胞形态多样,部分呈现为梭形或纺锤形,少量形态不规则,细胞变大,可见数个细胞组成的小集落形成;1w 后,细胞大部分为梭形及纺锤形,并可见多角形及不规则形态,细胞增殖明显加快,集落逐渐融合成片,细胞透亮,浆少核大,折光性强(图 1-1A);2w 时细胞基本铺满培养瓶底,进行传代。传代后的细胞初始呈圆形,约 2-4h 开始贴壁伸展,后 6-8h 贴壁率可达 90%以上,绝大多数呈梭形的成纤维细胞样形态,均匀性分布生长,细胞增多汇合后呈漩涡状或辐射状排列,少数细胞表现为三角形、多角形等,胞核呈圆形或椭圆形(图 1-1B)。随着再次传代,在 P3 代以后的细胞形态均一;共观察 20 代细胞, P20 代之内细胞形态一致,生长速度接近,无明显核固缩、核碎裂及从培养瓶底脱落等衰老现象。

二、生长曲线的绘制

经 MTT 法描绘的 P5、P10 及 P15 代 rMSC 细胞生长曲线如下图示(图 1-2)。细胞接种第 1d 处于静止期,随后迅速增殖进入对数生长期,在 4-5d 时达到最大值,此后细胞生长逐渐达到饱和,进入平台期;采用方差分析进行统计学检验,结果显示 P5、P10 及 P15 代 rMSC 细胞的生长速度未见明显差异($P>0.05$),见表 1-1,表明细胞早期传代对其增殖无明显影响。

三、细胞表面标记的测定

体外培养的 P5 代细胞表面标记流式细胞术检测显示(图 1-3),细胞高表达 CD29、CD44 和 Sca-1,而不表达造血干细胞的标记 CD34、CD117 和 CD45,不表达 Flk-1、MHC-II,表明本实验中所培养的细胞为骨髓间质来源的干细胞。

四、细胞周期的测定

取生长汇合达 30%-40%和 90%时 P5 代 rBMD-MSc,流式细胞仪检测细胞内的 DNA 含量,结果显示 G0/G1 期细胞的百分比为 53.07%,S+G2+M 期细胞的百分比为 46.93%(图 1-4A);生长融合达 90%时的检测结果提示,G0/G1 期细胞的

百分比为 85.24%，S+G2+M 期细胞的百分比为 14.76%（图 1-4B）。细胞周期的测定显示细胞在生长汇合达 30%-40%时，增殖旺盛，以 S+G2+M 期细胞为主，而生长到汇合达 90%时反之，以 G0/G1 期细胞为主，细胞逐渐进入静止期。因此，体外培养的 rMSC 在对数生长期有良好的增殖能力，是良好的种子细胞。

五、诱导分化潜能检测

（一）定向诱导分化为脂肪细胞

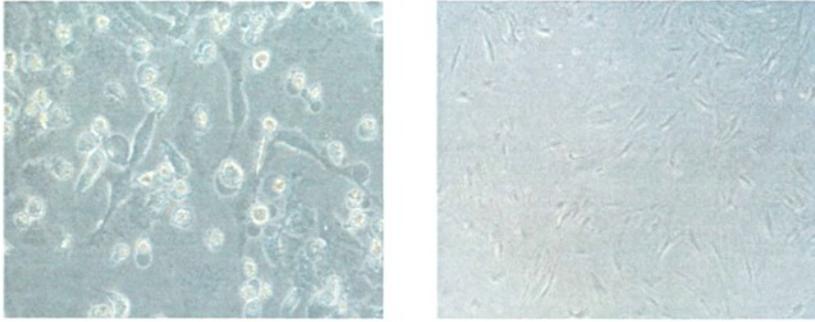
加入脂肪诱导体系后，rMSC 生长速度减缓，约第 3-4d 开始出现形态变化，逐渐由纺锤样和梭形变成椭圆形或三角形为主，胞浆内继而出现大小不等圆形脂滴。第 10-14d 取出爬片做油红 O 染色，可见细胞内有明显红色脂滴（图 1-5A）。

（二）定向诱导分化为成骨细胞

加入成骨诱导体系后，多角形和不规则形细胞逐渐增多，细胞体积变大；偶氮偶联法 AKP 染色可见胞浆内有紫红色沉淀（图 1-5B）；免疫组化 SP 法染色，可见细胞内有棕黄色 I 型胶原表达（图 1-5C 和 D）。

六、成瘤性检测

体外培养的 rMSC 接种于 BALB/c-nu/nu 裸鼠之后，小鼠生长状态良好，接种后观察 3 个月，接种部位皮肤无明显变化或肿块生成，实验组和阴性对照组小鼠解剖未见明显肿块形成（图 1-6A）；肺癌 A549 细胞接种的阳性对照组 5 只小鼠，有 4 只在接种后 10 天左右接种部位开始出现不规则隆起，肿块迅速长大，约 3-4w 即长成明显肿块（图 1-6B），小鼠形体消瘦，状态不佳，肿块病理切片 HE 染色，见癌组织内细胞排列紊乱，见明显核异性细胞（图 1-6C）。



A 原代rMSC (400×) B P5代rMSC (100×)

图 1-1: 体外培养 rMSC 的形态学观察

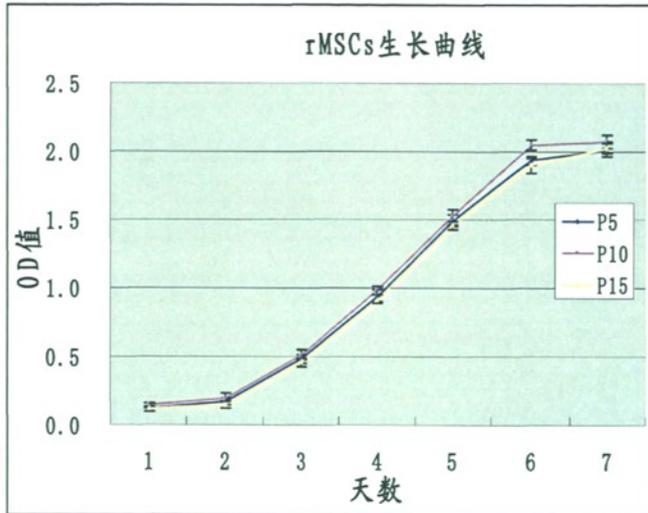


图 1-2: 体外培养 rMSC 的生长曲线

表 1-1: 体外培养 rMSC 的增殖状态 MTT 检测值($\bar{X} \pm s$)

	p5	p10	p15
D1	0.119±0.015	0.142±0.017	0.116±0.014
D2	0.175±0.024	0.201±0.027	0.150±0.022
D3	0.486±0.030	0.510±0.040	0.459±0.031
D4	0.943±0.042	0.982±0.030	0.919±0.033
D5	1.488±0.043	1.523±0.055	1.458±0.031
D6	1.934±0.031	2.051±0.037	1.901±0.054
D7	2.016±0.052	2.075±0.052	2.026±0.037
P	>0.05	>0.05	>0.05

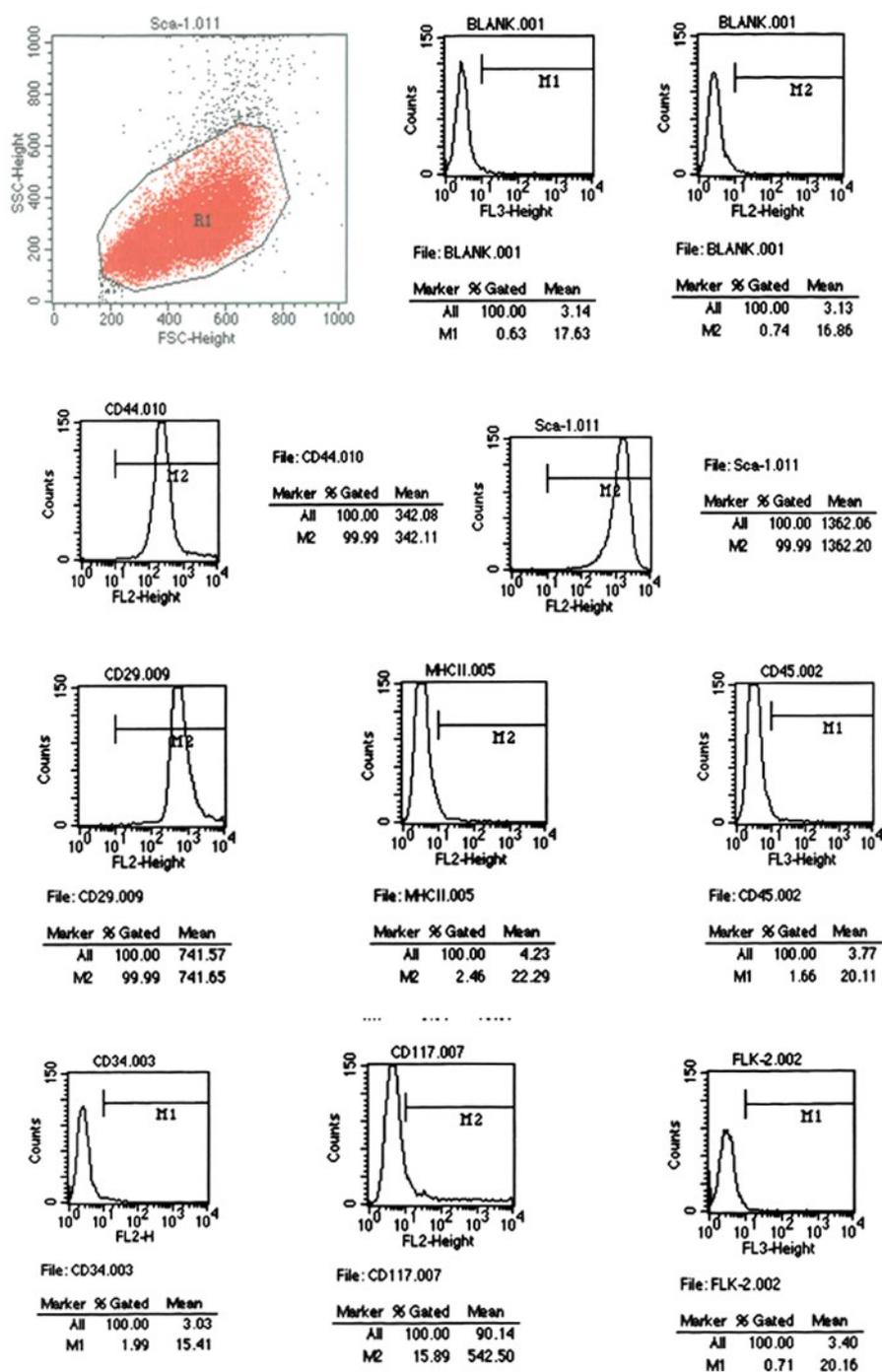
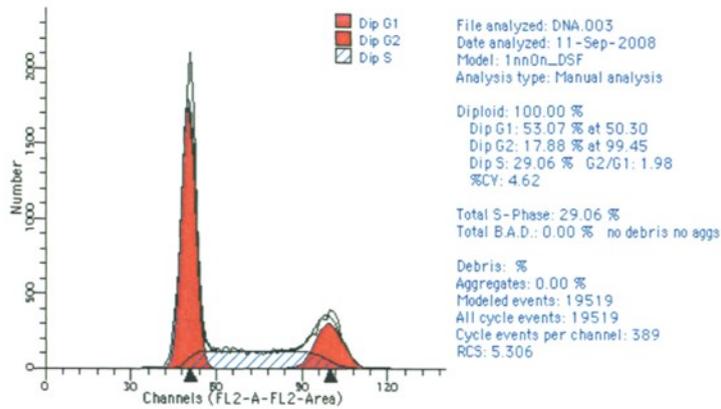
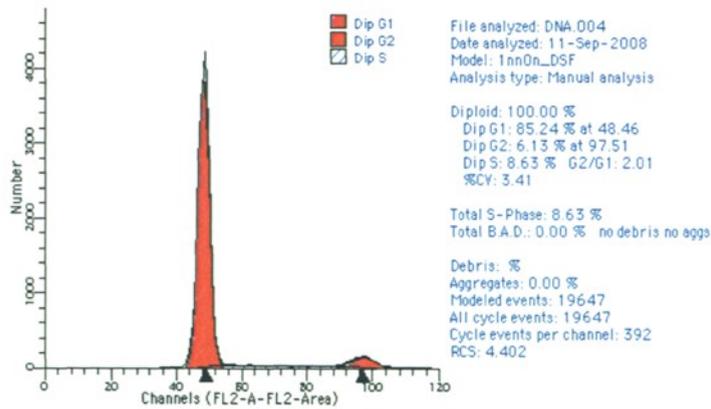


图 1-3: 体外培养 rMSC 细胞表面标志的测定

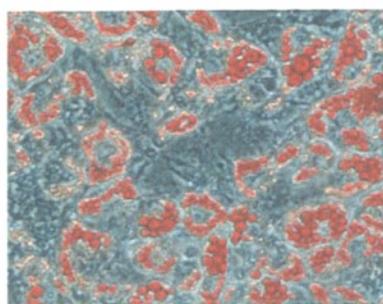


A 生长汇合达 30%-40%

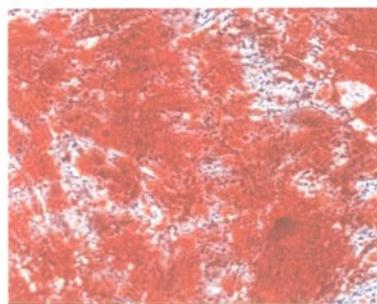


B 生长汇合达 90%

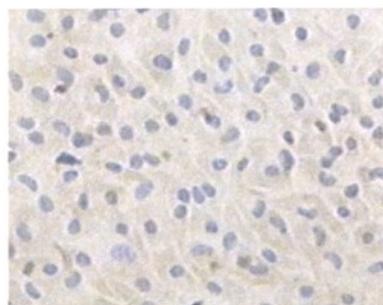
图 1-4: 体外培养 rMSC 的细胞周期测定



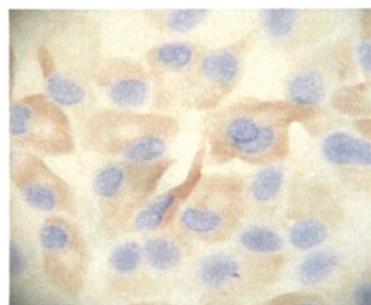
A 油红染色 (200×)



B AKP 染色 (200×)



C I型胶原 IHC 染色 (100×)



D I型胶原 IHC 染色 (400×)

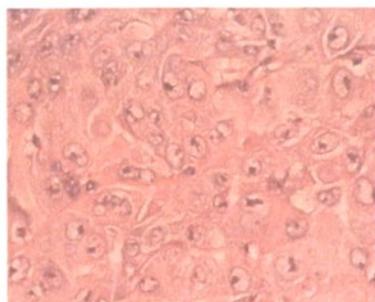
图 1-5: rMSC 体外诱导成脂肪细胞和成骨细胞



A 阳性对照组



B 实验组



C 肺癌 A549 肿瘤 HE 染色

图 1-6: rMSC 体外诱导成脂肪细胞和成骨细胞

讨 论

干细胞是一类具有自我更新和多向分化潜能的细胞。干细胞的概念在 1981 年第一次提出^[22]，而到 1998 年，干细胞研究已经引起各界政府和科学家的广泛重视^[23,24]。根据来源和发育阶段的不同，干细胞可分为胚胎干细胞和成体干细胞。机体的各种组织器官中存在成体干细胞^[21]，主要生理功能是组织损伤后的修复和再生作用，它们在生理状态下保持静止状态，一旦其所存在组织受到损伤，特定的微环境变化使得组织内成体干细胞被激活并分化为所需的细胞，从而实现组织损伤后的修复和再生功能。在这当中，发现最早并且目前研究最多的成体干细胞是骨髓间充质干细胞(BMD-MSC)。

BMD-MSC 存在于骨髓基质系统中，是区别于造血干细胞的一类组织干细胞，是骨髓造血微环境的重要组成部分。它形态上与成纤维细胞和内皮细胞相似，最初由 Friedenstein 发现。正如前述，在一定条件下它可分化为软骨细胞、心肌细胞、神经细胞、肝细胞、支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞等多个胚层来源的细胞^[25-27]。并且，BMD-MSC 在体外易于分离、培养和扩增，免疫原性低^[28]，使其在组织工程、细胞移植、基因治疗等领域具有十分广阔的应用前景。

无论作为基因载体和还是种子细胞，MSC 细胞治疗的效果都受到所用细胞种类、活性、细胞周期、分化潜能和安全稳定性等生物学特性的影响，因此 MSC 这些方面的特性对于移植治疗的效果至关重要。在本研究的第一部分，我们成功分离和体外培养、扩增了大鼠骨髓 MSC，并对其生物学特性做了相应研究与鉴定。

一、rBMD-MSC 的分离和体外培养

骨髓中的 MSC 含量极少，约占骨髓有核细胞总数的 0.001%至 0.01%^[29]，并且随着年龄增加或体质衰弱而逐渐减少。因此要获得足量的 BMSC，必须选择适当的动物来源和分离方法，获得足量细胞并在体外进行扩增。目前，BMD-MSC 的分离方法主要有贴附细胞分离法^[30]、流式细胞分离^[31]、免疫磁珠分离、细胞筛选法和梯度离心分离等。每种方法各有优缺点：1、全骨髓贴壁法：主要根据 BMD-MSC 的贴壁生长特性来实现分离，此法操作简易易行，分离到的细胞分化活力和潜能较好，被广泛采用，但所得骨髓 MSC 的纯度稍有受限；2、密度梯度离心法：主要根据骨髓中细胞的比重不同，清除红细胞，采用 Percoll 或 Ficoll 进行密度梯度离心分离提取骨髓单个核细胞进行贴壁培养，该法也被广泛应用，分离培养的 MSC 大小均匀，纯度较高，但也损失不少细胞；3、细胞筛选法：主要是根据细胞大小来实现分离，利用一种由 3 μ m 小孔的塑料培养皿从骨髓中筛选骨髓 MSC；4、细胞表面分子记号法：根据骨髓 MSC 的细胞表面分子特征来分离，一般采用流式细胞仪、免疫磁珠或免疫沉积法来进行分选，此法获得的 MSC 纯度较高，但操作繁杂，需要昂贵

的仪器和试剂，成本较高，并且对细胞的活性影响较大，损失细胞较多，因而较少采用^[32]。

我们的研究选用 6 周龄的雄性 Wistar 大鼠，此时动物尚年幼，骨髓细胞有足够数量和良好活力，然后应用全骨髓细胞贴壁法，利用不同的消化、贴壁时间和传代来达到细胞的纯化。实验成功地分离出大鼠的 rMSC，生长曲线显示分离的细胞有旺盛的自我更新和增殖能力，且传代 P15 以上细胞的形态无明显变化，表现为成纤维细胞样外观，形态均一，稳定性与活力尚佳。全骨髓培养法通过换液去除红细胞等杂细胞，对于贴壁细胞，根据粘附能力不同，通过调整胰蛋白酶消化时间，将 MSC 纯化，这种方法最大限度的保留了骨髓中的 MSC，并除去了杂细胞，随后经细胞表面标记的鉴定提示细胞的纯度可达 90%以上。

MSC 的体外培养采用常规的组织细胞培养方法。艾国平^[33]的研究表明，选用原代培养时 4-24h 贴壁的有核细胞进行传代培养最适宜，选用贴壁过早的细胞贴壁细胞数量过少，细胞生长困难；贴壁时间过长，造血细胞可粘附在贴壁细胞上成集落生长。培养基中胎牛血清含量为 5%-10%，细胞接种密度为 $4-8 \times 10^4/\text{ml}$ 最利于细胞生长。一般来说，分离较好的细胞前 20 代都能保持良好的活性增殖能力，传代周期为 3-4d，以后可能逐渐出现衰老凋亡。体外培养时 MSC 的倍增时间、传代能力及分化潜能与培养基血清浓度有关。血清浓度过低会导致细胞营养不良，生长速度过慢以及过早死亡，过高的血清浓度则由于含有大量促进细胞增殖的因子，易引起细胞增殖分化或过早出现老化；同样地，接种密度过高和过低也影响细胞的增殖与分化。我们选择 5%-20%的胎牛血清的培养基维持细胞系，结果发现用含 10% FBS 的 DMEM-LG 培养时细胞的增值能力最佳，各代细胞的形状和生物学特性都能保持稳定。

在生理状态和体内局部微环境下，体内的间充质干细胞具有壁龛作用，即保持静止状态，一旦其所存在组织受到损伤需要修复时被激活并分化为所需的细胞，因此体内骨髓 MSC 在生理状态下以 G0/G1 期为主，大部分细胞处于相对不活跃的静止期。但 MSC 经过体外培养其增殖速度会加快，在细胞的对数生长期，由于细胞的复制分裂，S+G2+M 期细胞的增加。根据本实验的结果提示，rBMD-MSC 在对数生长期 S+G2+M 期细胞的百分比可达 46.93%，在细胞生长到达平台期后为 14.76%。

二、rBMD-MSC 的表面标记及细胞鉴定

尚未发现 rBMD-MSC 的特异性表面标记，因此，目前还没有比较明确的鉴定方法，只有通过培养过程中细胞的形态、出现的分化表型及多向分化的潜能，推测是否为间充质干细胞。本实验中所分离的细胞经过传代，到 P4 及以后的镜下所见

为：细胞体积较小细长，呈梭形或纺锤形，细胞核明显，核浆比大，均匀性分布生长，汇合后呈漩涡状或辐射状排列，符合间充质干细胞的形态学表现。

目前研究发现，MSC 高表达 SH2、SH3、Sca-1 和基质细胞和间质细胞的表面标志如 CD29、CD90、CD105、CD166 和 CD44 等，不表达造血细胞表面抗原（如造血前体细胞标志抗原 CD34、CD117，成熟造血细胞标志抗原 CD38，白细胞标志抗原 CD45，淋巴细胞表面抗原 CD11a 和单核细胞/巨噬细胞表面抗原 CD14）^[34]，也不表达血管内皮生长因子受体 Flk-1 和 MHC-II 类分子以及共刺激分子 B7 等。此外 MSC 还表达一些细胞因子包括：IL-1 α 、IL-6、IL-7、IL-8、IL-11、IL-12、IL14、IL-15 和 G-CSF 等^[35]，及这细胞因子相应的受；表达细胞外基质，包括 I 型、III 型、IV 型、V 型和 VI 型胶原蛋白、粘连蛋白、透明质酸酶及层连蛋白等^[35]。

通常人们通过阴性标志和阳性标志相结合的方法来综合分析 MSC 的表型。因此我们选用了 CD34、CD117 和 CD45 作为实验细胞的阴性鉴定标记，CD29、CD44 和 Sca-1 为阳性鉴定标记，同时检测了 Flk-1 和 MHC-II 类分子表达情况，流式细胞分析的结果显示，本研究分离到的细胞绝大部分高表达 CD29、CD44 和 Sca-1（99.99%），而不表达或低表达 CD34（1.99%）、CD45（1.66%）和 CD117（15.89%），此外他们也极少表达 Flk-1 和 MHC-II 分子，提示分离培养所得细胞绝大部分符合间充质干细胞的表达特性。

根据已有的报道，鉴定 MSC 的“金标准”就是检测其多向分化潜能。由于 MSC 向成骨细胞的分化最早为人所注意，因此也最常用于分化实验鉴定所用。MSC 向骨细胞的分化受细胞因子、激素、物理作用等多种因素的影响^[36,37]，在体外 MSC 向成骨细胞分化在很大程度上依赖于诱导的条件，在培养体系中加入地塞米松、 β -磷酸甘油和抗坏血酸等单独或联合诱导，培养的 MSC 可逐渐形成聚集体或结节，碱性磷酸酶活性也随之增高，可分化为成骨细胞，这在我们的研究中得到证实。本实验根据文献选用含地塞米松、维生素 C 和 β -甘油磷酸钠的诱导体系，在诱导 10-14d 以后，细胞爬片的 AKP 染色阳性，I 型胶原的免疫组化染色显示片中大多数 MSC 经过诱导后成为阳性表达的成骨细胞。

