

• 基础研究 •

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2024.23.002

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.r.20240903.1037.016\(2024-09-03\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.r.20240903.1037.016(2024-09-03))

人羊膜间充质干细胞对松木屑烟雾溶液致大鼠肺微血管内皮细胞损伤的保护作用*

詹球¹, 崔培¹, 朱秀连¹, 李榕生¹, 蒙凤姬¹, 朱富军^{1,2}, 杨福旺², 童亚林^{1,2}, 辛海明^{1,2△}

(中国人民解放军联勤保障部队第九二四医院:1. 动物实验室;2. 烧伤整形皮肤美容中心, 广西桂林 541002)

[摘要] **目的** 通过观察人羊膜间充质干细胞(hAMSCs)对松木屑烟雾溶液致大鼠肺微血管内皮细胞(PMVECs)损伤后增殖、凋亡及炎症反应的影响,探讨 hAMSCs 对 PMVECs 的保护作用。**方法** 分离、培养 hAMSCs 和大鼠 PMVECs,分别利用流式细胞术和免疫荧光染色法鉴定 hAMSCs 和 PMVECs。实验分组:Control 组(正常培养的 PMVECs)、Smoke 组(用烟雾致伤液致伤 PMVECs)、Smoke+hAMSCs 组(用烟雾致伤液致伤 PMVECs 后,在 Transwell 培养体系中将 hAMSCs 与 PMVECs 共培养)。在共培养后 12、24 h,用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)检测 PMVECs 增殖活性、流式细胞术检测 PMVECs 凋亡、ELISA 法检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)表达水平。**结果** 成功分离、培养 hAMSCs 和 PMVECs,鉴定 hAMSCs 表面标志物 CD105(95.4%)、CD73(99.8%)和 CD90(99.8%)呈强阳性表达,CD34、CD45、CD14、CD19 和 HLA-DR(共为 1.96%)呈微弱表达,PMVECs 阳性表达血管内皮细胞标志物 CD34,且与西非单叶豆凝集素(BSI)结合也为阳性。在共培养 12、24 h 观察时间点,与 Control 组比较,Smoke 组中 PMVECs 增殖活性受抑制($P < 0.05$),细胞凋亡增加($P < 0.05$),TNF- α 和 IL-6 表达水平上调($P < 0.05$);Smoke+hAMSCs 组中 PMVECs 细胞的增殖活性受抑制、细胞凋亡增加及炎症因子表达水平上调现象较 Smoke 组被逆转($P < 0.05$)。**结论** 在烟雾溶液致伤 PMVECs 后,hAMSCs 可降低 PMVECs 炎症因子表达,促进其增殖活性并抑制其凋亡,从而对 PMVECs 起保护作用。

[关键词] 烟雾吸入性损伤;急性肺损伤;人羊膜间充质干细胞;肺微血管内皮细胞**[中图分类号]** R563.9**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2024)23-3527-08

Protective effect of human amniotic mesenchymal stem cells on pulmonary microvascular endothelial cell injury induced by pine sawdust smoke solution in rats*

ZHAN Qiu¹, CUI Pei¹, ZHU Xiulian¹, LI Rongsheng¹, MENG Fengji¹, ZHU Fujun^{1,2},
YANG Fuwang², TONG Yalin^{1,2}, XIN Haiming^{1,2△}

(1. Animal Laboratory; 2. Burn Plastic Skin Beauty Center, 924 Hospital of Joint Logistics Support Force of People's Liberation Army, Guilin, Guangxi 541002, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of human amniotic mesenchymal stem cells (hAMSCs) on pulmonary microvascular endothelial cell (PMVECs) through observing the effects of proliferation, apoptosis and inflammatory response after PMVECs injury induced by pine sawdust smoke solution. **Methods** hAMSCs and rat PMVECs were isolated and cultured. The flow cytometry and immunofluorescence were used to identify hAMSCs and PMVECs respectively. The experimental grouping: control group (normal cultured PMVECs), smoke group (PMVECs injury induced by pine sawdust smoke solution), smoke+hAMSCs group (after PMVECs was injured by smoke solution, hAMSCs and PMVECs were co-cultured in Transwell culture system). The proliferative activity of PMVECs after co-culture for 12, 24 h was measured by cell counting kit-8 (CCK-8), the apoptosis of PMVECs was measured by flow cytometry, and the expression levels of TNF- α and IL-6 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results**

* 基金项目:广西壮族自治区临床重点专科建设项目(桂卫医发[2023]26号);广西科技基地与人才专项(桂科 AD18126016);广西壮族自治区卫生健康委自筹经费科研项目(Z-C20241561);广西壮族自治区桂林市自筹经费科技项目(20210102z);联勤保障部队第九二四医院院内科技计划(GS2020CZ05、GS2020CZ06、SG2020FH08)。△ 通信作者, E-mail: xinhm123@163.com。

hAMSCs and PMVECs were successfully isolated and cultured, and the hAMSCs surface markers CD105 (95.4%), CD73 (99.8%) and CD90 (99.8%) were identified as strongly positive expression, while CD34, CD45, CD14, CD19 and HLA-DR were weakly expressed (1.96% in total). The vascular endothelial cell marker CD34 in PMVECs was positively expressed, moreover its combination with agglutinin BSI was also positive. At the observation time point of 12, 24 h co-culture, compared with the Control group, the proliferation activity of PMVECs in the Smoke group was inhibited ($P<0.05$), and the cellular apoptosis was increased ($P<0.05$), the TNF- α and IL-6 expression levels were up-regulated ($P<0.05$); the phenomena of PMVECs proliferation activity inhibition, apoptosis increase and inflammatory factor expression level up-regulation in the Smoke+hAMSCs group were reversed compared with the Smoke group ($P<0.05$). **Conclusion** After PMVECs are injured by smoke solution, hAMSCs could decrease the PMVECs inflammatory factors expression, promote its proliferation activity and inhibit its apoptosis, thus play the protective effect on PMVECs.

