

衰老对小鼠肺干细胞修复能力的影响

朱栩栋,姚超,龚松迪,何立锋,李晓燕,张玲玲

(杭州师范大学,杭州 311121)

【摘要】 **目的** 研究衰老对小鼠肺组织干细胞在生理状态和支气管上皮细胞(Clara 细胞)损伤后修复能力的影响。**方法** 通过流式细胞术对老龄和低龄组小鼠的肺组织干细胞比例进行分析,研究衰老对肺组织干细胞稳态维持的影响;通过免疫组化染色对肺组织病理切片进行分析,确立支气管上皮细胞(Clara 细胞)损伤模型;通过流式细胞术、免疫组化染色、肺组织病理切片研究老龄和低龄组小鼠在支气管上皮细胞(Clara 细胞)损伤后肺组织干细胞的损伤修复能力。**结果** 老龄组肺组织干细胞比例(肺上皮干细胞/前体细胞,肺间质干细胞/前体细胞)在稳态维持的情况下较老龄组改变不显著;在肺支气管上皮细胞(Clara 细胞)损伤后,老龄组小鼠支气管上皮出现较严重的细胞受损;在接下来的观察中发现,小鼠肺组织前体细胞/肺组织总细胞比例在老龄组显著下降,且增殖细胞在肺组织前体细胞和肺组织干细胞中的比例出现显著下降;同时,小鼠支气管上皮恢复程度在老龄组明显较差。**结论** 在稳态维持的状态下,衰老对肺组织干细胞的稳态没有影响。在支气管上皮细胞受到损伤后,肺组织干细胞占肺总细胞比例降低,修复与再生能力显著下降。可能为临床上衰老更易产生肺组织损伤及病变更严重的原因。

【关键词】 肺损伤修复;衰老;流式细胞术;肺干细胞

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 07-0025-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.007.006

Effect of aging on repair capability of lung stem cells

ZHU Xu-dong, YAO Chao, GONG Song-di, HE Li-feng, LI Xiao-yan, ZHANG Ling-ling
(Hang Zhou Normal University, Hangzhou 311121, China)

【Abstract】 **Objective** To study the impact of aging on the capability of lung stem cell steady-state maintaining and bronchial epithelial cells regeneration and differentiation during the repair of lung epithelial cells after naphthalene induced bronchial epithelial injury. **Methods** The proportion of lung stem cells in mice after naphthalene treatment was analyzed by immunohistochemistry and FACS. The repair efficiency of lung epithelial cell in young and old mice was examined by immunohistochemistry staining and FACS. **Results** The data suggested that aging didn't change the proportion of lung stem cells (including the distal lung epithelial stem cells/progenitor cells and lung mesenchymal stem cells/progenitor cells) under normal physiological conditions. After naphthalene injury, more serious injury and decreased repairing capacity was observed in old group. Lung progenitor cells /total lung cells decreased during the repair process of lung bronchial epithelialium (clara cell) injury. The ratio of regenerated cell to lung progenitor and stem cells were also significantly decreased in old group. **Conclusion** The regenerated capability of lung stem cells after lung bronchial epithelialium injury decreased with aging. This might be the reason of more incidence of lung injury and worse therapeutic results in the elder in clinic.

【基金项目】 国家自然科学基金(81300264);2012年度浙江省大学生科技创新活动计划(新苗人才计划2012R4210007)。

【作者简介】 朱栩栋(1987-),男,讲师。

【通讯作者】 张玲玲(1982-),女,讲师,博士,研究方向:衰老与成体干细胞。E-mail: zhangll821025@163.com。

【Key words】 Lung damage and repair; Aging; FACS; Lung stem cell

在我国,呼吸系统疾病的致死率仅次于心脑血管和恶性肿瘤,位居我国居民死亡原因的第三位。人口老龄化是影响呼吸系统疾病发生的重要因素。肺干细胞在肺组织损伤修复和稳态维持中发挥重要作用^[1-3]。呼吸系统疾病发生时可能存在着肺干细胞增殖分化和稳态维持的失衡^[1,4]。在衰老过程中,肺组织的形态结构发生改变,通气功能逐渐减弱,但是衰老是否影响了肺干细胞的稳态维持和损伤修复能力尚不清楚。

