空军军医大学
Air Force Medical University

分类号 R114
U D C 615.9
密 级 公开

硕士学位论文

CSF2RB 过表达介导间充质干细胞治疗光气致小鼠急性肺损伤的作用及其机制

樊振鹏

学 号 22320708008
培 养 类 别 全日制
学 位 类 型 学术学位
一级学科(专业类) 公共卫生与预防医学
二级学科(专业) 卫生毒理学
研 究 方 向 化学物损伤机制及其救治
指 导 教 师 李文丽 教授
培 养 单 位 军事预防医学系

二〇二六年六月

中国知网 https://www.cnki.net

硕士学位论文答辩委员会

CSF2RB 过表达介导间充质干细胞治疗光气致小鼠急性肺损伤的作用及其机制

The role and mechanism of CSF2RB overexpression-mediated mesenchymal stem cells in the treatment of phosgene-induced acute lung injury in mice

答辩人：樊振鹏

答辩委员会主席：

军事医学科学院杨晓明研究员

答辩委员会委员：

西北大学齐晓光教授

空军军医大学基础医学院李臻教授

空军军医大学教研保障中心师长宏教授

空军军医大学军事预防医学系陈长生教授

答辩时间：2026 年 06 月 05 日

中国知网 https://www.cnki.net

CSF2RB 过表达介导间充质干细胞治疗光气致小鼠急性肺损伤的作用及其机制

硕士研究生：樊振鹏

导　　师：李文丽 教授

辅导教师：李文军 教授

摘　要

【研究背景与意义】

作为一种重要的工业原料——光气（Phosgene），其意外吸入可导致严重的急性肺损伤（acute lung injury，ALI），甚至进展为急性呼吸窘迫综合征（acute respiratory distress syndrome，ARDS），其临床特征表现为剧烈的炎症级联反应、肺泡-毛细血管屏障破坏及顽固性低氧血症，目前尚缺乏特异性的治疗手段。间充质干细胞（mesenchymal stem cells，MSCs）具有的免疫调节和组织修复能力，暗示其在 ALI 治疗可使用，然而，由于受损肺组织炎症微环境恶劣，MSCs 移植后的存活率低、归巢能力弱，导致疗效不稳定，制约其临床转化。粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 2（colony stimulating factor 2，CSF2）及其集落刺激因子 2 受体β亚基（Colony Stimulating Factor 2 Receptor Subunit Beta，CSF2RB）是介导细胞趋化和募集的关键信号轴。既往研究表明，CSF2/CSF2RB 轴可有效促进静脉输注的 MSCs 向受损心肌定向归巢。鉴于 CSF2RB 作为多种细胞因子的共同信号传导亚基，在维持免疫稳态、促进肺泡上皮修复及激活抗凋亡信号通路中发挥核心作用，本研究推测 CSF2/CSF2RB 可能是改善 MSCs 在恶劣微环境中生存并增强其治疗光气诱导 ALI 的关键分子靶点。

本研究得到国家自然科学基金面上项目（编号：NO.82373603）资助。

中国知网　https://www.cnki.net

【研究目的】

探究过表达 CSF2RB 能否增强 MSCs 对光气诱导小鼠 ALI 的治疗效果，并阐明其潜在的分子机制，旨在为光气中毒性肺损伤的救治提供基于间充质干细胞优化的新策略。

【研究方法】

1. 采用鼻吸入光气动态染毒法建立 C57BL/6 小鼠光气致 ALI 模型，测定半数致死浓时积，并评估染毒后不同时间点的肺损伤时程。

2. 利用腺病毒载体感染 MSCs，构建稳定过表达 CSF2RB 的细胞株（MSC-CSF2RB）及空载对照细胞（MSC-NC），通过 Western Blot 验证转染效率。

3. 将小鼠随机分为对照组、光气损伤组、MSC-NC 治疗组及 MSC-CSF2RB 治疗组。各治疗组于染毒后 4 h 经静脉注射相应细胞进行干预。通过肺功能检测、肺脏系数、支气管肺泡灌洗液（BALF）蛋白定量及 HE 染色病理评分评估肺损伤程度；利用 ELISA 检测炎症因子水平；通过 Western Blot 检测抗氧化（SOD2、Nrf2）与抗凋亡（Bcl-2）相关蛋白表达；并检测肺泡巨噬细胞的极化状态；采用 CM-DiI 荧光染料标记 MSCs，通过免疫荧光示踪其在肺组织的归巢定植情况。

4. 通过体外培养的方式验证 MSC-NC 和 MSC-CSF2RB 在炎症环境中的存活，并采用 Western blot 实验检测与 MSCs 存活相关的蛋白表达量。

【主要结果】

1. 光气暴露导致小鼠发生剂量与时间依赖性的 ALI，其半数致死浓时积为 348 ppm·min，最小致死浓时积为 200 ppm·min，肺组织损伤在染毒后 12 h 达到高峰。

2. 与 MSC-NC 组相比，MSC-CSF2RB 干预能更显著地改善光气致 ALI 小鼠的肺功能，降低肺脏系数和 BALF 蛋白浓度，并有效减轻肺水肿与肺组织病理损伤。

3. MSC-CSF2RB 治疗显著下调了损伤肺组织中促炎因子（TNF-α、IL-6、IL-1β）的表达，促进了巨噬细胞向 M2 型极化；同时进一步上调了肺组织中抗氧化（SOD2、

中国知网 https://www.cnki.net

Nrf2）及抗凋亡（Bcl-2）蛋白的表达水平。

4. 荧光示踪结果显示，过表达 CSF2RB 显著增加了 MSCs 在光气致 ALI 小鼠损伤肺组织中的定植与聚集数量。

5. 体外培养结果显示，过表达 CSF2RB 显著增强 MSCs 在炎症环境中的存活，其机制可能与 PI3K/AKT 通路有关。

【结论】

MSCs 中过表达 CSF2RB 可通过促进其向损伤肺组织的靶向归巢，增强 MSCs 在炎症环境中的存活，并增强其抗炎、抗氧化应激及抗凋亡能力，显著提升 MSCs 对光气诱导 ALI 的治疗效果。本研究为优化 MSCs 治疗光气中毒性肺损伤提供了新的分子靶点和理论依据。

关 键 词：光气；急性肺损伤；间充质干细胞；CSF2RB；细胞归巢

中国知网 https://www.cnki.net

The role and mechanism of CSF2RB overexpression-mediated mesenchymal stem cells in the treatment of phosgene-induced acute lung injury in mice

Candidate for master: Fan Zhenpeng

Supervisor: Li Wenli

Tutor: Li Wenjun

ABSTRACT

Background and Significance

Phosgene is a crucial industrial chemical, and accidental inhalation can lead to severe acute lung injury (ALI), which may progress to acute respiratory distress syndrome (ARDS) in severe cases. Its clinical manifestations are characterized by a vigorous inflammatory cascade, disruption of the alveolar-capillary barrier, and refractory hypoxemia, with a current lack of specific therapeutic interventions. Mesenchymal stem cells (MSCs) hold significant promise for ALI treatment due to their exceptional immunomodulatory and tissue repair capabilities. However, their therapeutic efficacy is often inconsistent and their clinical translation is hindered by the harsh inflammatory microenvironment of the injured lung tissue, which results in poor survival and limited homing capacity of transplanted MSCs. Colony stimulating factor 2 (CSF2) and its receptor subunit beta (Colony Stimulating Factor 2 Receptor Subunit Beta, CSF2RB) constitute a critical signaling axis mediating cell chemotaxis and recruitment. Previous studies have confirmed that the CSF2/CSF2RB axis effectively promotes the targeted homing of intravenously infused MSCs to injured myocardium. Given that CSF2RB serves as a common signal-transducing subunit for multiple cytokines, playing a central role in maintaining immune homeostasis, promoting alveolar epithelial repair, and activating anti-apoptotic signaling pathways, this study hypothesizes that it may be a key molecular target for enhancing MSC survival within

This study was supported by the General Program of the National Natural Science Foundation of China (No. 82373603).

中国知网 https://www.cnki.net

the hostile microenvironment and augmenting their therapeutic efficacy against phosgene-induced ALI.

Objective

This study aims to investigate whether overexpression of CSF2RB can enhance the therapeutic effect of MSCs on phosgene-induced ALI in mice and to elucidate the underlying molecular mechanisms, thereby aiming to provide a novel MSC-based optimization strategy for the treatment of phosgene-induced lung injury.

Methods:

1. A phosgene-induced ALI model was established in C57BL/6 mice using a dynamic nasal inhalation method. The median lethal concentration-time product (LCt50) was determined, and the time course of lung injury at various time points post-exposure was assessed.

2. MSCs were infected with adenoviral vectors to generate cell lines stably overexpressing CSF2RB (MSC-CSF2RB) and a negative control empty vector line (MSC-NC). Transfection efficiency was verified by Western Blot.

3. Mice were randomly divided into control group, phosgene injury group, MSC-NC treatment group, and MSC-CSF2RB treatment group. Treatment groups received intravenous injections of the respective cells 4 hours post-exposure. Lung injury severity was evaluated through pulmonary function tests, lung coefficient, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) protein quantification, and HE staining pathology scores. Inflammatory cytokine levels were measured by ELISA. The expression of antioxidant (SOD2, Nrf2) and anti-apoptotic (Bcl-2) related proteins was detected by Western Blot. The polarization state of alveolar macrophages was also assessed. MSCs were labeled with the fluorescent dye CM-DiL, and their homing and colonization in lung tissue were tracked via immunofluorescence.

4. The aggregation and distribution of MSCs in lung tissue were examined by immunofluorescence. The survival of MSC-NC and MSC-CSF2RB in an inflammatory environment was verified through in vitro culture, and Western blot was employed to detect the expression levels of proteins associated with MSC survival.

Main Results

1. Phosgene exposure induced dose- and time-dependent ALI in mice, with a median

中国知网 https://www.cnki.net

lethal concentration-time product (LCt50) of 348 ppm·min and a minimum lethal concentration-time product (MLCt) of 200 ppm·min. Lung tissue injury peaked at 12 hours post-exposure.

2. Compared to the MSC-NC group, intervention with MSC-CSF2RB more significantly improved pulmonary function, reduced the lung coefficient and BALF protein concentration, and effectively alleviated pulmonary edema and histopathological lung damage in Phosgene induced ALI mice.

3. MSC-CSF2RB treatment significantly downregulated the expression of pro-inflammatory cytokines (TNF-α, IL-6, IL-1β) in the injured lung tissue and promoted macrophage polarization towards the M2 phenotype. Concurrently, it further upregulated the expression levels of antioxidant (SOD2, Nrf2) and anti-apoptotic (Bcl-2) proteins in the lung tissue.

4. Fluorescence tracing results showed that overexpression of CSF2RB significantly increased the number of MSCs colonizing and aggregating in the injured lung tissue of Phosgene induced ALI mice.

5. In vitro culture results demonstrated that overexpression of CSF2RB significantly enhanced the survival of MSCs in an inflammatory environment, and the underlying mechanism may involve the PI3K/AKT signaling pathway.

Conclusion:

Overexpression of CSF2RB in MSCs significantly enhances their therapeutic efficacy against phosgene-induced ALI by promoting their targeted homing to injured lung tissue, enhancing their survival in the inflammatory microenvironment, and strengthening their anti-inflammatory, anti-oxidative stress, and anti-apoptotic capabilities. This study provides a novel molecular target and theoretical basis for optimizing MSC-based therapy for phosgene-induced lung injury.

KEY WORDS: Phosgene; Acute lung injury; Mesenchymal stem cells; CSF2RB; Cell Homing

中国知网 https://www.cnki.net

目 录

缩略语表.....1
前言.....3
文献综述.....5
1 光气致急性肺损伤概述.....5
1.1 光气的理化性质.....5
1.2 光气致 ALI 的发病机制.....6
1.3 药物治疗策略.....7
2 间充质干细胞(Mesenchymal stem cell,MSCs)概述.....8
2.1 MSCs 的来源、特性与归巢.....9
2.2 MSCs 治疗 ALI 的机制.....11
2.3 MSCs 疗法面临的挑战.....13
3 CSF2RB 的生物学功能及其在肺损伤与修复中的潜在作用.....15
3.1 CSF2RB 的结构与信号通路.....15
3.2 CSF2RB 在髓系细胞分化与炎症调控中的作用.....17
3.3 CSF2RB 在肺损伤修复中的潜在作用.....18
3.4 CSF2RB 在 MSCs 中的研究现状.....19
研究内容.....21
第一部分 光气致 ALI 小鼠模型的建立及 MSC-CSF2RB 的构建.....21
1 材料.....22
2 方法.....24
3 结果.....29
4 讨论.....34
第二部分 静脉注射 MSC-CSF2RB 减轻光气致 ALI 小鼠的肺损伤.....37
1 材料.....38
2. 方法.....39
3. 结果.....43
4. 讨论.....51
结论与展望.....55
参考文献.....57

中国知网 https://www.cnki.net

缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
ADSC	adipose-derived mesenchymal stem cell	脂肪来源间充质干细胞
ALI	acute lung injury	急性肺损伤
AM	alveolar macrophage	肺泡巨噬细胞
Ang-1	angiopoietin-1	血管生成素-1
ARDS	acute respiratory distress syndrome	急性呼吸窘迫综合征
BALF	bronchoalveolar lavage fluid	支气管肺泡灌洗液
BMSC	bone marrow-derived mesenchymal stem cell	骨髓来源间充质干细胞
CAT	catalase	过氧化氢酶
CSF2	colony-stimulating factor 2	集落刺激因子 2
CSF2RB	colony-stimulating factor 2 receptor beta subunit	集落刺激因子 2 受体 β 亚基
ECMO	extracorporeal membrane oxygenation	体外膜肺氧合
EEP	expiratory pause	呼气末暂停时间
EPO	erythropoietin	促红细胞生成素
GSH	glutathione	谷胱甘肽
LCt	lethal concentration-time product	致死浓时积
MAPK	mitogen-activated protein kinase	丝裂原活化蛋白激酶
MDA	malondialdehyde	丙二醛
MOI	multiplicity of infection	感染复数

中国知网 https://www.cnki.net

缩略词	英文全称	中文全称
MSC	mesenchymal stem cell	间充质干细胞
NF-κB	nuclear factor kappa B	核因子 κB
Nrf2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2	核因子 E2 相关因子 2
NV	nanovesicle	纳米囊泡
PAP	pulmonary alveolar proteinosis	肺泡蛋白沉积症
PAU	pause	呼吸暂停
Penh	enhanced pause	支气管收缩系数
PI3K	phosphoinositide 3-kinase	磷脂酰肌醇 3-激酶
RNF4	ring finger protein 4	环指蛋白 4
ROS	reactive oxygen species	活性氧
RPTOR	regulatory-associated protein of mTOR	mTOR 调节相关蛋白
SOD2	superoxide dismutase 2	超氧化物歧化酶 2
SP-C	surfactant protein C	表面活性蛋白 C
STAT	signal transducer and activator of transcription	信号转导及转录激活因子
Treg	regulatory T cell	调节性 T 细胞
TGF-β	transforming growth factor beta	转化生长因子 β
TLR4	toll-like receptor 4	Toll 样受体 4
TNF-α	tumor necrosis factor alpha	肿瘤坏死因子 α
ucMSC	umbilical cord-derived mesenchymal stem cell	脐带来源间充质干细胞
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子
WBP	whole-body plethysmography	全身体积描记系统

中国知网 https://www.cnki.net

前　言

光气（phosgene）属于窒息性化学战剂，曾经在第一、第二次世界大战和后续国际局部冲突中造成大量人员伤亡。据统计，一战中 80%化学武器伤亡与光气中毒有关[1][2]。同时，光气还是在农药、医药、染料和塑料等化工行业起着重要作用的化工原料。自 1997 年至 2025 年，我国光气年产量由 4.8 万吨增加到 600 多万吨，从业人员达上百万，经济规模近十亿。光气极强的毒性和致死性，严重威胁着相关从业人员的生命安全。光气中毒能引发急性肺损伤（acute lung injury, ALI）和肺水肿，致死率高，且救治困难[4]。研究发现，光气暴露后肺组织发生明显氧化应激和炎症反应，二者相互促进形成恶性循环，是导致 ALI 的关键机制[5]。目前国际上对光气导致肺水肿尚无特效救治药物，临床救治主要以对症支持治疗为主[6]。因此，不管是在国防应用还是保障化工安全的角度，研究光气中毒救治具有重要的现实意义，是我国亟待解决的公共卫生问题。

间充质干细胞（mesenchymal stem cells，MSCs）是一种来源于中胚层的多能成体干细胞，广泛分布于骨髓、脂肪及脐带组织中，具有多向分化潜能、免疫调节特性及组织修复能力，并且具有低免疫原性、非致瘤特性，在 ALI 的治疗研究中展现出广阔前景[7]。研究证实，移植 MSCs 可通过多种途径在 ALI 中发挥肺脏保护作用，并且 MSCs 需要到达损伤部位才能更好地发挥其保护功能，静脉输注 MSCs 后 60-70%富集于肺脏组织，使得 MSCs 治疗肺损伤具有天然优势[8][9]。但 MSCs 在损伤肺组织中的存活率及归巢能力有限等问题依然是限制其在体内应用所面临重要挑战。其原因可能由于 ALI 发生过程中大量炎性细胞浸润、氧化应激参与导致肺脏微环境极其恶劣，诱导了 MSCs 发生凋亡或功能抑制，使其在肺脏的存活不超过 24h[10][11]。目前的研究主要通过对 MSCs 进行低氧或氧化应激预处理、基因改造、优化给药途径（如尾静脉脉注射或气管滴注）等方式提高 MSCs 在肺脏的存活，最重要是对宿主微环境进行调控，但目前还未取得较好的成果[12]。因此，我们拟通过基因改造的方式以增强 MSCs 在治疗 ALI 中的作用，并初步探索其具体机制，为实现其在光气所致 ALI

中国知网 https://www.cnki.net

中治疗奠定实验基础。

粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子受体 β 链（colony-stimulating factor 2 receptor subunit beta, CSF2RB）是 GM-CSF、IL-3 和 IL-5 等多种细胞因子受体的共同信号传导亚基，在调控免疫细胞功能、维持肺泡稳态中发挥关键作用[13]。研究发现，CSF2RB 缺陷可导致肺泡巨噬细胞功能异常，引发严重的遗传性肺泡蛋白沉积症[14]。在肿瘤免疫领域，CSF2RB 表达水平与肺腺癌患者预后及肿瘤免疫微环境密切相关。近期心血管研究更是首次证实，CSF2RB 过表达可显著增强 MSCs 向缺血心肌的归巢能力，并通过 STAT5/RNF4 信号通路抑制细胞凋亡、促进血管新生，从而优化 MSCs 对缺血性心脏损伤的治疗效果[15]。这些发现提示，CSF2RB 可能是调控 MSCs 在损伤组织中存活与功能的关键分子，但其在 ALI 尤其是化学性肺损伤治疗中的作用尚未见报道。本课题研究了光气诱导小鼠 ALI 过程中，CSF2RB 过表达在 MSCs 治疗中的增强作用，并初步探讨了其作用机制，可能与抗炎、抗氧化和抗凋亡相关。

中国知网 https://www.cnki.net

文献综述

1 光气致急性肺损伤概述

光气（Phosgene），学名碳酰氯，是一种重要的工业化学品，广泛应用于聚氨酯泡沫单体（如 TDI、MDI）、橡胶、染料、消毒剂、清洁剂、灭火剂、化肥的化学生产过程中。然而，它同时也是一种经典的窒息性毒剂。第一次世界大战期间，光气作为化学武器造成了数十万人员的死亡，在所有化学武器致死案例中占比高达 85%[16][17]。尽管其毒性令人畏惧，但因其巨大的工业价值，光气的生产和使用至今仍不可或缺。因此，生产、储存和运输过程中的泄漏风险始终存在，一旦发生中毒事故，往往造成严重后果[18]。光气中毒的主要途径是吸入，其靶器官是肺，可引起持续性呼吸抑制、难治性肺水肿，严重者可发展为 ARDS，甚至死亡[19]。由于其高死亡率、不良预后和频发的后遗症，且临床上尚无特效解毒剂，因此开发针对性的治疗方法至关重要[20]。

1.1 光气的理化性质

光气化学式：$COCL_2$，分子量：98.92，密度是空气的 4.05 倍，常温下为无色气体，有烂干草味，高浓度有辛辣气味，微溶于水。因其水溶性差，所以在通过中毒患者上呼吸道时很少被吸收，大部分能顺利抵达下呼吸道的肺泡腔[16]。根据 Haber 定律，光气的毒性效应与暴露浓度（C）和时间（t）的乘积（C×t）成正比。根据美国环保署的急性暴露指南水平（AEGL），Haber 定律在特定范围内适用。例如，对于狗或大鼠，暴露剂量大于 30 ppm·min 时，即可引起肺水肿和血气屏障破坏；对人类而言，亚致死剂量（30-150 ppm·min）的暴露即可引起肺组织内炎症反应和氧化应激而导致肺水肿。当吸入剂量超过 300 ppm·min 时，可能导致部分个体死亡；约 500 ppm·min 的剂量可在 3 h 内出现明显肺水肿，并在 24 h 内致死；而极高剂量（大于 600 ppm·min）可能在几分钟内造成人员死亡[17]。

