

DOI:10.13820/j.cnki.gdyx.2018.s1.005

两种间充质干细胞对肺纤维化治疗作用的比较

邓罔睿¹, 左万里², 黄积雄¹, 赵洁敏¹, 周伟³, 雷泽洪⁴, 黄炎明¹, 钟慧霖⁵中山大学附属江门医院、江门市中心医院¹呼吸科,³病理科,⁴检验科(广东江门 529030);²暨南大学附属江门中医院、江门市五邑中医院呼吸科(广东江门 529000);⁵广州熙帝生物科技有限公司(广东广州 510520)

【摘要】 目的 比较骨髓间充质干细胞(BM-MSCs)与脐血间充质干细胞(UCB-MSCs)对肺纤维化大鼠的疗效。方法 48 只雄性 SD 大鼠随机分为 4 组:A 组于气管内注入 0.1 mL 生理盐水;B、C、D 组于气管内注入 0.1 mL 5 mg/kg 的博来霉素制作肺纤维化模型。建模后 1 d ,A、B 组经尾静脉注射生理盐水 1.0 mL ,C 组经尾静脉注射 BM-MSCs 1×10^6 个 ,D 组经尾静脉注射 UCB-MSCs 1×10^6 个。建模后 28 d 及 42 d 处死各组大鼠的一半,分别留取肺组织进行病理学检查,并测定肺组织转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、羟脯氨酸(HYP)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1)表达水平。结果 B 组可见肺泡结构严重紊乱,大量胶原纤维沉积,B、C、D、A 组肺纤维化评分依次降低[28 d 时为(3.00 $\pm$ 0.00)分、(2.17 $\pm$ 0.75)分、(1.60 $\pm$ 0.89)分、(0.00 $\pm$ 0.00)分,42 d 时为(3.00 $\pm$ 0.00)分、(2.40 $\pm$ 0.55)分、(1.75 $\pm$ 0.96)分、(0.00 $\pm$ 0.00)分],肺组织 TGF- $\beta 1$ 、HYP、MMP-2/TIMP-1 水平依次下降。肺组织 TGF- $\beta 1$ 、HYP、MMP-2/TIMP-1 分别与肺泡炎程度评分、肺纤维化程度评分存在正相关。结论 BM-MSCs 与 UCB-MSCs 均可延缓大鼠肺纤维化进展,其中 UCB-MSCs 疗效更好,其治疗机制可能与下调 TGF- $\beta 1$ 水平、改善 MMP/TIMP 失衡有关。

【关键词】 肺纤维化;博来霉素;骨髓间充质干细胞;脐血间充质干细胞

肺纤维化(pulmonary fibrosis)是多种不同病因引起的间质性肺疾病的终末期病变,除长期氧疗和肺移植,尚无较好的治疗手段。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种具备多向分化潜能、趋化特性、免疫调节作用及旁分泌功能的多能干细胞。研究表明, MSCs 对包括肺纤维化在内的众多呼吸系统疾病具有一定的治疗作用。2015 年 9 月至 2016 年 9 月,我们选用博来霉素诱导的肺纤维化大鼠作为动物模型,分别采用大鼠骨髓间充质干细胞(BM-MSCs)和脐血间充质干细胞(UCB-MSCs)对博来霉素诱导肺纤维化大鼠进行干预,观察比较两种细胞对大鼠肺纤维化的治疗作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料 广东省医学实验动物中心提供雄性 SPF 级 SD 大鼠 50 只,2 只用于分离 BM-MSCs,其余 48 只随机分为 4 组,每组 12 只,分别为正常对照组(A 组)、模型对照组(B 组)、BM-MSCs 移植组(C 组)、UCB-MSCs 移植组(D 组),体重(200 $\pm$ 4)g,各组间体重差异无统计学意义($P > 0.05$)。脐血及慢病毒包装试剂盒由广州熙帝生物科技有限公司提供。

