

干细胞动员对肺损伤大鼠模型肺功能保护及机制研究

陆 鹏,方小正*

(南京医科大学附属淮安第一医院老年科,江苏 淮安 223300)

摘 要: 为了探讨干细胞动员对肺损伤大鼠的肺功能保护及机制研究,将雄性 wistar 大鼠 30 只,随机分为正常组、对照组和动员组,每组各 10 只。观察肺组织病理改变并检测 3 组大鼠肺泡灌洗液肺组织湿干比和中性粒细胞数,ELISA 测定肺组织匀浆肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-1、白细胞介素(IL)-6 水平。结果显示,干细胞动员可以减轻肺损伤大鼠模型的损伤程度。对照组和动员组的肺泡灌洗液中性粒细胞数均高于正常组,动员组低于对照组。对照组的肺组织湿干比高于正常组,动员组低于对照组。肺组织匀浆中对照组的 TNF- α 、IL-1、IL-6 的表达水平均明显高于正常组,动员组低于对照组。研究结果表明,干细胞动员能有效保护大鼠肺损伤,减少炎症因子释放,促进肺功能恢复。

关键词: 干细胞动员; 肺损伤; 中性粒细胞; 炎症因子; 大鼠

中图分类号:R563

文献标识码:A

Study on lung function protection and mechanism of stem cell mobilization in rat model of lung injury

LU Peng, FANG Xiaozheng

(Department of Geriatric, Huaian First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University,
Huaian 223300 Jiangsu, China)

Abstract: To investigate the protection and mechanism of lung function in rats with lung injury by stem cell mobilization. 30 male Wistar rats were randomly divided into the normal group, the control group and the mobilization group with 10 rats in each group. The pathological changes of lung tissue were observed. The wet dry ratio and neutrophil count of lung tissue in 3 groups of rats were detected. The levels of tumor necrosis factor (TNF) - α , interleukin (IL) -1 and interleukin (IL) -6 in lung homogenate were measured using ELISA kit. The results showed stem cell mobilization can reduce the degree of injury in rat models of lung injury. The number of neutrophils in the alveolar lavage fluid of the control group and the mobilization group were all higher than that of the normal group, and the mobilization group was lower than the control group. The ratio of wet and dry of lung tissue in the control group was higher than that of the normal group, and the mobilization group was lower than that of the control group. In the control group the expression levels of TNF- α , IL-1 and IL-6 in the lung homogenate were significantly higher than those in the normal group, and the mobilized group was lower than that in the control group. These results suggest that stem cell mobilization can effectively protect the lung injury of rats, reduce the release of inflammatory factors and promote the recovery of lung function.

Key words: stem cell mobilization; lung injury; neutrophils; inflammatory factors; rat

肺损伤是由于受到肺内外某些因素直接或间接的损伤肺血管内皮细胞或者肺泡的上皮细胞,使肺部的血管通透性增加,导致中性粒细胞浸润,释放炎症因子,引起组织损伤^[1-2]。近年来对干细胞的研究和应用成为许多疑难杂症,如缺血性疾病,

肺、脑损伤的有效治疗方式。在稳定状态下人类外周血中存在很低水平的干细胞并且大多处于静息状态,在炎症后其可迁移至非造血器官。在应急反应发生时,一些应急信号,如注射粒细胞集落刺激因子,会增加干细胞的释放,对受损的组织进行恢复。粒细胞集落刺激因子是目前最常用,效果明显的干细胞动员剂之一,在受损组织的恢复功能中发挥着重要作用^[3]。本文通过皮下注射重组人粒细

胞刺激因子治疗博来霉素诱导的肺损伤大鼠模型,探讨了干细胞动员对肺损伤大鼠的保护作用及其机制,为干细胞动员防治肺损伤提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂 实验动物:雄性 wistar 大鼠 30 只,体质量(200 ± 20)g,购自河北医科大学动物实验中心。实验中有关实验动物的喂养及处理均符合《关于善待实验动物的指导性意见》及《实验动物伦理学》的相关规定。