类似地，人和动物的骨髓 MSC 在多种生长因子、细胞因子的作用下可向脂肪细胞分化。事实上 MSC 在体外培养过程中有少部分可以自动分化成为脂肪细胞。而经过脂肪诱导体系（异丁基-甲基黄嘌呤、地塞米松、胰岛素和吡哆美辛等）诱导的 MSC 可有 95% 以上定向分化为脂肪细胞，在形态上逐渐变呈椭圆形富含脂滴的细胞，正如图 1-5A 所示，由此可以看出我们所分离的细胞有分化潜能，明确了其 MSC 的性质。

当然, rBMD-MSc 的可塑性还远不止这些。在一定的体系中, 它还可以被诱导成为软骨细胞、上皮细胞、心肌细胞、神经元细胞、肝细胞、肺泡、支气管上皮细胞等等。这些在许多过往的经典研究中被得到证实。

三、rBMD-MSc 的安全性

近年来有关 MSc 的研究和应用有了极大的进展, 但关于 MSc 的许多生物学特性及分化调控机制尚不十分清楚。经体外分离、培养的干细胞是否存在基因突变, 植入机体后是否有癌变或者引发其他疾病的可能, 目前所进行的相关研究较少, 有待进一步的观察。目前的多数的研究认为, MSc 移植治疗是安全有效的, 虽然有效性和可应用性程度差异很大。但也有一些报道提示 MSc 在某些情况下可能诱发免疫障碍和肿瘤形成。例如, 有研究发现, 将体外传代扩增的小鼠 MSc 输注到受体小鼠体内后, MSc 在受体小鼠的肺部毛细血管床沉积, 并在此迅速增殖, 或侵入肺实质, 形成骨肉瘤样病理改变的瘤块组织^[38]。而且, 恶变的过程可能在体外培养过程当中即已发生, 并在移植后的到表达^[39]。

我们在研究的第一部分中, 对 rMSc 做了裸鼠成瘤性实验, 以初步评价其安全性。接种的实验组 BALB/c nu-nu 小鼠继续饲养三个月, 未见明显肿瘤形成或者生长状态受影响, 而阳性对照组成瘤率达到 80%, 充分证明 rMSc 在恰当条件的体外培养中能把保持遗传性状的稳定性。当然, 至于在体内环境下, rMSc 是否仍然绝对安全, 还需要更多和更长时间的观察以证实。

总结而言, 本部分研究结果提示, 我们通过全骨髓贴壁法获得了足够数量和活力的 rBMD-MSc, 这些细胞活力和稳定性俱佳, 有良好的分化潜能与安全性, 来自同一批 Wistar 大鼠分离所得, 同质性好, 可以同时扩增出足量同代同批次细胞进行实验, 保证随后的实验具有可比性。当然, 干细胞治疗目前缺乏有效的体内诱导, 在治疗过程中, 有可能不能控制细胞某些特征, 使它们向人们所不希望的方向分化而出现非正常的组织修复结构, 因此在随后研究中除了观察 MSc 的修复治疗作用, 同样应当关注其安全性问题和不利影响。

第二部分

COPD 模型的构建和鉴定

COPD 是一种常见病，由于其发病率高、危害大而受到广泛重视。由于对 COPD 患者进行直接研究有一定的局限性，所以动物模型的研究显得非常重要。虽然目前为止仍没有一种公认的 COPD 理想动物模型，但近数十年来，随着对 COPD 病因和发病机理的认识不断深入，COPD 的实验动物模型也得到不断完善。根据不同实验目的的需要，研究者们采用不同的动物制作肺气肿模型。根据诱发肺气肿模型的机理不同，采用的方法也是多种多样的。我们借鉴文献的方法，本部分采用单纯熏烟法和熏烟加 LPS 气管注入结合法复制 COPD 大鼠模型，观察二者的造模效果。

材料和方法

一、实验材料

(一) 实验动物:

SPF 级 8 周龄 Wistar 大鼠，雄性，体重 200-220g，由上海中科院斯莱克动物实验中心提供，置于清洁环境下饲养观察，环境温度 $21\pm 3^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度 60%，自然光线采光，自由取水，普通专用饲料喂养。

(二) 实验主要试剂和设备:

1. 脂多糖 (LPS)：Sigma 公司产品，型号 055: B5;
2. 红旗渠牌香烟：烤烟型，焦油含量 14mg，尼古丁含量 1.1mg，河南新郑烟草集团;
3. 瑞氏染色剂：长海医院检验科惠赠;
4. 二甲苯、无水乙醇、中性树脂、苏木素、伊红：上海长海医院病理科惠赠;
5. 生理盐水注射液：上海长海医院药剂科;
6. 甲醛：上海生化试剂一厂产品;
7. 水合氯醛：上海贝基生物科技有限公司;
8. 主要仪器设备:

LEICA-RM2025 组织切片机
动物血液分析仪

德国 Leica 公司
德国西门子公司

4℃冰箱	中国 Haier 公司
动物电子天平	上海伦捷机电仪表公司
电热干燥箱	上海医疗器械总厂
YB-6 型生物组织包埋机	湖北孝感亚光电子技术研究所
光学显微镜	日本 OLYMPUS 公司
TGL-16C 离心机	上海安亭科学仪器厂
熏烟染毒箱	自制, 50×40×40cm, 80L, 自制, 侧壁有一直径为 2cm 圆孔
一次性真空采血管	上海伟思医用设备有限公司
注射器, 采血针等	上海天呈科技有限公司
血球计数板	浙江玉环县求精医用仪器厂
手掀计数器	绍兴市医疗器械一厂

(三) 主要试剂的配置:

1. 1mg/ml LPS: 将 LPS 1mg 溶解在 PBS 中, 加入 1ml PBS, 混匀即用。
2. PBS 液: KCl 0.2g, NaCl 8.0g, KH₂PO₄ 0.24g, Na₂HPO₄ 1.44g, 双蒸水溶解, 调节 PH 至 7.4, 定容至 1000ml, 高压蒸汽 15 磅灭菌 20min。密封 4℃冰箱保存。
3. 10%水合氯醛: 称取 5g 水合氯醛粉剂, 加入清洁灭菌的 50ml 试管中, 震荡混匀, 避光 4℃冰箱保存, 使用前预热。
4. 瑞氏染液配制: 瑞氏染剂粉 0.2-0.5g(根据不同批号产品的质量决定用量)置于乳钵中, 加 3.0ml 中性甘油充分研磨并逐步加入甲醇, 将溶液倒入棕色瓶内, 再将剩余的甲醇(总量为 97ml)冲洗乳钵中的残留染液, 全部装入瓶中。塞紧瓶口充分摇匀, 置阴暗处, 在室温下放置 1-2w (或 37℃温箱中 24h), 过滤后备用。

二、实验方法

(一) 实验动物模型的制备与分组

健康雌性 Wistar 大鼠 15 只, 购回后清洁环境适应性喂养一周, 随机分为随机分为三组: 正常对照组、熏烟加 LPS 气管注入组和单纯熏烟组, 每组各 5 只。

熏烟加 LPS 气管注入组 (A 组): d1、d14 经气管注入 1mg/ml 的 LPS 300 μ l, 第 2-30d (d14 除外) 将大鼠置入有机玻璃的熏烟染毒箱内, 注入红旗渠牌香烟烟雾, 每天两次, 每次 40min (每次 8 支烟, 分四次点燃, 每两支烟燃尽约需 8-10min, 换烟时间间歇 1min), 两次熏烟时间间隔 8h; 每连续熏烟 6 天休息 1 天, 为期 1 个月。

单纯熏烟组 (B 组) : 于 d1、d14 麻醉后经气管注入 300 μ l 生理盐水各一次。按文献方法设计^[40], 第 1-80 天, 每天两次将实验大鼠置入熏烟染毒箱内, 使用红旗渠牌香烟进行熏烟处理, 每次 40min (方法同 A 组), 两次熏烟时间间隔 8h; 每连续熏烟 6 天休息 1 天。为期 80 天。

健康对照组 (C 组) : 于 d1、d14 麻醉后经气管注入 300 μ l 生理盐水各一次。其余时间正常饲养, 无特殊处理。

(二)大鼠 LPS 气管注入方法

根据文献说明操作^[41]: 大鼠腹腔注射 10%水合氯醛 (0.3ml/100g) 进行麻醉, 将其仰卧固定于手术台上, 头部从大鼠门齿处以细绳务必固定牢固。以血管钳取出舌头并固定, 暴露声门, 用 16 号静脉套管针快速插入气管, 拔除针芯, 通过静脉套管针滴入 1mg/ml 的 LPS 300 μ l, 速度不要太快, 滴完之后补入少许空气以保证全部药液进入气管, 随后立即将大鼠固定板直立并左右旋转各三圈, 使 LPS 液能够均匀分布于两肺, 然后拔出套管, 将大鼠放回笼中俯卧, 注意保暖观察。

(三)外周血、支气管肺泡灌洗液(BALF)的采集及血常规检测

大鼠腹腔注射 10%水合氯醛 (0.3ml/100g) 麻醉后, 将其仰卧固定于手术台上, 碘伏消毒颈部至腹部皮肤, 沿腹正中线剪开皮肤和腹膜, 推移肠管暴露后腹膜, 钝性分开后腹膜, 暴露腹主动脉, 小心分离腹主动脉和静脉, 真空采血针沿腹主动脉朝心脏方向刺入, 见穿刺针回血后接抗凝真空采血管, 无菌条件下取血约 1-2ml 并混匀, 2h 内送血标本上机检查血常规。放血处死大鼠, 再沿体正中线前剪开颈部皮肤和胸壁, 切断肋骨入胸, 分离颈部皮肤和肌肉, 暴露气管和肺门, 沿气管逆行向下分离至气管分叉处, 于右主支管处结扎右肺, 小心移除心脏和纵膈, 距隆凸 1.5cm 处斜行切开气管, 使用钝头硬质空心管经该切口插入, 感阻力后左偏进入左主支气管。注入生理盐水 2ml 停留 30s, 反复抽吸 3 次, 回收抽回的生理盐水, 再注入生理盐水 2ml 重复操作, 共 3 次, 共注入生理盐水 6ml, 回收率一般达 80%以上。BALF 存入可防止细胞附壁的硅塑管内, 为细胞计数和细胞涂片观察备用。标本室温静置, 于 3h 内检测其白细胞总数和分类。

(四)支气管肺泡灌洗液 (BALF) 细胞计数与分类

取 1ml BALF 以 1 500 rpm 离心 10 min, 弃去上清液, 收集细胞, 计数。取 10 μ l 细胞悬液充入细胞计数板, 用低倍镜计数四角的四个大方格中的细胞数。沉淀细胞涂片, 晾干后行瑞氏染色 (温度与染色所需时间有密切关系, 气温低时应适当延长染色时间, 滴加瑞氏染液数滴染色数 min 后冲洗玻片, 晾干镜检), 检测细胞分类, 选取 100 个白细胞, 按其形态特点进行分类计数, 求出各种白细胞所占的百分率, 再以细胞总数求得 BALF 中各类白细胞的绝对值。

(五)肺组织标本的制备和 HE 染色

待单侧肺灌洗完毕后，切取钳夹的右侧肺，剖开，置于 4℃磷酸缓冲液（0.01M PBS，pH=7.3）中洗去血液，浸入固定于 10%福尔马林液中固定 24-48h，所有大鼠取右中肺常规石蜡包埋：

固定：在 10%甲醛溶液中固定 24h

↓

脱水：标本经缓冲液冲洗 30min，经梯度酒精脱水

↓

透明：二甲苯 30min

↓

浸蜡包埋：二甲苯加软石蜡经 45℃30min,60℃-62℃硬石蜡 1/2h×2 次包埋

↓

切片：以 4μm 厚度置于载玻片上，37℃烤片 4h 后室温下保存

HE 染色：

脱蜡前，将组织切片在 59℃烘箱内过夜烤片

↓

水洗 5min，0.01M PBS 洗 5min

↓

入二甲苯脱脂 10min×2 次

↓

无水乙醇 5min×2

↓

95%、85%、70%酒精下行至蒸馏水各 2min

↓

苏木素染色液染色 5-10min

↓

自来水洗 1-3min

↓

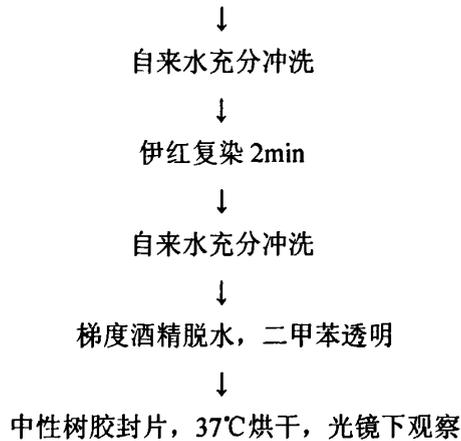
0.5%~1%盐酸酒精溶液分化数 s

↓

自来水洗 1-3min

↓

温热水洗 5-10min,或弱碱性溶液 30-60s 显蓝



(六)肺组织病理变化分析

各组每只动物随机选 1 张肺组织 HE 染色的病理切片，每张切片随机选取上、中、下、左和右 5 个视野(避开大血管和支气管)，100×倍显微镜下观察，数码相机摄像。

平均内衬间隔(MLI)和平均肺泡数(MAN)测定：在每个视野正中心划十字交叉线，计算与交叉线相交的肺泡间隔数(N_s)和每个视野内肺泡数(N_a)，同时测出十字线总长(L)和每个视野面积(S)。根据 $MLI=L / N_s$ (其数值反映肺泡平均直径)、 $MAN=N_a / S$ (其数值反映肺泡密度)，计算 MLI、MAN。

(七)统计结果的处理

计量资料用 $\bar{X} \pm s$ 表示，用 SPSS 13.0 软件对数据进行分析，组间比较采用 t -test 或方差分析，采用 SNK- q 检验进行多组之间两两比较， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、各实验组动物一般情况观察

各组大鼠均顺利完成造模过程，未出现死亡大鼠。

熏烟加 LPS 气管注入组 (A 组)：A 组大鼠在进行 LPS 气管注入当天未熏烟，麻醉过后大鼠能于 2-3h 内逐渐恢复活动能力和进食，4-6h 后已基本完全恢复；A 组和 B 组大鼠在熏烟初始 2-3 次熏烟时较烦躁，易激惹，跳动不停；随后的熏烟造模过程中大鼠形成条件反射，一旦开始熏烟即喜聚集成堆，减少活动或进入闭目休息状态，随着熏烟时程延长，逐渐出现张口喘息、气促、流涎、大汗，腹式呼吸加剧 (图 2-1)；熏烟结束后放归笼养。A、B 两模型组大鼠于造模开始第 1w 内即开始出现间歇咳嗽，呼吸明显较对照组急促，造模 2w 前后部分大鼠开始可闻及喘鸣，出现精神萎靡，拱背蜷缩，皮肤松弛，皮毛无光泽且脱落严重，活动能力下降，食纳较少，体型消瘦 (表 2-1)。

单纯熏烟组 (B 组)：熏烟时和平时饲养过程中与 A 组大鼠表现类似，A、B 两组造模结束时的外观无明显差异。

健康对照组 (C 组)：大鼠实验前后活动正常，活泼好动，食欲良好，体肥，皮毛光亮无脱落，无呼吸气促和紫绀，体重稳步增加。

表2-1: A、B、C三组大鼠体重监测 ($\bar{X} \pm s$)

组别	8w	12w	总增重
A	207.1±8.4	242.1±7.9*	35.0±2.7*
B	201.4±8.6	241.8±7.6*	40.4±1.1*
C	204.5±9.3	262.5±7.6	58.0±1.1

*与 C 组比较 $P < 0.05$

二、大鼠血常规和 BALF 检测情况

COPD 模型组 (A 组和 B 组) 外周血中白细胞总数和中性粒细胞分类升高，与健康对照组 C 组相比差异有显著性 ($P < 0.01$)；A、B 两组间的外周血白细胞总数和比例则无明显统计学差异 (表 2-2)。

与健康对照组 C 组相比，模型组 A 组和 B 组的 BALF 白细胞总数及中性粒细胞数均显著增高 ($P < 0.01$)，单核-巨噬细胞所占构成比显著降低 ($P < 0.01$)，但其绝对计数是增高的；A、B 两组间的 BALF 白细胞总数和比例则无明显统计学差异 (表 2-3)。

表2-2: A、B、C三组大鼠血常规检测情况 ($\bar{X} \pm s$)

组别	WBC ($\times 10^9/L$)	N%
A	18.9 \pm 4.0**	42.1 \pm 7.7**
B	17.2 \pm 3.9**	35.2 \pm 46.3**
C	8.3 \pm 2.1	15.3 \pm 43.2

**与对照组C组比较P<0.01

表2-3: A、B、C三组大鼠BALF检测情况 ($\bar{X} \pm s$)

组别	WBC ($\times 10^9/L$)	N%	M%	L%
A	3.57 \pm 0.17**	21.94 \pm 1.65**	73.91 \pm 1.81**	4.15 \pm 1.36
B	3.46 \pm 0.42**	22.57 \pm 1.76**	73.24 \pm 0.92**	4.18 \pm 1.01
C	2.13 \pm 0.24	8.30 \pm 0.85	87.10 \pm 1.13	4.60 \pm 1.07

**与对照组C组比较P<0.01

三、肺组织病理学观察

(一) 大体标本肉眼所见

两模型组大鼠的两肺外观呈膨胀状态, 体积明显增大, 颜色苍白, 弹性差, 指压后有压痕, 肺表面略显不平, 并可见小囊泡状突起, 有些局部可见充血, 无明显出血或渗出物; 肺脏表面和切面均可见多量较大的肺泡腔, 大小不一, 形状不规则(图2-2)。

健康对照组大鼠肺脏肉眼观表面光滑平整, 呈淡红色, 质地软弹性好, 指压后无压痕, 切面可见肺泡大小均匀一致。

(二) 肺组织 HE 染色结果

光学显微镜下观察 HE 染色后的肺组织标本切片。

健康组(C组): 支气管黏膜结构和肺组织结构清晰, 气管粘膜上皮完整, 纤毛排列整齐, 未见腺体增生及明显炎细胞浸润, 无支气管管腔扩张、上皮坏死脱落、纤毛脱失等病理改变; 肺泡壁无明显增厚, 肺泡腔干净、匀称, 相同视野内所见肺泡数目较多, 肺泡间隔稍厚, 肺泡大小均匀(图2-3)。

两 COPD 模型组(A和B组): 支气管粘膜上皮部分脱落, 腺体增生肥大, 管壁有淋巴细胞、浆细胞为主的炎细胞浸润; 细支气管周围平滑肌细胞增生, 胶原沉积增多; 肺组织内出现呼吸性细支气管、肺泡管、肺泡囊以及肺泡腔的扩大, 相同视野内肺泡数目减少, 肺泡腔不规则扩大且大小不一, 肺泡间隔变窄, 或可

见炎细胞浸润，可见部分肺间隔断裂，数个肺泡融合甚至形成一个肺大疱；小血管管壁增厚，周围组织疏松（图 2-4，图 2-5，图 2-6）。

A、B 模型组都有经典 COPD 病理变化，但 A 组病理切片中，较 B 组更常见有支气管、细支气管管壁及周围组织，以及肺间质内不同程度的炎症细胞浸润，支气管粘膜皱壁增多变长更为明显，突入管腔，导致管腔变窄或闭塞，腔内可见粘液栓及炎性细胞不同程度的渗出；B 组则主要表现为细支气管壁有时可见不同程度的炎细胞浸润，肺泡面积广泛扩大，肺泡间隔变薄及断裂。

（三）肺组织病理半定量分析结果

经前面所述方法测量得到的各组大鼠肺组织平均内衬间隔 (MLI) 以及平均肺泡数 (MAN) 数据如表 2-4 所示：单位面积内，A 模型组的 MAN 低于健康对照组，而 MLI 大于健康对照组，二者有统计学显著性差异(分别为 $P < 0.001$ 和 $P < 0.005$)；B 模型组的结果与 A 组类似 ($P < 0.001$ 和 $P < 0.005$)。其中 A 组的 MLI 绝对值较 B 组稍低，MAN 绝对值较 B 组稍高，但两者无统计学差异 ($P > 0.05$)。

表 2-4 A、B、C 三组大鼠肺组织 MLI 和 MAN 的比较($\bar{X} \pm s$)

组别	鼠数(只)	MLI(μm)	MAN(个/ 10^2mm)
A	5	52.34 \pm 3.12**	3.13 \pm 0.27**
B	5	50.90 \pm 3.70**	3.02 \pm 0.34**
C	5	42.52 \pm 4.41	4.24 \pm 0.29

*与 C 组比较 $P < 0.05$



图 2-1: Wistar 大鼠熏烟初期表现



图 2-2: A 组 Wistar 大鼠大体标本

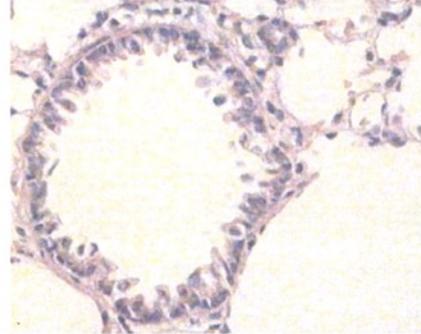
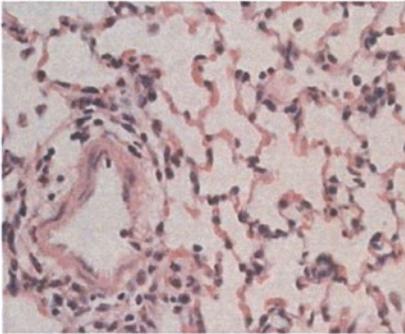


图 2-3 健康对照组 (C 组) 大鼠肺组织 HE 染色 (两图均 400×)

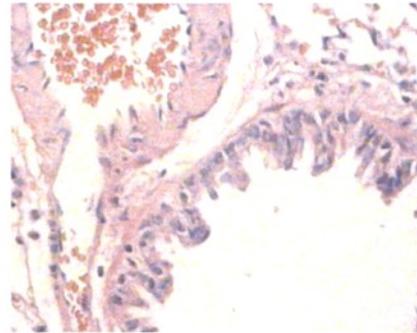
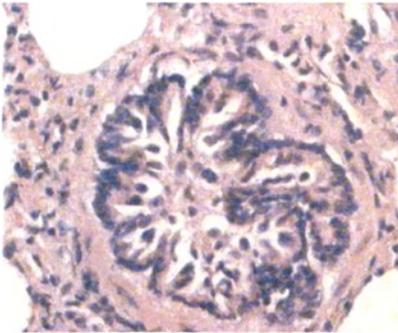


图 2-4 A/B 组大鼠肺组织 HE 染色: 小气道和小血管病变 (两图均 400×)

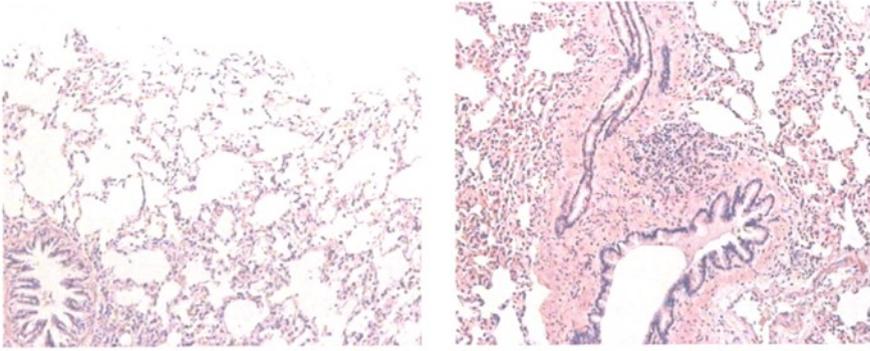


图 2-5 熏烟+LPS 组 (A 组) 大鼠肺组织 HE 染色 (左图 40 \times , 右图 100 \times)