1.2 BM-MSCs 的分离培养 断颈处死大鼠,无菌

条件下取后腿股骨,去除肌肉,从中间折断;用注射器吸取培养基吹入骨髓,冲出骨髓,离心 200 $\times g$, 5 min;加培养基重悬后接种于 10 cm 培养皿。每 2~3 d 换液 1 次,细胞长至 90% 左右融合后传代。

1.3 BM-MSCs 体外标记 构建慢病毒包装载体 Fuw-EGFP,使用慢病毒包装试剂盒在 293T 细胞中包装慢病毒,感染 P2 代骨髓间充质干细胞,感染后及传至第 5 代后于荧光倒置显微镜下观察细胞绿色荧光表达情况。

1.4 肺纤维化模型建立 2% 戊巴比妥溶液按 50 mg/kg 体重对大鼠进行腹腔注射麻醉,颈正中切口显露气管,A 组大鼠于气管内注入 0.1 mL 生理盐水,B、C、D 组大鼠分别于气管内注入 0.1 mL 以 5 mg/kg 体重配制的博来霉素生理盐水溶液,注射后立即直立旋转大鼠 2 min,使药物均匀分布于两肺内。缝合皮肤,局部消毒后继续在原饲养环境下饲养。

1.5 细胞注射液的制备及移植 建模后 1 d,消化收集第 5 代荧光标记的 BM-MSCs(并解冻 UCB-MSCs),加生理盐水洗 3 次后添加适量生理盐水制成 10^6 cells/mL 的细胞注射液备用。C 组大鼠经尾静脉注射 BM-MSCs 1×10^6 个,D 组大鼠经尾静脉注射 UCB-MSCs 1×10^6 个,A、B 组大鼠经尾静脉

注射生理盐水 1 mL。

1.6 标本采集 建模后 28 d 及 42 d 分别处死各组大鼠的一半(至少 5 只,分别标记为 A1 ~ D1 组和 A2 ~ D2 组),取左肺用生理盐水冲洗后浸泡于 4% 多聚甲醛缓冲液固定备用。取 1.000 g 右肺,剪碎后加入预冷的 PBS 溶液 9 mL,然后用高速匀浆机以 15 000 r/min 充分匀浆,所得匀浆液 4℃,2 000 r/min 离心 15 min 后收集上清 500 μ L,于 -80℃ 低温冻存。

1.7 检测肺组织中示踪细胞的分布 取新鲜肺组织用 10% 琼脂糖包埋后作振动切片,于荧光倒置显微镜下观察荧光细胞分布情况。

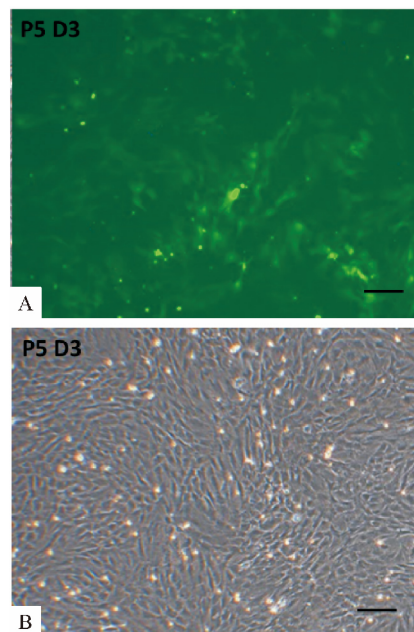
1.8 大鼠肺组织 HE、Masson 染色观察 将固定好的各组大鼠左肺组织常规酒精脱水、石蜡包埋,制作切片,进行 HE、Masson 染色,观察肺间质结构病理改变。根据 Szapiel 等^[1]的方法,对 HE 染色切片评定肺组织肺泡炎程度,对 Masson 染色切片评定肺组织纤维化程度。肺泡炎分 4 级:(1) 无(-);(2) 轻(+):受累范围 < 20%;(3) 中(++):受累范围 20% ~ 50%;(4) 重(+++):受累范围 > 50%。肺纤维化分 4 级:(1) 无(-);(2) 轻(+):受累范围 < 20%;(3) 中(++):受累范围 20% ~ 50%;(4) 重(+++):受累范围 > 50%。等级资料转化为计量资料:(-)为 0 分,(+)为 1 分,(++)为 2 分,(+++为 3 分,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

