

体外诱导人脐带间充质干细胞向 II型肺泡上皮细胞分化

刘 姜¹ 彭单伊¹ 苟 好¹ 吴 羨¹ 司道祝¹ 牛 超²
田代印² 刘恩梅² 邹 琳³ 符 州^{1,2*}

(¹重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 重庆市干细胞治疗工程技术研究中心, 重庆 400014; ²重庆医科大学附属儿童医院呼吸中心, 重庆 400014; ³重庆医科大学附属儿童医院临床分子医学中心, 重庆 400014)

摘要 该研究旨在通过条件培养基诱导人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)向II型肺泡上皮细胞(type II alveolar epithelial cells, AEC2s)分化, 为后续研究hUC-MSCs来源的AEC2s在肺部疾病中的治疗作用奠定基础。hUC-MSCs分为实验组和对照组, 实验组用小气道上皮细胞生长基础培养基培养2天后添加生长因子诱导培养, 对照组用20%血清的DMEM/F12培养。第14天观察细胞形态; Western blot、免疫荧光、流式细胞术和ELISA法检测肺泡表面活性蛋白C(surfactant protein C, SP-C)及前肺泡表面活性蛋白C(pro-surfactant protein C, proSP-C)。利用透射电镜观察板层小体。结果显示, 实验组细胞形态由长梭形向多边形转变, 细胞内有proSP-C表达, 培养基上清中有SP-C分泌, 透射电镜观察到板层小体; 而对照组细胞形态无明显改变, 未检测到proSP-C表达、SP-C分泌和板层小体形成。该研究结果表明, 体外诱导培养可促进hUC-MSCs向AEC2s分化, 通过该方法有望大量获得hUC-MSCs来源的AEC2s用于肺部疾病治疗研究。

关键词 人脐带间充质干细胞; II型肺泡上皮细胞; 分化

Induction of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells into Type II Alveolar Epithelial Cells *In Vitro*

Liu Jiang¹, Peng Danyi¹, Gou Hao¹, Wu Xian¹, Si Daozhu¹, Niu Chao²,
Tian Daiyin², Liu Enmei², Zou Lin³, Fu Zhou^{1,2*}

(¹Department of Pediatric Research Institute, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders, Chongqing Engineering Research Center of Stem Cell Therapy, Chongqing 400014, China;

²Respiratory Center of Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China;

³Center for Clinical Molecular Medicine, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract This study aimed at the directional differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSC) into type II alveolar epithelial cells (AEC2s) induced by a conditional medium with growth factors, so as to provide the foundation for further study on the therapeutic effects of hUC-MSCs-derived AEC2s in pulmonary diseases. hUC-MSCs cultured *in vitro* were divided into test group, in which cells were cultured in

收稿日期: 2017-09-29

接受日期: 2017-12-26

国家自然科学基金(批准号: 81670018、81600022)和重庆市科技委员会重大专项(批准号: Cstc2014yykfC10003)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-63622934, Fax: 023-63622934, E-mail: fu_zhou79@aliyun.com

Received: September 29, 2017

Accepted: December 26, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81670018, 81600022) and Key Grant from Chongqing Science and Technology Commission (Grant No.Cstc2014yykfC10003)

*Corresponding author. Tel: +86-23-63622934, Fax: +86-23-63622934, E-mail: fu_zhou79@aliyun.com

网络出版时间: 2018-03-09 15:31:03

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180309.1530.016.html>

small air way epithelial cells growth basal medium for 2 days and then growth factors were added for the induction culture; and control group, in which cells were cultured in DMEM/F12 culture medium containing 20% fetal bovine serum. 14 days later, the cellular morphology was observed and recorded with an inverted microscope. The protein level of pro-surfactant protein C (proSP-C) was detected by Western blot, immunofluorescence method and flow cytometry, respectively. The content of surfactant protein C (SP-C) secreted by the cells in medium supernatant was detected by ELISA. The formation of lamellar body in cells was observed by a transmission electron microscope (TEM). The results indicated that test group cells' shape transformed from long fusiform to polygon after the induction, while control group cells' shape changed little. The protein level of proSP-C was detectable in test group cells. Secreted SP-C was detectable in medium supernatant. Lamellar body formation was observed under TEM. The proSP-C, SP-C secretion or lamellar body was not detectable in control group cells. It concluded that *in vitro* directional induction culture promoted the differentiation of hUC-MSCs into AEC2s. Hopefully, a large scale of hUC-MSCs-derived AEC2s could be obtained through this method.

