

• 论著 •

骨髓间充质干细胞对创伤弧菌脓毒症肺损伤的保护作用

陈肖 梁欢 连洁 卢阳 李小林 支绍册 赵光举 洪广亮 邱俏檬 卢中秋

【摘要】 目的 探讨骨髓间充质干细胞(BMSC)对创伤弧菌脓毒症肺损伤的保护作用及机制。**方法** 采用全骨髓贴壁培养法分离小鼠 BMSC。按照随机数字表法将雄性 ICR 小鼠分为生理盐水对照组(NS 组)、生理盐水 + BMSC 对照组(NSB 组)、创伤弧菌脓毒症组(VV 组)、创伤弧菌脓毒症 + BMSC 治疗组(VVB 组),每组 40 只。于小鼠左侧腹腔注射 1×10^7 cfu/mL 创伤弧菌悬液 5 mL/kg 制备脓毒症模型;于制模后经尾静脉注射 4×10^5 cfu/mL BMSC 5 mL/kg 进行干预。各组分别于染菌后 6、12、24、48 h 取 10 只小鼠的肺组织,计算肺湿/干质量(W/D)比值;蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测细胞核内转录因子 κ Bp65(NF- κ Bp65)表达;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测肺组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL-1 β 、IL-6)水平;苏木素-伊红(HE)染色及醋酸铀-枸橼酸铅双染后于镜下观察肺组织病理学改变。**结果** VV 组染毒后各时间点肺 W/D 比值、肺组织细胞核内 NF- κ Bp65 表达量及肺组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达均较 NS 组明显升高,且于 12 h 达峰值;VVB 组肺 W/D 比值、NF- κ Bp65 表达量及 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平均明显低于 VV 组同时点[12 h VV 组比 NS 组:肺 W/D 比值 7.22 ± 0.03 比 5.21 ± 0.02 , NF- κ Bp65 表达量(灰度值) 1.86 ± 0.74 比 0.75 ± 0.07 , TNF- α (ng/L) 433.24 ± 3.23 比 106.57 ± 1.21 , IL-1 β (ng/L) 35.64 ± 0.15 比 10.64 ± 0.48 , IL-6 (ng/L) 58.84 ± 0.55 比 17.69 ± 1.35 , 均 $P < 0.05$; 12 h VVB 组比 VV 组:肺 W/D 比值 6.49 ± 0.06 比 7.22 ± 0.03 , NF- κ Bp65 表达量(A 值) 1.16 ± 0.08 比 1.86 ± 0.74 , TNF- α (ng/L) 357.22 ± 3.25 比 433.24 ± 3.23 , IL-1 β (ng/L) 27.77 ± 0.59 比 35.64 ± 0.15 , IL-6 (ng/L) 38.68 ± 1.29 比 58.84 ± 0.55 , 均 $P < 0.05$]。NS 组和 NSB 组各指标比较差异均无统计学意义。光镜下显示 NS 组和 NSB 组肺组织病理改变不明显;VV 组肺组织充血、水肿,肺泡腔内可见水肿液、红细胞,炎性细胞浸润;VVB 组上述肺组织损害减轻。透射电镜下显示 NS 组和 NSB 组 I 型、II 型肺泡上皮细胞结构完整,未见明显改变;VV 组肺泡壁完整结构破坏, I 型上皮细胞胞质肿胀、鼓泡、破裂, II 型上皮细胞胞质减少呈空泡变、嗜酸性板层小体排空、溶酶体增生、微绒毛减少;VVB 组 I 型、II 型肺泡上皮细胞上述改变明显减轻。**结论** 创伤弧菌脓毒症可引起急性肺损伤和肺水肿;BMSC 能降低炎症因子水平,减轻创伤弧菌脓毒症导致的肺损伤。

【关键词】 创伤弧菌脓毒症; 骨髓间充质干细胞; 急性肺损伤; 核转录因子 κ B; 炎症因子

The protective effect of bone marrow mesenchymal stem cell on lung injury induced by vibrio vulnificus sepsis Chen Xiao, Liang Huan, Lian Jie, Lu Yang, Li Xiaolin, Zhi Shaoce, Zhao Guangju, Hong Guangliang, Qiu Qiaomeng, Lu Zhongqiu. Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

Corresponding author: Lu Zhongqiu, Email: lzq640815@163.com

【Abstract】 Objective To discuss the protective effect of bone marrow mesenchymal stem cell (BMSC) on lung injury induced by vibrio vulnificus sepsis and its mechanism. **Methods** BMSCs were isolated by whole bone marrow adherent culture from mouse. Male ICR mice were randomly divided into normal saline control group (NS group), normal saline + BMSC control group (NSB group), vibrio vulnificus sepsis group (VV group), vibrio vulnificus sepsis + BMSC group (VVB group) according to random number table, with 40 mice in each group. Sepsis mouse model was reproduced by injecting vibrio vulnificus (1×10^7 cfu/mL) 5 mL/kg through the left side peritoneal cavity, and caudal intravenous injection of BMSC (4×10^5 cfu/mL) 5 mL/kg for intervention after model reproduction. Ten mice in each group were sacrificed at 6, 12, 24 or 48 hours after injecting vibrio vulnificus, and their lung tissues were harvested. The lung wet/dry (W/D) ratio was calculated. The expression of nuclear factor- κ Bp65 (NF- κ Bp65) in nucleus was measured by Western Blot. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukins (IL-1 β , IL-6) in lung tissue were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The pathological changes in lung tissue were observed after hematoxylin-eosin (HE) staining and uranyl acetate-lead citrate staining. **Results** After