小鼠的肺组织由多种细胞组成,其中上皮细胞包括基底细胞、纤毛细胞、杯状细胞、刷细胞、小颗粒细胞、Clara 细胞、I 型肺泡上皮细胞、II 型肺泡上皮细胞和神经内分泌细胞等。Clara 细胞被认为是远端支气管上皮的一种主要细胞,主要分布在小鼠的远端细支气管上皮。Clara 细胞占小鼠支气管上皮细胞数目的 89.5%,人类的终末细支气管上皮细胞的(11±3)%,人类呼吸性细支气管上皮细胞的(22±5)%,随着支气管内径的减小,其比例逐渐增多^[5]。

肺脏具有一定程度的再生能力,在肺损伤发生时可通过局部的修复来维持组织的结构和功能。这是由肺干细胞在损伤后进一步分化、增殖,替代受损伤的细胞,维持着肺上皮组织的稳定。参与肺组织的再生和损伤修复的肺干细胞主要存在两种类型:肺上皮干细胞和肺间质干细胞。我们利用萘特异性损伤 Clara 细胞,建立支气管上皮细胞损伤模型。观察肺组织干细胞对年轻和衰老两种状态下在支气管上皮细胞损伤后的稳态维持能力。由于目前尚无公认的肺干细胞表面标记,对肺组织干细胞的来源亦是众说纷纭^[2]。近几年来,研究人员利用流式细胞分析技术对肺组织干细胞进行分析和分选,极大地方便了对肺衰老和组织损伤修复过程的研究^[6-8]。因此,本研究中利用流式细胞技术观察衰老过程中肺组织干细胞数量和构成的改变,观察肺支气管上皮细胞损伤模型修复过程中肺干细胞的改变,了解衰老对肺组织干细胞在肺支气管上皮细胞损伤修复中的影响。

1 材料和方法

1.1 肺组织单细胞悬液的制备:

根据文献报道,制备肺组织单细胞悬液^[6],每个样品准备 1 mg/mL 胶原酶 I 溶于无菌的 PBS 中,

预热至 37℃。脱颈处死小鼠,打开腹腔,下腔静脉放血。打开胸腔,取肺,放入装有冷的 PBS 的 15 mL 离心管中。在这一步骤中,将肺部的支气管去除,只留下肺的远端细胞。在离心管中轻轻搅动肺叶,去除多余的血液直至肺组织变白,用眼科剪将肺剪碎,剪碎的组织放入 15 mL 离心管内,加入预热的 3 mL 胶原酶溶液。将离心管放在 thermo 的混匀器上 750 r/min,37 度震荡 0.5 h。5 mL 注射器吹打悬液,使大块结缔组织分离,在混匀器上 750 r/min,37 度继续震荡 0.5 h,1 mL 注射器吹打悬液,使细胞分离,0.22 μm 滤膜过滤,制备单细胞悬液,1400 r/min 离心 5 min,加入 1 mL 红细胞裂解液,去除红细胞。

1.2 肺干细胞流式分析

根据文献报道的研究方法^[6,9],以 CD31⁻CD45⁻Sca-1⁺CD34⁺ 作为肺干细胞的表面标记,CD31⁻CD45⁻Sca-1⁺CD34⁺EpCAM⁻ 作为肺间质干细胞标记;CD31⁻CD45⁻Sca-1⁺CD34⁺EpCAM⁺ 作为肺上皮干细胞标记。将 CD31-Biotin, CD45-Biotin, SA-PE/FITC, Sca-1-PE-Cy7 抗体用稀释液 10 倍稀释;肺组织细胞悬液离心后去上清,保留终体积约 50 μL。加入 CD31-Biotin(1-10) 10 μL, CD45-Biotin(1-10) 10 μL,冰上孵育 30 min;加入抗体稀释液 2 mL,1500 r/min 离心 5 min;去上清,终体积 50 μL。加入 SA-PE(1-10) 15 μL, Sca-1-PE-Cy7(1-10), APC-Epicam(1-10) 稀释液 10 μL, CD34-FITC 3 μL 冰上孵育 45 min;加入稀释液 2 mL,用 50 μm 滤膜过滤,1500 r/min 离心,5 min;去上清,加入抗体稀释液 300 μL 混匀;利用流式细胞仪分析肺上皮干细胞的比率。

