基础研究 文章编号:0253-3626(2010)06-0869-04

ATRA 诱导下 MSCs 在损伤肺组织的招募及对 MMP-9 mRNA 的影响

杨 威,温剑虎

(重庆医科大学附属第一医院心胸外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:对全反式维甲酸(All-trans retinoic acid,ATRA)诱导骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cells,MSCs)在损伤肺组织的招募情况同组织中基质金属蛋白酶 9 信使核糖核酸(Matrix metalloproteinase 9 mRNA,MMP-9 mRNA)的表达情况进行相关性的研究。方法:对实验动物随机给予 MSCs 及 ATRA 的方式,分别于 2、3、4 周后取肺组织切片,激光共聚焦显微镜下观察植入细胞的招募情况,RT-PCR 法检测组织中 MMP-9 mRNA 的表达变化。结果:随着时间的延长,在各时间点:在实验组,可见较多经过标记后的 MSCs 分布于肺泡表面,与 MSCs 移植组,ATRA 干预组及病例对照组相比较其积分光密度(Integral optical density,IOD)明显增强,差异有统计学意义($P<0.05$)。同时 MMP-9 mRNA 在病例对照组及 ATRA 干预组较高水平表达,而 MSCs 移植组中随着 MSCs 移植后时间延长,其表达水平随之降低,比较差异有统计学意义($P<0.05$),而实验组 MMP-9 mRNA 在 2、3、4 周表达又较 MSCs 移植组低,两者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:ATRA 对肺损伤组织中移植 MSCs 的招募作用的影响与组织中 MMP-9 mRNA 水平的降低有关。

【关键词】骨髓间充质干细胞;肺损伤;招募;基质金属蛋白酶 9

【中国图书分类法分类号】R655.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-12-01

Effect of ATRA on recruiting of MSCs and MMP-9 mRNA expression in damage tissue

YANG Wei ,et al

(*Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hosptial, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To research the correlation between the effect of all-trans retinoic acid (ATRA) on recruiting MSCs and MMP-9 mRNA expression in damage tissue. *Methods*: MSCs and ATRA were separately used in experimental SD rats. At 2 weeks, 3 weeks and 4 weeks after the treatment, RT-PCR assay was used to determine expressions of MMP-9 mRNA in lung tissues. Laser scanning microscope was used to observe the recruitment of implanted MSCs. *Results*: We found that, at each time point, experimental group had more implanted MSCs in the surface of alveoli and increased IOD than other groups. There was significant difference in these groups ($P<0.05$). At the same time, in control group and ATRA intervention group, there were overexpression of MMP-9 mRNA, but in MSCs implanted group the expression of MMP-9 mRNA decreased slowly, as compared with the above two groups ($P<0.05$). In experimental group, the drop of MMP-9 mRNA expression was clear, as compared with the above three groups ($P<0.05$). *Conclusion*: The effect of ATRA on recruitment of MSCs had relationship with the drop of MMP-9 mRNA expression in damage tissue.

【Key words】MSCs; Lung injury; Recruitement; MMP-9

慢性阻塞性肺病(Chronic obstructive pulmonary diseases,COPD)因其不完全可逆性的气流受限成为难治性疾病之一,其发病机制可表达为长期反复的肺部炎症及肺泡损伤,细胞外基质不断破坏、修复、重构,从而造成肺实质破坏,影响肺的通气和换气功能。其传统的治疗方法治疗周期长,花费高,病人生活质量差。但随着干细胞技术研究的进展,骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cells,MSCs)作为具有极强的自我复制能力和多向分化替代潜能的细胞,在肺部重构疾病中倍受关注。而全反式维甲酸(All-trans retinoic acid,ATRA)则是一种被公认的强效分化诱导剂。本实验旨在移植经过标记的同种异体 SD 大鼠的 MSCs 到动物 COPD 模型,并给予 ATRA 诱导的情况下观察其招募情况的改变与组织中基质金属蛋白酶 9 信使核糖核酸(Matrix metalloproteinase 9 mRNA,MMP-9 mRNA)表达之间的关系,从而预测 MSCs 在 COPD 防治中的作用、预后及影响因素。

作者介绍:杨 威(1983-),男,硕士,
研究方向:肺损伤。

通讯作者:温剑虎,男,教授,E-mail:tiger001@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 单克隆抗体 CD34、CD44（武汉博士德公司），羊抗鼠 IgG FITC（Sigma 公司），ATRA（Gibco 公司），脂多糖 10 mg/支（Sigma 公司），DAPI（Bestbio 公司），RT-PCR 试剂盒购自美国 Ferments 公司。