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.11.011

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y12H150014);浙江省医学创新学科计划(11-CX26);浙江省中医药重点学科计划(2012-XK-A28);浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划项目(2013R413061)

作者单位:325000 浙江,温州医科大学附属第一医院急诊医学中心(陈肖现在泰安市中心医院急诊科工作)

通信作者:卢中秋, Email: lzq640815@163.com

vibrio vulnificus injection, lung W/D ratio, the expression of NF- κ Bp65 in nucleus, and the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 in the lung tissues were significantly increased in VV group compared with those in NS group at all the time points, and peaked at 12 hours. Compared with the VV group, the VVB group had significantly decreased levels of lung W/D ratio, NF- κ Bp65 expression, and the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, with significant differences at all the time points [VV group vs. NS group at 12 hours: lung W/D ratio 7.22 ± 0.03 vs. 5.21 ± 0.02 , NF- κ Bp65 expression (gray scale) 1.86 ± 0.74 vs. 0.75 ± 0.07 , TNF- α (ng/L) 433.24 ± 3.23 vs. 106.57 ± 1.21 , IL-1 β (ng/L) 35.64 ± 0.15 vs. 10.64 ± 0.48 , IL-6 (ng/L) 58.84 ± 0.55 vs. 17.69 ± 1.35 , all $P < 0.05$; VVB group vs. VV group at 12 hours: lung W/D ratio 6.49 ± 0.06 vs. 7.22 ± 0.03 , NF- κ Bp65 expression (A value) 1.16 ± 0.08 vs. 1.86 ± 0.74 , TNF- α (ng/L) 357.22 ± 3.25 vs. 433.24 ± 3.23 , IL-1 β (ng/L) 27.77 ± 0.59 vs. 35.64 ± 0.15 , IL-6 (ng/L) 38.68 ± 1.29 vs. 58.84 ± 0.55 , all $P < 0.05$]. There were no significant differences in above indexes between NS group and NSB group. In the NS and NSB groups pathological changes were not obvious under light microscopy, in the VV group lung tissue hyperemia and edema was significant, the edema fluid, red blood cells and inflammatory cells also could be seen, and in the VVB group lung damage that mentioned above could be alleviated. In the NS and NSB groups epithelial cell structure of type I and type II was completed, and the changes were not obvious under the transmission electron microscopy. In the VV group the alveolar walls were damaged significantly, with type I epithelial cell cytoplasm swelling, bubbling and rupture, with type II epithelial cells visible cytoplasm decrease, cavitation, addition to osmium lamellar corpuscle emptying, lysosome hyperplasia, microvilli reduction, and in the VVB group the above damage was alleviated. **Conclusion** Vibrio vulnificus sepsis can cause acute lung damage and edema, and BMSC can down regulate inflammatory cytokines, reduce lung injury caused by vibrio vulnificus sepsis.

【Key words】 Vibrio vulnificus sepsis; Bone marrow mesenchymal stem cell; Acute lung injury; Nuclear factor- κ B; Inflammatory factor

创伤弧菌为高致死性嗜盐弧菌,感染性较强,由创伤弧菌感染导致的脓毒症起病急骤,发展迅速,多数患者可引起急性肺损伤(ALI)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、脓毒性休克和多器官功能障碍综合征(MODS)^[1-3]。炎症因子在创伤弧菌脓毒症及其肺损伤中起重要作用^[4-5],肺损伤出现较早,是引起创伤弧菌脓毒症死亡的重要原因,目前尚无特效的治疗药物。骨髓间充质干细胞(BMSC)自分离培养以来,已发现其具有抗炎和免疫调节功能^[6-10],被用于多种疾病的治疗。本实验通过建立小鼠创伤弧菌脓毒症模型,观察其肺组织炎症因子表达及病理变化,并探讨 BMSC 的干预作用。

1 材料与方法

1.1 细菌来源:抽取创伤弧菌感染患者上肢脓疱液接种于血平板上,37℃培养 24 h 分离纯化,经鉴定为创伤弧菌(编号:20120917BAA504),由检验科配成创伤弧菌悬液备用,含菌量为 1×10^7 cfu/mL。

1.2 实验动物及试剂:18~22 g 雄性 ICR 小鼠,由温州医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(浙)2010-0044。酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(上海西塘生物技术有限公司),兔抗小鼠核转录因子- κ Bp65(NF- κ Bp65)抗体(美国塞信通公司),兔抗小鼠 CD90、CD34 抗体(英国 Abcom 公司),辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(美国 Minipore 公司),RIPA 裂解液、BCA 蛋白测定试剂盒(碧云天生物技术研究所),化学发光底物液(美国 Advansta 公司),蛋白质分子质量标准(日本 Thermo Scientific 公司)。

