论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201507128

内皮祖细胞对急性损伤肺组织的抗炎作用

毛 梅,王健瑜,汪 丽,秦 磊 (400020 重庆,解放军第324医院老年科)

[摘要] **目的** 观察内皮祖细胞移植对急性损伤肺组织的抗炎作用。**方法** 清洁级同遗传背景SD大鼠36只,按随机数字表法分为PBS组、LPS组、内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)组($n=12$)。采用密度梯度离心法分离、培养EPCs。LPS组、EPC组大鼠经尾静脉注射脂多糖建立急性肺损伤模型;PBS组仅给予等量的PBS溶液。造模30 min后,PBS组、EPC组大鼠经尾静脉注入EPCs悬液;LPS组大鼠同法注入等量的PBS溶液。7 d后取动物血清及肺组织,分别检测各组肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)、中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)及髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)的表达。**结果** 与PBS组比较,LPS组中SD大鼠的肺损伤评分、肺组织W/D比值增加($P<0.01$, $P<0.05$),血清中TNF-α、IL-1β的含量增加[(195.88±10.08) *vs* (39.40±2.11) pg/mL, (143.33±10.19) *vs* (49.18±2.52) pg/mL, $P<0.05$],肺组织NE、MPO的含量也较PBS组增加[(3.88±0.02) *vs* (0.65±0.03) ng/mL, (7.11±0.41) *vs* (1.32±0.09) U/g, $P<0.05$];而EPC组中SD大鼠的肺损伤评分、肺组织W/D比值较LPS组降低($P<0.05$),血清中TNF-α、IL-1β的含量较LPS组减少[(103.52±10.07) *vs* (195.88±10.08) pg/mL, (78.04±3.98) *vs* (143.33±10.19) pg/mL, $P<0.05$],肺组织NE、MPO的含量也较LPS组降低[(1.98±0.05) *vs* (3.88±0.02) ng/mL, (4.63±0.37) *vs* (7.11±0.41) U/g, $P<0.05$]。**结论** 内皮祖细胞移植后能抑制炎症介质的表达,缓解肺损伤。

[关键词] 内皮祖细胞;干细胞移植;急性肺损伤;肿瘤坏死因子-α;白细胞介素-1β;中性粒细胞弹性蛋白酶;髓过氧化物酶

[中图法分类号] R329.2;R392.3;R563.05 [文献标志码] A

Anti-inflammatory effect of endothelial progenitor cell transplantation in rats with acute lung injury

Mao Mei, Wang Jianyu, Wang Li, Qin Lei (Department of Geriatrics, No. 324 Hospital of PLA, Chongqing, 400020, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the anti-inflammatory effect of transplantation of endothelial progenitor cells (EPCs) in rats with acute lung injury. **Methods** Thirty-six clean Sprague Dawley rats with the same genetic background were randomly divided into 3 groups ($n=12$): phosphate buffer solution (PBS) group, lipopolysaccharide (LPS) group, and EPCs group. The EPCs were isolated and cultured with density gradient centrifugation. The rats in the LPS and EPC groups were intravenously injected with 5 mg/kg LPS to induce lung injury. The rats in the PBS group were treated with only PBS at the same dose. Half an hour later, the rats in the EPC and PBS groups were injected with bone marrow-derived EPCs (2.0×10^6/0.5 mL) through the tail vein, and the rats in the LPS group were treated with the same dose of PBS. The amount of tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β), neutrophil elastase (NE) and myeloperoxidase (MPO) in the 3 groups were detected on the 7th day after EPCs transplantation. **Results** Compared with the PBS group, the lung injury score and the lung wet-to-dry ratio were increased in the LPS group, and the

[基金项目] 重庆市自然科学基金基础与前沿研究计划项目(CSTC2013jcyjA10087)