[Key words] smoke inhalation injury; acute lung injury; human amniotic mesenchymal stem cells; pulmonary microvascular endothelial cells

火灾现场烟雾吸入引起的急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是致烧伤患者死亡的重要因素^[1-2], 而肺微血管内皮细胞 (pulmonary microvascular endothelial cells, PMVECs) 损伤和通透性增加是烟雾吸入性损伤特征之一^[3-5], 如何减轻肺微血管内皮细胞损伤是防治烟雾吸入性损伤的研究热点。研究显示, 人羊膜间充质干细胞 (human amniotic mesenchymal stem cells, hAMSCs) 能在体内实验中减轻大鼠吸入发烟罐或木材烟雾所致的与血管内皮细胞损伤相关的肺水肿和出血^[6-7], 但 hAMSCs 能否对烟雾致 PMVECs 损伤起到点对点的保护作用尚不明确。因此, 本研究将火灾中常见的木材烟雾制成溶液作为致伤因素处理 PMVECs, 在体外利用 Transwell 培养体系使 hAMSCs 间接作用于 PMVECs, 再通过检测 PMVECs 增殖、凋亡及炎症反应变化来探讨 hAMSCs 对烟雾致 PMVECs 损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

PMVECs 供体使用的非特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级健康雄性 SD 大鼠 30 只 (180~200 g) 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。实验前将大鼠置于屏障环境实验室, 室温 20~26℃, 相对湿度 40%~70%, 昼夜循环 12 h, 标准饲料喂养, 自由进食、饮水。本研究已通过医院实验动物伦理委员会批准 (审批号: 924DWSYZX202101)。二甲基亚砜 (dimethyl sulphoxide, DMSO) 购自北京索莱宝科技有限公司; 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 购自安徽合肥白鲨生物科技有限公司; 内皮细胞生长因子 (endothelial cell growth supplement, ECGS) 购自美国 ScienCell 公司; 胰酶、Ⅳ型胶原酶、胎牛血清 (fetal calf serum, FBS)、F12/DMEM 高糖培养基均购自美国 Gibco 公司; 西非单叶豆凝集素 (bandeiraea simplicifolia isolectin, BSI) 购自美国 Sigma 公司; anti-CD34 抗体购自美国 Abcam 公司; 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的

膜联蛋白 V (Annexin-V) 凋亡检测试剂盒、碘化丙啶 (propidium ibdide, PI) Human MSC Analysis 试剂盒购自美国 BD 公司; 鼠抗肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 检测试剂盒、鼠白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) ELISA 检测试剂盒均购自美国 Invitrogen 公司; 10×Cell Lysis Buffer 购自美国 Cell Signaling 公司; Protease Inhibitor Cocktail Set III 购自美国 Merckmillipore 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 超净工作台 (AVC-4D1) 购自新加坡 Esco 公司; 二氧化碳培养箱 (Heracell 150i) 购自德国 Thermofisher 公司; 倒置显微镜 (IX71-A12FL/PH) 购自日本 Olympus 公司; 酶标仪 (IMark) 购自美国 Bio-Rad 公司; 流式细胞分选仪 (FACS Aria II) 购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 hAMSCs 的分离、培养与鉴定

羊膜的获取: 经产妇或家属知情同意, 由本院医学伦理委员会进行审查批准 (审批号: 924DW SYLC202012)。分娩前排除衣原体、梅毒螺旋体感染, 检测 HIV、HBV、HCV。收集上述检测均为阴性且健康足月生产的胎盘。hAMSCs 的分离培养: 分离羊膜, 并用生理盐水 (含 1% 双抗) 冲洗其表面。将其剪成 5 cm×5 cm 小片的羊膜放入离心管中, 加入 0.25% 胰酶 (羊膜片两倍体积) 在摇床中 37℃ 消化 1 h, 消化完成后用生理盐水冲洗 3 次。接着剪碎组织, 加两倍体积Ⅳ型胶原酶 (浓度 0.1%), 在摇床中 37℃ 消化 2~3 h, 加入 10% FBS 终止。依次用 50 目和 200 目无菌细胞筛过滤混合液, 得到的滤液 1 000 r/min 离心 5 min。去除上清液后, 用完全培养基重悬, 接种到培养瓶中, 24 h 后换液。待细胞融合率达 90% 后进行换液、传代, 在 P3 代获得高纯度的成熟的 hAMSCs。流式细胞术鉴定 hAMSCs 表面标志物: 用 0.25% 胰酶消化正常的 P3 代 hAMSCs, 并用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 重悬细胞 (浓

度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$),按照 Human MSC Analysis 试剂盒说明书处理细胞后,用流式细胞仪进行分析。

1.2.2 大鼠 PMVECs 的分离、培养与鉴定

麻醉大鼠后暴露其胸腔,用 1% 双抗生理盐水灌注心脏至肺组织变白,取下肺组织。用 1% 双抗生理盐水浸泡,用 0.25% 胰酶置于摇床中消化 5 min,1% 双抗生理盐水洗涤后,剪下肺叶 1~2 mm 边缘组织,分别加入胰酶和 0.4% IV 型胶原酶消化 15 min,加入 10% FBS 终止消化,离心,去上清液,加入 F12/DMEM 培养基(含 1% ECGS、1% 肝素钠、1% 双抗和 10% FBS)重悬,于 CO_2 培养箱(条件为 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 及 100% 湿度)中培养。待细胞完全贴壁后,消化接种于 6 孔板中,进行免疫荧光染色,在倒置显微镜下观察 PMVECs 表面标志物 CD34 及凝集素 BSI 结合情况。