1.3 BMSC 的提取、纯化、培养与鉴定:将小鼠脱颈处死,75%乙醇浸泡,取双侧胫骨和股骨浸入含双抗的 DMEM 培养基内;除去肌肉和附着的软组织,剪断股骨和胫骨暴露骨髓腔,用装有 DMEM 的培养基反复冲洗骨髓腔。收集骨髓细胞悬液于无菌 6 孔培养板内,加入 2 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,置 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养;原代接种 48 h 后换液培养;当原代细胞融合到 90% 左右时传代培养。采用 BMSC 特异性抗体 CD90 抗体、CD34 抗体免疫荧光染色对 BMSC 进行鉴定。

1.4 实验分组及处理:将 ICR 小鼠按随机数字表法分为生理盐水对照组(NS组)、生理盐水+BMSC 对照组(NSB组)、创伤弧菌脓毒症组(VV组)、创伤弧菌脓毒症+BMSC 治疗组(VVB组),每组 40 只。于小鼠左侧腹腔注射 1×10^7 cfu/mL 创伤弧菌悬液 5 mL/kg 制备脓毒症模型;NS 组和 NSB 组给予等量生理盐水。NSB 组和 VVB 组分别于腹腔注射生理盐水或创伤弧菌悬液后经尾静脉注射 4×10^5 cfu/mL BMSC 5 mL/kg 进行干预。

1.5 检测指标及方法:各组分别于染菌后 6、12、24、48 h 活杀 10 只小鼠,取肺组织,左肺上叶用于病理观察;靠近肺尖处取米粒大小肺组织,用于电镜观察;取右肺上叶称干、湿质量;其余肺组织置液氮速冻后于 -80℃ 冰箱保存备用。

1.5.1 肺湿/干质量(W/D)比值:取右肺上叶称湿质量,在烤箱里 60℃ 烘干 72 h 后称干质量,计算肺 W/D 比值。

1.5.2 肺组织病理观察

1.5.2.1 光镜下观察:取左肺上叶,以 4% 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋、切片,苏木素-伊红 (HE) 染色,光镜下观察肺组织病理改变。

1.5.2.2 透射电镜下观察:取肺尖部组织切成小块,2.5% 戊二醛及锇酸固定;磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗,梯度乙醇、90% 丙酮、100% 丙酮顺序脱水后包埋,超薄切片;醋酸铀-枸橼酸铅双染后透射电镜下观察并拍照。

1.5.3 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测肺组织细胞核内 NF- κ Bp65 蛋白表达:提取肺组织核蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。上样量 50 μ g,配制 10% 分离胶和 3% 浓缩胶进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),转膜,封闭 1.5 h,加兔抗小鼠 NF- κ Bp65 抗体 (1:500) 和兔抗小鼠组蛋白 H 核内参抗体 HistoneH₂A (1:400),4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜 (16 h),然后进行洗膜,用辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体 (1:5 000) 室温下孵育 1 h 后,再进行洗膜、曝光。用凝胶定量分析软件进行灰度值分析,以 NF- κ Bp65/HistoneH₂A 的灰度值比值作为表达量。

1.5.4 ELISA 检测肺组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素 (IL-1 β 、IL-6) 的蛋白表达:按 ELISA 试剂盒说明书步骤操作,用酶标仪在波长 450 nm 处测定吸光度 (A) 值。根据标准品浓度与 A 值绘制标准曲线,再根据样品 A 值计算样品浓度。

1.6 统计学处理:采用 SPSS 17.0 软件分析数据,数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,对各组数据先进行正态检验和方差齐性分析,若符合正态分布、方差齐,则进行单因素方差分析,组间比较用 LSD 检验;若方差不齐,则进行秩和检验,组间比较用 Dunnett T3 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体外培养 BMSC 的形态学观察和鉴定:原代接种 BMSC 48 h 首次换液后,悬浮细胞大部分被去除,光镜下可见成簇分布的贴壁细胞,圆形细胞变形伸出伪足,细胞呈现圆形、长梭形、多角形等不规则形态,细胞体积小,可见清晰核仁,偶可见颗粒样物质。随着培养时间的延长,细胞集落不断扩增,集落内细胞不断增加,细胞逐渐呈脊梁状、漩涡状生长,细胞突起不断增长、变粗。接种第 7 天,细胞即达到 90% 以上融合,可对细胞进行传代。原代细胞传代 8 h 后消化细胞在新瓶中贴壁,24 h 后细胞逐渐伸展为梭形、多角形,细胞体增大,均匀散在分布。连续传代后,细胞逐渐形态均一、排列有序,可见成纤维细胞

样、宽大扁平细胞 (图 1)。免疫荧光检测结果显示:BMSC 表达 CD90 抗体阳性 (图 2a),而表达 CD34 抗体阴性 (图 2b)。提示分离培养细胞为 BMSC。

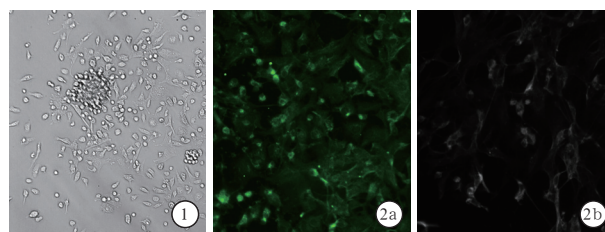


图 1 光镜下观察体外培养骨髓间充质干细胞 (BMSC) 传代后,细胞形态均一排列有序,可见成纤维细胞样、宽大扁平细胞形态学特征 中倍放大 图 2 荧光显微镜下观察体外培养骨髓间充质干细胞 (BMSC) 传代后表达 CD90 抗体阳性 (a),而表达 CD34 抗体阴性 (b) 免疫荧光染色 中倍放大

