·论　著·

内皮祖细胞移植对输血相关急性肺损伤小鼠模型保护作用的研究

姚海云[1],韩雪莹[1],陈秀莲[1],李　华[1],杜文军[2]
(1.山东省济南市血液供保中心检验科　250001;2.山东省千佛山医院消化内科,济南 250014)

摘　要:目的　建立输注人类血浆小鼠输血相关急性肺损伤(TRALI)模型,观察内皮祖细胞(EPC)移植对小鼠肺部炎性免疫反应及组织病理特点的影响。**方法**　BALB/C 雄性小鼠 36 只,随机分为 TRALI 组(n=12):腹腔注射脂多糖(LPS),每代谢体质量用量为 2 mg,2 h 后经过静脉输注人血浆,注射量为每只 1 mL;EPC 组(n=12):同 TRALI 组的方法造模后,经尾静脉注入 EPC(3×10^6 个);正常对照组(n=10):采用假手术处理。光镜分析各组小鼠肺组织病理及湿干比变化。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定各组小鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中白细胞介素-10(IL-10)、白细胞介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的含量。**结果**　TRALI 模型组小鼠肺组织出现肺泡间隔增厚、肺泡内纤维蛋白浸润、肺泡内出血、支气管壁增厚等病理变化,肺组织湿干比增高,EPC 组以上病理变化较 TRALI 组不明显,肺组织湿干比也低于 TRALI 组,高于正常对照组(P<0.05)。TRALI 组实验动物的 BALF 中 IL-10、IL-1β、TNF-α 含量均显著高于正常对照组和 EPC 组(均 P<0.05),EPC 组 BALF 中 IL-10、IL-1β、TNF-α 含量高于正常对照组(P<0.05)。**结论**　EPC 移植对 TRALI 小鼠模型具有保护作用,减轻肺部炎性免疫反应及组织病理学损伤的程度。该试验为临床治疗 TRALI 提供新的视角和思路。

关键词:输血相关急性肺损伤;　内皮祖细胞;　移植
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.04.023　**文献标志码:**A　**文章编号:**1672-9455(2017)04-0514-03

The therapeutic study of the transplantation of endothelial progenitor cell in the mice with the transfusion-related acute lung injury

YAO Haiyun[1],*HAN Xueying*[1],*CHEN Xiulian*[1],*LI Hua*[1],*DU Wenjun*[2]
(1.*Jinan Blood Supply Security Center Laboratory*,*Jinan*,*Shandong* 250001,*China*;2.*Qianfoshan Shandong Province Hospital Gastroenterology*,*Jinan*,*Shandong* 250014,*China*)

Abstract:Objective　To observe the effect of the transplantation of endothelial progenitor cells(EPCs) on the lung inflammatory response and histopathology change in mice with the transfusion-related acute lung injury(TRALI). **Methods**　Thirty-six male BALB/C mice were divided into three groups randomly:normal control group(n=12),TRALI model group(n=12),and EPCs transplantation group(n=12). The TRALI model was established through human plasma injection. The LPS was intraperitoneal injected in the mice of the TRALI model group,while the normal saline was injected in the normal control group. After 2 hours,the EPCs(3×10^6) were respectively injected via the tail vein in the EPCs transplantation group,when the PBS was given in the other groups by the same way. The pathological change in lung tissue was measured by the HE staining. The ratio of wet to dry weight (W/D) was measured. The IL-10,IL-1β and TNF-α level in the bronchial alveolar lavage fluid(BALF) was analyzed by the ELISA. **Results**　Compared with normal control group,the alveolar wall tissue and the bronchial wall were thickened,the fibrin was infiltrated,the alveolar was blooding. The W/D in the TRALI model group was significantly higher than the normal control group(P<0.05). The above pathological changes in EPCs group were not obvious,and the W/D in the EPCs group was lower than the TRALI group,but higher than the normal control group. The levels of IL-10,IL-1β,and TNF-α in the bronchial alveolar lavage fluid in the TRALI model group were significantly higher than the normal control and the EPCs group,while these biochemical indexes in the EPCs group were also higher than the normal control group(P<0.05). **Conclusion**　EPC transplantation have a protecting function on the mice with the transfusion-related acute lung injury,can relieve the inflammation response in the lung tissue and the pathological change. The study has provided a new view for the clinic treatment of the TRALI.