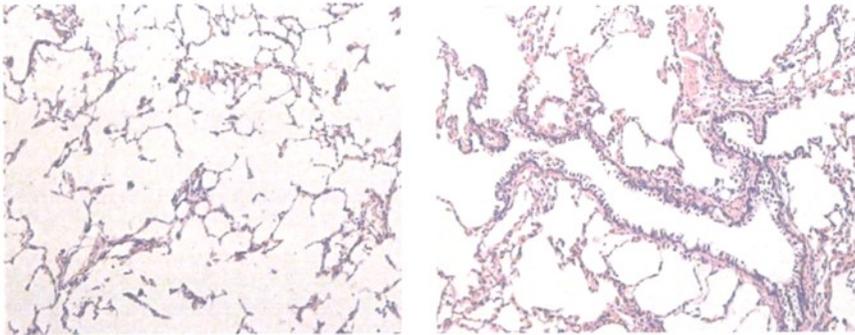


图 2-6 单纯熏烟组 (B 组) 大鼠肺组织 HE 染色 (左图 40 \times , 右图 100 \times)

讨 论

COPD 定义为一种以不完全可逆的气流受限为特征的慢性非特异性炎症, 病程进行性发展, 与肺部对香烟烟雾等有害气体或有害颗粒的异常炎症反应有关^[1]。COPD 特征性的病理学改变存在于中央气道、外周气道、肺实质和肺的血管系统。在中央气道有炎症细胞浸润表层上皮, 黏液分泌腺增大和杯状细胞增多使黏液分泌增加; 在外周气道的慢性炎症导致气道壁反复损伤和修复, 引起气道重塑, 造成胸腔狭窄和固定性气道阻塞; 肺实质破坏表现为小叶中央型为主的肺气肿, 涉及呼吸性细支气管损害, 并有肺毛细血管床的破坏; 肺血管改变以血管壁的增厚为特征, 这种增厚始于疾病的早期^[42]。

由此可见, COPD 是一种发病机制和临床病理表现复杂的疾病综合征, 这使得建立模拟 COPD 的多方面病理变化和临床特征的模型动物十分困难。建立标准化 COPD 动物模型是研究 COPD 发病机制和临床防治的基础, 同时也是 COPD 研究的一个难点。根据上述 COPD 病理特征, 一个符合临床理想的理想 COPD 动物模型应具备如下标准: (1) 致伤因素与临床 COPD 常见诱因基本一致; (2) 必须有气流阻塞存在, 小气道阻力增高, 并具有多层次结构破坏的病理特征, 包括气管、小气道、肺实质和肺血管; (3) 气道重塑; (4) 可伴有气道高反应性。但实际实验中往往很难达到全部这些条件。

根据不同实验目的需要, 研究者们采用小鼠、地鼠、大鼠、豚鼠、兔、狗、羊、猴来制作肺气肿模型。由于人们对大鼠基因组的研究非常深入, 且大鼠基因组与人的基因组序列较为相似, 故而成为目前最常用的 COPD 模型动物之一。因此, 我们的实验选用 Wistar 大鼠, 它种系较纯, 利于模型的可重复性及比较, 而且大鼠的体形较小、适应性强, 生命周期较短, 饲养繁殖以及药用成本低, 使得实验易于操作且周期较短。但它也有一定的缺陷, 主要在于: 啮齿类动物气管内纤毛的分布较少, 其气管黏膜下的腺体不发达, 且大鼠支气管的分支较少, 并且缺乏有呼吸功能的细支气管, 这使得在气道病变评价上有一定局限性, 在随后的干预研究评价中应当注意。但我们的造模结果显示, 在模型组大鼠的小气道和小血管都有典型的炎症、渗出反应和气道重塑、血管壁增厚等表现, 说明总体来说, 大鼠是较为理想的 COPD 造模选择。另外, 大鼠支气管炎症的介导体与人有所不同, 在实验研究中应当注意选择有代表性和说服力的炎症因子进行检测, 如 IL-8 和 IL-10, TNF- α 等。

根据诱发慢性支气管炎和肺气肿模型的机理不同, 造模采用的方法也是多种多样的。目前人们经常采用的 COPD 模型有数种, 尽量复制出 COPD 的多个层面特征。主要的造模方法有:

1. 大气污染法。流行病学调查资料显示, 空气污染是 COPD 重要危险因素, 吸入有害烟雾中的气体可引起慢性支气管炎及肺气肿。例如采用长期吸入高浓度 SO₂ 气体的方法建立模型, 可造成 Wistar 大鼠呼气峰流速(PEF)下降, 单位时间内气道内压上升幅度增大的气流阻塞现象。这些大鼠气道腔内黏液阻塞, 气道上皮坏死糜烂, 杯状细胞增生, 气道壁平滑肌增生, 肺泡腔扩大, 部分融合形成肺大疱, 运用这种方法也复制出稳定可靠的动物模型^[43,44]。常用的还有氯化镉诱导法^[45], 二氧化氮(NO₂) 吸入、高浓度氧吸入法等等。

2. 单纯熏香烟法。吸烟是目前引起 COPD 的最主要因素。让实验动物长期暴露于烟雾环境中, 能诱导出最真实的 COPD 模型, 逐渐呈现慢性支气管炎、肺气肿的病理改变和阻塞性病理生理改变^[46]。研究表明, 吸入烟雾的刺激和直接毒害作用, 能导致黏膜纤毛系统结构和功能异常, 引起支气管痉挛, 增加气道阻力。烟雾中的有害成分可直接损伤肺泡上皮, 导致肺血管内皮细胞及肺泡巨噬细胞聚集、活化, 一方面释放氧自由基与蛋白酶类(如弹性蛋白酶), 使气道上皮氧化负担加重, 形成氧化/抗氧化失衡, 另一方面抑制抗蛋白酶类(如 α 1-抗胰蛋白酶) 的活性, 破坏蛋白酶与抗蛋白酶之间的平衡, 最终形成 COPD。长期吸烟主要导致人类肺小叶中央型肺气肿。但各种动物气道和肺的结构有所不同, 对香烟易感性也不同, 形成肺气肿的机率和时间均有很大差异, 甚至相同种类不同个体间也有较大差异。大鼠对烟熏刺激表现了一定的抵抗力, 但不同种系的大鼠对烟熏的易感性也是有差别的。我们曾使用 SD 大鼠和 Wistar 大鼠进行比较发现, 后者对香烟的耐受性不及前者, 在熏烟如果过浓过久 (>10 支/次-每次 1h), Wistar 大鼠更易出现大批死亡现象。此外, 熏烟法难以控制烟雾浓度, 且多数报道认为吸烟诱发肺气肿动物模型的周期长, 约需 4-13 个月, 稳定性相对较差^[47]。但我们在建立单纯熏烟的 COPD 模型中, 仅用了 80d 时间, 造模的效果亦较好, 病理显示有明显的小气道增厚狭窄, 分泌物多以及显著突出的肺气肿与肺大疱, 甚至其 MLI 和 MAN 的变化较熏烟 4w 加上 LPS 气管注入组的更甚(B 组 MLI 50.90±3.70 和 MAN 3.02±0.34 vs A 组 MLI 52.34±3.12 和 MAN 3.13±0.27)。

3. 弹性蛋白酶诱导的肺气肿模型, 包括木瓜蛋白酶、人中性粒细胞弹性蛋白酶(HNE)、猪胰弹性蛋白酶(PPE)^[48]。这一类动物模型一次或多次气管内滴入酶类, 直接破坏肺泡间隔的弹性纤维, 使肺泡腔持续扩张而形成全小叶性肺气肿。该法周期短, 简便易行且稳定可靠, 制模时间短, 病理改变明显。但是用这种方法造成的病变与人类常见的由长期吸烟慢性刺激引起的小叶中央性肺气肿的病理变化并不完全一致, 而且模型肺组织内的病变往往分布不匀, 且弹性蛋白酶的局部浓度过大时,

很容易引起急性肺损伤，最终引起呼吸循环衰竭而致大鼠死亡，实验过程中大鼠死亡率可高达 30%左右。

4. 脂多糖诱发的 COPD 模型。脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性细菌释放的一种内毒素进入肺内后可以激活肺泡巨噬细胞。激活的肺泡巨噬细胞可以迅速产生 TNF- α 、IL-1、IL-8、血小板激活因子(PAF)等活性物质，其中了 TNF- α 是中性粒细胞的趋化物质，它可引起中性粒细胞与血管内皮粘附并进入肺泡壁间质和气道中。中性粒细胞可释放弹性蛋白酶及组织蛋白酶 G 等，导致蛋白酶/抗蛋白酶系统失衡，从而形成肺气肿^[49]。但使用化学药物诱导的肺气肿只可短时间内复制出与 COPD 所造成相似的呼吸道损伤，并不能复制出渐进性慢性的病理过程。

5. 基因调控的肺气肿动物模型。这其中又包括自然变异的小鼠肺气肿模型、基因敲除动物肺气肿模型^[50,51]和转基因动物肺气肿模型^[52,53]。近年来随着人类基因组计划和分子生物学技术的发展，对肺气肿发病相关基因的认识不断深入，通过对基因的调控造成相应肺气肿动物，必将为肺气肿的防治研究提供更为精确的模型。

不过，上述方法都各有优缺点，到目前为止尚无一种被公认为建立 COPD 动物模型的最佳方法。使用蛋白酶或化学药物诱导，同时配合使用烟熏是最常用的方法。宋一平等^[41]应用气管内两次注入脂多糖及熏香烟 4 周的复合刺激法建立大鼠 COPD 模型，结果发现模型组大鼠有慢性支气管炎、阻塞性肺气肿的特征性病理改变和气流受限的病理生理改变，与人类 COPD 类似。

根据历年来国内外同行们的研究为我们所提供的宝贵经验，在我们的实验的 COPD 造模过程中，采用了熏香烟加气管注内毒素法及较长期单纯熏香烟法两种方式，均复制出了较理想的 COPD 大鼠模型。模型组动物的病理改变与 COPD 尸检所见基本相符，表现为大鼠各级支气管粘膜上皮细胞明显损伤，支气管壁腺体增生，气道内分泌物增多；气道与周围组织，以及肺组织均有大量炎细胞浸润，气道壁增厚，细支气管伴行肺小动脉管壁亦明显增厚；肺泡扩大融合，有明显的肺气肿和肺大疱形成，病理也显示一定时程的烟雾暴露引起了肺部血管重塑^[54]。

模型组 A 组使用熏烟加 LPS 气管注入相结合的方法制作大鼠肺气肿模型。通过 1 个月的熏烟，引发气道慢性的炎症损伤和纤毛功能障碍，以及气道高分泌状态，黏液栓塞与气道痉挛造成气流阻塞。2 次气管内注入 LPS 模拟细菌感染和炎症，这是 COPD 病程进展中十分重要的病理生理过程，也是 COPD 急性加重的最常见因素，LPS 的主要成分脂 A 可诱使炎症介质的释放和激活。经查阅文献并进行预实验，我们采用了 LPS 200 μ g/300 μ l 气道内滴入，比文献适当增加滴入液体的体积^[55]，是为了减少用药误差和便于药物在大鼠肺部更均匀分布，浅麻醉后用 16 号静脉套管针代替一些文献所用的气管插管和气管切开给药，操作简便、快速，对动物人为损

伤小,模型稳定易重复。在本实验中观察到,LPS气道灌注后,大鼠当时可出现的呼吸急促等症状,病理学检查可见肺泡破坏以及气道和肺实质内大量中性粒细胞聚集等表现。所采用的致伤剂量效果确切,而损伤程度又适中,实验组动物造模期间内无动物死亡。肺部炎症损伤比较均一,损伤情况、病理改变与临床上由于细菌感染造成的肺损伤相似。研究表明,在烟熏的基础上加用气道内注射LPS,可以减少单独烟熏的次数,缩短造模的时间,与文献报道的相符^[56]。

模型组B组是采用经典的国际通用的单纯熏烟法,但我们并未熏烟长达3个月,而是把时间缩短为80天,结果表明仍然有显著的气道重塑和血管受累,肺气肿明显,广泛可见肺泡间隔断裂与肺大疱形成,病变程度与A模型组无显著差异。

我们比较了两种造模方法(单纯熏烟法和熏烟加LPS气管注入法)的效果,发现二者在共性中还有一些各自特点。A组病理切片中气道壁及其周围组织、肺间质内的炎症浸润较B组更常见,支气管粘膜改变更多,而B组则以肺泡面积的不规则扩大与肺泡及血管床破坏为主要特点。

另外,COPD可以导致全身不良效应,包括全身炎症和骨骼肌功能不良等方面。全身炎症表现为全身氧化负荷异常增高、循环血液中细胞因子浓度异常增高以及炎症细胞异常活化等。因此,我们检测了模型组大鼠的体重情况和外周血白细胞及分类。结果表明,血和BALF中的炎性细胞高,特别是中性粒细胞数量较对照组明显增多,说明了中性粒细胞在COPD的炎症机制中有重要地位,亦说明吸烟和反复气道感染能导致COPD的发生,戒烟和预防控制气道感染对防治COPD的发生发展具有非常重要的意义。

对COPD动物模型的评价,主要依靠病理学和肺功能观察,可辅以动脉血气、血和BALF常规检查等。病理指标(包括HE染色和电镜照片等)客观确实,能证实COPD模型肺组织的多层次结构破坏。肺功能检查则从病理生理角度阐释模型功能学改变,但是由于动物的呼吸检测是被动的,对于FEV₁和FVC等需要主动用力呼气的指标会缺乏稳定一致性结果。因此我们主要进行了病理切片的组织学观察,认真比对两模型组和健康对照组的病理结构差别,符合COPD的气道与肺实质、肺血管改变,同时模型组动物也具备COPD的全身表现如消瘦,活动能力下降,血和BALF中的炎性细胞升高。

总之,建立COPD动物模型最有效的方法仍然在探索中。根据本部分造模结果,我们认为,采用熏烟加LPS气管注入法复制COPD模型,比采用破坏性蛋白酶建立COPD的大鼠模型,从致病因素上和病程而言更符合COPD发生发展的病理生理状况;且用这种方法建立的模型较单用吸烟所得的模型更省时,并更多见COPD的组织炎症特征,小气道病变和气道重塑更为明显;相对较传统的SO₂吸入更安全;

与单用 LPS 气道滴入相比则较为经济可靠。建立的模型合理而稳定，经实践所确定的实验条件（包括熏烟的浓度和时间，选择动物的周龄等）切实可行，可重复性强，着眼于 COPD 损伤的常见致病因素和多级病理结构变化，可作为干细胞移植研究的良好基础。

第三部分

MSC 在 COPD 大鼠模型肺部的定植分化与治疗作用

COPD的肺部病变目前被认为属不可逆性病变，有害因素造成的肺部损伤依靠机体自身无法达到完全与正确的修复。这一方面是由于一些致病因素持续存在和作用，或者即使原发因素已经去除，但炎症级联反应仍继续进展；另一方面，则可能是因为在受到较为严重的损伤之后，机体内部，包括骨髓间质和肺局部，没有足够的干细胞用以修复组织。因此，应用外源性干细胞输注移植可能有助于机体的组织修复。骨髓间充质干细胞移植在充血性心衰、心肌梗死等心血管系统疾病的相关研究已开展较为广泛和深入，并有确切的依据证明外源性间充质干细胞通过局部注射能在坏死心肌区域停留下来，生存足够长的时间并转分化成为心肌样组织^[57,58]。而在胰腺疾病、神经系统疾病、骨科疾病和肝纤维化等众多的疾病领域，干细胞移植治疗的研究和效果评估也有类似的结果报道^[59,60]。

在呼吸系统疾病中，肺实质损伤疾病是很重要的一大类，包括多种间质性肺疾病、肺气肿和急性呼吸窘迫综合征等。这些疾病可出现气道上皮的损伤和肺实质、肺血管等的结构破坏，影响肺的通气和换气功能。而一旦支气管、肺泡上皮细胞发生了损伤，完全将其修复、恢复其功能几乎是不可能的^[61]。现行的治疗方法一般是尽早去除致病因素，最大限度地减少损伤细胞的数量和损伤程度，但治疗效果并不令人满意。因此在干细胞治疗的启发下，有人想通过其他方法给受到损伤的肺组织补充足够量的支气管、肺泡上皮细胞来改善和恢复肺的通气、换气功能^[15,16]，而MSC是较为理想和实用的来源。它具有自我更新能力和分化为多胚层细胞的潜能，性能稳定，易于采集和保存、扩增等，是理想的“种子”细胞。到目前为止，已有一些学者开始着手 MSC 移植治疗肺部某些疾病的研究，积累了初步的经验。但总的来说间充质干细胞与肺部疾病的治疗关系研究比较缺乏，大都集中在观察MSC治疗急性肺损伤和肺间质纤维化等方面的研究，且各家的报道不完全一致，使用的细胞也不完全相同，不具有可比性。

此外，虽然COPD是当今世界前四位的致残致死因素和呼吸系统极其重要的多发病^[1]，但到目前为止，关于COPD的干细胞治疗研究十分匮乏，更无须谈全面和系统的比较研究。对于COPD这样一个发病机制复杂、致病因素多样的疾病，干细胞是否也能达到治疗作用，外源的间充质干细胞在COPD的肺局部能否顺利定植下来（因为COPD伴有毛细血管床的大量破坏，静脉输注的效率有待考证），并在局部停留多长时间，能否发生转分化和分化修复的效率如何，都迫切需要进一步的探索。因此本部分研究采用静脉输注法将外源性rMSC导入用熏烟加LPS气管注入法复制的COPD的大鼠模型体内，系统的观察它们在动物模型机体内、在肺组织的各个解剖环节的定植情况，了解

它们的存活与停留时程、修复作用以及对于COPD病理损伤的改善情况如何，为MSC治疗肺损伤提供了实验依据。

材料和方法

一、实验材料

(一) 实验动物:

SPF级8周龄Wistar大鼠，雌性，体重200-220g，由上海中科院斯莱克动物实验中心提供，置于清洁环境下饲养观察，环境温度 $21\pm 3^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度60%，自然光线采光，自由取水，普通专用饲料喂养。

(二) 雄性Wistar大鼠骨髓间充质干细胞

取在本文第一部分中用全骨髓贴壁法分离培养的rMSC为移植所用。

(三) 实验常用仪器和设备

FA1004N型电子天平	上海精密科学仪器有限公司
TGL-16G型台式低温离心机	上海医用分析仪器厂
LEICA-RM2025组织切片机	德国Leica公司
Leica EG1140石蜡包埋机	德国Leica公司
Olympus CH光学显微镜	日本Olympus公司
荧光显微镜	日本Olympus公司
倒置显微镜	日本Olympus公司
冰冻切片机	德国Leica公司
可调式微量移液器	德国GILSON公司
-20 $^{\circ}\text{C}$ 及4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱	中国Haier公司
熏烟染毒箱	50 \times 40 \times 40cm 自制
BIO-RAD Model550酶标仪	日本BIO-RAD公司
37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温CO ₂ 孵箱	德国 Heraeus 公司
眼科手术器械	上海手术器械厂
TH-880超净台	苏州群众医电设备厂
微型漩涡混合仪	上海沪西分析仪器厂
可调多道(8)移液器(50-200 μL)	Eppendorf公司
超低温冰箱(Forma Scientific)	美国Forma Scientific.Inc
动物血液分析仪	德国Siemens公司

其他如细胞培养瓶、Tip 头 (200ml、1.0ml)、Eppendorf 小管 (0.5ml、1.5ml、5ml)、聚丙烯管 (50ml)、36 孔和 48 孔塑料 1.5ml 试管架、量筒 (100ml、1000ml)、烧杯、滴管、手套、酒精灯、三角烧瓶 (100ml、250ml、1000ml) 以及样品储存盒等均由本实验室提供。

(四) 实验常用试剂

1. 实验试剂

脂多糖 (LPS, 055: B5)	美国 Sigma 公司
红旗渠牌香烟 (焦油含量 14mg, 尼古丁含量 1.1mg)	河南新郑烟草集团
生理盐水注射液	上海百特医疗药品有限公司
青霉素钠、硫酸链霉素	华北制药厂
CM-Dil C-7000	Molecular Probes 公司
寡核苷酸探针预杂交液 即用型	灏洋生物制品公司
寡核苷酸探针杂交液 SRY 即用型	灏洋生物制品公司
复合消化液 (P/E)PH:6.4 即用型	灏洋生物制品公司
50%去离子甲酰胺 10ml	灏洋生物制品公司
2× SSC 干粉 2000ml	灏洋生物制品公司
细胞打孔液 10ml	灏洋生物制品公司
DAB Kit	灏洋生物制品公司
高敏过氧化物酶链亲和素复合物工作液	灏洋生物制品公司
TritonX-100	Sigma 公司
兔抗大鼠 Vimentin 多抗	美国 Santa Cruz 公司
兔抗大鼠 SPC 多抗	美国 Santa Cruz 公司
兔抗大鼠 CC16 多抗	美国 Abcom 生物技术公司
羊抗兔荧光二抗-FIFC	美国 Santa Cruz 公司
SABC 免疫组化试剂盒	武汉博士德生物工程公司
抗体稀释液	武汉博士德生物工程公司
大鼠 IL-10 ELISA 试剂盒	美国 Cytimmune 公司
大鼠 TNF- α ELISA 试剂盒	美国 Cytimmune 公司
大鼠 G-CSF ELISA 试剂盒	美国 Cytimmune 公司
甲醛	上海化学试剂四厂
无水乙醇	上海化学试剂四厂
PBS(0.01mol/l,PH7.4)	上海长海医院病理科惠赠

TBS(0.01mol/l,PH7.8)	上海长海医院病理科惠赠
Harris 苏木素染液	上海长海医院病理科惠赠
酸化伊红醇液	上海长海医院病理科惠赠
二甲苯	上海长海医院病理科惠赠
中性树胶	上海长海医院病理科惠赠
去离子水	上海长海医院中心实验室自制

其他常用试剂同第一和第二部分。

2.主要试剂的配制

1. 10%多聚赖氨酸：多聚赖氨酸原液用去离子水 1:10 稀释后用于涂载玻片。
2. 10×磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.4)：准确称取氯化钠 80 克、磷酸氢二钠 15.36 克、磷酸二氢钾 2.0 克和氯化钾 2.0 克，溶于 800ml 去离子水中，待完全溶解后用去离子水定容至 1000ml，10×稀释使用。
3. 抗原修复液 (pH 6.0)：取柠檬酸·H₂O 10.5 克加水至 500ml，取 11.5ml；柠檬酸三钠·2H₂O 取 14.7 克加水至 500ml，取 88.5ml，两者混合加水至 1000ml 即为 0.1M 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。
4. CM-Dil 储存液：1 mg CM-Dil 溶解于 1 ml DMSO，充分震荡混匀，以 50μl/支分装置低温冰箱保存备用。
5. 0.1%Triton：Triton × 1ml，加双蒸水 999ml，充分混匀。
6. 0.5%盐酸乙醇：浓盐酸 2ml 加 75%乙醇至 400ml，充分混匀。
7. LPS、细胞维持培养基、胰酶以及 HE 染色等制剂配置如前所述。

二、实验方法

(一) Wistar 大鼠 BMD-MSc 细胞的培养

选用足量的同批次 P5-P6 代进行实验。培养条件：含 10%FBS 的 DMEM-LG 培养基，培养于 37℃、5%CO₂ 和饱和湿度的恒温细胞培养箱，3-4d 传代一次，1:3 传代。

(二) Wistar 大鼠 COPD 模型建立

熏烟法+LPS 气管注入法进行大鼠 COPD 造模：d1、d14 经气管注入 1mg/ml 的 LPS 300μl，第 2-30d (d14 除外)将大鼠置入有机玻璃的熏烟染毒箱内，注入红旗牌香烟烟雾，每天两次，每次 40min (每次 8 支烟，分四次点燃，每两支烟燃尽约需 8-10min，换烟时间间歇 1min)，两次熏烟时间间隔 8h；每连续熏烟 6

