

# Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路在骨髓间充质干细胞治疗内毒素致急性肺损伤中的作用

徐道剑 张琳 黎俊 张静 何岱昆 钟志越 申捷

**【摘要】目的** 探讨 Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路在骨髓间充质干细胞 (MSCs) 治疗急性肺损伤中的作用。**方法** 采用 6 只 SPF 雄性进行贴壁分离法分离培养骨髓间充质干细胞。采用细菌脂多糖 (LPS) 诱导急性肺损伤, 72 只 6 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量约 180 ~ 220 g, 随机 (随机数字法) 分为 4 组, 分别为: Control 组 ( $n=18$ ) 采用 PBS 处理; LPS 组 ( $n=18$ ) 采用细菌脂多糖诱导急性肺损伤; LPS + MSCs 组 ( $n=18$ ) 在进行急性肺损伤的诱导后直接移植 MSCs; Control + MSCs 组 ( $n=18$ ) 在注射 PBS 后再移植 MSCs。每组分别取 LPS 注射后 6、24 和 48 h 三个时间点。通过肺组织免疫组化分析及免疫印迹分析法检测 Wnt 信号通路成分的水平。实时定量 PCR 检测 Wnt 信号通路的靶基因的表达水平。**结果** 相比于 PBS 对照组, 移植 MSCs 的能够显著降低急性肺损伤大鼠的湿干比, 同时能显著提高急性肺损伤大鼠的血氧分压的水平。通过组织免疫组化分析, 发现 Wnt5a 在急性肺损伤的肺组织中表达水平有显著的升高, 移植的 MSCs 能够显著降低 Wnt5a 的水平。免疫印迹结果显示 MSCs 能够通过降低 GSK-3 $\beta$  的磷酸化和  $\beta$ -catenin 水平起到治疗的作用。通过实时定量 PCR 的结果显示 MSCs 处理能够显著降低 Wnt 信号靶基因 Vegf、Axin2 及 Kl4 的表达。**结论** MSCs 对急性肺损伤的治疗作用是通过影响 Wnt5a 的水平, 降低 GSK-3 $\beta$  和  $\beta$ -catenin 的磷酸化及提高 Wnt 信号靶基因的表达得以发挥的, Wnt 信号通路参与到 MSCs 治疗急性肺损伤的过程中。

**【关键词】** 急性肺损伤; 内毒素; 间充质干细胞; Wnt/ $\beta$ -Catenin

**The role of Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling pathway in the endotoxin-induced acute lung injury during the treatment with mesenchymal stem cells** Xu Daojian, Zhang Lin, Li Jun, Zhang Jing, He Daikun, Zhong Zhiyue, Shen Jie. Emergency & Intensive Care Centre for Chemical Accident of Jinshan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 201508, China.

Corresponding author: Shen Jie, Email: j1999sh@163.com

**【Abstract】Objective** To investigate the role of Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling pathway in the endotoxin induced acute lung injury (ALI) during the treatment by mesenchymal stem cells (MSCs). **Methods** Six SPF male SD rats were isolated and bone marrow mesenchymal stem cells were cultured. A total of 72 SPF male SD rats with 6-week-old were randomly (random number) divided into 4 groups; control group ( $n=18$ ) in which phosphate buffered solution (PBS) used instead of lipopolysaccharide (LPS); LPS group ( $n=18$ ) in which LPS used to induce acute lung injury; LPS + MSCs group ( $n=18$ ) in which MSCs directly transplanted after injection of LPS; Control + MSCs group ( $n=18$ ) in which MSCs transplanted after injection of PBS. And then 6 rats of each group were sacrificed at 6 h, 24 h, and 48 h separately after injection of LPS. At 24 h after the modeling, lung tissue was taken and the levels of Wnt signaling pathway components were detected by using immunohistochemistry and Western blot. In addition, quantitative real-time PCR was used to detect the expression of Wnt signaling pathway target genes. **Results** Compare with

