

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20171005

携带血管紧张素转换酶 2 基因的人脐带间充质干细胞尾静脉注射移植可减轻博来霉素诱导的大鼠急性肺损伤

高凤英¹, 金文强¹, 王星海¹, 刘振威^{2*}

1. 上海市建工医院呼吸科, 上海 200083

2. 上海市第一人民医院呼吸科, 上海 200080

[摘要] **目的:**探讨携带血管紧张素转换酶 2(angiotensin converting enzyme 2, ACE2)基因的人脐带间充质干细胞(human umbilical mesenchymal stem cells, HUMSCs)尾静脉注射移植对博来霉素(bleomycin, BLM)诱导的大鼠急性肺损伤(ALI)的可能作用。**方法:**取正常足月剖宫产健康婴儿脐带分离 HUMSCs, 流式细胞术鉴定细胞表面抗原;三质粒共转染法在 293T 细胞中制备病毒颗粒 Lenti-ACE2, 并转染 HUMSCs。大鼠随机分为正常对照组、BLM 组、ACE2 组、HUMSCs 组、HUMSCs-ACE2 组($n=24$)。后 4 组大鼠采用一次性气管内滴注 BLM(5 mg/kg)建立肺损伤大鼠模型, 收集各组大鼠损伤前和滴注 BLM 后第 3、7、14 天肺泡灌洗液(BALF)及肺组织进行相关指标检测。计数法测定 BALF 中性粒细胞数量; BCA 法测定 BALF 总蛋白含量; 化学法测定髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性; H-E 染色法观察肺组织病理学形态; RT-PCR 测定肺组织中 INF- γ 、IL-4 mRNA 表达的变化; ELISA 法测定肺组织 TNF- α 含量; Western 印迹法测定肺组织 ACE2 蛋白表达。**结果:** HUMSCs 组、ACE2 组及 HUMSCs-ACE2 组大鼠 BALF 中性粒细胞计数在第 3、7、14 天较同期 BLM 组呈现下降趋势, 其中以 HUMSCs-ACE2 组降低量最明显, 差异有统计学意义($P<0.05$)。与同期 BLM 组相比, HUMSCs 组、ACE2 组及 HUMSCs-ACE2 组 BALF 总蛋白量降低, 以 HUMSCs-ACE2 组降低量最明显, 差异有统计学意义($P<0.05$)。肺损伤严重程度病理评分结果显示: 与 BLM 相比, ACE2、HUMSCs、HUMSCs-ACE2 组大鼠肺组织损伤得到不同程度的改善, 尤以 HUMSCs-ACE2 组表现最佳, 在损伤后第 3、7、14 天差异有统计学意义($P<0.05$)。与同期 BLM 组相比, HUMSCs-ACE2 组总蛋白中 ACE2 表达增量最明显, 第 14 天达高峰, 接近 BLM 刺激前水平, 差异有统计学意义($P<0.05$)。与同期 BLM 组相比, HUMSCs 组、ACE2 组及 HUMSCs-ACE2 组 MPO 活性降低, 以 HUMSCs-ACE2 组降低量最明显($P<0.05$)。与同期 BLM 组相比, HUMSCs 组、ACE2 组及 HUMSCs-ACE2 组 INF- γ mRNA 水平降低, 以 HUMSCs-ACE2 组降低量最明显($P<0.05$)。与同期 BLM 组相比, HUMSCs 组、ACE2 组及 HUMSCs-ACE2 组 IL-4 mRNA 表达升高, 以 HUMSCs-ACE2 组升高最明显($P<0.05$)。免疫荧光染色表明外源性 HUMSCs 携带 ACE2/eGFP 基因, 经静脉输入体内后第 14 天可见肺组织受损处出现 GFP 阳性表达细胞。**结论:**携带 ACE2 的 HUMSCs 尾静脉注射移植能有效降低 ALI 大鼠肺部中性粒细胞浸润和总蛋白渗出, 改善血管通透程度, 降低肺组织中促炎因子水平, 提升抗炎因子 IL-4 及 ACE2 的表达, 从而减轻 ALI 大鼠病理损伤程度。

[关键词] 血管紧张素转换酶 2; 人脐带间充质干细胞; 博来霉素; 急性肺损伤**[中图分类号]** R-332 **[文献标志码]** A

Intravenous human umbilical mesenchymal stem cells carrying angiotensin converting enzyme 2 gene in alleviating acute lung injury induced by bleomycin in rats

GAO Feng-ying¹, JIN Wen-qiang¹, WANG Xing-hai¹, LIU Zhen-wei^{2*}

1. Department of Respiratory Medicine, Shanghai Jiangong Hospital, Shanghai 200083, China

2. Department of Respiratory Medicine, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells (HUMSCs) carrying angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) gene in treatment of acute lung injury (ALI) induced by bleomycin in rats. **Methods:** HUMSCs were isolated from the umbilical cord of normal mature infants delivered by caesarean section, and flow cytometry was used to identify the cell surface antigen. The virus granules Lenti-ACE2 were prepared by three-plasmid co-transfection method in 293T cells, and then were transfected into HUMSCs. The rats were randomly divided into normal