1.2.3 木材烟雾溶液致 PMVECs 损伤模型的建立及实验分组

细胞损伤模型的建立:采用自行研制的气体装置收集细胞致伤液,以 DMSO(40 mL)作为溶剂,采用 30 g 木屑燃烧 5 min,共收集 6 次,收集到的溶液作为 100% 烟雾溶液。用基础培养基将 100% 烟雾溶液稀释 1 000 倍后作为烟雾工作液。本研究以烟雾工作液:基础培养基为 3:1 的浓度作为致伤浓度配制成烟雾致伤液,细胞致伤时间为 6 h。

实验分组:(1)Control 组,PMVECs 常规培养不以任何刺激;(2)Smoke 组,用烟雾致伤液致伤 PMVECs;(3)Smoke+hAMSCs 组,用烟雾致伤液致伤 PMVECs 后再与 hAMSCs 共培养。具体操作如下,将 2 mL 浓度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$ PMVECs 接种于 6 孔板中的 Transwell 小室上层,待细胞融合至 80% 左右,Transwell 小室下层 6 孔板中每孔加入 2 mL 烟雾致伤液(1.5 mL 烟雾工作液+0.5 mL 基础培养基)致伤 PMVECs,致伤 6 h 后,在 Smoke 组中,将孔中的烟雾致伤液换成基础培养基继续培养;在 Smoke+hAMSCs 组中,致伤后的 PMVECs 同 Transwell 小室一起移入已培养有 hAMSCs(每孔有 2 mL 浓度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞)的 6 孔板中进行共培养。各组

细胞置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 及 100% 湿度 CO_2 培养箱中培养 12、24 h 后进行后续实验。

1.2.4 CCK-8 检测细胞增殖活性

在观察时间点,取出 Transwell 小室并弃去其中上清液,然后将 Transwell 小室转移至新的 6 孔板中,每孔中加入含 CCK-8 的基础培养基 200 μL ,在培养箱中 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h 后将溶液转移至 96 孔板中,酶标仪检测 450 nm 波长处的光密度(optical density, OD)值。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡率

在观察时间点,取出 Transwell 小室并弃去其中上清液,经 0.25% 胰酶消化小室中的 PMVECs 后得到单细胞悬液,离心后去上清液,用预冷的 PBS 洗涤,相同条件再次离心,弃去 PBS,再加 PBS 重悬细胞,参照 FITC 标记的 Annexin-V 凋亡检测试剂盒说明书标记细胞,用流式细胞仪检测 PMVECs 凋亡率,利用 FlowJo V8 软件处理流式细胞仪检测结果。

1.2.6 ELISA 法测定 PMVECs 中炎症因子

在观察时间点,取出 Transwell 小室并弃去其中上清液,经 0.25% 胰酶消化小室中的 PMVECs,收集细胞并裂解,提取细胞总蛋白,并进行 BCA 定量。PMVECs 中 TNF- α 、IL-6 水平测定采用 ELISA 试剂盒,严格按照说明书步骤操作。

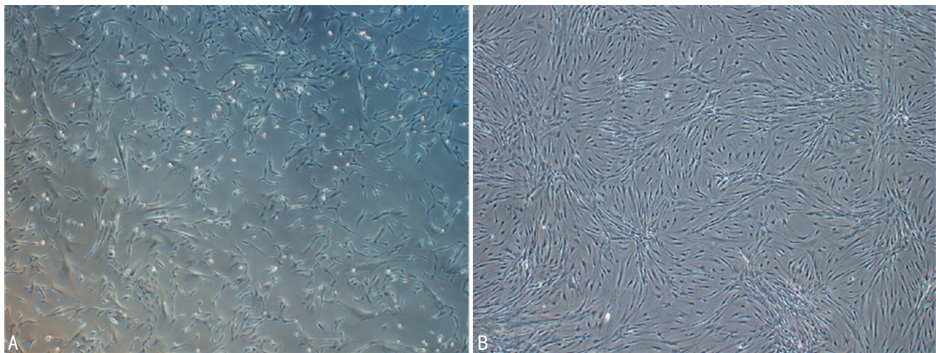
1.3 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件进行数据统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t*(方差齐)或 Dunnett T3(方差不齐)检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