the PBS control group, significant decrease in lung dry-to-wet ratio and increase in arterial oxygen partial pressure ( $\text{PaO}_2$ ) were found in MSCs transplantation groups. According the immunohistological results, Wnt 5a was significantly increased in the LPS-induced ALI rats and decreased after MSCs transplantation. Moreover, decrease in levels of GSK-3 $\beta$  phosphorylation and  $\beta$ -catenin was found in the lung tissue after MSCs transplantation. In addition, the expressions of Wnt signaling target genes Vegf, Axin2 and Klf4 were decreased significantly after MSCs transplantation. **Conclusions** In the setting of ALI, the therapeutic effect of MSCs was exerted by decreasing the expressions of Wnt 5a, GSK-3 $\beta$  phosphorylation,  $\beta$ -catenin, and Wnt signaling target genes Vegf, Axin2 and Klf4. Wnt signaling implicated in the therapeutic effect of MSC in the setting of ALI.

**【Key words】** Acute lung injury; Endotoxin; Mesenchymal stem cells; Wnt/ $\beta$ -Catenin

急性肺损伤及其重症形式急性呼吸窘迫综合征是发生肺部的一种重症炎症反应，是导致重症患者发生呼吸衰竭的主要原因。它们能够引起肺泡破损并导致不同程度的通气灌注不足、严重低氧血症、肺顺应性差及非心源性肺水肿<sup>[1]</sup>。急性肺损伤可能由多种病因导致，包括败血症、肺炎及输血相关的外伤等。其中败血症（尤其是革兰阴性菌导致的）是导致急性肺损伤的主要原因之一<sup>[2]</sup>。目前，对于急性肺损伤的患者来说，并没有很好的治疗的方法，通常需要采取呼吸支持来进行处理<sup>[3]</sup>。尽管近年来在呼吸支持系统上取得了一些进步，但是由急性肺损伤（不同病因导致）引起的死亡仍有约 40% 左右<sup>[1]</sup>。因此有必要去研究寻找治疗急性肺损伤的方法。近年来的研究发现，间充质干细胞（MSCs）作为一种成体干细胞，能够进行自我更新及多向分化<sup>[4]</sup>。它们可以从多种成体组织中进行分离获得，并且能够在体外进行扩增培养。此外，间充质干细胞还具有免疫耐受的特性<sup>[5]</sup>，这为它们进行移植治疗提供了便利。近年来的有研究证实，骨髓来源的间充质干细胞能够缓解脂多糖引起的急性肺损伤<sup>[6-8]</sup>，但对于 MSCs 在急性肺损伤中的治疗效应的相关机制并未深入研究。Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路在组织损伤修复、伤口愈合、组织纤维化、组织重构及破坏中发挥着重要的作用<sup>[9]</sup>。一些研究证实 Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号失调与多种疾病的发生发展有关，包括有哮喘、肺纤维化<sup>[10]</sup>、慢性阻塞性肺气肿<sup>[11]</sup>及肺癌<sup>[12]</sup>。此外，Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号被认为还参与到间充质干细胞的分化过程中，其中就包括有间充质细胞向上皮细胞的分化<sup>[13]</sup>。而这种对间充质干细胞向上皮细胞调控的过程可能参与到了肺损伤的修复及肺纤维化的过程中。本研究通过体外培养骨髓间充质干细胞同时建立急性肺损伤的模型，来探讨 Wnt/ $\beta$ -

Catenin 信号的组成成分在急性肺损伤中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及试剂

1.1.1 实验动物与分组 6 只 3 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠，体质量 60 g；72 只 6 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠，体质量 180 ~ 220 g。购自第二军医大学实验动物中心。在标准动物饲养间内，给予无菌水和食物饲养。

1.1.2 主要试剂 无血清低糖 DMEM、胎牛血清购自美国 ScienCell 公司。O55: B5 剂型的 LPS 购自 Sigma 公司。Wnt1、Wnt 5a 单克隆抗体及抗体 p-GSK-3 $\beta$ 、GSK-3 $\beta$  及  $\beta$ -catenin 均购自 Abcam 公司；Wnt 3a 单克隆抗体购自 Cell signalling 公司；蛋白裂解液购自碧云天公司；BCA 蛋白定量试剂盒、化学分光底物、苏木精-伊红购自北京化学试剂公司。其他生化试剂均为进口分装或国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 大鼠 MSCs 培养 采用贴壁法分离培养 MSCs，方法如前文所述。简述如下：将大鼠经断颈处死后，无菌分离股骨和胫骨。采用注射器将骨髓从骨髓腔内冲出，收集悬液通过离心沉淀。采用无血清低糖 DMEM 洗涤两次后，采用含 20% 胎牛血清的低糖 DMEM 并将细胞置于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 的条件下进行培养。细胞的表型鉴定采用流式细胞仪进行。收集 4 ~ 5 代的细胞用于急性肺损伤的治疗。