[收稿日期] 2017-11-19 **[接受日期]** 2018-03-22**[基金项目]** 上海市卫生和计划生育委员会科研课题(201740236). Supported by Research Projects of Shanghai Municipal Health and Family Planning Commission (201740236).**[作者简介]** 高凤英, 硕士, 主治医师. E-mail: 13816223978@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-63240090-3141, E-mail: zhenweiliu69@163.com

control group, BLM group, ACE2 group, HUMSCs group, and HUMSCs-ACE2 group ($n=24$). The rats were dripped by BLM (5 mg/kg) in endotracheal to establish ALI rat model except normal control group. The broncho-alveolar lavage fluid (BALF) and lung tissue were collected to detect the related indicators before and 3, 7, 14 days after BLM dripping. The number of neutrophils and total protein content in alveolar lavage were determined by counting method and BCA method, respectively. The histopathological morphology of lung was observed by H-E staining, the activity of myeloperoxidase (MPO), the levels of INF- γ and IL-4 mRNA, the level of TNF- α and the expression of ACE2 protein in lung tissue were respectively determined by chemical method, RT-PCR, ELISA method and Western blotting. **Results:** The neutrophil count and total protein content in BALF in HUMSCs group, ACE2 group and HUMSCs-ACE2 group showed a trend of decline compared with that in BLM group at 3, 7, 14 days time points, especially in HUMSCs-ACE2 group ($P<0.05$). Pathological grading of lung injury severity showed that the lung tissue injury was significantly improved in ACE2, HUMSCs, HUMSCs-ACE2 group rats compared with BLM group, especially in HUMSCs-ACE2 group ($P<0.05$) 3, 7, and 14 days after injury. Compared with BLM group at the same time points, the expression of ACE2 in HUMSCs-ACE2 group had the most obvious increment, reaching the peak at the 14th day ($P<0.05$). Compared with BLM group at the same time points, the MPO activity and INF- γ mRNA were decreased, the IL-4 mRNA was increased in HUMSCs, ACE2, and HUMSCs-ACE2 group, especially in HUMSCs-ACE2 group (all $P<0.05$). Immunofluorescence staining indicated that the exogenous HUMSCs carried ACE2/eGFP gene, and there were many GFP cells in the damaged lung tissue at the 14th day after intravenous transfusion of HUMSCs. **Conclusions:** Transplantation of HUMSCs carrying ACE2 gene can effectively reduce the neutrophil infiltration and total protein leakage, improve the vascular permeability, decrease the levels of proinflammatory factors, increase the levels of anti-inflammatory factors such as IL-4 and ACE2 in lung tissue in ALI rats, thus alleviates pathological injury of the lung.

[Key Words] angiotensin-converting enzyme 2; human umbilical mesenchymal stem cell; bleomycin; acute lung injury

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是由心源性以外的各种直接或间接因素所引起的以急性弥漫性肺炎性病变为特征的肺部急性炎症反应,是临床常见的危重疾病,可进一步发展为急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)^[1-2]。ALI发病机制复杂,发病率高,且尚无有效的治疗措施,其病死率高达40%以上。因此,寻找新的有效治疗方法是目前ALI临床诊治的难题。

血管紧张素转换酶2(angiotensin converting enzyme 2, ACE2)与ACE类似,是肾素-血管紧张素系统(rennin angiotensin system, RAS)的重要组成部分^[3],在ALI/ARDS疾病过程中发挥重要的保护作用^[4-5]。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有干细胞自我复制和多向分化潜能,逐渐被应用于肺损伤的临床诊治。MSCs体内移植能够抑制急性肺损伤模型动物的炎症反应,触发修复相关的生长因子,减轻肺组织炎症反应^[6-7]。但目前MSCs主要来源于骨髓,获取途径有限,获取过程有创,大大制约其临床应用。人脐带间充质干细胞(human umbilical mesenchymal stem cells, HUMSCs)是MSCs的一种,可从废弃胎盘组织中分离提取,来源广泛,较骨髓来源MSCs具有更低的

免疫原性,更易体外扩增,且无伦理学制约,逐渐成为组织工程和再生医学中最具发展前景的种子细胞^[8-9]。

因此,本研究基于HUMSCs的特性和ACE2对肺损伤的保护作用,采用转染法构建携带ACE2基因的HUMSCs,并将其移植入急性肺损伤模型大鼠体内,观察其对博来霉素(bleomycin, BLM)诱导的急性肺损伤大鼠肺组织的影响,探讨携带ACE2基因的HUMSCs尾静脉注射移植对急性肺损伤的作用及可能机制,为后续研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 主要试剂:BLM(美国Sigma公司),DMEM/F12培养基、胎牛血清(美国Gibco公司);PE anti-mouse CD45、CD105, FITC anti-mouse CD29、CD34、CD44(美国eBioscience公司),BCA蛋白浓度测定试剂盒、ACE2抗体(美国Cell Signal公司),髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),INF- γ 、IL-4基因引物[生工生物工程(上海)股份有限公司],TNF- α ELISA检测试剂盒(美国R&D公司)。主要仪器:流式细胞仪(FACSCalibur,美国BD Biosciences公司),PCR仪、电泳仪和电源(美国

Bio-Rad 公司)。

1.2 HUMSCs 的分离培养及鉴定 无菌条件下取正常足月剖宫产健康婴儿脐带,剪成约 1 mm^2 的组织块,将其接种于细胞培养板,加入含双抗及 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基,置于 37°C 、5% CO_2 饱和湿度的培养箱内培养,待细胞生长至约 80% 融合时,用含胰蛋白酶的消化液消化,按 $10^4/\text{cm}^2$ 的密度传代至细胞培养瓶中进行培养。细胞表面标志鉴定:取对数生长期第 4 代细胞,分别加入 PE anti-mouse CD86、CD45、CD105 及 FITC anti-mouse CD29、CD34、CD44 标记 HUMSCs。采用流式细胞仪检测 HUMSCs 表型。

1.3 ACE2 基因转染 HUMSCs 采用 TRIzol 试剂从人肺组织提取总 RNA,反转录获得人 ACE2 基因的 cDNA 片段。构建慢病毒基因转移载体,然后与包装载体共转染 293T 细胞,扩增病毒。再转染绿色荧光蛋白(GFP)基因在 HUMSCs 内作为追踪 HUMSCs 的基因。收集病毒后转染 HUMSCs,倒置荧光显微镜下观察 GFP 荧光阳性率来检测转染效率。转染效率 = 发出绿色荧光的细胞数/可见光下总细胞数 $\times 100\%$,并测定转染了 ACE2 基因 HUMSCs 的表型。