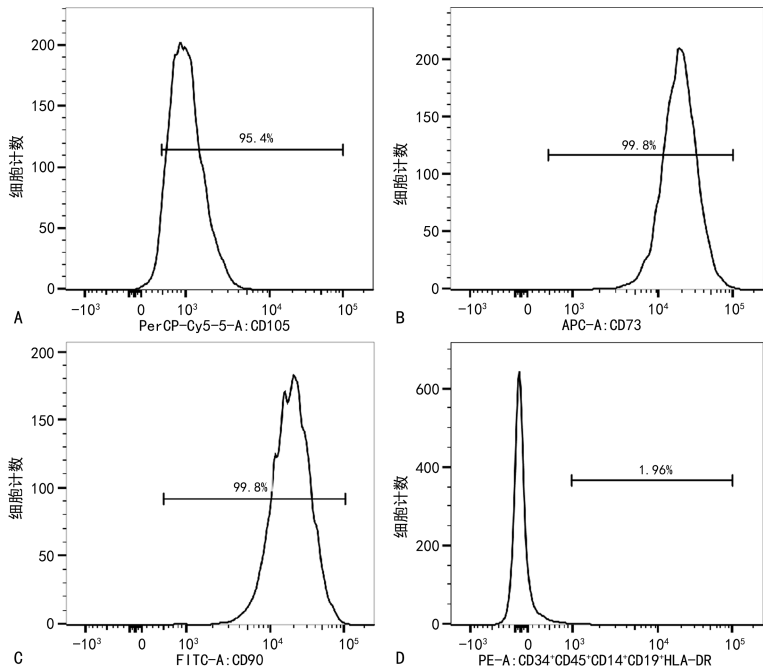
2.1 hAMSCs 形态学观察及表面抗原分析

培养 24 h 后的 P0 代贴壁 hAMSCs 在镜下大多呈梭形、多角形或者纺锤形(图 1A)。传至 P3 代的 hAMSCs 呈现立体感较强的梭形或纺锤形生长状态(图 1B)。P3 代 hAMSCs 经流式细胞术鉴定显示,hAMSCs 表面标志物 CD105(95.4%)、CD73(99.8%)和 CD90(99.8%)高表达,CD34、CD45、CD14、CD19 和 HLA-DR(共为 1.96%)微弱表达,见图 2。



A:P0 代 hAMSCs;B:P3 代 hAMSCs。

图 1 hAMSCs 形态学观察(40 $\times$)



A:CD105;B:CD73;C:CD90;D:CD34⁺CD45⁺CD14⁺CD19⁺HLA-DR;PerCP-Cy5-5-A、APC-A、FITC-A、PE-A 均为荧光标记物。

图 2 流式细胞术鉴定 hAMSCs 表面标志物的表达情况

2.2 大鼠 PMVECs 形态学观察及表面抗原分析

大鼠原代 PMVECs 培养 1 d 后开始逐步贴壁,经显微镜观察发现,原代 PMVECs 培养 1 周后融合成片,具有典型的“铺路石样”形态,见图 3。将原代 PMVECs 消化后接种到 6 孔板中,采用免疫荧光染色法检测 PMVECs 表面标志物 CD34 表达及与 BSI 结合情况,结果显示 PMVECs 阳性表达 CD34,且与 BSI 结合也为阳性,见图 4。

2.3 hAMSCs 对烟雾致伤后 PMVECs 增殖活性的影响

利用 CCK-8 检测各组 PMVECs 增殖活性。结果显示,在共培养 12、24 h 观察时间点,Smoke 组和 Smoke+hAMSCs 组 PMVECs 增殖活性均明显低于 Control 组($P<0.05$),但与 Smoke 组比较,Smoke+

hAMSCs 组 PMVECs 增殖活性在各观察时间点均明显升高($P<0.05$),见图 5。

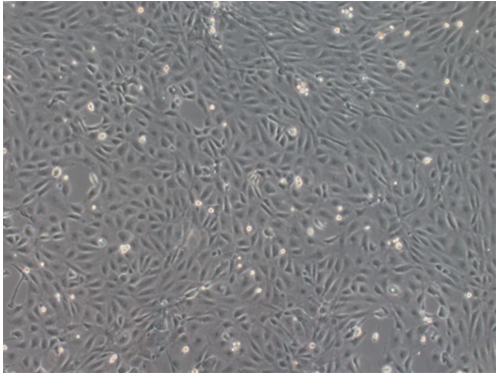


图 3 PMVECs 形态学观察(100×)

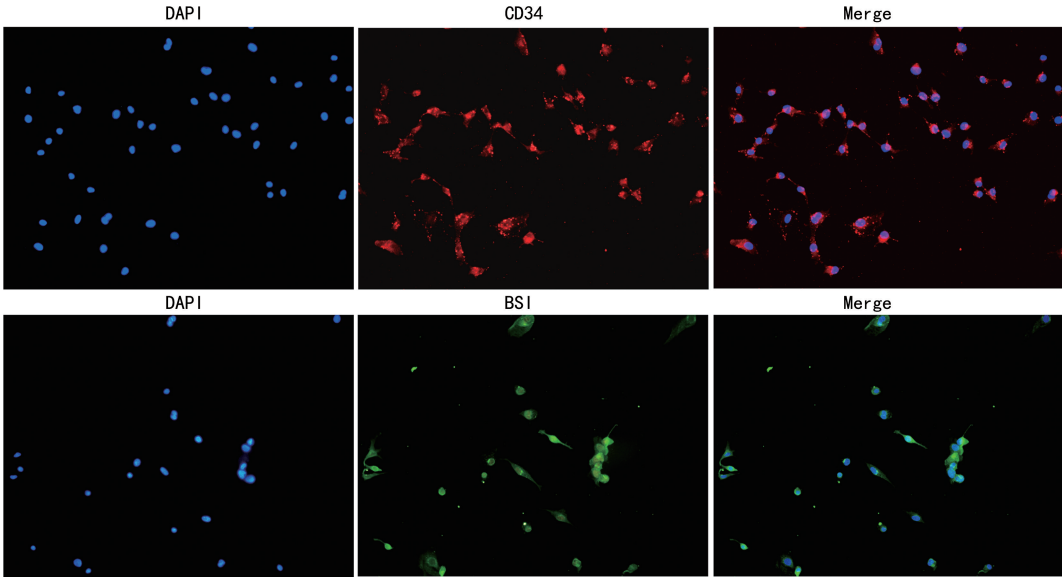


图 4 免疫荧光染色法鉴定 PMVECs 表面标志物的表达情况(200×)

