

• 论著 •

骨髓间充质干细胞移植对烟雾吸入性损伤兔早期肺组织的影响

朱峰 郭光华 黄松 陈任生 陈雯 詹剑华

【摘要】 目的 探讨骨髓间充质干细胞(MSCs)移植对烟雾吸入性损伤兔早期肺组织损伤的影响。方法 采用直接贴壁法体外培养兔 MSCs,用流式细胞术鉴定 MSCs。将 48 只兔制备烟雾吸入性损伤模型后按随机数字表法均分成致伤组和 MSCs 组。MSCs 组伤后立即静脉给予含 1×10^7 个/ml MSCs 的磷酸盐缓冲液(PBS)10 ml;致伤组则给予 10 ml PBS。分别于干预后 2、6 和 24 h 活杀 8 只兔,取肺组织行组织病理学观察,同时进行肺损伤评分。结果 流式细胞术检测显示所培养细胞为 MSCs,肺大体标本和光镜下均观察到 MSCs 组肺损伤程度较致伤组明显减轻。虽然 MSCs 组和致伤组伤后 2 h 肺损伤评分(分)比较差异无统计学意义(4.0 ± 0.7 比 $4.5 \pm 0.6, P > 0.05$),但 MSCs 组伤后 6 h 和 24 h 肺损伤评分(分)明显低于致伤组(6 h: 6.1 ± 0.9 比 $8.2 \pm 0.9, 24 h: 4.6 \pm 0.9$ 比 10.4 ± 0.8 , 均 $P < 0.01$)。结论 MSCs 移植能明显减轻烟雾吸入性损伤兔肺组织损伤,改善肺损伤评分。

【关键词】 骨髓间充质干细胞; 烟雾吸入性损伤; 肺损伤; 兔

The effect of bone marrow mesenchymal stem cells engraftment on lung tissue at early stage of smoke inhalation injury in rabbits ZHU Feng*, GUO Guang-hua, HUANG Song, CHEN Ren-sheng, CHEN Wen, ZHAN Jian-hua. * Department of Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China

Corresponding author: ZHU Feng, Email: z8160720@hotmail.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) engraftment on lung tissue at early stage of smoke inhalation injury in rabbits. Methods MSCs were proliferated by the method of whole marrow culture and identified by flow cytometry. Forty-eight rabbits were randomly divided into smoke inhalation group (S group) and MSCs group (M group) after reproduction of rabbit smoke inhalation injury model. 10 ml of phosphate buffer saline (PBS) containing 1×10^7 /ml MSCs was intravenously injected in M group, meanwhile 10 ml PBS was injected intravenously in S group. Eight rabbits were sacrificed at 2, 6 and 24 hours after intervention, and the lung tissue was harvested for morphological and pathological observation, and lung injury score was used to evaluate smoke inhalation injury. Results Cultured cells were confirmed to be MSCs with flow cytometry. Lung injury in rabbits of M group was less serious in morphology and histopathology than that in S group. Though there was no significance in lung injury score between M group and S group at 2 hours after injury (4.0 ± 0.7 vs. $4.5 \pm 0.6, P > 0.05$), the lung injury scores in M group at 6 hours and 24 hours after injury were significantly lower than those in S group (6 hours: 6.1 ± 0.9 vs. $8.2 \pm 0.9, 24 hours: 4.6 \pm 0.9$ vs. 10.4 ± 0.8 , both $P < 0.01$). Conclusion Intravenous engraftment of MSCs could ameliorate lung injury induced by smoke inhalation, and improve lung injury score significantly.