1.4 大鼠分组及急性肺损伤模型的建立 清洁级雄性 SD 大鼠 120 只,体质量(250 ± 20) g,由中国科学院实验动物中心提供。大鼠随机均分为 5 组:正常对照组、BLM 组、ACE2 组、HUMSCs 组、HUMSCs-ACE2 组($n=24$)。除正常对照组外,其余 4 组采用一次性气管内滴注 BLM(5 mg/kg)制造肺损伤大鼠模型,正常对照组滴注等体积生理盐水($0.9\%\text{NaCl}$)。各组大鼠分别给予如下处理,BLM 组:建立肺损伤大鼠模型后注入生理盐水 2 mL ; ACE2 组:建立肺损伤大鼠模型后尾静脉注入由慢病毒携带 ACE2 基因 2 mL ; HUMSCs 组:建立肺损伤大鼠模型后单纯注入 HUMSCs 2 mL ,细胞数 1×10^6 ; HUMSCs-ACE2 组:建立肺损伤大鼠模型后注入携带 ACE2 基因的 HUMSCs 2 mL ,细胞数 1×10^6 ; 正常对照组:正常大鼠输注等体积的生理盐水 2 mL 。于肺损伤前及肺损伤后第 3 天、第 7 天和第 14 天取相应标本进行检测。生存分析:每组 12 只大鼠单独用于记录生存状况,记录每只大鼠的生存天数,观察 14 d 研究周期内大鼠的生存状况,计算生存率并绘制生存曲线。

1.5 观察指标及测定方法

1.5.1 肺泡灌洗液(broncho-alveolar lavage fluid, BALF)中性粒细胞、总蛋白含量测定 采用 10% 水合氯醛麻醉大鼠,取预冷生理盐水灌洗支气管肺泡,收集 BALF,离心后取上清液根据 BCA 试剂盒说明书测定总蛋白含量,取沉淀部分经 1 mL PBS 重悬,常规瑞氏染色后,显微镜下人工计数中性粒细胞数量。

1.5.2 肺组织形态学观察及肺损伤严重程度评分 制备肺组织石蜡切片,脱蜡,苏木精染色,光镜下观察病变区及附近肺组织病理变化,重点对肺充血及肺出血情况、肺泡内渗出、肺泡及血管壁的中性粒细胞浸润、肺泡壁增厚程度及肺透明膜的形成等 4 种情况进行评估及对肺损伤严重程度评分。共分为 5 个等级:0 分为没有损伤,1 分为轻微损伤,2 分为中度损伤,3 分为重度损伤,4 分为极重度损伤。最终将各个评分进行汇总,总分即代表肺损伤程度。

1.5.3 Western 印迹法测定肺组织 ACE2 蛋白表达 取肺组织匀浆,离心,取上清,进行蛋白定量和免疫印迹检查。各实验组取等量蛋白 $20\text{ }\mu\text{g}$ 进行电泳分析。采用 12% SDS-PAGE 电泳分离蛋白,将分离的蛋白条带通过湿法转至 PVDF 膜上,室温下封闭,然后与抗 ACE2 抗体孵育过夜,洗脱一抗,加二抗($1:1\ 000$)孵育,洗去二抗,经过化学发光法显色后显影、定影。

1.5.4 肺组织 MPO 活性测定 准确称取肺组织质量,根据 MPO 检测试剂盒使用说明书检测 MPO 活性,根据以下公式计算 MPO 活性:
$$\text{MPO 活性} = \frac{\text{测定管光密度} - \text{空白管光密度}}{11.3 \times \text{样品质量}(\text{g})}$$

1.5.5 肺组织水含量测定 新鲜肺组织取下后称湿重,然后置烤箱烤至恒重,称干质量,计算两次肺组织质量之比,即肺组织的湿干比(W/D)以反映肺水肿程度。

1.5.6 RT-PCR 测定肺组织中 INF- γ 、IL-4 mRNA 变化 取肺组织匀浆,加入 TRIzol 试剂冰上提取总 RNA,然后根据反转录试剂盒说明书合成 cDNA。IL-4 引物序列,正向: $5'$ - CTG ACG GCA CAG AGC TAT TGA $-3'$,反向: $5'$ - TAT GCG AAG CAC CTT GGA AGC $-3'$ 。INF- γ 引物序列,正向: $5'$ - GCA TCT TGG CTT TGC AGC T $-3'$,反向: $5'$ - CCT TTT TCG CCT TGC TGT TG $-3'$ 。 β -

actin 引物序列,正向:5'-AGC TGC GTT TTA CAC CCT TT -3',反向:5'-AAG CCA TGC CAA TGT TGT CT -3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法来分析数据。其中, $\Delta Ct=Ct(\text{目的基因})-Ct(\text{内参基因})$, $\Delta\Delta Ct=\Delta Ct(\text{样品})-\Delta Ct(\text{对照})$ 。

1.5.7 ELISA 法测定肺组织中细胞因子 TNF- α 的含量 取肺组织用生理盐水冰上匀浆,离心后取上清液,按照 ELISA 检测试剂盒说明书操作检测 TNF- α 含量。

1.5.8 肺组织中外源性 HUMSCs 的检测 肺组织冷冻切片采用荧光显微镜观察外源性 HUMSCs 携带的 GFP 在特定波长光激发下所发出的绿色荧光,了解外源性 HUMSCs 存留肺内的转化效率。取肺组织样本进行免疫组化染色,检测肺组织中 GFP 的表达,同时在连续切片上检测肺泡上皮细胞特异性蛋白 cytokeratin,定位外源性 HUMSCs 在体内修复肺组织的情况。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析,多样本间两两比较采用 One-way ANOVA 中的 Bonferroni 检验,各项实验重复 3 次,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 HUMSCs 的形态学观察及 ACE2 基因的转染效果 无菌分离的 HUMSCs 在 CO₂ 培养箱中常规培养 1~2 d 后,显微镜下见部分梭形贴壁细胞,7 d 后形成形态相对一致、呈集落状态生长的长梭形细胞,14 d 后形成 80% 融合的单层贴壁细胞层。倒置显微镜观察结果(图 1)显示:HUMSCs 转染病毒后 24 h 开始检测到绿色荧光,荧光强度随时间不断增强,于第 5 天达到高峰。当感染复数(multiplicity of infection, MOI)=10 时,GFP 荧光检测阳性细胞百分比 >95%,且细胞感染后可见细胞未出现病变,细胞活力及生长状态良好;MOI 大于 10 时,细胞死亡率明显增加,当 MOI=80 时,细胞大量死亡,故确定后续转染最佳 MOI 值为 10。