1.2.2 实验分组 总共 72 只大鼠随机（随机数字法）分成 4 组，每组 18 只。具体分组如下：Control 组经右侧尾静脉注射 0.4 mL PBS；LPS 组经右侧尾静脉注射 8 mg/kg 细菌脂多糖（LPS）；LPS + MSC 组经右侧尾静脉注射 8 mg/kg 细菌脂多糖（LPS）之后，再经左侧注射  $1 \times 10^6$  个 MSCs；

Control + MSC 组经右侧尾静脉注射 0.4 mL PBS 之后,再经左侧注射  $1 \times 10^6$  个 MSCs。在模型建立后的 6 h、24 h 及 48 h 分别处死大鼠用于后续的分析。

**1.2.3 肺湿干比检测** 将新鲜分离的肺组织经 PBS 洗涤去除残留血块后进行称量,计作湿质量。随后将肺组织经 80 °C 烤箱烘烤至恒重再次进行称量,计作干质量。两者的比值即为肺湿干比。

**1.2.4 部分动脉氧分压 (PaO<sub>2</sub>) 检测** 通过一次性注射器采集大鼠动脉血 0.2 mL,采用血气分析仪 ABL80 (丹麦雷度公司)按照厂商说明进行检测。

**1.2.5 HE 染色** 各组肺组织 10% 中性甲醛固定后石蜡包埋切片,苏木素-伊红 (北京化学试剂公司)染色后光镜下观察拍照。

**1.2.6 免疫组织化学** 分别用 Wnt1、Wnt 3a、Wnt 5a 单克隆抗体 (Cell signaling 公司)进行免疫组织化学染色。具体步骤如下:脱蜡、抗原修复后,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育 10 min,滴加封闭用正常血清,之间 PBS 洗 3 遍,每遍 10 min。室温孵育 1 h 后,滴加适当 1:50 稀释的一抗,4 °C 过夜。PBS 冲洗后,滴加辣根酶标记二抗,室温 1 h。PBS 冲洗后,DAB 显色剂显色,镜下控制反应时间并及时终止反应。显微镜下观察阳性肺泡上皮细胞,并用数码相机拍照,采用 Image-Pro Plus 6.0 分析系统对切片进行图像分析。每张切片测定 5 个视野 ( $\times 200$ ),取均数作为测定值。空白对照采用抗体稀释液代替一抗。

**1.2.7 免疫印迹** 获得肺组织进行匀浆并采用碧云天公司生产的蛋白裂解液进行裂解,并通过 12 000 r/min 离心 10 min 后去上清液进行蛋白定量。蛋白定量采用 Pierce 公司生产的 BCA 蛋白定量试剂盒进行。将蛋白溶液与适当体积的载样缓冲液混合后于 100 °C 煮沸 5 min。蛋白样品采用十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,随后将蛋白胶通过转膜反应转移到 PVDF 膜上。采用 5% 脱脂奶粉 TBST 溶液封闭 1 h 后,与一抗 4 °C 孵育过夜,通过 TBST 洗涤 3 遍后与带有辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h。通过 TBST 洗涤 3 遍后采用 Pierce 公司的化学分光底物在 X 线片上进行曝光。蛋白水平的相对定量采用美国国立卫生院所提供的 Image J 软件进行。本文中所用到的抗体 p-GSK-3 $\beta$ 、GSK-3 $\beta$  及  $\beta$ -catenin 购自美国 Cell