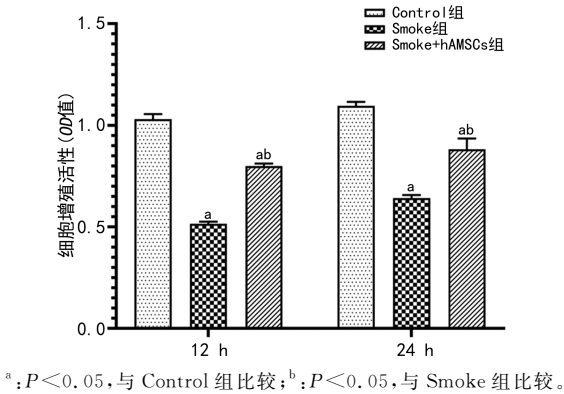
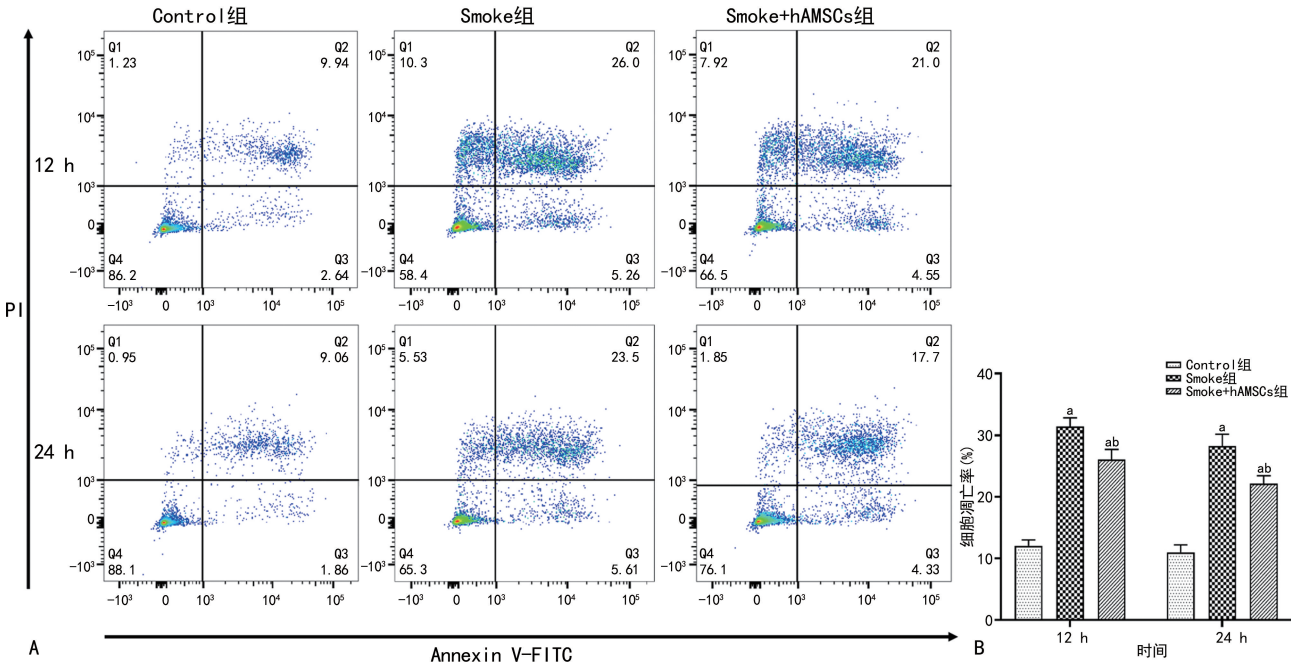


图5 各组PMVECs细胞增殖活性比较

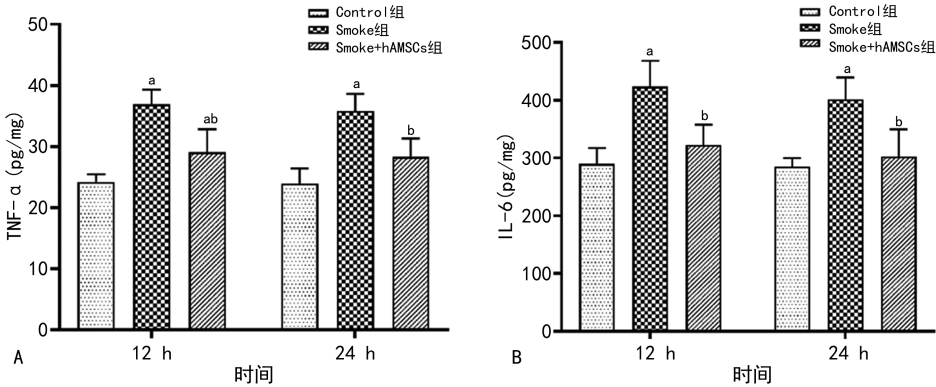
2.4 hAMSCs对烟雾致伤后PMVECs凋亡率的影响

利用流式细胞术检测各组PMVECs凋亡情况。



A:流式细胞术检测各组PMVECs的凋亡率;B:流式细胞术定量分析;^a: $P < 0.05$,与Control组比较;^b: $P < 0.05$,与Smoke组比较。

图6 各组PMVECs细胞凋亡情况比较



A:各组TNF-α表达水平的比较;B:各组IL-6表达水平的比较;^a: $P < 0.05$,与Control组比较;^b: $P < 0.05$,与Smoke组比较。