Keywords human umbilical cord mesenchymal stem cells; type II alveolar epithelial cells; differentiation

儿童呼吸系统难治性疾病主要有急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)、支气管肺发育不良和肺纤维化(pulmonary fibrosis, PF)等, 这些疾病病死率高, 存活者生活质量差, 且尚无根治性疗法^[1-4], 寻找新的治疗方法是目前的研究热点。

II型肺泡上皮细胞(type II alveolar epithelial cells, AEC2s)是肺泡的祖细胞, 可以自我更新或分化为I型肺泡上皮细胞(type I alveolar epithelial cells, AEC1s), 并与AEC1s一同构成肺泡。它可以合成及分泌多种肺泡表面活性蛋白(surfactant protein, SP)以维持肺泡的稳态, 在肺的正常生理功能、水钠转运及损伤修复中起着重要作用^[5]。研究表明, 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)通过气管移植在ARDS的动物研究和临床研究中均有明显治疗效果^[6-7], MSCs的移植治疗在疾病急性期可以取得治疗效果, 在疾病慢性期如PF的治疗中则效果不确切^[8]。但有实验证明, 将AEC2s经气管移植到博来霉素造模的PF动物模型中, 可以通过促进肺泡结构的修复来减轻PF程度, 并且使用人原代AEC2s治疗特发性肺纤维化已经进入临床实验^[9-11]。以上结果表明, AEC2s移植治疗在肺部疾病中具有巨大潜力。在器官移植供体来源有限的环境下^[12], 获得足够数量的AEC2s是亟待解决的问题。

人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)来源于新生儿出生后废弃的脐带组织, 具有强大的自我更新能力, 可在体外大量扩增, 并向三个胚层的多种细

胞分化^[13-14]。因hUC-MSCs取材方便且对人体无创伤, 免疫原性低且伦理争议少等优势, hUC-MSCs成为组织修复和器官重建的理想种子细胞^[15]。本研究采用条件培养基加小分子化合物的方法诱导hUC-MSCs向AEC2s分化, 可望为后续临床研究AEC2s在肺部疾病中的治疗作用提供稳定且充足的细胞来源。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

从人脐带华通氏胶中分离的hUC-MSCs由重庆市干细胞治疗工程技术研究中心赠送。DMEM/F12培养基购自Gibco公司。胎牛血清购自上海依科赛生物制品有限公司。小气道上皮细胞生长基础培养基、牛脑垂体提取液、重组人表皮生长因子、重组人胰岛素、氢化可的松、肾上腺素、三碘甲状腺原氨酸、运铁蛋白、维甲酸和无脂酸牛血清白蛋白购自Promocell公司。RIPA强蛋白裂解液和BCA蛋白质定量检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。ECL发光试剂盒和DAPI染液购自南京凯基生物科技发展有限公司。hUC-MSCs成骨、成脂和成软骨诱导分化培养基套装购自广东赛业生物科技有限公司。兔抗人proSP-C多克隆抗体购自Abcam公司。鼠抗人CD34-PE、CD45-PE、CD73-PE、CD90-PE、CD105-PE和HLA-DR-PE单克隆抗体购自BD公司。鼠抗人 β -actin多克隆抗体、Dylight488山羊抗兔二抗、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG和山羊抗鼠IgG均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。PE

山羊抗兔IgG购自武汉三鹰生物技术有限公司。人SP-C ELISA试剂盒购自AVIVA公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 鉴定hUC-MSCs

按照本课题组之前报道的方法, 通过流式细胞术检测细胞表面间充质干细胞标志物和三系分化鉴定hUC-MSCs^[16]。

1.3 诱导hUC-MSCs向AEC2s分化

用含有20%胎牛血清的DMEM/F12培养基培养原代hUC-MSCs。在细胞汇合至100%后传代, 将第4代hUC-MSCs以 2×10^5 细胞数接种至6孔板, 当细胞汇合至80%时每孔换小气道上皮细胞生长基础培养基2 mL, 每2天换液1次。从第1次换液起培养基中加入牛脑垂体提取液0.004 mL/mL、重组人表皮生长因子10 ng/mL、重组人胰岛素5 μ g/mL、氢化可的松0.5 μ g/mL、肾上腺素0.5 μ g/mL、三碘甲状腺原氨酸6.7 ng/mL、运铁蛋白10 μ g/mL、维甲酸0.1 ng/mL、无脂酸牛血清白蛋白2.5 mg/mL(图1), 培养至第14天鉴定细胞。

1.4 鉴定诱导来源的AEC2s

1.4.1 Western blot检测proSP-C 用RIPA强蛋白裂解液于冰上裂解细胞, 12 000 r/min离心30 min后, 取上清。BCA法检测总蛋白浓度, 加入适量上样缓冲液100 $^{\circ}$ C煮5 min, 取50 μ g蛋白质上样, 经10% SDS-PAGE, 转膜, 封闭。一抗(proSP-C 1:1 000; β -actin 1:800)4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 洗膜, 二抗(1:1 000)室温孵育1 h, 洗膜, ECL发光液显影, 成像保存。