2.2 小鼠行为观察:VV 组小鼠染菌 30 min 后出现烦躁不安、明显竖毛表现;6 h 时活动减少、精神萎靡、食欲不振、饮水减少、毛发湿润;12 h 时上述症状进一步加重,推之不动。与 VV 组同时时间点相比,VVB 组小鼠上述症状明显减轻。

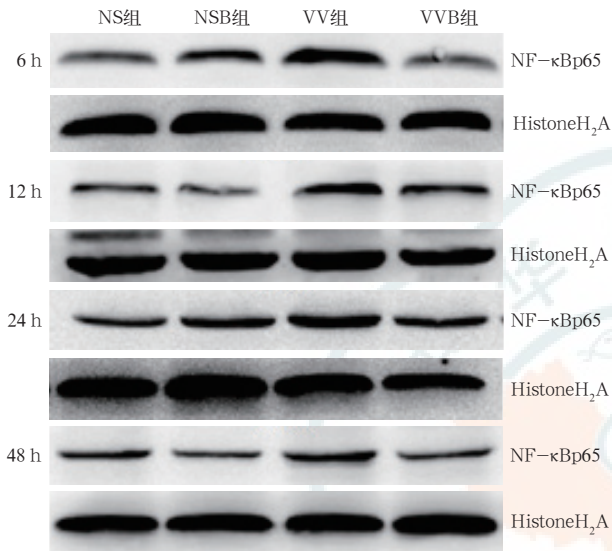
2.3 肺 W/D 比值 (表 1):与 NS 组同时时间点相比,NSB 组肺 W/D 比值均无差异;VV 组染菌后 6 h 肺 W/D 比值明显升高,12 h 达高峰,之后有所下降,各时间点肺 W/D 比值均明显高于 NS 组 (均 $P < 0.05$)。与 VV 组同时时间点相比,VVB 组肺 W/D 比值均明显下降 (均 $P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠染菌后不同时间点肺 W/D 比值、肺组织细胞核内 NF- κ Bp65 蛋白表达变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间点	动物数 (只)	肺 W/D 比值	NF- κ Bp65 蛋白表达 (灰度值)
NS 组	6 h 点	10	5.19 $\pm$ 0.06	0.68 $\pm$ 0.08
	12 h 点	10	5.21 $\pm$ 0.02	0.75 $\pm$ 0.07
	24 h 点	10	5.19 $\pm$ 0.05	0.73 $\pm$ 0.09
	48 h 点	10	5.20 $\pm$ 0.01	0.76 $\pm$ 0.11
NSB 组	6 h 点	10	5.28 $\pm$ 0.04	0.68 $\pm$ 0.07
	12 h 点	10	5.30 $\pm$ 0.05	0.70 $\pm$ 0.04
	24 h 点	10	5.21 $\pm$ 0.04	0.73 $\pm$ 0.07
	48 h 点	10	5.20 $\pm$ 0.08	0.72 $\pm$ 0.10
VV 组	6 h 点	10	6.88 $\pm$ 0.05 ^a	1.61 $\pm$ 0.06 ^a
	12 h 点	10	7.22 $\pm$ 0.03 ^a	1.86 $\pm$ 0.74 ^a
	24 h 点	10	7.06 $\pm$ 0.02 ^a	1.61 $\pm$ 0.06 ^a
	48 h 点	10	7.06 $\pm$ 0.02 ^a	1.54 $\pm$ 0.04 ^a
VVB 组	6 h 点	10	6.33 $\pm$ 0.02 ^b	1.11 $\pm$ 0.03 ^b
	12 h 点	10	6.49 $\pm$ 0.06 ^b	1.16 $\pm$ 0.08 ^b
	24 h 点	10	6.39 $\pm$ 0.02 ^b	1.14 $\pm$ 0.06 ^a
	48 h 点	10	6.35 $\pm$ 0.03 ^b	1.20 $\pm$ 0.08 ^b

注: NS 组为生理盐水对照组, NSB 组为生理盐水 + 骨髓间充质干细胞 (BMSC) 对照组, VV 组为创伤弧菌脓毒症组, VVB 组为创伤弧菌脓毒症 + BMSC 治疗组; 肺 W/D 比值为肺湿/干质量比值, NF- κ Bp65 为核转录因子- κ Bp65; 与 NS 组同期比较, ^a $P < 0.05$; 与 VV 组同期比较, ^b $P < 0.05$

2.4 肺组织细胞核内 NF-κBp65 蛋白表达 (表 1 ; 图 3) : NSB 组肺组织细胞核内 NF-κBp65 蛋白表达较 NS 组同时间点差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 而 VV 组 NF-κBp65 蛋白表达则均明显升高 (均 $P < 0.05$)。与 VV 组同时间点相比, VVB 组肺组织细胞核内 NF-κBp65 蛋白表达明显降低 (均 $P < 0.05$)。