流式细胞仪检测结果显示:转染前 HUMSCs 细胞表型 CD29、CD44、CD105 均呈阳性表达,而 CD34、CD45、CD86 呈阴性表达,提示所获得的细胞符合 HUMSCs 特性;转染 ACE2 基因后第 5 天其表型并未发生显著变化,提示转染本身及 ACE2 表达并未导致 HUMSCs 相关表型的变化。

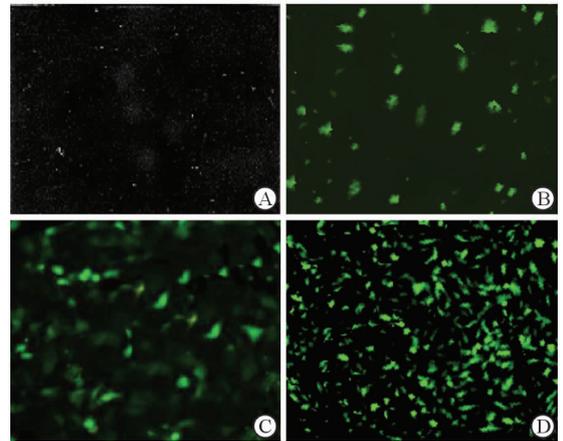


图 1 倒置荧光显微镜观察 HUMSCs 细胞 ACE2 基因转染效果 A:转染前;B 转染后第 1 天;C:转染后第 3 天;D:转染后第 5 天。Original magnification: $\times 200$

2.2 大鼠生存状态分析 Kaplan-Meier 生存曲线(图 2)表明:实验开始后 3~7 d 内大鼠死亡率较高,其他时间段较低。进一步采用 Log Rank (Mantel-cox) 法比较各干预组与 BLM 组大鼠的生存率,结果显示:HUMSCs-ACE2 组大鼠生存率优于 BLM 组,差异有统计学意义($P=0.037$);ACE2 组、HUMSCs 组大鼠生存率与 BLM 组相比,差异无统计学意义($P=0.167, 0.087$)。结果提示 HUMSCs-ACE2 干预能够减轻肺损伤导致的大鼠死亡($P<0.05$)。

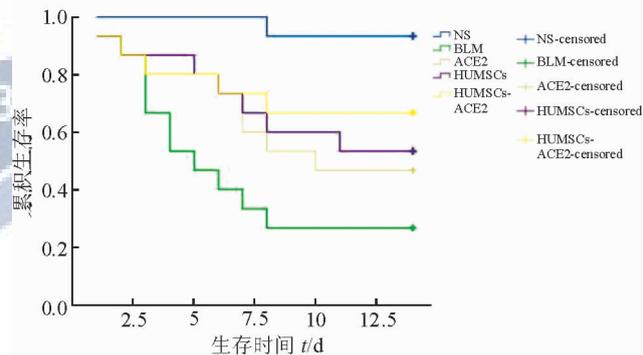


图 2 各组大鼠 Kaplan-Meier 生存曲线

2.3 BALF 中性粒细胞计数及总蛋白含量的变化 结果(图 3A)表明:与 NS 对照组相比,经 BLM 刺激后的各实验组大鼠 BALF 中性粒细胞计数明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。HUMSCs 组、ACE2 组及 HUMSCs-ACE2 组大鼠 BALF 中性粒细胞计数在第 3、7、14 天较同期 BLM 组呈现下降趋势,其中以 HUMSCs-ACE2 组降低量最明显,差异有统计学意义($P<0.05$)。

结果(图 3B)表明:经 BLM 刺激后,各实验组大鼠 BALF 总蛋白量升高,其中以第 3 天的 BALF 总

蛋白量表达最高;与同期 BLM 组相比, HUMSCs 组、ACE2 组及 HUMSCs-ACE2 组 BALF 总蛋白量降低,以 HUMSCs-ACE2 组降低量最明显,第 3、7、14 天较同期 BLM 对照组呈现时间依赖性下降趋势,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 肺组织形态学观察及肺损伤严重程度病理评分 H-E染色结果(图 4)表明:肺组织损伤在第 3~7 天最为严重,出现肺水肿,并有较多炎性细胞浸润,肺纤维化严重,与动物死亡数的时间分布相符;随后损伤有减轻趋势,肺泡炎症好转,少量淋巴细胞浸润,成纤维细胞少量增生。其中,第 7 天的 H-E

染色结果如下:NS 对照组大鼠肺组织结构正常,肺泡结构完整光滑,无炎性细胞浸润(图 4A);BLM 组肺组织水肿,少量出血,光镜下可见大量中性细胞浸润,肺泡间隔增厚,肺泡壁破坏(图 4B);HUMSCs-ACE2 组炎性细胞浸润明显减少,肺损伤程度较 BLM 组显著减轻(图 4E)。

肺损伤严重度病理评分结果(表 1)显示:与 BLM 相比,ACE2、HUMSCs、HUMSCs-ACE2 组大鼠肺组织损伤得到不同程度的改善,尤以 HUMSCs-ACE2 组表现最佳,在损伤后第 3、7、14 天差异有统计学意义($P < 0.05$)。