中国知网 https://www.cnki.net

1.2 光气致 ALI 的发病机制

1.2.1 光气致 ALI 病理生理学机制

光气致 ALI 的核心病理生理变化是肺水肿，其形成机制复杂，主要涉及肺泡-毛细血管屏障的直接损伤（非心源性肺水肿）和神经源性肺水肿两个方面。蛋白质、脂质和核酸中的重要基团（如-NH_2、-SH、-OH）等肺泡表面活性物质与光气中具有高反应性的羰基发生酰化反应，生成盐酸并交联生物大分子。这首先导致表面活性物质耗竭，进而破坏肺泡-毛细血管屏障的完整性。屏障破坏导致肺泡毛细血管通透性增加，血管内的液体和蛋白质渗漏到肺间质和肺泡腔，形成肺水肿[18][19]。同时，光气还可消耗肺泡内的谷胱甘肽（GSH），导致活性氧（ROS）产生增加，进一步加重组织损伤[20][21]。神经源性肺水肿则是由于光气可刺激支配下呼吸道的迷走神经 C 纤维。这些感觉神经末梢的持续兴奋会引发一系列迷走神经反射，如呼吸暂停和心动过缓（Bezold-Jarisch 反射），更重要的是，这种过度兴奋会导致肺交感神经张力丧失致使血管舒张机制失效，进而引起广泛的肺血管收缩和肺泡腔闭合。这使得大量血液淤积在肺循环中，导致肺静脉压力升高，最终促使液体和蛋白质渗出，形成神经源性肺水肿[23]。

1.2.2 光气致 ALI 分子机制

1.2.2.1 炎症反应

光气致 ALI 的特征之一是肺组织的级联炎症反应，促炎因子如 IL-1 β 和 TNF- α 的水平显著升高[22][23]。这与多条炎症信号通路的激活有关。光气暴露可增加 p38 MAPK 的磷酸化，并激活核转录因子 NF-κB（通过 p65 亚基磷酸化），从而协调多种炎症介质的表达，导致持续的炎症反应；激活 NLRP3 炎症小体，通过经典的 caspase-1 依赖途径，促进下游炎症介质 IL-1β、IL-18 和 IL-33 的成熟和释放，加剧炎症和组织损伤。基因沉默抑制 NLRP3 可下调这些炎症因子，改善病理变化[24]。

1.2.2.2 氧化应激

氧化应激在光气致 ALI 中也扮演着关键角色。光气及其解离产物与生物分子反应，产生大量活性氧（ROS）。当 ROS 过量且无法被有效清除时，就会损伤肺泡上皮细胞和肺内皮细胞[25][26]。这个过程通常伴随着抗氧化酶（如 SOD、CAT、GPx）表

中国知网 https://www.cnki.net

达的降低[27][28]。光气暴露可抑制核因子 E2 相关因子 2（Nrf2），导致其介导的抗氧化酶系统紊乱，加剧氧化损伤[29]。因此，抗氧化应激被认为是光气致 ALI 潜在的治疗和预防策略。

1.3 药物治疗策略

由于光气致 ALI 的具体机制目前仍不明确，所以缺乏特效解毒剂。目前其临床治疗仍以机械通气、氧疗、ECMO 和液体复苏等对症支持治疗为主。但这些方法无法逆转病理生理进程。因此，寻找早期干预的药物是研究的关键[30]。

常用的抗炎药物有：①糖皮质激素。早期、足量、短程应用糖皮质激素可促进肺水肿吸收，有效保护肺毛细血管内皮细胞。然而其应用存在争议，单次高剂量地塞米松可能加重肺毒性，且使用时间点至关重要；②乌司他丁。乌司他丁是一种广谱丝氨酸蛋白酶抑制剂，可通过下调 IL-15、ICAM-1 和 IL-1β 等促炎因子，减轻肺部炎症，且效果呈剂量依赖性；③NOS-2 抑制剂。诱导型一氧化氮合酶（NOS-2）在光气致 ALI 中上调，产生过量 NO，损伤肺泡上皮屏障。抑制剂如 1400W 和氨基胍（AG）能下调 NO 产生，增强表面活性蛋白 B（SP-B）和紧密连接蛋白 ZO-1 的表达，保护屏障功能；④褪黑素。是一种具有抗炎作用的激素，可通过激活 Wnt/β-catenin 通路、抑制 p38 MAPK 激活及 NOS-2 和 NF-κB 表达，在光气致 ALI 中发挥抗炎效应；⑤血管生成素-1。是一种维持血管内皮屏障功能的关键糖蛋白，通过腺病毒递送 Ang-1 可显著降低光气致 ALI 大鼠的炎症因子和血管通透性，其机制与抑制 NF-κB、p38 MAPK 通路和 NLRP3 炎症小体激活有关[31][32]。

治疗光气致 ALI 的抗氧化药物有：①N-乙酰半胱氨酸。是一种巯基化合物，理论上可通过 Nrf2/GR/GSH 途径提升 GSH 合成，修复抗氧化防御系统。但雾化吸入给药在动物模型中效果不佳，可能因肺水肿液阻碍了药物到达损伤部位，其临床效果仍存在争议；②咖啡酸苯乙酯。是一种从蜂胶中提取的天然黄酮类化合物，可通过下调 MDA 和 SOD 水平，上调抗氧化酶 GSH 水平来发挥抗氧化应激作用[32]；③布洛芬。除抗炎作用外，布洛芬还可通过螯合铁离子，阻止铁介导的氧化剂生成和脂质过氧化，从而减轻光气致 ALI 的氧化损伤；④Bio300。是一种异黄酮类放射防护剂，能通过 Keap1-Nrf2-ARE 通路上调抗氧化酶表达，降低光气致 ALI 小鼠死亡率；⑤

中国知网 https://www.cnki.net

5,8,11,14-二十碳四炔酸。是一种花生四烯酸类似物，通过增强抗氧化能力来减轻肺水肿[31][32]。

目前还有其他新兴治疗策略：①TRP 通道抑制剂。瞬时受体电位（TRP）通道（尤其是 TRPA1 和 TRPV1）是肺部的化学传感器。光气等毒气可激活这些通道，导致钙离子内流，引发神经源性炎症、气道收缩和血管通透性增加。广谱 TRP 通道抑制剂 SKF-96365、TRPA1 抑制剂 HC-030031 等可抑制肺上皮细胞钙离子外排，提高光气致 ALI 小鼠的存活率；②Fv-HSP72。热休克蛋白 72 具有抗应激和抗凋亡作用。通过将其与细胞穿透抗体 3E10 结合形成 Fv-HSP72，可增强其在损伤部位的靶向吸收。研究显示，它能通过抑制 NF-κB 入核，减少 NOS-2 表达和氧化应激诱导的凋亡，是一种有潜力的光气致 ALI 治疗药物[21][22]。

2 间充质干细胞（Mesenchymal stem cell，MSCs）概述

MSCs 是一类存在于骨髓、脂肪、脐带、胎盘等多种组织中的成体干细胞[23]。MSCs 的治疗潜力最初被认为源于其分化能力，但近年研究证实，MSCs 主要通过旁分泌途径发挥作用，其分泌多种生物活性因子及细胞外囊泡（Extracellular vesicles，EVs），调节靶细胞功能[24][25]。源于 MSCs 的 EVs 携带蛋白质、mRNA、miRNA 和脂质等生物信息分子，能够实现 MSCs 的大部分功能，且具有稳定性高、免疫原性低、无致瘤风险等优势，被视为“无细胞疗法”的理想选择[26]。MSCs 同时具备归巢能力，静脉输注后因“肺首过效应”主要滞留于肺部，这使其在治疗 ALI 时具有天然优势。多种疾病类型的 MSCs 的治疗研究已开展。在急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征领域，MSCs 通过免疫调节发挥核心作用。研究证实：MSCs 及其 EVs 能将促炎的 M1 型巨噬细胞转化为抗炎修复的 M2 型，抑制中性粒细胞过度浸润，调节 T 细胞和 NK 细胞功能。Morrison 等人发现，MSC-EVs 通过 CD44 介导的途径将功能性线粒体转移至巨噬细胞，增强其氧化磷酸化水平，从而驱动 M2 型极化[26]。Wei 等人则揭示，脐带 MSCEVs 中的 miR-377-3p 可通过靶向 RPTOR 激活肺泡上皮细胞自噬，减轻 LPS 诱导的肺损伤[]。在心血管疾病领域，Xia 等人通过过表达法尼醇 X 受体增强脂肪来源干细胞（Adipose-derived stem cells，ADSC）在心肌梗死微环境中的存活和功能，其分泌的血管生成素样蛋白 4 显著促进了血管新生和心脏修复[26]。在神经系统

中国知网 https://www.cnki.net

疾病领域，Ji 等人发现 ADSC-EVs 可通过抑制小胶质细胞 TLR4/MAPK/NF-κB 促炎级联信号，减轻高眼压诱导的视网膜神经节细胞损伤[27]。在皮肤伤口愈合领域，Yang 等人的研究表明缺氧预处理的 ADSC-EVs 外泌体通过激活 AKT/HIF-1α 轴，促进角质形成细胞增殖迁移，加速阴道伤口修复[28]。Sun 等人利用工程化纳米囊泡技术大量制备富含 miR-21-5p 的 ADSC 纳米囊泡，通过激活 PI3K/Akt 信号通路促进脂肪移植后的血管新生[37]。此外，MSCs 在自身免疫病、骨关节炎、移植物抗宿主病等领域也展现出治疗潜力。Ko 等人的研究揭示了 ADSC 分泌组通过上调 CIS 和 DUSP4 抑制 IL-2 介导的 JAK-STAT 和 AKT 信号通路，从而抑制 NK 细胞活性，为治疗 NK 细胞介导的炎症性疾病提供了新策略[30]。

MSCs 也被用于光气致 ALI 的治疗。MSCs 因其强大的免疫调节能力和组织修复潜力，成为治疗 ALI 的研究热点。MSCs 通过参与血气屏障修复、调节炎症反应来减轻光气致 ALI。MSCs 可以抑制 TGF-β1 和 Wnt5a 对 Wnt3a/β-catenin 通路，从而降低上皮细胞通透性[31]；激活 Notch 通路促进内源性肺干细胞（club 细胞）的增殖与分化。移植 MSCs 需要到达损伤部位才能更好地发挥其保护功能，而研究表明，静脉输注 MSCs 后 60-70%富集于肺脏组织，使得 MSCs 治疗肺损伤具有天然优势。但其在体内应用仍面临诸多困难，其中 MSCs 在损伤肺组织中的存活率及归巢能力有限且具体机制不明是当前研究面临的重要挑战。为解决这个问题，研究者通过基因修饰增强其功能。例如，过表达热休克蛋白 70（Hsp70）的 MSCs，可通过激活 PI3K/AKT 通路提高自身存活和迁移能力；过表达 CXCR7 可增强 MSCs 向损伤部位定向迁移并分化为 II 型肺泡上皮细胞的能力。为避免 MSCs 潜在的致瘤风险，MSC 来源的外泌体成为一种有前景的替代方案。研究发现，MSC 外泌体可通过抑制 MMP-9 合成、上调 SP-C 来治疗光气致 ALI；外泌体中的 miR-28-5p 还可通过 PI3K/Akt 途径反向调节 MSCs 的功能[32]。

2.1 MSCs 的来源、特性与归巢

间充质干细胞是一类存在于多种组织中的成体干细胞（图 1）[33]，目前研究中最常用的来源包括骨髓、脂肪组织和围产期组织如脐带、胎盘等。根据国际细胞治疗学会（ISCT）的最低标准，MSCs 被定义为：①在标准培养条件下具有贴壁性；②表

中国知网 https://www.cnki.net

达 CD73、CD90、CD105 等间质细胞标志物，不表达 CD14、CD34、CD45 及 HLA-DR 等造血系和内皮细胞标志物；③具有体外向成骨细胞、成脂细胞和成软骨细胞分化的多向潜能[34]。

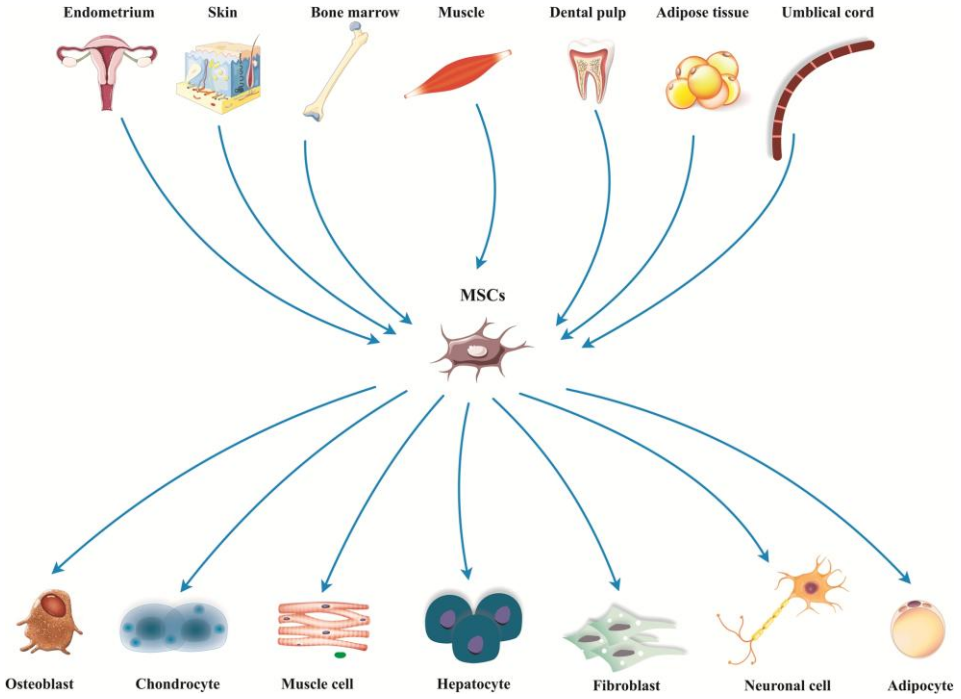


图 1 MSC 的来源和分化能力[33]

2.1.1 不同来源 MSCs 的特性与比较

不同组织来源的 MSCs 在功能上既有共性，也存在差异，这可能影响其在 ALI 治疗中的具体应用。骨髓来源 MSCs（Bone marrow mesenchymal stem cells，BMSCs）作为研究最广泛的 MSCs，其免疫调节能力已得到充分证实。研究表明，BMSCs 能有效减轻 LPS 诱导的 ALI，其机制涉及促进巨噬细胞 M2 型极化和抑制促炎因子释放。脂肪来源 MSCs（（Adipose Derived Stem Cells，ADSCs）因其获取方便、组织含量丰富（每克脂肪组织可获得约 5000 个 ADSCs）、创伤小且供区并发症少，成为再生医学领域的热门选择[24]。多项研究证实，ADSCs 及其分泌的细胞外囊泡在皮肤伤口愈合、心肌修复以及 ALI 治疗中均显示出良好效果[12][13]。脐带来源 MSCs（umbilical cord-derived mesenchymal stem cell，ucMSCs）来源于新生儿废弃物，具有增殖能力强、免疫原性更低、获取无创等优势。研究表明，ucMSCs 及其外泌体在治疗 LPS 诱导的 ALI 中效果显著[36]。Wei 等人的研究发现，ucMSC 外泌体通过递送

中国知网 https://www.cnki.net

miR-377-3p 靶向抑制 RPTOR，激活肺泡上皮细胞自噬，从而减轻炎症和肺损伤，揭示了其独特的分子机制[25]。

2.1.2 MSCs 的归巢与体内命运

MSCs 治疗 ALI 的首要步骤是其能否有效到达损伤部位，即“归巢”能力。然而，静脉输注 MSCs 面临一个关键的“肺首过效应”。Eggenhofer 等人的研究明确指出，由于 MSCs 的直径（15-30 μm）大于肺毛细血管的直径，绝大多数（超过 80%）经静脉输注的 MSCs 会在首次通过时被阻滞在肺毛细血管网中。通过放射性标记和荧光追踪，他们发现输注后 1 h 内，活 MSCs 主要滞留在肺部，在 24 h 内仍可在肺组织中检测到，但之后迅速消失，且无法迁移至肝脏、脾脏等其他脏器[11][12]。即使在肝脏诱导缺血-再灌注损伤的情况下，也未能发现活 MSCs 迁移至损伤的肝脏。这意味着，MSCs 在肺部的短暂滞留是其与肺内免疫微环境相互作用、发挥治疗作用的物理基础。虽然这限制了它向其他器官的分布，但对于治疗 ALI 而言，这种“被动靶向”反而成为优势，使得 MSCs 能够在损伤局部直接发挥功能。这种“hit and run”的作用模式也提示，MSCs 的治疗效果可能主要通过启动或调节宿主细胞的后续反应来实现，而非 MSCs 本身的长期植入[37]。

2.2 MSCs 治疗 ALI 的机制

MSCs 治疗 ALI 的机制非常复杂，早期认为的“分化替代”受损肺组织细胞的假说已被颠覆。目前主流观点认为，MSCs 主要通过旁分泌途径释放多种生物活性因子，调节宿主的免疫细胞功能，从而减轻炎症、促进组织修复。其核心机制可归纳为以下几个方面。

2.2.1. 免疫调节与炎症抑制

MSCs 能够感应炎症微环境中的信号，并做出相应的免疫调节响应。巨噬细胞在 ALI 的发病和转归中扮演着“总指挥”的角色。在 ALI 早期，巨噬细胞以分泌大量 TNF-α、IL-1β 等因子的 M1 型为主，放大炎症损伤。而在恢复期，则转变为 M2 型抗炎巨噬细胞，分泌 IL-10、TGF-β 等，促进组织修复。MSCs 及其分泌的细胞外囊泡能有效地将 M1 型巨噬细胞极化为 M2 型[38]。Morrison 等人的研究证实，MSC 来源的 EVs

中国知网 https://www.cnki.net

可通过 CD44 介导的途径被巨噬细胞摄取，并将功能性的线粒体转移至巨噬细胞内，增强其氧化磷酸化水平，从而驱动 M2 型极化[24]。此外，MSC-EVs 中富含的多种 miRNA，如 miR-27b-3p、miR-146a 等，可通过靶向 CSF-1、IRAK1 等关键分子，调控巨噬细胞的功能状态。Liu 等人的研究也表明，炎症刺激下的 MSC-EVs 中高表达的 miR-27b-3p 能够通过靶向 CSF-1，促进 M2 型巨噬细胞分化，从而在颞下颌关节骨软骨再生中发挥重要作用[47]。MSCs 还能抑制中性粒细胞的过度浸润和活化，减少其释放的活性氧和蛋白酶，从而减轻组织损伤；能抑制自然杀伤细胞的细胞毒性，下调其活化受体表达，减少 IFN-γ 的产生；并能促进调节性 T 细胞的增殖和功能，共同构建一个免疫抑制、有利于组织修复的微环境。Jia 等人的综述系统总结了 ADSC-EVs 通过其携带的非编码 RNA 和免疫调节特性，调控伤口愈合过程中的炎症反应（图 2）[40]。

2.2.2. 旁分泌因子与细胞外囊泡

MSCs 分泌的多种可溶性因子和细胞外囊泡是其发挥功能的主要载体。①可溶性因子。MSCs 分泌的生长因子如角质形成细胞生长因子（KGF）、肝细胞生长因子（HGF）、血管内皮生长因子（VEGF）和血管生成素-1（Ang-1）等，有助于修复受损的肺泡上皮和内皮屏障，促进肺泡液清除，并具有抗凋亡作用[41]。②细胞外囊泡与线粒体转移。MSC-EVs 携带了蛋白质、mRNA、miRNA、脂质等多种生物信息分子，能够模拟 MSCs 的大部分功能，且具有稳定性高、免疫原性低、无致瘤风险等优势，被视为“无细胞疗法”的理想选择[42]。特别值得关注的是，EVs 可以介导线粒体的转移。Morrison 等人的研究发现，MSC-EVs 可将功能完好的线粒体递送给巨噬细胞，这不仅改善了细胞的能量代谢，更是驱动巨噬细胞向 M2 型极化的关键信号[24]。这种“能量重塑”为理解 MSCs 的免疫调节作用提供了全新的视角。Xia 等人的研究则发现，过表达法尼醇 X 受体（FXR）的 ADSCs 可通过结合心肌缺血微环境中的胆汁酸，上调血管生成素样蛋白 4（Angptl4）的分泌，从而增强其促血管生成和保护心脏的作用，这为改造 MSCs 以适应特定微环境提供了范例[26]。

