

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.12.001

骨髓间充质干细胞移植对矽肺大鼠肺纤维化的作用*

陈志军, 黄惠霞, 谢 英, 李冬红, 李智民, 张健杰[△]
(广东省深圳市职业病防治院职业病科 518020)

[摘要] **目的** 探讨骨髓间充质干细胞(BMSCs)移植对矽肺大鼠肺组织纤维化的影响。**方法** 将 42 只 SD 雌性大鼠分为 A、B、C、D 组。A、B 和 C 组采用暴露式气管内一次性缓慢注入二氧化硅(SiO₂)混悬液建立矽肺大鼠模型, D 组则注入生理盐水。B、C 组分别于造模后 6 h 或第 42 天经尾静脉注射 BMSCs。第 14 天, A、B 和 D 组分别处死大鼠各 6 只, 第 56 天各组分别处死 6 只。HE 染色观察肺组织形态学变化, ELISA 检测肺组织羟脯氨酸(Hyp)水平。**结果** A 组在造模后第 14 天, 肺组织病理改变以急性炎症反应为主, 第 56 天以纤维化为主; B、C 组病理改变均较同时期 A 组轻; D 组未见明显异常。肺组织中 Hyp 水平, A、B 和 C 组均较 D 组明显升高($P=0.000$); B、C 组与 A 组比较, 在 BMSCs 治疗后第 14 天均明显减低($P=0.000, 0.035$), B 组在治疗后第 56 天仍明显减低($P=0.016$)。**结论** 不论在以肺泡炎为主还是在以纤维化为主的病理阶段予 BMSCs 移植, 均可以延缓矽肺大鼠肺纤维化的病理进程。

[关键词] 矽肺; 肺纤维化; 间充质干细胞; 羟脯氨酸; 大鼠, Sprague-Dawley

[中图分类号] R322.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)12-1585-03

Effect of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on silicosis fibrosis in rats*

Chen Zhijun, Huang Huixia, Xie Ying, Li Donghong, Li Zhimin, Zhang Jianjie[△]

(Department of Occupational Disease, Shenzhen Hospital for Occupational Disease Prevention and Treatment, Shenzhen, Guangdong 518020, China)

[Abstract] **Objective** To study the effects of bone mesenchymal stem cells (BMSCs) transplantation on pulmonary tissue fibrosis in silicosis rats. **Methods** Forty-two healthy female SD rats were randomly divided into 4 groups: group A, B, C and D. The group A, B and C received intratracheal injection of silica crystals (SiO₂) to establish silicosis mouse models, while the group D received the infusion of physiological saline. BMSCs were injected by the tail vein at 6 h after modeling or on 42 d in the group B and C. Six rats in each group A, B, and D were sacrificed on 14 d, and other 6 rats in each group were sacrificed on 56 day. The morphological changes of the lung tissues were observed by HE staining; the content of hydroxyproline (Hyp) in the lung tissue homogenate was detected by ELISA. **Results** The lung tissue pathological changes in the group A were dominated by acute inflammatory response on 14 d after model construction, and fibrosis reaction on 56 d; the pathological changes in the group B and C were lighter than those in the group A; while no obvious abnormality was found in the group D. The Hyp level of pulmonary tissue in the group A, B and C was significantly increased compared with the group D ($P=0.000$); which on 14 d after BMSCs treatment in the group B and C was significantly decreased compared with the group A ($P=0.000, P=0.035$), and which on 56 d after treatment in the group B was still significantly decreased ($P=0.016$). **Conclusion** No matter in the pathological stages of pulmonary alveolitis and fibrosis, BMSCs transplantation may postpone the pathological process of pulmonary fibrosis in silicosis rats.