Western Blot 为蛋白质免疫印迹试验, NF-κBp65 为核转录因子-κBp65, Histone H₂A 为组蛋白 H 核内参抗体; NS 组为生理盐水对照组, NSB 组为生理盐水 + 骨髓间充质干细胞 (BMSC) 对照组, VV 组为创伤弧菌脓毒症组, VVB 组为创伤弧菌脓毒症 + BMSC 治疗组

图 3 Western Blot 检测各组小鼠染毒后不同时间点肺组织细胞核内 NF-κBp65 蛋白表达

2.5 肺组织 TNF-α、IL-1β、IL-6 蛋白表达 (表 2) : 与 NS 组同时间点相比, NSB 组各时间点肺组织 TNF-α、IL-1β、IL-6 蛋白表达均无明显变化 (均 $P > 0.05$), 而 VV 组各指标蛋白表达均明显升高 (均 $P < 0.05$)。与 VV 组同时间点相比, VVB 组各时间点肺组织 TNF-α、IL-1β、IL-6 蛋白表达均明显降低 (均 $P < 0.05$)。

表 2 各组小鼠染菌后不同时间点肺组织炎症因子表达变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间 点	动物数 (只)	TNF-α (ng/L)	IL-1β (ng/L)	IL-6 (ng/L)
NS 组	6 h 点	10	107.71 ± 1.37	10.64 ± 0.14	16.86 ± 1.69
	12 h 点	10	106.57 ± 1.21	10.64 ± 0.48	17.69 ± 1.35
	24 h 点	10	107.15 ± 0.85	10.60 ± 0.09	16.78 ± 0.96
	48 h 点	10	106.94 ± 0.70	10.43 ± 0.28	15.84 ± 0.76
NSB 组	6 h 点	10	107.01 ± 1.53	10.73 ± 0.01	17.14 ± 0.99
	12 h 点	10	108.33 ± 1.36	10.90 ± 0.15	17.96 ± 0.88
	24 h 点	10	107.82 ± 0.35	10.81 ± 0.28	16.62 ± 1.73
	48 h 点	10	107.04 ± 0.80	10.89 ± 0.10	16.35 ± 0.78
VV 组	6 h 点	10	416.66 ± 0.42 ^a	31.27 ± 0.44 ^a	55.56 ± 0.63 ^a
	12 h 点	10	433.24 ± 3.23 ^a	35.64 ± 0.15 ^a	58.84 ± 0.55 ^a
	24 h 点	10	422.77 ± 2.63 ^a	34.93 ± 0.83 ^a	55.94 ± 0.33 ^a
	48 h 点	10	421.30 ± 3.79 ^a	32.47 ± 0.21 ^a	55.39 ± 0.74 ^a
VVB 组	6 h 点	10	345.40 ± 2.55 ^b	25.81 ± 0.50 ^b	36.06 ± 0.66 ^b
	12 h 点	10	357.22 ± 3.25 ^b	27.77 ± 0.59 ^b	38.68 ± 1.29 ^b
	24 h 点	10	344.51 ± 1.77 ^b	27.76 ± 0.16 ^b	36.95 ± 0.79 ^b
	48 h 点	10	341.55 ± 2.77 ^b	25.85 ± 0.15 ^b	37.03 ± 0.38 ^b

注: NS 组为生理盐水对照组, NSB 组为生理盐水 + 骨髓间充质干细胞 (BMSC) 对照组, VV 组为创伤弧菌脓毒症组, VVB 组为创伤弧菌脓毒症 + BMSC 治疗组; TNF-α 为肿瘤坏死因子-α, IL-1β、IL-6 为白细胞介素-1β、-6; 与 NS 组同期比较, ^a $P < 0.05$; 与 VV 组同期比较, ^b $P < 0.05$

2.6 肺组织病理变化

2.6.1 光镜下观察 (图 4) : NS 组和 NSB 组肺组织结构清楚, 肺泡壁结构完整, 未见明显充血、水肿, 肺泡腔内未见明显的水肿液、红细胞和炎性细胞。VV 组肺间质水肿伴有炎性细胞浸润, 肺泡壁及肺间隔断裂, 肺泡腔内可见水肿液及红细胞渗出, 12 h 时损伤最为严重。VVB 组肺间质及肺泡间隔充血、水肿较 VV 组明显减轻, 仍可见完整的肺泡腔, 腔内可见少量水肿液及红细胞。

2.6.2 透射电镜下观察 (图 5) : NS 组及 NSB 组肺泡壁完整, I 型、II 型上皮细胞结构完整, 未见明显改变, 肺泡上皮细胞之间紧密连接均保持完好。VV