Key words:TRALI;　EPCs;　transplantation

输血相关急性肺损伤(TRALI)是一种因输血引发的以急性呼吸急迫和非心源肺水肿为主要临床症状的输血并发症,该疾病是目前引起输血性病死的主要疾病之一,其病死率高达 10%左右[1-2]。该疾病是由向受血者输入含有某些特殊成分的血液后引起患者体内某些免疫细胞的活化,肺泡损伤,通透性增加,白细胞介素-10(IL-10)等炎性因子大量渗出,引发机体的急性肺部损伤[3-4]。大量研究已经表明,内皮祖细胞(EPC)在抵抗缺血性损伤、抑制肿瘤生长,以及构建人工血管等医学和生物工程学方面均表现出卓越品质[5-6]。鉴于以往研究,EPC 在治愈 TRALI 的研究还较欠缺,推测 EPC 移植可能会促进 TRALI 的修复[7]。现通过建立输注人类血浆小鼠 TRALI 模型并观察 EPC 移植对小鼠肺部炎性免疫反应及组织病理特点的影响,为 TRALI 的治疗和研究提供一种新的视角和思路。

1　材料与方法

1.1　实验设计　随机对照动物实验。

1.2　时间及地点　2014 年 2 月至 2015 年 12 月在山东医科大学动物实验室完成。

1.3　实验动物　健康 BALB/C 雄性小鼠 36 只,所有小鼠均由山东大学动物研究中心提供,各组小鼠在清洁级屏蔽环境中单笼喂养,可自由饮水、进食,笼具进行定时清洁并行垫料的更换,温度保持 20～24 ℃。对健康指标检测符合标准,实验中对

作者简介:姚海云,男,研究员,主要从事输血相关研究。

动物处置方法符合动物伦理学要求。

1.4 仪器与试剂　(1)台式离心机购自德国 SIGMA 有限公司,显微镜及光镜均由华中科技大学同济医学院附属协和医院(湖北武汉)友情提供。ht2 型 Biocell 酶标仪从中国郑州博赛生物公司购买,－70 ℃冰箱为日本 SANYO 公司提供。(2)体质量均一的 BALB/C 雄性小鼠由山东大学动物研究中心提供,室温 25 ℃,湿度 50%～80%,SPF 环境下自由饮水和采食。PBS 磷酸盐缓冲液由 Hyclone 提供;细胞培养箱购自 Herarus Sepatech 公司。DMEM 培养液、胎牛血清(FBS)和 PBS 均购自 Hyclone;健康纯种的 BALB/B 小鼠由中科院某研究所友情赞助。

1.5 方法

1.5.1 动物模型的建立及分组　(1)本实验 TRALI 动物模型构建进行且某些操作细节略有修改。将 36 只实验小鼠平均随机分为 TRALI 组、正常对照组、EPC 组。TRALI 组、EPC 组各只小鼠进行 1.3 中阐述的模型建立;正常对照组小鼠实施腹腔注射同体积生理盐水处理。2 h 后将 3 组小鼠分别麻醉,对 TRALI 组和 EPC 组小鼠分离股血管并插管,内充 50%肝素/生理盐水混合液,5～10 min 内移除约等于小鼠 10%血容量的血液(约 1 mL),输注等体积的人血浆。(2)造模成功后约 30 min TRALI 组和正常对照组小鼠尾静脉注射 1 mL 磷酸盐缓冲液;EPC 组注射同体积的 EPCs 悬浮液(内含 3×10^6 个)。(3)实验分组,取 36 只 BALB/C 雄性小鼠,随机平分为 TRALI 组($n=12$):腹腔注射脂多糖(LPS),每代谢体质量用量为 2 mg,2 h 后经过静脉输注人血浆,注射量为每只 1 mL;EPC 组($n=12$):同上述阐述的方法进行病理性造模后,尾静脉注入 1 mL EPC(大约含 3×10^6 个细胞);正常对照组($n=12$):采用假手术处理,腹腔注射相同量的生理盐水 2 h 后,静脉注入约 1 mL 生理盐水,尾静脉注入 1 mL PBS 磷酸盐缓冲液。