signaling 公司。GAPDH 被作用内参在免疫印迹中进行使用。

**1.2.8 实时定量 PCR** 依 RNA 提取试剂盒说明书,提取肺组织 RNA。取 RNA 样品,按 RNA 逆转录试剂盒说明书,配制反转录反应液,42 °C 保温 2 h,95 °C 保温 15 min 后冰上冷却,得到 cDNA。按实时定量 PCR 试剂盒说明书在冰上准备 50  $\mu$ L PCR 扩增反应体系:2XSYBR 25  $\mu$ L,上、下游引物各 1  $\mu$ L,cDNA 2  $\mu$ L,双蒸水 20.7  $\mu$ L,Taq DNA Polymerase 0.3  $\mu$ L。在 PCR 仪上反应,条件:预孵育 95 °C 120 s;扩增 95 °C 20 s、59 °C 25 s、72 °C 30 s,45 个循环;溶解曲线 95 °C 20 s。反应结束后,确认 real-time PCR 的扩增曲线和溶解曲线,得到每个样本的 Ct 值。GAPDH 作为内参照,利用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  公式计算 Vegf、Axin2、Cyclin D1 和 Klf4 mRNA 表达情况。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计软件对文中的数据进行处理。所有的数据采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。多组间的比较采用方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠间充质干细胞的分离培养及鉴定

在骨髓细胞接种后 3 d 第一次换液,可见少量细胞贴壁成克隆样生长。随着生长时间的延长,细胞逐渐融合成漩涡状,在培养的第 14 天可见融合度为 90% 左右的成纤维样细胞 (图 1A)。经流式检测确认,所获得的细胞为 CD34 阴性、CD45 阴性、CD29 阳性、CD44 阳性及 CD90 阳性 (图 1B)。这与国际细胞治疗协会 (International Society for Cellular Therapy, ISCT) 提出的标准及文献报道的间充质干细胞的表型相符<sup>[14-15]</sup>。

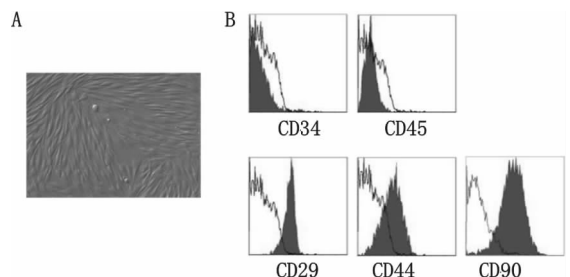
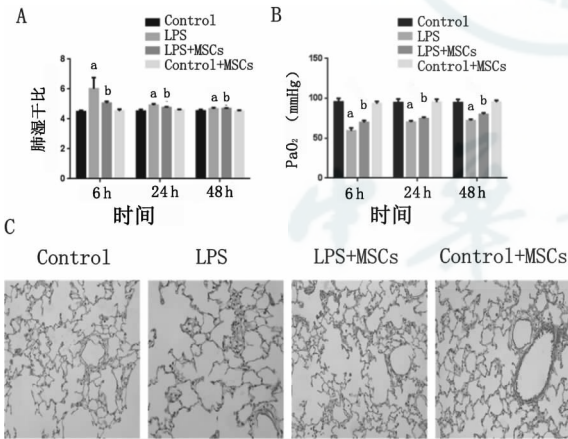


图 1 间充质干细胞的形态特征 (A) 及表型鉴定 (B)  
Fig 1 Mesenchymal stem cells morphology (A) and flow identification (B)