[通信作者] 毛 梅,E-mail:905891951@qq.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151118.1514.038.html(2015-11-18)

amount of TNF-α (195.88 ± 10.08 *vs* 39.40 ± 2.11 pg/mL), IL-1β (143.33 ± 10.19 *vs* 49.18 ± 2.52 pg/mL), NE (3.88 ± 0.02 *vs* 0.65 ± 0.03 ng/mL), and MPO (7.11 ± 0.41 *vs* 1.32 ± 0.09 U/g) were significantly increased (all $P < 0.05$). Compared with the LPS group, the lung injury score and lung wet-to-dry ratio were decreased in the EPC group, and the amount of TNF-α (103.52 ± 10.07 *vs* 195.88 ± 10.08 pg/mL), IL-1β (78.04 ± 3.98 *vs* 143.33 ± 10.19 pg/mL), NE (1.98 ± 0.05 *vs* 3.88 ± 0.02 ng/mL), and MPO (4.63 ± 0.37 *vs* 7.11 ± 0.41 U/g) were significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** Transplantation of EPCs can reduce the inflammatory mediators and improve the injured lung tissues in rats with acute lung injury.

[**Key words**] endothelial progenitor cells; stem cell transplantation; acute lung injury; tumor necrosis factor-α; interleukin-1β; neutrophil elastase; myeloperoxidase

Supported by the Program of Basic and Frontier Research Plan of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2013jcyjA10087). Corresponding author: Mao Mei, E-mail: 905891951@qq.com

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)/急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是由感染、创伤等一种或多种原因导致的全身炎症反应综合征的肺部表现,死亡率高达30% ~50%,主要病理特征是广泛肺血管内皮细胞的破坏及炎症细胞浸润[1-2]。随着干细胞移植在缺血性疾病、心血管疾病和肿瘤防治研究中的应用[3-5],近年来发现成血管干细胞——内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)能归巢到损伤的肺组织,参与损伤血管的修复,对急性肺损伤有一定的治疗作用[6-7],但对于EPC移植缓解肺损伤的具体抗炎作用目前仍不清楚。本研究主要通过检测各组血清肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)及肺组织中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)的表达,来观察EPC移植后对急性损伤肺组织炎症状态的影响,从而进一步探讨EPC移植对损伤肺组织的抗炎作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂

健康同遗传背景的清洁级SD大鼠60只,体质量约150 g,用于EPC的采集;清洁级成年SD大鼠36只,体质量250 ~300 g,按随机数字表法分为3组(n = 12):PBS组、LPS组、EPC组。动物由第三军医大学实验动物中心提供,实验中对动物的处置符合动物伦理学标准。主要试剂:淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品公司)、TNF-a、IL-1β及NE的ELISA试剂盒(TaKaRa公司)、髓过氧化物酶试剂盒(南京建成生物工程公司)。

1.2 EPC的分离、培养及鉴定

具体方法参见文献[6,8]。

1.3 动物分组及EPC移植

大鼠经1%戊巴比妥5 mg/kg腹腔麻醉后经尾静脉注入脂多糖(5 mg/kg)诱发ALI;ALI造模30 min后,取培养第10天的EPC,胰酶消化后用无菌PBS稀释悬液(2×10^6/0.5 mL)经大鼠尾静脉注入PBS组和EPC组,而LPS组同法给予等量的PBS。7 d后经颈动脉取血,4 ℃、3 000 r/min离心5min,取上清保存备用;取部分大鼠肺组织置于-70 ℃保存备用,取部分肺组织处理后行HE染色,余下肺组织称湿质量后,放入75 ℃烤箱烘烤48 h后称干质量,计算湿/干质量比(W/D)。

1.4 肺组织形态学观察及肺损伤评分

取大鼠肺组织经4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,切片5 μm,苏木精-伊红染色,显微镜下观察肺组织形态变化;根据Bustos等[3]方法进行肺损伤指数评分。