1.1.2 动物 选用健康清洁级 SD 大鼠，雌雄各半，4 周龄大小，体重 200 g 左右，由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立 第 1 d 和第 14 d 将大鼠麻醉后，暴露喉头，以 14 G 静脉套管针行气管插管，向气管内注入脂多糖 1 g/L 共计 200 μl，并注入少量空气，并将大鼠直立旋转 10～20 s，使脂多糖均匀分布于气管、肺部。第 2～13 d 和 15～28 d，每天在密闭有机玻璃箱中持续吸入新鲜的香烟烟雾 30 min，18 支/d，然后立即用低于环境温度 5 ℃ 的冷空气刺激 1 h，造模 4 周结束。于 4 周后随机选取 8 只，抽取动脉血液行血气分析与正常大鼠比较，并立即任意取处死大鼠肺组织 3 处经固定，石蜡包理、HE 染色，光镜观察组织学改变。根据 Gross 及李红梅等人关于香烟及内毒素制备 COPD 模型标准[1,2]提示模型复制成功。

1.2.2 移植用 MSCs 的获取、鉴定、标记 无菌条件下收集 SD 大鼠股骨骨髓细胞悬浮液，接种在塑料培养瓶中，低糖 DMEM、胎牛血清、37 ℃、5% CO_2 条件下培养。10～14 d 后待悬液细胞达 80% 以上融合时，按 1∶2 比例传代。以免疫组织化学染色法对传 3 代的 MSCs 行 CD34、CD44 鉴定，传代细胞 CD44 应阳性，CD34 应阴性。取第四代 MSCs，加入 DAPI 至浓度为 50 g/L，放入培养箱孵育 1 h，离心洗涤后收集细胞，于紫外光显微镜下观察细胞染色情况，其余细胞以无血清 DMEM 液调整至浓度为 2×10^9 个/L 备用，移植量每只 1 ml。

1.2.3 动物分组 随机分组：实验组（给予 ATRA，尾静脉途径移植 MSCs）：21 只；MSCs 移植组（不给予 ATRA，尾静脉途径移植 MSCs）：21 只；ATRA 干预组（给予 ATRA，注射无细胞的等量基础培养基）：21 只；病例对照组（模型对照，不给予 ATRA，注射无细胞的等量基础培养基）正常饲养，21 只。在各时间点选取样本进行观察。

1.2.4 实验结果的观察 取处死大鼠左肺下叶组织（1 cm^3）经多聚甲醛固定冰冻切片，激光共聚焦显微镜观察移植 MSCs 在肺组织中的招募情况并拍摄照片，每个样本数 3 个视野，测定积分光密度（Integral optical density，IOD）数值，计算其平均值。

处死动物后取右肺下叶迅速放入液氮中冻存，对实验各组分别进行 RT-PCR 分析。按照 Trizol 试剂盒常规一步法提取总 RNA，采用 Fementas 公司逆转录试剂按操作说明转录成 cDNA，产物进行 RT-PCR。MMP-9 引物上游：5'-AGCGCTGTTATGACACTC-3'，下游：5'-GCTATGGTGATGCCACCTTA-3'，β-actin 上游：5'-CCAAGTTCAACGGCACAG-3'，下游：5'-CGGTCTTCTGAGTGGCAGT-3'。产物长度分别为 207 bp，412 bp。退火温度为 60 ℃，35 个循环。PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测，以 260 mn 和 280 mn 波长的长波紫外灯下照相，经凝胶成像系统分析，以各组光密度比值比较（引物由上海生工合成）。

1.3 统计方法

所有数据均以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，以 SPSS 12.0 统计软件采用单因素方差检验，对差异显著性进行分析，$P<0.05$ 表示有统计学意义。

2 实验结果

2.1 MSCS 的培养及鉴定

MSCs 培养传代后细胞呈梭形，漩涡样生长，免疫组织化学染色法检测传 3 代 MSCS 结果为 CD34 表达阴性，CD44 表达阳性（见图 1），表明所获得的细胞为大鼠骨髓间质来源的干细胞。



CD44 阳性

图 1 CD44 阳性的 MSCS 细胞（×200，免疫组化染色）

2.2 COPD 大鼠模型病理染色（HE 染色法）的形态观察及血气分析的测定（见图 2 及表 1）

根据图 2 可见模型组肺泡结构不完整，支气管周围大量炎性细胞侵润。表 1 提示模型组 $PaCO_2$ 较高，PaO_2、SaO_2 明显低于正常组，可确定 COPD 大鼠模型建立成功。