1.5.2 光镜分析小鼠肺组织病理变化　EPC 注射 12 h 后,所有动物均处死,取出右侧肺脏备用。灌洗完毕之后,将各个实验组小鼠的左侧肺脏组织全部取出,分离并剔除小鼠左侧肺脏的肺叶尖部结缔组织;生理盐水中漂洗并吸干后用体积分数约为 10%的甲醛溶液固定肺脏组织,石蜡包埋后进行切片,使其厚度约为 5 μm。之后采用 HE 染色,在光学显微镜下观察各组小鼠的肺脏组织的病理学变化。

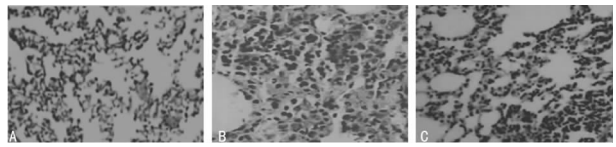
1.5.3 小鼠肺组织湿干比变化　肺脏组织的湿干比变化,注射 EPC 完毕之后,取出小鼠的右侧肺脏组织,用冷生理盐水小心冲掉肺脏表面的血迹,立刻进行右侧肺脏组织的湿质量称质量;然后置于 80 ℃烘箱中进行干燥处理至恒质量,取出称右侧肺脏组织的干质量。计算肺脏组织的湿质量与干质量的比值。

1.5.4 ELISA 测定 BALF 中 IL-10、白细胞介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的含量　选取各组小鼠左侧肺脏舌叶作为灌洗部位以获取 BALF 细胞,所有操作均参照 BAL 相关指南进行。该操作进行 3～4 次,随后用注射器回收,回收液大于 40%则为成功。BALF 中的免疫因子采用 ELISA 进行检测。

1.6 统计学处理　采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计数资料组间比较使用单因素方差(One-way ANOVA)程序分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结　果

2.1 小鼠肺组织病理变化　根据 HE 染色切片可知,与正常对照组小鼠肺脏组织切片比较,TRALI 组小鼠肺脏组织出现明显的充血,可见肺泡内有纤维性蛋白浸润,肺泡内出血,肺泡间隔和支气管管壁均增厚,此外还有大量炎性细胞,如中性粒细胞、巨噬细胞等浸润渗出,并出现增生和聚集。与 TRALI 组比较,EPC 组小鼠的肺脏组织病理学变化不明显,提示得到显著缓解。见图 1。



注:A 表示正常对照组(×200);B 表示 TRALI 组(×200);C 表示 EPC 组(×200)。

图 1　各组小鼠肺组织病理变化

2.2 小鼠肺组织湿干比变化　各组小鼠进行肺组织湿干比结果比较,正常对照组的湿质量较损伤后的肺组织明显减弱,湿干比也相对较小,所以 TRALI 组小鼠肺组织的湿干比增高,各组间比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。如表 1、图 2。

表 1　各组小鼠肺组织湿干比结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	正常对照组	TRALI 组	EPC 组
湿干比	4.23±0.15	8.74±0.21	6.21±0.12

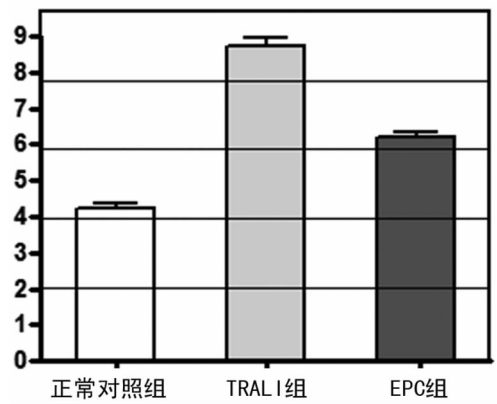


图 2　各组小鼠肺组织湿干比结果比较

表 2　各组 IL-10、IL-1β、TNF-α 含量结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	IL-10	IL-1β	TNF-α
正常对照组	17.15±9.76	11.28±9.89	43.41±10.11
TRALI 组	59.26±14.13	39.51±8.12	117.70±11.16
EPC 组	33.18±9.03	22.14±8.21	70.27±10.22