天休息 1 天，为期 1 个月。造模结束后取其中一只解剖 HE 染色观察。

(三) rMSC 移植前的收集和 CM-Dil 染色

应用无菌 0.01M PBS 稀释 CM-Dil 储存液，rMSC 细胞在贴壁状态下以 2 μ g/ml CM-Dil PBS 溶液 37 $^{\circ}$ C 孵育 5min，4 $^{\circ}$ C 15min，然后倾去染色液以 PBS 洗两遍后，胰酶/EDTA 消化，PBS 洗涤离心 1-2 次后制备成细胞悬液，调整密度为 1 \times 10⁶/ml。取少量细胞悬液荧光显微镜下观察，计算荧光标记率，再移植标记的细胞到动物体内。

(四) 实验分组

选健康雌性 Wistar 大鼠 36 只，体重 200-220g，随机分为五组：健康对照组 4 只；rMSC 对照组 4 只；COPD 模型组 4 只；rMSC 小剂量/单次尾静脉移植组和 rMSC 大剂量/两次尾静脉移植组，每组各 12 只。

小剂量移植组（A 组）：按照第二部分熏烟加 LPS 气管注入法造模。于造模结束后 d1 予以用 CM-Dil 标记的 rMSC 单次尾静脉输注，量为 1 \times 10⁶/1ml。

大剂量两次移植组（B 组）：按照第二部分熏烟加 LPS 气管注入法造模。于造模结束后 d1 的上午和下午予以用 CM-Dil 标记的 rMSC 尾静脉输注 2 次，每次细胞量均为 1 \times 10⁶/1ml。

rMSC 对照组（C 组）：于 d1、d14 麻醉后经气管注入 300 μ l 生理盐水各一次。其余时间正常饲养，无特殊处理。于 A 组同一天予以用 CM-Dil 标记的 rMSC 单次尾静脉输注，量为 1 \times 10⁶/1ml。

COPD 组（D 组）：按照第二部分熏烟加 LPS 气管注入法造模。于造模结束后 d1 予以无菌 PBS 溶液 1ml 单次尾静脉输注。

健康对照组（E 组）：于 d1、d14 麻醉后经气管注入 300 μ l 生理盐水各一次。其余时间正常饲养，无特殊处理。于 A 组同一天予以无菌 PBS 溶液 1ml 单次尾静脉输注。

(五) rMSC 的移植后大鼠处死的时间点

在 rMSC 或无菌 PBS 溶液尾静脉输注后 d1、d7、d15、d30 分别处死 A、B 组实验动物 3 只。C、D、E 组动物于 rMSC 或无菌 PBS 溶液尾静脉输注后 d1 分别处死 4 只。

(六) 动物的处理和标本收集

1. 动物处理：大鼠称重、腹腔麻醉后固定，剖腹后无菌条件下取血约 1-2ml 并混匀，2h 内送血标本；以真空非抗凝采血管继续采血，按压动物心脏、继续放血直至不能再吸出血液（一般可采血 5-8ml），收集的血标本室温下直立静置于试管架上 1-2h 备用，动作轻柔避免溶血。然后进一步暴露气管和肺门，于右支气管

处结扎右肺，以生理盐水 2ml×3 次行左肺肺泡灌洗，回收的 BALF 存入可防止细胞附壁的硅塑管内备用（回收率一般达 80%以上）。弃左肺，切取钳夹的右侧肺，剖开，置于 4℃磷酸缓冲液（0.01M PBS, pH=7.3）中洗去血液，所有大鼠取右中肺以及心、肝、骨骼肌组织浸入 10%福尔马林液中固定 24-48h，右下叶纸锡纸包好置于冻存管，并立即放入液氮送冰冻切片。

2. 血清标本处理：室温静置后的外周血标本离心 2000 rpm 离心 10-20 min，用移液器小心吸取上层淡黄色血清，以 0.5ml EP 管分装两管，标记封口后保存于 -80℃冰箱备用。

3. BALF 标本处理：硅塑管内收集的 BALF 尽快进行细胞计数与分类检测。取 1ml BALF 以 1 500 rpm 离心 10 min，上清液以无菌 1ml EP 管分装 2 管，标记封口后保存于 -80℃冰箱备用；管底部所余下的细胞进行计数和分类，方法如前述。

(七) 组织标本 HE 染色处理

各组动物右中肺等组织常规石蜡包埋，4μm 厚度切片，HE 染色：

- (1)组织切片在 59℃烘箱内过夜烤片；
- (2)水洗，0.01M PBS 洗，5min×2 次；
- (3)入二甲苯脱脂 10min×2 次；
- (4)无水乙醇 5min×2 次；
- (5)95%、85%、70%酒精下行至蒸馏水各 2min；
- (6)苏木精液 5-10min；
- (7)冰醋酸数 s；
- (8)自来水冲洗碱化 3min；
- (9)入蒸馏水 1-3-min；
- (10)梯度酒精 70%、80%、95%-各 2min；
- (11)伊红 (95%酒精制备)5-10min；
- (12)95%酒精分色数 s 钟至数 min；
- (13)100%酒精 5min×2 次；
- (14)二甲苯 10min×2 次；
- (15)树胶封片。

各组每只动物随机选 2 张肺组织 HE 染色的病理切片，每张切片随机选取上、中、下、左和右 5 个视野(避开大血管和支气管)，100×倍显微镜下观察，数码相机摄像，测定平均内衬间隔(MLI)和平均肺泡数(MAN)。

(八) 冰冻切片的制作和 Dil 荧光镜下观察

- (1) 自液氮缸中取出经预冷处理的肺组织，用适量 OTC 包埋；

- (2) 将组织放上载台，在切片机腔体温度平衡至少 30min；
- (3) 将包埋好的样品固定在样品头上，放入冰冻切片机箱内，待包埋剂冻结变硬后，用冰冻切片机以 5 μ m 厚度连续切片 5-8 张，平铺于经多聚赖氨酸处理的载玻片上，标记正反面和标号；
- (4) 将载玻片放于丙酮中固定 5-10min；
- (5) 切片完成后即置于荧光显微镜下观察，随机选取 5 个视野记录；其余切片避光、风干保存 4 $^{\circ}$ C 冰箱，尽早使用。

(九) 石蜡切片原位杂交 (Sry 基因组 DNA-POD 探针染色步骤)

1. 石蜡切片梯度乙醇复水：用纯水配制 95%-80%-60%-30% 的梯度乙醇（3-5 min/次），然后进行下一步实验。
 2. 置入打孔液中室温 10 min，给细胞打孔以改变组织细胞的通透性使探针快速顺利的穿透细胞膜。0.1M PH 7.8 TBS 冲洗三次，5min/次-室温。
 3. 滴加复合消化工作液，覆盖组织表面，37 $^{\circ}$ C 10-30 min。甘氨酸终止消化。甘氨酸溶液：0.4g 甘氨酸溶于 200ml 2 倍浓度的 TBS (2mg/ml)，0.1M PH7.8 TBS 冲洗三次(4 $^{\circ}$ C 洗涤)。4 $^{\circ}$ C 乙醇梯度(30%-60%-80%-95%)脱水，室温干燥。0.2 \times SCC 洗一次（室温 3min）。
 4. 95 $^{\circ}$ C 0.1mol (PH 8.9) TBS 溶液孵育 15-20min，后 0.1M 冷 TBS 冲洗三次，5min/次（0 $^{\circ}$ C 洗涤）。至 50% 甲酰胺 0 $^{\circ}$ C 冰浴 20min，0.1mol TBS 洗涤三次，5min/次。
 5. 滴加预杂交工作液覆盖组织 37 $^{\circ}$ C 湿盒孵育 1h，盖上原位杂交专用玻片。
 6. 预杂交后的洗涤：揭去盖玻片以 0.2 \times SCC 室温洗三次，每次洗涤 5min。
 7. 滴加杂交工作液覆盖组织 37 $^{\circ}$ C 湿盒孵育 4h。
 8. 杂交后的洗涤：揭去盖玻片，2 \times SCC 37 $^{\circ}$ C 洗三次，每次洗涤 5 min；0.2 \times SCC 37 $^{\circ}$ C 洗三次，每次洗涤 5 min；0.1mol PH7.8 TBS 37 $^{\circ}$ C 洗 3-5 次，每次洗涤 5min。
 9. 滴加高敏过氧化物酶链亲和素复合物工作液至覆盖组织，37 $^{\circ}$ C 40min。
 10. 0.1M PBS 冲洗三次，每次洗涤 5min。
 11. DAB 显色，光学显微镜下观察至细胞内胞浆阳性颜色与细胞外背景颜色对比度反差明显时蒸馏水洗终止反应（显色时间约为 10-20min）。细胞核显棕黄色颗粒为阳性反应。苏木素复染。
 12. 80%>90%>无水乙醇>二甲苯脱水，每步须 3-5min，中性树胶封片保留。
- (十) 血清和 BALF 的 ELISA 检测

取出保存于-80℃冰箱的血清和 BALF 上清液标本，室温下复温 1-2h。采用双抗夹心酶联免疫吸附 (ELISA)方法。操作流程严格按照试剂盒说明书进行(以 IL-10 为例):

【原理】本试剂盒采用双抗夹心 ELISA 法。抗大鼠 TNF- α 单抗包被于酶标板上，大鼠标本中的 TNF- α 会与单抗结合。加入生物素化的抗大鼠 TNF- α (二抗)，它将与结合在单抗上的大鼠 TNF- α 结合而形成免疫复合物，未结合的将被洗去。辣根过氧化物酶标记的 Streptavidin 将与二抗的生物素结合，多余的物质会被洗掉。加入 TMB 显色。大鼠 TNF- α 的浓度与 OD(450nm)成正比。

【准备工作】

1.浓缩洗涤液(50 \times)用双蒸水稀释成 1 \times (至 350ml)。配制 1 \times HRP: HRP 用酶联物稀释液稀释 60 倍，即 1 份浓缩 HRP 加入 59 份 HRP 稀释液，即 50ul HRP 加入 2 950 ulHRP 稀释液。

2.血清样品应稀释 50000 倍，即 10ul 样品加入 5ml 生理盐水中，混匀 (1: 500)；将混匀液 10ul 加入 1000ul 样品稀释液中 (1: 100)，混匀；这样总共稀释 50000 倍。标准品已稀释，不用再稀释。其他样本请做预实验确定稀释倍数。

【操作步骤】试剂盒应平衡至室温 (20-25℃) 再行实验。取出所需反应板。

1. 加入 100ul 标准品(Standards)、100ul 已稀释标本于相应反应板孔中。
2. 轻轻混匀 30s，20-25℃温育 20min。
3. 洗板：甩尽板内液体，用洗涤液洗涤反应板（每孔内加入 350ul 洗涤液），并去除水滴（在厚叠吸水纸上拍干）；反复洗涤 3 次。
4. 每孔加入 100ul Biotin anti-rat IL-10。轻轻混匀 30s，20-25℃温育 20min
5. 洗板：甩尽板内液体，用洗涤液洗涤反应板（每孔内加入 350ul 洗涤液），并去除水滴（在厚叠吸水纸上拍干）；反复洗涤 3 次。
6. 每孔加入 100ul 1 \times HRP。轻轻混匀 30s，封住板孔，20-25℃温育 10min
7. 洗板：甩尽板内液体，用洗涤液洗涤反应板（每孔内加入 350ul 洗涤液），并去除水滴（在厚叠吸水纸上拍干）；反复洗涤 3 次。
8. 每孔加入 100ul TMB 显色液，轻轻混匀 10s，20-25℃温育 20min。
9. 每孔加入 100ul 终止液 (Stop Solution)。轻轻混匀 30s；15min 内在 450nm 处读 OD 值。

以 OD 值为纵坐标，以标准品浓度为横坐标，绘制标准曲线。根据样品的 OD 值可在标准曲线上查出其浓度。

$\text{Rat IL-10}(\text{pg/ml}) = \text{标准曲线上查出的浓度} \times \text{稀释倍数} / 50000$

(十一) 免疫组化方法检测组织 Vimentin 表达变化表达

将储存在 4℃ 的石蜡/冰冻切片室温中放置 1h

↓

石蜡切片脱蜡至水

↓

PBS 洗 2-3 次, 5min/次

↓

0.2%Triton×100 破膜

↓

3% H_2O_2 滴加在切片上, 室温静置 10min

灭活内源性氧化酶

↓

PBS 洗 2-3 次, 5min/次

↓

微波抗原修复

↓

PBS 洗 2-3 次, 5min/次

↓

滴加山羊血清封闭液, 室温 20min

↓

甩去血清封闭液, 滴加一抗 50 μ l, 室温静置 1h, 或者 4℃ 过夜

↓

4℃ 过夜后在 37℃ 复温 45min, PBS 洗 5min×3 次

↓

滴加二抗 40-50 μ l, 室温或 37℃ 静置 1h

↓

PBS 洗 5min×3 次

↓

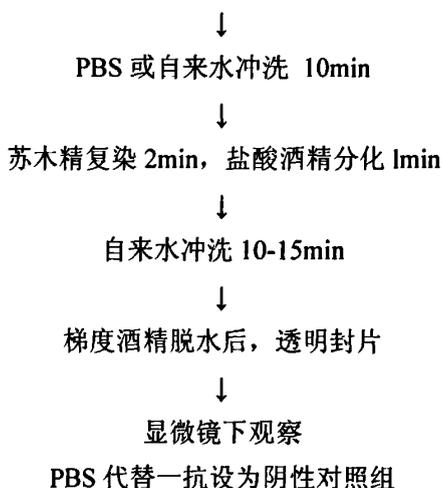
滴加适当比例稀释的 HRP 标记的链霉卵白素, 37℃ 孵育 30min

↓

PBS 洗 5min×3 次

↓

DAB 显色 5-10min, 在显微镜下掌握染色程度



(十二) CM-Dil 标记联合免疫组化方法观察 rMSC 转分化情况

冰冻切片荧光显微镜观察 CM-Dil 染色阳性细胞分布情况后, 选择 CM-Dil 阳性细胞较多的切片进行免疫组化染色:

- 1) 冻切片室温放置30min 后, 入4℃丙酮固定10min, PBS 洗, 5min×3次。
- 2) 3%过氧化氢孵育5-10min, 消除内源性过氧化物酶的活性。PBS 洗, 5min×2次。
- 3) 5~10%正常山羊血清 (PBS 稀释) 封闭, 室温孵育10min。
- 4) 倾去血清, 勿洗, 滴加1: 100稀释的一抗工作液 (兔抗鼠 SPC 和 CC16多抗), 37℃孵育1-2h 或4℃过夜。
- 5) PBS 冲洗, 5min×3次。
- 6) 滴加适当比例稀释的荧光标记二抗 (羊抗兔 FIFC), 37℃孵育40min-1h;
- 7) PBS 冲洗, 5min×3次。
- 8) 缓冲甘油封片。
- 9) 荧光显微镜观察, 4℃冰箱保存。

(十三) 统计学分析

计量资料用 $\bar{X} \pm s$ 表示, 用 SPSS13.0 软件对数据进行分析, 组间比较采用方差分析, 采用 SNK-q 检验进行多组之间两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、外源性 rMSC 在 COPD 模型大鼠体内的定植情况

1. rMSC 在各组大鼠肺组织的分布与定位

rMSC 在体外用 CM-Dil 标记, 标记的细胞在荧光显微镜下观察显示为红色荧光。标记率达 95% 以上(图 3-1F)。将标记好的细胞注入受体大鼠后, 各组大鼠在输注 rMSC 后相应时间点处死, 肺组织新鲜取材送冰冻切片, 荧光显微镜下观察, 结果发现: MSC 治疗组 (A、B 组) 大鼠肺组织的切片中均发现有一定比例的红色荧光阳性细胞(图 3-1 A, B), 细胞分布散在肺泡区、肺间质和气管粘膜下为主, 无明显区域分布规律, 肺组织发淡红色荧光, 隐约可见肺组织轮廓, 而 CM-Dil 标记的细胞所发红色荧光明显较周围组织亮, 呈点状分布, 聚集现象, 提示植入的 rMSC 到达肺部并趋化进入肺组织内部; rMSC 对照组 (C 组) 偶可见个别红色荧光标记的细胞(图 3-1 C); 而 COPD 组(D 组)和正常对照组 (E 组) 均未发现红色荧光标记的细胞(图 3-1 D, E)。

2. rMSC 在各组大鼠肺组织的定植效率

为进一步确定外源细胞进入受体大鼠肺组织的比例和移植效率, 我们再使用 Sry 基因原位杂交法对 COPD 模型肺部的外源性细胞进行定位, 并计数每个高倍镜视野 (400 \times) 下 100 个有核细胞中核染色阳性细胞的百分比, 每组每张片子随机选 5 个视野计数。

结果同样提示: MSC 治疗组 (A、B 组) 大鼠肺组织切片中均发现有相当比例的原位杂交阳性细胞 (细胞核染棕色) (图 3-2 A-1 和图 3-2 A-2, 图 3-2 B-1 和图 3-2 B-2), 细胞分布散在肺泡上皮、肺间质和气管粘膜下各处, 弥漫分布, 无明显区域分布规律; 血管平滑肌层和气管外周平滑肌层也有少量的阳性细胞; 镜下可见部分原位杂交阳性的细胞呈现 II 型肺泡上皮和气管粘膜上皮形态以及平滑肌细胞形态, 提示植入的 rMSC 到达肺部组织并定植入肺组织内部, 且在局部微环境中转分化为相应的肺结构细胞。有核细胞计数结果显示, A 组移植后第 7 天的肺组织中, 肺泡区阳性细胞百分率为 31.9% \pm 6.3%, 气管粘膜区为 20.3% \pm 5.7%; B 组的肺泡区阳性细胞百分率为 34.6% \pm 6.4%, 气管粘膜区为 19.9% \pm 8.4%; 二者比较无明显的统计学差异 ($P>0.05$)。rMSC 对照组 (C 组) 的肺组织内仅偶见阳性标记的细胞; 而 D、E 两组的肺组织标本中未见明显的阳性细胞(图 3-2 C, D)。

3. rMSC 在各组大鼠肺组织的存留时间

在 rMSC 移植后的 d1、d7、d15、d30 分别处死 A 组和 B 组实验动物, 各时间点冰冻切片观察和原位杂交检测均提示肺组织内有外源性细胞存在, 随着时间的推

移,肺内阳性细胞比例逐渐有所减少。结果提示,rMSC 经尾静脉移植后,可在 COPD 肺部定植并可在肺局部存活 30d 以上,有充分的时间发挥其生理作用(详见后,图 3-4)。

4. rMSC 在各组大鼠其他脏器的定植情况

分别检测各组动物的心肌、骨骼肌、肝脏内的外源细胞定植情况,结果提示,各组动物的心肌、骨骼肌内均未见到核染棕色的阳性细胞(外源细胞),在 A 和 B 组肝脏偶见原位杂交阳性细胞,提示 rMSC 移植后,外源细胞主要趋向于病变的肺部组织,其他脏器则无或罕有外源细胞进驻(图 3-3)。

5. 不同移植剂量的肺部定植效率比较

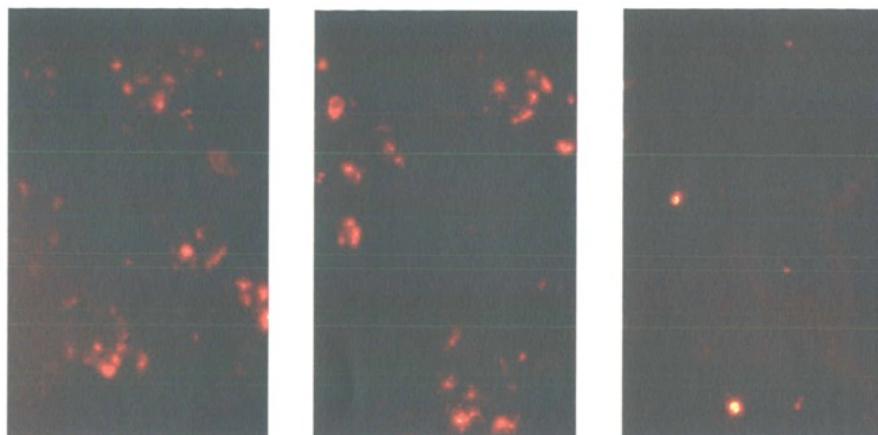
高倍镜下计数阳性细胞占有核细胞总数的比例,在移植后各时间点(d1、d7、d15、d30),A 和 B 组的肺泡区和气道粘膜区阳性细胞百分率无显著性差异,虽然 B 组的绝对值稍高,提示两种移植剂量的效率相当,无明显量效关系(图 3-4)。

二、各组的动物肺组织病理学改变

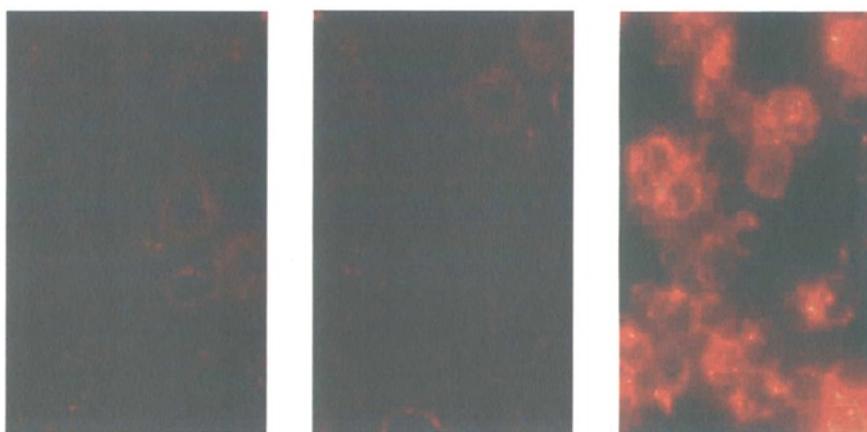
HE 染色光镜下观察各组大鼠肺组织可见:C、E 两组大鼠肺泡腔大小均匀,肺泡壁无增厚或破坏,各级气道粘膜上皮整齐,无腺体明显增生,肺内无明显炎细胞浸润;A、B、D 三组大鼠肺泡腔可见不规则扩大,肺大疱形成,肺间质和支气管周围有明显的炎症细胞浸润,小气道壁和伴行血管壁增厚,气道粘膜损伤脱落,上皮层排列紊乱,可见鳞状上皮化生和纤毛倒伏脱落,D 组最为严重;A、B 两组的肺部炎症、气道和肺气肿病变随着时间的推移(d1、d7、d15、d30)有逐步好转趋势,较 D 组有所好转,特别是炎症浸润情况改善;A 组和 B 组之间病理改变无显著差异;较之 C 和 E 组,A、B 两组的病变仍较明显(图 3-5)。

三、各组动物 BALF 和外周血常规检测

A-E 组动物外周血白细胞总数及中性粒细胞分类见表 3-1 和表 3-2,表中数据显示,rMSC 移植治疗之后的 d1,A、B 组和 D 组外周血、BALF 白细胞总数及中性粒细胞分类明显高于 C 和 E 组($P<0.01$),但随着时间的推移,A 和 B 组的数值逐步降低(图 3-6)。A-E 组动物 BALF 细胞总数及中性粒细胞分类见表 3-3 和表 3-4,其 A、B 组 BALF 细胞总数及中性粒细胞分类明显高于 C 和 E 组($P<0.01$),变化趋势和外周血相似。



A: 小剂量移植组 (A 组) B: 大剂量移植组 (B 组) C: rMSC 对照组 (C 组)