1.5 血清中TNF-α和IL-1β检测

均采用双抗体夹心ELISA法检测,具体步骤按说明书操作。

1.6 肺组织中NE、MPO测定

肺组织在玻璃匀浆器中匀浆,分别采用ELISA试剂盒和髓过氧化物酶试剂盒来检测NE和MPO,具体步骤按试剂盒说明书操作。

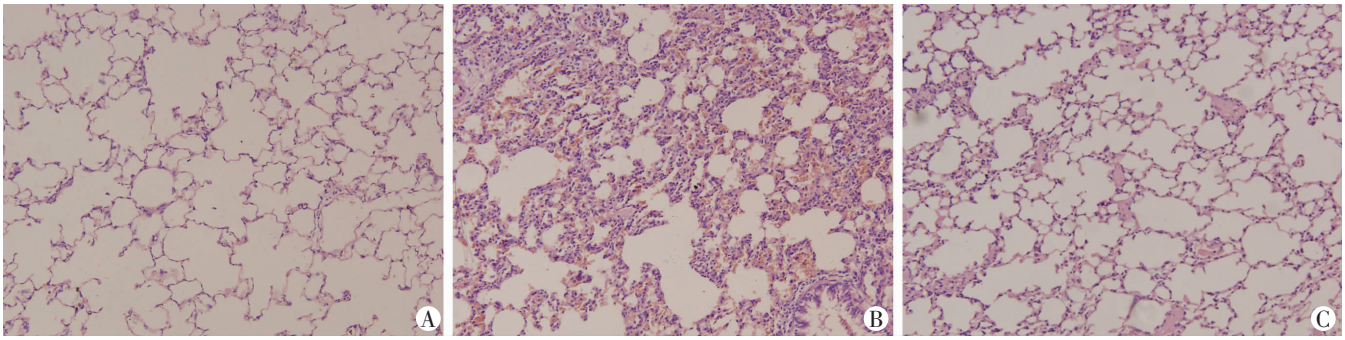
1.7 统计学分析

采用SPSS 16.0统计软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2组间比较采用配对 t 检验。

2 结果

2.1 肺组织形态学观察、肺损伤评分及W/D比值

HE染色可见PBS组肺组织结构完整;LPS组肺泡结构严重破坏、肺泡腔及肺间质出血、间质增生、大量炎性细胞浸润;EPC组中大部分肺泡结构基本完整,肺组织出血及炎症细胞浸润显著减少。给予LPS后,显著加重了肺损伤,与PBS组比较,肺损伤评分增加(12.25 ± 1.14 *vs* 1.83 ± 0.58, $P < 0.01$);同时也使肺泡-毛细胞管通透性增加,使肺组织含水量增加,其肺



A：PBS 组；B：LPS 组；C：EPC 组

图 1　各组大鼠肺组织 HE 染色观察（×200）

组织 W/D 比值为 5.48 ± 0.11 *vs* 2.68 ± 0.06，差异具有统计学意义（$P < 0.05$）；EPC 组与 LPS 组相比，肺损伤评分较 LPS 组显著降低（7.17 ± 0.94 *vs* 12.25 ± 1.14，$P < 0.05$），肺组织含水量下降，其 W/D 比值为 4.20 ± 0.08 *vs* 5.48 ± 0.11，差异具有统计学意义（$P < 0.05$，图 1）。

2.2　各组大鼠血清 TNF-α、IL-1β 的含量

给予 LPS 损伤后，血清中 TNF-α、IL-1β 的含量较 PBS 组明显增加，组间差异有统计学意义（$P < 0.05$）；EPC 移植后降低了 TNF-α、IL-1β 的含量，与 LPS 组相比差异有统计学意义（$P < 0.05$，表 1）。

表 1　各组大鼠血清中 TNF-α、IL-1β 的含量

（pg/mL，$n = 12$，$\bar{x} \pm s$）

组别	TNF-α	IL-1β
PBS 组	39.40 ± 2.11	49.18 ± 2.52
LPS 组	195.88 ± 10.08[a]	143.33 ± 10.19[a]
EPC 组	103.52 ± 10.07[b]	78.04 ± 3.98[b]

a：$P < 0.05$，与 PBS 组比较；b：$P < 0.05$，与 LPS 组比较

2.3　肺组织中 NE、MPO 的含量

LPS 组中 NE、MPO 的含量较 PBS 组显著增加（$P < 0.05$）；但 EPC 移植后显著降低了 NE 及 MPO 的含量，组间差异有统计学意义（$P < 0.05$，表 2）。