1.9 测定肺组织转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、羟脯氨酸(HYP)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1)水平 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)双抗体夹心法,同时批量检测各组大鼠肺组织 TGF- β 1、HYP、MMP-2、TIMP-1 水平。

1.10 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计软件,各组均数比较使用单因素方差分析或 Kruskal-Wallis 秩和检验,组间两两比较采用 t 检验,两变量间关系使用 Spearman 秩相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨髓间充质干细胞体外标记 慢病毒感染的 BM-MSCs 稳定表达绿色荧光,传代后仍稳定表达,见图 1。

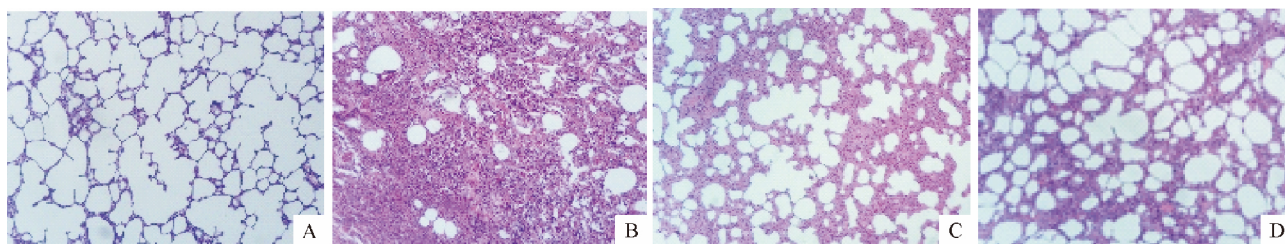


A: 细胞形态符合 MSCs 形态特征,显成纤维细胞样;B: 转入绿色荧光蛋白基因的细胞在荧光倒置显微镜下发出绿色荧光

图 1 移植用细胞形态及绿色荧光表达($\times 100$)

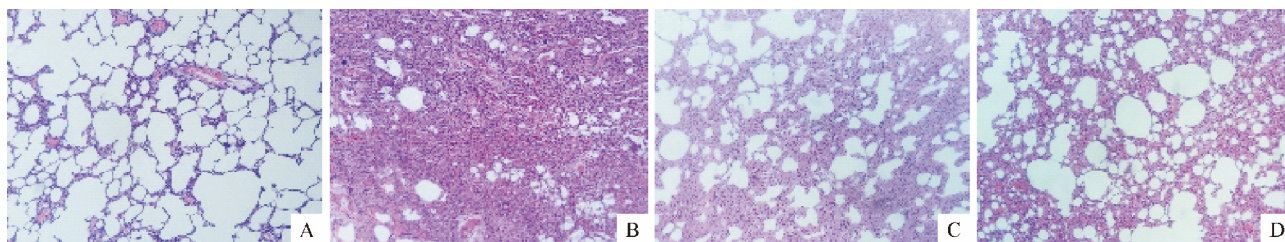
2.2 大鼠一般情况 A 组一般情况良好,无死亡。B、C、D 组在建模及 MSCs 移植后 7 d 内分别死亡 2 只、1 只、3 只,C、D 干细胞移植组大鼠精神、活动、饮食优于同期的 B 组,组间差异不明显。所有大鼠颈前伤口于建模 3 ~ 4 d 后自然愈合,无红肿、化脓。

2.3 大鼠肺组织 HE 染色观察 第 28 天处死半数大鼠,取肺组织进行 HE 染色,结果 A 组肺泡结构正常,未出现明显的炎症或纤维化表现。B 组 HE 染色可见肺泡间隔明显增宽,伴明显水肿,可见出血,大量炎性细胞浸润。C、D 组 HE 染色可见肺泡炎程度减轻。42 d 处死另一半大鼠,取肺组织进行 HE 染色,结果与 28 d 基本一致,C、D 组 HE 染色可见 42 d 各组大鼠肺泡炎程度均较其同组 28 d 略有减轻。见图 2、3。