2.2.3. 增强细胞自噬

自噬是真核细胞中一种保守的降解机制，对于清除受损细胞器、蛋白聚集体以及

中国知网 https://www.cnki.net

维持细胞稳态至关重要。Wei 等人的研究发现，人脐带 MSC 来源的外泌体可以通过递送 miR-377-3p 至肺泡上皮细胞，靶向抑制 RPTOR（mTORC1 的调节相关蛋白），从而解除 mTOR 对自噬的抑制，激活自噬流。增强的自噬有助于抑制炎症小体活化，减轻内质网应激，保护肺泡上皮细胞免受 LPS 诱导的损伤。这一发现将 MSCs 的疗效与细胞自噬这一基础生物学过程联系起来[25]。

2.2.4. 抗凋亡与促血管生成

MSCs 通过分泌 VEGF、HGF 和胰岛素样生长因子-1（IGF-1）等因子，抑制内皮细胞和上皮细胞凋亡。同时，它们还能促进损伤区域新生血管的形成，恢复局部血液供应，为组织修复提供必要的氧气和营养支持[41]。Sun 等人利用工程化纳米囊泡（NVs）技术，从 ADSCs 中大量制备富含 miR-21-5p 的纳米囊泡，证实其能通过激活 PI3K/Akt 信号通路，有效促进脂肪移植后的血管新生和组织再生[37]。

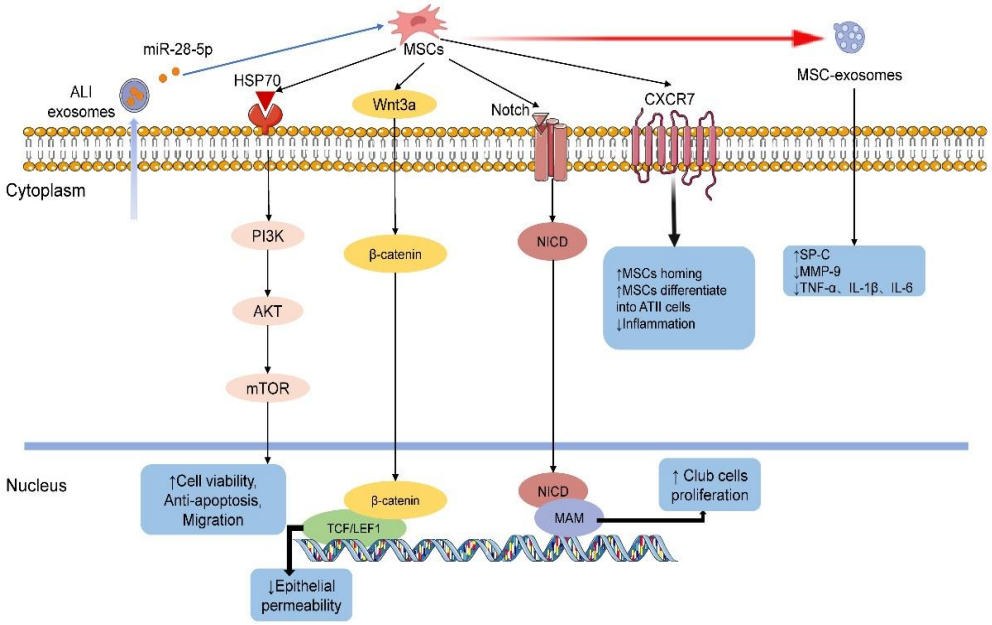


图 2 MSCs 在 ALI 中的功能[40]

2.3 MSCs 疗法面临的挑战

尽管 MSCs 治疗 ALI 在临床前研究中取得了显著成效，但向临床转化仍面临诸多挑战。

中国知网 https://www.cnki.net

2.3.1. MSCs 的异质性与标准化难题

MSCs 的生物学特性受供者年龄、健康状况、组织来源、分离方法、培养条件（如氧浓度、血清、传代次数）等多因素影响，导致不同批次的 MSCs 产品在细胞表型、增殖能力、分化潜能和免疫调节功能上存在显著差异。这种异质性使得难以建立一个统一的“效价测定”方法来预测其临床疗效，给药品监管和质量控制带来了巨大挑战，也导致不同临床研究结果难以比较[42]。

2.3.2. MSCs 在损伤肺组织中归巢与存活率低

如前所述，尽管 MSCs 能短暂滞留于肺部，但 Eggenhofer 等人的研究证实，输注后 24-72 h，活 MSCs 的数量急剧下降，很快被宿主固有免疫系统（特别是巨噬细胞）清除。这意味着 MSCs 的治疗作用是短暂的，可能是一种“hit-and-run”模式[9]。如何通过基因修饰、预处理（如缺氧预适应、细胞因子刺激）或联合生物材料，延长 MSCs 在体内的存活时间和功能窗口，是提高疗效的关键。Yang 等人的研究显示，缺氧预处理的 ADSC 外泌体可通过激活 AKT/HIF-1α 轴，增强角质形成细胞的增殖和迁移，从而促进阴道伤口愈合，这表明对 MSCs 进行预处理是增强其功能的有效策略[28]。

2.3.3. 机制研究的深入与转化

虽然目前对 MSCs 的旁分泌和免疫调节机制有了较深入的了解，但这些机制多在动物模型或简单的体外实验中验证，在复杂的人体内环境中是否完全适用尚不清楚。例如，Pauluhn 对光气诱导 ALI 的机制提出了与传统观点完全不同的“心源性”假说，指出肺水肿的成因可能并非源于直接的肺泡上皮损伤和经典炎症，而是由神经源性触发的心肺功能失衡所致[43]。如果这一假说成立，那么针对经典炎症的 MSCs 疗法在这种特定病因的 ALI 中是否有效，就需要重新审视。这提示我们，针对不同病因、不同阶段的 ALI，可能需要“个性化”的 MSCs 治疗方案，如选择不同来源的 MSCs、使用不同功能的 EVs 亚群，或与其他药物联合应用。

2.3.4. 大规模生产与递送问题

为了达到临床治疗剂量，需要大规模扩增 MSCs，这可能导致细胞衰老和功能下

中国知网 https://www.cnki.net

降。同时，开发符合药品生产质量管理规范的、稳定、高效的 EVs 大规模制备工艺也是一个亟待解决的问题。此外，优化递送方式（如雾化吸入、局部注射）也可能提高 MSCs 在肺部的保留率和治疗效果[42]。

综上所述，MSCs 通过其独特的免疫调节、抗炎、促自噬和促血管生成等旁分泌功能，在 ALI 治疗中展现出巨大潜力。未来的研究应聚焦于建立标准化的生产体系和效价评价方法，开发更有效的基因修饰或预处理策略以增强 MSCs 的功能，并深入探索 MSCs 在不同病因、不同阶段 ALI 中的作用机制和药代动力学特性，以期早日实现其在 ALI 中的临床应用。

3 CSF2RB 的生物学功能及其在肺损伤与修复中的潜在作用

3.1. CSF2RB 的结构与信号通路

CSF2RB，又称为 CD131 或 IL-3RB，是细胞因子受体家族中的一个独特而关键的成员。它作为 IL-3、IL-5 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子受体的共同 β 亚基，本身不具备与这些配体的高亲和力，却是信号转导的核心亚基。其结构与功能的研究揭示了细胞因子受体激活的复杂机制（图 3）[44]。

3.1.1 CSF2RB 的分子结构

CSF2RB 的基因定位于 22 号染色体 q12.3 区域。其编码的蛋白是一个跨膜糖蛋白，包含一个较长的胞外结构域、一个跨膜区和一个负责信号转导的胞内结构域。胞外结构域包含多个纤连蛋白 III 型结构域，这些结构域在与配体-α 链复合物相互作用及受体二聚化中发挥关键作用。McClure 等人的研究通过巧妙的嵌合受体实验证明，CSF2 与其受体结合会诱导 CSF2RB 发生同源二聚化。他们构建了 CSF2RB 胞外段与 EPO 受体胞内段的嵌合体，在表达 CSF2 受体的细胞中，CSF2 刺激能通过该嵌合体传递增殖信号，这强有力地证明了 CSF2RB 的二聚化是启动信号传导的必要环节[45]。

中国知网 https://www.cnki.net

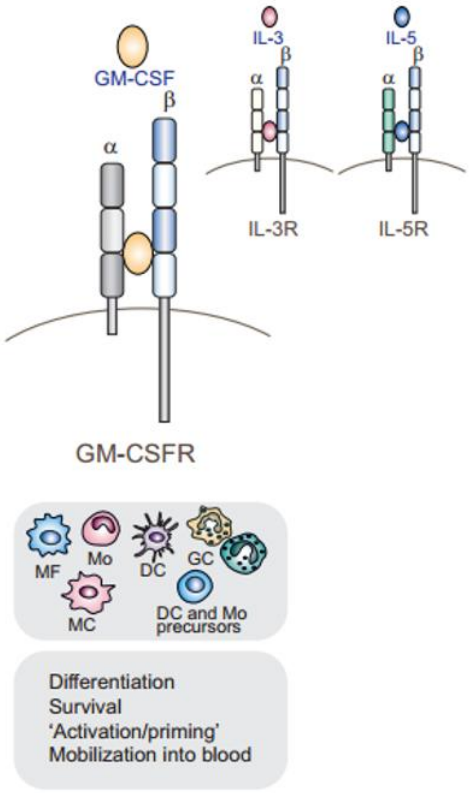


图 3 CSF2RB 的结构[44]

3.1.2 CSF2RB 的激活机制与信号通路

在静息状态下，CSF2RB 与 JAK2 酪氨酸激酶组成性地结合。当 CSF2、IL-3 或 IL-5 与其特异性 α 链（CSF2RA、IL-3RA、IL-5RA）结合后，形成的配体-α 链复合物会招募 CSF2RB，形成高亲和力的异源六聚体或更高级的十二聚体复合物。这一过程导致与 CSF2RB 结合的 JAK2 相互靠近并发生反式磷酸化激活。激活的 JAK2 进而磷酸化 CSF2RB 胞内结构域上的多个酪氨酸残基，这些磷酸化的位点成为含有 SH_2 结构域的信号分子的锚定位点，从而启动下游三条主要的信号通路：

①JAK/STAT 通路：这是 CSF2RB 最经典的信号通路。STAT5 是最主要的被激活的转录因子。磷酸化 STAT5 参与调控细胞存活、增殖、分化等功能相关的基因表达。Sun 等人的研究表明，CSF2 的剂量依赖性效应，如诱导粒细胞或单核细胞发育，正是通过 STAT5 等通路的差异激活实现的[37]。Tanaka 等人对遗传性肺泡蛋白沉积症患者的研究也证实，CSF2RB 基因突变导致 STAT5 磷酸化完全消失，直接证明了 CSF2RB 在 STAT5 激活中的必要性[45]。

中国知网 https://www.cnki.net

②PI3K/AKT 通路：磷酸化的 CSF2RB 也可招募并激活 PI3K，进而激活 AKT 激酶。该通路主要促进细胞存活和增殖，对抑制凋亡至关重要。Ko 等人发现，ADSC 分泌组通过上调 CIS 抑制 IL-2 介导的 JAK-STAT 和 AKT 信号通路，从而约束 NK 细胞活性，这也反向证明了 AKT 通路在免疫细胞活化中的重要性[38]。

③RAS/MAPK 通路：接头蛋白 Shc 可被招募至磷酸化的 CSF2RB，进而通过 Grb2-SOS 激活 Ras，最终引发 MAP 激酶（ERK）的级联反应。该通路参与调控细胞增殖、分化及效应功能[45]。

3.2. CSF2RB 在髓系细胞分化与炎症调控中的作用

CSF2RB 作为多种炎症性细胞因子受体的共用信号亚基，在髓系细胞的发育、存活、极化及功能调控中扮演着核心角色，是连接先天性免疫和适应性免疫的关键节点。

3.2.1 CSF2RB 在髓系细胞分化与存活中的作用

CSF2RB 是 CSF2 和 IL-3 信号的必需组分，对粒细胞、单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞的生成与功能至关重要。Sun 等人发现，CSF2 剂量能够选择性调控粒细胞和单核细胞的发育，低剂量 CSF2 主要通过促进粒细胞存活发挥作用，而高剂量则主要通过促进单核细胞系增殖[37]。这种剂量依赖性效应正是通过 CSF2RB 及其下游 STAT5、AKT 等信号通路的不同激活程度实现的。在肺稳态维持中，CSF2RB 的作用尤为突出。Gschwend 等人的研究通过条件性敲除小鼠模型，首次在体内证实肺泡 II 型上皮细胞（AT2）是肺泡巨噬细胞（AM）生存、发育和维持所需 CSF2 的唯一关键来源。造血细胞来源的 CSF2 对 AM 的发育并非必需。一旦 AT2 细胞来源的 CSF2 信号通过 CSF2RB 缺失，AM 将几乎完全耗竭，导致肺泡蛋白沉积症（PAP）的发生[46]。Koochaki 等人通过 CRISPR 筛选进一步揭示，CSF2RB 的蛋白稳定性受到 E3 泛素连接酶 STUB1/CHIC2 复合物的负调控，该复合物在低细胞因子环境下促进 CSF2RB 的降解，从而防止细胞表面受体过度积累，精细调控髓系细胞对 CSF2 的敏感性[47]。

3.2.2 CSF2RB 在炎症调控与自身免疫病中的作用

CSF2RB 是驱动组织炎症的关键分子。在炎症状态下，Th17.1 等致病性 T 细胞

中国知网 https://www.cnki.net

大量产生CSF2，作用于表达CSF2RB的髓系细胞，形成一个正反馈的炎症放大环路。Franken 等人的单细胞测序研究在免疫检查点抑制剂相关性肺炎（CIP）患者的肺泡灌洗液中，发现了大量共表达 TBX21 和 RORC 的致病性 Th17.1 细胞，这些细胞高表达 CSF2[56]。同时，肺泡灌洗液中富集了高表达 CSF2RB 和促炎因子（如 IL-1β、IL-6、IL-23）的炎性单核细胞。研究揭示了一个由 T 细胞来源的 GM-CSF 作用于单核细胞 CSF2RB，驱动单核细胞产生炎症因子，进而放大 T 细胞应答的致病性环路[48]。Charlet 等人在 FLT3-ITD 阳性急性髓系白血病中的研究则从另一个角度验证了CSF2RB 的促炎/促增殖潜力。他们发现突变的 FLT3-ITD 激酶能够直接与 CSF2RB 结合并使其磷酸化，绕过 JAK2，直接激活 STAT5，驱动 AML 细胞的恶性增殖。这表明 CSF2RB 在特定病理条件下可被非经典配体激活，成为疾病治疗的新靶点[49]。

此外，Shang 等人发现，在阿尔茨海默病中，患者脑内高水平的 CSF2 可上调血单核细胞上 CSF2RB 的表达，并通过破坏脑血管内皮细胞间的紧密连接，促进外周单核细胞向脑内浸润，加剧神经炎症。这扩展了 CSF2RB 在神经退行性疾病中介导“脑-免疫”相互作用的认识[50]。

3.2.3 CSF2RB 在免疫调节中的双面性

Corte-Real 等人的研究发现，尽管 $FOXP3^+$调节性 T 细胞显著高表达 CSF2RB，但在体外实验中，无论是敲除 CSF2RB 还是用 βc 家族细胞因子刺激，均未发现其对 Treg 的经典抑制功能产生明显影响。这提示 CSF2RB 在 Treg 中的作用可能不是调节其基础抑制功能，而可能与其他环境依赖性功能相关，同时也说明了 CSF2RB 在不同免疫细胞中的作用具有高度的特异性[51]。

3.3. CSF2RB 在肺损伤修复中的潜在作用

基于 CSF2RB 在髓系细胞活化和炎症调控中的重要地位，它在 ALI 及其修复过程中的作用日益受到关注。

3.3.1 抑制肺损伤中的炎症风暴

在感染、创伤等因素诱导的 ALI 中，失控的炎症是重要病理特征。多项研究表明，CSF2/CSF2RB 轴是驱动肺内炎症风暴的关键上游信号。De Alessandris 等人在

中国知网 https://www.cnki.net

LPS 诱导的 ALI 小鼠模型中发现，肺内募集的炎性中性粒细胞表面的 CSF2RB 迅速下调，同时肺泡灌洗液中的 CSF2 浓度在短暂升高后快速下降。使用抗 CSF2RB 抗体阻断该信号，不仅能维持肺泡内 CSF2 的高水平，还能显著减少中性粒细胞浸润和 IL-1β 的产生，从而减轻肺损伤。这表明，中性粒细胞通过其表面的 CSF2RB，主动“消耗”并响应 CSF2，是放大和维持肺部炎症的关键环节。阻断 CSF2RB 信号，就切断了炎症放大的正反馈，从而起到保护作用[61]。

3.3.2 调控肺泡巨噬细胞功能与修复

AMs 是肺组织稳态和损伤修复的重要细胞，其功能完全依赖于 CSF2RB 信号。如前所述，AT2 细胞来源的 CSF2 通过 CSF2RB 维持 AMs 的生存和功能。在肺损伤修复期，AMs 需要从促炎表型转变为促修复表型。Morrison 等人的研究揭示了 MSC 来源的细胞外囊泡通过 CSF2RB 信号通路调控 AM 功能的潜在机制。他们发现，MSC-EVs 可通过其表面的 CD44 分子与巨噬细胞相互作用，将线粒体转移至巨噬细胞内，通过增强其氧化磷酸化，促进其向抗炎、高吞噬活性的 M2 表型极化。虽然该研究未直接操纵 CSF2RB，但线粒体转移后巨噬细胞功能的增强依赖于细胞代谢重塑，这提示了 CSF2RB 下游的 PI3K/AKT 等代谢相关信号通路可能参与了这一过程[24]。

3.3.3 CSF2RB 作为治疗靶点的潜力

CSF2RB 在肺损伤中的关键作用使其成为一个极具吸引力的治疗靶点。在 COVID-19 大流行期间，针对 CSF2/CSF2RB 轴的治疗策略得到了迅速应用和验证。De Luca 等人的队列研究显示，在重症 COVID-19 肺炎伴全身高炎症反应的患者中，使用靶向 CSF2RB 的拮抗剂 mavrilimumab，可以显著降低患者死亡率，缩短临床改善时间和住院时间。这为靶向 CSF2RB 治疗急性、重症肺部炎症提供了有力的临床证据[61]。

3.4. CSF2RB 在 MSCs 中的研究现状

尽管 CSF2RB 最初被认为是髓系细胞的特有受体，但近年来越来越多的研究发现它在非造血细胞，特别是 MSCs 上也发挥重要功能，这极大地扩展了对其生物学

中国知网 https://www.cnki.net

功能的认识。

3.4.1 CSF2RB 在 MSCs 中的表达与功能

传统观念认为 MSCs 低表达或不表达 CSF2RB。然而，Qi 等人的研究对此进行了重要修正。他们发现，尽管基础水平很低，但通过基因工程手段在 ADSCs 中过表达 CSF2RB，可以显著增强 MSCs 的治疗效果。其机制在于心肌缺血后释放的大量 CSF2 形成一个趋化梯度，过表达 CSF2RB 的 ADSCs 能更有效地感知这一信号，从而增强其向受损心肌的归巢能力[15]。更重要的是，他们发现 CSF2RB 过表达不仅能促进 MSCs 归巢，还能通过激活 STAT5 信号通路，上调泛素连接酶 RNF4 的表达，显著增强 ADSCs 在缺血/再灌注环境下的抗凋亡能力，从而提高其在损伤部位的存活率和保留时间。这一研究首次将 CSF2RB 定义为 MSCs 的“归巢”和“存活”的双重增强因子[15]。

3.4.2 CSF2RB 在 MSCs 免疫调节中的作用

除了影响 MSCs 自身的命运，CSF2RB 还参与了 MSCs 对免疫细胞的调节。Lee 等人的研究比较了胎盘、骨髓和脂肪来源 MSCs 的免疫调节能力，发现所有 MSCs 均能抑制 T 细胞增殖。尽管该研究未直接探讨 CSF2RB 的作用，但胎盘 MSCs 显示出独特的免疫调节分子特征（如高表达 HLA-G），并分泌更高水平的 CSF2。这暗示胎盘 MSCs 可能通过其分泌的 CSF2，作用于靶细胞（如单核/巨噬细胞）上的 CSF2RB，发挥更强的免疫调节作用。这为理解 MSCs 的异质性和优化细胞来源提供了新视角[55]。