【Key words】 Bone marrow mesenchymal stem cell; Smoke inhalation injury; Lung injury; Rabbit

烟雾吸入性损伤是由烟雾及热力的直接损害以及继发的炎症反应、组织水肿等致使气管、支气管和肺组织结构及功能受到严重损害,这种损伤往往为致命性损伤^[1]。减轻肺组织损伤、加快肺组织修复是改善急性肺损伤(ALI)预后的关键^[2]。骨髓间充质

干细胞(MSCs)是一种具有潜在多向分化能力、抗炎-免疫调节等多种特征的成体干细胞,在创伤修复、组织功能再生与重建、免疫调节与治疗等研究领域有着极广阔的应用前景^[3-5],特别是近期其在 ALI 中的抗炎及组织修复作用也引起了广泛的关注^[6-7]。本实验中拟通过静脉移植 MSCs 至烟雾吸入性损伤兔体内,观察损伤肺组织的变化,为其进一步研究和临床应用提供依据。

1 材料与与方法

1.1 动物与主要试剂:2 kg 4 周龄健康新西兰大耳白兔(用于取骨髓)以及正常成年新西兰大耳白兔均

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.01.005

基金项目:国家科技支撑计划项目(2008BA168B06);国家自然科学基金资助项目(81060155);江西省教育厅青年科学基金项目(GJJ09432);江西省研究生创新专项基金项目(YC08A020)

作者单位:330006 江西,南昌大学第一附属医院重症医学科(朱峰),烧伤科(郭光华、陈雯、詹剑华),病理科(黄松、陈任生)

通信作者:朱峰,Email:z8160720@hotmail.com

由南昌大学动物实验中心提供,动物合格证号:赣动 96021;DMEM-F12 液体培养基、胎牛血清(美国 Hyclone 公司),磷酸盐缓冲液(PBS,美国 Gibco 公司);鼠非特异性 IgG-藻红蛋白(PE)鼠抗兔 CD34-PE、鼠抗兔 CD45-PE、鼠抗兔 CD44-PE、鼠抗兔 CD105-PE 均由美国 Santa Cruz 公司生产。

1.2 兔 MSCs 的分离、培养和鉴定:3%戊巴比妥耳缘静脉注射麻醉动物后,选取双侧胫骨结节和双侧髂后上嵴为穿刺点抽取骨髓约 4 ml,以直接贴壁法,用含 10%胎牛血清的 DMEM-F12 培养液接种到 25 cm² 培养瓶中,接种密度约 1×10⁴ 个/cm²,于 37 ℃、5%CO₂ 及饱和湿度的 CO₂ 培养箱内培养,24 h 后半量换液,以后 3~4 d 换液并观察细胞生长情况。细胞培养 7~8 d 达到 80%融合后按 1:2 比例传代培养至第 3 代备用。观察 MSCs 的形态学,用流式细胞术检测所培养细胞的特异性抗原。

1.3 烟雾吸入性损伤模型的制作及分组:以南昌大学烧伤研究所自制的控烟、控时烟雾吸入性损伤致伤仪造成重度兔烟雾吸入性损伤模型^[8],致伤后动物自由摄食、饮水。48 只制模成功兔按随机数字表法均分成致伤组和 MSCs 组,每组再按 2、6 和 24 h 观察时间点分为亚组,每组 8 只。MSCs 组伤后立即经耳缘静脉注入含有第 3 代 MSCs 1×10⁷ 个/ml 的 PBS 10 ml;致伤组伤后立即经耳缘静脉注入 10 ml PBS 作为对照。

1.4 肺组织损伤观察:分别于各时间点杀兔取双肺,观察形态、色泽、质地、颜色及出血等变化。取右肺下叶组织,用甲醛溶液固定后切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肺组织病理变化。每组随机选取 10 张切片,每张切片在光镜下取 4 个不重叠视野(×400),计算肺损伤评分,取均值。肺损伤评分根据有无透明膜形成、微血栓、肺不张形成以及肺间质水肿、浸润、肺泡渗出及出血等情况分为 0~3 分共 4 级,1 级为 0 分,4 级为 3 分^[9]。