A: A 组;B: B 组;C: C 组;D: D 组

图 2 各组大鼠第 28 天肺组织 HE 染色($\times 100$)

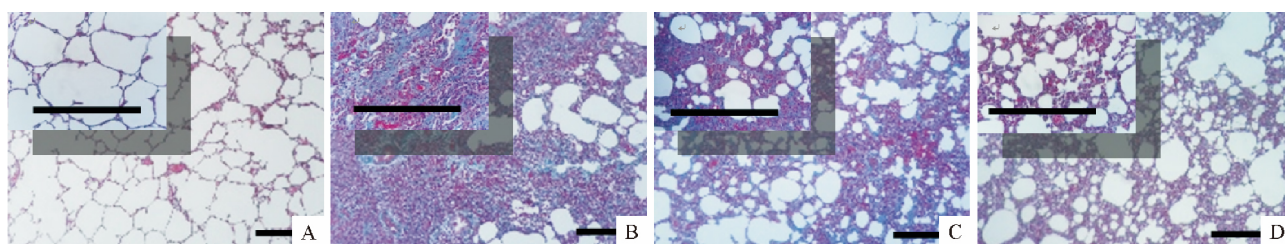


A:A 组;B:B 组;C:C 组;D:D 组

图3 各组大鼠第42天肺组织 HE 染色(×100)

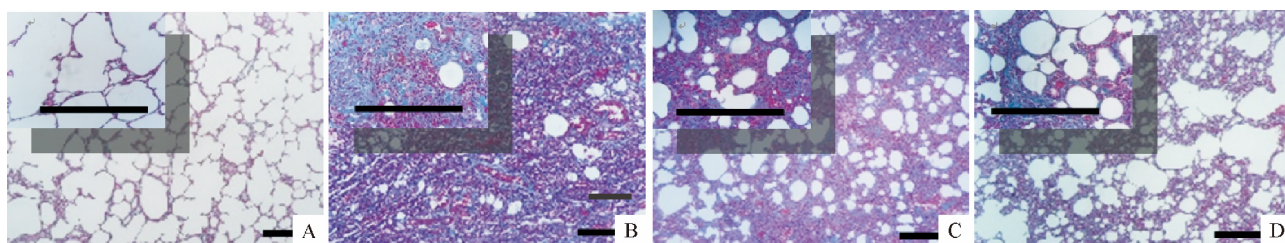
2.4 大鼠肺组织 Masson 染色观察 第 28 天处死半数大鼠,取肺组织进行 Masson 染色,结果 A 组肺泡结构正常,未出现明显的炎症或纤维化表现。B 组 Masson 染色可见肺泡结构严重紊乱,肺泡间隔明显增宽,可见大量蓝绿色染色的胶原纤维沉积。C、D

组 Masson 染色可见肺纤维化程度依次减轻,肺泡间隔增宽程度依次减轻,蓝绿色染色的胶原纤维沉积依次减少。42 d 处死另一半大鼠取肺组织进行 HE 染色,结果与 28 d 基本一致,C、D 组大鼠肺纤维化程度均较其同组 28 d 略有加重。见图 4、5。



A:A 组;B:B 组;C:C 组;D:D 组

图4 各组大鼠第28天肺组织 Masson 染色(×100)



A:A 组;B:B 组;C:C 组;D:D 组

图5 各组大鼠第42天肺组织 Masson 染色(×100)

