



# 不同数目骨髓间充质干细胞移植对大鼠肺损伤的抑制作用

赵科研<sup>1</sup>, 王辉山<sup>1</sup>, 侯明晓<sup>1</sup>, 孙江滨<sup>2</sup>, 吴慧颖<sup>2</sup>, 柳克祥<sup>2</sup>

(1. 中国人民解放军沈阳军区总医院心血管外科, 沈阳 110016;  
2. 吉林大学第二医院心血管外科, 长春 130041)

**【摘要】** 目的 研究不同数目的骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)静脉移植对野百合碱(monocrotaline, MCT)诱导大鼠肺损伤的抑制作用。方法 全骨髓贴壁法培养Wistar大鼠MSCs,取第3~5代细胞进行移植。健康雄性Wistar大鼠20只由颈外静脉移植MSCs,按移植细胞个数分为 $5 \times 10^5$ 组、 $1 \times 10^6$ 组、 $5 \times 10^6$ 组和对照(生理盐水)组( $n=5$ )。测定移植前、移植后5 min、30 min及24 h的RVSP。另40只随机分组( $n=10$ ):①MCT/MSCs  $5 \times 10^5$ 组;②MCT/MSCs  $1 \times 10^6$ 组;③MCT组;④对照组。腹腔注射60 mg/kg<sup>M</sup>CT(对照组注射等量生理盐水),同时分别移植MSCs  $5 \times 10^5$ 个、 $1 \times 10^6$ 个或等量PBS液体。4周后检测大鼠右心室收缩压(right ventricular systolic pressure, RVSP)、RV/(LV+S)重量比值;肺组织苏木素-伊红染色、地衣红染色和平滑肌Actin免疫组织化学染色。统计数据采用SPSS 11.0软件,对各组数据进行单因素方差分析检验。结果 少于 $1 \times 10^6$ 个MSCs颈外静脉移植是安全的。MSCs颈外静脉移植4周后,MCT/MSCs  $1 \times 10^6$ 组RVSP( $35.6 \pm 8.4$ ) mmHg与MCT组( $47.2 \pm 10.5$ ) mmHg相比明显下降( $P < 0.05$ ),心室比 $0.3572 \pm 0.0923$ 明显低于MCT组 $0.4454 \pm 0.0935$ ( $P < 0.05$ ),而MCT/MSCs  $5 \times 10^5$ 组RVSP为( $42.5 \pm 11.3$ ) mmHg,心室比 $0.4003 \pm 0.0725$ ,与MCT组相比无明显下降(两者 $P > 0.05$ );病理染色可见肺组织肺小动脉中,MCT/MSCs  $1 \times 10^6$ 组中膜厚度分布为( $19.2 \pm 3.8$ )%较MCT组( $26.4 \pm 4.9$ )%明显变薄( $P < 0.05$ );而MCT/MSCs  $5 \times 10^5$ 组( $23.3 \pm 3.6$ )%较MCT组相比无显著差异( $P > 0.05$ )。结论 MSCs颈外静脉移植对MCT诱导的肺损伤具有抑制作用, $1 \times 10^6$ 个细胞较 $5 \times 10^5$ 个细胞移植抑制作用显著。

**【关键词】** 骨髓间充质干细胞;野百合碱;肺动脉高压;细胞移植

**【中图分类号】** R541.5; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1001-7488(2012)01-0034-05

doi: doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.001.002

## Preventive Effects of Different Number of Mesenchymal Stem Cells Transplantation on Lung Injury in Rats

ZHAO Ke-yan<sup>1</sup>, WANG Hui-shan<sup>1</sup>, HOU Ming-xiao<sup>1</sup>, SUN Jiang-bin<sup>2</sup>, WU Hui-ying<sup>2</sup>, LIU Ke-xiang<sup>2</sup>,

(1. Department of Cardiovascular Surgery, General Hospital of Shenyang Military District, Shenyang 110016, China;

2. Department of Cardiovascular Surgery, The Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China)

**【Abstract】 Objective** To observe effects on lung injury after different number of mesenchymal stem cells transplantation in rats. **Methods** MSCs of Wistar rats were isolated and cultivated by bone marrow adherent culture. The cells between the third and fifth passages were prepared for transplantation. 20 male Wistar rats were divided into four