1.3 萘致肺 Clara 细胞损伤模型的制备

我们将 C57 BL/6J 野生型小鼠根据年龄分为两组,老龄组(>72 周龄)和低龄组(8~16 周龄),每组 8 只。对年轻和年老组小鼠给予 275 mg/kg 萘(用玉米油溶解)腹腔注射,同年龄对照组小鼠给予等体积的玉米油腹腔注射。3~7 d 后取小鼠肺组织实验。SPF 级 C57 BL/6J 小鼠,来源于杭州师范大学实验动物中心【SCXK(浙)2011-0048】。萘致肺 Clara 细胞损伤模型构建在杭州师范大学医学实验中心进行【SYXK(浙)2011-0157】。

1.4 苏木素-伊红染色

将小鼠脱颈处死,分离肺组织取右下肺叶,固定于 4% 多聚甲醛溶液中,24 h 后石蜡包埋。进行

连续石蜡切片,厚度 5 μm。切片固定到载玻片上。切片脱水后,进行苏木素伊红染色。

1.5 免疫荧光染色:

将小鼠脱颈处死,分离肺组织取右下肺叶,固定于 4% 多聚甲醛溶液中,24 h 后石蜡包埋。进行连续石蜡切片,厚度 5 μm。切片固定到载玻片上。对石蜡切片进行胞内抗原 CCSP 染色,观察肺损伤修复过程中 Clara 细胞的形态结构^[10]。

1.6 统计学分析

数据用均数 ± 标准误表示,组间比较采用 student *t* 检验。

2 结果

2.1 衰老对小鼠肺组织干细胞比例的影响

为研究衰老状态是否会影响小鼠远端肺干细胞占肺总细胞的比例,我们对远端肺干细胞在老龄组和低龄组的比例进行了分析(图 1A-B)。分离肺组织,采用 CD31⁻ CD45⁻ Sca-1⁻ EpCAM⁺ 标记肺上皮干细胞,流式细胞仪分析比例。结果表明肺上皮干细胞 (CD31⁻ CD45⁻ Sca-1⁻ EpCAM⁺) (老龄组 37.02% ± 6.58%,低龄组 36.12% ± 0.61%) 和肺间质干细胞 (CD31⁻ CD45⁻ Sca-1⁺ EpCAM⁻) (老龄组 10.46% ± 4.36%,低龄组 9.85% ± 2.31%) 在肺总细胞中所占比例在老龄组和低龄组之间无显著差异。另据文献报道,EpCAM^{hi} 标记细胞属于上皮

干细胞,将其进行体外培养,可生成上皮细胞样克隆球^[11]。根据该文献,我们将 EpCAM⁺ (CD31⁻ CD45⁻ Sca-1⁻ EpCAM⁺) 细胞分为 EpCAM^{hi}, EpCAM^{med}, EpCAM^{low} 三群 (图 1A)。其中 EpCAM^{hi} (老龄组 4.75% ± 1.23%,低龄组 4.81% ± 4.72%), EpCAM^{med} (老龄组 22.5% ± 4.98%,低龄组 19.78% ± 0.97%), EpCAM^{low} (老龄组 9.18% ± 1.13%,低龄组 12.29% ± 3.26%) 细胞群并未在衰老组中出现显著差异 (*P* > 0.05) (图 1B)。说明在正常生理稳态下,衰老并不影响在远端肺组织中干细胞的比率。