2.5 大鼠肺泡炎与肺纤维化评分 动物造模后,28 d 及 42 d 其肺纤维化及肺泡炎评分均显著增高($P < 0.05$),BM-MSCs 治疗后,第 28 天 C 组肺纤维化程度与 A 组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),其他时间点的肺纤维化及肺泡炎程度有所好转,但与 B 组相比差异无统计学意义($P > 0.05$);UCB-MSCs 治疗后,D 组第 28 天的肺纤维化程度、第 42 天的肺纤维化及肺泡炎评分与 B 组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.6 肺组织 TGF- $\beta 1$ 水平的测定 28 d:A1 组最低,B1 组最高,C1 组、D1 组介于 A1 组和 B1 组之间,数值呈依次下降;D1 组与 B1 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。42 d:A2 组最低,B2 组最高,C2 组、D2 组介于 A2 组和 B2 组之间,数值呈依次下降;C2 组、D2 组分别与 B2 组比较,差异有统计学意

义($P < 0.05$)。42 d 各组大鼠肺组织 TGF- $\beta 1$ 值均较其同组 28 d 有所上升,但差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表1 各组大鼠肺泡炎、肺纤维化程度评分比较 $\bar{x} \pm s$

实验时间	组别	n	肺泡炎程度评分	肺纤维化程度评分
28 d	A1 组	6	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	B1 组	5	2.60 ± 0.55*	3.00 ± 0.00*
	C1 组	6	2.17 ± 0.75*	2.17 ± 0.75*△
	D1 组	5	2.00 ± 0.71*	1.60 ± 0.90*△
42 d	A2 组	6	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	B2 组	5	2.40 ± 0.55#	3.00 ± 0.00#
	C2 组	5	1.80 ± 0.84#	2.40 ± 0.55#
	D2 组	4	1.50 ± 0.58#▲	1.75 ± 0.96#▲

* 与 A1 组比较 $P < 0.05$; △ 与 B1 组比较 $P < 0.05$; # 与 A2 组比较 $P < 0.05$; ▲ 与 B2 组比较 $P < 0.05$

表 2 各组大鼠肺组织 TGF- β 1、HYP、MMP-2、TIMP-1、MMP-2/TIMP-1 比较

$\bar{x} \pm s$

时间	组别	TGF- β 1 (ng/mL)	HYP (ng/mL)	MMP-2 (ng/mL)	TIMP-1 (ng/mL)	MMP-2/TIMP-1
28 d	A1 组	0.04 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01	0.19 $\pm$ 0.04	0.20 $\pm$ 0.11
	B1 组	0.15 $\pm$ 0.04*	0.17 $\pm$ 0.03*	0.25 $\pm$ 0.01*	0.06 $\pm$ 0.00*	4.23 $\pm$ 0.51*
	C1 组	0.11 $\pm$ 0.05*	0.12 $\pm$ 0.05* Δ	0.17 $\pm$ 0.02* Δ	0.08 $\pm$ 0.01*	2.20 $\pm$ 0.56* Δ
	D1 组	0.08 $\pm$ 0.05 Δ	0.11 $\pm$ 0.05* Δ	0.13 $\pm$ 0.02* Δ #	0.10 $\pm$ 0.02* Δ	1.38 $\pm$ 0.23* Δ #
42 d	A2 组	0.05 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.02	0.30 $\pm$ 0.12
	B2 组	0.18 $\pm$ 0.03 $\blacktriangle$	0.18 $\pm$ 0.03 $\blacktriangle$	0.23 $\pm$ 0.02 $\blacktriangle$	0.05 $\pm$ 0.00 $\blacktriangle$	4.51 $\pm$ 0.37 $\blacktriangle$
	C2 组	0.13 $\pm$ 0.02 $\blacktriangle\Diamond$	0.15 $\pm$ 0.05 $\blacktriangle$	0.18 $\pm$ 0.02 $\blacktriangle\Diamond$	0.07 $\pm$ 0.01 $\blacktriangle$	2.72 $\pm$ 0.61 $\blacktriangle\Diamond$
	D2 组	0.11 $\pm$ 0.05 $\blacktriangle\Diamond$	0.13 $\pm$ 0.03 $\blacktriangle$	0.10 $\pm$ 0.01 $\blacktriangle\Diamond\blacklozenge$	0.06 $\pm$ 0.01 $\blacktriangle$	1.87 $\pm$ 0.53 $\blacktriangle\Diamond\blacklozenge$