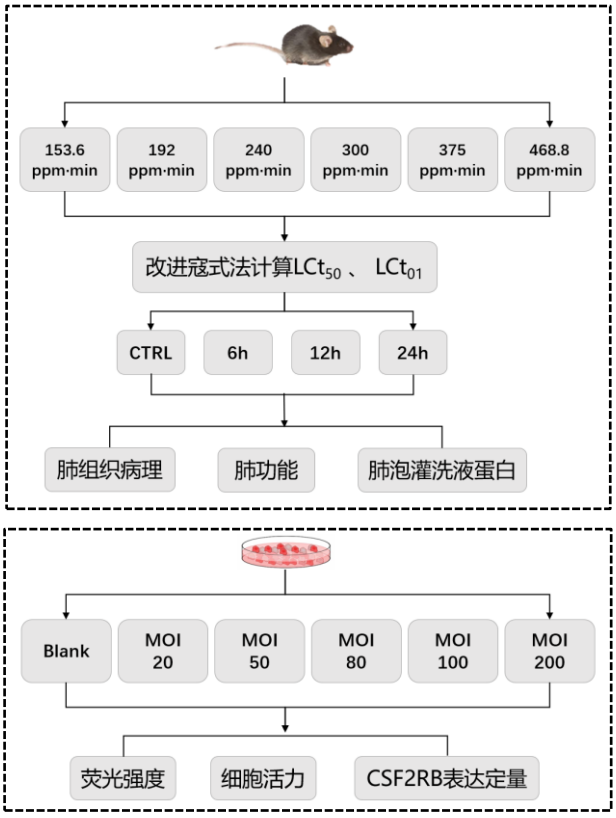
综上所述，CSF2RB 作为一个多功能的受体信号亚基，不仅通过 JAK/STAT 等经典通路在髓系细胞的分化、存活和炎症风暴中发挥核心作用，近年来其在 MSCs 等非造血细胞中的新功能也逐步被揭示，尤其是在调控 MSCs 的归巢、存活及组织修复方面展现出巨大潜力。靶向 CSF2RB 信号通路，无论是抑制其过度的炎症活化，还是增强其在干细胞治疗中的功能，都为多种疾病的治疗提供了广阔前景。

中国知网 https://www.cnki.net

研究内容

第一部分 光气致 ALI 小鼠模型的建立及 MSC-CSF2RB 的构建

本研究选用雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠作为实验载体，通过光气诱导建立 ALI 动物模型，系统测定光气对实验动物的半数致死浓时积及最小致死浓时积。在此基础上，动态监测光气暴露后不同时间节点的肺组织病理学演变特征，最终确立构建 ALI 模型的最佳光气暴露剂量与持续时间。同时，采用不同梯度 CSF2RB 过表达腺病毒及对照腺病毒对 MSCs 进行转染处理，利用 Western blotting 技术验证 CSF2RB 的过表达效能，并通过 CCK8 法评估转染后细胞的增殖活性。基于细胞生理特性、蛋白表达效能及细胞代谢活性等参数的综合评估，确定适宜的腺病毒感染复数，进而构建 CSF2RB 过表达的 MSCs 模型。技术路线图如下：



中国知网 https://www.cnki.net

1 材料

1.1 实验动物

6～8 周龄，体重 20～22 g 的雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠，及 6～8 周龄，体重 100-150 g 的雄性 SD 大鼠。实验动物饲养于 12 h/12 h 明暗循环的 SPF 级实验室，温度 22～25℃，相对湿度 40%～60%，可自由获得食水。所有动物均购买自空军军医大学实验动物中心，实验方案经过空军军医大学动物研究伦理委员会批准。

1.2 主要仪器

表 1 实验所用仪器

仪器名称	生产厂家
全身体积描记检测系统(WBP)	美国 Harvard Bioscience 公司
正置显微镜	日本 Olympus 公司
小鼠鼻吸入动态染毒装置	德国拜耳公司
-80℃冰箱	美国 Sigma 公司
制冰机	日本 SANYO 公司
超纯水系统	美国 Millipore 公司
细胞培养箱	美国 Thermo 公司
细胞培养超净台	山东博科器械公司
恒温水浴箱	上海舜制仪器公司
多功能酶标仪	瑞士 TECAN 公司
超声细胞破碎仪	安徽中科都菱公司
涡旋混合仪	杭州瑞诚仪器公司
小鼠固定器	天津合普公司
移液器	德国 Eppendorf 公司
电子天平	日本 Shimadzu 公司
恒温摇床	美国 New Brunswick 科技公司
凝胶成像系统	美国 Bio-Rad 公司

中国知网 https://www.cnki.net

续表 1 实验所用仪器

仪器名称	生产厂家
Trans-Blot 蛋白半干转膜仪	美国 Bio-Rad 公司
SDS-page 垂直电泳仪	美国 Bio-Rad 公司
低速离心机	美国 Sigma 公司
高速冷冻离心机	美国 Sigma 公司
全自动高速冷冻离心机	美国 Sigma 公司
高压蒸汽灭菌器	日本 SANYO 公司
磁力搅拌器	德国 IKA 公司
高通量组织研磨器	宁波新芝生物科技公司
干燥箱	上海一恒科学仪器公司
LD-4 离心机	北京医用离心机厂
倒置显微镜	日本 Olympus 公司
荧光显微镜	日本 Olympus 公司

1.3 主要试剂与耗材

表 2 实验所用试剂耗材

试剂名称	生产厂家
腺病毒载体	上海和元生物技术公司
光气	德国 Linde 公司
4%多聚甲醛	中国 Beyotime 公司
PBS 缓冲液	美国 InCellGenE 公司
苏木精-伊红染色液	江苏雨露实验器材公司
MEM-α 细胞培养基	美国 cytiva 公司
青霉素链霉素混合物	西安米鼠生物科技公司
胎牛血清	西安米鼠生物科技公司
胰蛋白酶 0.25%EDTA 消化液	西安米鼠生物科技公司
BCA 蛋白定量试剂盒	美国 Thermo 公司

中国知网 https://www.cnki.net

续表 2 实验所用仪器

仪器名称	生产厂家
裂解液	陕西中晖赫彩公司
蛋白酶抑制剂	陕西中晖赫彩公司
磷酸酶抑制剂	陕西中晖赫彩公司
抗凝管	武汉塞维尔公司
ELISA 检测试剂盒	上海科兴商贸公司
TBS 缓冲液	武汉赛维尔科技公司
转膜缓冲液	美国 Bio-Rad 公司
电泳缓冲液	美国 Bio-Rad 公司
抗体稀释液	陕西中晖赫彩公司
吐温 20	西安国安生物公司

表 3 实验所用抗体

抗体	公司	货号	稀释浓度
CSF2RB	ABclonal	#A10501	WB:1/1000
CSF2	Bioworld	#BS7922	WB:1/1000
GAPDH	Bioworld	#AP0036	WB:1/15000

2 方法

2.1 鼻吸入光气诱导小鼠 ALI 模型建立

1) 将 60 只 C57BL/6 小鼠经随机化分为 6 组，每组 10 只，进行鼻吸入光气动态染毒 30 min，浓时积分别为 153.6 ppm·min、192 ppm·min、240 ppm·min、300 ppm·min、375 ppm·min 和 468.8 ppm·min，观察并记录小鼠的死亡时间，计算死亡率及小鼠鼻吸入光气的最小致死浓时积和半数致死浓时积（改进寇式法）。

2) 将 40 只 C57BL/6 小鼠经随机化分为 4 组，每组 10 只。分为对照组、染毒后 6 h、12 h 和 24 h 组。对照组吸入空气，光气染毒组以浓时积为 200 ppm·min 进行动

中国知网 https://www.cnki.net

态染毒 30 min。染毒结束后 6 h、12 h 和 24 h 后测定小鼠肺功能。随后进行解剖获取肺组织和 BALF 进行相关指标的检测。实验动物均在标准饲养环境中饲养。

2.2 小鼠肺功能测定

采用无创全身体积描记系统（Whole-body Plethysmography），在预定时间评估小鼠呼吸力学参数。每个检测仓内只可放入 1 只小鼠，检测前应进行气密性检查。检测时用不透光布将检测仓遮盖，使小鼠在黑暗中适应 5 min 后再进行检测。检测结束后将小鼠取出进行后续实验，保存检测数据并进行分析。

2.3 小鼠肺湿重与肺系数检测

小鼠麻醉称重后取出肺组织，清除心脏和肺组织表面附带的脂肪、淋巴组织，PBS 清洗后擦干，称取肺组织质量并记录，将小鼠肺湿重与体重相比得到肺系数。最后将肺组织放入 4%的多聚甲醛内固定，以备后续实验。

2.4 小鼠 BALF 的收集

1) 用 20 mg/kg 的异氟烷将小鼠麻醉后取血。

2) 分离小鼠主支气管，用眼科剪剪开 1 mm 的开口，将灌洗针缓慢插入开口中 0.5 cm 后结扎固定。将预冷的 PBS 缓慢注入肺脏，等待 1 min 后吸出，重复 2 次，EP 管收集。

3) 将收集的 BALF 在 4℃离心机 1000 rpm 离心 5 min，取上清液置入-80℃冰箱保存备用。

4) BCA 定量法检测 BALF 中的蛋白含量。

2.5 HE 染色切片观察小鼠肺组织病理学变化及肺损伤评分

1) 脱水：肺组织经固定处理后，置于流水中漂洗以彻底清除其中残留的固定剂。组织经梯度乙醇溶液（70%、80%、90%、95%、100%）逐步脱水处理，各浓度下的浸泡时长设定为 1-2 h，该时长可依据组织的体积规格与生物学特性进行调整。

2) 透明：组织经脱水处理后，浸入二甲苯溶液内进行 2-3 次透明化操作，每次持续 15-30 min。

3) 浸蜡与包埋：组织经透明处理后，转移至预热至 56-60℃的石蜡熔液中进行浸渍

中国知网 https://www.cnki.net

处理，该过程持续 2-4 h，期间需更换石蜡 2-3 次以确保充分渗透。组织经浸蜡程序处理后，被转移至包埋模腔内，随后注入足量石蜡介质，待其完全固化后方可实施切片操作。

4) 切片：切片操作需借助专用切片设备完成，过程中必须确保样本片段的连贯性与整体性，杜绝任何形式的结构断裂或形变现象。将制备好的薄片悬浮于温热液体的上层，利用表面张力促使样本完全舒展，随后将其转移至载玻片表面并固定。将载玻片置于温度维持在 60℃左右的恒温干燥箱中处理 1-2 h，以确保切片与载玻片之间形成牢固的黏附结合。

5) 脱蜡与水化：切片经烘烤处理后，需置于二甲苯溶液中进行双重脱蜡处理，每次浸没时长控制在 10-15 min，旨在彻底清除组织样本内残留的石蜡成分。切片依次浸入不同浓度的梯度乙醇溶液中，起始浓度为 100%，随后依次递减至 95%、90%、80%及 70%，每个浓度梯度下的处理时长控制在 2-3 min，最终以蒸馏水完成漂洗步骤。

6) 染色与分化：切片经苏木精染液浸染 5-15 min，具体时长依据染液浓度及组织特性进行动态调整，染色完成后经流水冲洗，待组织适度返蓝后转移至 1%盐酸酒精溶液中处理数秒至数十秒，该分化步骤需精确控制时长，消除细胞核内过量苏木精沉积，确保核结构呈现清晰染色效果。

7) 伊红染色：经分化处理的组织切片需采用流水冲洗或短暂浸入氨水溶液以实现复蓝，随后将复蓝完成的切片浸入伊红染料溶液中孵育 2-5 min，此过程可使胞质及胞外基质呈现红色着色。染色完成后的组织切片需经历脱水与透明处理。

8) 脱水与透明：脱水步骤采用梯度乙醇溶液进行，历时 2-3 min；随后，样本被转移至二甲苯溶液中实施透明化操作，此过程需重复两次，每次持续 5-10 min。

9) 封片：切片经透明化处理后自二甲苯中取出，滴注适量中性树胶，随后加盖玻片，操作时需严防气泡形成。封固完毕的样本可置于通风环境自然干燥或通过低温烘干方式处理，最终借助显微镜完成观察与评估。

10) 采用优化后的 Smith 半定量评估体系，对以下指标进行系统性量化分析：肺水肿的严重程度、肺泡与间质炎症浸润的密集程度、出血性病变的扩散范围、肺泡塌

中国知网 https://www.cnki.net

陷的覆盖面积以及透明膜的构成比例。病变范围依据受累组织所占视野的比例划分为五个等级：0 级对应完全正常的组织学表现；1 级指示病变区域不足视野总面积的四分之一；2 级表示病变范围介于四分之一至二分之一之间；3 级界定为超过二分之一但不超过四分之三的视野受累；4 级则代表整个视野均呈现病理改变。数字化病理扫描技术进行图像采集，计算各项指标评分，每份样本随机选取 10 个高倍视野取平均值。

2.6 MSCs 的提取与培养

1) 取材：对手术器械、PBS、六孔板、细胞培养皿及 70 μm 滤网等实验耗材进行消毒灭菌。将雄性 SD 大鼠通过异氟烷吸入的方式进行麻醉，固定于温度维持 37℃的恒定温控手术台上。随后，自其体内完整摘取附睾脂肪组织，细致剥离剔除血管成分，将处理后的样本浸入预冷至特定温度的磷酸盐缓冲盐溶液（PBS）中保存。

2) 消化过滤：在生物安全柜内完成脂肪组织的转移操作，组织样本经磷酸盐缓冲盐水（PBS）反复漂洗后，切割成细小碎块。随后，将组织碎片中置入预先配置的 0.1% I 型胶原酶溶液（该溶液溶解于 α-MEM 培养基内），并将混合体系置于 37℃恒温水浴环境中进行酶解处理，持续作用时间为 60 min。在此期间，每隔 30 min 需通过吹打方式促使组织块充分分散。消化反应终止后，采用孔径为 70 μm 的细胞滤网对混合物进行过滤处理，以获取单细胞分散体系。

3) 离心培养：将所得悬浮液以 800 r/min 的速度进行离心分离，历时 5 min。此过程促使上清液中的脂肪成分及残留消化介质被有效去除，最终在管底形成纯净的细胞沉积物。细胞团块经红细胞裂解液作用后，以包含 10%胎牛血清与 1%双抗的 α-MEM 完全培养基进行悬浮培养。细胞悬液被转移至培养皿内，置于 37℃恒温环境及 5%二氧化碳浓度下实施差速贴壁处理。经过 8 h 培养后，倾弃原有培养液并注入新鲜培养基以移除未贴壁的悬浮细胞。培养基每 48 h 更新一次，直至细胞覆盖率达 90%时进行传代。本研究中所有实验环节均采用第 2 至第 3 代间充质干细胞作为研究对象

中国知网 https://www.cnki.net

2.7 腺病毒转染 MSCs

制备 CSF2RB 过表达与对照腺病毒载体，采用梯度浓度病毒感染 MSCs，通过 Western blot 实验验证基因修饰效能，利用 CCK-8 试剂盒评估细胞增殖活性。腺病毒滴度的确定需综合细胞生理特性、蛋白表达水平及细胞存活率等关键参数，以实现最优化的感染条件。

2.8 Western blot 实验检测蛋白表达

1) 蛋白样品的制备：将细胞沉淀物与预先配置的 RIPA 裂解液（含按比例添加的磷酸酶抑制剂及蛋白酶抑制剂）混合，冰上孵育 10 min 以使其充分裂解。裂解后的混合物在 4℃条件下 12000 rpm 转速离心 15 min，收集上清液。取 4 μL 上清液稀释后采用 BCA 定量法测定蛋白浓度，剩余上清液用 RIPA 裂解液调整体积，加入 5×loading buffer 后充分混匀。混合物置于 95℃金属浴中加热 5-10 min 完成热变性处理，经瞬时离心后分装，储存于-80℃冰箱备用。

2) 制备工作液：根据试剂盒说明配制电泳液、转膜液、TBST 缓冲液、10% AP（过硫酰胺）等实验用工作液。

3) 制备电泳凝胶：固定清洗干净的玻璃板和胶架，加入纯水检查是否漏液，验漏后弃掉纯水并用滤纸吸干残留水分。根据 TGX Fast Cast Acrylamiae Kit 试剂盒标准操作指南配置凝胶溶液。根据目标蛋白分子量范围（10-180 kDa），优化梯度分离胶浓度（10%-12%）。下层胶灌注后静置至凝固，随后立即灌注上层胶并插入样品梳，室温固化 30 min 后进行电泳上样或将凝胶玻璃板置入 TBST 缓冲液中 4℃冰箱保存待用。

4) 蛋白电泳：将凝胶玻璃板固定于电泳槽中，加入适量电泳液，SDS-PAGE 胶孔中加入计算好的适量样品或 Marker，盖好盖子并连接电泳仪，设置参数如下：初始电压 80 V（30 min）后切换至 120 V 直至溴酚蓝迁移至凝胶底部时停止电泳。

5) 转膜：将滤纸放入转膜液充分浸湿，4℃预冷；提前用甲醇浸泡 0.22 μm PVDF 膜 2-3 min，使其活化。按照滤纸-PVDF 膜-胶-滤纸的顺序放入半干转转膜仪抽屉里，25 V 恒压，10 min 的条件下进行转膜。

6) 封闭：转膜后立即将 PVDF 膜放入提前配置的 5%脱脂奶或 5% BSA 的封闭液中，

中国知网 https://www.cnki.net

在室温摇床下孵育 2 h 左右。封闭完成后弃去封闭液，用 1×TBST 缓冲液中清洗 3 次，洗去多余封闭液。

7) 一抗孵育：按照相关抗体说明书上推荐的稀释比例稀释抗体，将 PVDF 膜置于一抗溶液中 4℃慢速摇床孵育过夜。

8) 二抗孵育：回收稀释后的一抗，洗膜 5 min×3 次。在按比例稀释后的二抗中常温孵育 PVDF 膜 2 h。

9) 蛋白显影及分析：二抗孵育结束后，用 TBST 缓冲液洗去多余二抗，5 min×3 次。按说明配置发光液，使用凝胶成像系统检测条带，ImageJ 软件进行分析。

2.9 CCK8 检测细胞活力

弃去细胞上清后用无菌 PBS 洗涤 1-2 次，96 孔板每孔加入 100 μL CCK-8 工作液，每组 6 个复孔，同时设置空白孔。将待处理细胞和 96 孔板放置于 37℃/5%CO_2 孵箱中培养 1 h 后使用酶标仪，检测 450 nm 波长处的 OD 值并进行统计分析。以上操作须在避光条件下进行。

2.10 统计学分析

本研究采用两独立样本 Student's t 检验比较两组间差异，通过单因素方差分析（One-way ANOVA）结合 Sidak 法检验多组间差异分析。全部统计检验均为双侧假设检验，使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据处理和分析，当 $P<0.05$ 时，认为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 光气染毒对小鼠的损伤作用

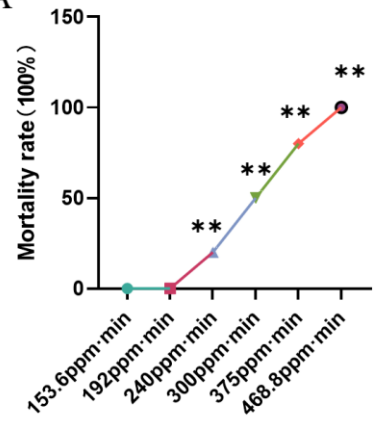
3.1.1 小鼠吸入不同浓时积光气后对死亡率的影响

为探究光气中毒浓时积与死亡率之间的关系，我们将小鼠暴露在不同浓度的光气下动态染毒 30 min，观察并记录小鼠死亡率和死亡时间。结果发现（**图 1.1**），浓时积为 192-240 ppm·min 时，小鼠开始出现死亡。随着染毒浓度升高，小鼠死亡率逐渐升高。当光气浓时积为 468.8 ppm·min 时死亡率为 100%。通过改进寇氏法计算

中国知网 https://www.cnki.net

得到光气半数致死浓时积（LCt_{50}）为 348 ppm • min，最小致死浓时积（LCt_{01}）约为 200 ppm • min。

A



B

小鼠鼻吸入光气染毒剂量与死亡率统计表

组别	动物数（n）	剂量（ppm·min）	死亡数（n）	死亡率(p)	存活率(q)
1	10	153.6	0	0.0	1.0
2	10	192.0	0	0.0	1.0
3	10	240.0	2	0.2	0.8
4	10	300.0	5	0.5	0.5
5	10	375.0	8	0.8	0.2
6	10	468.8	9	1.0	0.0

光气吸入后24h LCt_{50}≈348ppm·min
LCt_{01} ≈200ppm·min

图 1. 1 小鼠鼻吸入不同浓时积光气后死亡率的变化及 LCt_{50} 和 LCt_{01}

A：吸入光气浓时积与死亡率的变化；B：吸入光气后 24 h 内的 LCt_{50} 和 LCt_{01}

3.1.2 光气染毒后不同时间对小鼠肺脏及病理学形态的影响

为探讨光气染毒后不同时间小鼠的肺损伤效应，为后续治疗提供依据，本研究将实验小鼠分为 4 个组，分别为对照组、染毒后 6 h、12 h 和 24 h 组，对照组吸入空气，染毒组进行 200 ppm • min 浓时积的动态染毒 30 min。在不同时间检测小鼠典型肺损伤指标，并进行统计学分析。结果显示（图 1. 2），对照组外观可见肺轮廓清晰，表面光滑有光泽，颜色呈均匀粉红色；光气暴露后 6 h，小鼠肺组织表面呈现颜色不均，并伴有瘀斑及出血点。随着时间延长，肺部出现显著水肿，外观呈暗红色，表面粗糙，瘀斑与出血点进一步增多。组织病理学 HE 染色观察显示，对照组小鼠肺组织结构完整，肺泡形态规则，肺泡壁薄。暴露后 6 h，肺泡腔内可见少量渗出液及炎性细胞浸润；至 12 h，渗出与炎性细胞浸润明显加重，肺泡结构破坏，肺泡壁明显增厚。对各时间点肺组织病理损伤进行评分，结果显示，与对照组比较，光气暴露后 6 h、12 h 和 24 h 组小鼠肺损伤评分均显著升高。12 h 组小鼠肺组织出现显著损伤效应。