1.4.2 免疫荧光检测proSP-C 盖玻片消毒后置于24孔板中, 将 5×10^4 细胞数hUC-MSCs种植于孔板中。按诱导方法培养14天后取出盖玻片, 4%甲醛固定30 min, 0.5% Triton X-100室温破膜5 min, 胎牛白蛋白封闭, proSP-C一抗(1:200)4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 37 $^{\circ}$ C复温30 min, Dylight488山羊抗兔二抗(1:100)4 $^{\circ}$ C孵

育1 h, DAPI染细胞核, 抗荧光淬灭剂封片, 倒置荧光显微镜观察并成像保存。

1.4.3 流式细胞术检测proSP-C 诱导14天后的细胞用胰蛋白酶消化后, 1 000 r/min离心5 min, PBS洗涤, 4%多聚甲醛4 $^{\circ}$ C固定30 min, PBS洗涤, 0.5% Triton X-100室温破膜。用含2%胎牛血清的PBS稀释proSP-C抗体(1:100), 4 $^{\circ}$ C孵育2 h, PBS洗涤后离心。用含2%胎牛血清的PBS稀释PE标记二抗(1:50), 4 $^{\circ}$ C孵育30 min, PBS洗涤离心后重悬, 使用流式细胞术检测proSP-C水平。

1.4.4 用ELISA试剂盒检测SP-C含量 收集实验组诱导14天后换液时的培养上清, 收集对照组DMEM/F12培养时换液的培养上清, 去除细胞及细胞碎片。把培养上清及标准品加入检测板的样品孔中, 加入SP-C抗体, 经过孵育、漂洗后, 加入TMB底物, 最后加入终止液终止反应。用酶标仪测定450 nm处的吸光度(D)值, 通过绘制标准曲线计算培养基中SP-C浓度。

1.4.5 透射电镜鉴定板层小体 细胞诱导14天后用胰蛋白酶消化并1 000 r/min离心5 min, PBS重悬并转移至2 mL EP管, 1 000 r/min离心5 min, 吸净上清后沿管壁缓慢注入预冷的4%戊二醛固定液。4 $^{\circ}$ C固定1.5 h后进行常规电镜样品脱水和包埋。超薄切片后在日立H-7500透射电镜下观察拍照。

1.5 数据统计

实验数据用SPSS 11.5软件进行显著性差异分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态

在DMEM/F12培养基中培养至第4代的hUC-MSCs在光镜下呈长梭形, 有长短不一向外伸出的突起, 并且在细胞生长过程中可以观察到螺旋状汇合

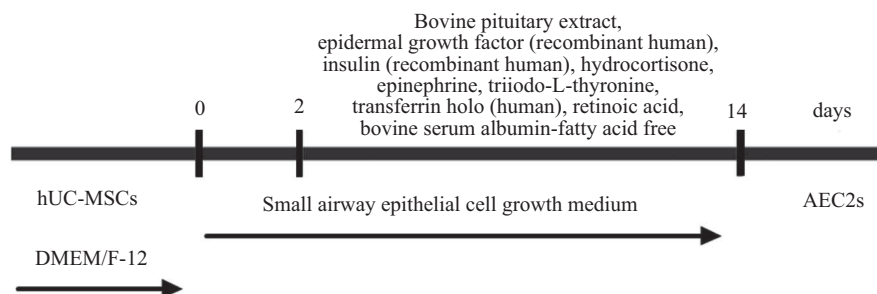
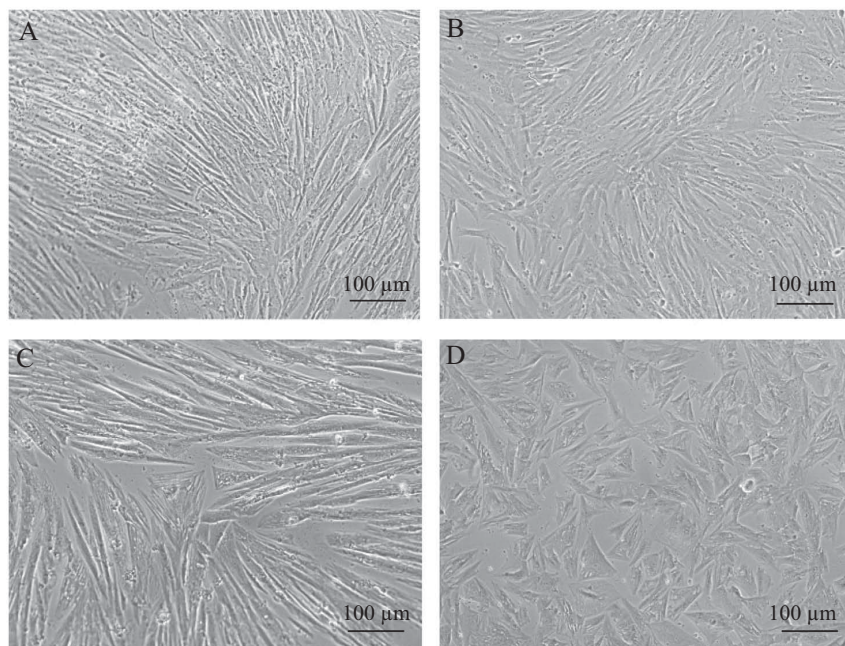