1.5 统计学处理:使用 SPSS 15.0 软件进行统计分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MSCs 形态学观察和流式细胞术鉴定(图 1):光镜下观察 MSCs 呈长梭形,紧密排列,呈局部多个散在分布的细胞集落,均匀分布的 MSCs 簇状增殖灶并排列类似旋涡状。流式细胞仪检测显示,在所鉴定的细胞中,99.39%的细胞表达 CD44,99.79%的细胞表达 CD105,而仅有 0.11%的细胞表达 CD34,

0.70%的细胞表达 CD45,说明培养细胞为 MSCs。

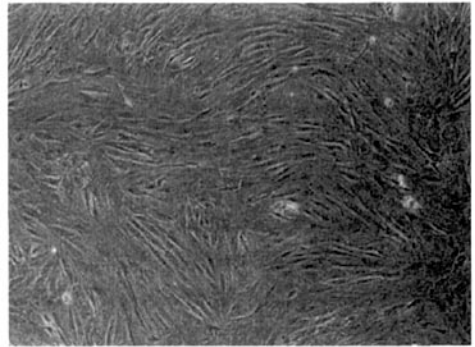


图 1 光镜下观察传代第 3 代兔骨髓间充质干细胞呈长梭形,紧密排列,黏状增殖灶均匀分布并排列类似旋涡状 ×200

2.2 24 h 肺组织大体观察:致伤组肺肿胀明显、苍白、包膜紧张、边缘变钝,双下肺灶状出血点,张力较大,切开肺叶可见淡红褐色泡沫样液体流出。MSCs 组肺脏较致伤组有明显改善,无肿胀,色鲜红,包膜略紧张,双下肺散见点状出血点,张力不大,切开见少量淡红色液体流出。

2.3 肺组织病理观察:HE 染色显示,致伤组 2 h 肺血管明显扩张充血,肺泡隔断裂,肺泡融合,少量中性粒细胞浸润;6 h 支气管上皮细胞脱落至肺泡腔内,血管扩张充血较 2 h 严重,灶状中性粒细胞浸润和灶状出血,肺泡坍塌和肺不张;24 h 肺泡上皮细胞坏死脱落明显,肺泡腔内炎性渗出和出血,大量炎性细胞浸润。与致伤组比较,MSCs 组 2 h 血管扩张充血相对较轻,肺泡隔断裂,肺泡融合较轻,散在中性粒细胞浸润;6 h 支气管腔内少量脱落细胞,炎性细胞浸润明显减轻;24 h 散在脱落细胞,肺泡腔内炎性渗出和出血明显减轻,炎性细胞浸润明显减轻,肺泡结构相对完整。

2.4 肺损伤评分(表 1~2):随着时间的推移,致伤组 6 h 和 24 h 肺损伤评分均较 2 h 明显升高(均 *P*<0.05),而 MSCs 组仅 6 h 升高明显(*P*<0.05)。MSCs 组 6 h 和 24 h 肺损伤评分较致伤组相应时间点显著降低(均 *P*<0.01),但 2 h 比较无明显差异(*P*>0.05)。

表 1 烟雾吸入性损伤兔肺损伤评分标准

得分	透明膜	微血栓	肺泡渗出	肺间质浸润	肺不张	出血
0 分	无	无	无	无	无	无
1 分	稀少	少	轻	轻	小灶	小灶
2 分	中度	一些	中	中	大灶	大灶
3 分	严重	许多	重	重	广泛	广泛

表 2 两组烟雾吸入性损伤兔伤后不同时间点肺损伤评分比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	肺损伤评分(分)		
		2 h	6 h	24 h
致伤组	24	4.5±0.6	8.2±0.9 ^a	10.4±0.8 ^a
MSCs 组	24	4.0±0.7	6.1±0.9 ^{ab}	4.6±0.9 ^b