* 与 A1 组比较 $P < 0.05$; Δ 与 B1 组比较 $P < 0.05$; # 与 C1 组比较 $P < 0.05$; $\blacktriangle$ 与 A2 组比较 $P < 0.05$; $\Diamond$ 与 B2 组比较 $P < 0.05$; $\blacklozenge$ 与 C2 组比较 $P < 0.05$

2.7 肺组织 HYP 水平的测定 28 d: A1 组最低, B1 组最高, C1 组、D1 组介于 A1 组和 B1 组之间, 数值呈依次下降; C1 组、D1 组分别与 B1 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。42 d: A2 组最低, B2 组最高, C2 组、D2 组介于 A2 组和 B2 组之间, 数值呈依次下降。42 d 各组大鼠肺组织 HYP 均值均较其同组 28 d 有所上升, 但差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.8 肺组织 MMP-2 水平的测定 28 d: A1 组最低, B1 组最高, C1 组、D1 组介于 A1 组和 B1 组之间, 数值呈依次下降, 此 3 组分别与 B1 组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); D1 组分别与 C1 组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。42 d: A2 组最低, B2 组最高, C2 组、D2 组介于 A2 组和 B2 组之间, 数值呈依次下降, 此两组分别与 B2 组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); D2 组与 C2 组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。42 d A、C 组大鼠肺组织 MMP-2 均值较其同组 28 d 有所上升, 42 d B、D 组大鼠肺组织 MMP-2 均值较其同组 28 d 有所下降。见表 2。

2.9 肺组织 TIMP-1 水平的测定 28 d: A1 组最

高, B1 组最低, C1 组、D1 组介于 A1 组和 B1 组之间, 数值呈依次上升; D1 组与 B1 组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。42 d: A2 组最高, B2 组最低, D2 组、C2 组介于 A2 组和 B2 组之间, 数值呈依次上升。42 d 各组大鼠肺组织 TIMP-1 均值较其同组 28 d 有所下降。见表 2。

2.10 肺组织 MMP-2/TIMP-1 28 d: A1 组最低, B1 组最高, C1 组、D1 组介于 A1 组和 B1 组之间, 数值呈依次下降, 此两组分别与 B1 组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); D1 组与 C1 组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。42 d: A2 组最低, B2 组最高, C2 组、D2 组介于 A2 组和 B2 组之间, 数值呈依次下降, 此 3 组分别与 B2 组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); D2 组与 C2 组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。42 d 各组大鼠肺组织 MMP-2/TIMP-1 均值较其同组 28 d 有所上升, 但差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.11 相关性分析 肺组织 TGF- β 1、HYP、MMP-2/TIMP-1 分别与肺泡炎程度评分、肺纤维化程度评分存在显著正相关。见表 3。

表 3 TGF- β 1、HYP、MMP-2/TIMP-1 分别与肺泡炎程度及肺纤维化程度评分相关性分析

指标	TGF- β 1		HYP		MMP-2/TIMP-1	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
肺泡炎评分	0.82	<0.001	0.86	<0.001	0.83	<0.001
肺纤维化评分	0.89	<0.001	0.92	<0.001	0.92	<0.001

2.12 振动切片观察荧光细胞 28 d 和 42 d 处死的大鼠肺组织振动切片后均未发现有荧光细胞。

3 讨论

肺纤维化是众多间质性肺疾病的终末期病变, 其表现为慢性肺泡间质性炎症损伤、细胞外基质破

坏和异常修复等^[2-3]。肺纤维化的预后极差, 目前除氧疗及肺移植外尚无有效的治疗手段。

近年来, 已有研究显示间充质干细胞对肺纤维化具有治疗作用, Ortiz 等^[4]发现博来霉素所致的肺损伤可促进 BM-MSCs 向肺内归巢, 分化为 II 型肺泡上皮细胞, 并减轻肺纤维化的程度; Rojas 等^[5]发现