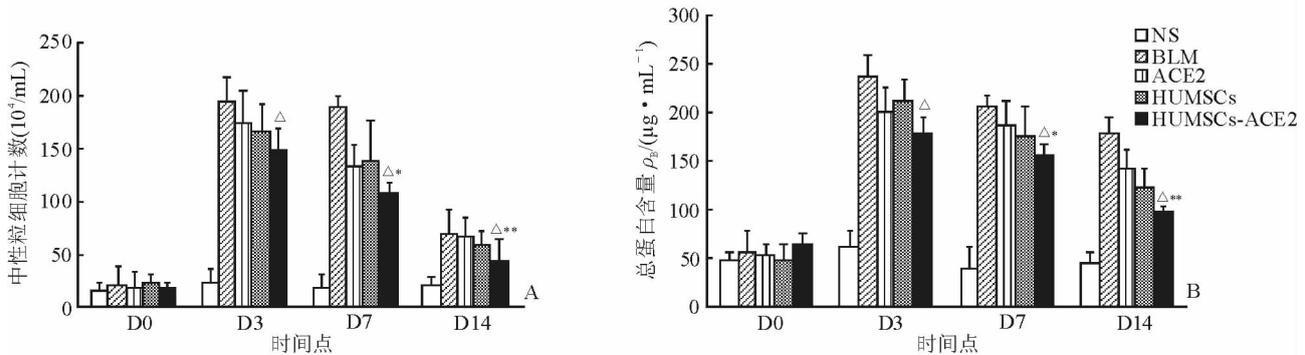


图 3 各组大鼠 BALF 中性粒细胞计数(A)及总蛋白含量(B)的变化

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 与 HUMSCs-ACE2 组 D3 相比; $\triangle P < 0.05$ 与同期 NS 对照组相比; $\blacktriangle P < 0.05$ 与同期 BLM 组相比, $n = 12$, $\bar{x} \pm s$

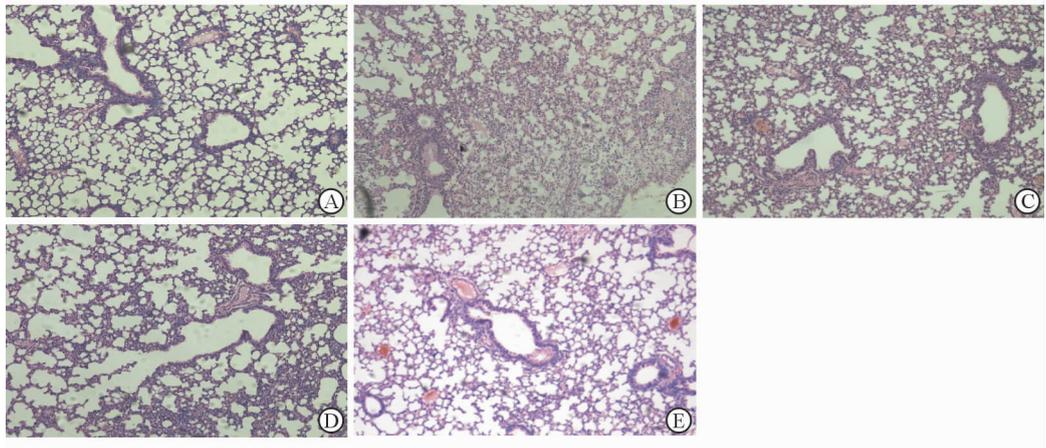


图 4 损伤后第 7 天大鼠肺组织 H-E 染色结果

A: NS 对照组; B: BLM 组; C: ACE2 组; D: HUMSCs 组; E: HUMSCs-ACE2 组. Original magnification: $\times 200$

表 1 病程中各组大鼠肺组织损伤严重度评分的比较

组别	时间点			
	D0	D3	D7	D14
BLM 组	5.54 ± 1.24	17.85 ± 2.82	14.66 ± 1.23	10.85 ± 2.23
ACE2 组	4.58 ± 1.88	14.85 ± 3.48	12.56 ± 2.45	7.37 ± 3.21
HUMSCs 组	6.97 ± 2.01	15.98 ± 3.27	12.50 ± 2.81	8.09 ± 2.84
HUMSCs-ACE2 组	4.85 ± 1.87	13.88 ± 1.21*	11.24 ± 2.46*	7.83 ± 1.56*
NS 对照组	4.12 ± 1.47	6.01 ± 2.33	5.06 ± 3.29	4.34 ± 2.22

* $P < 0.05$ 与同期 BLM 组相比; $n = 12$, $\bar{x} \pm s$

2.5 Western 印迹法测定肺组织 ACE2 蛋白表达 结果(图 5)表明:各时间点 NS 对照组大鼠肺组织 ACE2 蛋白表达差别无统计学意义;与 NS 对照组相比,经 BLM 刺激后,BLM 组 ACE2 蛋白表达下降最显著,ACE2 组、HUMSCs 组及 HUMSCs-ACE2 组 ACE2 蛋白受 BLM 诱导肺损伤后呈下降趋势,但在第 3 天开始回升,HUMSCs-ACE2 组总蛋白中 ACE2 表达增量最明显,在第 14 天达到高峰,接近 BLM 刺激前水平,与同期 BLM 组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.6 肺组织 MPO 活力及肺水肿程度的测定 结果(图 6A)表明:经 BLM 刺激后,各实验组大鼠肺组织 MPO 活力显著升高,在第 3 天达到高峰,随后在第 7 天、第 14 天开始回落,与 NS 对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。HUMSCs 组、ACE2 组及 HUMSCs-ACE2 组与同期 BLM 组相比,MPO

活性降低,以 HUMSCs-ACE2 组降低量明显,第 3、7、14 天较同期 BLM 组呈现时间依赖性下降趋势,差异有统计学意义($P < 0.05$)。其中,在第 3 天,HUMSCs-ACE2 组 MPO 活性低于 HUMSCs 组,但差异无统计学意义。在第 7、14 天,HUMSCs-ACE2 组 MPO 活性较 ACE2 组、HUMSCs 组均明显降低,提示 ACE2 转染 HUMSCs 能有效降低肺组织中 MPO 活性。