[基金项目] 全军十一五课题资助项目(08G004);辽宁省自然科学基金计划资助项目(2010010427-401)。

[作者简介] 赵科研(1975-),男,主治医师,博士,研究方向:复杂先心病及肺动脉高压的治疗。

[通讯作者] 柳克祥, E-mail: kxliu64@hotmail.com。

groups by the number of MSCs transplanted intravenously: the  $5 \times 10^5$  group, the  $1 \times 10^6$  one, the  $5 \times 10^6$  one and the control one ( $n = 5$ ). RVSPs were measured at the time of pre-transplantation, 5 min, 30 min and 24 h post-transplantation. The other 40 rats were randomly divided into four groups: ① the MCT/MSCs  $5 \times 10^5$  group; ② the MCT/MSCs  $1 \times 10^6$  one; ③ the MCT one; ④ the control one. Rats were injected intraperitoneally with  $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  MCT, except the control group with physiological saline. Phosphate buffered saline with  $5 \times 10^5$  MSCs and  $1 \times 10^6$  MSCs were transplanted into rats through external jugular vein in the first two groups respectively. At the fourth week after cell administration, RVSPs were measured and lungs' tissues were stained with Hematoxylin-eosin staining, lichen dyed red staining and smooth muscle Actin immunohistochemistry. Lungs' pathological changes were observed. All data were analyzed statistically by one way analysis of variance using SPSS 11.0. **Results** It was safe to transplant MSCs less than  $1 \times 10^6$  intravenously. At the fourth week after MSCs administration, RVSP and ventricular ratio significantly decreased in the MCT/MSCs  $1 \times 10^6$  group compared to that in MCT group ( $47.2 \pm 10.5 \text{ mmHg}$  vs  $35.8 \pm 8.4 \text{ mmHg}$ ,  $0.3572 \pm 0.0923$  vs  $0.4454 \pm 0.0935$ , respectively, both  $P < 0.05$ ), but they didn't differ statistically in MCT/MSCs  $5 \times 10^5$  group compared to in the MCT one. By pathological staining, medium thickness of the pulmonary arterioles was observed comparatively thinner in the MCT/MSCs  $1 \times 10^6$  group than those in the MCT group. In contrast they had no significant difference between in the MCT/MSCs  $5 \times 10^5$  group and in the MCT one ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Intravenous MSCs administration can prevent lungs injury induced by monocrotaline and  $1 \times 10^6$  MSCs administration has better effects than  $5 \times 10^5$  MSCs'.

**【Key words】** Mesenchymal stem cells; Monocrotaline; Hypertension pulmonary; Cell transplantation

肺动脉高压 (pulmonary artery hypertension, PAH) 是顽固性和致死性疾病, 肺血管阻力进行性增高, 最终导致右心衰竭而死亡, 是严重的内皮功能障碍的血管疾病。人们尝试再生手段打断 PAH 的恶性循环, 移植骨髓细胞, 如内皮祖细胞、内皮样祖细胞和基质干细胞, 以再生健康的内皮细胞, 显示了初步的疗效<sup>[1-3]</sup>。野百合碱是豆科植物野百合中提取的生物碱, 具有细胞毒性作用, 代谢产物通过肺脏时沉积于肺小动脉壁及肺毛细血管, 导致对肺血管的损伤, 破坏肺组织内皮细胞等, 导致肺动脉高压, 常做为制作肺动脉高压模型的药物<sup>[4]</sup>。对于不同 MSCs 数量移植的安全性, 以及移植对 MCT 诱导肺血管损伤的抑制效应如何尚不明确, 本文对此研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

清洁级雄性 Wistar 大鼠 (3 周, 60 ~ 70 g), 成年雄性 Wistar 大鼠 60 只, 体重 (180 ~ 250) g, 均由吉林大学实验动物中心提供 (SCXK [吉] 2008 - 0005)。

### 1.2 主要仪器和试剂

全自动显微镜数码摄像系统 (OLYMPUS, 日本), LEICA 病理切片机 (德国), 多功能病理图象分析仪 (同济), BL-420E<sup>+</sup> 生物机能实验系统 (成都泰盟科技有限公司), 流式细胞仪 (Becton Dickinson 美国)。低糖 DMEM 培养基 (Gibco 公司), 特级胎

