

间充质干细胞治疗吸入性损伤的实验研究进展

朱峰 郭光华

Advances in the experimental study of the use of mesenchymal stem cells for the treatment of inhalation injury Zhu Feng, Guo Guanghua. Department of Burn Surgery, Institute of Burns, Changhai Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Corresponding author: Guo Guanghua, 330006, Email: guogh2000@hotmail.com

【Abstract】 Inhalation injury seriously threatens the survival and quality of life in burn and trauma patients. So far there is no breakthrough in the treatment of inhalation injury. A significant advance has been witnessed in the experimental study of the use of stem cells in the treatment of lung injury in recent years. In this paper, according to the results of our study in the systemic transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of inhalation injury, the effect of mesenchymal stem cells on anti-inflammatory process and repair of lung tissues in inhalation injury, and its possible mechanisms are reviewed.

【Key words】 Mesenchymal stem cells; Paracrine communication; Burns, inhalation; Mechanism

【关键词】 间质干细胞; 旁分泌细胞交流; 烧伤, 吸入性; 机制

吸入性损伤尤其是烟雾吸入性损伤患者, 不仅因为急性一氧化碳、氰化物中毒以及气道和肺组织受热力和化学颗粒损害导致急性预后不良, “幸存者”也因为肺纤维化带来的肺功能障碍、哮喘、反复肺部感染等后遗症严重影响生存质量。吸入性损伤已然成为影响烧/创伤预后的独立因素, 对吸入性损伤的诊疗及其研究也受到广大医务工作者的重视^[1-2]。以机械通气为主的临床治疗策略虽然解决了部分吸入性损伤急性期氧合、呼吸功能支持等问题, 但对于重度吸入性损伤造成的顽固性低氧血症和极差的肺顺应性, 有时不仅不能维持正常的氧合, 而且容易导致氧中毒、呼吸机相关性肺损伤等并发症, 严重影响预后。而药物治疗(激素、表面活性物质等)不仅效果有限, 且因没有为受损气道和肺组织提供病理上直接修复和功能上恢复的机会, 也严重影响患者远期疗效和生存质量。以上这些也是吸入性损伤治疗近年来未有突破性进展的原因^[3-4]。

20 世纪 90 年代兴起的干细胞治疗在炎症性肺疾病(ILD)、急性肺损伤(ALI)、慢性肺损伤救治中取得了较好的进展。大量的动物实验结果证实, 干细胞不仅能改善 ILD 以

及 ALI、慢性肺损伤局部和全身炎症反应; 而且可以通过分化作用可直接参与肺组织的修复, 减轻后期肺纤维化, 改善预后^[5-8]。笔者在 21 世纪初开展了骨髓间充质干细胞(BMMSC)治疗吸入性损伤的系列动物研究, 也取得了一定进展。本文以国内外间充质干细胞(MSC)治疗 ALI/ARDS 的研究为基础, 对 BMMSC 治疗吸入性损伤的研究作一综述。



1 MSC 概述

MSC 是起源于机体发育早期的中胚层和外胚层的具有高度自我更新和多向分化潜能的成体干细胞, 是干细胞家族中的重要成员, 主要存在于结缔组织和器官间质中, 以骨髓组织中含最为丰富。MSC 表面表达 CD105⁺、CD90⁺、CD73⁺、CD166⁺、CD45⁻、CD34⁻、CD14⁻、CD11b⁻, 在体内外特定的条件下可分化为肌细胞、软骨细胞、骨细胞、脂肪细胞、神经细胞、神经胶质细胞和肝卵原细胞^[9]。

2 MSC 治疗吸入性损伤的作用机制

MSC 移植治疗 ALI/ARDS 的机制尚不清楚, 笔者对 BMMSC 治疗吸入性损伤的机制研究也在进一步探索中。综合目前国内外 MSC 治疗 ALI 的资料, MSC 治疗吸入性损伤的可能机制如下。