D: COPD+NS 组 (C 组) E: 正常对照组 (E 组) F: Dil 标记体外 rMSC

图3-1 各组动物肺组织冰冻切片荧光镜下观察 Dil 阳性细胞

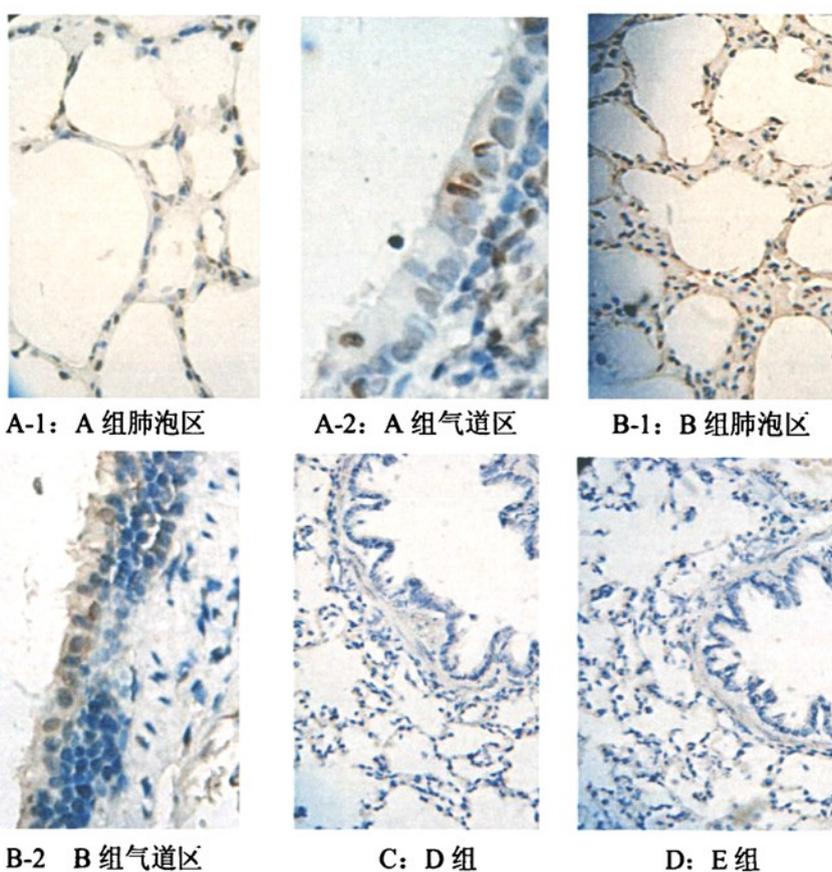


图 3-2 各组动物肺组织石蜡切片原位杂交结果

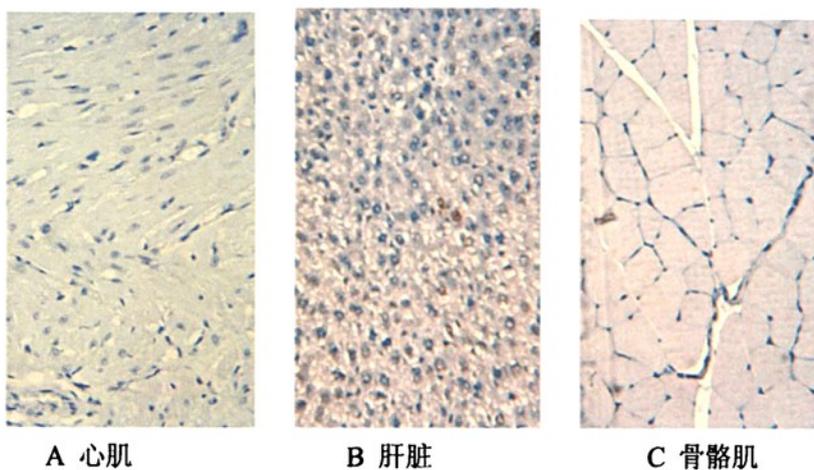


图 3-3 rMSC 移植后在受体动物肺外脏器的分布

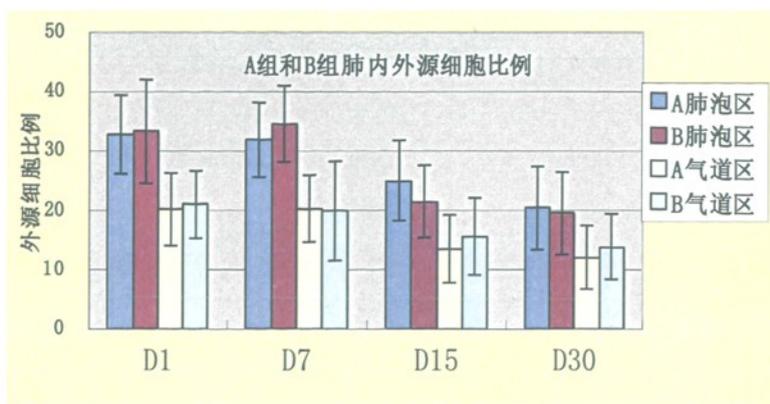


图 3-4 不同移植剂量的肺部定植效率比较

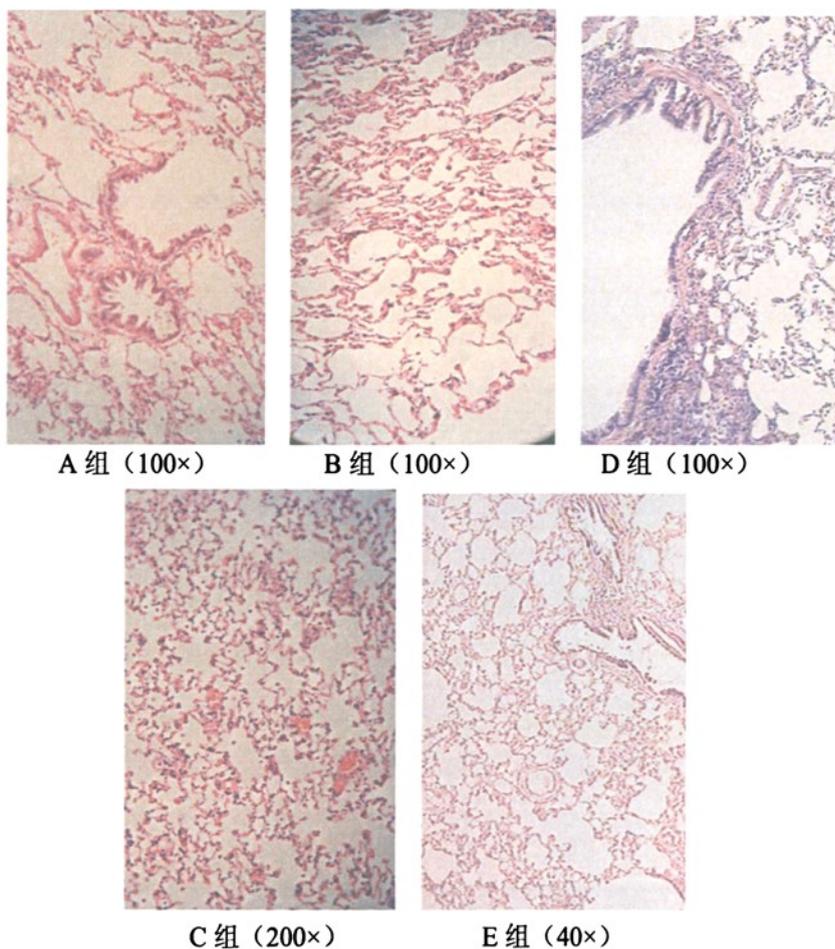
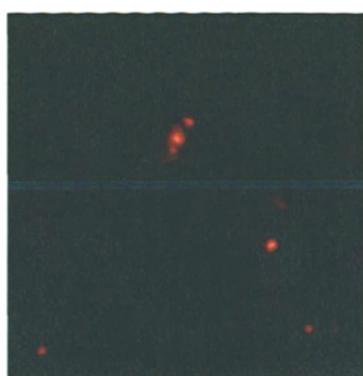
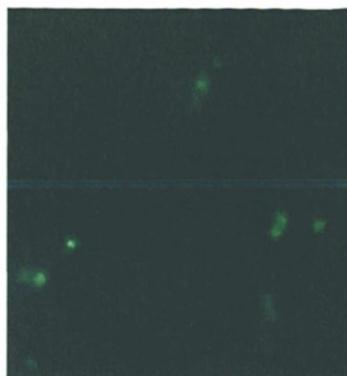


图 3-5 各组动物病理学改变 HE 染色



CM-Dil 染色为红色荧光

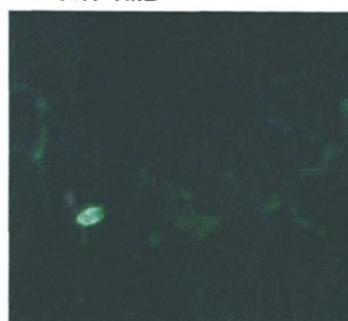


SPC-FIFC 标记为绿色荧光

图 3-8 CM-Dil 和 SPC 双标细胞

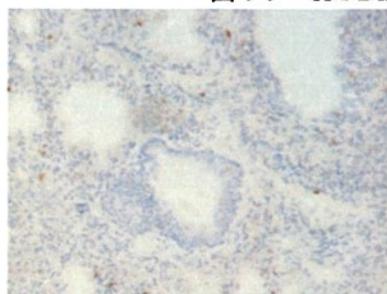


CM-Dil 染色为红色荧光

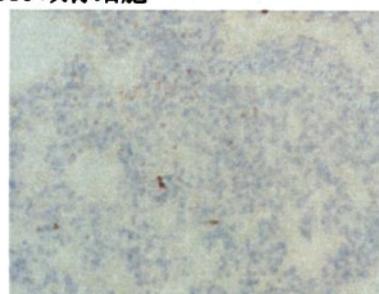


CC16-FIFC 标记为绿色荧光

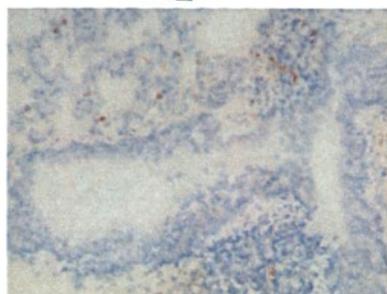
图 3-9 CM-Dil 和 CC16 双标细胞



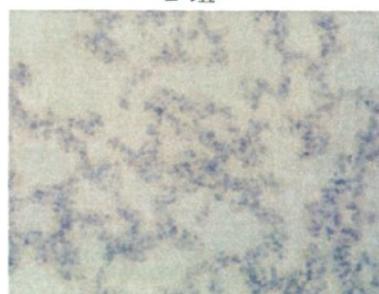
A 组



B 组



D 组



E 组

图 3-10 各组动物肺组织 Vimentin 表达情况

表 3-1 A-E 组动物外周血常规

组别	WBC ($\times 10^9/L$)	N%
A 组-D1	19.3 \pm 4.5**	36.9 \pm 8.3**
B 组-D1	18.3 \pm 5.0**	31.0 \pm 7.8**
C 组	7.2 \pm 2.4	18.1 \pm 4.6
D 组	15.5 \pm 5.6**	30.2 \pm 8.3**
E 组	6.9 \pm 2.8	16.1 \pm 5.7

**与 E 组比较 P<0.01

表 3-2 A-B 组动物外周血常规变化趋势

	A 组	B 组
D1-WBC ($\times 10^9/L$)	19.3 \pm 4.5	18.3 \pm 5.0
D1-N%	36.9 \pm 8.3	31.0 \pm 7.8
D7- WBC ($\times 10^9/L$)	15.2 \pm 3.9	18.3 \pm 5.0
D7-N%	30.2 \pm 6.8	26.9 \pm 7.4
D15- WBC ($\times 10^9/L$)	12.4 \pm 3.4	12.5 \pm 3.5
D15-N%	23.0 \pm 5.8	22.5 \pm 3.0
D30- WBC ($\times 10^9/L$)	11.6 \pm 2.9	20.1 \pm 5.6
D30-N%	12.3 \pm 2.3	23.3 \pm 3.4

AB 两组血常规变化趋势

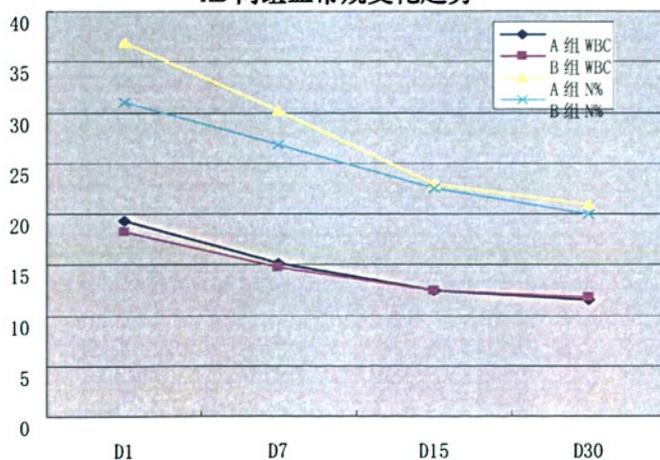


图 3-6 A-B 组动物外周血常规变化趋势

表 3-3 A-E 组动物 BALF 有核细胞计数和中性粒细胞百分比

组别	WBC ($\times 10^9/L$)	N%
A 组-D1	3.6 \pm 0.5**	26.6 \pm 3.9**
B 组-D1	3.6 \pm 1.1**	31.0 \pm 7.8**
C 组	2.2 \pm 0.9	7.5 \pm 1.7
D 组	3.6 \pm 0.8**	22.9 \pm 1.9**
E 组	2.1 \pm 0.9	8.6 \pm 1.2

**与 E 组比较 P<0.01

表 3-4 A-B 组动物 BALF 常规变化趋势

	A 组	B 组
D1-WBC ($\times 10^9/L$)	3.6 \pm 0.5	3.6 \pm 1.1
D1-N%	26.6 \pm 3.9	31.0 \pm 7.8
D7-WBC ($\times 10^9/L$)	3.5 \pm 1.1	3.5 \pm 1.1
D7-N%	25.1 \pm 5.2	25.9 \pm 4.5
D15-WBC ($\times 10^9/L$)	3.4 \pm 0.9	3.4 \pm 0.7
D15-N%	24.3 \pm 4.1	24.6 \pm 3.5
D30-WBC ($\times 10^9/L$)	3.3 \pm 0.9	3.2 \pm 0.6
D30-N%	22.8 \pm 4.2	22.6 \pm 3.2

四、各组动物 BALF 和外周血中 COPD 相关炎症因子检测

应用双抗夹心 ELISA 法检测各组动物外周血和 BALF 中 IL-10、TNF- α 以及 G-CSF 水平, 检测显示: IL-10、TNF- α 以及 G-CSF 倍比稀释标准品后所得的标准曲线见下图 (图 3-7), 经数据回归推导的回归方程亦分列如下 (表 3-5, Y 为 ELISA 检测获得的 OD 值; X 为检测因子浓度, 单位 pg/ml):

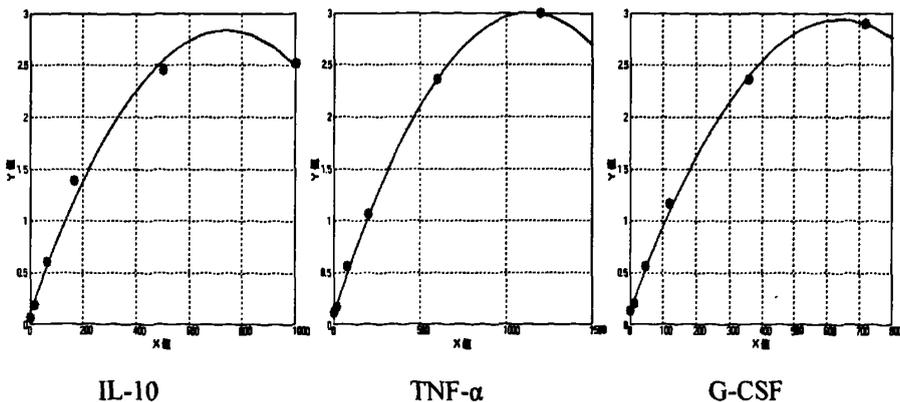
图 3-7 IL-10、TNF- α 和 G-CSF 的 ELISA 标准曲线

表 3-5 IL-10、TNF- α 和 G-CSF 的 ELISA 回归方程

IL-10 二次曲线回归方程	TNF- α 二次曲线回归方程	G-CSF 二次曲线回归方程
$y = a + bx + cx^2$	$y = a + bx + cx^2$	$y = a + bx + cx^2$
a = 0.11849	a = 0.11663	a = 0.14074
b = 0.00735	b = 0.00511	b = 0.00875
c = -0.00000	c = -0.00000	c = -0.00001
$r^2 = 0.99171$	$r^2 = 0.99930$	$r^2 = 0.99855$

表 3-6 A-E 组动物外周血 IL-10、TNF- α 和 G-CSF 水平

组别	IL-10	TNF- α	G-CSF
A 组-D1	100.9 \pm 12.1**	611.5 \pm 110.3**	160.3 \pm 30.6**
B 组-D1	107.4 \pm 16.9**	620.3 \pm 86.9**	157.1 \pm 35.6**
C 组	157.9 \pm 19.2	56.2 \pm 9.1	69.8 \pm 7.8
D 组	100.4 \pm 21.1**	634.3 \pm 127.8**	168.9 \pm 34.0**
E 组	167.4 \pm 25.7	50.1 \pm 11.0	78.9 \pm 12.0

**与 E 组比较 P<0.01

表 3-7 A-B 组动物外周血 IL-10、TNF- α 和 G-CSF 变化趋势

	A-IL-10	A-TNF- α	A-G-CSF	B-IL-10	B-TNF- α	B-G-CSF
D1	100.9 \pm 12.1	611.5 \pm 110.3	160.3 \pm 30.6	107.4 \pm 16.9	620.3 \pm 86.9	157.1 \pm 35.6
D7	124.0 \pm 14.4	533.3 \pm 89.7	293.9 \pm 49.7	125.7 \pm 18.9	537.4 \pm 102.3	284.5 \pm 48.0
D15	128.9 \pm 21.1	397.8 \pm 62.7	254.2 \pm 27.9	129.3 \pm 24.4	382.9 \pm 60.6	248.2 \pm 46.1
D30	132.6 \pm 21.6	268.5 \pm 51.7	156.3 \pm 25.1	130.2 \pm 29.3	246.4 \pm 42.7	146.6 \pm 32.1

表 3-8 A-E 组动物 BALF-IL-10、TNF- α 和 G-CSF 水平

组别	IL-10	TNF- α	G-CSF
A 组-D1	15.6 \pm 2.5**	42.3 \pm 8.3**	13.2 \pm 2.6**
B 组-D1	14.9 \pm 2.0**	40.3 \pm 8.3**	13.2 \pm 2.9**
C 组	82.8 \pm 9.4	7.8 \pm 1.8	10.1 \pm 1.0
D 组	18.7 \pm 3.3**	45.6 \pm 12.2**	12.6 \pm 2.5**
E 组	89.8 \pm 12.2	9.9 \pm 2.4	8.1 \pm 1.8

**与 E 组比较 P<0.01

表 3-9 A-B 组动物 BALF-IL-10、TNF- α 和 G-CSF 变化趋势

	A-IL-10	A-TNF- α	A-G-CSF	B-IL-10	B-TNF- α	B-G-CSF
D1	15.6 \pm 2.5	42.3 \pm 8.3	13.2 \pm 2.6	14.9 \pm 2.0	40.3 \pm 8.3	13.2 \pm 3.0
D7	24.6 \pm 6.4	30.9 \pm 6.9	17.1 \pm 3.8	25.8 \pm 6.6	31.29 \pm 7.8	17.5 \pm 4.0
D15	49.2 \pm 13.2	20.0 \pm 4.1	15.2 \pm 4.0	44.5 \pm 9.0	22.2 \pm 5.9	16.2 \pm 4.1
D30	56.0 \pm 10.6	25.6 \pm 7.6	12.4 \pm 2.7	49.9 \pm 11.7	25.4 \pm 5.9	15.2 \pm 3.2

从表 3-6 到表 3-9 的结果显示：在移植后第 1 天，A、B 和 D 三个 COPD 造模组的外周血和 BALF 的 IL-10 水平显著性低于 E 组，而 TNF- α 及 G-CSF 显著性高于 E 组（均 $P < 0.01$ ），C、E 两组水平相近；随着 rMSC 移植治疗后的时间推移，A、B 两组的外周血和 BALF 的 IL-10 水平逐渐升高，而 TNF- α 水平则逐步降低；G-CSF 水平先升后降，以 D7 水平最高，随后渐渐降低；到观察 30 天结束，A、B 两组的外周血和 BALF 的 IL-10 水平仍低于对照组 E 组，TNF- α 及 G-CSF 反之，仍高于正常对照组 E 组。外周血和 BALF 检测的指标变化规律基本一致。

五、rMSC 在大鼠肺组织内的分化

rMSC 移植治疗组（A、B 组）的大鼠肺组织切片部分进行 CM-Dil 和 SPC/CC16 双染色标记检测，可见到肺泡壁少量发红色荧光的细胞（CM-Dil 标记）的细胞同时被绿染（SPC-FIFC 标记），即同时表达肺泡表面活性蛋白 C，提示供体来源的 rMSC 在受体肺组织内可分化 II 型为肺泡上皮细胞（图 3-7）；而在支气管壁上，少量发红色荧光的细胞（CM-Dil 标记）的细胞同时被绿染（CC16-FIFC 标记），即同时表达 Clara 细胞的特异性蛋白，提示供体来源的 rMSC 在受体可分化为支气管上皮细胞（图 3-8）。

六、其他

1. 处死动物时仔细解剖实验动物各主要脏器，未见明显肿瘤或脓肿形成。

2. 肺组织 Vimentin 免疫组化检测肺部成纤维细胞成分 结果显示，rMSC 移植组和肺移植组间，肺组织 Vimentin 表达无明显差异，提示 rMSC 移植后并未增加肺部成纤维细胞的含量（图 3-9）。

讨 论

COPD 目前居全球发病率和死亡原因的第四位,且发病率有逐年增高的趋势^[1]。2005 年下旬钟南山院士公布的我国 COPD 流行病学调查的结果显示,全国 COPD 患病率占 40 岁以上人群的 8.2%,其中男性患病率为 12.4%,女性患病率为 5.1%^[2]。由此看见,我们面临的局势相当严峻。而另一方面,COPD 的发病机制复杂,病理改变累及气道、肺实质及肺血管多级结构,依靠机体的自我再生能力无法达到完全的修复,因而病程进行性发展。目前 COPD 的内科治疗以预防气道感染、控制并发症和进行氧疗、呼吸运动锻炼来改善患者的呼吸功能、稳定肺实质的可逆性改变状态为主,其作用非常有限,外科肺减容术等治疗目的在于缓解症状和改善生活质量,二者均不能阻止病情的进一步发展。所以,如果能寻找到一种有效修复肺部组织结构、重建肺功能的方法,将具有极其重要的意义。

近年来随着干细胞研究的不断进展,干细胞治疗研究和技术也得到长足发展。目前用于研究的干细胞非常多,包括胚胎干细胞与成体干细胞,以及作为新近研究热点的所谓诱导多功能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS 细胞)^[62,63]。这类细胞是通过分离自体成体组织细胞,并在体外经过载体的基因改造导入胚胎干细胞的某些特定基因组及标志物,从而使得成体细胞逆向发育,表现出胚胎细胞的特性,再经过扩增干预后重新输入成体进行治疗^[63]。胚胎干细胞的相关研究现在很多,但是由于操作技术的复杂性和涉及到伦理问题,胚胎细胞的应用一直受到很大限制^[64];而诱导多功能干细胞的研究还只是刚刚起步,许多的细胞特性还有待进一步摸索证实,离实际应用有相当的距离。因而,现在更多的研究着眼于成体干细胞,特别是骨髓间充质干细胞(BMD-MSC)的应用研究。