[Key words] silicosis; pulmonary fibrosis; mesenchymal stem cells; hydroxyproline; rats, Sprague-Dawley

尘肺病一种特殊类型的肺纤维化疾病,也是我国最严重的职业病,尚无有效的治疗逆转或阻止其自然进程,严重影响劳动者的生活质量。近年来,多个动物实验发现,间充质干细胞(MSCs)能够参与肺组织的再生修复,抑制炎症反应和免疫调节等功能,有效减轻肺泡炎及随后的肺纤维化^[1-3]。但这些实验大都是在模型早期(肺泡炎为主的阶段)给予 MSCs 干预,不能反映在纤维化为主阶段的治疗效果。有报道在放射性肺损伤后 4 h 予 MSCs 移植,可以减轻肺损伤,2 个月后移植则促进肺纤维化的形成^[4]。而尘肺病患者确诊时已处于纤维化为主的阶段。基于此,本实验在大鼠染矽尘后早期和晚期分别进行骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)治疗,探讨不同时期 BMSCs 移植对矽肺大鼠肺纤维化的影响,为尘肺病治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 检疫合格的 10~12 周龄 SPF 级 SD 雌性大鼠 42 只,体质量 203.9~228.7 g,购自广东省医学实验动物中心,动物生产和使用许可证号码分别为 SCXK(粤)2013-0002 和 SYXK(粤)2013-0002。饲养在广东省医学实验动物中心 SPF 级动物房,自由进食饮水。分成 A、B、C、D 组,各组体质量无明显差异,具体分组情况见表 1。

1.1.2 主要试剂及仪器 标准石英粉尘,含二氧化硅(SiO₂)大于 95%,由中国疾病预防控制中心劳动卫生职业病研究所提供。SD 大鼠第 4 代 BMSCs 由广州昭美生物科技有限公司提供。羟脯氨酸 ELISA 试剂盒由上海科源生物科技有限公司提供。超净工作台 BCM-1000A(北京华威兴业科技有限公司),

表 1 实验动物分组及处理

组别	n	体质量($\bar{x}\pm s$,g)	第 1 天	第 14 天	第 42 天	第 56 天
A 组	12	220.13±6.47	气管内注入 SiO ₂	处死 6 只	—	处死 6 只
B 组	12	214.88±6.89	气管内注入 SiO ₂ 后 6 h 输 BMSCs	处死 6 只	—	处死 6 只
C 组	6	219.28±7.04	气管内注入 SiO ₂	—	输 BMSCs	处死 6 只
D 组	12	218.40±6.39	气管内注入生理盐水	处死 6 只	—	处死 6 只

—:不处理。

BS224S 电子分析天平(Sartorius 公司,德国)。

1.2 方法

1.2.1 SiO₂ 悬溶液配制方法 称取 5 g 经充分研磨(约 2 h)的 SiO₂,加 0.9%氯化钠注射液配制成 50 mg/mL 的 SiO₂ 溶液,高压灭菌后加青霉素 2 000 U/mL 备用。

1.2.2 动物模型的建立 A 组、B 组和 C 组大鼠,经异氟烷呼吸麻醉后,暴露式气管内一次性缓慢注入 1 mL SiO₂ 混悬液。D 组注入等量的灭菌 0.9%氯化钠注射液(临用前加青霉素 2 000 U/mL)。

1.2.3 BMSCs 细胞移植 B 组在造模后 6 h,C 组在造模后第 42 天,经尾静脉注射 BMSCs 细胞悬液,浓度为 2.5×10^6 /mL,每只 1 mL。A 组和 D 组各 6 只大鼠在造模后 6 h、各 6 只大鼠在第 42 天经尾静脉注射 PBS 每只 1 mL。

1.2.4 肺组织病理学观察 右上肺组织经 4%甲醛固定 24 h,常规乙醇脱水,石蜡包埋和切片。切片经 HE 染色和 Masson 染色后,在光学显微镜下观察大鼠肺组织的炎症改变、胶原沉积及纤维化程度等病理变化。