图7 各组PMVECs细胞中TNF-α、IL-6表达水平比较

3 讨论

烟雾吸入性损伤是火灾伤员死亡的常见原因,更

结果显示,在共培养12、24 h观察时间点,Smoke组和Smoke+hAMSCs组PMVECs凋亡率均明显高于Control组($P < 0.05$)。但与Smoke组比较,Smoke+hAMSCs组PMVECs凋亡率在各观察时间点均明显降低($P < 0.05$),见图6。

2.5 hAMSCs对烟雾致伤后PMVECs中TNF-α、IL-6表达水平的影响

利用ELISA法检测各组PMVECs炎症因子表达水平。在共培养12、24 h观察时间点,Smoke组PMVECs中TNF-α、IL-6表达水平较Control组均明显升高($P < 0.05$)。但与Smoke组比较,Smoke+hAMSCs组PMVECs中TNF-α、IL-6表达水平在各观察时间点均降低($P < 0.05$),见图7。

是烧伤患者死亡和预后不良的独立预测因子^[8],烟雾吸入导致的ALI会大大提高中、重度烧伤患者的病死

率^[9-11]。PMVECs 是烟雾损伤的重要靶细胞,烟雾的吸入破坏了 PMVECs 的完整性,增加了血管通透性,从而无法阻止血浆中富含蛋白的液体流入肺泡腔及血管中炎性细胞对肺泡的浸润,这进一步加重了对肺上皮的损伤,并导致肺泡水肿^[12-13],此外,体外研究也表明木烟提取物能促使人肺动脉内皮细胞凋亡^[14]。因此,探索防治烟雾损伤 PMVECs 的方法,对于维持气-血屏障的稳定性、降低肺水肿进而减轻肺损伤变得尤为重要。

hAMSCs 易获取、伦理不受限且免疫原性低,广泛应用于肺损伤^[15]、肾损伤^[16]、肝损伤^[17]、心肌梗死^[18]、创面愈合^[19]等研究中。有研究^[20]表明,在脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 和百草枯诱导的小鼠 ALI 模型中, hAMSCs 干预可明显减轻毛细血管通透性、氧化应激、炎症因子水平和组织病理学损伤。在烟雾致 ALI 防治方面, hAMSCs 在体内实验中可通过减少炎症反应、肺组织细胞凋亡和肺水肿等机制减轻大鼠吸入发烟罐或木材烟雾所致的 ALI^[6-7]。从上述研究结果可推测, hAMSCs 在体内可能会通过作用于 PMVECs 发挥防治 ALI 的作用,但在烟雾吸入致 ALI 中, hAMSCs 能否点对点作用于 PMVECs,目前尚无相关的体外研究报道。因此,本研究通过体外实验观察 hAMSCs 对烟雾致伤后 PMVECs 增殖、凋亡及炎症反应的影响来探讨 hAMSCs 对烟雾致 PMVECs 损伤的保护作用。

本研究首先对分离的 hAMSCs 和 PMVECs 做了形态观察和表面标记鉴定,以确保实验的准确性。显微镜下观察贴壁的 hAMSCs 形态成典型的梭形或纺锤形生长,流式细胞术结果显示其高表达间充质细胞表面特异性抗原 CD73、CD105、CD90,且微弱表达 CD34、CD45、CD14、CD19 和 HLA-DR,结果符合间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 的一般特征^[21]。培养的内皮细胞在镜下呈典型的“铺路石样”形态,免疫荧光染色法结果显示细胞阳性表达血管内皮细胞标志物 CD34^[22-24],与凝集素 BSI 结合为阳性进一步证明分离培养的细胞是 PMVECs^[24-26]。

MSCs 在疾病中起作用的方式多样,但在 MSCs 给药后,由于归巢及环境因素多种原因,迁移至受损靶组织的细胞量有限,也无持续足够长的时间来证明其组织替代的结果^[27-28],但 MSCs 依旧可以发挥显著的治疗作用,这可能与其旁分泌作用密切相关^[29-30]。因此本研究采取非接触共培养的方式建立 hAMSCs/PMVECs 共培养体系以观察 hAMSCs 对烟雾致伤后 PMVECs 的保护作用。本研究结果显示,在各观察时间点,经烟雾致伤液致伤的 PMVECs 增殖活性均被明显抑制,细胞凋亡显著增加,凋亡结果与相关报道^[14]类似。加入 hAMSCs 共培养后,各观察时间点 PMVECs 增殖活性抑制和细胞凋亡被明显逆转。TNF- α 和 IL-6 是炎症和免疫反应中重要的炎症因

子,可激活细胞信号通路,引起细胞分化、异常增殖及多种炎症因子合成等一系列生理生化变化^[31],它们是 ALI 的潜在炎性标志物^[32-33],在体内烟雾致肺损伤^[34-35]及体外其他因素致 PMVECs 损伤^[36-37]相关研究中常作为评价炎症水平的指标。本研究结果表明,经烟雾溶液致伤的 PMVECs TNF- α 和 IL-6 表达水平明显增加,该结果与体内研究中木材烟雾致大鼠吸入性肺损伤肺组织细胞 TNF- α 和 IL-6 的表达趋势相同^[7]。据报道, hAMSCs 可旁分泌表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF)、角质细胞生长因子 (keratinocyte growth factor, KGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor b, bFGF) 等具有调控血管内皮或其他细胞生成、增殖、分化、迁移、凋亡功能的细胞生长因子^[38],此外, KANG 等^[39]发现 hAMSCs 可通过旁分泌作用刺激共培养的外周血单个细胞产生以 IL-10 为代表的抗炎细胞因子,参与细胞炎症调节。SHU 等^[40]也发现 hAMSCs 的上清液可以抑制 LPS 刺激的单核细胞白血病细胞产生 TNF- α 和 IL-1 β ,进一步证明 hAMSCs 可通过旁分泌发挥抗炎作用。由此可推测,本研究 hAMSCs 可能是通过旁分泌各类细胞因子或对烟雾致 PMVECs 损伤发挥了保护作用。