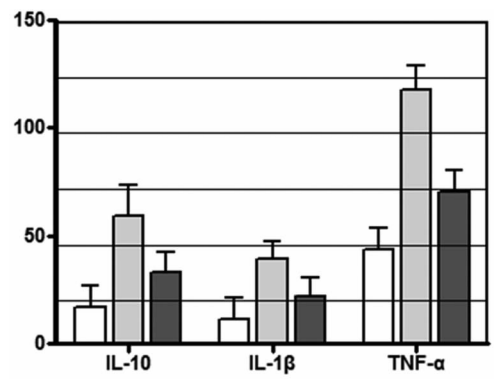


图 3　各组 IL-10、IL-1β、TNF-α 含量结果比较

2.3 各组 IL-10、IL-1β、TNF-α 含量结果比较　正常对照组 IL-10、IL-1β、TNF-α 3 种炎性因子的含量均显著低于 TRALI

组和 EPC 组。EPC 移植后,小鼠支气管肺泡灌洗液中 3 种炎性因子水平均显著低于 TRALI 组,且各组间比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2、图 3。

3 讨 论

本实验 TRALI 模型根据"2 次打击"学说设计。该学说认为 TRALI 患者在炎性状况下引起肺内炎性免疫细胞的活化;缺血进行输血时,所输入的血液中含有某些抗体或生物活性物质,刺激机体活化的炎性细胞释放炎性免疫因子;进而引起患者的肺部组织损伤和呼吸衰竭[8-10]。本实验结果表明,TRALI 组小鼠肺部发生明显病变,与正常对照组比较,肺部充血,间隔变宽,有纤维性黏液浸润,炎性细胞渗出聚集等,提示建模成功。

EPC 主要来源于骨髓,是循环中特征性祖细胞之一,可迁移归巢到血管新生部位增殖、分化为新的血管。目前在改善心肌缺血、肢体缺血、促进肺部血管损伤重建等方面表现出良好的疗效。近年来,其在修复肺部损伤等方面的研究逐渐增加,取得满意结果。国内外大量研究显示,发生急性肺损伤后机体外周血中的 EPC 数量显著上升,这是由于发生组织损伤后,机体内多种趋化因子或信号分子通过信号转导通路动员 EPC 释放出骨髓并参与肺损伤的修复。EPC 进入外周血之后,经过干细胞因子、集落刺激因子等多种活性因子的活化或刺激向组织损伤部位归巢,到达靶组织之后,EPC 将开展损伤修复工作。主要机制包括:分化为新的血管并改善肺部血管内皮功能和结构,维系屏障的完整性并重塑肺部正常的生理结构;通过抑制 NF-κB 等信号转导通路,进而降低 IL-10、IL-1β、TNF-α 等炎性介质水平,缓解炎性反应;提高损伤部位抗氧化体系的活性,抑制氧化应激对损伤部位的伤害。

本研究结果证实,静脉移植 EPC 可改善 TRALI 组小鼠的肺部病理损伤,缓解肺水肿,降低炎性因子水平。这可能是通过上述 EPC 归巢定植并发挥其修复急性肺损伤的作用而实现。然而对于 EPC 改善肺损伤方面的研究都是基于 LPS、缺氧、油酸等诱导的 TRALI 模型,针对 TRALI 模型的研究还较为缺乏。本实验初探了 EPC 移植对 TRALI 的作用,结果表明 EPC 可以保护肺部因"2 次打击"造成的损伤,缓解炎性反应,但是其分子机制还有待进一步验证。

参考文献

[1] 张志永,高艳,黄宇光.输血相关急性肺损伤的研究进展[J].临床麻醉学杂志,2013,29(4):414-416.