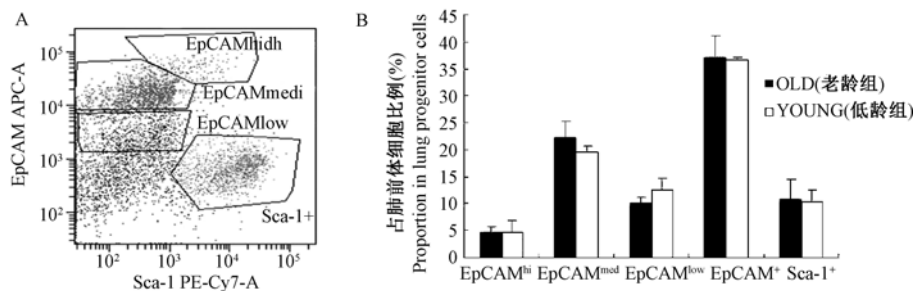
2.2 肺支气管上皮损伤小鼠模型的建立及肺组织干细胞修复能力的观察

2.2.1 肺支气管上皮损伤小鼠模型的建立

利用 Clara 细胞的萘易损伤的特性,建立小鼠的支气管上皮细胞特异性损伤模型。对小鼠进行萘的腹腔注射,在支气管气道上皮中可选择性地去除表达 CCSP 的 Clara 细胞。萘处理 3 d 后的肺组织进行 HE 染色,观察标本,可见 Clara 细胞在细支气管上皮形成空泡,部分部位出现脱落。上皮结构受到破坏,不完整,有断裂出现(彩插 3 图 2)。

2.2.2 肺支气管上皮损伤小鼠模型的修复能力

萘损伤 7 d 后,观察肺支气管上皮是否进行了修复,可见 Clara 细胞的萘特异性损伤依然存在,同时出现部分修复(彩插 3 图 3)。



注:(A)流式示意图。(B) 老龄组和低龄组肺组织干细胞比例比较。EpCAM^{hi}: CD31⁻ CD45⁻ Sca-1⁻ EpCAM^{hi} 细胞/肺总细胞; EpCAM^{med}: CD31⁻ CD45⁻ Sca-1⁻ EpCAM^{med} 细胞/肺总细胞; EpCAM^{low}: CD31⁻ CD45⁻ Sca-1⁻ EpCAM^{low} 细胞/肺总细胞; EpCAM⁺ (肺上皮干细胞): CD31⁻ CD45⁻ Sca-1⁻ EpCAM⁺ 细胞/肺总细胞; Sca-1⁺ (肺间质干细胞): CD31⁻ CD45⁻ Sca-1⁺ EpCAM⁻ 细胞/肺总细胞。OLD: 老龄组(n=8), YOUNG: 低龄组(n=8)。

图 1 年轻、年老小鼠远端肺组织干细胞的比例比较

Note: (A) The FSC schematic diagram. (B) Comparison of the proportion of lung stem cells between young and old group. EpCAM^{hi} means the proportion of CD31⁻ CD45⁻ Sca-1⁻ EpCAM^{hi} cells to total lung cells; EpCAM^{med} means the proportion of CD31⁻ CD45⁻ Sca-1⁻ EpCAM^{med} cells to total lung cells; EpCAM^{low} means the proportion of CD31⁻ CD45⁻ Sca-1⁻ EpCAM^{low} cells to total lung cells; EpCAM⁺ (lung epithelial stem cells/total lung cells): CD31⁻ CD45⁻ Sca-1⁻ EpCAM⁺ cells to total lung cells; Sca-1⁺ (lung mesenchymal stem cells/total lung cells): CD31⁻ CD45⁻ Sca-1⁺ EpCAM⁻ cells to total lung cells. OLD: old group (n=8), YOUNG: young group (n=8).

Fig. 1 The number of lung stem cells in total distal lung cell in young and old group mice

2.3 衰老对支气管上皮损伤修复的影响(图见彩插 4)

2.3.1 年轻和年老萘损伤模型的肺组织病理改变

将 C57BL/6J 小鼠分为老龄组(>72 周龄)和低龄组(8~16 周龄),每组各 8 只。进行萘的腹腔注射(200 mg/kg)。将肺组织的石蜡切片进行 HE 染色(图 4A-D)。细支气管上皮细胞在老龄对照组(未经萘处理组)(图 4B)较低龄组(图 4A)变薄,在上皮细胞中未观察到脱落及死亡。在萘损伤组中,(图 4C-D)我们发现细支气管上皮细胞出现部分脱落及破坏,间隙变大;老龄组(图 4D)肺上皮细胞大部分出现脱落,破坏严重;低龄组(图 4C)则表现较轻,具体为细胞间隙增大,少量脱落。对肺组织进行免疫荧光染色,CCSP 特异性标记细支气管上皮(Clara 细胞)细胞(图 4E-H)。染色显示萘可特异性损伤支气管上皮 Clara 细胞。老龄组损伤更明显(图 4H),3 d 后即可看到大部分 Clara 脱落,死亡。甚至细支气管上皮层出现结构破坏;与此同时,低龄组 Clara 细胞仍可见。(图 4G)。