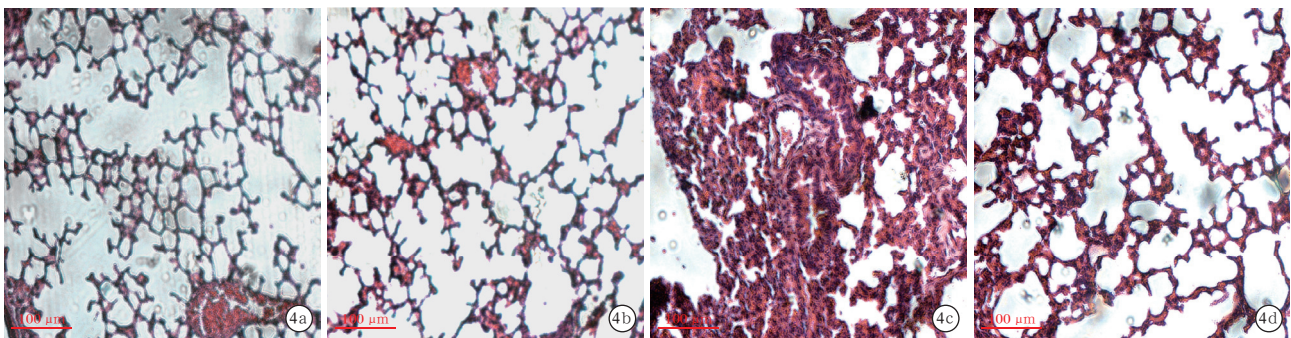


图 4 光镜下观察各组小鼠肺组织病理改变 生理盐水对照组 (a) 和生理盐水 + 骨髓间充质干细胞 (BMSC) 对照组 (b) 肺组织结构完整, 未见充血、水肿, 肺泡腔内未见水肿液、红细胞和炎性细胞; 创伤弧菌脓毒症组 (c) 肺间质水肿伴炎性细胞浸润, 肺泡壁及肺间隔断裂, 肺泡腔内可见水肿液及红细胞渗出; 创伤弧菌脓毒症 + BMSC 治疗组 (d) 上述肺组织改变明显减轻 HE 低倍放大

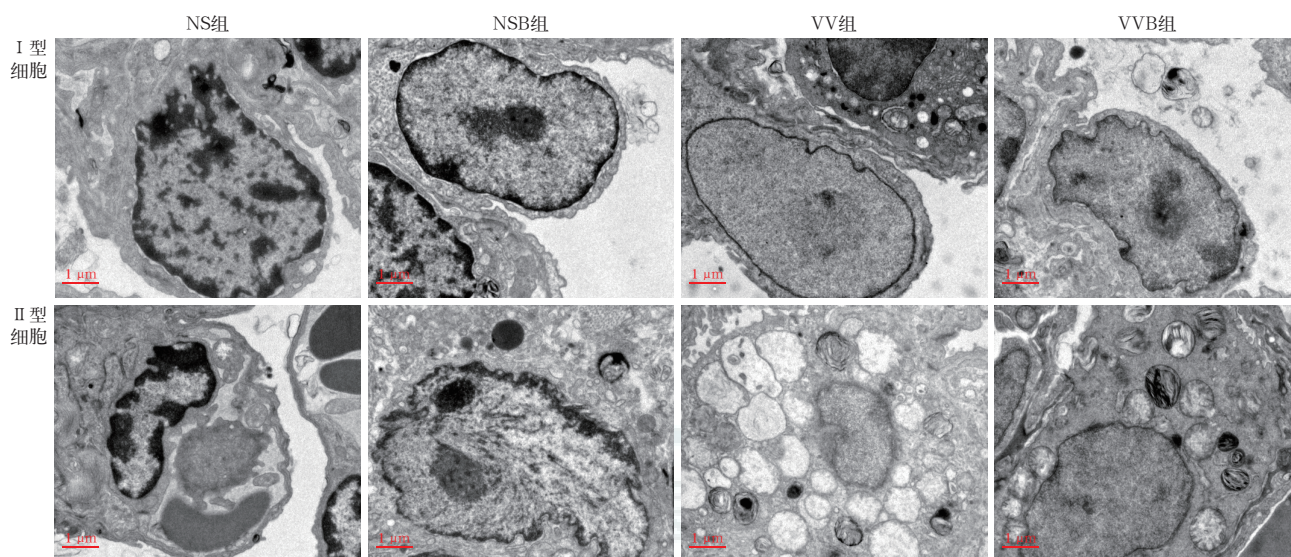


图5 透射电镜下观察各组小鼠肺组织超微结构改变 生理盐水对照组(NS组)和生理盐水+骨髓间充质干细胞(BMSC)对照组(NSB组)肺泡壁完整,I型、II型上皮细胞结构完整,未见明显改变;创伤弧菌脓毒症组(VV组)肺泡壁结构破坏,I型上皮细胞胞质肿胀、鼓泡、破裂,甚至可见核染色质凝固结块、碎裂,细胞碎裂脱落,基底膜暴露,II型上皮细胞可见胞质减少呈空泡变、嗜碱性板层小体排空、溶酶体增生、微绒毛减少等;创伤弧菌脓毒症+BMSC治疗组(VVB组)I型上皮细胞胞质肿胀减轻,II型上皮细胞板层小体排空现象减少 醋酸铀-枸橼酸铅双染 $\times 10\,000$

组肺泡壁完整结构被破坏,I型上皮细胞胞质肿胀、鼓泡、破裂,甚至可以见到核染色质凝固结块、碎裂,细胞碎裂脱落,基底膜暴露;II型上皮细胞中可见胞质减少呈空泡变、嗜碱性板层小体排空、溶酶体增生、微绒毛减少等现象。VVB组肺泡壁和细胞上述改变减轻,I型上皮细胞胞质肿胀减轻,II型上皮细胞板层小体排空现象减少。