如前述,BMD-MSC 具有如下特点:取材方便,体外可大量扩增,具有多向分化潜能,并且在体内不引发免疫排斥,甚至有免疫抑制功能^[65],分化较易控制,致癌风险小。所以利用骨髓中的 MSC 治疗多种疾病,包括急慢性肺损伤疾病,可能会拥有广泛的前景。尤其是在移植物抗宿主疾病(GVHD)心脏疾病的 MSC 治疗方面,取得的成绩令人瞩目,已经入临床评价阶段^[58,66]。

近年来许多研究也表明,干细胞移植可能为某些肺部疾病的治疗带来新希望^[67]。例如,有人以 MSC 为基因载体治疗肺部肿瘤和肺囊性纤维化^[68,27],或者直接局部移植 MSC 用以修复肺损伤^[69]。关于 BMD-MSC 对肺部损伤的修复研究,经典之一是 2003 年 Ortiz 等^[15]的报道,研究者将雄性博来霉素抗性 BALB/c 小鼠的 MSC 输注给博来霉素敏感型雌性 C57BL/6 小鼠,然后给予受体小鼠博来霉素,Real-time PCR 显示给药后雄性小鼠 DNA 占雌鼠肺部全部 DNA 的比例较给药前提高了 23 倍;

荧光原位杂交显示移植的雄性细胞集中于博来霉素所致的肺损伤区并表现出上皮样形态，部分分化为 II 型肺泡上皮细胞；而且 MSC 移植显著降低了博来霉素造成的肺局部炎性反应和胶原的沉积。Rojas M^[16]等也证实，移植的 MSC 在博来霉素肺损伤小鼠模型肺部定植并分化为 I 和 II 型肺泡上皮细胞、内皮细胞、肺间质细胞和支气管上皮细胞等；并发现 MSC 移植后肺部和全身的炎症水平有所改善。就本部分研究结果看来，经 rMSC 移植治疗，确实从一定程度上改善了 COPD 大鼠的肺气肿、气道炎症和肺实质和肺血管的破坏与重建病变，特别是降低了肺部炎症细胞的浸润水平和肺局部、外周血的炎症因子水平，与文献报道相符。

MSC 对特定疾病发挥治疗作用的首要条件是它在靶器官的定植。有研究提示^[16,70]，炎症反应可以刺激并诱导自身的骨髓干细胞释放，由这些细胞去替换损伤的细胞，这就是 MSC 的损伤趋化性。它促使间充质干细胞主动迁移（损伤趋化作用）到损伤部位，当机体的损伤较轻时，经由内源性的骨髓和组织干细胞的修复补充可能起着关键作用。但这种自我修复毕竟是有限的，当损伤比较严重，机体内源性修复机制遭到破坏，或者内源性骨髓和组织干细胞数量相对不足、无法到达损伤部位发挥作用时，组织损伤将进一步发展。此时，若能有效移植外源性干细胞并辅以适宜的诱导条件，则可能逆转疾病的发展。在上述研究中^[15,16]，都观察到了移植的 MSC 有向肺损伤部位汇集的现象，这提示炎症损伤环境了外源间充质干细胞向肺局部归巢并长时间定植至肺脏，此现象可以称为再殖（repopulation），即外源的 MSC 在定植的局部分化为相应的细胞，并发挥分化后细胞的固有功能，参与再生和修复。在我们的研究中发现，对比移植 MSC 的正常大鼠 C 组，肺部存在慢性损伤的 A、B 两组在 MSC 移植后同期检测到的肺部外源细胞比例明显增多，而且在输注 rMSC 之后 30d，这两组动物的肺部仍然能够检测到相当数量的外源细胞，提示雄性的 rMSC 确实地进驻了 COPD 模型肺部，并可以在局部存活停留足够长的时间以发挥生理作用。本实验观察到，外源的细胞主要位于肺泡区、肺间质和气管粘膜下为主，散在分布也有聚集现象，无明显区域分布规律，外源细胞占肺部有核细胞的比例相当高，A、B 两组移植后第 7 天肺泡区阳性细胞达 30%-35%，气管粘膜区达 20%左右；血管平滑肌层和气管外周平滑肌层也有少量的阳性细胞。而且，该两组大鼠肺外的脏器则多未发现明显的外源细胞流入，亦提示了炎症反应对 rMSC 的趋化诱导作用。这可能是由于肺损伤部位的细胞能够产生某些体液调节因子，这些因子可以趋化 MSC 进入损伤肺组织，并刺激 MSC 的增殖分化等。而对这些细胞因子的来源和具体的趋化机制，目前并未完全明确，可能与炎性细胞分泌的各种因子及粘附分子相关。已如第一部分前述，MSC 表面可表达多种白细胞介素的受体以及粘附分子 ICAM-1 受体，这些受体与配体结合可能促进 MSC 细胞向病变脏器的趋化。

外源 MSC 可能通过以下两个方面参与肺的损伤修复。首先,肺损伤所造成的局部微环境可以诱导移植的 MSC 向损伤部位聚集,并诱导分化为肺泡、肺间质细胞和气道上皮等结构细胞,参与组织损伤的修复^[15,16]; MSC 和类似细胞进行组织修复的机制可能有三:建立增强内源细胞再生的环境、转分化和细胞融合^[71]。不过,许多 MSC 移植性研究发现外源细胞的定植比例较低,往往不到局部总结构细胞数的 5-10%,而所谓细胞融合现象报道的更少之又少,因此关于这类观点存在争议。而我们的实验观察到的是有相当高比例的外源细胞进入到 COPD 大鼠肺脏,而且部分原位杂交阳性的细胞呈现 II 型肺泡上皮和气道粘膜上皮形态以及平滑肌细胞形态,CM-Dil 与免疫组化双染色也证明了 rMSC 在局部的分化,提示植入的 rMSC 到达肺部组织并定植入肺组织内部,且在局部微环境转分化为相应的肺结构细胞。以现有的外源细胞比例,可以通过转分化而一定程度上起到组织的替代与修复作用。事实上,HE 染色表明,经 rMSC 移植治疗的 COPD 大鼠肺部病理改变较未处理处有所改善。

此外,近年来受到重视的另一个 MSC 重要生理作用在于它的免疫抑制作用,移植的 MSC 可能通过与肺局部细胞相互作用或抑制 T 淋巴细胞的活化而减轻肺局部的炎症反应,为损伤修复提供有利的环境^[72]。除此之外, MSC 可能还具有维持肺实质细胞功能的作用。体外实验表明如果将人类支气管粘膜上皮(NHBE)与 MSC 体外通过 Transwell 共培养,可以更长时间的维持支气管粘膜上皮的粘液分泌功能^[73]。事实上, MSC 与肺部组织细胞之间是相互作用和影响的,这种相互作用可能是通过旁分泌机制达成的^[74-76]。

COPD 的炎症机制中,最主要的是辅助性 T 淋巴细胞 Th1/Th2 (I 型辅助性 T 细胞/II 型辅助性 T 细胞)免疫反应的失衡,表现为 Th1 系统亢进而 Th2 系统受抑制,而 TNF- α 是 Th1 系统中代表性的炎性因子,IL-10 则是 Th2 系统分泌的代表性因子,而这又相互制约的作用, TNF- α /IL-10 的比值则与 COPD 的病情发展和预后相关^[77]。有不少临床研究报道, COPD 患者的全身和肺局部存在 IL-10 的相对或绝对不足^[78]。因此,我们选用了这两个指标进行检测,观察 rMSC 对 COPD 炎症反应的调节作用。从这两个炎症因子的表达变化看来, rMSC 经尾静脉移植降低了 COPD 主要炎性因子 TNF- α 的水平,而增加了抗炎因子 IL-10 的水平,这将拮抗 Th1 系统的作用,有利于 COPD 的炎症的好转,而实验动物病理学改善的一个重要表现也就是炎症的改善。既往的研究中我们已知, MSC 具有免疫调节作用,主要表现在抑制初始 T 淋巴细胞和记忆 T 淋巴细胞,增加调节性 T 淋巴细胞,从而延长移植物的生存时间^[28]。由此推测, MSC 可能通过与辅助性 T 淋巴细胞之间的相互作用,例如通过各类白介素和白介素受体介导的细胞间对话,或者细胞直接接触作用,而影响

活性 T 细胞的诱导活化与成熟, 调节肺部乃至机体全身的免疫机能, 达到治疗作用。此外, MSC 对于肺部巨噬细胞和中性淋巴细胞的作用尚不明确, 对于这些机制的研究将更有利于 MSC 的临床应用。

G-CSF 是骨髓粒细胞和间质细胞、祖细胞动员的相关因子, 可以促进自体骨髓释放上述细胞。我们观察到, 在机体受到损伤后, G-CSF 往往表达增加, 一方面促进骨髓内间充质细胞参与机体的修复, 另一方面也调动粒细胞参与局部的炎症反应。有研究发现, 给予 G-CSF 治疗可以增进内皮功能, 并使得外周血 IL-10 的上升和 TNF- α /IL-10 下降, 当然在实验的后期, TNF- α 水平又出现上升。因此它的效应是多方面的。本研究发现, COPD 大鼠的外周血和肺泡灌洗液 G-CSF 水平高于正常组, 提示存在内源性的骨髓干细胞和粒细胞的动员, 但可能在 COPD 疾病状态下, 机体可动员的干细胞有限, 或者疾病状态下骨髓动员存在某种障碍, 而影响了受损肺脏的自身修复, 给予外源性 rMSC 之后, 我们看到外周血和肺泡灌洗液 G-CSF 水平出现了一度升高, 提示可能伴随内源性骨髓干细胞的动员增强^[79]。

现在有很多研究发现, 经静脉注射进行 MSC 移植时, 因为肺脏的特殊结构, 许多的 MSC 将被毛细血管网嵌顿而滞留于肺部^[80]。此被称为肺脏的首过效应^[81], 这对于经静脉输注方式进行干细胞移植的其他脏器而言, 干预效果必然受到影响。但对于肺部疾病的 MSC 移植, 则可能成为一个天然的优势。这使得外源的 MSC 不必在外周循环中经过各个脏器的滤过、特别是绕开了骨髓组织的诱导归巢, 而直接停留于肺部。一旦 MSC 在肺部毛细血管床停顿, 则有机会与微环境和周围组织细胞相互作用, 逐步迁移到肺间质和肺泡、肺血管壁和气道发挥作用。我们是在原位杂交实验中观察到, A、B 处理组的外源细胞嵌入比例相当之高, 可能与此有关。而正常大鼠由于组织结构正常, 由于没有明显的炎症微环境条件诱导, 在肺局部的 MSC 很快被清除掉或输送走。

既往研究表明 MSC 可以嵌入于 COPD 动物模型肺部, 并对其受损气道上皮细胞和 II 型肺泡上皮细胞的可能发挥重要的修复作用。但 MSC 在 COPD 动物模型肺部能否长期的定植, 能停留多久并不确定。我们在对 COPD 模型大鼠进行 MSC 移植后, 最长达 30 天时时处死大鼠, 仍在其肺部可见 CM-Dil 示踪的细胞, 证明移植的外源细胞在局部能停留足够长时间, 发挥对损伤的肺组织修复作用, 而众所周知, 干细胞只有在特定龛位环境才能保持其特性稳定不分化, 在 COPD 肺局部复杂的内环境中 MSC 失去了稳态环境, 必然走向分化或死亡, 而我们长时间后仍能检测到外源基因, 也从侧面证实了 MSC 在局部已分化再殖。

rMSC 分化为肺泡上皮细胞及支气管上皮细胞的机制目前尚不清楚。许多学者认为, rMSC 的分化受其所处微环境(niche)的影响和制约。细胞是否分化及如何分

化是 rMSC 内源性调控因子与其所处的微环境共同作用的结果,而这种微环境的成分相当复杂,不同的组织、相同组织不同的状态均可表达不同的细胞因子,使得 rMSC 向不同的细胞类型分化。而用干细胞移植治疗肺部疾病的效率也依赖于机体内特定的微环境。随着移植后肺组织炎症的改善,随后继续输入运动员自身的更多 MSC 的定居进一步减轻肺部病变,两者可能形成相互促进的关系。目前也存在反对移植干细胞分化为肺实质细胞的证据,比如在使用传统方法得到了和前述实验类似的结果后,Chang 等应用了更为严格的实验方法(如使用细胞特异启动子控制下的转基因小鼠以及更为精确的观测手段反卷积显微镜),发现供者来源的骨髓细胞并没有生成受体的肺细胞,传统方法造成了假阳性结果。造成以上矛盾结果的原因可能是不同实验室使用细胞的来源、表型上的差异,也可能是不同损伤模型的差异,而检验方法是否可靠显然也是重要因素之一。

值得注意的一个问题是,在实验观察的早中期我们看到,肺内的外源细胞比例较高,但是并非所有外源细胞都发生了转分化行为,转变成肺上皮等组织的结构细胞参与脏器损伤的修复,这也说明 MSC 在肺部的作用不单纯是组织干细胞的补充和结构修复。另外, rMSC 治疗的 COPD 大鼠肺部病变的好转,但程度有限,这可能是因为局部的病变较重,过于严重的病变亦可能使得进入到肺部的 rMSC 失去依托的局部的基本环境和修复的基本架构,或者单纯的干细胞移植不足以完全逆转病情的进展,而需要联合其他治疗方式或药物以增进疗效;亦可能是因为本身实验条件的制约,进一步摸索合适的时间点、更为合理的移植剂量与次数,可能优化治疗的效果。当然,我们实验观察的周期有限,可能移植的治疗作用还需要更长时间的观察才能体现出来。

我们比较了 A 组和 B 组两个移植剂量的 MSC 治疗效果差异。B 组的细胞用量是 A 组的两倍,输注的时间基本相同,而观察到的效果看来,无论是雌性 COPD 大鼠肺部雄性来源细胞的定植效率和存留时间,还是 HE 染色所见的病理学好转,还是炎症因子的水平变化趋势,都没有观察到二者间有统计学意义上的差异,这可能的原因是一方面我们采用的一次剂量已经足够大,是能够进驻肺内的细胞一时达到饱和,效果不能附加,而相聚一段时间分次给予细胞移植也许会有不同的效果,而实验可见,随着时间推移肺脏的外源细胞比例逐渐减少,因此维持疗效的方法之一也是间隔一段时间再次补充 MSC;另一方面,在移植细胞输注量达到一定时, rMSC 移植治疗的效果不再具有量效性关系。

此外,本部分研究也发现,体内实验和 MSC 裸鼠成瘤实验相一致,处理组大鼠在实验观察期间未见明显的肿瘤形成,而且 rMSC 在移植进入受体大鼠肺组织后,并未向成纤维细胞的间叶类方向分化,肺组织内 HE 染色病理情况改善,未见明显

胶原增生。就现有的观察期来看，这提示 MSC 移植治疗不仅效果良好，而且安全可靠。

总之，本阶段的研究我们发现，经尾静脉给予 COPD 大鼠模型进行 rMSC 移植后，外源性 rMSC 在肺局部炎症诱导下可以长期定植于肺部，参与肺组织的损伤修复和免疫调节。由于两方面机制均在其治疗中发挥重要作用，因此，在今后可以考虑使用 MSC 做为载体的基因治疗，构建高表达 IL-10 因子的转基因 MSC 并一直到疾病机体内，将是非常有前景的治疗手段。但另一方面肺部组织结构复杂，COPD 发病机制复杂而多层面，关于移植干细胞减缓炎症、对抗纤维化、修复肺部组织的机制也仍十分欠缺，对于肺部疾病干细胞移植治疗的适宜途径、时机、效率、调控、功能分析等亦需要进一步探索。

全文总结

本研究使用全骨髓贴壁法分离 rMSC，并进行体外培养和鉴定后，将其经尾静脉输注到熏烟加 LPS 气管注入复制成的 COPD 模型同系大鼠体内，观察了 MSC 在 COPD 受体大鼠肺部组织内的存活、分化及对气道和肺损伤的修复作用，并初步探讨了其作用机理，获得了以下主要结论：

1. 全骨髓贴壁法可成功分离和培养出 rMSC，所得的细胞性状稳定、状态良好，形态学和表型符合间充质干细胞特点。

2. 用单纯熏烟法和脂多糖+熏香烟的方法，均可成功制备大鼠 COPD 模型，其病理生理改变与人类 COPD 类似，但后者经济和周期更短，比前者更符合 COPD 自然发病过程，且无明显致瘤性和成纤维化倾向；。

3. 经尾静脉注射的 rMSC 能在大鼠 COPD 模型的肺组织内定植并长期存留，改善 COPD 肺部的病理损伤。

4. rMSC 能调节宿主的肺局部及全身的炎症因子水平，这种治疗效应在一定范围内无明显量效关系。

5. rMSC 植入肺损伤大鼠体内后可在其肺组织内存活并分化为肺泡上皮细胞及支气管上皮细胞。

综上所述，移植的外源性 rMSC 在 COPD 宿主的肺部损伤修复过程中具有重要的作用，这些治疗效应与 rMSC 的组织结构性修复作用以及免疫调节功能相关。本实验结果为 COPD 的干细胞治疗提供了有力依据和实验基础，rMSC 具体作用机制需要在后续研究中进一步明确。

综述一

间充质干细胞与肺

[摘要] 间充质干细胞(MSC)是一类自我更新能力强、细胞特性稳定、具有多分化潜能的成体干细胞,广泛存在于人骨髓、肝、脾、肺等多种组织和器官中。本文综述了 MSC 的生物学特性和临床应用前景,并着重阐述肺部 MSC 的特点,对近年来 MSC 与各类常见肺部疾病的相关研究作一同顾。

[关键词] 间充质干细胞; 肺

在针对最具破坏性疾病的新疗法上,干细胞有巨大潜力,相关研究将可能对整个生命科学及临床医疗产生革命性影响。因而,近年来干细胞研究一直是热点,广泛涉及基础与临床医学各分支,其中间质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)是研究最广泛的干细胞之一。

1 MSC 概述

1.1 干细胞的分类与来源 干细胞按分化潜能大小可分为全能干细胞、胚胎干细胞和多能干细胞;按发育阶段可分为胚胎干细胞和成体干细胞,后者包括神经干细胞、血液干细胞、骨髓间质干细胞及表皮干细胞等,其中报道最多的是骨髓来源的 MSC (BMD-MSC),此外,在人肝、脾、肺、肌肉、胰、脑、肾等组织中已证明有 MSC 存在^[82]。MSC 还可从脐血、胎盘、脐静脉内皮、脂肪等中分离得到^[83,84]。

1.2 MSC 的生物学特征 MSC 符合干细胞一般特点,能自我更新,以不对称方式分裂。近年发现它们能跨系统分化,此称为“可塑性”。MSC 可通过直接贴壁法和 Percoll 密度梯度离心法分离纯化。概括说来, MSC 有以下生物学特征:①自我更新能力强,性质稳定,体外扩增 10^7 倍后仍保持干细胞特性和正常表型^[85],连续传代培养和冷冻保存后仍具有多向分化潜能。②表达 SH2, SH3, CD29, CD90, CD106 和 CD166 等多种表面标志,不表达造血干细胞表面标志,但其缺乏独特性表面标记。③分泌多种细胞因子,包括一些造血和非造血生长因子、趋化因子、细胞外基质分子等,并通过它们诱导造血干细胞表达归巢受体、调节骨髓微环境,促进造血细胞及 MSC 增殖分化。④易于外源基因的转染与表达,是良好的组织工程载体。⑤在体内外不同条件下, MSC 可分化为成骨、软骨、脂肪和成肌细胞等中胚层组织和神经元细胞、胰岛细胞及肾小管上皮、肺上皮细胞等^[13,86,87]。但其分化条件复杂,仍有许多尚未明了之处。MSC 是自我复制还是分化主要由其本身状态(如各种周期素和周期素依赖激酶、基因转录因子、影响细胞不对称分裂的细胞质因子)和微环境决定(即干细胞与周围细胞、外基质及各种可溶性因子的相互作用)。如真

皮、小肠及毛囊上皮经常存在分隔的微小环境—龕位(niche), 可保护干细胞免受外界侵害, 可能还控制着其分化^[88]。

1.3 MSC 的应用前景 MSC 广泛存在, 有高度自我更新能力和可塑性, 性能稳定、易采集和处理, 易于外源基因表达, 因而在组织修复、免疫及基因治疗中显示出广阔的应用前景。具体说来有: ①在造血干细胞移植中的应用。研究表明 MSC 输注能促进外周血造血干细胞移植后的造血重建。Koc 等^[89]将体外扩增的自体骨髓 MSC 输注给大剂量化疗后造血干细胞移植的乳腺癌患者, 可加快患者造血重建。Irt Anker 等^[90]也证实了 MSC 对造血干细胞移植的支持作用。②免疫治疗。MSC 免疫原性弱, 它在体内外能抑制 T 细胞增殖, 降低移植抗宿主疾病(GVHD)的发生^[91,92], 令正常供者异基因 MSC 联合造血干细胞移植成为可能。③细胞治疗和组织工程。MSC 导入梗死心肌边缘, 可分化形成新的心肌和血管组织, 改善心肌重构和心功能^[93,94]。类似研究还涉及肝、软骨和皮肤等。④基因治疗。对基因突变或缺失性疾病, 可分离自体 MSC 进行体外改造, 敲除突变基因, 导入正常基因后回输, 既纠正了遗传缺陷, 又避免了移植反应。例如, 用人 MSC 为载体将腺病毒送到乳腺癌肺部转移灶, 可抑制转移瘤生长, 较之单独用腺病毒小鼠生存期延长^[95]。将分泌型蛋白基因导入 MSC 后将细胞回输, 使它们在体内定植并分泌治疗性蛋白则是治疗蛋白缺陷病的方法之一。

2 MSC 与肺

2.1 肺部 MSC 的基本生物学特点与来源 胎肺和成人肺中均可分离出 MSC, 呈典型纺锤样成纤维细胞状, 分离培养后 7-10 d 形成放射状克隆, 细胞形态均一, 生长迅速, 可传至数十代以上而形态及生长特点不发生明显改变。它们不表达细胞分化相关标志 CD34, CD45 和免疫相关表型 HLA-DR(MHC-II 类分子)、共刺激分子 CD80 和 CD86, 表达 CD29 和 CD44, CD73, CD105, CD166 和 HLA-ABC, 和 BMDMSC 相似。细胞周期分析显示 90%以上为 G0/G1 期细胞, 而 S 期和 G2/M 期细胞分别为 5.56%和 2.08%, 即仅少数细胞处于活跃的增殖期, 且肺来源 MSC 能体外诱导分化成脂肪、神经细胞、软骨和成骨细胞^[96-98]。此外, 肺组织来源的 MSC 也同样具免疫调控能力。体外培养的胎肺来源 MSC 不仅不能刺激 T 细胞的增殖, 而且还能抑制单个核细胞和有丝分裂原引起的 T 细胞的增殖, 且随着 MSC 数量的增加, 其对 T 细胞增殖的抑制作用增强^[98]。MSC 的免疫负调控与其表型相关, 且部分机制在于诱导 CD8⁺抑制细胞起作用。除肺局部分离的 MSC 之外, 成体组织来源的 MSC 可以归巢和长时间定植至肺^[15]。

2.2 MSC 与肺部疾病 将肺部分离获得的 Fikl(+)/CD31(-)/CD34(-)细胞输入接受超致死剂量射线照射的受体小鼠,可重建其造血功能;并可在气管、肺、血管等多种组织中分化和再生。还有研究表明正常人类支气管黏膜上皮与 MSC 在黏液产生、免疫学和气道修复中方面存在相互作用^[73],提示 MSC 与肺部生理病理同样有着密切关联。