注:MSCs:骨髓间充质干细胞;与本组 2 h 比较,^a $P<0.05$;与致伤组比较,^b $P<0.01$

3 讨论

促炎/抗炎反应和组织修复过程在 ALI/急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的发生发展过程中起重要作用^[9-10]。多向分化潜能和抗炎-免疫调节效应是 MSCs 治疗 ALI 最重要的特征基础,也是 MSCs 在 ALI 中发挥作用的主要机制^[4,6,11]。通过分化, MSCs 能向肺内主要功能细胞分化,包括肺泡上皮细胞和肺血管内皮细胞等,达到修复肺组织、改善肺损伤的目的^[12-13],但是因为 MSCs 的分化需要相当长的时间(文献报道在 28 d 左右),所以这一机制主要在修复后期发挥作用^[14];通过抗炎-免疫调节作用, MSCs 能升高肺内主要抗炎因子水平,降低主要促炎因子水平,减少血管外肺水,减轻肺损伤,达到修复肺组织损伤的目的^[15-16]。这种炎症因子的作用机制往往在损伤早期(急性期)就能起作用,也是现今 MSCs 治疗 ALI 关注热点之一^[17]。

本研究中通过静脉移植 MSCs,干预后 24 h,动物肺脏以充血为主,表现为炎症反应比较明显而出血等不明显;致伤组肺脏苍白肿胀明显,包膜紧张,下肺出血坏死灶明显。根据肺不张、炎性细胞浸润及肺泡出血、渗出等指标进行的肺损伤评分显示,干预后 2 h 两组肺损伤评分虽无明显差异,但 6 h 和 24 h MSCs 组肺损伤评分较致伤组明显下降,说明肺损伤明显改善。

MSCs 对烟雾吸入性损伤早期肺组织损伤影响的具体机制尚不清楚,我们设想这主要与 MSCs 的抗炎-免疫调节效应直接或间接改善肺组织急性期损伤有关。首先, MSCs 表面表达大量受体分子和分泌某些活性分子能直接或者间接吸附、中和及抑制机体释放的大量炎症因子,降低或者改善炎症反应^[18]。其次, MSCs 通过产生可溶性细胞因子白细胞介素-1 受体拮抗剂(IL-1ra)等和诱导辅助性 T 淋巴细胞 2(TH2)对内毒素的促炎反应和抗炎反应,改变了炎症因子对损伤的反应方式,使 TH1 反应降低,从而能维持 TH2 炎症因子水平^[15]。因此可以下调致伤因子的促炎反应和促炎因子,产生或者上调

抗炎因子。

总之, MSCs 移植对烟雾吸入性损伤早期肺组织的影响结果提示了干细胞治疗吸入性损伤的可行性,为临床烟雾吸入性损伤的治疗开辟了一条新的思路。

参考文献

- [1] 杨宗城. 烧伤治疗学. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 349-368.
- [2] Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*, 2000, 342: 1334-1349.
- [3] Garcia-Castro J, Trigueros C, Madrenas J, et al. Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modelling tool. *J Cell Mol Med*, 2008, 12: 2552-2565.
- [4] 都义日, 付小兵, 李存保. 骨髓间充质干细胞的研究进展. *中国危重病急救医学*, 2004, 16: 499-501.
- [5] 常颖, 齐欣, 卜丽莎, 等. 成人骨髓间充质干细胞体外多向分化潜能特性的研究. *中国危重病急救医学*, 2005, 17: 95-97.
- [6] 朱峰, 王红梅, 郭光华, 等. 骨髓间充质干细胞在急性肺损伤中抗炎作用的研究进展. *中国危重病急救医学*, 2009, 21: 700-702.
- [7] Iyer SS, Co C, Rojas M. Mesenchymal stem cells and inflammatory lung diseases. *Panminerva Med*, 2009, 51: 5-16.
- [8] 朱峰, 郭光华, 王年云, 等. 免烟雾吸入性损伤模型的改进和建立. *广东医学*, 2009, 30: 1800-1802.
- [9] 中华医学会重症医学分会. 急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征诊断和治疗指南(2006). *中国危重病急救医学*, 2006, 18: 706-710.
- [10] 孙中吉, 卢青, 李银平. 急性呼吸窘迫综合征发病中的细胞因子和炎性介质. *中国危重病急救医学*, 2003, 15: 186-189.
- [11] 朱峰, 胡贞贞, 郭光华. 肺外成体干细胞移植治疗急性肺损伤研究进展. *第二军医大学学报*, 2009, 30: 713-716.
- [12] Neuringer IP, Randall SH. Stem cells and repair of lung injuries. *Respir Res*, 2004, 5: 6.
- [13] Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development*, 2001, 128: 5181-5188.
- [14] Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 8407-8411.
- [15] 蔡存良, 文仲光, 周岗, 等. 骨髓间充质干细胞移植对急性肺损伤大鼠血浆 TNF- α 、IL-6 水平的影响. *感染·炎症·修复*, 2006, 7: 98-101.
- [16] 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 Immunol*, 2007, 179: 1855-1863.
- [17] Rojas M, Xu J, Woods CR, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 33: 145-152.
- [18] Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 2001, 105: 369-377.