牛血清 (Gibco 公司), 胰酶 (Sigma 公司), 亚美尼亚仓鼠抗大鼠 CD29 - Alexa Fluor (Biolegend 公司), 小鼠抗大鼠 CD45 - FITC (Biolegend 公司), 小鼠抗大鼠 CD44 - PE (Santa Cruz 公司), 小鼠抗大鼠 CD34 - FITC (Santa Cruz 公司), 平滑肌 Actin 免疫组化试剂盒 (武汉博士德)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 MSCs 的分离、培养和鉴定

Wistar 大鼠幼鼠断颈处死, 酒精浸泡 15 min, 无菌条件下分离股骨、胫骨, DMEM 培养液冲洗骨髓腔。洗涤, 沉淀以含 10% 胎牛血清的 DMEM 混悬, 接种在 100 mL 培养瓶中, 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 下培养。24 ~ 48 h 后换液, 每 2 ~ 3 d 更换一次培养基, 相差显微镜观察细胞融合情况。细胞 80% 融合后 0.25% 胰酶消化, 计数并传代。收获第 3 代细胞, CD29 - Alexa Fluor、CD34 - FITC、CD44 - PE、CD45 - FITC 鉴定, 流式细胞仪检测。3 ~ 5 代 MSCs 以 0.25% 的含 EDTA 的胰酶收获, PBS 冲洗, 以 PBS 悬浮细胞 1000 个/μL, 置于冰上直到进行移植。

#### 1.3.2 不同细胞数量静脉移植对正常大鼠 RVSP 的影响

采用正常健康雄性大鼠 20 只, 依据移植 MSCs 个数分为  $5 \times 10^5$  组、 $1 \times 10^6$  组、 $5 \times 10^6$  组和对照 (生理盐水) 组, 每组 5 只。大鼠颈部正中切口, 游离左侧及右侧颈外静脉, 通过右侧颈外静脉插管至右心室检测 RVSP, 通过左侧颈外静脉注入不同数目 MSCs, 测量细胞移植前、移植后 5 min, 30 min 及

24 h 的 RVSP。

### 1.3.3 动物分组

成年雄性 Wistar 大鼠 40 只,分为 4 组:① MCT/MSCs  $5 \times 10^5$  组;② MCT/MSCs  $1 \times 10^6$  组;③ MCT 组;④ 对照组。MCT 组给予野百合碱 60 mg/kg,腹腔注射,对照组注入等量盐水。全麻后固定大鼠,颈部正中切口,游离右侧颈外静脉,1 mL 注射器给予 MSCs 或等量 PBS 溶液(MCT 组和对照组)4 周后进行测压、取材。

### 1.3.4 移植 4 周后大鼠 RVSP 测量

移植 4 周后,暴露右颈外静脉 1 cm,3F 婴幼儿穿刺鞘管(美国 COOK 公司)进行改良,头部呈弧形弯曲,由颈外静脉至前腔静脉、右心房缓缓推入右心室,根据压力波形观察测定 RVSP。

### 1.3.5 心室比测量

测 RVSP 后处死大鼠,取出心脏,沿房室沟剪除心房组织,沿室间隔右心室边缘分离右心室,用滤纸吸去血液,称湿重,计算右心室/(左心室 + 室间隔),并以此作为右心室肥大的指标。

### 1.3.6 移植后肺组织形态学观察

大鼠处死后由主支气管灌注中性福尔马林固定缓冲液,使肺组织膨胀固定 20 min,后切下肺组织浸泡中性福尔马林液中,48 h 后取材做石蜡切片,厚约 5  $\mu$ m,每个肺组织标本取 5 支肺泡水平肺小动脉,行 HE 染色、平滑肌 actin 免疫组化染色和弹力纤维地衣红染色。弹力纤维染色图片采用 200 倍光镜观察,采集图像后分别测定内、外弹力板的平均直径,根据公式计算中膜厚度百分比<sup>[5]</sup>: WT% = (2  $\times$  WT/ED)  $\times$  100%。