表 2　各组肺组织中 NE、MPO 的含量（$n = 12$，$\bar{x} \pm s$）

组别	NE（ng/mL）	MPO（U/g）
PBS 组	0.65 ± 0.03	1.32 ± 0.09
LPS 组	3.88 ± 0.02[a]	7.11 ± 0.41[a]
EPC 组	1.98 ± 0.05[b]	4.63 ± 0.37[b]

a：$P < 0.05$，与 PBS 组比较；b：$P < 0.05$，与 LPS 组比较

3　讨论

ALI 是指各种原因引起的肺内过度或失控性炎症反应导致的肺泡上皮、肺微血管内皮和肺间质的急性弥漫性损伤。其中，中性粒细胞（polymorphonuclear cells，PMN）在肺内过度聚集和活化发挥了重要作用[9]。在肺内和循环系统各种炎性刺激下，PMN 首先聚集、黏附于肺微血管内皮并被激活，由肺血管进入肺组织并持续活化，释放一系列损伤介质（如 TNF-α、IL-1β、氧自由基、蛋白酶、脂质代谢产物和肽类物质等），引起弥漫性肺泡损害，最终导致 ALI。EPC 是来源于骨髓的原始干细胞，在缺氧、缺血、炎症、外伤等因素刺激下，能直接参与及发挥旁分泌作用，促进损伤血管的修复及微血管新生，EPC 移植被认为是血管性疾病最有前景的治疗措施之一[10-11]。近年来，人们将 EPC 研究引入肺部疾病领域，在 ALI/ARDS 中也见报道。研究发现 EPC 移植后能归巢到损伤的肺组织，参与损伤血管的修复，缓解肺组织损伤[6-7,12]。尽管其免疫调节机制目前仍不清楚，但 EPC 在炎症疾病的治疗应用仍值得研究。在本实验中，我们通过观察 EPC 移植后肺血清及组织中 TNF-a、IL-1β、NE 及 MPO 含量的变化，进一步探讨 EPC 移植后对损伤肺组织的抗炎作用。

HE 染色结果显示：给予 LPS 后加重了肺损伤，肺泡结构严重破坏、肺泡腔及肺间质出血、间质增生、大量炎性细胞浸润，肺泡-毛细血管膜通透性增加，肺损伤评分及肺组织 W/D 比值较 PBS 组显著增加；而 EPC 移植缓解了肺损伤，EPC 组中肺泡结构大部分基本完整，肺组织出血及炎症细胞浸润显著减少，肺 W/D 比值及肺损伤评分较 LPS 组降低，组间差异有统计学意义。

TNF-α 主要由 PMN、巨噬细胞分泌，被认为是全身炎症反应的始动介质；IL-1β 可促进 PMN 炎症介质的释放，并能与 TNF-α 产生协同作用，是导致感染及脓毒症发生的重要炎症介质[13-14]。我们采用 ELISA 法检测各组大鼠血清中 TNF-α、IL-1β 的含量，结果显示：给予 LPS 刺激后显著增加了 TNF-α、IL-1β 的含

量,与PBS组间差异具有统计学意义;EPC移植后血清中TNF-α、IL-1β的含量较LPS组显著下降。我们还检测了肺组织中NE、MPO的含量,NE由PMN所分泌,能分解几乎所有细胞外基质和许多重要的血浆蛋白,被认为是最具破坏力的酶类之一,同时也被认为是引起ALI/ARDS炎症级联反应的重要炎性损伤因子[15];MPO是PMN的标志酶,其活性高低反映组织中PMN聚集程度[16]。实验发现LPS组中NE、MPO的含量较PBS组显著增加;但EPC移植后降低了NE及MPO的含量,组间差异有统计学意义。