(收稿日期: 2010-06-23)

(本文编辑: 李银平)

响

作者: 朱峰, 郭光华, 黄松, 陈任生, 陈雯, 詹剑华, ZHU Feng, GUO Guang-hua, HUANG Song, CHEN Ren-sheng, CHEN Wen, ZHAN Jian-hua
作者单位: 朱峰, ZHU Feng(南昌大学第一附属医院重症医学科, 江西, 330006), 郭光华, 陈雯, 詹剑华, GUO Guang-hua, CHEN Wen, ZHAN Jian-hua(南昌大学第一附属医院烧伤科, 江西, 330006), 黄松, 陈任生, HUANG Song, CHEN Ren-sheng(南昌大学第一附属医院病理科, 江西, 330006)
刊名: 中国危重病急救医学 ISTIC PKU
英文刊名: CHINESE CRITICAL CARE MEDICINE
年, 卷(期): 2011, 23(1)

参考文献(18条)

1. 杨宗城. 烧伤治疗学 2006
2. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome 2000
3. García-Castro J, Trigueros C, Madrenas J. Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modelling tool 2008
4. 都义日, 付小兵, 李存保. 骨髓间充质干细胞的研究进展 2004(8)
5. 常颖, 齐欣, 卜丽莎, 徐忠信. 成人骨髓间充质干细胞体外多向分化潜能特性的研究 2005(2)
6. 朱峰, 王红梅, 郭光华, 詹剑华. 骨髓间充质干细胞在急性肺损伤中抗炎作用的研究进展 2009(11)
7. Iyer SS, Co C, Rojas M. Mesenchymal stem cells and inflammatory lung diseases 2009
8. 朱峰, 郭光华, 王年云, 彭燕. 兔烟雾吸入性损伤模型的改进和建立 2009(12)
9. 中华医学会重症医学分会. 急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征诊断和治疗指南(2006) 2006(12)
10. 孙中吉, 卢青, 李银平. 急性呼吸窘迫综合征发病中的细胞因子和炎性介质 2003(3)
11. 朱峰, 胡贞贞, 郭光华. 肺外成体干细胞移植治疗急性肺损伤研究进展 2009(6)
12. Neuringer IP, Randell SH. Stem cells and repair of lung injuries 2004
13. Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium 2001
14. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects 2003
15. 蔡存良, 文仲光, 周岗. 骨髓间充质干细胞移植对急性肺损伤大鼠血浆TNF- α 、IL-6水平的影响 2006
16. Gupta N, Su X, Popov B. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice 2007
17. Rojas M, Xu J, Woods CR. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung 2005
18. Krause DS, Theise ND, Collector MI. Multi-organ, multilineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell 2001

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgwzbjyx201101005.aspx