### 1.3.7 统计学处理

采用 SPSS 11.0 软件,右心室压力、心室重量比及肺小动脉中膜厚度百分比均用  $\pm s$  表示,各个组值之间进行单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 MSCs 培养结果、鉴定

骨髓细胞接种于培养瓶后,约 6~8 h 可见间充质干细胞贴壁,呈圆形或多角形,2~3 d 后可见细胞呈短梭形、短棒状或星形;6~7 d 左右见细胞呈集落状生长,放射状排列;约 14 d 细胞几乎长满培养皿底,呈鱼群、旋涡状分布。传代后的细胞生长迅速,多为梭形,贴壁快,24 h 便可全部贴壁、伸展,呈均匀分布、增殖,3~4 d 可见细胞融合生长为单

层。第 3 代 MSCs 表面标记物 CD29、CD44、CD34 和 CD45 的阳性率分别为 98.6%、78.2%、0.0%、0.3% (图 1)。

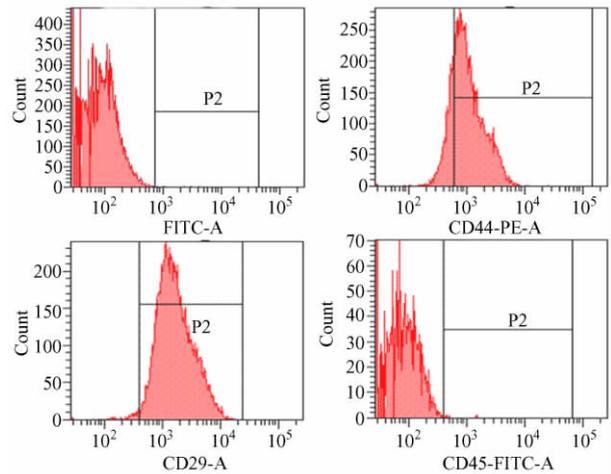


图 1 MSCs 表面标记物流式细胞仪检测结果

Fig. 1 Results of the marks of MSCs by flow cytometry

### 2.2 不同数量 MSCs 静脉移植对正常大鼠 RVSP 的变化

$5 \times 10^5$  个 MSCs 与生理盐水对照组进行大鼠静脉内移植是安全的,几乎不导致明显的 RVSP 的增加。注射  $1 \times 10^6$  个 MSCs 到颈外静脉 5 min 后, RVSP 从 (22.3  $\pm$  4.4) mmHg 到 (35.8  $\pm$  5.6) mmHg,30 min 后 RVSP 增加达到 (44.2  $\pm$  4.5) mmHg;24 h 后, RVSP 为下降为 (27.8  $\pm$  3.6) mmHg,与生理盐水对照组相比,会有残存的压力增加(图 2),但相对安全;但在移植  $5 \times 10^6$  个 MSCs 5 min 内有 2 只死亡,剩余 3 只 RVSP 分别为 45.3 mmHg、49.4 mmHg 和 51.2 mmHg,24 h 又一只死亡,剩余 2 只 RVSP 36.2 mmHg、41.3 mmHg,静脉移植不安全。

### 2.3 移植后 RVSP 及心室比的改变

MCT 组 4 周后 RVSP 为 (47.2  $\pm$  10.5) mmHg,心室比 (0.4454  $\pm$  0.0935),而对照组 4 周后 RVSP (25.2  $\pm$  4.0) mmHg,心室比 (0.2348  $\pm$  0.0212),前者右心室压力明显增加 ( $P > 0.05$ )、右心室肥厚 ( $P > 0.05$ );MCT/MSCs  $1 \times 10^6$  组 4 周后 RVSP 为 (35.6  $\pm$  8.4) mmHg,心室比 (0.3572  $\pm$  0.0923) 与 MCT 组相比均明显下降 ( $P < 0.05$ ),而 MCT/MSCs  $5 \times 10^5$  组 RVSP 为 (42.5  $\pm$  11.3) mmHg,心室比 (0.4003  $\pm$  0.0725),与单纯 MCT 组相比均下降不明显 ( $P > 0.05$ ) (图 3 和 4)。