综上所述,木屑烟雾溶液可促进 PMVECs 炎症因子表达,抑制其增殖活性并促进凋亡,加入 hAMSCs 共培养后,可明显降低 PMVECs 炎症因子表达,促进其增殖活性并减少凋亡,从而发挥对烟雾致 PMVECs 损伤的保护作用。hAMSCs 的这些保护作用可能与其旁分泌作用相关。实验结果为进一步明确 hAMSCs 对烟雾吸入致 ALI 的保护机制提供了实验室依据。

参考文献

[1] GALEIRAS R. Smoke inhalation injury; a narrative review[J]. Mediastinum, 2021, 5: 16.

[2] 刘佩华,路潇,李露茜,等. 烟雾吸入性急性肺损伤的临床研究进展[J]. 临床急诊杂志, 2023, 24 (4): 221-224.

[3] KELLY E J, CARNEY B C, OLIVER M A, et al. Endothelial damage occurs early after inhalation injury as measured by increased syndecan-1 levels[J]. J Burn Care Res, 2023, 44 (4): 769-774.

[4] SHI Y, CAO Y, HAN X, et al. iNOS inhibitor S-methylisothiourea alleviates smoke inhalation-induced acute lung injury by suppressing inflammation and macrophage infiltration[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 126: 111097.

- [5] 瞿少伊,金发光,高维,等. 葡萄籽原花青素对大鼠烟雾吸入性肺损伤的保护作用[J]. 现代生物医学进展,2010,10(2):221-223.
- [6] CUI P,XIN H,YAO Y,et al. Human amnion-derived mesenchymal stem cells alleviate lung injury induced by white smoke inhalation in rats[J]. *Stem Cell Res Ther*,2018,9(1):101.
- [7] 李榕生,朱秀连,邓春江,等. 人羊膜间充质干细胞对松木屑烟雾诱导大鼠急性肺损伤的保护作用[J]. 华南国防医学杂志,2022,36(10):765-768.
- [8] PUYANA S,RUIZ S,AMADOR F. The outcomes of inhalation injuries in lesser burns:still a deadly injury[J]. *Eplasty*,2021,21:e7.
- [9] PHELPS M K,OLSON L M,PATEL M,et al. Nebulized heparin for adult patients with smoke inhalation injury:a review of the literature[J]. *J Pharm Technol*,2020,36(4):130-140.
- [10] HOLLEY A D,READE M C,LIPMAN J,et al. There is no fire without smoke! Pathophysiology and treatment of inhalational injury in burns:a narrative review[J]. *Anaesth Intensive Care*,2020,48(2):114-122.
- [11] CHANG J,CHEN Z,ZHAO R,et al. Ion transport mechanisms for smoke inhalation-injured airway epithelial barrier[J]. *Cell Biol Toxicol*,2020,36(6):571-589.
- [12] FUKUDA S,LOPEZ E,IHARA K,et al. Superior effects of nebulized epinephrine to nebulized albuterol and phenylephrine in burn and smoke inhalation-induced acute lung injury[J]. *Shock*,2020,54(6):774-782.
- [13] 曲毅睿,柴家科,胡方超,等. 小鼠烟雾吸入性损伤模型的建立与评估[J]. 解放军医学院学报,2023,44(6):678-684.
- [14] LIU P L,CHEN Y L,CHEN Y H,et al. Wood smoke extract induces oxidative stress-mediated caspase-independent apoptosis in human lung endothelial cells:role of AIF and EndoG[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*,2005,289(5):L739-749.
- [15] 李埏,赵建军,张建勇,等. hAMSCs 调控 MAPK 信号通路对急性肺损伤 AQP1 的影响[J/CD]. 中华肺部疾病杂志(电子版),2023,16(2):156-163.
- [16] NI Y,CHEN Y,JIANG X,et al. Transplantation of human amniotic mesenchymal stem cells up-regulates angiogenic factor expression to attenuate diabetic kidney disease in rats[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*,2023,16:331-343.
- [17] WANG H,TIAN Y,LI X,et al. Amniotic mesenchymal stem cells derived hepatocyte-like cells attenuated liver fibrosis more efficiently by mixed-cell transplantation[J]. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*,2020,12(1):11-24.
- [18] NASEROLESLAMI MABOUTALEB N. Human amniotic membrane mesenchymal stem cells exert cardioprotective effects against isoproterenol (ISO)-induced myocardial injury through suppression of inflammation and modulation of inflammatory MAPK/NF-kappaB pathway[J]. *Cell Tissue Bank*,2022,23(1):67-77.
- [19] GAO S,CHEN T,HAO Y,et al. Exosomal miR-135a derived from human amnion mesenchymal stem cells promotes cutaneous wound healing in rats and fibroblast migration by directly inhibiting LATS2 expression[J]. *Stem Cell Res Ther*,2020,11(1):56.
- [20] WU Y Y,SUN H H,QIN L L,et al. Human amnion-derived mesenchymal stem cells attenuate acute lung injury in two different acute lung injury mice models[J]. *Front Pharmacol*,2023,14:1149659.
- [21] LUO L,ZHOU Y,ZHANG C,et al. Feeder-free generation and transcriptome characterization of functional mesenchymal stromal cells from human pluripotent stem cells[J]. *Stem Cell Res*,2020,48:101990.
- [22] MÜLLER A M,HERMANN S M I,SKRZYŃSKI C,et al. Expression of the endothelial markers PECAM-1 and CD34 in vivo and in vitro[J]. *Exper Mol Pathol*,2002,72(3):221-229.
- [23] GILL S E,TANEJA R,ROHAN M,et al. Pulmonary microvascular albumin leak is associated with endothelial cell death in murine sepsis-induced lung injury in vivo[J]. *PLoS One*,2014,9(2):e88501.
- [24] 徐顺贵,吴国明,徐智,等. 组织块法培养大鼠肺微血管内皮细胞的综合鉴定[J]. 第三军医大学学报,2007,29(1):39-42.
- [25] KING J,HAMIL T,CREIGHTON J,et al. Structural and functional characteristics of lung macro- and microvascular endothelial cell phenotypes[J]. *Microvasc Res*,2004,67(2):139-151.