主要试剂:博来霉素(日本化药株式会社);重组人粒细胞刺激因子(rhG-CSF)(齐鲁制药);戊巴比妥钠(天津市化学试剂六厂);4%多聚甲醛固定液(上海歌凡);苏木精-伊红染色液(北京索莱宝);肿瘤坏死因子(TNF)- α ELISA 试剂盒(中国武汉博士德生物工程有限公司);白细胞介素(IL)-1 β ELISA 试剂盒(中国武汉博士德生物工程有限公司);白细胞介素(IL)-6 ELISA 试剂盒(中国武汉博士德生物工程有限公司)。

主要仪器:光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司);分光光度计(上海第三分析仪器厂);多样品组织研磨机-24(天津科莱恩);多功能酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);低温高速离心机(美国 Thermo 公司);-80℃冰箱(海尔);注射器等。

1.2 实验分组及模型的建立^[4] 雄性 wistar 大鼠 30 只,随机分为正常组、对照组和动员组各 10 只。正常组正常饲养,不做处理,对照组、动员组大鼠经气管注入 $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 博来霉素 0.2~0.3mL 诱发建立肺损伤模型,大鼠明显出现呼吸加快,浅促。动员组于模型建立后即刻皮下注射重组人粒细胞刺激

因子 $30\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,连续 7 天;对照组于模型建立后即刻皮下注射等量生理盐水,连续 7 天。7 天后注射 3%戊巴比妥钠 $1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 过度麻醉处死。

1.3 观察肺组织病理改变 取部分右肺下叶用多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,4 μm 切片,HE 染色,显微镜下观察病理改变。

1.4 肺泡灌洗液中性粒细胞数测定 取部分右肺以 10mL 生理盐水灌洗 3 次,收集灌洗液,离心 $800\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,5min,收集上清液放入-80℃冰箱保存。

1.5 肺组织的湿干比测定 取右肺上叶组织以生理盐水冲洗表面血液,用滤纸吸干肺脏表面附着液体,称质量为肺湿质量,在 80℃烘箱中干燥过夜,再次称质量为肺干质量,计算两次肺组织质量之比,即肺组织的湿干比。

1.6 肺组织匀浆中肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-1 β 、白细胞介素(IL)-6 的测定 取大鼠左肺组织按 1g 肺组织加 5mL 生理盐水比例制成匀浆,行 ELISA 法检测肺组织匀浆中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平,严格按照试剂盒的说明书操作。

1.7 统计学分析 用 SPSS 19.0 进行统计处理,实验所得数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 检验法,以 $P<0.05$ 判定差异有显著性。

2 结果

2.1 肺组织病理学改变 正常组肺泡结构清晰,间隔完整;对照组肺泡结构破坏,间隔增厚,有炎性细胞浸润;动员组肺泡结构清晰,但较正常组间隔仍增厚,肺组织损伤明显减轻。