BM-MSCs 可降低博来霉素诱导肺纤维化小鼠肺组织中 IFN- γ 、IL-2、IL-1 β 和 IL-4 的含量,从而减轻肺部炎症。以上表明,间充质干细胞在肺纤维化中的治疗作用与其迁移分化作用、免疫调节作用以及旁分泌功能有关。

本研究着重观察 HYP、TGF- β 1、MMP-2 及 TIMP-1 在肺纤维化致病和治疗过程中的变化。A 组的 TGF- β 1、HYP、MMP-2 及 MMP-2/TIMP-1 的比值处于低水平,TIMP-1 处于高水平;B 组的 TGF- β 1、HYP、MMP-2 及 MMP-2/TIMP-1 的比值处于高水平,TIMP-1 处于低水平,TGF- β 1、HYP、MMP-2/TIMP-1 的水平与肺纤维化的程度呈正相关;C、D 组均较 B 组下调 TGF- β 1、HYP 和 MMP-2 水平,上调 TIMP-1 水平,使 MMP-2/TIMP-1 的比值明显下降,病理结果亦显示其肺泡炎症程度及肺纤维化程度均有不同程度的减轻,推测 BM-MSCs 及 UCB-MSCs 可能通过抑制 TGF- β 1 纠正 MMP/TIMP 的失衡,终止 MMP-2 对正常肺泡结构的破坏及其所导致的异常修复,从而减轻肺泡炎和肺纤维化的程度。

研究表明,BM-MSCs 和 UCB-MSCs 治疗不同疾病有其各自的优势^[6-7]。与 BM-MSCs 相比,UCB-MSCs 具有来源充足、取材方便、操作简单、对供体无痛苦、免疫原性较弱、受病原体污染的概率更低等多个优势。本研究显示,在同等剂量(1×10^6)下,UCB-MSCs 在肺组织病理、MMP-2 水平、MMP-2/TIMP-1 比值均明显优于 BM-MSCs;而在 HYP、TGF- β 1、肺泡炎程度和肺纤维化程度评分等指标中,虽然 UCB-MSCs 与 BM-MSCs 相比多数指标差异无统计学意义,但仍展示出更好的表现。因此,与 BM-MSCs 相比,UCB-MSCs 对肺纤维化

具有更佳的治疗效果,UCB-MSCs 有望成为肺纤维化的治疗新途径。

本研究结果提示,间充质干细胞经静脉移植可延缓肺纤维化进展,下调 TGF- β 1 水平及改善 MMP/TIMP 失衡可促进间充质干细胞对肺纤维化的修复作用,选择 UCB-MSCs 或可提高对肺纤维化的治疗效果,但临床上应用间充质干细胞治疗肺纤维化仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] Szapiel SV, Elson NA, Fulmer JD, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse[J]. Am Rev Respir Dis, 1979, 120(4): 893-899.
- [2] Wynn TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis[J]. J Exp Med, 2011, 208(7): 1339-1350.
- [3] Noble PW, Barkauskas CE, Jiang D. Pulmonary fibrosis: patterns and perpetrators[J]. J Clin Investigation, 2012, 122(8): 2756-2762.
- [4] 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[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(14): 8407-8411.
- [5] Rojas M, Xu J, Woods CR, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005, 33(2): 145-152.
- [6] Ryu H, Kang B, Park S, et al. Comparison of mesenchymal stem cells derived from fat, bone marrow, Wharton's jelly, and umbilical cord blood for treating spinal cord injuries in dogs[J]. J Vet Med Sci, 2012, 74(12): 1617-1630.
- [7] Du WJ, Chi Y, Yang ZX, et al. Heterogeneity of proangiogenic features in mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord, and placenta[J]. Stem Cell Res Ther, 2016, 7(1): 163.

(收稿日期:2017-11-17 编辑:杜冠辉)