图1 人脐带间充质干细胞体外诱导分化为II型肺泡上皮细胞流程图

Fig.1 Diagram describing inducing human umbilical cord mesenchymal stem cells into type II alveolar epithelial cells *in vitro*



A: DMEM/F12培养的hUC-MSCs; B: 小气道上皮细胞生长基础培养基培养2天后的hUC-MSCs; C: 条件培养基培养14天后的诱导来源AEC2s; D: 条件培养基培养14天后的诱导来源AEC2s消化后重铺板。

A: hUC-MSCs cultured in DMEM/F12; B: hUC-MSCs cultured in small airway epithelial cells growth basal medium for 2 d; C: hUC-MSCs-derived AEC2s cultured in conditional medium for 14 d; D: passaged hUC-MSCs-derived AEC2s cultured in conditional medium for 14 d.

图2 显微镜观察诱导来源的II型肺泡上皮细胞形态

Fig.2 Cellular morphology of hUC-MSCs-derived type II alveolar epithelial cells by microscope

(图2A)。在小气道上皮细胞生长基础培养基培养2天后,细胞间连接改变(图2B)。在条件培养基培养至第14天,可明显观察到细胞骨架,细胞形态由长梭形转变为扁平状(图2C),将细胞消化后重新铺板,在贴壁后可观察到细胞呈不规则多边形并有立体感(图2D)。

2.2 hUC-MSCs诱导前后细胞干性检测

2.2.1 细胞表面间充质干细胞标志物检测 在DMEM/F12培养基中培养的hUC-MSCs表面分子CD34、CD45、HLA-DR阳性率低于2%,CD73、CD90、CD105阳性率高于95%(图3A),符合2006年国际干细胞治疗协会发布的标准^[17]。诱导来源的AEC2s表面CD34、CD45、HLA-DR阳性率仍低于2%,CD73和CD105阳性率明显降低,低于80%,CD90阳性率也降低,但仍大于95%(图3B)。

2.2.2 三系分化在DMEM/F12培养基中培养的hUC-MSCs 通过诱导可以分化为骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞(图3C)。而诱导来源的AEC2s不能在成骨、成脂或成软骨诱导培养基中存活。

2.3 诱导来源的AEC2s中proSP-C蛋白质水平

2.3.1 proSP-C蛋白质水平 Western blot检测细

胞中proSP-C蛋白质水平,结果显示,对照组细胞中未见proSP-C,而实验组中proSP-C水平明显升高(图4A)。免疫荧光结果显示,实验组中部分细胞胞质中可见明显的proSP-C,部分细胞未见proSP-C,而对照组细胞中proSP-C均为阴性(图4B)。流式细胞术结果显示,与对照组比较,实验组细胞中proSP-C阳性率显著升高,达到21.70%(图4C)。