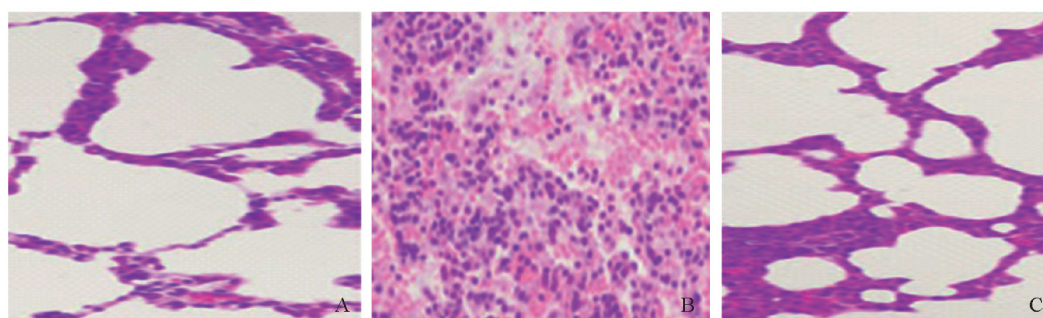


图 1 A、B、C 分别为各组大鼠肺组织 HE 观察结果(200 $\times$) 注:A 为正常组,B 为对照组,C 为动员组。

2.2 各组大鼠肺泡灌洗液中性粒细胞数和肺组织湿干比的差异比较 与正常组相比,动员组和对照组肺泡灌洗液中性粒细胞数均高于正常组($P<$

0.05),对照组的肺组织湿干比高于正常组($P<0.05$);与对照组相比,动员组肺泡灌洗液中性粒细胞数和肺组织湿干比均低于对照组($P<0.05$)。

表 1 各组大鼠肺泡灌洗液中性粒细胞和肺组织湿干比的差异比较

分组	n	中性粒细胞数($\times 10^9/L$)	肺组织湿干比(%)
正常组	10	7.68 $\pm$ 1.54	3.59 $\pm$ 0.22
对照组	10	19.26 $\pm$ 3.11 ^a	8.47 $\pm$ 0.31 ^a
动员组	10	12.18 $\pm$ 2.16 ^{ab}	4.02 $\pm$ 0.18 ^b

与正常组比较, ^a $P<0.05$;与对照组比较, ^b $P<0.05$

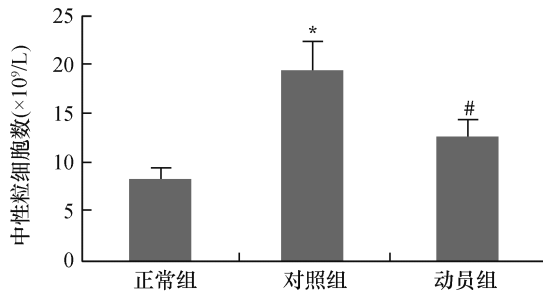


图 2 各组大鼠肺泡灌洗液中的中性粒细胞数

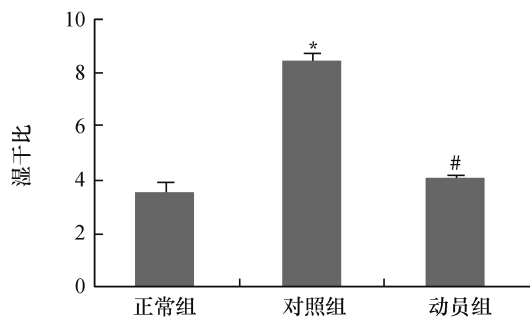


图 3 各组大鼠肺细胞湿干比

2.3 各组大鼠肺组织匀浆中细胞因子含量检测结果 与正常组相比,对照组的肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-1、白细胞介素(IL)-6的表达水平均高于正常组($P<0.05$);与对照组相比,动员组TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平降低($P<0.05$)。

表 2 各组大鼠肺组织匀浆中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达水平比较 (pg/mL)

分组	n	TNF- α	IL-1 β	IL-6
正常组	10	108.33 $\pm$ 13.78	208.93 $\pm$ 13.02	127.34 $\pm$ 11.46
对照组	10	365.79 $\pm$ 26.02 ^a	532.61 $\pm$ 20.37 ^a	386.76 $\pm$ 15.26 ^a
动员组	10	145.36 $\pm$ 9.27 ^b	304.05 $\pm$ 15.96 ^{ab}	187.83 $\pm$ 12.58 ^b

注:与正常组比较, ^a $P<0.05$;与对照组比较, ^b $P<0.05$

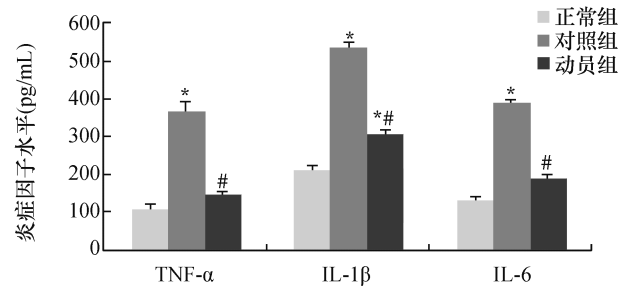


图 4 各组大鼠肺组织匀浆中炎症因子水平

个复杂的过程,涉及到许多细胞活动,分为早期的组织损伤和晚期的损伤后恢复^[5],初步认为肺损伤是以血管为中心的,以中性粒细胞、巨噬细胞等等反应为主的炎症过程^[6],而 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎症因子在这一过程中发挥着重要作用^[7]。用博来霉素诱导的肺损伤模型,起初主要的症状为破坏肺泡细胞,毛细血管壁通透性增加使炎性细胞因子浸润,之后转化为肺部纤维化,肺组织功能受损^[8]。