2.2.1 MSC 与肺部肿瘤 肿瘤可能起源于正常干细胞在某些诱因下的转化,相似的信号通路可能既调节干细胞也调节癌细胞的自我更新。也可能存在一群肿瘤干细胞,它们在肿瘤的发生、发展、复发和转移中起着重要作用,这对癌症治疗将产生深远影响。就肺部肿瘤的治疗来说,一方面, MSC 是一种良好的载体,可用于肺癌基因打靶治疗。Elzaouk 等^[99]发现逆转录病毒转导后表达白介素 12 的 MSC(IL-12/MSC)强烈抑制小鼠黑素瘤的肺转移灶形成。Chen 等^[68]证实 IL-12/MSC 对未成型 lewis 肺癌的抗瘤效应,12 只实验动物中 10 只未成瘤,而空白对照组成瘤率为 100%,单独注射 IL-12 和空载 MSC 组的成瘤率 83%-100%,提示 MSC 能铲除那些逃避了常规治疗的幸存或休眠状态肿瘤细胞。另一方面, MSC 对造血干细胞移植者的造血功能和免疫机能重建有重要作用。无论是原始未扩增的、还是体外扩增后的胎肺来源或成体骨髓来源 MSC 都促进造血干细胞移植的造血功能重建^[90]。肺癌,特别是小细胞肺癌的剂量效应非常明显,通过这种支持手段,可为患者进行超大剂量化疗,从而最大程度上杀死体内肿瘤细胞。因而有效地利用 MSC 对造血干细胞的支持作用是很有意义的。另外,自体造血干细胞移植存在肿瘤细胞污染的隐患,异体外周血干细胞移植则克服这一缺陷,但又可能引起不同程度 GVHD,若利用 MSC 的免疫抑制和调节功能,则有望解决这类问题。此外,基因修饰的 MSC 移植既可直接从数量上补充 MSC,又可从功能上改善 MSC,刺激造血细胞增殖和分化,值得进一步研究。

2.2.2 MSC 与肺实质损伤类疾病 这类疾病包括慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、放射性肺炎、肺间质纤维化、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 等,对于这些目前认为属于不可逆性的病变,寻找到一种参与肺部组织结构修复和重建的有效方法将具有极其重要的意义。从目前研究看来, MSC 可在体内分化成为肺部组织细胞,参与受损肺组织的修复与再生。Sabatini 等^[97]发现 MSC 可出现于成人的肺组织中并显示有多种增殖分化的能力。Rojas 等^[16]发现,骨髓抑制增加了实验小鼠对博莱霉素致肺损伤的易感性;而 BMD-MSC 在博莱霉素所致肺损伤和纤维化的修复中起保护作用:BMD-MSC 定植于受损肺并呈现出肺部细胞表型,其机制还和免疫抑制与修复性生长因子生成的触发相关(伴有循环中活化内源性干细胞的 G-CSF 和 GM-CSF 水平升高,炎性因子水平下降);在体外实验中,来自小鼠肺部损伤细胞的可溶性因子引

起 BMDMSC 增殖和迁入受损肺部,说明肺损伤能够明显促进 MSC 在局部的募集、定植和分化。Ortiz 等^[15]的实验结果相似。对于放射性肺炎所致肺损伤, MSC 同样显示出治疗价值^[100]。此外,对于 ARDS 和 COPD 等严重或不可逆疾病,近年来基因治疗为其带来了新曙光,人们现在开始尝试以 MSC 为载体,且它有向损伤组织的趋化性并归巢于肺部,显示出良好潜能,但今后其中细节还需更多研究。

2.2.3 MSC 与肺动脉高压(PAH) PAH 是肺心病发生、发展的中心环节,肺血管重建是 PAH 持续发展的病理基础。Kanki-Horimoto 等^[101]报道,给小鼠 PAH 模型移植过表达内皮一氧化氮合酶的 MSC(MSC/eNOS)和输注单纯 MSC,3 周后发现两组的右室收缩压均较未治疗组低,其中 MSC/eNOS 组更低,右室与全身重量比也明显降低, MSC/eNOS 移植组小鼠生存期延长。Baber 等^[102]发现气管内注入 MSC 能减低野百合碱诱发的 PAH 及肺血管阻抗,恢复肺部对乙酰胆碱的反应性,降低了右心室肥厚程度;结果显示肺实质气道旁有 lacZ-标记的 MSC 广泛分布,移植的 MSC 固定表达血管假性血友病因子和平滑肌肌动蛋白标记,此为平滑肌和内皮细胞的特异表型。但肺血管壁未见免疫标记的细胞,这提示实验观察到的效应可能缘于肺实质内移植的 MSC 的旁分泌效应提高了血管内皮功能。MSC 作为载体与基因治疗法结合也同样适用于 PAH 治疗体外实验表明经基因改造后分泌降钙素基因相关肽的 MSC 可抑制鼠肺动脉和主动脉平滑肌细胞增殖^[103]。此外,以往认为 PAH 肺血管重构是不可逆的,随着内皮前体细胞的发现与研究,这种观念将会改变。若可在合适条件下应用 MSC 分化为的内皮前体细胞,重构血管结构或形成新生血管、降低 PAH、可望根本性逆转肺血管重构。

2.2.4 MSC 与肺囊性纤维化(CF) CF 是一种跨膜传导调节蛋白基因突变引起的疾病,基因治疗应当是其最具希望的治疗方法,但目前却疗效欠佳,原因之一就在于肺上皮的快速更新导致基因的纠正难以长久。若以 MSC 为载体转染跨膜调控子基因,利用异源性或基因纠正后的自体干细胞定植于气道并向功能性呼吸上皮分化,将很具治疗潜力,虽然 BMDMSC 目前转化率十分有限(<1%)。但肺干细胞也可能是今后的治疗选择之一^[104]。Wang 等^[27]发现,取自 CF 患者的 BMDMSC 可进行囊性纤维化跨膜转运调节物 (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) 基因纠正而不影响其分化潜能,且基因纠正后的 MSC 对 CAMP 激动剂有反应,呈现出顶端 Cl⁻分泌。

2.2.5 其它 肺 MSC 与肺干细胞的关系和调控机制也值得探讨。有依据表明,组织的修复是由各组织内的组织干细胞驱动的,而后者则需由来自骨髓的祖细胞补充,骨髓 MSC 即是其中之一。MSC 和类似细胞进行组织修复的机制可能有三:建立增强内源细胞再生的环境,转分化和细胞融合^[71]。气管一支气管和肺泡上皮的干细胞

分别可能是基底细胞和 AEC II 中的一种亚型,但尚缺乏确切证据^[105,106]。可惜目前对肺干细胞及其与肺部 MSC 相互关系的了解甚微,但二者无疑都在肺组织的再生、修复或重构中扮演重要角色。

3 MSC 治疗的安全性与目前存在的问题

研究者也发现 MSC 移植的不利影响。首先是致瘤性问题。有人认为肿瘤的发生很可能是干细胞自我更新过程中发生基因突变,或增殖分化时被异常信号诱导成为肿瘤干细胞^[107]。MSC 体外扩增条件变化或体内微环境的影响很可能导致其生物学、遗传学性状改变。有人发现 MSC 会促进小鼠 B16 黑色素瘤与 Renca 腺癌生长,原因可能在于 MSC 抑制了宿主的免疫系统,因体外 MSC 与癌细胞共培养时后者未见增殖加速^[108]。MSC 联合基因治疗时,目的基因来源、功能及表达安全性,以及插入突变、引起癌基因激活或抑癌基因失活等问题也同样应重视。此外,目前研究大都限于基础实验,而细胞只有形成组织、器官才可解决临床问题,理论上 MSC 虽可分化为肺多级结构,但定向分化机制尚不完全清楚,诱导分化效率还很低;MSC 对造血干细胞的支持机制也未完全明了,故对其远期效果和对 GVHD 的影响还待观察。总之,令 MSC 最终能安全有效地造福人类还任重道远。

综述二

COPD 的肺部病理生理学和免疫学

[摘要] 慢性阻塞性肺病(COPD)是一种香烟烟雾等有毒气体导致的呼吸系统慢性非特异性炎症。这些炎症损伤导致肺气肿和气道重塑,表现为上皮鳞状化生和粘液化生,平滑肌增生以及气道壁纤维化。COPD 为异质性疾病,其机理尚需进一步探讨。近年来,研究主要集中于对香烟烟雾等所致炎症的本质的探讨,COPD 炎症相关细胞群的研究,寻找疾病进展和活动的生物标记物等方面。目前发现了一些新的细胞因子,如 C-反应蛋白和各类白介素,以及肿瘤坏死因子 α ,并阐明了它们之间的相互作用。

[关键词] 慢性阻塞性肺病 病理学 病理生理学 免疫学 细胞因子

慢性阻塞性肺病(COPD)是一种严重危害人类健康的常见病和多发病,它目前位居全世界第四大死因^[109]。它是一种慢性非特异性炎症,与机体对香烟烟雾等有毒气体的异常炎性反应有关。这些损伤导致肺气肿和气道重塑,表现为上皮鳞状化生和粘液化生,平滑肌增生以及气道壁纤维化。香烟烟雾是目前公认的最大危害因素,它会导致吸烟者肺功能明显下降。但并不是每一个吸烟者都会发展成为 COPD,事实上只有 15%-20%的吸烟者最后发展为临床症状显著的 COPD 患者^[110]。因此,遗传的易感性和环境因素在 COPD 的发病学中也发挥重要的作用。吸烟引起易感者的异常气道炎症,导致局部炎症持续存在,即使在戒烟后仍继续发展,导致气道阻塞。

COPD 的临床表现各不相同,表现为气管炎、肺气肿,或二者并存。关于同样的香烟烟雾等暴露为何导致迥异的 COPD 疾病表型,目前其原因尚不明确。但是近年来人们对 COPD 的炎症和病理、机体对香烟烟雾的免疫反应以及一些新的炎症生物标记有了进一步认识,其中引人瞩目的包括 C-反应蛋白(CRP),以及白介素 6(IL-6),肿瘤坏死因子 α (TNF- α),白介素 8(IL-8)和白介素 10(IL-10)等。

一、COPD 的病理学和病理生理学

肺气肿

肺气肿是指终末性细支气管和远端肺泡腔异常而持久的扩张,伴有气道和肺泡壁的损坏,但不伴有明显的纤维化^[111]。肺气肿分为小叶中央型和全小叶型两种,前者主要累及中央的呼吸性细支气管周围的肺小叶,这是香烟烟雾引起的肺气肿的主要类型,通常以肺上叶病变为主;全小叶型则累及整个次级肺小叶,它与 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶($\alpha 1$ -AT)缺乏有关,通常以下肺病变为甚。由于肺气肿的发生,肺间质

和肺泡的弹性回缩力降低, 导致呼气时气道陷闭^[112], 而且过度膨胀的肺组织和气体潴留也使得终末气道受压阻塞。

气道疾病

COPD 的一个重要病理特征是气道的炎症和气道重塑, 这些病理变化主要发生在直径 2mm 以下的细支气管。在 COPD 诊断确立以前, 吸烟的易感者周围气道就已存在有早期的炎症变化。既往有许多探讨了 COPD 的小气道炎症浸润和病理改变, 证实小气道持续异常炎症及气道重塑在 COPD 发病学中具有重要意义^[113,114]。

上皮异常

香烟烟雾等的慢性暴露会损伤气道上皮, 导致鳞状化生。这一现象在非 COPD 的吸烟者肺部也可见到, 与气道阻塞的相关性并不密切。肉眼看来, 随着疾病严重程度加剧, 上皮层的厚度也增加^[114]。但由此形态学的观察, 并不能判断上皮层的增厚是否继发于上皮细胞的增生、肥大还是黏液化生, 三者似乎对此皆有影响。COPD 患者之间的上皮重塑也不尽相同。有研究发现, 在 25 例行肺减容术的同种晚期肺气肿患者的肺标本中, 气道上皮层厚度差异很大^[117]。在 COPD 患者中, 上皮重塑中一个重要因素是黏液化生, 导致在炎性信号作用下黏液过量分泌^[116], 并造成气流阻塞^[117]。吸烟暴露^[118], 急慢性病毒感染^[119], 或者炎性细胞活化以致粘蛋白基因转录表达增加^[120]均可导致这一病变。而黏液化生加剧肺功能恶化并增加感染机会, 甚至影响肺减容术后的生存率^[121]。黏液化生后由于过多黏液阻塞气道, 上皮层增厚也突入管腔^[122], 加上黏液导致气道表面张力增加, 均使得气道在呼吸相陷闭。

平滑肌肥大和气道壁纤维化

多数的研究认为, COPD 气道的平滑肌总量是增加的。平滑肌肥大是 COPD 的病理学和发病学重要因素之一。有研究发现, 气道平滑肌总量和气流阻塞相关^[123]。吸烟所致的慢性气道炎症可引起气道平滑肌收缩和肥大, 导致气道壁增厚, 管腔阻塞。而增厚的气道壁在平滑肌收缩后, 会导致更严重的气流阻塞。

支气管周围纤维化是小气道重塑的重要特征。粘膜和呼吸性细支气管纤维化引起管壁增厚^[124], 降低气道弹性和对支气管扩张剂的反应性, 并降低了气道与肺泡的附着性, 使之在呼吸相更易于关闭。

总之, 小气道病变和肺气肿是 COPD 的两个重要病理改变, 而这往往同时存在, 以其中之一为主, 而表现为不同的 COPD 临床表型。小气道的病变不止影响到肺减容术后的肺气肿患者的肺功能, 而且也影响肺的弹性扩张等动力学因素, 而这相互影响, 决定着疾病的预后^[124]。

二、COPD 的肺部免疫和炎症反应

疾病发生发展的免疫过程

在 COPD 的发生发展过程中,其免疫过程极其复杂,涉及了先天性免疫和获得性免疫的成分。不同患者之间,其免疫过程也不完全相同。参与 COPD 的炎症过程和发病的细胞和炎性因子众多,主要包括中性粒细胞, T 淋巴细胞和巨噬细胞等,以及它们分泌的各种炎性因子。白细胞和结构细胞(内皮细胞和上皮细胞)活化,细胞及其细胞因子相互作用,引起炎症反应细胞聚集,导致炎症级联反应,引起肺组织的破坏和小气道重塑。最后,肺部的免疫反应显示为以 I 型 T 辅助淋巴细胞(Th1)占优势的特征。

COPD 炎症反应和细胞浸润的本质

COPD 的肺部具有炎症的一些普遍特征。肺组织活检材料显示,相对不吸烟或吸烟的非患病人群,轻中度 COPD 患者的肺部有更多炎性细胞的浸润^[125]。不同患者肺部这些浸润的细胞组分有所不同,但普遍存在的是巨噬细胞、中性粒细胞和 CD8+T 淋巴细胞。此外在某些部位还有少量的 CD4+T 淋巴细胞。CD8+T 淋巴细胞的动员和在肺部的积聚是 COPD 的一个特征,其机制尚未明确。肺部浸润的炎细胞表达一些促炎因子的受体,如 CCR5 和 CXCR3,这些受体相应的细胞因子激动剂在肺部的表达也上调^[126]。支气管上皮细胞中趋化因子受体 CXCR3、CXCL9、CXCL10 和 CXCL11 等的干扰素(IFN)诱导性激动剂表达也增加^[127, 128]。此外,趋化因子 CCL5 (CCR5 激动剂)在慢性支气管炎加重期表达是升高的^[126],这可能促进表达 CCR5 的 T 细胞和活化的巨噬细胞在肺部聚集。由于 COPD 的炎症呈慢性过程,由各类浸润的炎性细胞和活化的肺部结构细胞所分泌的大量细胞因子和炎症介质相互作用,使得 COPD 肺部白细胞的诱导动员复杂化。例如,巨噬细胞的迁入产生一些趋化因子(如 CCL5),后者募集 T 细胞到达肺部,继而诱导大量的 CD8+T 细胞积聚。

COPD 的肺部有丰富的 CD8+T 淋巴细胞聚集,但其确切作用尚未明了。可以确定的是,这类细胞的存在导致了 TNF- α 和蛋白酶等一些致病性炎症介质的产生,参与 COPD 的肺组织和肺间质的破坏^[129]。此外,CD8+T 细胞还可能产生的 IFN- γ ,后者诱导 CXCR3 激动剂的生成,如此一来,这些 T 细胞又不断趋使其他表达 CXCR3 的炎性 T 细胞聚集活化,往复不断。

中性粒细胞也是 COPD 患者肺部一类广泛存在的细胞,对疾病发生的作用值得重视。COPD 患者的痰和肺泡灌洗液中的中性粒细胞明显增加,吸烟可以引起患者循环中的中性粒细胞升高,进而在肺毛细血管积聚^[130],在 IL-8 和白三烯 B4(LTB4)等的作用下迁移进入肺部,产生蛋白酶类、活性氧(ROS)和趋化因子等一系列炎性介质。

巨噬细胞是 COPD 患者的肺泡灌洗液中的最多的一群细胞。有研究表明,灌洗液中的巨噬细胞数量与 COPD 的病情严重程度相关^[131]。这类细胞能产生多种炎症介质,如 TNF- α 、LTB₄、ROS 和数种趋化因子,包括 IL-8 和促炎性的 CCL2 (CCR2 激动剂)^[130,132]。后者意义十分重要,因为 CCL2 的产生有助于募集更多的促炎性巨噬细胞亚型到达肺组织。这些粗言细胞募集产生大量的蛋白酶类,包括组织蛋白酶 K、L 和 S,以及 MMPs-1、-2、-9 和-12。COPD 患者肺部的巨噬细胞无论是在体内还是体外,这些蛋白酶的生成均有增加^[132,133]。

COPD 的肺部炎症往往表现为以 Th1 占优势的获得性免疫反应。然而,近来随着对效应性 T 细胞的生物学特性的进一步认识,人们发现还存在一种具有潜在促活性的特异 CD4+T 细胞亚群^[125]。由于这类细胞能够分泌 IL-17A 和 IL-17F,因而被命名为 Th17 细胞。虽然其他一些造血细胞如 CD8+细胞、NK 细胞和中性粒细胞也分泌 IL-17,但经典的 CD4+效应性 T 淋巴细胞群(Th1 和 Th2)并不分泌这一细胞因子^[134]。Th17 细胞的炎症活性显然与它所分泌的特定炎症介质相关,包括 IL-6、IL-17A、IL-17F、GM-CSF 和 TNF- α 。它还表达 IL-18 和 IL-23 受体,而 IL-23 能促进 Th17 细胞群的生长活化。IL-17 能诱导支气管上皮细胞产生 IL-6^[135],而 IL-6 与 IL-17 均为肺上皮细胞生成粘蛋白 Muc5AC 和 Muc5B 的强效诱导剂^[136]。IL-17 还可以诱导上皮细胞释放 CXCL8,后者是中性粒细胞的重要趋化因子。此外,IL-17 也上调 IL-23 的表达,后者促进 Th17 细胞进一步活化和增殖^[137]。IL-17—IL-23 这一反馈回路的形成导致炎症极易慢性化和自我维持,以致 COPD 的炎症持续存在,即使戒烟后仍然继续。Th17 细胞强大的促炎作用使得它在许多炎症性疾病和自身免疫性疾病当中(如类风湿性关节炎,炎性肠病等)具有重要作用^[125,138]。Th17 细胞的潜在致炎作用以及它在其他炎症性疾病当中的地位使得我们有理由相信, Th17 细胞在 COPD 的发生发展中也有重要作用,但其具体细节还需要进一步深入研究。

COPD 进展的生物学标记

现已发现不少 COPD 的生物学标记,可用于疾病的诊断和病情进展评估。COPD 患者的血液、痰以及肺泡灌洗液中存在大量的细胞因子、趋化因子、急性期蛋白和蛋白酶等多种炎症介质,但目前为止,没有一种物质可作为单一使用的 COPD 炎症生物学标记物,往往需要综合应用和分析。

目前来说,与 COPD 疾病严重程度关系最密切的是 C 反应蛋白(CRP)。CRP 是一种急性期蛋白,主要由肝细胞生成,能够诱导促炎因子和粘附分子表达,很可能具有促炎作用。但是它究竟只是一个疾病预测因子,还是切实参与了 COPD 的发病学尚不明确。但有研究表明,血中 CRP 的水平和随后 COPD 的发病率与病死率显著相关^[139,140]。

其他有潜在应用价值的生物学标记还包括 IL-6、TNF- α 、IL-10、IL-8 和 CCL18/PARC (肺和活性调节趋化因子)。这些物质并非 COPD 炎症过程所特有,而是机体应对多种炎性刺激的反应产物。关于他们在 COPD 起病中的确切作用还需更进一步的研究。IL-8 由活化的支气管上皮细胞、巨噬细胞和中性粒细胞分泌,它能诱导和活化中性粒细胞与单核细胞,向肺组织聚集。COPD 患者诱导痰中的 IL-8 水平升高,并与其中的中性粒细胞比例正相关^[141],在疾病的急性加重期尤为如此。TNF- α 是一项强有力的促炎因子,能够直接和间接地促进炎症进程,在香烟诱导的肺气肿形成当中至关重要^[142]。许多情况下, TNF- α 受体的活化会导致一系列炎性介质的释放,这些介质又产生进一步的炎症效应。由此形成一个由细胞因子、蛋白酶、趋化因子、粘附分子和其他炎症介质构成的广谱的促炎因子网络。IL-6 也是一种促炎因子,有多种细胞生成,通过活化白细胞以及结构细胞而发挥效应。COPD 患者的血液、诱导痰和肺泡灌洗液中 IL-6 水平均升高,加重期加重期为甚。IL-6 是急性期反应的一部分,能诱导肝脏生成 CRP。IL-10 由于对 Th1 型 CD4+ T 细胞有抑制作用,多数人认为它是一个抑炎因子。Barcelo 等^[143]报道, COPD 患者的肺泡灌洗液中能分离出产 IL-10 的 CD8+T 淋巴细胞,其数量显著高于健康人群。COPD 体内这类细胞的作用尚不明确,它们可能抑制促炎因子表达及其对肺组织的炎症损伤作用。COPD 患者肺部组织内的 IL-10 表达也是升高的。

总结

慢性阻塞性肺病发病过程极其复杂,包含了多种炎症细胞及其分泌的细胞因子和炎性介质的相互作用。至今为止发病的机制尚不明确,不同人群的遗传特征不同,对 COPD 的易感性也不同,患者的疾病表型也有差异。今后的研究重点在于了解香烟等有毒气体如何作用于不同遗传背景的人群,细胞因子间的具体作用怎样决定着疾病的表型和发展进程。

参考文献

- [1]Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 176(6):532-555.
- [2]中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2007 年修订版). *中华结核和呼吸杂志*, 2007, 30(1):8-17.
- [3]Dazzi F, Horwood NJ. Potential of mesenchymal stem cell therapy. *Curr Opin Oncol*, 2007, 19(6):650-655.
- [4]Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol*, 2006, 44(4):215-230.
- [5]Grauss RW, Winter EM, van Tuyn J, et al. Mesenchymal stem cells from ischemic heart disease patients improve left ventricular function after acute myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293(4):2438-2447.
- [6]Zhang H, Song P, Tang Y, et al. Injection of bone marrow mesenchymal stem cells in the borderline area of infarcted myocardium: heart status and cell distribution. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2007, 134(5):1234-1240.
- [7]Kassem M. Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications. *Cloning Stem Cells*, 2004, 6(4):369-374.
- [8]Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2004, 95(5):209-214.
- [9]Risbud MV, Albert TJ, Guttapalli A, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells towards a nucleus pulposus-like phenotype in vitro: implications for cell-based transplantation therapy. *Spine*, 2004, 29(23):2627-2632.
- [10]Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, et al. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. *Int J Mol Med*, 2004, 14(6):1035-1041.
- [11]Chen LB, Jiang XB, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(20):3016-3020.
- [12]Satake K, Lou J, Lenke LG. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue. *Spine*, 2004, 29(18):1971-1979.
- [13]Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*, 2003, 102(10):3483-3493.
- [14]Keating A. Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol*, 2006, 13(6):419-425.