2.3 激光共聚焦示移植 MSCs 在各组损伤肺组织中的分布

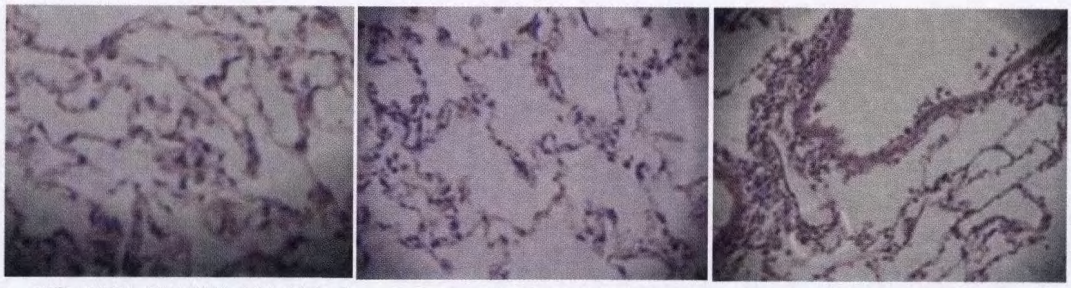
DAPI 标记的 MSCS 在荧光显微镜下细胞核显示为蓝色发光点，胞质不显示。移植入 SD 大鼠体内 2 周后，激光共聚焦显微镜可见 MSCs 移植组中部分大鼠肺组织内有荧光标记的细胞，细胞分布无特定规律，3、4 周后荧光标记的细胞未见明显增加。而实验组中荧光标记的细胞较 MSCs 移植组呈逐渐增加的趋势，细胞主要分布在肺泡壁、支气管壁。而 ATRA 干预组及病例对照组未发现荧光标记。见图 3。

2.4 检测各组中移植 MSCs 的荧光强度的变化（见表 2）

检测结果显示：MSCs 移植组与病例对照组相比荧光强度有所升高（$P<0.05$），但 3 周，4 周后未见明显增强。而实验组中荧光强度较 MSCs 移植组明显升高（$P<0.05$），并呈现逐渐增强趋势。ATRA 干预组与病例对照组无统计学意义。

2.5 RT-PCR 检测各组 MMP-9 mRNA 表达结果

MMP-9 mRNA 在病例对照组及 ATRA 干预组较高水平表达，而 MSCs 移植组中随着 MSCs 移植时间延长，其表达水平随之有所降低，与前两者比较差异有统计学意义（$P<0.05$），而实验组 MMP-9 mRNA 在 2 周，3 周，4 周表达较 MSCs 移植组及 ATRA 干预组降低明显，比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。病例对照组与 ATRA 干预组无统计学意义。（见图 4 与表 3）



A. 正常对照组:肺泡结构连续,肺泡壁完整,肺泡腔无明显扩大,无明显渗出。

B. 病例对照组:肺泡结构紊乱,肺泡囊和肺泡扩张,肺泡壁变薄,多个肺泡融合呈肺大泡。

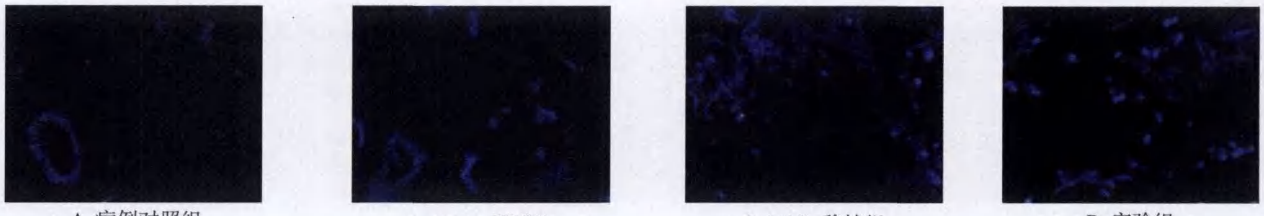
C. 病例对照组:支气管黏膜上皮变性坏死脱落,纤毛连续性中断,肺间质大量炎细胞浸润。

图 2 各组大鼠肺损伤情况(×200,HE 染色)

表 1 COPD 模型组与正常对照组血气分析测定

	COPD 模型组	正常对照组
$PaCO_2$(mmHg)	47.4 ± 3.6*	38.4 ± 5.3
PaO_2(mmHg)	80.2 ± 7.8△	98.4 ± 1.5
SaO_2(%)	91.3 ± 3.5*	97.3 ± 2.1

注:与正常对照组比较(*P<0.05,△P<0.05,*P<0.05)