目前治疗肺损伤的方法主要是呼吸维持及抗炎用药,但效果不是很好,而干细胞动员作为一种新的治疗方法受到了广泛关注。

干细胞是一类具有自我更新和分化潜能的细胞。近些年来,随着对干细胞分化潜能的研究,使干细胞在防治某些损伤性疾病和造血系统、免疫系统疾病中的治疗作用得到很大促进,并发现干细胞能修复受损肺组织的结构和功能。干细胞动员剂可以使骨髓造血细胞、内皮干细胞、充质干细胞同时动员,从而使骨髓的多种干细胞动员参与受损组织的恢复^[9],其中粒细胞集落刺激因子是骨髓干细胞最强的动员剂之一。当机体受损或有炎症时,单一或多重的应急信号可干扰稳态造血,导致骨髓中成熟和不成熟的造血细胞向外周循环的释放增加,骨髓释放干细胞至循环并迁移至损伤部位,来构成机体防御和组织修复。而肺内有多种干细胞,肺组织受损后由于内源性干细胞的存在使肺具有一定再生能力,外源性的干细胞也在受损组织处分化为肺功能细胞,具体机制还有待研究^[10]。

正常生理条件下,机体的炎症因子处于动态平衡状态,当机体遇到刺激时平衡状态被打破,若炎症因子过表达,就会造成机体损伤。当发生创伤应激反应时,大量炎症因子产生如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等,促进炎症反应,从而炎症级联反应放大,加重肺损伤。

TNF- α 主要由单核细胞和巨噬细胞激活后产生,能直接损伤组织器官,在炎症的发生中起着起始作用而诱导其他炎性因子的释放。TNF- α 可以使

3 讨 论

肺损伤,就是指肺部的损伤,有各种表现,是一

中性粒细胞大量释放,增加血管通透性,促使 IL-1 β 、IL-6 等炎性因子释放生成量增多,加重炎症反应的发生进程。白细胞介素由多种细胞产生,参与机体免疫调节应答,参与机体的生理病理过程,在干细胞动员中具有调节作用。IL-1 β 由多种类型细胞分泌,参与介导免疫和炎症反应,它能够有效促进骨髓间充质干细胞向损伤组织迁移^[11]。IL-1 β 也能促进 TNF- α 、IL-6 的生成。IL-6 可由多种细胞分泌,具有促进干细胞分化,刺激造血干细胞生长的功能,促进干细胞向受损的组织迁移,归巢,并转化为肺组织细胞^[12]。

干细胞具有减轻炎症反应的功能,通过再生修复、免疫调节、抗凋亡抗氧化等^[13]。研究表明,TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎性因子在肺损伤中明显增高,可通过增加肺泡毛细血管的通透性而增加肺组织含水量^[14]。而移植的骨髓间充质干细胞可以向受损的组织聚集分布,抑制 TNF- α 、IL-1 β 等细胞因子的释放,减轻炎症反应修复肺组织,治疗重症急性胰腺炎肺损伤大鼠^[15]。此前有研究报道研究发现皮下注射 rhG-CSF 进行骨髓干细胞动员能够使急性肺损伤大鼠的 IL-1 β 和 TNF- α 等炎性因子的表达水平下调,进而阻止炎症反应的发生发展,进而促进肺组织损伤的修复。