- [15]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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(14):8407-8411.
- [16]Rojas M, Xu J, Woods CR, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 33(2):145-152.
- [17]Schoeberlein A, Holzgreve W, Dudler L, et al. Tissue-specific engraftment after in utero transplantation of allogeneic mesenchymal stem cells into sheep fetuses. *Am J Obstet Gynecol*, 2005, 192(4):1044-1052.
- [18]Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*, 2004, 40(6):1275-1284.
- [19]Tomita M, Adachi Y, Yamada H, et al. Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina. *Stem Cells*, 2002, 20(4):279-283.
- [20]Long X, Olszewski M, Huang W, et al. Neural cell differentiation in vitro from adult human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 2005, 14(1):65-69.
- [21]Jarvinen L, Badri L, Wettlaufer S, et al. Lung resident mesenchymal stem cells isolated from human lung allografts inhibit T cell proliferation via a soluble mediator. *J Immunol*, 2008, 181(6):4389-96.
- [22]Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292(5819):154-156.
- [23]Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282(5391):1145-1147.
- [24]Shamblott MJ, Axelman J, Wang SP, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(23): 13726~13731.
- [25]Gregory CA, Prockop DJ, Spees JL. Non-hematopoietic bone marrow stem cells. Molecular control of expansion and differentiation. *Experimental Cell Res*, 2005, 306(2):330-335.
- [26]Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development*, 2001, 128(24): 5181-5188.
- [27]Wang G, Bunnell BA, Painter RG. Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: Potential therapy for cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci*, 2005, 102(1): 186-191.
- [28]Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*, 2003, 31(10):890-896.

- [29]David CC, Reiner C, Carla M, et al. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(7):321-328.
- [30]Nuttall ME, Patton AJ, Olivera DL, et al. Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders. *J Bone Miner Res*, 1998, 13(3):371-382.
- [31]Zohar R, Sodek J, McCulloch CA. Characterization of stromal progenitor cells enriched by flow cytometry. *Blood*, 1997, 90(9): 3471-3481.
- [32]Hu Y, Liao LM, Wang QH, et al.. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fatal pancreas. *Lab Clin Med*, 2003, 41(5):342-346.
- [33]艾国平, 莱永萍, 闰国和, 等. 骨髓间充质干细胞的分离与培养. *第三军医大学学报*, 2001, 23(5):553.
- [34]张燕, 刘杰, 王德文, 等. 胎儿骨髓间充质干细胞的分离培养及表面标志的检测. *细胞与分子免疫学杂志*, 2002, 18(6):631-633.
- [35]Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal Stem Cell. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2004, 226(6):507-520.
- [36]Pereira RF, O Hara MD, Laptev AV, et al. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(3):1142-1147.
- [37]Van den Bos C, Mosca JD, Winkles J. Human mesenchymal stem cells respond to fibroblast growth factor. *Hum Cell*, 1997, 10(1):45-50.
- [38]Aguilar S, Nye E, Chan J, et al. Murine but not human mesenchymal stem cells generate osteosarcoma-like lesions in the lung. *Stem Cells*, 2007, 25(6):1586-1594.
- [39]Tolar J, Nauta AJ, Osborn MJ, et al. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2007, 25(2):371-379.
- [40]陈劲龙, 冉丕鑫. 血管内皮生长因子与烟雾暴露所致大鼠肺气肿发病关系的研究, 2003, 26(11): 671-674.
- [41]宋一平, 崔德健, 茅培英, 王德文. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立及药物干预的影响. *中华内科杂志*, 2000, 39(8):556-557.
- [42]Chung KF, Adcock IM. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur Respir J*, 2008, 31(6):1334-1356.
- [43]Kodavanti UP, Jackson MC, Ledbetter AD, et al. The combination of elastase and sulfur dioxide exposure causes COPD-like lesions in the rat. *Chest*, 2000, 117(5 Suppl 1):299S-302S.

- [44]Xu J, Zhao M, Liao S. Establishment and pathological study of models of chronic obstructive pulmonary disease by SO₂ inhalation method. *Chin Med J (Engl)*, 2000, 113(3):213-216.
- [45]Rubio ML, Sanchez-Cifuentes MV, Peces-Barba G, et al. Intrapulmonary gas mixing in panacinar and centriacinar-induced emphysema in rats. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 157(1):237-245.
- [46]Wright JL, Churg A. A model of tobacco smoke-induced airflow obstruction in the guinea pig. *Chest*, 2002, 121(Suppl 5):188S-191S.
- [47]Shore S, Kobzik L, Long NC. Increased airway responsiveness to inhaled methacholine in a rat model of chronic bronchitis. *Respir Crit Care Med*, 1995, 151(6): 1931-1938.
- [48]Mahadeva R, Shapiro SD. Chronic obstructive pulmonary disease: Experimental animal models of pulmonary emphysema. *Thorax*, 2002, 57(10):908-914.
- [49]Soler N, Ewig S, Torres A, et al. Airway inflammation and bronchial microbial patterns in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 1999, 14(5):1015-1022.
- [50]Dawkins PA, Stockley RA. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, 2001, 56(12):972-977.
- [51]Hokuto L, Pert AK, Whitsett JA. Prenatal but not postnatal inhibition of fibroblast growth factor receptor causes emphysema. *J Biol Chem*, 2003, 278(1) :415-421.
- [52]Suga T, Kurabayashi M, Sando Y. Disruption of the klothe gene causes pulmonary emphysema in mice: Defect in maintenance of pulmonary integrity during postnatal life. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000, 22(1):26-33.
- [53]龚太乾, 谭群友. 肺气肿的实验动物模型. *重庆医学*, 2004, 2 (33): 204-206.
- [54]Wright JL, Farmer SG, Churg A. A neutrophil elastase inhibitor reduces cigarette smoke-induced remodelling of lung vessels. *Eur Respir J*, 2003, 22(1):77-81.
- [55]马楠, 崔墓健, 集延杰, 等. 气道内注入脂多糖法建立大鼠慢性阻塞性肺病模型. *中华结核和呼吸杂志*, 1999, 22(6): 371-372.
- [56]李红梅, 崔德健, 佟欣, 等. 熏香烟加气管注内毒素和单纯熏香烟法建立大鼠 COPD 模型. *中国病理生理杂志*, 2002, 18(7):808-812.
- [57]Hu X, Wang J, Chen J, et al. Optimal temporal delivery of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with myocardial infarction. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2007, 31(3):438-443.
- [58]Tayyareci Y, Umman B, Sezer M, et al. Intracoronary autologous bone marrow-derived stem cell transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy: results of 18-month follow-up. *Turk Kardiyol Dern Ars*, 2008, 36(8):519-529.
- [59]Kakinuma S, Nakauchi H, Watanabe M. Hepatic stem/progenitor cells and stem-cell transplantation for the treatment of liver disease. *J Gastroenterol*, 2009, 44(3): 167-172.

- [60]Itoh T, Satou T, Ishida H, et al. The relationship between SDF-1alpha/CXCR4 and neural stem cells appearing in damaged area after traumatic brain injury in rats. *Neurol Res*, 2009, 31(1):90-102.
- [61]Fira-Mladinescu O, Tudorache V, Mihăicută S, et al. New concepts in the pathogenesis and pathophysiology of COPD. *Pneumologia*, 2007, 56(1):24, 26-31.
- [62]Shao L, Feng W, Sun Y, et al. Generation of iPS cells using defined factors linked via the self-cleaving 2A sequences in a single open reading frame. *Cell Res*, 2009, 19(3):296-306.
- [63]Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, et al. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(3):275-280.
- [64]Tessarollo L, Palko ME, Akagi K, et al. Gene targeting in mouse embryonic stem cells. *Methods Mol Biol*, 2009, 530:1-24.
- [65]Hashemi SM, Ghods S, Kolodgie FD, et al. A placebo controlled, dose-ranging, safety study of allogenic mesenchymal stem cells injected by endomyocardial delivery after an acute myocardial infarction. *Eur Heart J*, 2008, 29(2):251-259.
- [66]Larghero J, Vija L, Lecourt S, et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: Toward new immunosuppressive strategies for the treatment of autoimmune diseases? *Rev Med Interne*, 2009, 30(3):287-299.
- [67]Yen CC, Yang SH, Lin CY, et al. Stem cells in the lung parenchyma and prospects for lung injury therapy. *Eur J Clin Invest*, 2006, 36(5):310-319.
- [68]Chen XC, Wang R, Zhao X, et al. Prophylaxis against carcinogenesis in three kinds of unestablished tumor models via IL-12-gene-engineered MSCs. *Carcinogenesis*, 2006, 27(12):2434-2441.
- [69]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.
- [70]Yamada M, Kubo H, Kobayashi S, et al. Bone marrow-derived progenitor cells Are important for lung repair after lipopolysaccharide induced lung injure. *J Immunol*, 2004, 172(2):1266-1272.
- [71]Prockop DJ, Gregory CA, Spees JL. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, 100 Suppl 1:11917-11923.
- [72]Noël D, Djouad F, Bouffi C, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells and immune tolerance. *Leuk Lymphoma*, 2007, 48(7):1283-1289.

- [73]Le Visage C, Dunham B, Flint P, et al. Coculture of mesenchymal stem cells and respiratory epithelial cells to engineer a human composite respiratory mucosa. *Tissue Eng*, 2004, 10(9-10):1426-1435.
- [74]Xu J, Woods CR, Mora AL, et al. Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 293(1):L131-141.
- [75]Popov BV, Serikov VB, Petrov NS, et al. Lung epithelial cells induce endodermal differentiation in mouse mesenchymal bone marrow stem cells by paracrine mechanism. *Tissue Eng*, 2007, 13(10):2441-2450.
- [76] Patel KM, Crisostomo P, Lahm T, et al. Mesenchymal stem cells attenuate hypoxic pulmonary vasoconstriction by a paracrine mechanism. *J Surg Res*, 2007, 143(2):281-285.
- [77]Shmarina GV, Pukhalsky AL, Kokarovtseva SN, et al. Tumor necrosis factor-alpha/interleukin-10 balance in normal and cystic fibrosis children. *Mediators Inflamm*, 2001, 10(4):191-197.
- [78]Hackett TL, Holloway R, Holgate ST, et al. Dynamics of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine release during acute inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: an ex vivo study. *Respir Res*, 2008, 9(1):47-57.
- [79]Ikonomidis I, Papadimitriou C, Vamvakou G, et al. Treatment with granulocyte colony stimulating factor is associated with improvement in endothelial function. *Growth Factors*, 2008, 26(3):117-124.
- [80]Schrepfer S, Deuse T, Reichenspurner H, et al. Stem cell transplantation: the lung barrier. *Transplant Proc*, 2007, 39(2):573-576.
- [81]Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: The pulmonary first pass effect. *Stem Cells*, 2009, 18(5):1-6.
- [82]Da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*, 2006, 119(Pt 11): 2204-2213.
- [83]Gang EJ, Hong SH, Jeong JA, et al. In vitro mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 321(1):102-108.
- [84]Yen BL, Huang HI, Chien CC, et al. Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells*, 2005, 23(1):3-9.
- [85]Caplan AI. Mesenchymal stem cells and gene therapy. *Clin Orthop*, 2000, 379(Suppl) : S67-70.
- [86]Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, 418(6893):41-49.

- [87]Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, et al. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res*, 2005, 319(2): 243-253.
- [88]Watt FM, Hogan BL. Out of eden: stem cells and their niches. *Science*, 2000, 287(5457): 1427-1430.
- [89]Koc ON, Lazarus HM. Mesenchymal stem cells: heading into the clinic. *Bone Marrow Transplant*, 2001, 27(3):235-239.
- [90] in't Anker PS, Noort WA, Kruisselbrink AB, et al. Nonexpanded primary lung and bone marrow-derived mesenchymal cells promote the engraftment of umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol*, 2003, 31(10): 881-889.
- [91]Aggarwal S, Pittenger ME. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 2005, 105(4): 1815-1822.
- [92]Bacigalupo A, Palandri F. Management of acute graft versus host disease (GVHD). *Hematol J*, 2004, 5(3):189-196.
- [93]Silva GV, Litovsky S, Assad JA, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*, 2005, 111(2):150-156.
- [94]Zhang S, Ge J, Sun A, et al. Comparison of various kinds of bone marrow stem cells for the repair of infarcted myocardium: single clonally purified non-hematopoietic mesenchymal stem cells serve as a superior source. *J Cell Biochem*, 2006, 99(4): 1132-1147.
- [95]Stoff-Khalili MA, Rivera AA, Mathis JM, et al. Mesenchymal stem cells as a vehicle for targeted delivery of CRAbs to lung metastases of breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*, 2007, 105(2):157-167.
- [96]Fan CG, Tang FW, Zhang QI, et al. Characterization and neural differentiation of fetal lung mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*, 2005, 14(5):311-321.
- [97]Sabatini F, Petecchia L, Taviani M, et al. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest*, 2005, 85(8): 962-971.
- [98]向明章, 蒋耀光, 王慧春, 等. 人肺来源的间充质干细胞对 T 淋巴细胞增殖的影响. *第三军医大学学报*, 2006, 28(10):1052-1053.
- [99]Elzaouk L, Moelling K, Pavlovic J. Anti-tumor activity of mesenchymal stem cells producing IL-12 in a mouse melanoma model. *Exp Dermatol*, 2006, 15(11): 865-874.
- [100]Epperly MW, Francicola D, Zhang X, et al. Reduced irradiation pulmonary fibrosis and stromal cell migration in Smad3^{-/-} marrow chimeric mice. *In Vivo*, 2006, 20(5): 573-582.

- [101]Kanki-Horimoto S, Horimoto H, Mieno S, et al. Implantation of mesenchymal stem cells overexpressing endothelial nitric oxide synthase improves right ventricular impairments caused by pulmonary hypertension. *Circulation*, 2006, 114(1 Suppl): 1181-185.
- [102]Baber SR, Deng W, Master RG, et al. Intratracheal mesenchymal stem cell administration attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292(2):H1120-1128.
- [103]Deng W, St Hilaire RC, Chattergoon NN, et al. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation in vitro by genetically engineered marrow stromal cells secreting calcitonin gene-related peptide. *Life Sci*, 2006, 78(16):1830-1838.
- [104]Conese M, Rejman J. Stem cells and cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 2006, 5(3):141-143.
- [105]Randell SH, Walstad L, Schwab UE, et al. Isolation and culture of airway epithelial cells from chronically infected human lungs. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2001, 37(8):480-489.
- [106]Otto WR. Lung epithelial stem cells. *J Pathol*, 2002, 197(4): 527-535.
- [107]Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2004, 51(1):1-28.
- [108]Djouad F, Bony C, Apparailly F, et al. Earlier onset of syngeneic tumors in the presence of mesenchymal stem cells. *Transplantation*, 2006, 82(8): 1060-1066.
- [109]GOLD Executive Committee [DB/OL]. Guidelines: Global Strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of COPD, November 2006 [2006-11-18].[http://www. goldcopd. com/Guidelineitem.asp? 11=2&12=1&intId=989](http://www.goldcopd.com/Guidelineitem.asp?11=2&12=1&intId=989).
- [110]American Thoracic Society. Cigarette smoking and health. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, 153(2):861-865.
- [111]PiquetteCA, RennardSI, SniderGL. Chronic bronchitis and emphysema. In: Murray JF, Nadel JA, editors. *Textbook of respiratory medicine*, 3rd ed. Philadelphia, PA: W.B. Saunders, 2000. pp. 1188-1245.
- [112]Lamb D, McLean A, Gillyooly M, et al. Relation between distal airspace size, bronchiolar attachments, and lung function. *Thorax*, 1993, 48(10):1012-1017.
- [113]Gelb AF, Hogg JC, Muller NL, et al. Contribution of emphysema and small airways in COPD. *Chest*, 1996, 109(2):353-359.
- [114]Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*, 2004, 350(10):2645-2653.

- [115]Kim V, Criner GJ, Abdallah HY, et al. Small airway morphometry and improvement in pulmonary function after lung volume reduction surgery. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 171(1):40–47.
- [116]Williams OW, Sharafkhaneh A, Kim V, et al. Airway mucus: from production to secretion. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, 34(5):527–536.
- [117]Baraldo S, Saetta M, Cosio MG. Pathophysiology of the small airways. *Semin Respir Crit Care Med*, 2003, 24(5):465–472.
- [118]Deshmukh HS, Case LM, Wesselkamper SC, et al. Metalloproteinases mediate mucin 5AC expression by epidermal growth factor receptor activation. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 171(4):305–314.
- [119]Holtzman MJ, Tyner JW, Kim EY, et al. Acute and chronic airway responses to viral infection: implications for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*, 2005, 2(2):132–140.
- [120]Burgel PR, Nadel JA. Roles of epidermal growth factor receptor activation in epithelial cell repair and mucin production in airway epithelium. *Thorax*, 2004, 59(11):992–996.
- [121]Hogg JC, Chu FS, Tan WC, et al. Survival after lung volume reduction in chronic obstructive pulmonary disease: insights from small airway pathology. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 176(5):454–459.
- [122]James AL, Wenzel S. Clinical relevance of airway remodelling in airway diseases. *Eur Respir J*, 2007, 30(1):134–155.
- [123]Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, et al. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995, 152(5 Pt 1):1666–1672.
- [124]Patel BJ, Marchetti N, Kim V, et al. Airway wall thickness correlates with dynamic hyperinflation in severe COPD. *Proc Am Thorac Soc*, 2006, 3:A712.
- [125]Kikly K, Liu L, Na S, Sedgwick JD. The IL-23/Th(17) axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr Opin Immunol*, 2006, 18(6):670–675.
- [126]Zhu J, Qiu YS, Majumdar S, et al. Exacerbations of Bronchitis: bronchial eosinophilia and gene expression for interleukin-4, interleukin-5, and eosinophil chemoattractants. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164(1):109–116.
- [127]Aksoy MO, Yang Y, Ji R, et al. CXCR3 surface expression in human airway epithelial cells: cell cycle dependence and effect on cell proliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 290(5):L909–L918.

- [128]Kelsen SG, Aksoy MO, Yang Y, et al. The chemokine receptor CXCR3 and its splice variant are expressed in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 287(3):L584-L591.
- [129]O'Donnell R, Breen D, Wilson S, et al. Inflammatory cells in the airways in COPD. *Thorax*, 2006, 61(5):448-454.
- [130]Rutgers SR, Postma DS, ten Hacken NH, et al. Ongoing airway inflammation in patients with COPD who Do not currently smoke. *Chest*, 2000, 117(5 Suppl 1):262S.
- [131]MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*, 2005, 2(4):258-266. (discussion 290-291).
- [132]Molet S, Belleguic C, Lena H, et al. Increase in macrophage elastase(MMP-12) in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Inflamm Res*, 2005, 54(1):31-36.
- [133]Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, et al. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest*, 2000, 117(3):684-694.
- [134]Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25:821-852.
- [135]Molet S, Hamid Q, Davoine F, et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol*, 2001, 108(3): 430-438.
- [136]Chen Y, Thai P, Zhao YH, et al. Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. *J Biol Chem*, 2003, 278(19): 17036-17043.
- [137]Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, et al. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*, 2004, 202(1):96-105.
- [138]Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med*, 2007, 13(2):139-145.
- [139]Man SF, Connett JE, Anthonisen NR, et al. C-reactive protein and mortality in mild to moderate chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, 2006, 61(10):849-853.
- [140]Dahl M, Vestbo J, Lange P, et al. C-reactive protein as a predictor of prognosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 175(3):250-255.
- [141]Yamamoto C, Yoneda T, Yoshikawa M, et al. Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. *Chest*, 1997, 112(2):505-510.
- [142]Churg A, Wang RD, Tai H, et al. Tumor necrosis factor-alpha drives 70% of cigarette smoke-induced emphysema in the mouse. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004, 170(5):492-498.
- [143]Barcelo B, Pons J, Fuster A, et al. Intracellular cytokine profile of T lymphocytes in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Immunol*, 2006, 145(3):474-479.

在读期间论文发表和科研工作

博士在读期间以第一作者发表的论文情况

- ❖ 宋小莲, 白冲, 彭瑞云, 王水明, 高亚兵. 微波辐射诱导肺癌A549细胞凋亡的研究. 中华内科杂志. 2007,46(10):850-851.
- ❖ 宋小莲, 白冲. 微波辐射与肿瘤细胞凋亡. 国际呼吸杂志. 2007, 27(18): 1425~1427.
- ❖ 宋小莲, 白冲. 间充质干细胞与肺. 国际呼吸杂志. 2008. 28(3).-183~186.
- ❖ 宋小莲, 胡海洋, 顾红军, 喻超, 白冲. 骨髓间充质干细胞移植对COPD大鼠肺部损伤的影响. 2009年上海肺科年会(优秀论文三等奖).
- ❖ Song XL, Bai C. Swyer-James syndrome with peculiar course and ipsilateral pulmonary vein defect. (已投出)

博士在读期间参与的科研课题

- ❖ 国家自然科学基金《骨髓间充质干细胞移植对慢性阻塞性肺病气道及肺损伤的修复作用及相关机制》(2008年) 32万
- ❖ 国家自然科学基金《CAP在急性肺损伤II型肺泡上皮细胞凋亡异常及信号传导中的作用机理研究》(2007年) 29万;
- ❖ 上海浦江人才计划《CAP在急性肺损伤II型肺泡上皮细胞凋亡异常及信号传导中的作用机理研究》(2007年) 27万
- ❖ 全军“十一五”基金课题《造血干细胞移植对小鼠哮喘模型气道重塑的影响》(2006年) 7万

参编著作

- ❖ 《细支气管肺泡癌》第二军医大学出版社 2008
- ❖ 《呼吸系统疑难、少见病-经典案例分析》东方国际呼吸论坛文献 2008
- ❖ 《慢性阻塞性肺疾病的预防和治疗》人民卫生出版社 2009

致 谢

本研究是在导师白冲教授的悉心指导下完成的。

多年以来，恩师渊博的学识、敏锐的洞察力、缜密的科研思路和丰富的临床经验、严谨的治学及不懈追求的精神一直是我事业上效仿的楷模。三年的博士研究生学习过程中，他对我言传身教、严格要求、不断督促我进步，他的人格魅力无时无刻不在对我产生潜移默化的影响。我不仅仅从这里学到了丰富的医学科研知识，增长了才干，并且学到了做人的道理。三年来，他对我学习上的谆谆教诲，生活上的亲切关怀与帮助将使我受益终生。

同时，也真诚感谢师母陈若华教授给予的亲切关怀与鼓励，以及在实验上给予的支持与帮助。

衷心感谢李强主任三年来对我学习和工作的悉心指导。感谢韩一平、黄怡、王昌惠、赵立军、姚小鹏等教授一直以来对我课题和临床工作给予的认真培养与大力关心支持。他们教给我许多宝贵的科研知识与临床经验，让我在今后职业生涯终身受益；他们认真负责的工作态度与谦虚和蔼的做人风格也让我非常敬佩。

感谢徐浩、董宇超、商艳、孙沁莹、张景熙、黄海东、王辰飞、聂小蒙、张伟主治医师等，以及呼吸科王汇护士长和全体的护理人员在三年里给予我工作上提供了指导和帮助，他们的专业精神和敬业精神让我深深触动，激励着我今后工作中不断进步。

感谢第二军医大学细胞生物学教研室胡以平主任在实验总体设计和实施，以及实验技术方面给予我的大力帮助，胡主任以其严谨的科研思维和丰富的科研经验，让我在打下坚实的科研基本功和确立更科学的科研思维上受益匪浅。

感谢长海医院中心实验室沈茜主任、蔡在龙主任、张燕等博士在流式细胞仪检测和分子生物学技术上给予的热情帮助。

感谢长海医院血液科王建民和杨建民两位主任在干细胞培养技术和相关研究方面的真诚援助。

感谢长海医院病理科陈新房老师和倪灿荣高级实验师在免疫组化及病理切片上的帮助和指导。

感谢朝夕相处的各位同学们，特别是顾红军、胡海洋、武宁三位博士在工作、实验以及生活上给予我的无私帮助；感谢吴俊杰、戈霞辉、胥武剑、喻超、郑溢声、

尹惠君等，同学的友情协作和帮助，三年来在实验室的密切合作与朝夕相处给我留下难忘的回忆。

感谢我的父母和家人三年来给予我的全力帮助与支持，他们在精神和物质上的给予我的无私奉献，将令我永远心存感动。

感谢所有为本研究的完成提供过建议和帮助的老师 and 亲友们。