中国知网 https://www.cnki.net

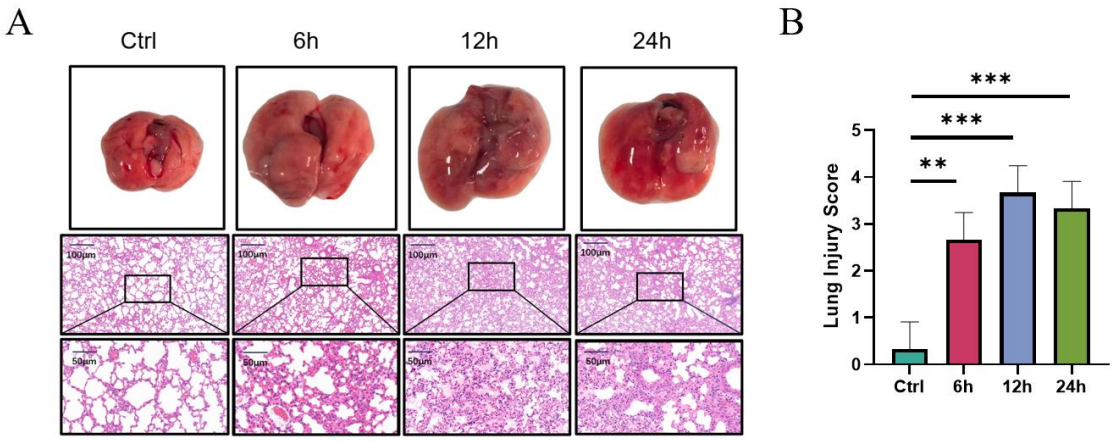


图 1. 2 小鼠鼻吸入光气后不同时间外观、病理变化及肺损伤评分

A：各组小鼠肺组织外观及光镜下病理结构变化，Bar=100 μm、50 μm；**B：病理损伤评分。****P*<0.05，***P*<0.01，****P*<0.001，n=3。

3.1.3 光气染毒后不同时间对小鼠肺湿重、肺系数变化的影响

统计各组小鼠的肺湿重与肺系数。结果显示（图 1.3），与对照组相比，光气染毒后小鼠肺湿重和肺系数明显升高，小鼠肺组织出现明显水肿，至 12 h 升高最为显著，24 h 后呈略有下降的趋势。

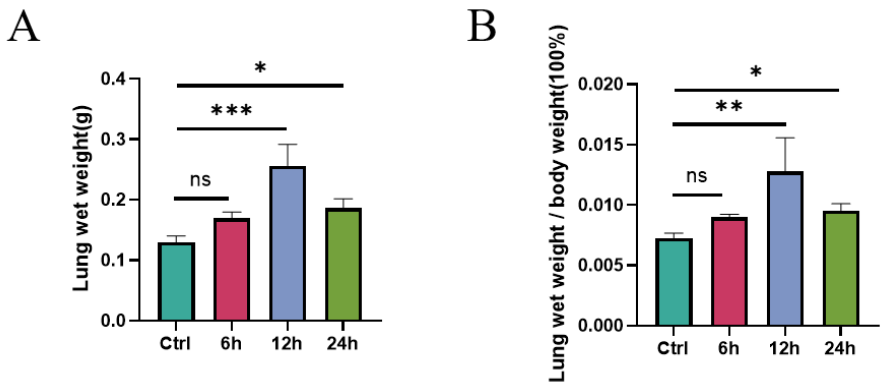


图 1. 3 小鼠鼻吸入光气后不同时间对肺湿重和肺系数的影响

A：肺湿重；B：肺系数。**P*<0.05，***P*<0.01，****P*<0.001，n=6。

3.1.4 光气染毒后不同时间对小鼠 BALF 蛋白浓度变化的影响

检测 BALF 中总蛋白浓度，结果显示（图 1.4），与对照组相比，染毒后 6 h 的小鼠 BALF 中蛋白明显增多，12 h 时最高，24 h 略有下降。

中国知网 https://www.cnki.net

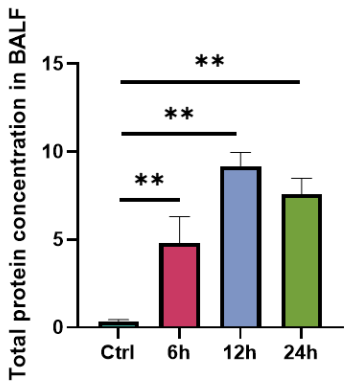


图 1. 4 小鼠鼻吸入光气后不同时间对 BALF 蛋白浓度的影响

***P*<0.01，n=6。

3.1.5 光气染毒后不同时间对小鼠肺功能变化的影响

我们使用无创全身体积描记系统定量测定各组小鼠各项肺功能指标，结果显示（**图 1. 5**），与对照组相比，染毒组支气管收缩系数（Enhanced pause，Penh）、呼气末暂停时间（Expiratory Pauses，EEP）和呼吸暂停（Pause，PAU）出现显著性升高，12 h 时肺功能变化最为明显。

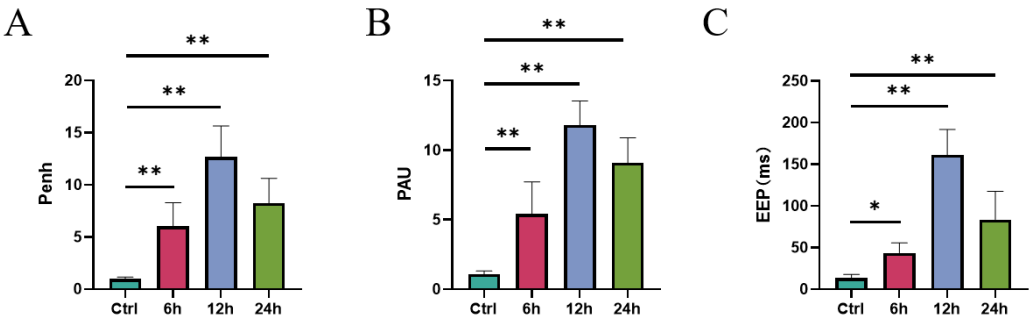


图 1. 5 小鼠鼻吸入光气后不同时间对小鼠肺功能变化的影响

A：支气管收缩系数；B：呼吸暂停；C：呼气末暂停时间。**P*<0.05，***P*<0.01 vs Ctrl 组，n=6。

3.1.6 光气染毒后不同时间对小鼠肺组织 CSF2 蛋白表达水平的影响

为揭示 CSF2 在光气致 ALI 中的变化，我们检测了光气致 ALI 小鼠肺组织中 CSF2 的表达。结果显示（图 1. 6），200 ppm • min 光气染毒小鼠后 6 h、12 h 和 24

中国知网 https://www.cnki.net

h，与对照组相比，CSF2 蛋白表达在 12 h 时最高，24 h 表达量开始下降。

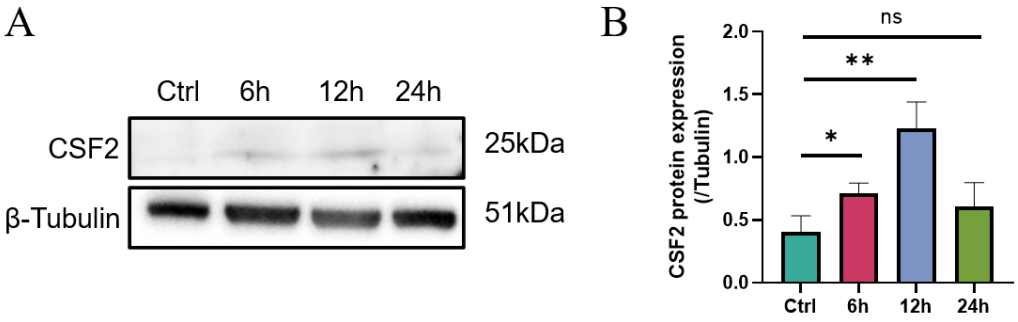


图 1. 6 小鼠鼻吸入光气后不同时间肺组织 CSF2 蛋白表达水平变化

A：WB 检测 CSF2 蛋白表达水平；B：CSF2 蛋白表达定量分析。*P<0.05，**P<0.01，ns，无统计学意义，n=3。

3.2 转染 CSF2RB 腺病毒增加了 MSCs 中 CSF2RB 蛋白的表达

本研究在成功构建 CSF2RB 腺病毒后，并对 MSCs 进行转染，48 h 后采用 CCK-8 实验检测细胞活力的变化，通过 Western blot 实验验证 MSCs 中 CSF2RB 表达量。综合评估，在可以显著增加 MSCs 中 CSF2RB 蛋白表达水平的前提下而不影响其细胞活力时的感染复数 MOI 为 50（图 1. 7 和图 1. 8）。

3.2.1 转染不同 MOI 值 CSF2RB 腺病毒对 MSCs 细胞活力的影响

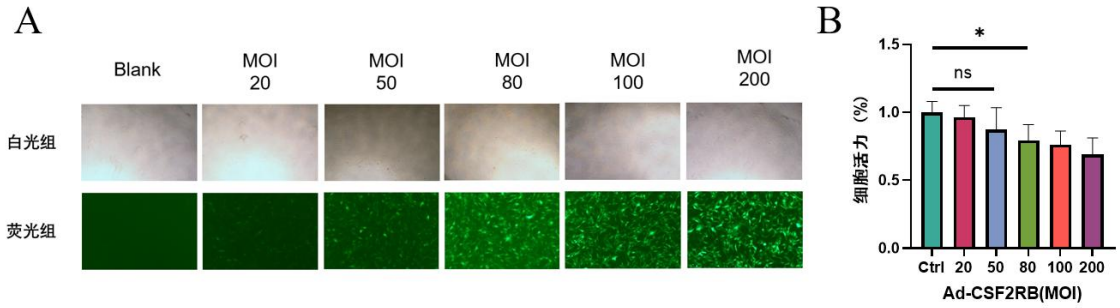


图 1. 7 CSF2RB 腺病毒转染 MSCs 后 48 h 荧光强度和细胞活力的变化

A：腺病毒转染 MSCs 48 h 后荧光强度；B：CCK-8 法检测 MSC 细胞活力。视野：×4 倍，*P<0.05，ns，无统计学意义，n=6。

中国知网 https://www.cnki.net

3.2.2 转染 CSF2RB 腺病毒对 MSCs 中 CSF2RB 表达量的影响

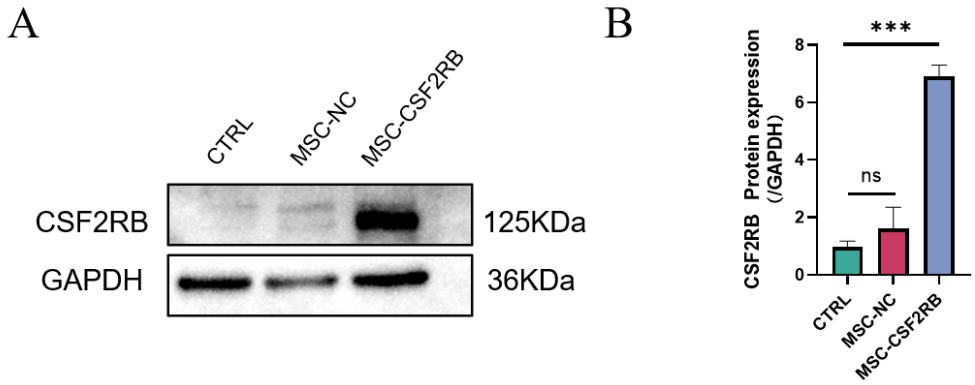


图 1. 8 转染 CSF2RB 腺病毒对 MSCs 中 CSF2RB 表达量的影响

A：WB 检测 CSF2RB 蛋白表达水平；B：CSF2RB 蛋白表达定量分析。*P<0.05，ns，无统计学意义，n=6。

4 讨论

光气属于窒息性化学战剂，具有很强的毒性和致死性。同时光气也是一种重要的化工原料，我国是世界上光气产量和使用量最大的国家，以光气为原料的生产企业 33 家，年生产量超过 600 万吨[1][2]。光气中毒能引发 ALI 和肺水肿，致死率高，且救治困难[4]。研究发现，光气暴露后肺组织发生明显氧化应激和炎症反应，二者相互促进形成恶性循环，是导致 ALI 的关键机制[5]。但光气中毒引起的 ALI 目前没有特效救治药物。因此，研究光气中毒救治具有重要的现实意义。

本研究首先探讨了小鼠光气中毒浓时积与死亡率之间的关系。结果发现。光气染毒浓时积为 192-240 ppm • min 时，小鼠开始出现死亡。随着染毒浓度升高，死亡率逐渐增加。当光气浓时积为 468.8 ppm • min 时，死亡率为 100%。即浓度越高，死亡时间越早，死亡率越高，存在剂量-效应关系。通过改进寇氏法计算得到光气 LCt_{50} 为 348 ppm • min，LCt_{01} 约为 200 ppm • min。前期，我们课题组研究了大鼠鼻吸入不同浓度光气后对死亡率的影响，得到 LCt_{50} 为 409 ppm • min，LCt_{01} 为 300 ppm • min。由此可见，小鼠的对光气的耐受性不如大鼠。本课题研究目的为光气致 ALI 的情况，因此，我们后续实验选择光气染毒浓时积 200 ppm • min（动态染毒 30 min）建立光气 ALI 动物模型。

中国知网 https://www.cnki.net

接着我们开展了光气染毒后不同时间小鼠的肺损伤效应的研究，组织病理学 HE 染色观察显示，对照组小鼠肺组织结构完整，肺泡形态规则，肺泡壁薄。暴露后 6 h，肺泡腔内可见少量渗出液及炎性细胞浸润；至 12 h，渗出与炎性细胞浸润明显加重，肺泡结构破坏，肺泡壁明显增厚。对各时间点肺组织病理损伤进行评分，与对照组相比，光气染毒后 6 h、12 h、24 h 肺损伤评分均明显升高，到 12 h 出现显著损伤效应。

光气致 ALI 的核心病理生理变化是肺水肿。光气中的羰基能迅速与蛋白质、脂质和核酸中的重要基团发生酰化反应，生成盐酸并交联生物大分子，极大消耗了肺泡表面活性物质，进而破坏肺泡-毛细血管屏障的完整性。屏障破坏导致肺泡毛细血管通透性增加，血管内的液体和蛋白质渗漏到肺间质和肺泡腔，形成肺水肿[18][19]。本研究结果显示，与对照组相比，染毒后 6 h 的小鼠 BALF 中蛋白明显增多，12 h 时最高，至 24 h 略有吸收。各项肺功能指标显示，与对照组相比，损伤组支气管收缩系数、呼气末暂停时间、呼吸暂停出现显著性升高，12 h 时损伤最为明显。我们的结果提示，光气染毒所造成的小鼠 ALI 在 12 h 内存在时间效应关系，染毒后 24 h 小鼠的肺损伤有所缓解，这与我们课题组之前的大鼠实验结果一致。综合以上实验结果，我们成功构建了小鼠鼻吸入光气致 ALI 的动物模型。

间充质干细胞（mesenchymal stem cell，MSC）是一类源于中胚层的多向分化潜能细胞，同时具有免疫调控、抗氧化和抗凋亡等多种生物学功能。近年来研究发现，MSC 在自身免疫疾病、肝脏损伤、神经退行性病变、心肌梗死等临床治疗中表现出极大潜力。此外，国内外大量临床研究还发现，MSC 在新型冠状病毒（COVID-19）危重症患者临床救治中取得了显著疗效。MSC 可通过多种机制发挥肺组织修复作用。有研究报道，MSC 定植到肺损伤部位后，可以分化为肺泡 II 型上皮细胞和内皮细胞，直接参与肺泡上皮的更新[62]。MSC 可分泌多种物质作用于肺损伤部位，如生长因子、抗氧化因子、microRNA 等。MSC 还可以分泌细胞外囊泡或转移线粒体到肺泡从而减轻肺损伤。此外，MSC 具有调节巨噬细胞从 M1 向 M2 型转化，减少中性粒细胞在肺部浸润，从而减轻肺组织损伤[42]。

然而，国内外有关 MSC 在光气致 ALI 治疗中应用较少，其作用与机制远未明确。值得注意的是正常状态下 MSC 静脉注射后，可能由于毛细血管网截留作用，约

中国知网 https://www.cnki.net

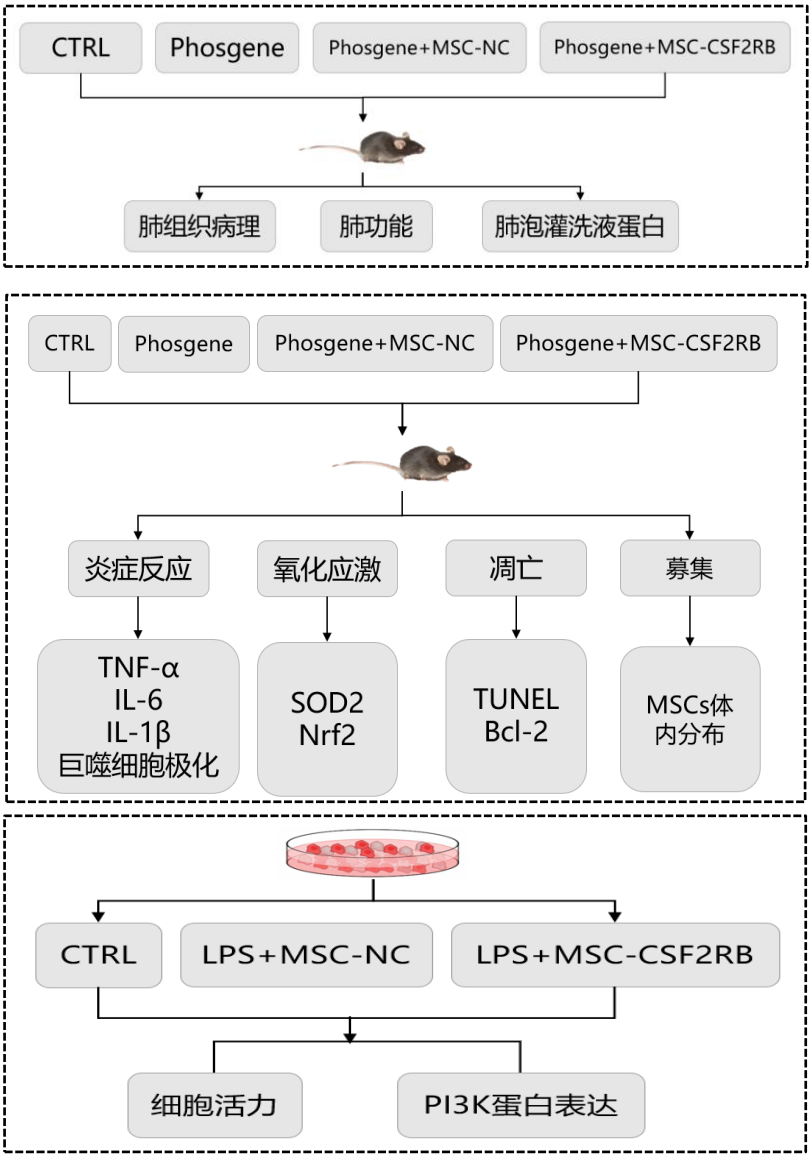
70%的 MSC 会富集在肺脏组织。但光气暴露条件下肺组织毛细血管发生严重的结构和功能损伤，可能降低 MSC 在肺组织的聚集和存活。除此之外，肺组织氧化应激和炎症微环境也能导致 MSC 发生凋亡。因此，光气中毒肺组织中 MSC 的分布和存活能力不足，是限制其疗效的关键因素。