2.1 抗炎与免疫调节

吸入性损伤的实质是 ALI。ALI 被认为是全身炎症反应在肺部的表现, 伴随大量且复杂的炎症反应及细胞损伤。减轻肺部的炎症反应、级联效应以及调节肺损伤时的免疫功能是治疗 ALI 的重要措施。笔者研究团队将 BMMSC 经外周静脉移植至烟雾吸入性损伤兔体内后证实, BMMSC 移植可以显著降低外周血和肺组织中主要促炎因子 IL-1 β 、IL-6 以及 TNF- α 的浓度, 提高主要抗炎因子 IL-10 的浓度, 改善局部及全身炎症反应和免疫紊乱^[10-11]。实验中笔者还观察到 BMMSC 治疗后肺水质量分数和肺泡水肿也得到了显著改善。这些结果与 Rojas 等^[12]和 Gupta 等^[13]关于 BMMSC 治疗 LPS 所致 ALI 报道的实验结论是一致的, 说明 BMMSC 移植有助于改善吸入性损伤导致的局部和全身炎症反应。近年来一些关于 MSC 治疗各种形式 ALI 的报道^[14-15], 其结论也与笔者的结果大致相同。

BMMSC 移植治疗对 ALI 蛋白酶以及抗氧化的影响, 也是其在抗炎与免疫调节方面的重要表现。研究证实, 携带分泌型白细胞蛋白酶抑制因子质粒的 BMMSC 能减轻慢性阻塞性肺疾病大鼠气道炎症反应和黏液分泌^[16]。N-乙酰半胱氨酸预处理的 MSC 治疗博来霉素诱导的肺损伤, 展现了较好的治疗效果^[17]。MSC 移植能显著减少缺血再灌注肺损伤大鼠肺内丙二醛、髓过氧化物酶的产生, 增加 SOD 的含量, 减轻肺损伤^[18]。另几项研究也证实, MSC 移植能显著降低

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2015.03.024

基金项目: 国家自然科学基金(81060155、81360292); 江西省自然科学基金(20132BAB205058); 江西省科技厅支撑计划(2010BSA10300); 江西省优势科技创新团队计划(20115BCB29023)

作者单位: 200433 上海, 第二军医大学长海医院烧伤外科, 全军烧伤研究所(朱峰); 南昌大学第一附属医院烧伤科(郭光华)

通信作者: 郭光华, 330006, Email: guogh2000@hotmail.com

小鼠 LPS 损伤后血浆半胱氨酸和谷胱甘肽含量,调节 NOS 和 NOS 来源一氧化氮水平,下调一氧化氮代谢产物水平,展现体内抗氧化效应^[19-21]。然而,这些结果并未在吸入性损伤的研究中得到考察和印证,亟须进一步研究。

2.2 分化为肺内主要功能细胞,参与并加快肺组织修复

无论是热力、烟雾的直接损害还是继发性炎症反应造成的组织细胞坏死或凋亡,均可造成吸入性损伤气道和肺组织细胞的严重缺失,包括肺泡上皮细胞、肺血管内皮细胞、气道上皮细胞等,进而引起呼吸系统结构和功能障碍^[22]。机械通气仅依靠机体自身干细胞修复,作用十分有限,外源性干细胞才可以真正起到修复的作用。笔者研究团队将 BMMSC 体外 5-溴脱氧尿苷(BrdU)染色后注入烟雾吸入性损伤家兔体内,利用 Evison 双染法观察到在家兔肺内 BrdU 与水通道蛋白 5 双阳性(肺泡 I 型上皮细胞标志蛋白)、BrdU 与碱性磷酸酶双阳性(肺泡 II 型上皮细胞标志蛋白)以及 BrdU 与 CD34 双阳性(肺血管内皮细胞标志蛋白)细胞,证实移植入体内的同源 BMMSC 能分化为肺泡 I 型上皮细胞、肺泡 II 型上皮细胞以及肺血管内皮细胞,参与吸入性损伤的组织修复^[23]。但可惜的是,并未观察到 BrdU 与角蛋白双阳性(气管上皮细胞标志蛋白)细胞。同期的肺组织大体标本显示,对照组肺肿胀明显、包膜紧张,双下肺见大片出血点,切开肺叶可见淡红褐色泡沫样液体流出;BMMSC 治疗组肺脏无明显肿胀,色鲜红,包膜略紧张,双下肺散见点状出血点,张力不大,切开见少量淡红色液体流出。此外,HE 染色显示,BMMSC 治疗组肺血管扩张充血、肺泡隔断裂、肺泡融合、中性粒细胞浸润、气管上皮细胞脱落、肺泡塌陷和肺不张等病理改变较对照组显著减轻,肺损伤评分也显著优于对照组^[24]。说明 BMMSC 参与并加快了吸入性损伤的修复,减轻了肺损伤。