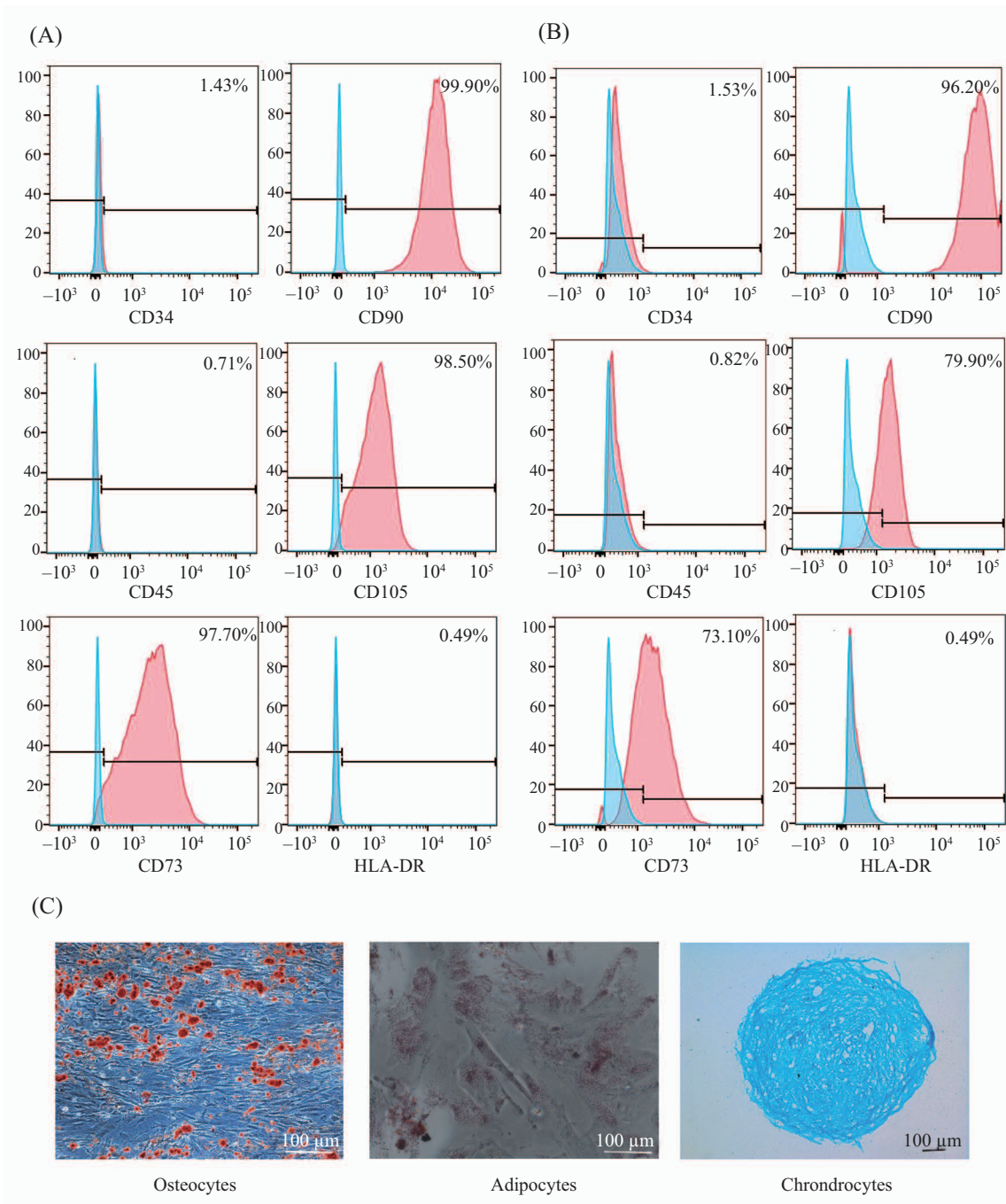
2.3.2 ELISA法检测培养基中细胞分泌SP-C的含量 通过ELISA法检测两组不同细胞分泌到培养上清中SP-C的含量,发现实验组细胞分泌到上清中SP-C水平明显高于对照组,且对照组细胞培养上清中几乎检测不到SP-C(图4D, $P < 0.05$)。

2.4 透射电镜观察板层小体形态

在条件培养基中生长14天后的hUC-MSCs,在透射电镜下可以观察到多个板层小体的形成,其大小不一,形态如洋葱横断面。在对照组中则未发现板层小体样的细胞器形成(图5)。