结果(图 6B)表明:肺湿干比在 BLM 造模后较 NS 对照组显著上升,HUMSCs-ACE2 组在第 3 天达高峰后开始下降,ACE2 组、HUMSCs 组则在第 7 天达高峰($P < 0.05$)。HUMSCs 组、ACE2 组及 HUMSCs-ACE2 组与同期 BLM 组相比,肺湿干比均有所降低,以 HUMSCs-ACE2 组降低最明显,提示 ACE2 转染的 HUMSCs 能协同降低肺水肿程度。

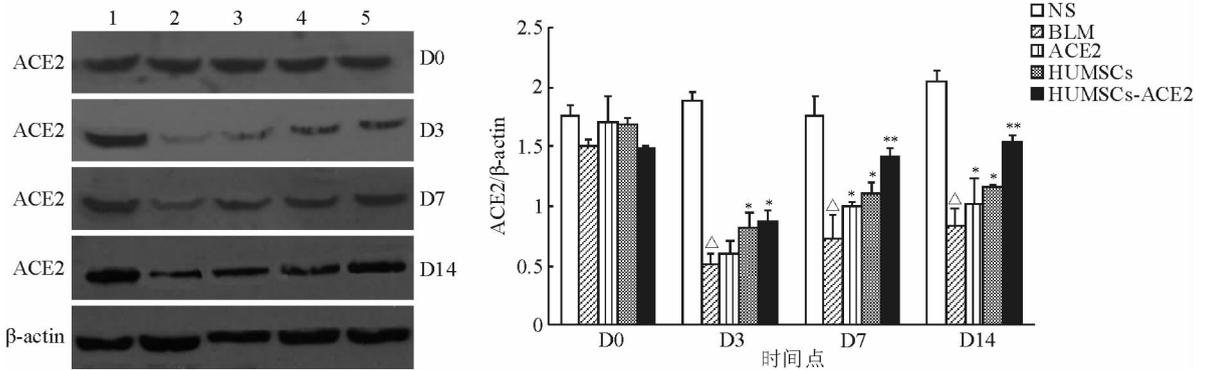


图 5 各组大鼠肺组织 ACE2 蛋白的表达变化

1: NS 对照组;2: BLM 组;3: ACE2 组;4: HUMSCs 组;5: HUMSCs-ACE2 组。△ $P < 0.01$ 与 NS 对照组相比; ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 与 BLM 组相比。 $n = 12, \bar{x} \pm s$

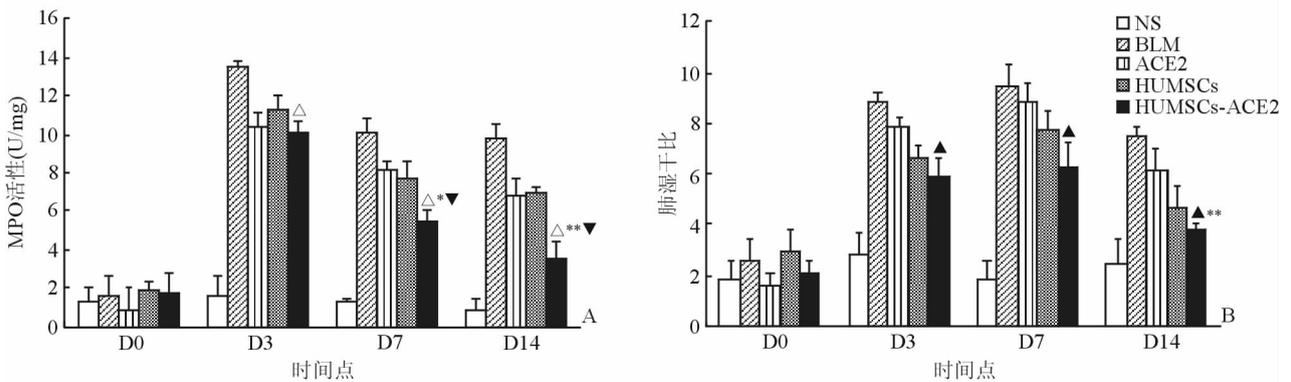


图 6 各组大鼠肺组织 MPO 活性(A)及肺水肿程度(B)的变化

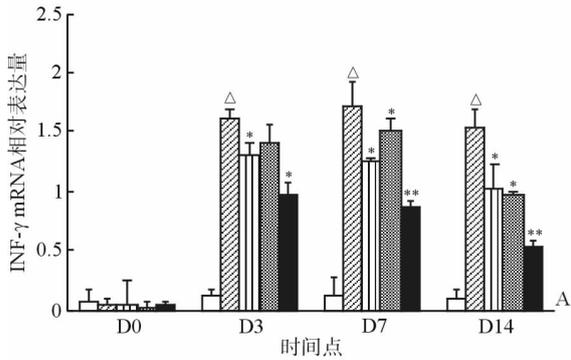
△ $P < 0.05$ 与同期 NS 对照组相比; ▲ $P < 0.05$ 与同期 BLM 组相比; ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 与 HUMSCs-ACE2 组 D3 相比; ▼ $P < 0.05$ 与同期 ACE2 组、HUMSCs 组相比。 $n = 12, \bar{x} \pm s$

2.7 RT-PCR 测定肺组织中 INF- γ 、IL-4 mRNA 的表达变化 结果(图 7A)表明:BLM 组和 HUMSCs 组 INF- γ mRNA 表达量一直维持在较高

水平,第 7 天达高峰,随后随时间推移开始下降,ACE2 组及 HUMSCs-ACE2 组 INF- γ mRNA 表达在第 3 天达高峰,随后在第 7、14 天开始下降。

HUMSCs组、ACE2组及 HUMSCs-ACE2组与同期 BLM组相比 $\text{INF-}\gamma$ mRNA水平降低,以 HUMSCs-ACE2组降低量最明显,第3、7、14天较同期 BLM组呈现时间依赖性下降趋势,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

结果(图7B)表明:经 BLM刺激后,各实验组大鼠肺组织 IL-4 mRNA表达显著下降,在第3天达



到最低量,随后在第7、14天开始上升,与 NS对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。HUMSCs组、ACE2组及 HUMSCs-ACE2组与同期 BLM组相比,IL-4 mRNA表达升高,以 HUMSCs-ACE2组升高量最明显,第3、7、14天较同期 BLM对照组呈现时间依赖性上升趋势,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