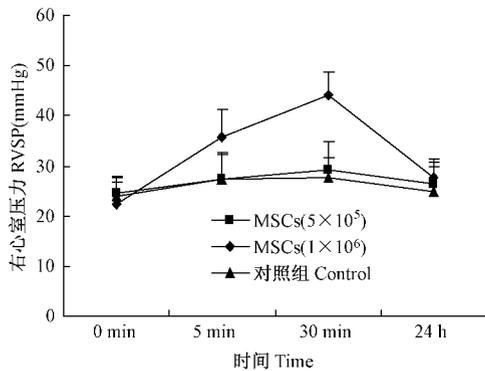


图 2 正常大鼠移植不同数目 MSCs 后不同时间右心室压力的变化

Fig. 2 Changes of RVSP with time after different numbers of MSCs' transplantation in normal rats

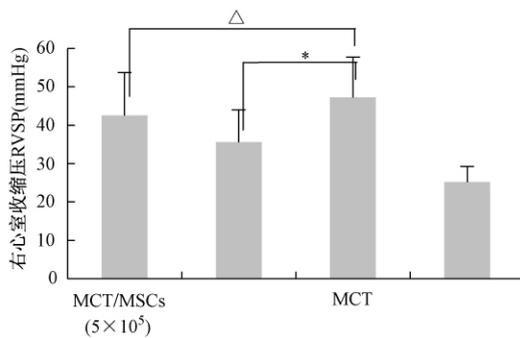


图 3 MSCs 移植后 4 周后右心室收缩压的变化

Fig. 3 Changes of RVSP after four weeks of MSCs' transplantation

注: \* 表示差异显著; Δ 表示差异不显著

Note: \* significant difference; Δ no significant difference

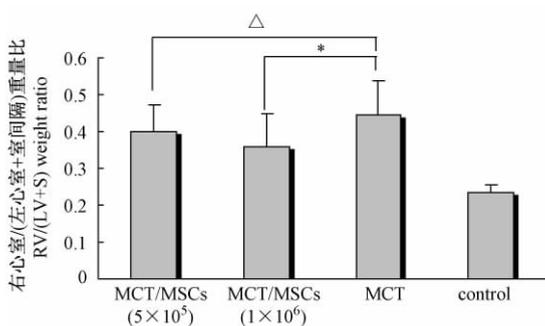


图 4 MSCs 移植后 4 周后右心室 / (左心室 + 室间隔) 重量比的变化

注: \* 表示差异显著; Δ 表示差异不显著

Fig. 4 Changes of RV/(LV+S) ratio after four weeks of MSCs' transplantation

Note: \* significant difference; Δ no significant difference

## 2.4 移植后肺组织病理变化

### 2.4.1 HE 染色:

对照组肺动脉管壁菲薄,内皮细胞扁平连续,细胞分布均匀,大小厚薄较一致;MCT 组肺小动脉壁增厚伴玻璃样变,管腔狭窄甚至闭塞,大量炎性细胞浸润,以淋巴细胞为主;小血管壁正常结构丧失,有纤维素样渗出,管周有淋巴细胞浸润,肺泡壁上毛细血管淤血,肺间质增厚;MCT/MSCs  $1 \times 10^6$  组与 MCT 组相比弹力纤维变薄,而 MCT/MSCs  $5 \times 10^5$  组亦变薄,但无 MCT/MSCs  $1 \times 10^6$  组明显(彩插 2 图 5)。

### 2.4.2 平滑肌 actin 免疫组织化学染色:

正常对照组平滑肌染色,中层厚度很薄;MCT 组中层平滑肌明显增厚;MCT/MSCs  $1 \times 10^6$  组及 MCT/MSCs  $5 \times 10^5$  组平滑肌 actin 染色均较 MCT 变薄(彩插 2 图 6)。