本研究结果提示:EPC参与损伤肺血管的修复,维持肺泡-毛细血管膜结构稳定、使其通透性降低,肺组织的W/D比值下降;减少了肺间质出血、间质增生及炎性细胞浸润,MPO的降低也反映了PMN在肺组织中的聚集减少,肺损伤评分值下降;同时减少了炎症介质TNF-α、IL-1β及蛋白酶NE的释放,降低了促炎症介质的瀑布样级联放大效应,减少了肺组织基膜胶原的降解,此可能为EPC移植后具有抗炎作用、缓解肺损伤的重要机制之一。

参考文献:

[1] Han S, Mallampalli R K. The acute respiratory distress syndrome: from mechanism to translation[J]. J Immunol, 2015, 194(3): 855-860.

[2] Shaver C M, Bastarache J A. Clinical and biological heterogeneity in acute respiratory distress syndrome: direct versus indirect lung injury[J]. Clin Chest Med, 2014, 35(4): 639-653.

[3] Bustos M L, Huleihel L, Meyer E M, *et al*. Activation of human mesenchymal stem cells impacts their therapeutic abilities in lung injury by increasing interleukin(IL)-10 and IL-1RN levels[J]. Stem Cells Transl Med, 2013, 2(11): 884-895.

[4] Sukmawati D, Tanaka R. Introduction to next generation of endothelial progenitor cell therapy: a promise in vascular medicine[J]. Am J Transl Res, 2015, 7(3): 411-421.

[5] Morita R, Sato K, Nakano M, *et al*. Endothelial progenitor cells are associated with response to chemotherapy in human non-small-cell lung cancer [J]. J Cancer Clin Oncol, 2011, 137(12): 1849-1857.

[6] Mao M, Wang S N, Lv X J, *et al*. Intravenous delivery of bone marrow-derived endothelial progenitor cells improves survival and attenuates lipopolysaccharide-induced lung injury in rats [J]. Shock, 2010; 34(2): 196-204.

[7] Li H, Qiang Y, Wang L, *et al*. Repair of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by endothelial progenitor cells, alone and in combination with simvastatin [J]. Chest, 2013, 144(3): 876-886.

[8] 毛梅, 王博, 王艺, 等. Y染色体探针示踪内皮祖细胞移植在损伤肺组织中的表达[J]. 中华急诊医学杂志, 2011, 20(11): 1162-1166.

[9] Dengler V, Downey G P, Tuder R M, *et al*. Neutrophil intercellular communication in acute lung injury. Emerging roles of microparticles and gap junctions[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013, 49(1): 1-5.

[10] Georgescu A, Alexandru N, Constantinescu A, *et al*. The promise of EPC-based therapies on vascular dysfunction in diabetes[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 699(1/3): 1-6.

[11] Woodard G E, Ji Y, Christopherson G T, *et al*. Characterization of discrete subpopulations of progenitor cells in traumatic human extremity wounds[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e114318.

[12] Mao M, Xu X, Zhang Y, *et al*. Endothelial progenitor cells: the promise of cell-based therapies for acute lung injury [J]. Inflamm Res, 2013, 62(1): 3-8.

[13] Binnie A, Tsang J L, dos-Santos C C. Biomarkers in acute respiratory distress syndrome [J]. Curr Opin Crit Care, 2014, 20(1): 47-55.

[14] Iliodromiti Z, Zygouris D, Sifakis S, *et al*. Acute lung injury in preterm fetuses and neonates: mechanisms and molecular pathways [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2013, 26(17): 1696-1704.

[15] Aikawa N, Kawasaki Y. Clinical utility of the neutrophil elastase inhibitor sivelestat for the treatment of acute respiratory distress syndrome [J]. Ther Clin Risk Manag, 2014, 10: 621-629.

[16] Rom W N. Role of oxidants in interstitial lung diseases: pneumoconioses, constrictive bronchiolitis, and chronic tropical pulmonary eosinophilia [J]. Mediators Inflamm, 2011, 2011: 407657.

(**收稿**:2015-07-22;**修回**:2015-09-25)

(编辑 邓强庭)