3 讨论

目前已有报道成功使用人胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和诱导多能干细胞

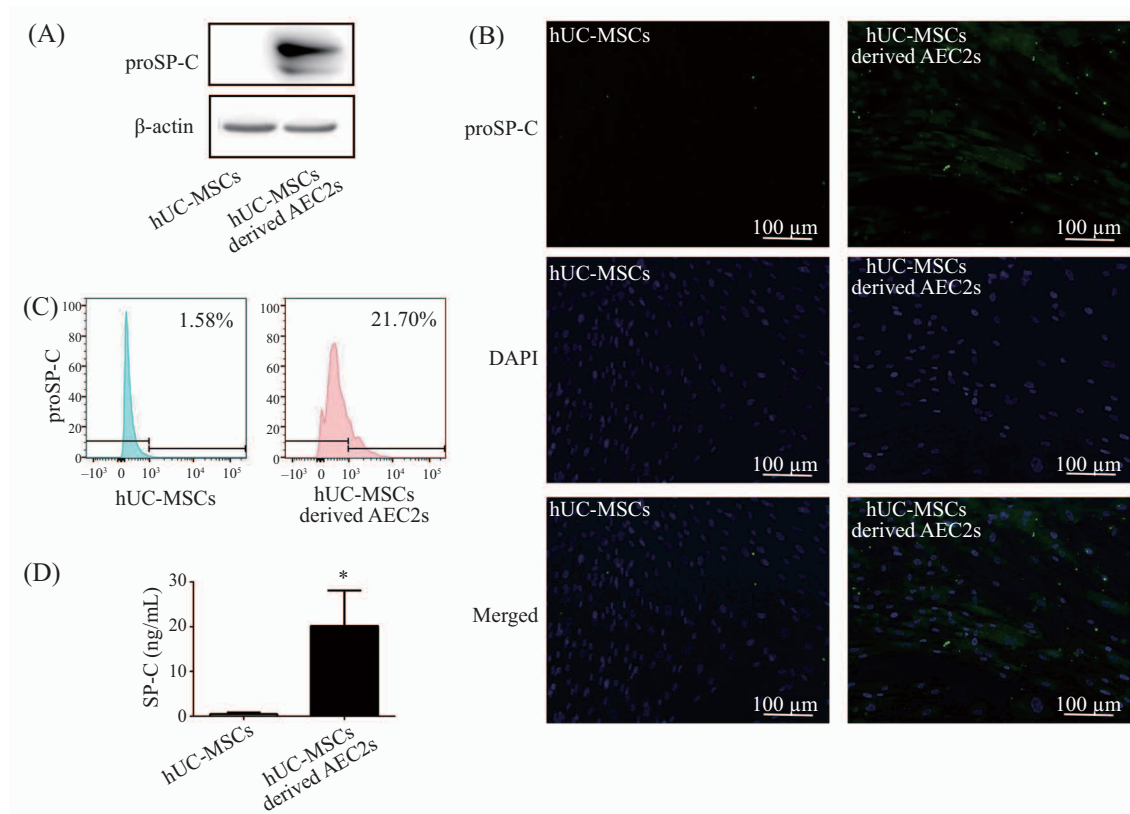


A: hUC-MSCs表面间充质干细胞标志物; B: 诱导来源的AECs表面间充质干细胞标志物; C: hUC-MSCs三系分化结果。
A: hUC-MSCs CD marker; B: hUC-MSCs-derived AEC2s CD marker; C: the results of hUC-MSCs differentiation into osteocytes, adipocytes and chondrocytes.

图3 hUC-MSCs和诱导来源II型肺泡上皮细胞干性检测
Fig.3 The pluripotency of hUC-MSCs and hUC-MSC-derived type II alveolar epithelial cells

(induced pluripotent stem cells, IPS)体外诱导分化为AEC2s^[18-20], 主要以条件培养基诱导和共培养诱导两种方法为主。在共培养诱导方法中, 滋养细胞主要为胚肺来源的间充质细胞或人肺腺癌细胞(A549细胞), 前者细胞来源有限且存在伦理争议, 后者在细胞诱导中有较大的成瘤风险。在条件培

养基诱导方法中, 研究使用的细胞多集中在ESCs和IPS, 同样有较大伦理争议和成瘤风险, 虽然也有报道尝试使用此方法诱导骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)分化为ACE2s, 但是最终分化为AEC2s的比例较低, 不超过5%^[21]。hUC-MSCs采集于新生儿出生后废弃的脐带,

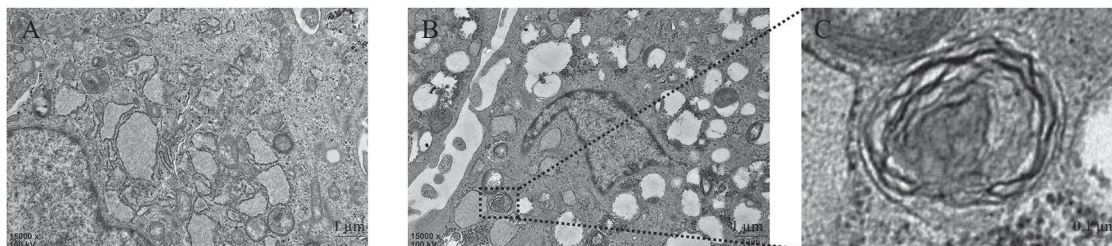


A: Western blot检测proSP-C蛋白质水平; B: 荧光显微镜观察proSP-C蛋白质水平; C: 流式细胞术测定proSP-C阳性率; D: ELISA法检测SP-C分泌。* $P<0.05$, 与对照组比较。

A: the protein level of proSP-C detected by Western blot. B: the protein level of proSP-C observed under fluorescence microscope. C: the positive ratio of proSP-C detected by flow cytometry. D: the secretion of SP-C detected by ELISA. * $P<0.05$ vs control group.