### 2.4.3 弹力纤维染色:

正常对照组肺腺泡内小动脉内外弹力板(花边样)呈深棕色,中层不增厚,管腔无狭窄;MCT 组中层增厚,管腔呈狭窄;MCT/MSCs  $1 \times 10^6$  组与 MCT 组相比中层变薄,而 MCT/MSCs  $5 \times 10^5$  组亦变薄, MCT/MSCs  $1 \times 10^6$  组明显(彩插 2 图 7)。结果显示,正常对照组肺小动脉中层厚度百分比( $10.1 \pm 1.1$  %),MCT 组中层厚度百分比( $26.4 \pm 4.9$  %),MCT/MSCs  $1 \times 10^6$  组中膜厚度( $19.2 \pm 3.8$  %)较 MCT 组明显变薄( $P < 0.05$ ),而 MCT/MSCs  $5 \times 10^5$  组中膜厚度( $23.3 \pm 3.6$  %)与 MCT 组相比无统计学意义( $P > 0.05$ )(图 8)。

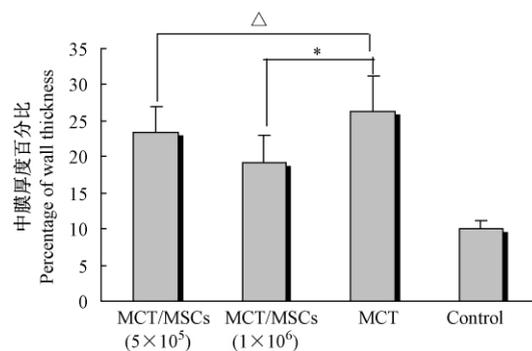


图 8 MSCs 移植后 4 周后肺小动脉中膜厚度百分比.

注: \* 表示差异显著; Δ 表示差异不显著

Fig. 8 Percentage of wall thickness of the pulmonary arterioles after four weeks of MSCs' transplantation

Note: \* significant difference; Δ no significant difference

## 3 讨论

我们研究认为采用  $5 \times 10^5$  个 MSCs、 $1 \times 10^6$  个 MSCs 进行颈外静脉移植是安全的,不会导致严重的

血流动力学变化。经过颈外静脉移植的细胞经过前腔静脉、右心房、右心室、肺动脉到达肺微小动脉,定植于此发挥作用。Campbell 等<sup>[6]</sup>研究从静脉移植细胞后,脾、肝和骨骼肌组织,没有发现有荧光信号的细胞,细胞以高度选择方式到阻力前毛细血管床,这正因为肺是生理的解剖滤器,相对大的粒子例如悬浮细胞会定植于肺的微血管,这对治疗某一肺动脉血管疾病非常有用。颈外静脉移植细胞导致 RVSP 升高,是因为悬浮细胞多,会导致肺微小动脉的栓塞,从而使肺动脉压力及 RVSP 升高。因此较少的细胞形成的栓塞少所以影响小,而  $1 \times 10^6$  个 MSCs 移植后 RVSP 升高后逐渐下降,可能是部分细胞与肺动脉内皮可黏附、迁移入血管内腔,或移植细胞的丢失,导致肺小动脉的栓塞减少而使 RVSP 在 24 h 后下降。Sachiko 等<sup>[7]</sup>认为更多的细胞注射可能导致更多的肺小动脉栓塞致 RVSP 急性严重升高,血流动力学变化明显以致循环不稳定,所以死亡率较高。

Ortiz 等<sup>[8]</sup>认为骨髓间充质细胞可以定植于博莱霉素损伤的肺,尽管观察到的数量较少,但是该细胞展现了上皮细胞样形态,降低肺部炎症及胶原沉积,而且移植的细胞在肺组织中长期存在,表现出高度的可塑性,并保留其分化基因的能力而发挥作用<sup>[9,10]</sup>。而移植骨髓间充质干细胞的实验研究较少,Nagaya 等<sup>[11]</sup>培养人脐带血单核细胞,获取的内皮祖细胞,移植 MCT 诱导的肺动脉高压大鼠左颈外静脉 2 周后,检测到大鼠肺血管阻力下降 16%,平均肺动脉压力下降 14%。我们在 MCT 诱导大鼠肺动脉高压的同时进行 MSCs 移植,发现  $1 \times 10^6$  MSCs 进行静脉内移植,可以明显降低 RVSP,减轻了肺动脉压力升高导致的右心室肥厚,还可以使肺小动脉中层厚度明显变薄,不论从血流动力学还是病理形态上均证实可以明显抑制肺动脉高压形成的严重程度,而且较  $5 \times 10^5$  个 MSCs 移植效果明显。