## 2.2 骨髓间充质干细胞缓解内毒性引起的急性肺损伤

肺湿干比的结果显示 (图 2A), LPS 组的湿干比在 6 h [ (6.02 ± 0.74) vs. (4.48 ± 0.10),  $P < 0.05$  ], 24 h [ (4.91 ± 0.10) vs. (4.50 ± 0.10),  $P < 0.05$  ] 和 48 h [ (4.70 ± 0.10) vs. (4.51 ± 0.10),  $P < 0.05$  ] 均显著高于 Control 组。相比于 LPS 组, LPS + MSC 组的湿干比在 6 h [ (6.02 ± 0.74) vs. (5.01 ± 0.10),  $P < 0.05$  ] 及 24 h [ (4.91 ± 0.10) vs. (4.75 ± 0.06),  $P < 0.05$  ] 时均显著下降, 而在 48 h 两者差异无统计学意义。PaO<sub>2</sub> 的结果显示 (图 2B): LPS 组在 6 h [ (59.13 ± 3.72) vs. (95.50 ± 4.54),  $P < 0.05$  ], 24 h [ (70.00 ± 1.77) vs. (94.62 ± 4.57),  $P < 0.05$  ] 和 48 h [ (71.75 ± 2.12) vs. (94.50 ± 4.14),  $P < 0.05$  ] 均显著低于 Control 组。相比于 LPS 组, LPS + MSC 组在 6 h [ (59.13 ± 3.72) vs. (69.93 ± 2.62),  $P < 0.05$  ], 24 h [ (70.00 ± 1.77) vs. (74.50 ± 1.85),  $P < 0.05$  ] 和 48 h 时 [ (71.75 ± 2.12) vs. (79.75 ± 2.12),  $P < 0.05$  ] 均显著低升高。肺组织切片结果显示 (图 2C): 经过 MSCs 治疗后, 肺组织水肿有所减轻, 只有少量中性粒细胞浸润。



与 Control 比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 LPS 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

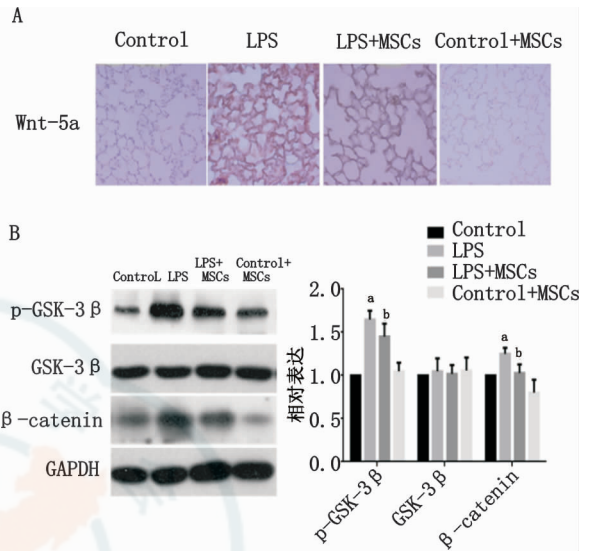
图 2 各组肺湿干比、动脉氧分压比较及肺组织 HE 染色结果 (× 200)

Fig 2 The lung wet to dry ratio, arterial oxygen partial pressure and lung tissue HE staining comparison (× 200)

## 2.3 Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路参与到 ALI 的修复中

通过免疫组化实验, 笔者发现 Wnt 5a 的水平在发生 ALI 后会有显著的上升, 而在经过 MSCs 移植的肺组织中有显著的下降 (图 3A)。笔者并没

有观察到其他 Wnt 配体在肺组织中的表达 (数据未显示)。此外, 通过免疫印迹实验, 还发现 MSCs 能够显著下调 p-GSK-3 $\beta$  和  $\beta$ -catenin 的水平, 从而发挥对 ALI 的治疗的作用 (图 3B)。



与 Control 比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 LPS 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; A: Wnt5a 在肺组织中的表达; B: Wnt 信号通路胞内分子的免疫印迹分析

图 3 各组 24 h 时间点肺组织 Wnt 信号通路参与成分分析  
Fig 3 Composition analysis of lung tissue Wnt signaling pathway at 24 h among each group

## 2.4 Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路相关靶基因的表达

通过实时定量 PCR, 对 Wnt 信号通路的靶基因水平进行检测, 结果显示, 在发生 ALI 的大鼠中 Vegf、Axin2、Klf4 及 Cyclin D1 均显著上升 (图 4); 而在经过 MSCs 处理的 ALI 大鼠肺组织中, Vegf、Axin2、及 Klf4 均有显著下降, 而 Cyclin D1 却有显著的上升 (图 4)。