CSF2 及其受体 CSF2RB 是一对趋化因子/趋化因子受体，在募集炎症细胞中发挥重要作用。炎症因子是 CSF2 的有效诱导剂。在炎症条件下，各种类型的细胞都能产生 CSF2。CSF2 作用于单核细胞，驱动炎症信号，导致细胞因子和 ROS 的释放，直接导致组织损伤和功能缺陷。研究表明，CSF2 参与了包括 TNF-α、IL-6 和 IL-1 为共同调节剂的一个正反馈炎症循环，成为 SARS-CoV-2 和 COVID-19 诱导受损组织炎症风暴的一个重要原因，最终导致了 ARDS[61]。本研究实验也证实 CSF2 的表达在光气肺组织受损后明显增高，12 h 时表达最高，24 h 和 48 h 表达量有所下降。证明 CSF2 作为一个重要炎症因子也参与了光气致 ALI 的病理变化。研究证实，CSF2/CSF2RB 可促进静脉注射 MSC 向损伤心肌趋化归巢，此外，CSF2RB 过表达可通过 STAT5-RNF4 的激活和相互作用增强 MSC 的迁移和抗凋亡能力。而由于 MSCs 中 CSF2RB 本底较低，为优化细胞治疗效能，本研究通过基因改造成功构建了 CSF2RB 过表达的 MSCs，为后续实验奠定了基础。

中国知网 https://www.cnki.net

第二部分 静脉注射 MSC-CSF2RB 减轻光气致 ALI 小鼠的肺损伤

光气诱发肺水肿的发生机制主要涉及炎症反应和氧化应激，二者极易形成相互放大效应，最终诱发组织细胞的损伤。而 MSCs 兼具抗炎、抗氧化和抗凋亡功能。第一部分研究已经建立了小鼠光气致 ALI 模型，证实在光气致 ALI 肺组织中 CSF2 表达量显著增高，并成功构建了 MSCs-CSF2RB。本部分主要探究静脉注射 MSC-CSF2RB 是否能减轻光气致 ALI 小鼠的肺损伤，肺损伤的减轻是否与 CSF2RB 的抗炎、抗氧化和抗凋亡功能相关。技术路线图如下：



中国知网 https://www.cnki.net

1 材料

1.1 实验动物

使用雄性 SPF 级 C57BL/6BL/6 小鼠，同第一部分。

1.2 主要仪器

表 4 实验所用仪器

仪器名称	生产厂家
染毒装置	德国拜耳公司
全身体积描记检测系统(WBP)	美国 Harvard Bioscience 公司
正置显微镜	日本 Olympus 公司
多功能酶标仪	瑞士 TECAN 公司
全自动高速冷冻离心机	美国 Sigma 公司
CKX41S 倒置显微镜	日本 Olympus 公司
荧光显微镜	日本 Olympus 公司

其余同第一部分

1.3 主要试剂与耗材

表 5 实验所用试剂与耗材

试剂名称	生产厂家
光气	德国 linde 公司
腺病毒载体	上海和元生物技术公司
4%多聚甲醛	中国 Beyotime 公司
苏木精-伊红染色液	江苏雨露实验器材公司
MEM-α 细胞培养基	美国 cytiva 公司
胎牛血清	西安米鼠生物科技公司
胰蛋白酶 0.25%EDTA 消化液	西安米鼠生物科技公司
青霉素链霉素混合物	西安米鼠生物科技公司
BCA 蛋白定量试剂盒	美国 Thermo 公司

中国知网 https://www.cnki.net

续表 5 实验所用试剂与耗材

试剂名称	生产厂家
裂解液	陕西中晖赫彩公司
蛋白酶抑制剂	陕西中晖赫彩公司
磷酸酶抑制剂	陕西中晖赫彩公司
抗凝管	武汉塞维尔公司
ELISA 检测试剂盒	上海科兴商贸公司
抗体稀释液	陕西中晖赫彩公司
吐温 20	西安国安生物公司
TUNEL 染色试剂盒	中国 Beyotime 公司
DiR 荧光探针	美国 APExBIO 公司
活细胞示踪剂 CM-DiI	中国翌圣公司

其余同第一部分

表 6 实验所用抗体

抗体	公司	货号	稀释浓度
SOD2	Proteintech	#24127-1-AP	WB:1/2000
GAPDH	Bioworld	#AP0036	WB:1/15000
β-Tubulin	Proteintech	#66240-1-Ig	WB:1/15000
Nrf2	Affinity	#AF0639	WB:1/1000
Bcl-2	Affinity	#AF0060	WB:1/1000
p-PI3K	Abcam	Ab278545	WB:1/1000

2. 方法

2.1 小鼠吸入光气致 ALI 治疗分组

将 40 只小鼠按照体重随机分为 4 组，设置单纯对照组（Control）、光气损伤组（Phosgene）、光气损伤后 MSC-NC 治疗组（Phosgene+MSC-NC）和光气损伤后 MSC-CSF2RB 治疗组（Phosgene+MSC-CSF2RB）。小鼠光气致 ALI 造模后 4 h，

中国知网 https://www.cnki.net

Phosgene+MSC-NC 组和 Phosgene+MSC-CSF2RB 组小鼠分别经尾静脉注射 MSC-NC 和 MSC-CSF2RB。24 h 后检测各组小鼠肺功能，再处死小鼠，收集 BALF、血清、肺组织，记录小鼠肺湿重和体重进行相关指标检测。

2.2 腺病毒转染 MSCs

同第一部分 2.7。

2.3 小鼠尾静脉注射 MSCs

将小鼠装入固定器，尾部从后端孔伸出，保持尾部伸直，用侧光源从尾部下方照射，可清晰看到尾静脉（呈暗红色）与尾动脉（颜色较浅、位置较深）的区别。用 75%酒精棉球擦拭尾部，从尾尖向尾根方向消毒。优先选择尾侧静脉（左右各一条），从尾尖 1/3 处开始尝试，如失败可向尾根方向逐段上移；针头斜面朝上，与尾部呈 15-30°角刺入，见到回血（针栓内出现少量血液）即表示进入血管，如无回血，可轻微回抽针栓确认。确认在血管内后，缓慢推注药物（约 0.05 mL/秒）如推注阻力大或尾部皮肤变白肿胀，说明漏出血管外，立即停止。注射完毕后，用干棉球轻压针孔处，迅速拔针，继续按压止血 30-60 秒。每只小鼠注射 100 μL（约 8×10^5 个细胞）细胞悬液。

2.4 小鼠肺功能测定

同第一部分 2.2。

2.5 小鼠肺湿重与肺系数检测

同第一部分 2.3。

2.6 HE 染色观察肺组织病理变化及肺损伤评分

同第一部分 2.5。

2.7 小鼠 BALF 的收集

同第一部分 2.4。

2.8 小鼠血清的分离

小鼠麻醉后，通过眼球取血法采集全血，使用无热原和内毒素的 EP 管收集血液

中国知网 https://www.cnki.net

后静置 4 h，随后在 4℃条件下以 3000 rpm 离心 10 min，分离血清并收集上清液，于-80℃冰箱中保存备用。

2.9 ELISA 检测血清及 BALF 中炎症因子水平

1) 从 4℃冷藏环境中取出试剂盒，于室内放置约 20 min 复温。拆封后取出本次实验所需的酶标板条，剩余板条立即装入含有干燥剂的密封袋中，排除空气后重新储存于 4℃环境。

2) 在板条上规划好标准品与待测样本的加样布局。向对应的标准品孔中分别加入不同浓度梯度的标准液，每孔体积为 50 μL。

3) 待测样本孔的操作规程为：先于孔底加入 10 μL 待测样品和 40 μL 样本稀释液，振荡混匀。同时设置不添加任何样本及稀释液的空白对照，至少 1 孔。

4) 向所有除空白以外的孔内加入 50 μL 经辣根过氧化物酶标记的检测抗体，随后 37℃孵育 60 min。

5) 孵育结束弃去孔内液体，加入足量洗涤液洗涤 5 次。

6) 洗涤完成后，依次向各孔加入底物 A 液与 B 液各 50 μL，将反应板转移至 37℃恒温箱，注意避光，静置反应 15 min。

7) 取出反应板，每孔加入 50 μL 终止液以终止显色反应。酶标仪检测各孔的 450 nm 光密度值。

2.10 组织切片免疫荧光染色

1) 脱蜡与水化：将制备好的石蜡切片依次浸没于以下溶液中：环保透明剂I（10 min）、II（5 min）、III（5 min）；无水乙醇I（10 min）、II（5 min）、III（3 min）；随后于 95%乙醇I、II中各处理 1 min，再分别经 90%、80%、70%梯度乙醇各处理 1 min。完成上述步骤后，用 PBS 漂洗切片两次，每次持续 5 min。

2) 抗原修复：将已脱蜡的切片置于切片架上，浸入预热至 95±0.5℃的柠檬酸盐抗原修复液（pH 6.0，含 0.05% Tween-20）中，恒温水浴加热 15 min 以暴露抗原表位。取出切片架，于室温条件下自然冷却 20 min。冷却后，PBS 漂洗两次，每次 5 min。

3) 膜通透：滴加 0.3% Triton-X100 溶液覆盖组织，室温通透处理 15 min。随后 PBS 漂洗两次，每次 5 min。

中国知网 https://www.cnki.net

4) 封闭：使用含 5%血清的培养基完全覆盖组织区域，置于摇床上室温缓慢摇动孵育 1 h，以封闭非特异性结合位点。孵育结束后，PBS 漂洗两次（5 min/次），并小心吸干组织周围的残留液体。

5) 一抗结合：用 TBST 缓冲液稀释后的一抗均匀覆盖组织切片。将其置于湿盒内，4℃孵育过夜。

6) 复温与清洗：次日室温静置复温 15 min 后用 PBS 漂洗 2 次，每次 5 min。

7) 荧光二抗标记：在避光条件下，用 TBST 稀释荧光素标记的二抗，并滴加于组织样本上，室温避光孵育 60 min 后，PBS 漂洗 2 次，每次 5 min。

8) 细胞核染色：于组织上滴加 DAPI 染液，室温避光作用 10 min，以标记细胞核。之后 PBS 漂洗两次，每次 5 min。

9) 封片：滴加适量不含 DAPI 的抗荧光衰减封片剂后盖上盖玻片。

10) 图像采集与分析：在荧光显微镜下观察染色效果并采集图像，进行后续分析。

2.11 TUNEL 染色检测肺组织细胞凋亡水平

1) 脱蜡与水化：同 2.10.1 所述方法对石蜡切片进行脱蜡和水化处理。

2) 膜通透：在组织切片上滴加 0.3% Triton-X100 溶液，室温通透 15 min。随后用 PBS 在摇床上漂洗两次，每次 5 min。

3) TUNEL 反应体系构建与标记：此后操作需严格避光。按 1:9 的比例，将末端脱氧核苷酸转移酶与荧光素标记的 dUTP 溶液在冰浴的离心管中充分混合。取 70 μL 混合液均匀覆盖于组织表面。将切片置于避光湿盒内，室温下反应 60 min。孵育结束后 PBS 漂洗 2 次，每次 5 min。

4) 细胞核复染：在样本区域滴加 DAPI 工作液，于室温下避光染色 10 min 后 PBS 漂洗 2 次，每次 5 min。

5) 封片：滴加不含 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂，并用盖玻片封闭切片。

6) 结果观察：使用荧光显微镜观察并记录 TUNEL 阳性信号与 DAPI 核染的共定位情况。

2.12 组织蛋白提取

将储存于-80℃的肺组织样本取出，迅速转移至预先标记好的 2.0 mL 离心管中。

中国知网 https://www.cnki.net

向管内精确加入 1.4 mL 预先混合好的 RIPA 裂解液（已添加 1×蛋白酶抑制剂），并放入 3 颗不锈钢研磨珠。将离心管对称放入预冷的组织研磨仪中，设置参数为 6000 rpm 进行 4 个循环的研磨，每个循环持续 60 秒，循环间隔 30 秒并辅以液氮速冻，以防止产热导致蛋白降解。待组织充分裂解后，将离心管置入提前降温至 4℃的高速冷冻离心机，12,000 rpm 离心 15 min 后取上清，分装标记后立即置于-80℃冰箱长期保存备用，避免反复冻融。

2.13 BCA 蛋白定量及 Western blot 检测蛋白表达

同第一部分 2.8。

2.14 MSCs 体外炎症环境培养

37℃恒温环境及 5%二氧化碳浓度下培养 MSCs-NC 和 MSCs-CSF2RB，给予 100 ng/mL CSF2 因子后，使用 3 μg/mL LPS 刺激 24 h，建立体外炎症环境。

2.15 统计学分析

同第一部分 2.10。

3. 结果

3.1 MSC-CSF2RB 对模型小鼠肺水肿的影响

3.1.1 MSC-CSF2RB 对模型小鼠 BALF 中的蛋白含量、肺系数变化的影响

使用 BCA 法对小鼠 BALF 中的蛋白含量进行测定，并统计了各组小鼠的肺系数，结果显示（图 2.1），光气染毒后小鼠 BALF 中蛋白含量和肺系数都显著高于对照组，静脉单纯给予 MSC，BALF 中的蛋白含量有所降低，肺系数没有统计学意义，但静脉给予 MSC-CSF2RB 组小鼠以上两个指标显著降低。

中国知网 https://www.cnki.net

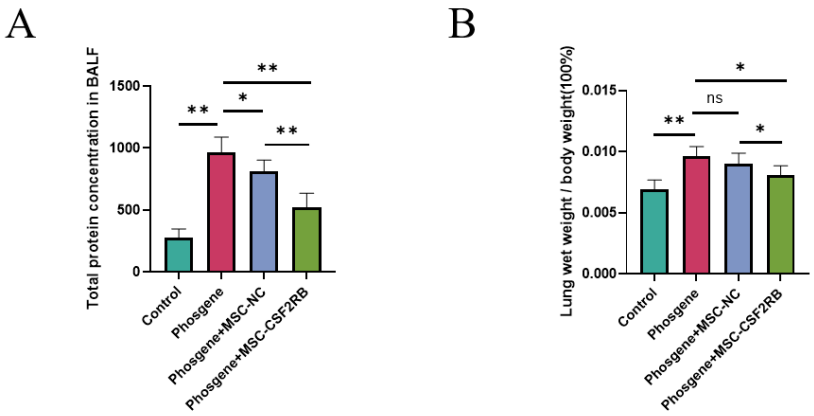


图 2. 1 MSC-CSF2RB 对模型小鼠 BALF 蛋白和肺系数的影响

A：BALF 中的蛋白含量；B：肺系数。*P<0.05，**P<0.01，ns，无统计学意义，n=6。

3.1.2 MSC-CSF2RB 对模型小鼠肺组织病理结构的影响

对各组小鼠肺脏 HE 切片进行观察，结果表明（图 2. 2），与对照组相比，光气组小鼠肺泡间隔增宽、肺泡内可见渗出液，局部间质出血伴中性粒细胞浸润等，MSC-NC 组肺组织损伤有所改善，MSC-CSF2RB 组肺泡间隔较染毒组明显变薄，肺泡结构趋于正常。采用肺组织评分法对大鼠的肺组织病理损伤进行评分，与对照组相比，染毒组损伤评分显著升高，给予 MSC 后损伤评分降低，MSC-CSF2RB 组降低更明显。

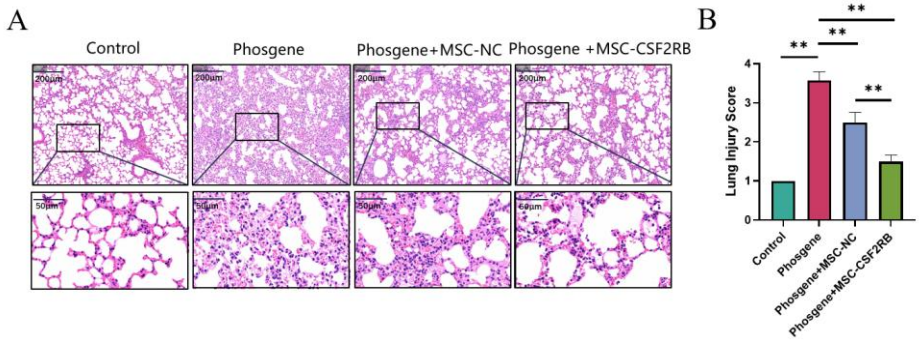


图 2. 2 MSC-CSF2RB 对模型小鼠肺组织病理结构的影响

A：各组小鼠肺组织光镜下病理结构变化，Bar=200 μm、50 μm；B：病理损伤评分。**P<0.01，n=3。

中国知网 https://www.cnki.net

3.2 MSC-CSF2RB 对模型小鼠肺功能的影响

对各组小鼠的肺功能进行检测，结果显示（图 2.3），光气组相比于对照组，支气管收缩系数、呼吸暂停和呼气末暂停时间显著高于对照组，MSC-NC 组相比于光气组，三个指标显著降低；而 MSC-CSF2RB 组相比于单纯 MSC 组，以上指标也显著降低。

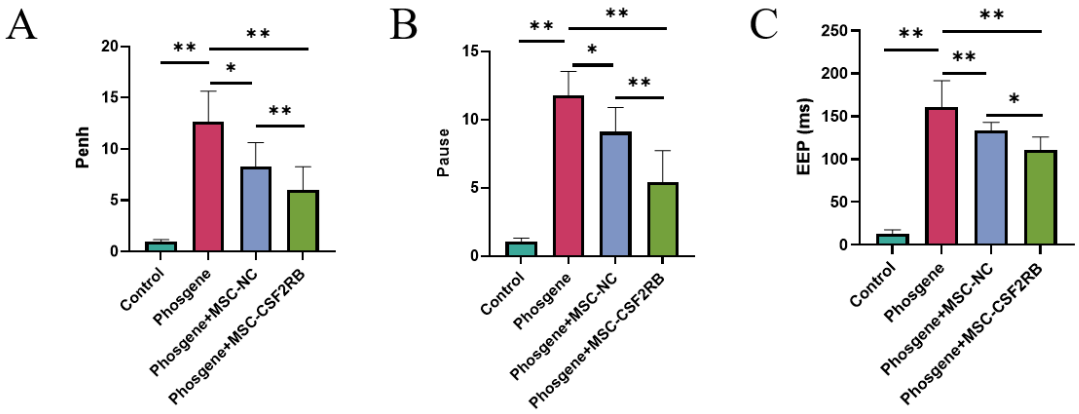


图 2. 3 MSC-CSF2RB 对模型小鼠肺功能的影响

A：支气管收缩系数；B：呼吸暂停；C：呼气末暂停时间。*P<0.05，**P<0.01，n=6。

3.3 MSC-CSF2RB 对模型小鼠肺组织炎症水平的影响

3.3.1 MSC-CSF2RB 对模型小鼠血清、BALF 中的炎症因子的影响

采用 ELISA 法检测模型小鼠血清和 BALF 中的炎症因子，结果显示（图 2. 4 和图 2. 5），与对照组比较，光气组炎症因子水平（IL-1β、IL-6、TNF-α）显著升高；给予 MSC 后，BALF 中所测三种炎症因子水平有所下降，但无统计学意义。血清中 IL-1β、IL-6 水平显著降低；静脉注射 MSC-CSF2RB 后，与光气组相比，可显著降低血清、BALF 中的炎症因子水平（IL-1β、IL-6、TNF-α）；相比 MSC-NC 组，MSC-CSF2RB 组降低上述炎症指标更加明显。

中国知网 https://www.cnki.net

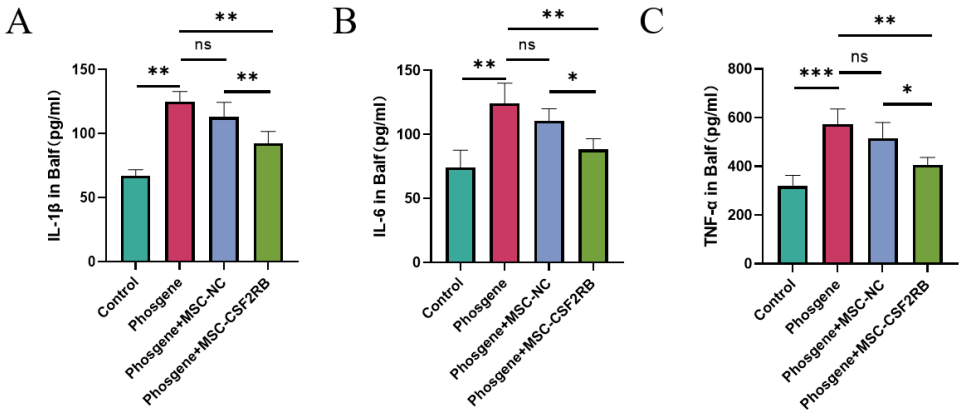


图 2. 4 MSC-CSF2RB 对模型小鼠 BALF 中炎症因子的影响

A：BALF 中的 IL-1β；B：BALF 中的 IL-6；C：BALF 中的 TNF-α。*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001，ns，无统计学意义，n=6。