关于干细胞移植对肺动脉高压作用机制复杂。首先,移植的干细胞可以整合到肺血管的内皮细胞层,分化为内皮细胞,修复内皮缺损。Nagaya 等<sup>[11]</sup>静脉移植表达绿色荧光蛋白的内皮祖细胞,发现该细胞可以掺和到 MCT 诱导大鼠的肺小动脉和毛细血管中,分化为成熟的内皮细胞;其次,存在大量的证据证实骨髓来源的细胞具有刺激各种组织血管新生的能力,这主要通过基因标志的骨髓移植得到的结论;再次,就是干细胞的自分泌和促进临近细胞分泌细胞因子的能力。内皮细胞可以像输注巨

噬细胞一样可以分泌生长因子,并不融合到血管,从而使缺血后侧枝血流轻度增加<sup>[12]</sup>。

近年来,已有各种干细胞联合基因转染治疗肺动脉高压的报道。Zhao 等<sup>[13]</sup>采用腹主动脉-下腔静脉分流法 10 周诱导大鼠肺动脉高压,分离人外周血内皮细胞培养,质粒转染降钙素基因相关肽,由大鼠颈外静脉移植 4 周后平均肺动脉压及总肺血管阻力均下降。因此骨髓间充质干细胞静脉内移植是治疗肺动脉高压的良好尝试,可以应用于各种原因导致的肺动脉高压,是良好的种子细胞,还可以转染基因增加治疗的效果。考虑到如此众多的肺动脉高压患者,即使很少的个体受益,也会带来明显的影响。

#### 参考文献:

- [1] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. *Nature*, 2002, 418(6893): 41-49.
- [2] Zhao YD, Courtman DW, Deng Y, et al. Rescue of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension using bone marrow-derived endothelial-like progenitor cells[J]. *Circ Res*, 2005, 96(4): 442-450.
- [3] 何志旭,汪浩文,尚峰,等. 骨髓间充质干细胞移植治疗肺动脉高压大鼠肺血管病变的研究[J]. *中国输血杂志*, 2009, 22(3): 180-184.
- [4] Hayashi Y, Hussa JF, Lalich JJ. Cor pulmonale in rats[J]. *Lab Invest*, 1967, 16(6): 875-880.
- [5] 刘斌,王献民,魏丽,等. 4 种肺动脉高压动物模型肺血管重构模式的差异研究[J]. *中国病理生理学杂志*, 2008, 24(2): 289-293.
- [6] Campbell AIM, Kuliszewski MA, and Stewart DJ. Cell-Based Gene Transfer to the Pulmonary Vasculature Endothelial Nitric Oxide Synthase Overexpression Inhibits Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999, 21(5): 567-575.
- [7] Sachiko KH, Hitoshi H, Shigetoshi M, et al. Implantation of Mesenchymal Stem Cells Overexpressing Endothelial Nitric Oxide Synthase Improves Right Ventricular Impairments Caused by Pulmonary Hypertension[J]. *Circulation*, 2006, 114(Sup. 1): I-181-I-185.
- [8] 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 USA*, 2003, 100(14): 8407-8411.
- [9] Grove JE, Lutzko C, Priller J, et al. Marrow-derived cells as vehicles for delivery of gene therapy to pulmonary epithelium[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, 27(6): 645-651.
- [10] Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium [J]. *Development*, 2001, 128(24): 5181-5188.
- [11] Nagaya N, Kangawa K, Kanda M, et al. Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells [J]. *Circulation*, 2003, 108(7): 889-895.
- [12] Ward MR, Stewart DJ, Kutryk MJ. Endothelial progenitor cell therapy for the treatment of coronary disease, acute MI, and pulmonary arterial hypertension: current perspectives [J]. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2007, 70(7): 983-998.
- [13] Zhao Q, Liu Z, Wang Z, et al. Effect of Prepro-Calcitonin Gene-Related Peptide - Expressing Endothelial Progenitor Cells on Pulmonary Hypertension[J]. *Ann Thorac Surg*, 2007, 84(2): 544-552.