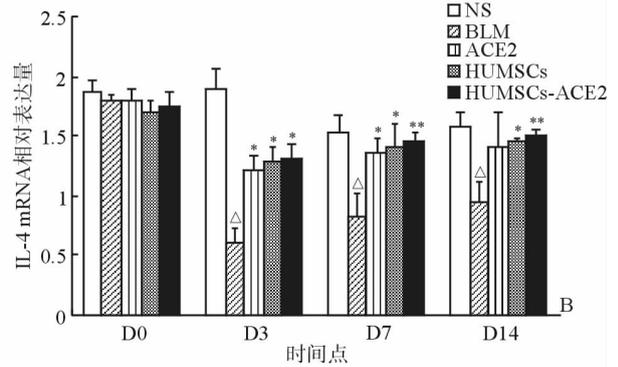


图7 各组大鼠肺组织 $\text{INF-}\gamma$ (A)、IL-4 mRNA(B)的表达变化

$\Delta P < 0.05$ 与 NS 对照组相比; $** P < 0.01$, $* P < 0.05$ 与 BLM 组相比. $n = 12$, $\bar{x} \pm s$

2.8 ELISA法测定肺组织中 $\text{TNF-}\alpha$ 的含量 结果(图8)表明:BLM组大鼠肺组织 $\text{TNF-}\alpha$ 含量一直维持在较高水平,在第3天达到高峰,在第7、14天随时间推移开始下降。HUMSCs组、ACE2组及 HUMSCs-ACE2组与同期 BLM组相比, $\text{TNF-}\alpha$ 表达下降,以 HUMSCs-ACE2组降低量最明显,第3、7、14天较同期 BLM组呈现时间依赖性下降趋势,差异有统计学意义($P < 0.05$)。第3天 HUMSCs-ACE2组 $\text{TNF-}\alpha$ 表达高于 HUMSCs组,但在第7、14天, HUMSCs-ACE2组 $\text{TNF-}\alpha$ 表达较 ACE2组、HUMSCs组均明显降低,并呈现时间依赖性,提示 ACE2 转染 HUMSCs 能有效降低肺组织 $\text{TNF-}\alpha$ 的表达。

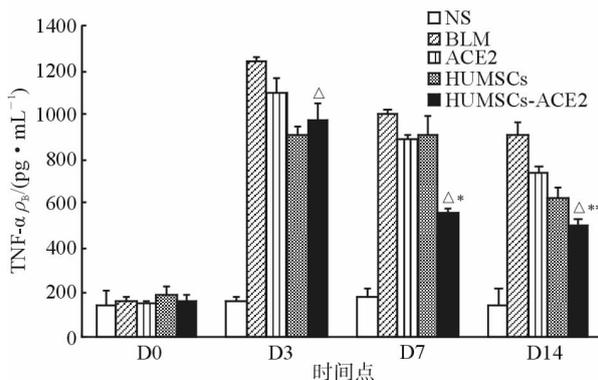


图8 各组大鼠肺组织 $\text{TNF-}\alpha$ 的表达变化

$\Delta P < 0.05$ 与同期 NS 对照组相比; $** P < 0.01$, $* P < 0.05$ 与 HUMSCs-ACE2 组 D3 相比. $n = 12$, $\bar{x} \pm s$

2.9 肺组织外源性 HUMSCs 的检测 结果(图9)显示:外源性 HUMSCs 携带 ACE2/eGFP 基因,经尾静脉输入体内后,在第14天可见肺组织受损处多处表达 GFP 阳性细胞。特异性蛋白 cytokeratin 检测结果发现,该类细胞为肺泡上皮细胞,提示携带 ACE2 基因的 HUMSCs 在肺部有转化修复的能力。

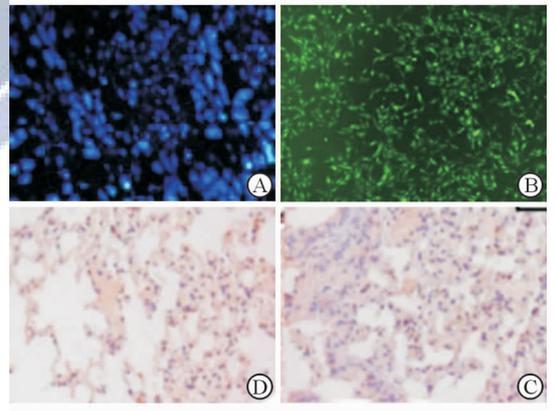


图9 肺组织外源性 HUMSCs 的检测

A: DAPI 染色; B: 直接镜检; C: 肺泡上皮细胞 GFP 免疫组化染色; D: 免疫组化染色阴性对照. Original magnification: $\times 400$

3 讨论

本研究采用一次性气管内滴注 BLM 制造肺损伤动物模型,模拟 ALI 的病理生理过程,通过肺组织病理学及相关炎症指标的检测显示,肺组织中出现炎性渗出、水肿,肺血管膜受损和通透性增加,符

合 ALI 的模型要求。HUMSCs 是从废弃的胎盘中分离提取,易得且来源丰富、不涉及伦理学争议^[10]。ACE2 基因对 Ang II 有极高的催化效率,具有扩张血管、参与炎症反应调控的作用^[11-13]。ACE2 基因缺失能加剧 BLM 诱导的肺损伤,而重组 ACE2 蛋白对急性肺损伤小鼠有保护作用^[14]

本研究采用流式细胞仪对 ACE2 转染前后 HUMSCs 进行表面标志检测,结果显示 HUMSCs 转染 ACE2 基因后其表型并未发生显著变化,提示转染本身及 ACE2 并未影响 HUMSCs 相关表型的变化。目前尚无携带 ACE2 基因的 HUMSCs 对急性肺损伤的作用研究。因此,本研究拟探讨携带 ACE2 基因的 HUMSCs 对急性肺损伤的作用,并为进一步研究其在肺损伤中的作用机制及对肺损伤的临床治疗提供理论依据。