3 讨论

创伤弧菌脓毒症是由创伤弧菌感染引起的全身炎症反应综合征(SIRS),进一步发展可致MODS和脓毒性休克,严重者可引起多器官功能衰竭(MOF),其中常表现为ALI,进展到ARDS则病死率极高。研究证实,患者血清TNF- α 和IL-6水平与MOF的发生密切相关^[11]。本课题组前期大量研究证实,创伤弧菌进入机体后会引发一系列的损伤炎症反应,导致ALI/ARDS,炎症反应过程中激活中性粒细胞、淋巴细胞及单核/巨噬细胞系统,释放炎症介质,NF- κ B作为参与炎症反应的核内信号分子,TNF- α 、IL-1 β 、IL-6作为早期炎症反应因子,可以激活中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞等,使其释放氧自由基、蛋白酶等,引起炎症反应级联放大;此外,创伤弧菌脓毒症时诱导型一氧化氮合酶(iNOS)被激活,一氧化氮(NO)大量释放入血,Toll样受体4水平升高等,最终引起肺组织损伤^[4,12-15]。

提高对创伤弧菌脓毒症的早期诊断非常重要,尤其是寻找敏感的生物标志物。近年来有学者对

脓毒症生物标志物的联合早期诊断进行了诸多研究,包括降钙素原(PCT)、IL-6和D-二聚体3种生物标志物联合检测^[16];PCT、C-反应蛋白(CRP)和内毒素联合检测^[17];血清PCT和髓系细胞触发受体-1(TREM-1)联合检测^[18];血浆心房钠利尿肽(ANP)浓度检测^[19]等,都对脓毒症的早期诊断具有良好的临床价值。同时,急诊脓毒症死亡风险评分(MEDS)联合血乳酸对脓毒症的危险分层^[20];感染患者凝血功能障碍与脓毒症严重程度的关系及在感染性休克中的变化^[21-22];血清肝素结合蛋白(HBP)升高、外周血血小板-白细胞聚集体(PLA)升高、血清脂联素下降、淋巴细胞水平的变化等在脓毒症诊断中的作用均被发现并用于临床^[23-27],并且血小板参数对脓毒症的危险分级及预后评价^[22]具有重要的意义。

目前在创伤弧菌脓毒症的治疗中多选择敏感抗菌药物进行治疗^[1,5,12],并遵循早期、联合、足量的原则;同时密切监测病情变化,给予对症支持及中药血必净治疗^[13-15];合并ALI患者早期给予无创正压通气或呼吸机辅助治疗。BMSC具有自我更新和分化成多种细胞的能力,可以分泌大量的生长因子和细胞因子,在组织和细胞的修复过程中发挥作用^[28]。研究证实,BMSC对ALI具有修复作用,在各类肺损伤模型中,给予BMSC干预可抑制NO代谢,降低NF- κ B、TNF- α 、IL-6等炎症因子水平,减轻炎症反应,并可在炎症部位分化为内皮细胞和上皮细胞,减轻肺组

织损伤和肺纤维化的程度,改善肺通气^[7,9,29-32]。

本研究证实,小鼠感染创伤弧菌后肺组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及细胞核内 NF- κ Bp65 蛋白表达水平均明显升高,经 BMSC 干预后则明显降低,且病理学观察发现肺组织中性粒细胞浸润减少,肺部充血、水肿减少,Ⅰ型、Ⅱ型肺泡上皮细胞损伤减轻,提示 BMSC 可以降低炎症因子水平,对创伤弧菌脓毒症引起的肺损伤具有治疗作用。有研究证实 BMSC 可以分泌转化生长因子- α (TGF- α),在肠道缺血/再灌注引起的间接性肺损伤模型中,内源性的 TGF- α 表达增加有利于缺血后肺损伤的自我修复^[33]。TGF- α 主要通过 Smad 起作用,因此可进一步研究 TGF- α / Smad 通路在 BMSC 保护肺组织损伤中的作用。

综上所述,BMSC 可降低 NF- κ Bp65 和 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎症因子水平,减轻创伤弧菌脓毒症诱导的 ALI,说明 BMSC 对创伤弧菌诱导的 ALI 具有一定的治疗价值,为进一步临床应用提供了可靠依据,但尚需进一步明确其具体的保护机制。