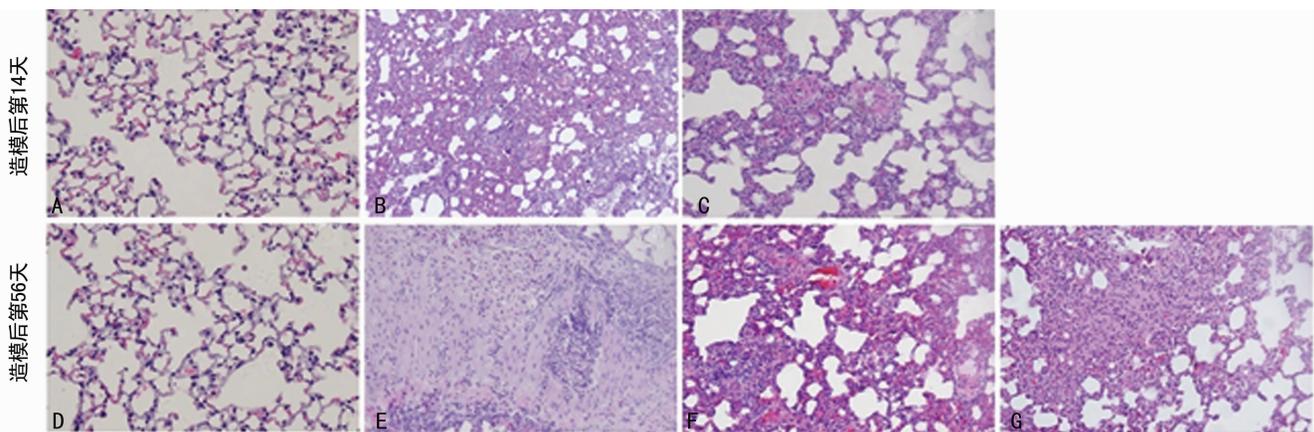
1.2.5 肺组织羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)水平测定 取

大鼠冻存肺组织的右肺下叶,制成组织匀浆后测定 Hyp 的水平,具体操作步骤按照 Hyp 试剂盒说明书进行。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,计量数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间数据采用单因素方差分析,组内两两比较采用 LSD 检验;两组间比较采用独立样本 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠肺组织 HE 染色病理改变 A 组在造模后第 14 天,肺泡结构破坏,肺泡壁增厚,肺泡间隔增宽,肺间质炎症细胞浸润,以巨噬细胞和淋巴细胞浸润为主,少许纤维、细胞性肉芽肿形成;在造模后第 56 天肺组织出现明显的成纤维细胞增生和胶原纤维形成,可见细胞、纤维性肉芽肿和纤维性结节。B 组在造模后第 14 天,少量炎症细胞浸润,纤维、细胞性肉芽肿少。B 组和 C 组在第 56 天肉芽肿均较同期 A 组少且小,B 组纤维、细胞性肉芽肿为主,而 C 组以细胞、纤维性肉芽肿为主。D 组在造模后第 14 天和第 56 天,HE 染色见肺泡结构清晰,肺泡壁薄,未见明显炎细胞浸润,见图 1。



A、D: D 组; B、E: A 组; C、F: B 组; G: C 组。

图 1 各组造模后肺组织病理改变(HE, $\times 200$)

表 2 各组大鼠肺组织 Hyp 水平($\bar{x}\pm s$, $\mu\text{g/L}$)

组别	造模后第 14 天	造模后第 56 天	<i>t</i>	<i>P</i>
A 组	22.25±4.09 ^a	34.55±6.87 ^a	3.767	0.004
B 组	13.92±3.48 ^{ab}	27.52±4.27 ^{ac}	6.053	0.000
C 组	—	28.49±4.25 ^{ac}		
D 组	5.61±1.42	5.40±1.51	0.252	0.806
F	40.468	45.685		
<i>P</i>	0.000			0.000