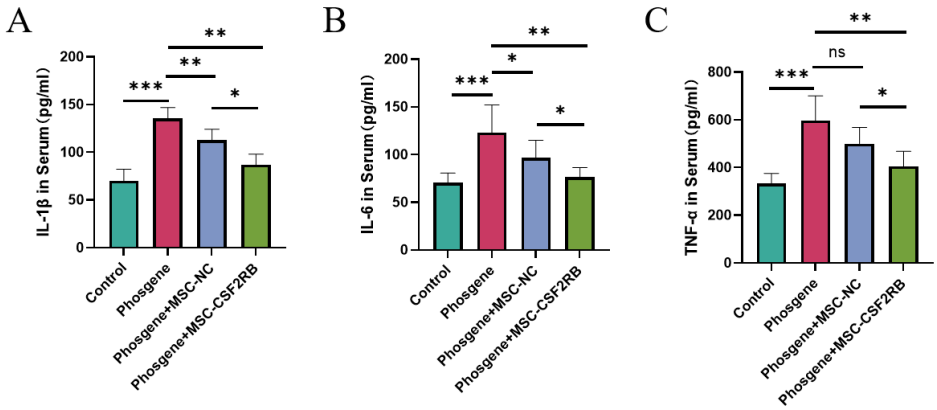


图 2. 5 MSC-CSF2RB 对模型小鼠血清中炎症因子的影响

A：血清中的 IL-1β；B：血清中的 IL-6；C：血清中的 TNF-α。*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001，ns，无统计学意义，n=6。

3.3.2 MSC-CSF2RB 对模型小鼠肺组织中巨噬细胞极化的影响

巨噬细胞在病理微环境信号动态调控下可发生功能性极化。因此，我们对各组小鼠肺脏分别进行 F4/80 和 CD206 免疫荧光染色，并对双染阳性细胞数量进行计数。最终结果显示（**图 2. 6**），相比于 MSC-NC 组，给予 MSC-CSF2RB 可以显著增强 MSC 促进巨噬细胞向 M2 型极化的能力。

中国知网 https://www.cnki.net

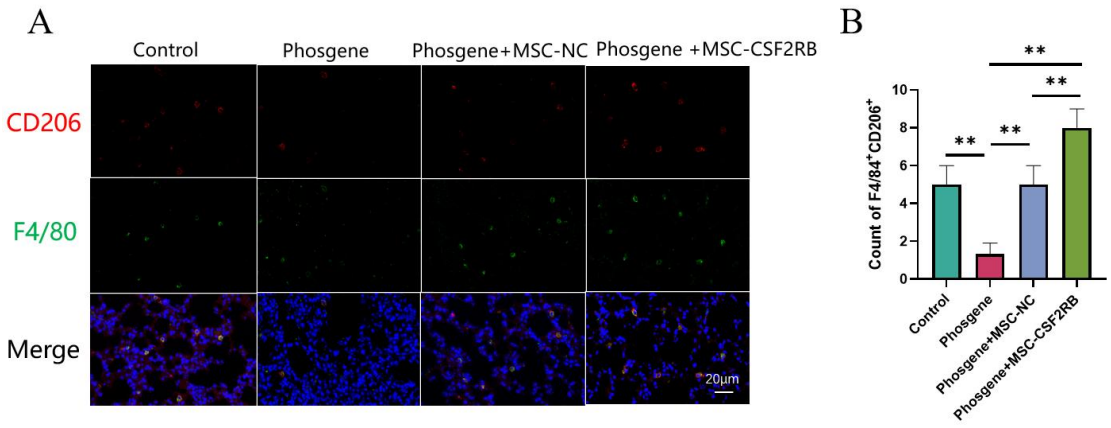


图 2. 6 MSC-CSF2RB 对模型小鼠肺组织中巨噬细胞极化的影响

A：F4/80 和 CD206 免疫荧光图像，Bar=20 μm；B：双染阳性细胞数量。**P<0.01，n=3。

3.4 MSC-CSF2RB 对模型小鼠肺组织抗氧化水平的影响

采用 Western blot 实验检测模型小鼠肺组织中抗氧化应激相关指标，结果显示（图 2. 7），与对照组比较，光气组 SOD2 和 Nrf2 蛋白表达显著降低；给予 MSC-NC 后，与光气组相比，肺组织中抗氧化水平无明显变化；而 MSC-CSF2RB 组与光气组比较，能显著提高抗氧化水平。

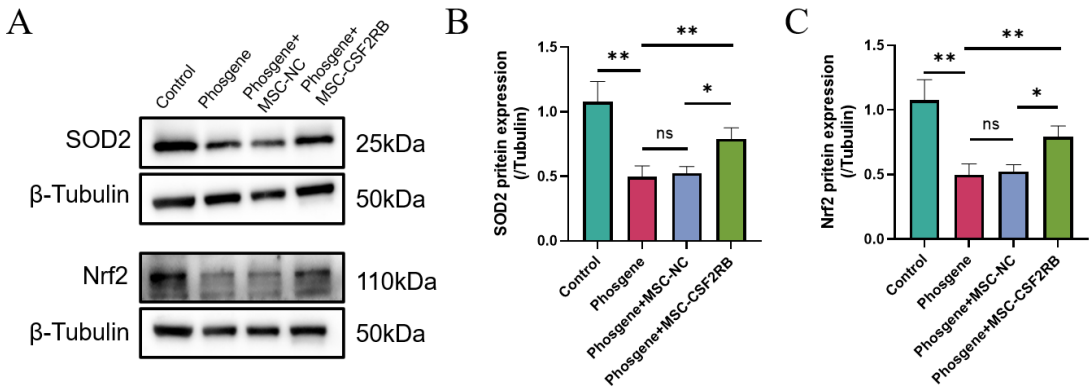


图 2. 7 MSC-CSF2RB 对模型小鼠肺组织中抗氧化水平的影响

A：WB 检测 SOD2、Nrf2 蛋白表达水平；B：SOD2 蛋白表达定量分析；C：Nrf2 蛋白表达定量分析。*P<0.05，**P<0.01，ns，无统计学意义，n=3。

中国知网 https://www.cnki.net

3.5 MSC-CSF2RB 对模型小鼠肺组织抗凋亡水平的影响

3.5.1 MSC-CSF2RB 对模型小鼠肺组织中细胞凋亡水平的影响

我们采用 TUNEL 法检测各组小鼠肺组织细胞凋亡水平，对 TUNEL 阳性细胞进行计数。结果显示（图 2.8），光气致 ALI 小鼠模型中，细胞凋亡显著升高；给予不同 MSCs 进行治疗后，细胞凋亡水平降低；相较于 MSC-NC 组，MSC-CSF2RB 显著降低小鼠肺组织中的细胞凋亡水平。

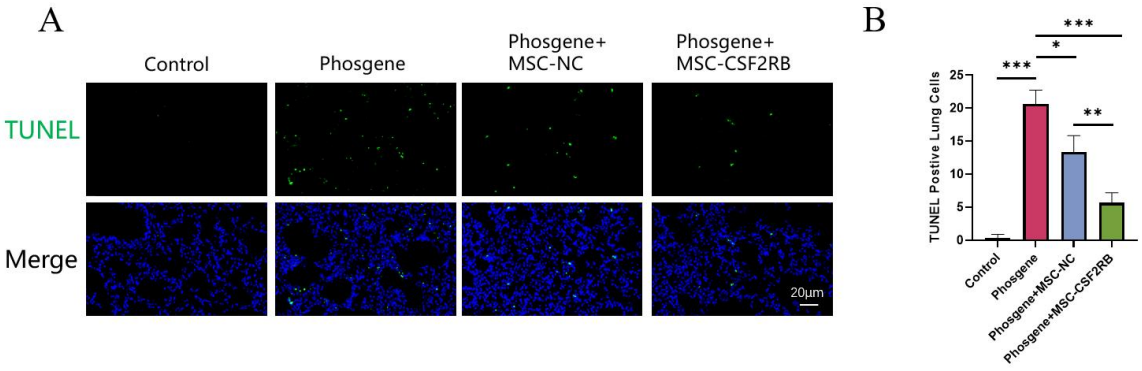


图 2.8 MSC-CSF2RB 对模型小鼠肺组织中细胞凋亡水平的影响

A：TUNEL 染色荧光图像 Bar=20 μm；B：TUNEL 阳性细胞数量。*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001，n=3。

3.5.2 MSC-CSF2RB 对模型小鼠肺组织 Bcl-2 蛋白表达水平的影响

采用 Western blot 实验检测模型小鼠肺组织中抗凋亡相关指标，结果显示（图 2.9），与对照组比较，光气组抗凋亡指标 Bcl-2 蛋白表达无明显变化；给予 MSC-NC 后，肺组织中 Bcl-2 表达略有增高，但无统计学意义；而 MSC-CSF2RB 组与光气组相比 Bcl-2 表达水平显著升高。

中国知网 https://www.cnki.net

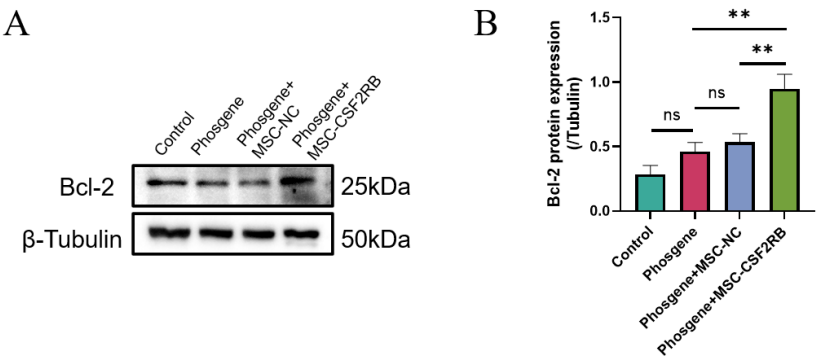


图 2. 9 MSC-CSF2RB 对模型小鼠肺组织中 Bcl-2 蛋白表达水平的影响

A：WB 检测 Bcl-2 蛋白表达水平；B：Bcl-2 蛋白表达定量分析。**P<0.01，ns，无统计学意义，n=3。

3.6 过表达 CSF2RB 对 MSCs 在模型小鼠肺组织中聚集的影响

采用 DiR 对 MSCs 进行体外标记，随后将标记的细胞回输至体内，利用活体光学成像系统监测 MSCs 在模型小鼠各脏器中分布特征。结果显示（图 2. 10），相较 MSC-NC 组，MSC-CSF2RB 组肺组织中标记的 MSCs 的数量显著增加。

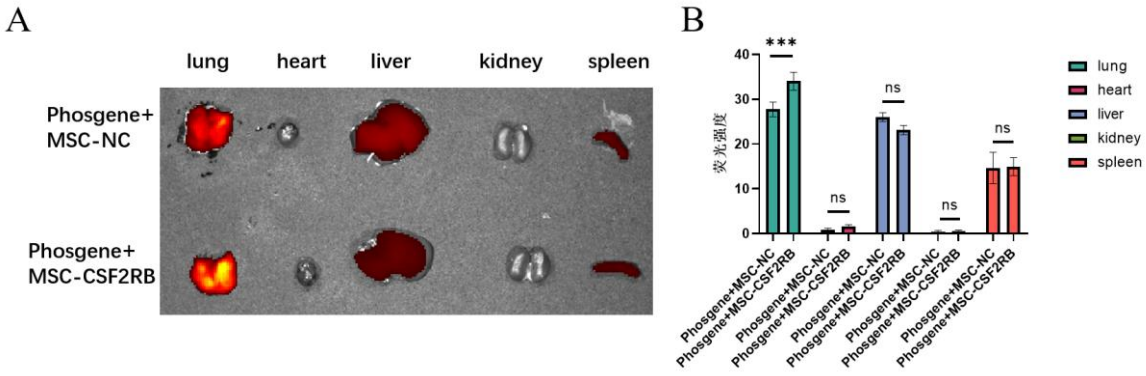


图 2. 10 DiR 标记的 MSCs 在光气致 ALI 小鼠各脏器中的分布

A：小鼠活体成像的代表性图像；B：荧光强度的定量。***P<0.001，ns，无统计学意义，n=3。

用 CM-DiI 标记示踪 MSCs，用荧光显微镜检测过表达 CSF2RB 是否增加 MSCs 在模型小鼠肺脏中的募集和存活，结果显示（图 2. 11），过表达 CSF2RB 显著增加

中国知网 https://www.cnki.net

了 MSCs 在损伤肺组织中的聚集。

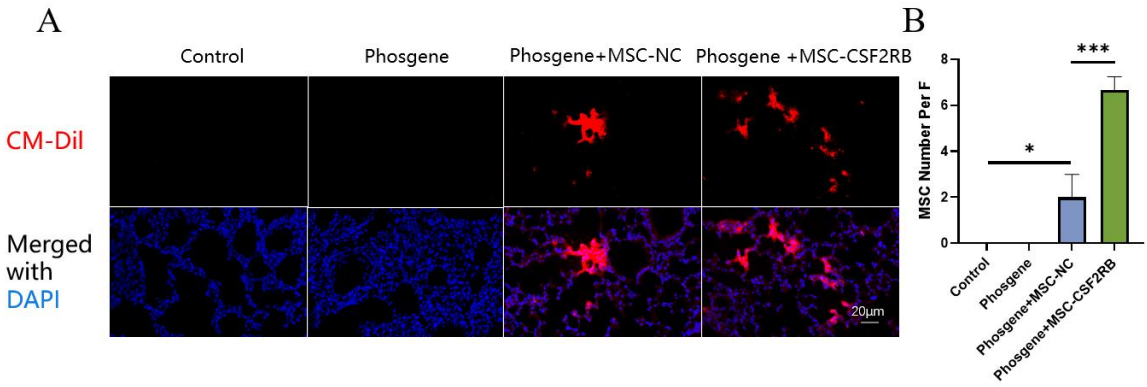


图 2. 11 过表达 CSF2RB 对 MSCs 在模型小鼠肺组织中聚集的影响

A：CM-DiI 标记的 MSCs 在肺组织中的分布；B：CM-DiI 标记的 MSCs 数量。Bar=20 μm，*P<0.05，***P<0.001，n=3。

3.7 过表达 CSF2RB 对 MSCs 在炎症环境中存活的影响

相同条件下体外培养 MSCs-NC 和 MSCs-CSF2RB，给予 100 ng/mL CSF2 因子后使用 3 μg/mL LPS 刺激 24 h，采用 CCK-8 实验检测细胞活力。结果显示（图 2. 12），MSCs-CSF2RB 组细胞活力显著高于 MSCs-NC 组。提示 MSC-CSF2RB 能够响应环境中的高浓度 CSF2，提高其在炎症环境下的存活。

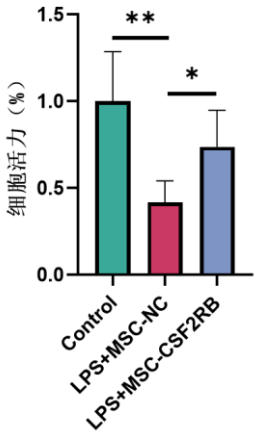


图 2. 12 过表达 CSF2RB 对 MSCs 在炎症环境中存活的影响

*P<0.05，**P<0.01，n=6。

3.8 过表达 CSF2RB 对 MSCs 在炎症环境中 PI3K 蛋白表达水平的影响

采用 Western blot 实验检测体外培养 MSCs 在 LPS 刺激的炎症环境中，PI3K 蛋

中国知网 https://www.cnki.net

白表达水平。结果显示（图 2. 13），MSCs-CSF2RB 组 PI3K 蛋白表达显著高于 MSCs-NC 组。

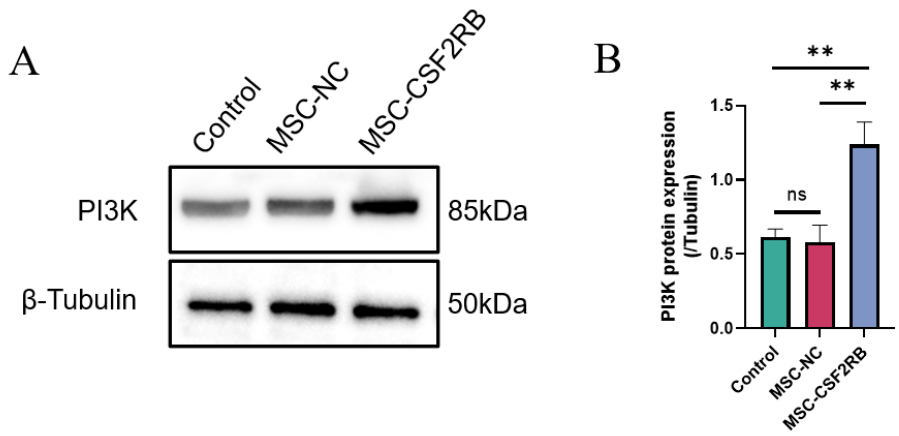


图 2. 13 过表达 CSF2RB 对 MSCs 在炎症环境中 PI3K 表达的影响

A：WB 检测 PI3K 蛋白表达水平；B：PI3K 蛋白表达定量分析。**P<0.01，ns，无统计学意义，n=6。

4. 讨论

本部分结果显示，静脉注射 MSCs 可显著减轻光气致 ALI 小鼠的肺水肿程度，降低 BALF 蛋白含量和肺系数，改善肺组织病理结构，促进肺功能恢复。这与既往研究结果一致，证实了 MSCs 在 ALI 治疗中的作用。值得注意的是，与普通 MSCs 相比，CSF2RB 过表达的 MSCs 治疗组在各项指标上均表现出更好的治疗效果，肺组织 HE 染色显示肺泡间隔增宽、炎性细胞浸润和肺泡内渗出明显减轻，肺损伤评分显著降低，肺功能指标如支气管收缩系数、呼吸暂停时间和呼气末暂停时间均得到更好改善。提示 CSF2RB 过表达能够增强 MSCs 对光气致 ALI 的治疗效果。

炎症反应是光气致 ALI 发生发展的核心机制之一。光气暴露可激活 p38 MAPK/NF-κB 通路和 NLRP3 炎症小体，导致促炎因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平显著升高，形成级联放大的炎症风暴[31][32]。本研究结果显示，MSCs 治疗可显著降低模型小鼠血清和 BALF 中上述炎症因子水平，而过表达 CSF2RB 的 MSCs 其抑炎效果更为显著。提示 CSF2RB 过表达增强了 MSCs 的免疫调节能力。

巨噬细胞在 ALI 的发病和转归中扮演着“总指挥”的角色。在 ALI 早期，以 M1

中国知网 https://www.cnki.net

型促炎巨噬细胞为主，分泌大量促炎因子放大炎症损伤；在恢复期，则转变为 M2 型抗炎巨噬细胞，分泌 IL-10、TGF-β 等促进组织修复。MSCs 及其分泌的细胞外囊泡能有效地将 M1 型巨噬细胞极化为 M2 型。Morrison 等人发现，MSC 来源的 EVs 可通过 CD44 介导的途径将功能性线粒体转移至巨噬细胞，增强其氧化磷酸化水平，从而驱动 M2 型极化[24]。Liu 等人的研究也表明，炎症刺激下的 MSC-EVs 中高表达的 miR-27b-3p 能够通过靶向 CSF-1，促进 M2 型巨噬细胞分化。本研究的免疫荧光结果显示，静脉注射 MSC-CSF2RB 可以增强 MSCs 促进巨噬细胞向 M2 极化的能力，这可能是其增强抗炎效应的关键机制之一[47]。

CSF2RB 作为 IL-3、IL-5 和 GM-CSF 受体的共同信号亚基，在髓系细胞的发育、存活和功能调控中扮演核心角色。Franken 等人对免疫检查点抑制剂相关性肺炎患者的单细胞测序研究发现，肺泡灌洗液中富集了大量共表达 TBX21 和 RORC 的致病性 Th17.1 细胞，这些细胞高表达 CSF2，同时存在高表达 CSF2RB 和促炎因子的炎性单核细胞，形成了一个由 T 细胞来源的 CSF2 作用于单核细胞 CSF2RB，驱动单核细胞产生炎症因子的致病性环路[56]。本研究结果提示，CSF2RB 过表达可能通过增强 MSCs 对这一炎症环路的调控能力，更有效地抑制肺部炎症反应。De Alessandris 等人在 LPS 诱导的 ALI 小鼠模型中发现，使用抗 CSF2RB 抗体阻断该信号，不仅能维持肺泡内 CSF2 的高水平，还能显著减少中性粒细胞浸润和 IL-1β 的产生，从而减轻肺损伤。这表明中性粒细胞通过其表面的 CSF2RB 主动“消耗”并响应 CSF2，是放大和维持肺部炎症的关键环节。阻断 CSF2RB 信号可切断炎症放大的正反馈，起到保护作用[60]。而在本研究中过表达 CSF2RB 的 MSCs 可能也存在类似通过消耗肺组织中的 CSF2 来降低炎症正反馈的作用。

光气及其解离产物与生物分子反应，产生大量 ROS。当 ROS 过量且无法被有效清除时，就会损伤肺泡上皮细胞和肺内皮细胞。这个过程通常伴随着抗氧化酶表达的异常。Nrf2 是维持细胞内氧化还原平衡的关键转录因子。光气暴露可抑制 Nrf2，导致其介导的抗氧化酶系统紊乱，加剧氧化损伤[27][28]。本研究结果显示，MSC-CSF2RB 治疗可显著上调光气致 ALI 小鼠肺组织中抗氧化酶 SOD2 和转录因子 Nrf2 的蛋白表达水平，增强机体的抗氧化应激能力。MSCs 具有抗氧化功能，可分泌多种抗氧化因