2.3.2 年轻和年老小鼠肺支气管上皮损伤修复过程中肺干细胞的分析

肺支气管上皮损伤模型建立后,我们对远端肺干细胞在老龄和低龄组中的比例进行了分析。具体如下,老龄组(>72 周龄)和低龄组(8~16 周龄)的 C57 BL/6J 野生型小鼠各 8 只,萘处理特异性损伤肺支气管上皮细胞。用 CD31⁻CD45⁻Sca-1⁺CD34⁺对在处理 7 d 的小鼠肺组织进行上皮干细胞表面标记,同时用 BrdU 标记增殖细胞,并在流式细胞仪上进行分析(图 5)。结果显示萘处理后老龄组

较低龄组小鼠肺前体细胞(CD31⁻CD45⁻)/肺总细胞比值(老龄组 12.24% ± 2.53%,低龄组 18.74% ± 2.05%)及肺组织干细胞(CD31⁻CD45⁻Sca-1⁺CD34⁺)/肺总细胞比值(老龄组 0.89% ± 0.13%,低龄组 1.38% ± 0.15%)均出现显著降低。无论是肺前体细胞(CD31⁻CD45⁻)(老龄组 8.21% ± 1.46%,低龄组 12.57% ± 1.59%)还是肺组织干细胞(CD31⁻CD45⁻Sca-1⁺CD34⁺)(老龄组 6.85% ± 0.46%,低龄组 8.57% ± 0.89%)中增殖细胞所占比例低龄组明显高于老龄组($P < 0.05$)。该数据提示损伤后,低龄组的干细胞增殖能力在修复过程中较老龄组高。

3 讨论

肺组织衰老的发生过程和衰老过程中肺脏相关的各种疾病的致病机制仍有待深入研究。成体干细胞在组织再生中具有重要作用,越来越多的研究表明衰老与干细胞功能的下降密不可分^[12-15]。随着干细胞生物学方法的建立,关于其研究也在不断深入。在肺脏相关疾病及损伤修复过程中肺组织干细胞所扮演的角色也越来越受到人们的重视。肺干细胞的体外培养为相关疾病的发生发展体外研究提供了模型,并为干细胞在肺相关疾病的治疗提供了理论基础^[3]。但肺干细胞由于标记物不明确而延缓了其相关的研究,研究报道表明肺间质和上皮干细胞可以使用流式细胞术进行筛选^[6]。根据文献报道我们采用流式细胞术对肺干细胞进行了表面标记。研究在衰老变化中成体肺组织干细胞的自我更新和分化能力,以期探讨成体干细胞在

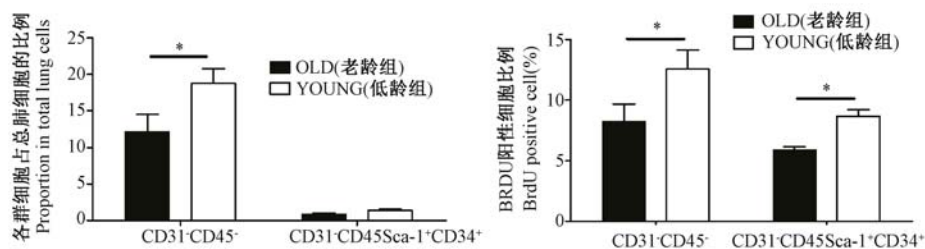


图 5 A. 肺支气管上皮损伤后老龄组和低龄组肺前体细胞(CD31⁻CD45⁻)和肺组织干细胞(CD31⁻CD45⁻Sca-1⁺CD34⁺)占肺组织总细胞比例;B. 肺支气管上皮损伤后老龄组和低龄组肺前体细胞(CD31⁻CD45⁻)中增殖细胞和肺组织干细胞(CD31⁻CD45⁻Sca-1⁺CD34⁺)中增殖细胞所占比例。OLD 为老龄组(n=8),YOUNG 为低龄组(n=8);* 为 $P < 0.05$

Fig. 5 A. The proportion of progenitor cells (CD31⁻CD45⁻); lung stem cells (CD31⁻CD45⁻Sca-1⁺CD34⁺) to total lung cell in different ages mice after naphthalene treatment. B. The proportion of BRDU positive cell in CD31⁻CD45⁻Sca-1⁺CD34⁺ and CD31⁻CD45⁻Sca-1⁺CD34⁺ cell. OLD: the old group (n=8); YOUNG: the young group (n=8). * : $P < 0.05$