[26] 蒋玲,胡远东,徐菲菲,等.大鼠肺微血管内皮细胞原代培养方法的改进[J].四川大学学报(医学版),2016,47(5):777-780.

[27] 吕玉珍.人胎盘间充质干细胞源外泌体对急性肺损伤肺血管内皮的影响及其机制研究[D].银川:宁夏医科大学,2022.

[28] SPEES J L,LEE R H,GREGORY C A. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function[J]. Stem Cell Res Ther,2016,7(1): 125.

[29] WANG Y,WU J,CHEN J,et al. Mesenchymal stem cells paracrine proteins from three-dimensional dynamic culture system promoted wound healing in third-degree burn models[J]. Bioeng Transl Med,2023,8(6):e10569.

[30] ULPIANO C,DASILVAC L,MONTTEIRO G A. Mesenchymal stromal cells (MSCs): a promising tool for cell-based angiogenic therapy[J]. Curr Gene Ther,2021,21(5):382-405.

[31] 林中民,陈国荣,张泉波,等.髓样分化蛋白 2 基因沉默对高糖诱导的大鼠心肌细胞增殖抑制、凋亡及炎症反应的影响[J].中国应用生理学杂志,2019,35(3):273-279.

[32] MOKRA D,KOSUTOVA P. Biomarkers in acute lung injury[J]. Respir Physiol Neurobiol, 2015,209:52-58.

[33] 刁一芮,丁奇,史渊源.模式识别受体 PRRs 在急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征发病机制中的作用研究进展[J].中国免疫学杂志,2022,38(2):227-233.

[34] ENKHBAATAR P,PRUITT B A JR,SUMAN

O, et al. Pathophysiologyresearch challenges and clinical management of smoke inhalation injury[J]. Lancet, 2016, 388 (10052): 1437-1446.

[35] 李和林,吕琪,肖培欣,等.西维来司钠对烟雾吸入性肺损伤大鼠早期炎症反应的影响[J].天津医药,2017,45(9):916-919.

[36] WANG QHUANG YFU Z. Bone mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-26a-3p promotes autophagy to attenuate LPS-induced apoptosis and inflammation in pulmonary microvascular endothelial cells [J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2024,70(2):104-112.

[37] 金巧艳,曾明华,谭延振,等. CTRP9 抑制低氧环境下肺微血管内皮细胞 IL-6 和 TNF- α 表达的研究[J].心脏杂志,2017,29(4):399-404.

[38] 骆雪,李文晶,李天舒,等.人羊膜间充质干细胞旁分泌与自分泌作用的研究进展[J].中国医科大学学报,2018,47(7):641-645.

[39] KANG J W,KOO H,CHWANG S Y, et al. Immunomodulatory effects of human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells [J]. J Vet Sci,2012,13(1):23-31.

[40] SHU J,HE X,ZHANG L, et al. Human amnion mesenchymal cells inhibit lipopolysaccharide-induced TNF-alpha and IL-1beta production in THP-1 cells[J]. Biol Res,2015,48:69.

(收稿日期:2024-01-14 修回日期:2024-08-28)
(编辑:姚雪)

(上接第 3526 页)

[39] KEDZIOR K K,KAPLAN I. Tai Chi and Parkinson's disease (PD): a systematic overview of the scientific quality of the past systematic reviews[J]. Complement Ther Med,2019,46: 144-152.

[40] MAILANKODY P,VARAMBALLY S,THE-NNARASU K, et al. The rationale of Yoga in Parkinson's disease: a critical review[J]. Neurol India,2021,69(5):1165-1175.

[41] MACHADO SOTOMAYOR M J,ARUFEG-IRÁLDEZ V,RUÍZ-RICO G, et al. Music therapy and Parkinson's Disease: a systematic review from 2015 — 2020[J]. Int J Environ Res Public Health,2021,18(21):11618.

[42] CUCCA A,DI ROCCO A,ACOSTA I, et al.

Art therapy for Parkinson's disease[J]. Parkinsonism Relat Disord,2021,84:148-154.

[43] MIRABELLA G,DE VITA P,FRAGOLA M, et al. Theatre is a valid add-on therapeutic intervention for emotional rehabilitation of Parkinson's disease patients[J]. Parkinsons Dis, 2017,2017:7436725.

[44] PUYJARINET F,BÉGEL V,GENY C, et al. At-home training with a rhythmic video game for improving orofacial, manual, and gait abilities in Parkinson's disease: a pilot study[J]. Front Neurosci,2022,16:874032.

(收稿日期:2024-05-01 修回日期:2024-09-13)
(编辑:管佩钰)