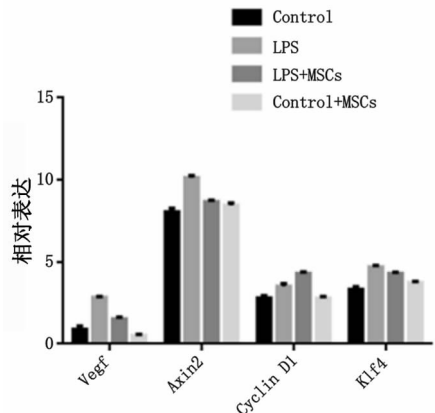


图 4 Wnt 信号通路相关靶基因的表达情况

Fig 4 The expression of Wnt signaling pathway target genes

### 3 讨论

在本项研究中,采用贴壁分离法成功分离培养骨髓间充质干细胞,然后通过尾静脉注射细菌脂多糖构建大鼠急性肺损伤模型,采取骨髓 MSCs 对急性肺损伤进行治疗。在此过程中,笔者对 Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路的组成成分进行了分析,结果显示, Wnt 信号通路配体 Wnt 5a 参与到了间充质干细胞治疗急性肺损伤的过程中。此外, Wnt 信号通路胞内分子 GSK-3 $\beta$  的磷酸化和  $\beta$ -catenin 的水平也参与到了该过程中。此外,在经过 MSCs 治疗的急性肺损伤大鼠中, Wnt 信号通路的靶基因 Vegf、Axin2、及 Klf4 均有显著下降,而 Cyclin D1 却有显著地上升。本研究初步证实 Wnt 信号通路的配体,胞内分子及相关靶基因在 MSCs 治疗内毒素性急性肺损伤的过程中发挥着作用。

LPS 诱导的肺损伤是目前常用的模拟人体急性肺损伤的模型。通过给大鼠尾静脉注射细菌脂多糖可以引起急性肺损伤,而且这种肺损伤与人体急性肺损伤的情况比较类似,都有包括肺炎等症状的出现<sup>[16]</sup>。细菌可以通过释放纤毛毒素、肺炎球菌溶血素、内毒素和免疫球蛋白 A 蛋白酶等,中和黏膜的清除作用,活化肺泡巨噬细胞、中性粒细胞及上皮细胞来实现急性炎症反应<sup>[17]</sup>。研究认为,在 LPS 注射的 6~48 h 内,肺的生理结构的变化最为显著<sup>[18]</sup>。因此本研究采取 6、24 及 48 h 三个时间点作为观察肺结构变化及检测肺湿干比、PaO<sub>2</sub> 的时间点。本研究观察到 LPS 损伤组中肺湿干比在这 3 个不同的时间点都显著高于 Control 组;此外在 LPS 组中 3 个时间点的 PaO<sub>2</sub> 均显著低于 Control 组。肺组织病理结构观察发现, LPS 损伤组的肺组织在不同时间点均出现肺泡结构的破坏、肺间质的增宽、肺水肿及炎症细胞浸润的现象。这些结果显示已经正确的建立了急性肺损伤的大鼠模型。而在进行 MSCs 注射后,发现肺水肿及损伤的情况有显著的降低。该结果与他人所报道的结果一致<sup>[19]</sup>。

研究显示, Wnt 信号通路被认为参与到了人体多种生理过程中。越来越多证据显示,在肺纤维化疾病中,博来霉素引起的病理性肺纤维化过程中及伤口损伤修复的过程中均有 Wnt 信号的参与<sup>[20]</sup>。近来的研究显示在肺损伤发生后, Wnt 信号的过度激活可能导致细胞外基质成分的过度释放,从而引

起肺纤维化<sup>[21]</sup>。此外, Wnt 信号的活化能够刺激肺上皮细胞的过度增殖及胶原的合成<sup>[22]</sup>。这些研究均证实 Wnt 信号在肺损伤中有重要的作用。本实验结果显示, MSC 治疗能够显著降低 Wnt 配体 Wnt 5a 的水平。Villar 等<sup>[23]</sup>的研究证实在败血症导致的急性肺损伤中, Wnt 5a 的水平有显著地增加,而 MSCs 可以降低 Wnt 5a 的水平,这可能是通过抑制活化细胞的分泌作用而发挥效应的。此外, Li 等<sup>[24]</sup>的研究证实抑制 Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路能够保护肺泡巨噬细胞避免由脂多糖引起的凋亡。Sun 等<sup>[25]</sup>的研究发现抑制 Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路能够促进 MSCs 向肺损伤归巢从而更好的达到修复的作用。本研究检测到胞内的 Wnt 信号通路分子 GSK-3 $\beta$  的磷酸化和  $\beta$ -catenin 的表达水平在 MSCs 处理后均有显著的下降。