^a: $P<0.01$,与 D 组比较; ^b: $P<0.01$,与 A 组比较; ^c: $P<0.05$,与 A 组比较。—:表示无数据。

2.2 大鼠肺组织 Hyp 测定 大鼠肺组织 Hyp,在造模后第

14 天, A 组和 B 组均较 D 组明显升高($P=0.000$),但 B 组较 A 组明显减少($P=0.000$)。造模后第 56 天, A 组、B 组和 C 组均较 D 组明显升高($P=0.000$); B 组与 C 组均较 A 组明显减少($P=0.016, 0.035$)。造模后第 56 天与第 14 天比较, A 组与 B 组均明显升高($P=0.004, 0.000$)。见表 2。

3 讨 论

MSCs 是一种起源于中胚层的多能干细胞,来源广泛,可从骨髓、骨骼肌、脂肪、脐带血等组织中分离出,易于体外分离、培养和扩增,也不表达主要组织相容性复合物分子,具有低免疫原性和较低的抗原提呈能力^[5-6]。MSCs 移植不需要进行配型,而且没有胚胎干细胞伦理道德问题,在生物医学工程上具有广阔的应用前景,也是近年来肺纤维化治疗的研究热点

之一。

国内外很多动物实验均证实 MSCs 移植能减轻肺炎及肺纤维化,但研究大多采用博来霉素等诱导的肺纤维化模型。博来霉素诱导的动物模型上皮细胞过度增生、缺少纤维结节,28 d 后肺纤维化可出现自限性^[7]。而尘肺所吸入的粉尘不易被清除,纤维化刺激持续存在,病情不断进展,最终形成典型的纤维细胞性结节。矽尘诱导的矽肺动物模型,肺纤维化发展过程与人类矽肺病的发展类似^[7]。MSCs 治疗包括矽肺在内的肺纤维化动物模型,在移植后第 14 天,因此,本研究采用矽尘诱导的纤维化模型进行研究。多项实验表明,大鼠气管内一次性注入矽尘,在染尘第 1~7 天肺组织表现急性肺炎炎症反应为主,第 28 天后出现成纤维细胞性矽结节形成^[8-9]。在 BMSCs 移植后第 14 天能充分观察到其治疗肺纤维化疗效^[1-3,10]。本研究在造模后第 6 小时及第 42 天分别予 BMSCs 移植,在造模后第 14 天及第 56 天应该能够观察到 BMSCs 治疗以肺炎为主和以纤维化为主的不同病理阶段肺纤维化的效果。

本研究发现,大鼠染矽尘后,肺部病理改变由肺炎→纤维、细胞性肉芽肿→细胞、纤维性肉芽肿→纤维性结节的过程,D 组在造模后第 14 天和第 56 天,HE 染色见肺泡结构清晰,肺泡壁薄,未见明显炎细胞浸润。B 组的肺炎及随后的纤维化均明显缓解,C 组的肺纤维化也有缓解。BMSCs 治疗后肺组织中的 Hyp 水平明显减少;B 组第 56 天较第 14 天又有明显升高。Hyp 是机体胶原蛋白中的一种主要而又相对恒定的氨基酸,在弹性蛋白中浓度极少,而在其他蛋白中则不存在,组织中羟脯氨酸的水平,能够反映纤维化的程度^[10]。结果提示 BMSCs 治疗能延缓肺纤维化的进程,但随时间推移,作用减弱,恰当的重复给药可能是维持其疗效的方法之一。BMSCs 治疗肺纤维化的可能机制有:(1)MSCs 能够迁移到受损的肺组织,在适当的微环境下分化为支气管上皮细胞和 I、II 型肺泡上皮细胞^[11]。(2)MSC 具有免疫调节、抗炎作用的作用,MSCs 可通过下调基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、基质金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1)、INF- γ 、TGF- β_1 ^[12],以及 IL-2、IL-1 β 和 IL-4 mRNA 的表达^[13],调节 MMP-2 与 TIMP-1 之间的平衡^[14]。MSCs 还能够促进 CD4⁺ CD25⁻ T 细胞向表达 Foxp3 的 CD4⁺ CD25⁺ 调节 T 细胞转化^[15],以及调节 Th1/Th2 平衡向 Th1 反应偏移^[16],从而减轻肺部炎症及肺纤维化。有研究认为,BMSCs 的移植在矽肺纤维化早中期对大鼠的病理进程起到延缓作用,晚期治疗效果不明显^[17],可能与该研究采用的 BMSCs 剂量(1×10^6 /mL)明显小于与本研究有关,而 BMSCs 移植对大鼠矽肺纤维化的拮抗作用存在剂量一效应关系^[3]。