图4 诱导来源的II型肺泡上皮细胞中proSP-C和SP-C蛋白质水平

Fig.4 The levels of proSP-C and SP-C proteins in hUC-MSCs-derived type II alveolar epithelial cells



A: 透射电镜观察hUC-MSCs形态; B: 透射电镜观察诱导来源AEC2s形态; C: 透射电镜观察板层小体。

A: hUC-MSCs observed under transmission electron microscope; B: hUC-MSCs-derived AEC2s observed under transmission electron microscope; C: the lamellar body in hUC-MSCs-derived AEC2s observed under transmission electron microscope.

图5 电镜下观察诱导来源的II型肺泡上皮细胞中板层小体的形态

Fig.5 The lamellar body in hUC-MSCs-derived type II alveolar epithelial cells observed by transmission electron microscope

来源丰富, 相对于ESCs伦理争议少, 相对于IPS成瘤风险低, 相对于BMSCs取材方便、对供体无创且数量更充足, 目前尚未有文献报道使用hUC-MSCs诱导分化为AEC2s。

本研究使用小气道上皮细胞生长基础培养基, 在细胞贴壁2 d后添加AEC2s生长中需要的多种生

长因子。连续培养14天后光镜下可观察到细胞形态变得扁平, 细胞骨架明显可见, 将细胞传代重新贴壁后, 可观察到细胞从长梭形向多边形变化。在诱导过程中添加生长因子是不可或缺的关键步骤, 第4代hUC-MSCs在不含生长因子的小气道上皮细胞生长基础培养基中培养, 第5天开始出现贴壁细胞脱

落的情况, 培养基中出现悬浮细胞和细胞碎片, 第7天的时候所有细胞都从贴壁状态脱落, 考虑为hUC-MSCs无法在不含生长因子的小气道上皮细胞生长基础培养基中存活。通过对hUC-MSCs诱导前后细胞干性的检测, 在条件培养基中培养14天后的hUC-MSCs细胞表面CD73和CD105比例降低明显, 且在三系分化的诱导培养基中无法存活, 失去再分化能力。这表明, 在条件培养基中培养14天后的hUC-MSCs已经失去干细胞的特性。hUC-MSCs在条件培养基中汇合密度不再增加, 提示它在条件培养基中并无增殖能力。这考虑为细胞密度在诱导分化的过程中比较大, 可能存在接触抑制, 同时本研究采用的诱导培养基可以诱导hUC-MSCs向AEC2s分化, 但并不是AEC2s的生长培养基, 且诱导培养基为无血清培养基, 所以在诱导过程中AEC2s不再增殖。

AEC2s可以合成并分泌多种SP。其中, 以SP-C最具特异性, 它由AEC2s的内质网合成proSP-C, 经高尔基体和多泡小体转运后储存在板层小体中, 并最终加工、包装为成熟SP-C蛋白质后分泌至细胞外^[22]。Western blot和免疫荧光结果表明, 实验组细胞中有proSP-C的表达。流式细胞术检测结果发现, 实验组细胞中proSP-C的表达率达21.70%。ELISA法检测到, 实验组细胞诱导14天后换液留存的培养上清中有SP-C的分泌。以上结果证明, 实验组细胞在体外具有AEC2s分泌SP-C的功能。板层小体是AEC2s特异的细胞器, 可以保存和释放SP^[23]。经过透射电镜的观察, 可以在实验组细胞中观察到板层小体, 而在对照组细胞中则未找到板层小体的存在, 在形态学上证明实验组细胞具有AEC2s的特征。本研究证明可以使用条件培养基定向诱导hUC-MSCs分化为AEC2s, 并且在综合多种条件培养基诱导方法的优点下, 本研究改良的条件培养基更稳定, 可以在14天后取得较高的转化效率。在本研究中, 实验组细胞在条件培养基的生长环境中可以最长培养2个月并经Western blot检测仍有明显proSP-C表达。本研究为AEC2s移植治疗的相关研究提供了一种稳定获得大量细胞来源的方法, 且伦理争议少, 成瘤风险低, 为进一步研究AEC2s在肺部疾病中的治疗作用及机制奠定了实验基础。

参考文献 (References)