参考文献

- [1] 卢中秋,洪广亮. 创伤弧菌脓毒症诊治进展[J]. 临床外科杂志,2011,19(3): 159-163.
- [2] Lu Z, Li M, Liang H, et al. Dynamic expressions of liver tissue apoptosis-related genes of *Vibrio vulnificus* sepsis rats and the effects of antibacterial agents [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2009, 29(2): 193-197.
- [3] 卢中秋,李景荣. 创伤弧菌脓毒症研究进展[J]. 中国危重病急救医学,2005,17(7): 439-441.
- [4] 卢中秋,邱俏檬,李海燕,等. 创伤弧菌脓毒症病理组织学及血清细胞因子动态变化研究[J]. 浙江医学,2007,29(1): 23-25.
- [5] 李海燕,梁欢,卢中秋,等. 抗菌药物对创伤弧菌脓毒症大鼠血清抗炎/促炎细胞因子的影响[J]. 中国危重病急救医学,2007,19(1): 53-54.
- [6] Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E₂-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production [J]. Nat Med, 2009, 15(1): 42-49.
- [7] 胡占升. 稳定表达血管生成素 1 的骨髓间充质干细胞对内毒素诱导急性肺损伤干预作用的研究进展[J]. 中国危重病急救医学,2008,20(10): 627-629.
- [8] 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[J]. 中国危重病急救医学,2009,21(11): 700-702.
- [9] 朱峰,郭光华,黄松,等. 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[J]. 中国危重病急救医学,2011,23(1): 18-20.
- [10] 陈雯,朱峰,郭光华,等. 骨髓间充质干细胞对烟雾吸入性损伤兔早期炎症因子分泌的影响[J]. 中国危重病急救医学,2011,23(1): 21-23.
- [11] Steinberg J, Halter J, Schiller H, et al. Chemically modified tetracycline prevents the development of septic shock and acute respiratory distress syndrome in a clinically applicable porcine model [J]. Shock, 2005, 24(4): 348-356.
- [12] 卢中秋,梁欢,李萌芳,等. 创伤弧菌脓毒症大鼠肝组织核转录因子- κ B 活性表达及抗菌药物的影响[J]. 中国急救医学,2007,27(12): 1090-1093.
- [13] 李忠旺,邱俏檬,孙琦,等. 血必净注射液对创伤弧菌脓毒症大鼠肺组织 Toll 样受体 4 及核转录因子- κ B 表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志,2010,17(1): 24-27.
- [14] 陈玉熹,卢中秋,邱俏檬,等. 创伤弧菌脓毒症大鼠肺组织 NF- κ B 和 IL-18 的基因表达以及药物的干预效应[J]. 中华医院感染学杂志,2010,20(3): 320-323.
- [15] 赵光举,李忠旺,孙琦,等. 血必净注射液对创伤弧菌脓毒症大鼠肺组织诱导型一氧化氮合酶及一氧化氮的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志,2010,17(2): 99-101.
- [16] 赵永祯,李春盛. 生物标志物组合对急诊脓毒症和重度脓毒症患者的诊断价值[J]. 中华危重病急救医学,2014,26(3): 153-158.
- [17] 陈炜,赵磊,牛素平,等. 不同炎症因子对细菌性血流感染所致脓毒症患者的早期诊断价值[J]. 中华危重病急救医学,2014,26(3): 165-170.
- [18] 李英,邓超,计超,等. 髓系细胞触发受体-1 在低水平降钙素原脓毒症患者的诊断意义[J]. 中国急救医学,2014,34(2): 132-134.
- [19] 刘玥,李青,李津津,等. 心房钠利尿肽对脓毒症的早期诊断作用[J]. 中华危重病急救医学,2013,25(11): 669-672.
- [20] 谈定玉,夏仲芳,郑爱东,等. 急诊脓毒症死亡风险评估联合血乳酸对急诊严重脓症患者危险分层的价值研究[J]. 中华危重病急救医学,2014,26(3): 159-164.
- [21] 胡健,尚为民,段艳青,等. 急诊感染患者凝血障碍与脓毒症严重程度的关系研究[J]. 中华医院感染学杂志,2013,23(17): 4102-4103,4114.
- [22] 高艳霞,李莉,李毅,等. 血小板参数在感染性休克患者中的变化[J]. 中华危重病急救医学,2014,26(1): 28-32.
- [23] 刘杨,马少林,王学斌. 血清肝素结合蛋白在脓毒症休克中的预测作用[J]. 中华急诊医学杂志,2014,23(1): 79-83.
- [24] 贾安奎,刘彦轩,张国林,等. 脓症患者外周血小板-白细胞聚集水平变化的意义[J]. 中国急救医学,2014,34(4): 289-291.
- [25] 王永芹,李治国. 血清脂联素、TNF- α 、CRP 在脓症患者中的临床应用价值分析[J]. 中国免疫学杂志,2014,30(4): 528-530.
- [26] 刘慧琳,刘桂花,田兆兴. 脓症患者血中淋巴细胞水平的变化[J]. 中华危重病急救医学,2014,26(3): 148-152.
- [27] 张红金,刘娇,吴相伟,等. 大黄对烫伤后脓毒症大鼠糖皮质激素受体表达和外周血淋巴细胞的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志,2014,21(3): 186-189.
- [28] McFarlin K, Gao X, Liu YB, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat [J]. Wound Repair Regen, 2006, 14(4): 471-478.
- [29] Lee SH, Jang AS, Kim YE, et al. Modulation of cytokine and nitric oxide by mesenchymal stem cell transfer in lung injury/fibrosis [J]. Respir Res, 2010, 11: 16.
- [30] Mei SH, McCarter SD, Deng Y, et al. Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by mesenchymal stem cells overexpressing angiopoietin 1 [J]. PLoS Med, 2007, 4(9): e269.
- [31] Xu J, Woods CR, Mora AL, et al. Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 293(1): L131-141.
- [32] Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli [J]. Blood, 2002, 99(10): 3838-3843.
- [33] Teekakirikul P, Milewicz DM, Miller DT, et al. Thoracic aortic disease in two patients with juvenile polyposis syndrome and SMAD4 mutations [J]. Am J Med Genet A, 2013, 161A(1): 185-191.

(收稿日期: 2014-06-16)

(本文编辑:李银平)