(修回日期)2011-08-18

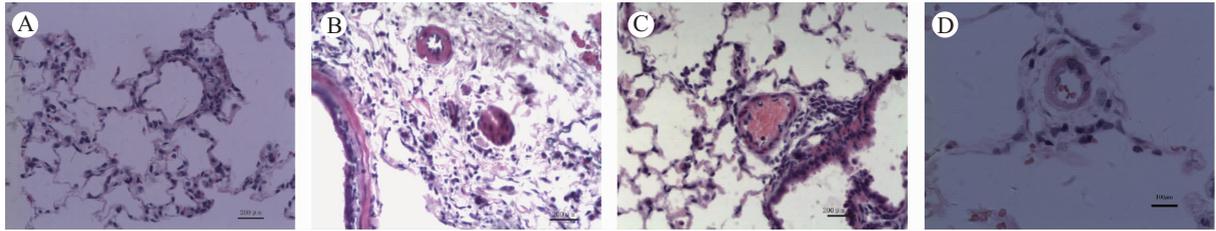


图 5 肺组织 HE 染色

Fig. 5 Hematoxylin- eosin staining in lungs

注 :A:对照; B: MCT; C: MCT/MSCs  $1 \times 10^6$ ; D: MCT/MSCs  $5 \times 10^5$

Note: A: Control; B: MCT; C: MCT/MSCs  $1 \times 10^6$ ; D: MCT/MSCs  $5 \times 10^5$

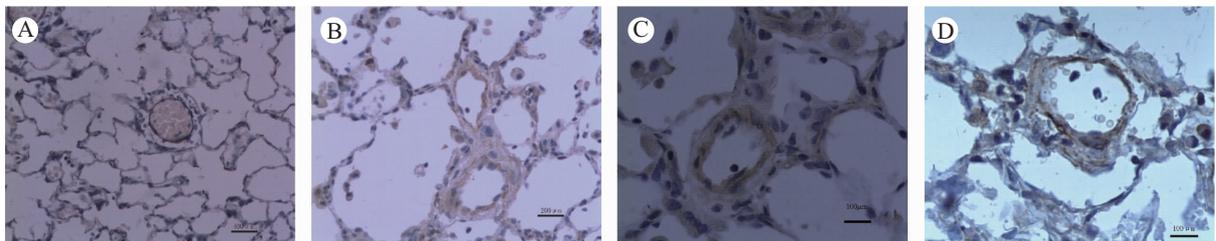


图 6 肺组织平滑肌 Actin 免疫组织化学染色.

Fig. 6 Smooth muscle actin immunohistochemistry staining in lungs

注 :A:对照; B: MCT; C: MCT/MSCs  $1 \times 10^6$ ; D: MCT/MSCs  $5 \times 10^5$

Note: A: Control; B: MCT; C: MCT/MSCs  $1 \times 10^6$ ; D: MCT/MSCs  $5 \times 10^5$

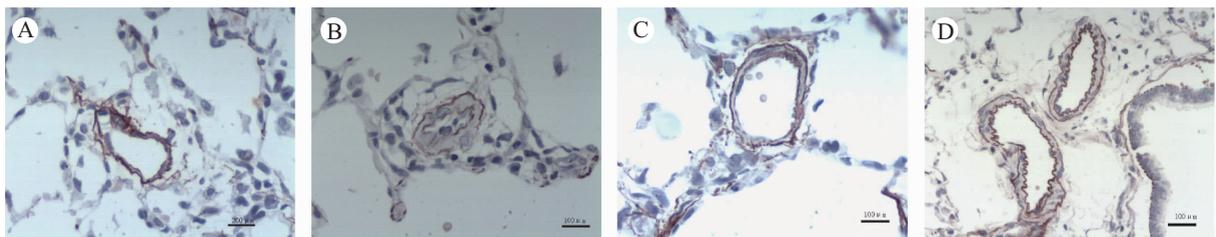


图 7 肺组织地衣红染色.

Fig. 7 Lichen dyed red staining in lungs

注 :A: 对照; B: MCT; C: MCT/MSCs  $1 \times 10^6$ ; D: MCT/MSCs  $5 \times 10^5$

Note: A: Control; B: MCT; C: MCT/MSCs  $1 \times 10^6$ ; D: MCT/MSCs  $5 \times 10^5$