2.3 促进血管新生,减轻肺纤维化

内皮系统的直接或间接损害是肺内毛细血管通透性增加以及肺水肿的主要原因,也是吸入性损伤的重要病理生理基础。机械通气治疗并不能改善和维持呼吸膜和肺血管内皮细胞结构和功能的完整性,这也是机械通气治疗的局限所在。血管内皮生长因子(VEGF)以及血管生成素(Ang)家族是目前已知对血管内皮细胞有较强作用的特异性生长因子^[25-26]。有报道指出,MSC 可以通过旁分泌或自分泌促血管生成因子,包括 VEGF、Ang-1、bFGF 等,促进肺内血管新生,减轻肺内炎症,减少肺(泡)水肿,改善临床症状^[27]。笔者研究团队研究显示,BMMSC 治疗组家兔肺组织中 VEGF 水平较对照组显著升高而外周血 VEGF 明显降低,肺组织病理学改变也相应地好转^[28]。虽然目前还不清楚 BMMSC 治疗后肺组织与外周血 VEGF 变化差异的具体机制,但是结果证实了 BMMSC 移植能提高早期烟雾吸入性损伤肺组织 VEGF 水平,降低外周血 VEGF 水平,减少血管外肺水,对烟雾吸入性损伤肺可能具有一定的保护作用。笔者研究团队在对烟雾吸入性损伤后家兔肺内 Ang-2/Ang-1 体系的研究中证实,BMMSC 治疗组 Ang-2/Ang-1 显著降低,相应的 VEGF 显著升高,这有利于吸入性损伤后肺内血管新生,减少血管通透性和肺(泡)水肿^[29]。

国内外干细胞减轻肺纤维化的研究主要集中在以博来

霉素致伤的动物模型上,结果均显示干细胞移植能显著降低肺纤维化程度,减少 ECM 胶原沉积或胶原 1 α 1 mRNA 表达并参与组织修复,降低整体病死率^[30-31]。笔者研究团队在烟雾吸入性损伤的家兔模型中也观察到,BMMSC 移植能显著改善肺部炎症,减轻肺损伤,降低肺纤维化程度^[24]。

2.4 归巢

干细胞归巢至肺损伤和炎症区域,这是其发挥功能的前提。笔者研究显示,经外周静脉输注的 BMMSC,在细胞膜红色荧光探针或 BrdU 体外染色示踪下,大部分归巢至吸入性损伤气道、肺内以及肺内炎症较严重区域,而在炎症不明显的肺外器官,如心脏、肝脏以及肾脏几乎难以找到^[23]。这也与 Kähler 等^[32]的研究结论一致。虽然笔者未就这一现象展开机制研究,但相关领域的研究显示,坏死气管和肺组织细胞可能通过释放系列信号因子,如基质细胞衍生因子 1、趋化性细胞因子受体、干细胞因子受体、集落刺激因子、VEGF 等,引导表达特异性受体的干细胞逆浓度梯度移动并黏附于损伤处,这也被认为是干细胞归巢的主要机制^[33-34]。

3 存在的问题与展望

鉴于肺部复杂的解剖结构、生理功能以及吸入性损伤后复杂的病理生理改变,MSC 移植治疗吸入性损伤仍有许多问题亟待解决,如干细胞在吸入性损伤体内微环境下的治疗机制,体外培养的干细胞回输体内的安全性,MSC 治疗剂量、输注途径以及对预后的影响等。MSC 在吸入性损伤中的研究目前仅限于动物实验,临床实践尚未开展,极大地限制了其临床应用,仍需进行更多深入的研究。