本研究采用三质粒共转染法在 293T 细胞中制备 $10^9 \sim 10^{10}$ 级病毒颗粒 Lenti-ACE2,并转染 HUMSCs,ACE2 基因进入 HUMSCs 内形成稳定表达,然后将 HUMSCs-ACE2 经尾静脉输入大鼠体内,同时设置 GFP 作为示踪蛋白,追踪 HUMSCs 在体内的变化。结果显示携带 ACE2/GFP 基因的 HUMSCs 在肺组织受损处多处出现表达 GFP 的肺泡上皮细胞,提示携带 ACE2 基因的 HUMSCs 在肺部有转化修复的能力。

病理学研究和肺组织损伤严重程度总体评分发现,肺组织损伤在第 3 天和第 7 天最为严重,与动物死亡数时间分布相符,随后损伤有减轻趋势。经 ACE2、HUMSCs 和携带 ACE2 基因的 HUMSCs 这 3 种不同方法干预后,肺组织病理学和肺组织损伤得到进一步不同程度的改善,尤其以 HUMSCs-ACE2 组表现为佳,提示携带 ACE2 的 HUMSCs 在改善实验大鼠整个病程的肺损伤上存在优势。

通过对肺组织 MPO 活性和 BALF 中性粒细胞数目的检测,结果显示第 3 天各组 MPO 活性和 BALF 中性粒细胞数目达到高峰,其中 HUMSCs-ACE2 组大鼠 MPO 活性和 BALF 中性粒细胞数目与 HUMSCs、ACE2 组相比,在第 3 天后开始迅速下降,表现出改善迹象,提示携带 ACE2 基因的 HUMSCs 对于治疗肺损伤较 HUMSCs 或 ACE2 单独治疗有优势。

细胞因子的改变是肺损伤病程中的一个重要体现。细胞因子按炎症反应可分为促炎因子和抗炎因子,其中促炎因子主要有 $\text{INF-}\gamma$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-1 、

TL-6 等,抗炎因子主要有 IL-4 、 TL-10 等。本研究选取促炎因子 $\text{INF-}\gamma$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 及抗炎因子 IL-4 作为研究对象,通过 ELISA 和 RT-PCR 检测其表达水平。结果表明,经 BLM 刺激后,各组促炎因子 $\text{INF-}\gamma$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 表达量增加,在第 3 天达到高峰,抗炎因子 IL-4 表达量下降,在第 3 天达到最低值,随后的第 7、14 天促炎因子 $\text{INF-}\gamma$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 表达量随时间降低,抗炎因子 IL-4 mRNA 水平随时间上升,均以 HUMSCs-ACE2 组表达量改变最明显,提示 HUMSCs-ACE2 细胞移植治疗对抑制促炎因子 $\text{INF-}\gamma$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 的表达,提高抗炎因子 IL-4 的表达较单纯 ACE2、HUMSCs 效果更佳。

综上所述,携带 ACE2 基因的 HUMSCs 尾静脉注射移植能有效降低 ALI 大鼠肺部炎症渗出和血管通透性,降低肺组织中促炎因子基因水平,并能提高抗炎因子 IL-4 及 ACE2 的表达,从而减轻 ALI 大鼠病理损伤程度,提示 HUMSCs-ACE2 具有修复肺损伤的功能,且治疗效果优于单纯的 HUMSCs 或 ACE2 治疗,其具体的作用机制仍有待进一步的研究证实。

参考文献

- [1] DODOO-SCHITTKO F, BRANDSTETTER S, BRANDL M, et al. German-wide prospective DACAPO cohort of survivors of the acute respiratory distress syndrome (ARDS): a cohort profile [J]. *BMJ Open*, 2018, 8 (4):e019342.
- [2] GALVIN I M, STEEL A, PINTO R, et al. Partial liquid ventilation for preventing death and morbidity in adults with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013, (7):CD003707.
- [3] GEMBARDT F, STERNER-KOCK A, IMBODEN H, et al. Organ-specific distribution of ACE2 mRNA and correlating peptidase activity in rodents [J]. *Peptides*, 2005, 26 (7): 1270-1277.
- [4] LI W, MOORE M J, VASILIEVA N, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus[J]. *Nature*, 2003, 426(6965):450-454.
- [5] IMAI Y, KUBA K, RAO S, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure[J]. *Nature*, 2005, 436(7047):112-116.
- [6] KRAUSE D S, THEISE N D, COLLECTOR M I, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell[J]. *Cell*, 2001, 105(3):369-377.
- [7] ORTIZ L A, GAMBELLI F, MCBRIDE C, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in

- response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(14): 8407-8411.
- [8] ROJAS M, XU J, WOODS C R, 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.
- [9] KOTTON D N, MA B Y, CARDOSO W V, et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium[J]. *Development*, 2001, 128(24):5181-5188.
- [10] MUELLER S M, GLOWACKI J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges[J]. *J Cell Biochem*, 2001, 82(4):583-590.
- [11] ZHONG J C, YU X Y, LIN Q X, et al. Enhanced angiotensin converting enzyme 2 regulates the insulin/Akt signalling pathway by blockade of macrophage migration inhibitory factor expression[J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 153(1):66-74.
- [12] ZHONG J C, YU X Y, HUANG Y, et al. Apelin modulates aortic vascular tone via endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway in diabetic mice[J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 74(3):388-395.
- [13] OUDIT G Y, KASSIRI Z, PATEL M P, et al. Angiotensin II-mediated oxidative stress and inflammation mediate the age-dependent cardiomyopathy in ACE2 null mice [J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 75(1):29-39.
- [14] REY-PARRA G J, VADIVEL A, COLTAN L, et al. Angiotensin converting enzyme 2 abrogates bleomycin-induced lung injury[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2012, 90(6):637-647.

[本文编辑] 廖晓瑜, 贾泽军