综上所述,不论在以肺炎为主还是在以纤维化为主的病理阶段予 BMSCs 移植,均可以明显抑制矽肺大鼠肺组织的炎症以及胶原沉积,延缓纤维化的病理进程。治疗效果可能与介入时机、治疗剂量以及恰当的维持治疗有关。

参考文献

[1] Choi M, Ban T, Rhim T. Therapeutic use of stem cell transplantation for cell replacement or cytoprotective effect of microvesicle released from mesenchymal stem cell[J]. *Mol Cells*, 2014, 37(2): 133-139.

[2] 黄坤, 吴晓梅, 王欣燕, 等. 骨髓间充质干细胞移植对大鼠肺纤维化的影响[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2012, 35(9): 659-664.

[3] 赵曼曼, 崔建忠, 李冉, 等. 不同剂量骨髓间充质干细胞移植对大鼠矽肺纤维化形成的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28(12): 2205-2210.

[4] Yan X, Liu YN, Han Q, et al. Injured microenvironment directly guides the differentiation of engrafted Flk-1(+) mesenchymal stem cell in lung[J]. *Exp Hematol*, 2007, 35(9): 1466-1475.

[5] Gronthos S, Zannettino A, Hay SJ, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow[J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(9): 1827-1835.

[6] Tse WT, Pendleton JD, Wm B, et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation[J]. *Transplantation*, 2003, 75(3): 389-397.

[7] Moore BB, Hogaboam CM. Murine models of pulmonary fibrosis[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 294(2): 152-160.

[8] 李春红, 朱文, 董西方, 等. 实验性矽肺模型大鼠外周血 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 调节性 T 细胞的变化及意义[J]. *环境与职业医学*, 2010, 27(8): 480-482.

[9] 朱文, 沙泉, 董西方, 等. 实验性矽肺大鼠肺组织中 Th1/Th2 型细胞因子的变化及意义[J]. *安徽医药*, 2010, 14(9): 1034-1036.

[10] 张雁敏, 邱泽武, 刘广贤. 骨髓间充质干细胞治疗大鼠百草枯中毒急性肺损伤的作用[J]. *中华急诊医学杂志*, 2011, 20(1): 39-43.

[11] Theise ND, Henegariu O, Grove J, et al. Radiation pneumonitis in mice: A severe injury model for pneumocyte engraftment from bone marrow[J]. *Exp Hematol*, 2002, 30(11): 1333-1338.

[12] Yu SH, Liu LJ, Lv B, et al. Inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by bone marrow-derived mesenchymal stem cells might be mediated by decreasing MMP9, TIMP-1, INF- γ and TGF- β [J]. *Cell Biochem Funct*, 2015, 33(6): 356-366.

[13] 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.

[14] 王贤, 曾玉兰, 彭红星, 等. 骨髓间充质干细胞抑制大鼠肺纤维化的作用机制[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2014, 43(3): 300-303.

[15] Li G, Ren J, Wang G, et al. T2 enhances in situ level of Foxp3⁺ regulatory cells and modulates inflammatory cytokines in Crohn's disease[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 18(2): 244-248.

[16] 李月红, 张春来, 王艳, 等. 骨髓间充质干细胞对肺纤维化大鼠肺组织中 Th1/Th2 平衡的调节作用[J]. *解剖学杂志*, 2014, 37(1): 10-14.

[17] 朱会兴, 高俊玲, 赵曼曼, 等. 不同时间骨髓间充质干细胞移植对大鼠矽肺纤维化形成的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2015, 31(2): 193-196.