笔者的系列实验研究显示,具有主动归巢与分化以及抗炎—免疫调节效应的 MSC 移植治疗对吸入性损伤具有全面的生物学效应,为其提供了 3 种潜在应用于临床的治疗手段,即药物治疗、细胞治疗、基因治疗。已有研究将 Ang-1 基因转染 MSC 后植入 LPS 诱导的 ALI 家兔体内,结果显示携带 Ang-1 基因的 BMMSC 能明显促进肺血管生成和肺血管内皮细胞成熟,改善 ALI 肺血管通透性,减轻肺水肿及肺内炎症反应^[35]。总之,MSC 移植是吸入性损伤极具前景的治疗方法。笔者下一步将继续开展以 MSC 为载体,携带多个目标基因(如 VEGF/Ang-1 双基因等)治疗吸入性损伤的研究,相信具有潜在的治疗意义。

参考文献

- [1] Antonio AC, Castro PS, Freire LO. Smoke inhalation injury during enclosed-space fires: an update[J]. J Bras Pneumol, 2013, 39(3): 373-381.
- [2] Zhu F, Qiu X, Wang J, et al. A rat model of smoke inhalation injury[J]. Inhal Toxicol, 2012, 24(6): 356-364.
- [3] Dries DJ, Endorf FW. Inhalation injury: epidemiology, pathology, treatment strategies [J]. Scand J Trauma Resusc Emerg Med, 2013, 21: 31.
- [4] 郭光华. 重度吸入性损伤的呼吸支持与治疗[J]. 中华烧伤杂志, 2013, 29(2): 134-138.
- [5] Zhu YG, Feng XM, Abbott J, et al. Human mesenchymal stem cell microvesicles for treatment of Escherichia coli endotoxin-induced acute lung injury in mice[J]. Stem Cells, 2014, 32(1): 116-125.
- [6] Rojas M, Parker RE, Thorn N, et al. Infusion of freshly isolated