[2] 魏明,涂玲,梁颖红,等.输血相关性急性肺损伤患者免疫调节性 T 淋巴细胞表达与预后的关系[J].广东医学,2013,34(5):726-728.

[3] 张京臣,谢慧,陈莹,等.内皮祖细胞对兔急性肺损伤血管通透性的影响[J/CD].中华危重症医学杂志(电子版),2014,7(2):83-87.

[4] 吴倩,朱佳丽,李金宝.中和 IL-17A 对输血相关急性肺损伤小鼠的保护作用[J/CD].中华临床医师杂志(电子版),2015,13(8):83-87.

[5] 魏明,梁颖红,刘佳,等.输血相关急性肺损伤小鼠肺组织血管生成素-2 mRNA 及蛋白表达[J].中华实验外科杂志,2015,32(9):21.

[6] 邓晓杨,徐蕾,朱晓莺,等.子宫腺肌病患者血清的 IL-10、IFN-γ 测定及其临床意义[J].中国实验诊断学,2014,18(10):1657-1659.

[7] 张京臣,翁杰,周飞,等.内皮祖细胞对急性肺损伤保护作用的研究进展[J/CD].中华细胞与干细胞杂志(电子版),2014,4(3):217-221.

[8] Cheng Y,Jiang S,Hu R,et al. Potential mechanism for endothelial progenitor cell therapy in acute myocardial infarction: activation of VEGF-PI3K/Akte-NOS pathway [J]. Ann Clin Lab Sci,2013,43(4):395-401.

[9] 毛梅,王健瑜,汪丽,等.内皮祖细胞对急性损伤肺组织的抗炎作用[J].第三军医大学学报,2015,24(12):2444-2447.

[10] 王海峰,郭伟新,谢南姿,等.乌司他丁注射液改善急性肺损伤兔循环内皮祖细胞成血管能力及对 PKB/eNOS/NO 通路的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2014,10(10):1250-1252.

(收稿日期:2016-08-14 修回日期:2016-10-22)

(上接第 513 页)

[2] Bhagavathula-Venkata SS,Arimappamagan A,Lafazanos S,et al. Syringomyelia secondary to cervical spondylosis: case report and review of literature[J]. J Neurosci Rural Pract,2014,5(Suppl 1):S78-S82.

[3] 邹晓刚.中药、针灸、推拿、牵引综合治疗神经根型颈椎病 19 例[J].中国现代药物应用,2012,6(3):42-43.

[4] Wang C,Tian F,Zhou Y,et al. The incidence of cervical spondylosis decreases with aging in the elderly,and increases with aging in the young and adult population: a hospital-based clinical analysis[J]. Clin Interv Aging,2016,11(5):47-53.

[5] 王会刚,宋全生,朱祥兰.针灸推拿加中药湿热敷治疗神经根型颈椎病 120 例临床观察[J].航空航天医学杂志,2014,12(5):629-631.

[6] 刘洋,肖飞.针灸罐并用治疗颈椎病临床研究[J].中医学报,2013,28(2):295-296.

[7] 沙志静.针灸推拿配合中药治疗神经根型颈椎病的临床疗效分析[J].现代诊断与治疗,2012,23(10):1644-1645.

[8] 林穗双.推拿配合针灸治疗椎动脉型颈椎病疗效观察[J].中医临床研究,2013,10(1):39-40.

[9] 刘亮,李曦光,徐蓉.运动疗法联合推拿治疗颈椎病的临床效果观察[J].检验医学与临床,2015,11(24):3726-3727.

[10] 付忠全.颈椎硬膜外置管注射臭氧联合复方倍他米松治疗颈椎病[J].检验医学与临床,2014,11(8):1087-1088.

[11] 邱建文,王禹燕,麦少云,等.杨刺风池法对椎动脉型颈椎病血流动力学的影响[J].广州中医药大学学报,2013,30(2):179-180.

[12] 胡兆斌.中医药治疗椎动脉型颈椎病临床与实验研究[J].长春中医药大学学报,2013,29(1):109-111.

(收稿日期:2016-08-16 修回日期:2016-10-24)