1 Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin

- DP, Neff M, *et al.* Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Eng J Med* 2005; 353(16): 1685-93.
- 2 Klinger G, Levy I, Sirota L, Boyko V, Lerner-Geva L, Reichman B, *et al.* Outcome of early-onset sepsis in a national cohort of very low birth weight infants. *Pediatrics* 2010; 125(4): 736-40.
- 3 Thomas AW, Thirumalai RR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* 2012; 18(7): 1028-40.
- 4 Luca R, Harold RC, Mark GJ. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 2017; 389: 1941-52.
- 5 Tushar JD, Douglas GB, Mark AK. Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer. *Nature* 2014; 507(7491): 190-4.
- 6 Lee JW, Krasnodembskaya A, McKenna DH, Song Y, Abbott J, Matthay MA. Therapeutic effects of human mesenchymal stem cells in *ex vivo* human lungs injured with live bacteria. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187(7): 751-60.
- 7 Wilson JG, Liu KD, Zhuo HM, Caballero L, McMillan M, Fang X, *et al.* Mesenchymal stem (stromal) cells for treatment of ARDS: a phase 1 clinical trial. *Lancet Respir Med* 2015; 3(1): 24-32.
- 8 Zhang WG, He L, Shi XM, Wu SS, Zhang B, Mei L, *et al.* Regulation of transplanted mesenchymal stem cells by the lung progenitor niche in rats with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2014; 15(1): 33.
- 9 Raquel GP, Gemma GJ, Antoni X, Victor IP, Anna SM. Alveolar Type II cell transplantation restores pulmonary surfactant protein levels in lung fibrosis. *J Heart Lung Transplant* 2014; 33(7): 758-65.
- 10 Anna SM, Maria N, Gemma GJ, Daniel C, Antoni X, Oriol B. Intratracheal transplantation of alveolar type II cells reverses bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176(12): 1261-8.
- 11 Anna SM, Gemma GJ, Raquel GP, Daniel C, Fernanda HG, Pedro M. Safety and tolerability of alveolar type II cell transplantation in idiopathic. *Chest* 2016; 150(33): 533-43.
- 12 De P, Snell G, Babcock WD, Meyers BF, Patterson G, Hodges TN, *et al.* Strategies to optimize the use of currently available lung donors. *J Heart Lung Transplant* 2004; 23: 1127-34.
- 13 高黎, 祝华, 张荣, 王莉佳, 邹琳, 符州. BrdU标记人脐带间充质干细胞及对细胞生物学行为影响的体外研究. 重庆医科大学学报(Gao Li, Zhu Hua, Zhang Rong, Wang Lijia, Zou Lin, Fu Zhou. Effect of 5-bromo-2-deoxyuridine labeled umbilical cord mesenchymal stem cells on cell biology behaviors *in vitro*. *Journal of Chongqing Medical University*) 2014; 39(11): 1617-21.
- 14 Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, *et al.* A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008; 3(3): 301-13.
- 15 宋昱庆, 朱明, 何骁, 郭隼, 邢伟, 梁东兰, 等. 人脐带间充质干细胞移植对脓毒症小鼠的保护作用研究. 中国细胞生物学学报(Song Yuqing, Zhu Ming, He Xiao, Guo Wei, Xing Wei, Liang Donglan, *et al.* Therapeutic efficacy of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in septic mice. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2017; 39(8): 1000-7.
- 16 Hua Z, Yi X, Yunqiu X, Rong Z, Daiyin T, Ting W, *et al.* Therapeutic effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in acute lung injury mice. *Sci Rep* 2017;

- 7: 39889.
- 17 Dominici M, Le BK, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315-7.
- 18 Sarah XLH, Mohammad I, John O, Zheng H, Yongguang Y, Yawen C, *et al.* Highly efficient generation of airway and lung epithelial cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2014; 32(1): 84-91.
- 19 Dachun W, David LH, Alan RB, Eva Z, Rick AW. A pure population of lung alveolar epithelial type II cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(11): 44449-54.
- 20 Mahboobe G, Julio JM, Peter FB, Amogh S, Micha SBR, Laura EN. Alveolar epithelial differentiation of human induced pluripotent stem cells in a rotating bioreactor. *Biomaterials* 2014; 35(2): 699-710.
- 21 陈寅, 马南, 梅举, 肖海波, 陆善伟, 徐怀阳, 等. 体外诱导人骨髓间充质干细胞向II型肺泡上皮细胞分化. *中国组织工程研究* (Chen Yin, Ma Nan, Mei Ju, Xiao Haibo, Lu Shanwei, Xu Huaiyang, *et al.* *In vitro* induction of human bone marrow mesenchymal stem cells to differentiate into type II alveolar epithelial cells. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*) 2012;16(10): 1737-41.
- 22 Kajstura J, Rota M, Hall SR, Hosoda T, D' Amario D, Sanada F, *et al.* Evidence for human lung stem cells. *N Eng J Med* 2011; 364(19): 1795-806.
- 23 Milos S, Khazaei R, McCaig LA, Nygard K, Gardiner RB, Zuo YY, *et al.* Impact of ventilation-induced lung injury on the structure and function of lamellar bodies. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2017; 313(3): 524-33.