中国知网 https://www.cnki.net

子，并通过转移线粒体等方式增强靶细胞的抗氧化能力。本研究中，过表达 CSF2RB 进一步增强了 MSCs 的抗氧化能力，其机制可能与 CSF2RB 下游的 PI3K/AKT 信号通路激活有关。PI3K/AKT 通路不仅促进细胞存活，还可通过磷酸化激活 Nrf2，增强其核转位和转录活性，上调下游抗氧化酶的表达[30]。

本研究检测肺组织中抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平结果显示，光气染毒后 Bcl-2 表达无明显变化，给予 MSC-NC 后略有增高但无统计学意义，而 MSC-CSF2RB 治疗组 Bcl-2 表达显著升高，提示 CSF2RB 过表达增强了 MSCs 的抗凋亡能力。Qi 等人的研究发现，CSF2RB 过表达可通过激活 STAT5 信号通路，上调泛素连接酶 RNF4 的表达，显著增强 MSCs 在缺血/再灌注环境下的抗凋亡能力，从而提高其在损伤部位的存活率和保留时间[15]。本研究结果与之一致，提示 CSF2RB 过表达可能通过 STAT5/RNF4 信号通路增强 MSCs 的抗凋亡能力，进而保护肺组织细胞免受光气诱导的损伤。此外，MSCs 分泌的生长因子如肝细胞生长因子（HGF）、血管内皮生长因子（VEGF）和胰岛素样生长因子-1（IGF-1）等，也具有抑制内皮细胞和上皮细胞凋亡的作用[59]。CSF2RB 过表达可能通过增强 MSCs 的旁分泌功能，上调这些抗凋亡因子的分泌，从而发挥更强大的肺组织保护作用。

MSCs 治疗 ALI 的首要步骤是其能否有效到达损伤部位，即“归巢”能力。然而，静脉输注 MSCs 面临一个关键的“肺首过效应”。Eggenhofer 等人的研究明确指出，由于 MSCs 的直径（15-30 μm）大于肺毛细血管的直径，绝大多数（超过 80%）经静脉输注的 MSCs 会在首次通过时被阻滞在肺毛细血管网中，在 24h 内仍可在肺组织中检测到，但之后迅速消失[9]。

本研究采用 CM-DiI 标记示踪 MSCs，观察过表达 CSF2RB 对 MSCs 在光气致 ALI 小鼠肺组织中聚集的影响。结果显示：与普通 MSCs 相比，CSF2RB 过表达的 MSCs 在损伤肺组织中的聚集数量显著增加，提示 CSF2RB 过表达增强了 MSCs 向损伤肺组织的归巢能力。这一结果与 Qi 等人的研究一致，他们首次将 CSF2RB 定义为 MSCs 的“归巢”和“存活”双重增强因子，发现过表达 CSF2RB 可增强 ADSCs 向缺血心肌的归巢能力，并通过激活 STAT5 信号通路上调 RNF4 表达，增强细胞在缺血/再灌注环境下的抗凋亡能力，提高其在损伤部位的存活率和保留时间[15]。

光气暴露后肺组织中 CSF2 表达明显增高，形成趋化梯度，过表达 CSF2RB 的

中国知网 https://www.cnki.net

MSCs 能更有效地感知这一信号，从而增强其向损伤肺组织的定向迁移。Koochaki 等人通过 CRISPR 筛选进一步揭示，CSF2RB 的蛋白稳定性受到 E3 泛素连接酶 STUB1/CHIC2 复合物的负调控，该复合物在低细胞因子环境下促进 CSF2RB 的降解，从而防止细胞表面受体过度积累，精细调控细胞对 CSF2 的敏感性[56]。这提示 CSF2RB 的表达水平是决定细胞响应 CSF2 趋化信号的关键因素。

磷酸化的 CSF2RB 也可招募并激活 PI3K，进而激活 AKT 激酶。该通路主要促进细胞存活和增殖，对抑制凋亡至关重要。Ko 等人发现[38]，MSC 分泌组通过上调 CIS 抑制 IL-2 介导的 JAK-STAT 和 AKT 信号通路，从而约束 NK 细胞活性，这也反向证明了 AKT 通路在免疫细胞活化中的重要性。本研究发现，在炎症环境中，MSC-CSF2RB 组 PI3K 蛋白表达显著高于 MSC-NC 组。提示 CSF2RB 促进 MSC 在炎症环境存活可能与 PI3K 有关。

同时，光气还可消耗肺泡内的谷胱甘肽，导致 ROS 产生增加，引发氧化应激损伤。这种严酷的炎症微环境是导致 MSCs 在损伤部位存活率低的重要原因[20][21]。CSF2RB 过表达可能通过激活 STAT5 及相关信号通路，增强 MSCs 的抗凋亡能力，使其能够在光气致 ALI 的炎症微环境中更好地存活，从而增加其在肺组织中的聚集数量。

综上所述，本研究证实 CSF2RB 过表达可协同增强 MSCs 对光气致 ALI 的治疗效果，其机制可能与增强 MSCs 在炎症肺组织中的聚集和存活、调控巨噬细胞极化、增强抗炎、抗氧化和抗凋亡能力有关。

中国知网 https://www.cnki.net

结论与展望

光气是一种窒息性毒剂，也是一种重要的工业原料。在我国光气每年产量达到600万吨，意外暴露和接触，均可引起ALI和肺水肿，严重者可导致ARDS而死亡。目前光气中毒没有特效救治药物，研发有效的治疗策略和手段是我国迫切需要解决的难题，有着重要的意义。MSCs具有免疫调节和组织修复能力，在ALI治疗中具有巨大潜力，但其在严酷的炎症微环境下存活率低、疗效不稳定，限制了其临床应用。CSF2RB作为多种炎症因子的共同信号传导亚基，在调控免疫稳态、肺泡上皮修复及抗凋亡信号通路中发挥关键作用，提示其可能是增强MSCs疗效的关键分子靶点。

本研究通过建立小鼠鼻吸入光气所致ALI模型和构建过表达CSF2RB的MSCs，观察了MSCs-NC及MSCs-CSF2RB对模型小鼠肺损伤的治疗作用，得到如下结论：MSCs中过表达CSF2RB可通过促进其向损伤肺组织的靶向归巢，增强其在炎症环境中的存活，并增强其抗炎、抗氧化应激及抗凋亡能力，显著提升MSCs对光气诱导小鼠ALI的治疗效果。本研究为优化MSCs治疗光气中毒性肺损伤提供了新的分子靶点和理论依据。

本研究主要从动物水平证实CSF2RB过表达可增强MSCs在光气致ALI肺组织中的聚集，缓解肺损伤。但因为光气染毒细胞存在进口设备需要光气量太大而光气从国外购买时间太长，自制的细胞染毒设备存在染毒条件不稳定等因素，后期需要进一步从细胞层面探索本研究的具体机制。CSF2RB作为IL-3、IL-5和GM-CSF受体的共同信号亚基，主要通过JAK/STAT、PI3K/AKT和RAS/MAPK三条通路发挥功能。后续研究可利用特异性抑制剂或基因敲除技术，明确具体的信号通路在CSF2RB增强MSCs聚集和存活中起主导作用。值得关注的是PI3K/AKT和STAT5信号通路，后者在Qi等人的研究中被证实是CSF2RB增强ADSCs抗凋亡能力的关键。本研究采用CM-DiI标记示踪技术观察MSCs在肺组织中的聚集情况，但未能动态追踪MSCs在体内的分布、迁移和存活时间。后续研究可结合活体成像技术，实时观察CSF2RB过表达MSCs在光气致ALI小鼠体内的动态分布规律，明确其在损伤肺组织中的滞

中国知网 https://www.cnki.net

留时间和衰减曲线，为优化给药方案提供依据。

综上所述，本研究证实 CSF2RB 过表达可协同增强 MSCs 对光气致 ALI 的治疗效果，其机制可能与增强 MSCs 在炎症肺组织中的聚集和存活、调控巨噬细胞极化和增强抗炎、抗氧化以及抗凋亡能力有关。本研究为优化 MSCs 治疗光气致 ALI 提供了新的分子靶点和理论依据，后续研究将进一步深入探讨其分子机制、优化治疗策略，为光气所致 ALI 特效救治药物研发奠定实验基础。

中国知网 https://www.cnki.net

参考文献

[1] Fitzgerald G J. Chemical warfare and medical response during World War I[J]. Am J Public Health, 2008, 98(4): 611-625.

[2] Nicholson-Roberts T C. Phosgene use in World War Ⅰ and early evaluations of pathophysiology[J]. J R Army Med Corps, 2019, 165(3):183-187.

[3] Hardison L S Jr, Wright E, Pizon A F. Phosgene exposure: a case of accidental industrial exposure[J]. J Med Toxicol, 2014, 10(1): 51-56.

[4] Everett E D, Overholt E L. Phosgene poisoning[J]. JAMA, 1968, 205(4):243-245.

[5] 秦绪军,海春旭,梁欣,等.大鼠急性光气吸入对机体氧化损伤的研究[J].毒理学杂志,2005,19(4):260-262.

[6] Sciuto A M, Hurt H H. Therapeutic treatments of phosgene-induced lung in jury[J]. Inhal Toxicol, 2004, 16(8): 565-580.

[7] Walter J, Ware L B, Matthay M A. Mesenchymal stem cells: mechanisms of potential therapeutic benefit in ARDS and sepsis[J]. Lancet Respir Med, 2014, 2(12): 1016-1026.

[8] Fischer U M, Harting M T, Jimenez F, et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect[J]. Stem Cells and Development, 2009, 18(5): 683-692.

[9] Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, et al. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion[J]. Frontiers in Immunology, 2012, 3: 297.

[10] Toma C, Wagner W R, Bowry S, et al. Fate of culture-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature: in vivo observations of cell kinetics[J]. Circulation Research, 2009, 104(3): 398-402.

中国知网 https://www.cnki.net

[11] Schrepfer S, Deuse T, Reichenspurner H, et al. Stem cell transplantation: the lung barrier[J]. Transplantation Proceedings, 2007, 39(2): 573-576.

[12] 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]. The Journal of Immunology, 2007, 179(3): 1855-1863.

[13] Becher B, Tugues S, Greter M. GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation[J]. Immunity, 2016, 45(5): 963-973.

[14] Tanaka T, Motoi N, Tsuchihashi Y, et al. Adult-onset hereditary pulmonary alveolar proteinosis caused by a single-base deletion in CSF2RB[J]. J Med Genet, 2011, 48(3): 205-209.

[15] Qi T T, Xu X M, Guo Y Z, et al. CSF2RB overexpression promotes the protective effects of mesenchymal stromal cells against ischemic heart injury[J]. Theranostics, 2023, 13(6): 1759-1773.

[16] 陈宏莉,海春旭,梁欣,等.大鼠光气染毒后不同时间点肺水肿及炎症反应的差异性研究[J].癌变·畸变·突变,2006,18(2):93-95.

[17] 李文丽,海春旭,张晓迪,等.光气对小鼠 MDA、GSH 和 SOD 的影响[J].癌变·畸变·突变,2005,17(2):90-93.

[18] 李文丽,海春旭,何伟,等.光气对小鼠肺脏的损伤作用[J].毒理学杂志,2005,19(3):186-187.

[19] Sciuto A M, Hurt H H. Therapeutic treatments of phosgene-induced lung in j ury[J]. Inhal Toxicol, 2004, 16(8): 565-580.

[20] Pauluhn J. Phosgene inhalation toxicity: update on mechanisms and mechanism-based treatment strategies[J]. Toxicology, 2021, 450: 152682.

[21] Aggarwal S, Jillin g T, Doran S, et al. Phos g ene inhalation causes hemolysis and acute lung injury[J]. Toxicol Lett, 2019, 312: 204-213.

[22] Zhang X D, Hai C X, Cai F L, et al. Time course for expression of VEGF and its receptor and regulator levels of contraction and relaxation in increased vascular

中国知网 https://www.cnki.net

permeability of lung induced b y p hos gene[J]. Inhal Toxicol, 2008,20(9): 805-812.

[23] He G, Yu W, Li H, et al. Alpha-1 antitrypsin protects against phosgene-induced acute lung injury by activating the ID1-dependent anti-inflammatory response[J]. Eur J Pharmacol, 2023, 957: 176017.

[24] Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, et al. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy[J]. Circulation Research, 2008, 103(11): 1204-1219.

[25] Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery[J]. Leukemia, 2006, 20(5): 847-856.

[26] Phinney D G, Pittenger M F. Concise review: MSC-derived exosomes for cell-free therapy[J]. Stem Cells, 2017, 35(4): 851-858.

[27] Lai R C, Yeo R W, Tan K H, et al. Exosomes for drug delivery - a novel application for the mesenchymal stem cell[J]. Biotechnology Advances, 2013, 31(5): 543-551.

[28] Nicholson-Roberts T C. Phosgene use in World War 1 and early evaluations of pathophysiology[J]. J R Army Med Corps, 2019, 165(3):183-187.

[29] Hardison L S Jr, Wright E, Pizon A F. Phosgene exposure: a case of accidental industrial exposure[J]. J Med Toxicol, 2014, 10(1): 51-56.

[30] Hoseinzadeh A, Esmaeili S A, Sahebi R, et al. Fate and long-lasting therapeutic effects of mesenchymal stromal/stem-like cells: mechanistic insights[J]. Stem Cell Res Ther, 2025, 16(1): 33.

[31] Morrison T J, Jackson M V, Cunningham E K, et al. Mesenchymal Stromal Cells Modulate Macrophages in Clinically Relevant Lung Injury Models by Extracellular Vesicle Mitochondrial Transfer[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2017, 196(10): 1275-1286.

[32] Wei X, Yi X, Lv H, et al. MicroRNA-377-3p released by mesenchymal stem cell exosomes ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by targeting RPTOR to induce autophagy[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(8): 657.

中国知网 https://www.cnki.net

[33] Tavakoli S, Ghaderi Jafarbeigloo HR, Shariati A, et al. Mesenchymal stromal cells; a new horizon in regenerative medicine. J Cell Physiol. 2020;235:9185–9210.

[34] Xia Y, Xu X, Guo Y, et al. Mesenchymal stromal cells overexpressing farnesoid X receptor exert cardioprotective effects against acute ischemic heart injury by binding endogenous bile acids[J]. Adv Sci, 2022, 9(20): 2200431.

[35] Ji S, Peng Y, Liu J, et al. Human adipose tissue-derived stem cell extracellular vesicles attenuate ocular hypertension-induced retinal ganglion cell damage by inhibiting microglia-TLR4/MAPK/NF-κB proinflammatory cascade signaling[J]. Acta Neuropathol Commun, 2024, 12(1): 44.

[36] Yang X, Zhang S, Chen K, et al. Hypoxic preconditioned ADSC exosomes enhance vaginal wound healing via accelerated keratinocyte proliferation and migration through AKT/HIF-1α axis activation[J]. Ann Biomed Eng, 2024, 52(10): 293-302.

[37] Sun D, Mou S, Chen L, et al. High yield engineered nano species from ADSC with enriched miR-21-5p promote angiogenesis in adipose tissue regeneration[J]. Biomater Res, 2022, 26(1): 83.

[38] Ko E, Yoon T, Lee Y, et al. ADSC secretome constrains NK cell activity by attenuating IL-2-mediated JAK-STAT and AKT signaling pathway via upregulation of CIS and DUSP4[J]. Stem Cell Res Ther, 2023, 14(1): 329.

[39] Shao Y, Jiang Z, He D, et al. NEDD4 attenuates phosgene-induced acute lung injury through the inhibition of Notch1 activation[J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(10): 2831-2840.

[40] Lu Q, Huang S, Meng X, et al. Mechanism of phosgene-induced acute lung injury and treatment strategy[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(20): 10933.

[41] Walter J, Ware L B, Matthay M A. Mesenchymal stem cells: mechanisms of potential therapeutic benefit in ARDS and sepsis[J]. Lancet Respir Med, 2014, 2(12): 1016-1026.

[42] Chen W, He Z, Li S, et al. The effect of mesenchymal stem cells, adipose tissue derived stem cells, and cellular stromal vascular fraction on the repair of acute anal sphincter

中国知网 https://www.cnki.net

injury in rats[J]. Bioengineering, 2022, 9(7): 318.

[43] Zeng X, Gan J, Huang D, et al. Recombinant human collagen hydrogels with different stem cell-derived exosomes encapsulation for wound treatment[J]. J Nanobiotechnol, 2025, 23(1): 241.

[44] Becher B, Tugues S, Greter M. GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. Immunity. 2016 Nov 15;45(5):963-973.

[45] Shi L, Huang H, Lu X, et al. Effect of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on lung damage in severe COVID-19patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 58.

[46] Hoseinzadeh A, Esmaeili S A, Sahebi R, et al. Fate and long-lasting therapeutic effects of mesenchymal stromal/stem-like cells: mechanistic insights[J]. Stem Cell Res Ther, 2025, 16(1): 33.

[47] Liu Y, Zhang Z, Wang B, et al. Inflammation-stimulated MSC-derived small extracellular vesicle miR-27b-3p regulates macrophages by targeting CSF-1 to promote temporomandibular joint condylar regeneration[J]. Small, 2022, 18(16): 2107354.

[48] Jia Q, Zhao H, Wang Y, et al. Mechanisms and applications of adipose-derived stem cell-extracellular vesicles in the inflammation of wound healing[J]. Front Immunol, 2023, 14:1214757.

[49] Lu Z, Chang W, Meng S, et al. Mesenchymal stem cells induce dendritic cell immune tolerance via paracrine hepatocyte growth factor to alleviate acute lung injury[J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 372.

[50] Silva L H A, Antunes M A, Dos Santos C C, et al. Strategies to improve the therapeutic effects of mesenchymal stromal cells in respiratory diseases[J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 45.

[51] Pauluhn J. Phosgene inhalation toxicity: update on mechanisms and mechanism-based treatment strategies[J]. Toxicology, 2021, 450: 152682.

[52] McClure B J, Woodcock J M, Harrison-Findik D, et al. GM-CSF binding to its receptor

中国知网 https://www.cnki.net

induces oligomerisation of the common beta-subunit[J]. Cytokine, 2001, 14(6): 334-337.

[53] Tanaka T, Motoi N, Tsuchihashi Y, et al. Adult-onset hereditary pulmonary alveolar proteinosis caused by a single-base deletion in CSF2RB[J]. J Med Genet, 2011, 48(3): 205-209.

[54] Papiris S A, Louvrier C, Fabre A, et al. CSF2RB mutation-related hereditary pulmonary alveolar proteinosis: the"long and winding road" into adulthood[J]. ERJ Open Res, 2023, 9(6): 00703-2023.

[55] Koochi S H J, Slabicki M, Lumpkin R, et al. A STUB1 ubiquitin ligase/CHIC2 protein complex negatively regulates the IL-3, IL-5, and GM-CSF cytokine receptor common β chain(CSF2RB) protein stability[J]. J Biol Chem, 2022, 298(10): 102484.

[56] Franken A, Van Mol P, Vanmassenhove S, et al. Single-cell transcriptomics identifies pathogenic T-helper 17.1 cells and pro-inf lammatory monocytes in immune checkpoint inhibitor-related pneumonitis[J]. J Immunother Cancer, 2022, 10(10): e005323.

[57] Charlet A, Kappenstein M, Keye P, et al. The IL-3, IL-5, and GM-CSF common receptor beta chain mediates oncogenic activity of FLT3-ITD-positive AML[J]. Leukemia, 2022, 36(3): 701-711.

[58] Shang D S, Yang Y M, Zhang H, et al. Intracerebral GM-CSF contributes to transendothelial'monocyte migration in APP/PS1 Alzheimers disease mice[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2016, 36(11): 1978-1991.

[59] Corte-Real B F, Arroyo Hornero R, Dyczko A, et al. Dissecting the role of CSF2RB expression in human regulatory T cells[J]. Front Immunol, 2022, 13: 1005965.

[60] Bonaventura A, Vecchié A, Wang T S, et al. Targeting GM-CSF in COVID-19 Pneumonia: Rationale and Strategies[J]. Front Immunol, 2020, 11:1625.

[61] De Luca G, Cavalli G, Campochiaro C, et al. GM-CSF blockade with mavrilimumab in severe COVID-19 pneumonia and systemic hyperinflammation: a single-centre, prospective cohort study[J]. Lancet Rheumatol, 2020, 2(8): e465-e473.

中国知网 https://www.cnki.net

[62] Chuang L S, Villaverde N, Hui K Y, et al. A frameshift in CSF2RB predominant among Ashkenazi Jews increases risk for Crohns disease and reduces monocyte signaling via GM-CSF[J]. Gastroenterology, 2016, 151(4): 710-723.

中国知网 https://www.cnki.net