A. 病例对照组 B. ATRA 干预组 C. MSCs 移植组 D. 实验组

图 3 激光共聚焦下移植 MSCs 在各组损伤肺组织中的分布(×200)

表 2 各实验组移植 MSCs 荧光强度(IOD)比较($\bar{x}$ ± s)

	2 周	3 周	4 周
病例对照组	195.34 ± 17.45	196.11 ± 11.22	195.14 ± 15.35
MSCs 移植组	233.45 ± 20.81*	245.56 ± 18.26*	249.89 ± 16.55*
ATRA 干预组	195.12 ± 15.32*	197.63 ± 10.21*	196.88 ± 10.17*
实验组	256.34 ± 18.45△	295.39 ± 17.97△	332.50 ± 21.33△

注:与病例对照组比较(*P<0.05),与 MSCs 移植组比较(△P<0.05),与病例对照组(*P<0.05)

表 3 各实验组移植 MMP-9 mRNA (OD)值比较($\bar{x}$ ± s)

	2 周	3 周	4 周
病例对照组	20.15 ± 0.36*	19.89 ± 0.23*	20.46 ± 0.18*
MSCs 移植组	13.34 ± 0.56△	12.21 ± 0.12△	9.83 ± 0.35△
ATRA 干预组	19.98 ± 0.36*△	21.02 ± 0.45*△	19.56 ± 0.58*△
实验组	9.55 ± 0.45	8.56 ± 0.32	5.33 ± 0.17

注:与 MSCs 移植组比较(*P<0.05),与实验组比较(△P<0.05)

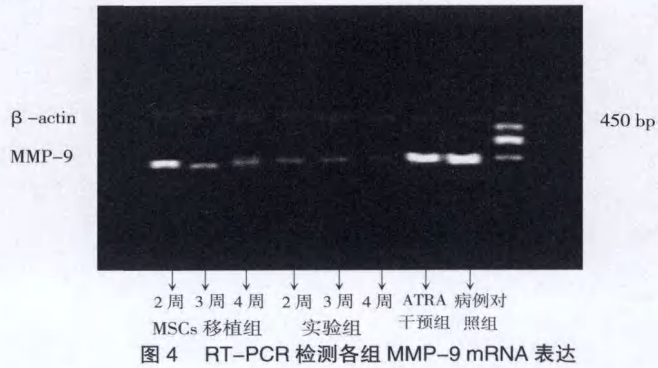


图 4 RT-PCR 检测各组 MMP-9 mRNA 表达

3 讨 论

慢性阻塞性肺病是我国患病率较高的病之一。如何防止或减轻慢性阻塞性肺病对支气管肺泡上皮细胞,细胞外基质的损害,是目前肺保护研究的热点。Barnes 报道肺气肿患者肺泡灌洗液中巨噬细胞增加 5 ~ 10 倍,是产生金属蛋白酶的主要来源,因此巨噬细胞释放的 MMPs 是导致 COPD 的主要决定因素之一[3]。MMP-9 是基质金属蛋白酶家族中重要的酶类,其主要作用是降解细胞外基质中蛋白酶,尤其是肺泡基膜中的Ⅳ型胶原,已逐渐成为评价肺部重构等呼吸系统疾病的预后标准。目前认为 MMP-9 的作用机制可能是Ⅳ型胶原首先作用于支气管肺泡上皮细胞,MMP-9 在其表面聚集,进而降解上皮细胞[4]。已有报道显示在慢性阻塞性肺病患者肺实质、血清中 MMP-9 被检测出为高表达。而 MSCs 作为一种全能干细胞,可以通过循环途径进入体内后,在损伤部位招募、定居、分化并对损伤进行修复[5],且国内外在应用干细胞移植治疗血管、神经系统疾病已取得很好应用前景。同时 ATRA 具有极强诱导分化及维持内环境稳定的作用,可诱导体外培养的 MSCs 增殖分化形成肺组织[6,7]。它们三者之间是否具有相互作用及其作用机制尚未清楚。因此本实验研究 ATRA 诱导下 MSCs 在损伤肺组织中的招募与 MMP-9 mRNA 表达之间的关系,从而预测 MSCs 在 COPD 防治中的作用、预后及影响因素。