肺组织湿干比,即肺水含量,被称为水肿的指标来进行评价,而水肿是炎症的典型表现。在本研究结果中,与正常组相比,对照组的肺组织湿干比高于正常组($P<0.05$);动员组肺组织湿干比均低于对照组($P<0.05$)。肺损伤是一种全身炎症反应的表现,当发生病理炎症反应时会激活中性粒细胞的释放,导致促炎因子释放,扩大炎症级联反应,加剧损伤的发生发展。在本研究结果中,与正常组相比,动员组和对照组肺泡灌洗液中中性粒细胞数均高于正常组($P<0.05$),与对照组相比,动员组肺泡灌洗液中中性粒细胞数低于对照组($P<0.05$);肺组织匀浆中对照组和动员组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达水平平均明显高于正常组($P<0.05$),动员组低于对照组($P<0.05$),提示 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 参与了肺损伤的病理过程,并且加剧的损伤的严重程度,而干细胞动员能有效保护肺损伤,具有一定的临床意义。

大鼠体内注入博来霉素可使肺组织受损,进而炎症细胞浸润,TNF- α 、IL 等大量产生,本实验中在注射博来霉素后注射重组人粒细胞刺激因子,结果显示中性粒细胞数减少,肺组织湿干比降低,肺组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平降低,表明干细胞动员可以抑制炎症反应,保护肺功能促使其恢复。干细胞

其对受损组织再生修复的功能这一新的研究越来越受到广大学者的重视,相信不久的将来会有重大突破。

参考文献:

- [1] RC RENNERT, M SORKIN, RK GARG, et al. Stem cell recruitment after injury: lessons for regenerative medicine[J]. Regen Med, 2012, 7(6):833-50.
- [2] HAN D, HU Y, LI L, et al. Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection results in acute lung injury of the infected pigs[J]. Vet Microbiol, 2014, 169(3):135-46.
- [3] REEVES G. Overview of use of G-CSF and GM-CSF in the treatment of acute radiation injury[J]. Health Phys, 2014, 106(6):699-703.
- [4] LIU F B, LIN Q, LIU Z W. A study on the role of apoptotic human umbilical cord mesenchymal stem cells in bleomycin-induced acute lung injury in rat models[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(5):969-82.
- [5] 田艳. miR-21 对肺癌干细胞增殖、侵袭和化疗敏感性的影响[J]. 中南医学科学杂志, 2016, 44(6):643-7.
- [6] 屈顺林, 朱宇凝, 潘文军, 等. 胞红蛋白对巨噬细胞氧化损伤的保护作用[J]. 中南医学科学杂志, 2016, 44(5):486-9.
- [7] XIN T, GRECO V, MYUNG P. Hardwiring stem cell communication through tissue structure[J]. Cell, 2016, 164(6):1212-25.
- [8] USUKI J, MATSUDA K, AZUMA A, et al. Sequential analysis of myofibroblast differentiation and transforming growth factor- β 1/Smad pathway activation in murine pulmonary fibrosis[J]. J Nippon Med Sch, 2012, 79(1):46-59.
- [9] PARK SS, MOISSEIEV E, BAUER G. Advances in bone marrow stem cell therapy for retinal dysfunction[J]. Prog Retin Eye Res, 2016, 56(1):148-65.
- [10] HOOGDUILIN MJ, ROEMELINGVAN RM, ENGELA AU. Mesenchymal stem cells induce an inflammatory response after intravenous infusion[J]. Stem Cells Dev, 2013, 22(21):2825-35.
- [11] HAO Z, TIAN SS, ZHI L, et al. Hip fracture aggravates systemic inflammation and lung injury in aged chronic cigarette smoke exposed rats[J]. J Orthop Res, 2014, 32(1):24-30.
- [12] LEE JW, KRASNODEMBSKAYA A, MCKENNA DH, et al. Therapeutic effects of human mesenchymal stem cells in ex vivo human lungs injured with live bacteria[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 187(7):751-60.
- [13] UCCELLI A, MORETTA L, PISTOIA V. Mesenchymal stem cells in health and disease[J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(9):726-36.
- [14] SONG SY, ZHOU B, YANG SM, et al. Preventive effects of sevoflurane treatment on lung inflammation in rats[J]. Asian Pac J Trop Med, 2013, 6(1):53-6.
- [15] 陈进玲, 陈艳霞, 张志勇. 骨髓间充质干细胞移植治疗重症急性胰腺炎肺损伤[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(45):6774-81.

(本文编辑:秦旭平)