Vegf、Axin2、Cyclin D1 和 Klf4 作为 wnt 信号通路的靶基因。在 Wnt 信号传导通路中, Axin 作为一种构架 (scaffold) 蛋白参与 APC/Axin/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin 复合体的形成,促进 Wnt 通路的关键因子  $\beta$ -catenin 磷酸化,并最终通过泛素蛋白酶体途径降解,使 wnt 通路处于低活性状态<sup>[26]</sup>。细胞周期素 D1 (Cyclin D1) 是一种原癌基因,可以与 CDK4 结合,磷酸化 Rb,进而启动 S 期相关基因的转录,使细胞由 G1 期进入 S 期。研究表明,抑制 Cyclin D1 基因表达后,能够明显抑制血管内皮生长因子的表达<sup>[27]</sup>。VEGF 刺激血管内皮细胞的增殖、迁移,对血管生成 (angiogenesis) 起主要作用,研究证实 VEGF 是肺血管发育过程中不可或缺的调节因子,参与了 BPD (Broncho-Pulmonary Dysplasia) 病理发生,对肺发育起着重要作用<sup>[28]</sup>。Krtippel 样因子 4 (KLF4),也称为胃肠富集 Krtippel 样因子 (gut-enrich Krtippel like factor, GSKLF),最近有研究发现 klf4 与肺损伤相关<sup>[29]</sup>。

在 Villar 等<sup>[30]</sup>的另一项研究中显示,在发生肺纤维化的情况下, Wnt 信号通路的分子包括 Vegf、Axin2、Cyclin D1 和 Klf4 发生活化。同时,笔者对 Wnt 信号通路的靶分子进行了检测,结果与他们的结果一致。另外在进行 MSCs 处理的大鼠中,本研究发现, Vegf、Axin2、及 Klf4 均有显著下降,而 Cyclin D1 却有显著的上升。说明 Wnt 信号通路受到抑制。

综上所述,本研究初步阐明 MSCs 对急性肺损伤的治疗作用是通过影响 Wnt5a 的水平,降低

GSK-3 $\beta$  和  $\beta$ -catenin 的磷酸化及提高 Wnt 信号靶基因的表达得以发挥的, Wnt 信号通路参与到 MSCs 治疗急性肺损伤的过程中。调控 Wnt 信号通路的活化可能可以作为治疗急性肺损伤治疗的新靶点。