本实验显示:在动物肺损伤以后单独予以移植 MSCs 的大鼠标本在激光共聚焦镜下仅见少量的荧光细胞分布于肺组织中,细胞分布无明显规律,第 2 周,3 周,4 周后天并未见到明显的增加。同时实验组中大鼠肺组织可见较多量的荧光细胞。而病例对照组和 ATRA 干预组未见移植细胞。虽然不能排除 MSCs 注入大鼠后个别组织中因存活量少未被检测出的可能,但仍然说明移植 MSCs 可在损伤的大鼠肺组织中被招募是肯定的,是否给予 ATRA 干预是有差别的,ATRA 体内干预在 MSCs 的招募中具有一定的积极作用。而 RT-PCR 的结果提示病理对照组及 ATRA 干预组中 MMP-9 mRNA 的表达呈高水平,符合既往的相关报道。MSCs 移植组中表达有所降低,3 周后其表达曲线趋于平缓。而实验组中呈低水平表达,且含量逐渐降低。提示我们 ATRA 诱导下损伤肺组织对 MSCs 的招募与 MMP-9 mRNA 的表达呈逆相关。目前多数学者认为 MSCs 的招募、分化能力受其所处微环境的影响和制约,且具有环境依赖作用。干细胞进入新的微环境后,对分化信号的反应受到周围正在进行分化细胞的影响,并对新的微环境中的调节信号做出反应,在周围刺激因素的作用下甚至可分化为平滑肌细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞,甚至神经、心肌细胞、肺组织和消化道上皮[8,9]。其机制可能与多种肿瘤坏死因子、血小板衍化生长因子、内皮生长因子等多因素的调节有关[10,11]。而 MMPs 的表达和活性调节同样取决于体内多种活性介质,其中最主要的是生长因子。有实验通过体内局部使用白介素 17,致 MMP-9 前体分泌细胞聚集提高分子浓度,而体外实验并无增加,说明白介素 17 是通过引起局部分泌细胞的聚集而增加 MMP-9 浓度的。

因此 ATRA 诱导下的 MSCs 在损伤肺组织中的招募与 MMP-9 mRNA 的表达之间具有某种作用机制,可能是 ATRA 通过诱导刺激 MSCs 的招募改变了微环境,进而抑制 MMP-9 mRNA 的高表达,从而缓解对 COPD 病人的损伤,其具体作用机理,MMP-9 在移植 MSCs 修复肺损伤中所占决定因素的比重有多大仍有待于进一步深入的研究。

综上所述:ATRA 参与了肺损伤情况下移植 MSCs 的招募,其可能通过刺激移植的 MSCs 改变微环境,调节 MMP-9 的表达,减轻细胞外基质的破坏,促进细胞的存活。

参 考 文 献

[1] Gross P,Pfitzer E A,Tolker E,et al.Exprimental amphysema:its production with papain in normal and slicotic rats[J].Arch Environ Health,1965,11(1):50-58.

[2] 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[J].中国病理生理杂志,2002,18(7):808-812.

[3] Barnes P J.Mechanisms in COPD:differences from asthma[J].Chest Feb,2000,117(2):10-14.

[4] Claire Legrand,Christine Gilles,Jean-Marie Zahm,et al.Airway epithelial cell migration dynamics:MMP-9 role in cell-extracellular matrix remodeling[J].Cell Biol,1999,146(2):517-522.

[5] Krause D S,Theise N D,Collector M I,et al.Multi-organ,multi-lineage engraftemnt by a single bone marrow-derived stem cell[J].Cell 2001,105(3):369-377.

[6] Ishizawa K,Kubo H,Yamada M,et al.Bone marrow-derived cells contribute to lung regeneration after elastase-induced pulmonary emphysema[J].FEBS Letters,2004,556(3):249-252.

[7] Tepper J,Juergen P,Melinda A,et al.Can retinoic acid ameliorate the physidogic and morphologyic effects of elastase instillation in the rat[J].Chest May,2000,117(4):242-244.

[8] 付小兵,孙晓庆,孙同柱,等.表皮细胞生长因子治疗创面出现的干细胞岛现象[J].中华医学杂志,2001,81(12):733-736.

[9] Cuenca-López M D,Zamora-Navas P,García-Herrera J M,et al.Adult stem cells applied to tissue engineering and regenerative medicine [J].Cell Mol Biol,2008,54(1):40-51.

[10] Egi K,Conrad NE,Kwan J,et al.Inhibition of inducible nitric oxide synthase and superoxide production reduces matrix metalloproteinase-9 activity and restores coronary vasomotor function in rat cardiac allografts[J].Eur J Cardiothorac Surg,2004,26(2):262-269.

[11] Ren ó F,Baj G,Surico N,et al.Exogenous pmstaglandin E2 inhibits TPA induced matrix metalloproteinase-9 production in MCF-7 cells[J].Prostaglandins other lipid mediat,2004,73(3-4):237-247.

(责任编辑:关蕴良)