- autologous bone marrow derived mononuclear cells prevents endotoxin-induced lung injury in an ex-vivo perfused swine model [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4(2):26.
- [7] Garcia O, Carraro G, Turcatel G, et al. Amniotic fluid stem cells inhibit the progression of bleomycin-induced pulmonary fibrosis via CCL2 modulation in bronchoalveolar lavage[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71679.
- [8] Spees JL, Pociask DA, Sullivan DE, et al. Engraftment of bone marrow progenitor cells in a rat model of asbestos-induced pulmonary fibrosis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 176: 385-394.
- [9] 陈齐红, 邱海波, 杨毅. 间充质干细胞治疗急性肺损伤作用机制研究进展[J]. *中国危重病急救医学*, 2012, 24(10): 637-640.
- [10] 朱峰, 郭光华, 陈雯, 等. 骨髓间充质干细胞移植对吸入性损伤家兔炎症反应和肺损伤的影响[J]. *中华烧伤杂志*, 2010, 26(5): 360-365.
- [11] 陈雯, 朱峰, 郭光华, 等. 骨髓间充质干细胞对烟雾吸入性损伤兔早期炎症因子分泌的影响[J]. *中国危重病急救医学*, 2011, 23(1): 21-23.
- [12] Rojas M, Xu J, Woods CR, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 33(2):145-152.
- [13] 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]. *J Immunol*, 2007, 179(3): 1855-1863.
- [14] Asmussen S, Ito H, Traber DL, et al. Human mesenchymal stem cells reduce the severity of acute lung injury in a sheep model of bacterial pneumonia[J]. *Thorax*, 2014, 69(9): 819-825.
- [15] Zhao YD, Huang X, Yi F, et al. Endothelial FoxM1 mediates bone marrow progenitor cell-induced vascular repair and resolution of inflammation following inflammatory lung injury[J]. *Stem Cells*, 2014, 32(7): 1855-1864.
- [16] 江德鹏, 李琪, 维克多·克罗斯夫, 等. 携分泌型白细胞蛋白酶抑制因子的间充质干细胞对慢性阻塞性肺疾病大鼠的治疗作用[J]. *中华医学杂志*, 2011, 91(48): 3438-3441.
- [17] Wang Q, Zhu H, Zhou WG, et al. N-acetylcysteine-pretreated human embryonic mesenchymal stem cell administration protects against bleomycin-induced lung injury[J]. *Am J Med Sci*, 2013, 346(2):113-122.
- [18] Chen S, Chen L, Wu X, et al. Ischemia postconditioning and mesenchymal stem cells engraftment synergistically attenuate ischemia reperfusion-induced lung injury in rats[J]. *J Surg Res*, 2012, 178(1): 81-91.
- [19] Iyer SS, Torres-Gonzalez E, Neujahr DC, et al. Effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on endotoxin-induced oxidation of plasma cysteine and glutathione in mice [J]. *Stem Cells Int*, 2010: 868076.
- [20] Lee SH, Jang AS, Kim YE, et al. Modulation of cytokine and nitric oxide by mesenchymal stem cell transfer in lung injury/fibrosis[J]. *Respir Res*, 2010, 11:16.
- [21] Gao P, Yang X, Mungur L, et al. Adipose tissue-derived stem cells attenuate acute lung injury through eNOS and eNOS-derived NO[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(6):1313-1318.
- [22] Rehberg S, Maybauer MO, Enkhbaatar P, et al. Pathophysiology, management and treatment of smoke inhalation injury[J]. *Expert Rev Respir Med*, 2009, 3(3):283-297.
- [23] 朱峰, 郭光华, 陈任生, 等. 骨髓间充质干细胞在烟雾吸入性损伤家兔体内向功能细胞分化的观察[J]. *中华烧伤杂志*, 2011, 27(2): 150-155.
- [24] 朱峰, 郭光华, 黄松, 等. 骨髓间充质干细胞移植对烟雾吸入性损伤兔早期肺组织的影响[J]. *中国危重病急救医学*, 2011, 23(1): 18-20.
- [25] McCarter SD, Mei SH, Lai PF, et al. Cell-based angiopoietin-1 gene therapy for acute lung injury[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 175(10):1014-1026.
- [26] 宋俊峰, 孙波. 血管内皮细胞生长因子与急性肺损伤[J]. *国际儿科学杂志*, 2008, 35(1): 22-25.
- [27] Lee JW, Fang X, Krasnodembskaya A, et al. Concise review: Mesenchymal stem cells for acute lung injury: role of paracrine soluble factors[J]. *Stem Cells*, 2011, 29(6):913-919.
- [28] 朱峰, 郭光华, 陈雯, 等. 骨髓间充质干细胞对烟雾吸入性损伤早期血管内皮细胞生长因子的影响[J]. *中华急诊医学杂志*, 2010, 19(9): 938-941.
- [29] 朱峰, 郭光华, 陈雯, 等. 骨髓间充质干细胞移植对烟雾吸入性损伤兔肺血管内皮生长因子以及血管生成素 1 和血管生成素 2 的影响[J]. *中华烧伤杂志*, 2012, 28(6): 470-472.
- [30] Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(14):8407-8411.
- [31] Aguilar S, Scotton CJ, McNulty K, et al. Bone marrow stem cells expressing keratinocyte growth factor via an inducible lentivirus protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *PLoS One*, 2009, 4:e8013.
- [32] Kähler CM, Wechselberger J, Hilbe W, et al. Peri pheral infusion of rat bone marrow derived endothelial progenitor cells leads to homing in acute lung injury[J]. *Respir Res*, 2007, 8: 50.
- [33] 邓启垣, 陈灿, 黄石安. 间充质干细胞归巢的研究进展[J]. *医学综述*, 2010, 16(5): 678-681.
- [34] 朱峰, 王红梅, 郭光华, 等. 骨髓间充质干细胞在急性肺损伤中抗炎作用的研究进展[J]. *中国危重病急救医学*, 2009, 21(11):700-702.
- [35] Xu J, Qu J, Cao L, et al. Mesenchymal stem cell-based angiopoietin-1 gene therapy for acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice[J]. *J Pathol*, 2008, 214(4):472-481.

(收稿日期:2014-07-09)

(本文编辑:程林)