### 参 考 文 献

- [1] 陆月明, 孙波. 急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征临床流行病学研究进展 [J]. 中华急诊医学杂志, 2003, 12 (1): 65-66.
- [2] Sheu CC, Gong MN, Zhai R, et al. Clinical characteristics and outcomes of sepsis-related vs non-sepsis-related ARDS [J]. Chest, 2010, 138 (3): 559-567.
- [3] Walkey AJ, Sumner R, Ho V, et al. Acute respiratory distress syndrome: epidemiology and management approaches [J]. Clin Epidemiol, 2012, 4: 159-169.
- [4] Prockop DJ, Kota DJ, Bazhanov N, et al. Evolving paradigms for repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs) [J]. J Cell Mol Med, 2010, 14 (9): 2190-2199.
- [5] Moodley Y, Manuelpillai U, Weiss DJ. Cellular therapies for lung disease: a distant horizon [J]. Respirology, 2011, 16 (2): 223-237.
- [6] 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.
- [7] Krasnodembskaya A, Song Y, Fang X, et al. Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37 [J]. Stem Cells, 2010, 28 (12): 2229-2238.
- [8] 张心灵, 陈力, 黎檀实, 等. 间充质干细胞在肺组织损伤及修复中的研究进展 [J]. 中华急诊医学杂志, 2008, 17 (10): 1116-1118.
- [9] Pongracz JE, Stockley RA. Wnt signalling in lung development and diseases [J]. Respir Res, 2006, 7: 15.
- [10] Konigshoff M, Balsara N, Pfaff EM, et al. Functional Wnt signaling is increased in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. PLoS One, 2008, 3 (5): e2142.
- [11] Baarsma HA, Spanjer AI, Haitsma G, et al. Activation of WNT/ $\beta$ -catenin signaling in pulmonary fibroblasts by TGF- $\beta$  (1) is increased in chronic obstructive pulmonary disease [J]. PLoS One, 2011, 6 (9): e25450.
- [12] Uematsu K, He B, You L, et al. Activation of the Wnt pathway in non small cell lung cancer: evidence of dishevelled overexpression [J]. Oncogene, 2003, 22 (46): 7218-7221.
- [13] Wang Y, Sun Z, Qiu X, et al. Roles of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in epithelial differentiation of mesenchymal stem cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 390 (4): 1309-1314.
- [14] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. Cytotherapy, 2006, 8 (4): 315-317.
- [15] Zhang XD, Hai CX, Cai FL, et al. Time course for expression of VEGF and its receptor and regulator levels of contraction and relaxation in increased vascular permeability of lung induced by phosgene [J]. Inhal Toxicol, 2008, 20 (9): 805-812.
- [16] Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008, 295 (3): L379-L399.
- [17] Rojas M, Woods CR, Mora AL, et al. Endotoxin-induced lung injury in mice: structural, functional, and biochemical responses [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 288 (2): L333-341.
- [18] Xu F, Droemann D, Rupp J, et al. Modulation of the inflammatory response to Streptococcus pneumoniae in a model of acute lung tissue infection [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008, 39 (5): 522-529.
- [19] Shalaby SM, El-Shal AS, Abd-Allah SH, et al. Mesenchymal stromal cell injection protects against oxidative stress in Escherichia coli-induced acute lung injury in mice [J]. Cytotherapy, 2014, 16 (6): 764-775.
- [20] Ling L, Nurcombe V, Cool SM. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells [J]. Gene, 2009, 433 (1/2): 1-7.
- [21] Scotton CJ, Chambers RC. Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus [J]. Chest, 2007, 132 (4): 1311-1321.
- [22] Iwano M, Plieth D, Danoff TM, et al. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis [J]. J Clin Invest, 2002, 110 (3): 341-350.
- [23] Villar J, Cabrera-Benitez NE, Ramos-Nuez A, et al. Early activation of pro-fibrotic WNT5A in sepsis-induced acute lung injury [J]. Crit Care, 2014, 18 (5): 568.
- [24] Li B, Zhang H, Zeng M, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells protect alveolar macrophages from lipopolysaccharide-induced apoptosis partially by inhibiting the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway [J]. Cell Biol Int, 2015, 39 (2): 192-200.
- [25] Sun Z, Gong X, Zhu H, et al. Inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling promotes engraftment of mesenchymal stem cells to repair lung injury [J]. J Cell Physiol, 2014, 229 (2): 213-224.
- [26] Bode H. Axis formation in hydra [J]. Annu Rev Genet, 2011, 45: 105-117.
- [27] Yasui M, Yamamoto H, Ngan CY, et al. Antisense to cyclin D1 inhibits vascular endothelial growth factor-stimulated growth of vascular endothelial cells: implication of tumor vascularization [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12 (15): 4720-4729.
- [28] 王玲, 封志纯, 吕回. 血管内皮生长因子和血管生成素-1 在高氧诱导新生鼠支气管肺发育不良的表达及其对肺发育的影响 [J]. 实用医学杂志, 2014 (4): 525-528.
- [29] Zahlten J, Steinicke R, Bertrams W, et al. TLR9- and Src-dependent expression of Krueppel-like factor 4 controls interleukin-10 expression in pneumonia [J]. Eur Respir J, 2013, 41 (2): 384-391.
- [30] Villar J, Cabrera NE, Valladares F, et al. Activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway by mechanical ventilation is associated with ventilator-induced pulmonary fibrosis in healthy lungs [J]. PLoS One, 2011, 6 (9): e23914.

(收稿日期: 2015-06-18)

(本文编辑: 郑辛甜)