肺组织器官的衰老和衰老相关疾病的发生中的作用。

在生理状态下,肺干细胞拥有有限的增殖能力,为了发掘肺干细胞的增殖潜力,我们建立了肺上皮细胞损伤模型。羰能够特异性损伤小鼠支气管上皮 Clara 细胞,我们利用该动物模型来研究肺干细胞在肺衰老生理状态及肺上皮细胞损伤过程中再生修复能力。研究显示衰老在生理状态下对肺干细胞(包括远端肺上皮干细胞和肺间质干细胞/肺总细胞)的比例影响不明显。而在小鼠肺支气管上皮(Clara)细胞特异性损伤修复过程中,肺上皮干细胞和肺间质干细胞/肺总细胞的比例出现下降。为了进一步比较损伤修复状态下年轻和年老小鼠肺组织干细胞修复能力的差异,我们通过 BrdU 染色对肺组织干细胞的增殖能力进行了分析,发现老龄组较低龄组的肺干细胞增殖比例下降,表明在衰老显著影响了肺上皮细胞损伤后肺干细胞修复的能力。由此可见,在正常生理状态下衰老对以肺干细胞比例为代表的肺干细胞表型没有影响,而一旦在应激状态下(Clara 细胞受损)肺干细胞不仅出现比例下降的表型且增殖能力也存在明显的减弱趋势。该研究发现揭示了衰老状态下肺组织干细胞尚能保持稳态维持,但在损伤后的对肺组织的修复却无能为力。该发现为肺组织衰老和肺组织干细胞的研究提供了理论依据,并为干细胞在特异性组织器官衰老预防及治疗提供了研究思路。

参考文献:

- [1] Royce SG, Moodley Y, Samuel CS. Novel therapeutic strategies for lung disorders associated with airway remodelling and fibrosis. *Pharmacol Ther* 2013.
- [2] Kotton DN, Morrisey EE. Lung regeneration: mechanisms, applications and emerging stem cell populations. *Nat Med* 2014; 20:822 - 32.
- [3] Desai TJ, Brownfield DG, Krasnow MA. Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer. *Nature* 2014;507:190 - 4.
- [4] Lee JH, Bhang DH, Beede A, *et al.* Lung stem cell differentiation in mice directed by endothelial cells via a BMP4-NFATc1-thrombospondin-1 axis. *Cell* 2014;156:440 - 55.
- [5] Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB. Number and proliferation of clara cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1585 - 91.
- [6] Bertonecello I, McQualter J. Isolation and clonal assay of adult lung epithelial stem/progenitor cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2011; Chapter 2; Unit 2G 1.
- [7] Ding BS, Nolan DJ, Guo P, *et al.* Endothelial-derived angiocrine signals induce and sustain regenerative lung alveolarization. *Cell* 2011;147:539 - 53.
- [8] Kajstura J, Rota M, Hall SR, *et al.* Evidence for human lung stem cells. *N Engl J Med* 2011;364:1795 - 806.
- [9] Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, *et al.* Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 2005;121:823 - 35.
- [10] Rock JR, Barkauskas CE, Cronic MJ, *et al.* Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:E1475 - 83.
- [11] McQualter JL, Yuen K, Williams B, *et al.* Evidence of an epithelial stem/progenitor cell hierarchy in the adult mouse lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:1414 - 9.
- [12] Liu J, Finkel T. Stem cell aging: what bleach can teach. *Nat Med* 2006;12:383 - 4.
- [13] Oh J, Lee YD, Wagers AJ. Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nat Med* 2014;20:870 - 80.
- [14] Beerman I, Bock C, Garrison BS, *et al.* Proliferation-dependent alterations of the DNA methylation landscape underlie hematopoietic stem cell aging. *Cell Stem Cell* 2013;12:413 - 25.
- [15] Beerman I, Seita J, Inlay MA, *et al.* Quiescent hematopoietic stem cells accumulate DNA damage during aging that is repaired upon entry into cell cycle. *Cell Stem Cell* 2014;15:37 - 50.

[修回日期] 2015-07-02