

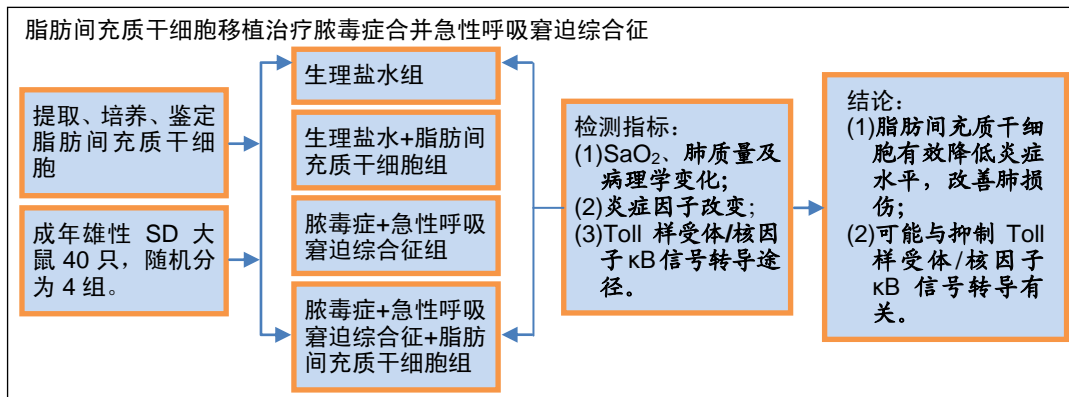
脂肪间充质干细胞移植治疗脓毒症大鼠急性呼吸窘迫综合征及机制

冯芳, 董晨明, 陈宇, 齐艳(兰州大学第二医院重症医学科, 甘肃省兰州市 730000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1589

ORCID: 0000-0002-7458-8551(冯芳)

文章快速阅读:



冯芳, 女, 1982年生, 甘肃省定西市人, 汉族, 2009年兰州大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事重症医学研究。

文献标识码: B

稿件接受: 2018-09-01



文题释义:

脓毒症: 本质上是感染引发的宿主免疫、炎症和凝血机制失调, 但由于宿主反应的复杂性和多样性, 决定了单一针对脓毒症发病机制中某一关键介质或调控环节的治疗措施效果并不显著, 只有从整体上逆转宿主体内免疫反应平衡才能维持重要脏器功能, 并有效防治脓毒症。目前临床上对脓毒症多以对症及支持治疗为主, 尚无特效疗法。多项动物实验显示, 间充质干细胞可以通过平衡炎症反应、调节免疫状态、改善器官功能、降低细菌负荷等途径而提高脓毒症模型动物的生存率, 显示了干细胞在脓毒症治疗方面的巨大潜力。然而, 移植细胞的作用机制不清, 治疗获益有限, 严重限制了脓毒症细胞生物学治疗的临床转化。

Toll 样受体/核因子 κ B 信号转导途径: Toll 样受体是一类介导天然免疫的受体家族, Toll 样受体 4 是连接先天免疫和特异性免疫的跨膜信号转导受体, 主要介导细菌脂多糖的跨膜信号传导, Toll 样受体与配体结合后最终导致核因子 κ B 的活化, 调控炎症和免疫相关基因的表达。核因子 κ B 是一组广泛存在的多向性核转录调节因子, 参与炎症、免疫反应、细胞凋亡和肿瘤发生等多种生物进程。

摘要

背景: 脓毒症合并急性呼吸窘迫综合征病情凶险, 传统治疗以支持为主, 虽对预后有所改善, 但效果不明显, 故急需寻找一种新的有效的治疗手段。间充质干细胞是具有多向分化潜能的干细胞, 可用于多种疾病的治疗, 且已被多项实验证明有效。

目的: 探讨脂肪间充质干细胞对脓毒症大鼠急性呼吸窘迫综合征的保护作用及机制。

方法: ①采用组织细胞贴壁培养法分离大鼠脂肪间充质干细胞; ②按照随机数字表法将成年雄性 SD 大鼠(兰州大学实验动物中心提供)分为生理盐水组(A组)、生理盐水+脂肪间充质干细胞组(B组)、脓毒症+急性呼吸窘迫综合征组(C组)、脓毒症+急性呼吸窘迫综合征+脂肪间充质干细胞组(D组), 每组 10 只; ③A组及 B组大鼠开腹后, 取出盲肠, 然后放回腹腔, 关腹; 12 h 后经尾静脉注射 1.0 mL 生理盐水或 1.0 mL 生理盐水+脂肪间充质干细胞(1.2×10^6 个)。C组及 D组行盲肠结扎穿孔术, 大鼠持续吸纯氧 48 h 后造成肺损伤形成急性呼吸窘迫综合征模型, 12 h 后经尾静脉注射 1.0 mL 生理盐水或脂肪间充质干细胞(1.2×10^6 个); ④建模 24 h 后测定动脉血氧饱和度; 建模 48 h 后计算肺湿/干质量比值; ELISA 检测肺组织炎症因子水平; 苏木精-伊红染色镜下观察肺组织病理学改变; 凝胶电泳迁移率分析肺组织核因子 κ B 活性; RT-PCR、Western Blot 测定肺部 Toll 样受体 2, 4 mRNA 和蛋白表达。

结果与结论: ①与 A组、B组相比较, C组肺湿/干质量比值、肺损伤评分、炎症因子水平、核因子 κ B 活性、Toll 样受体 mRNA 表达、Toll 样受体蛋白表达均明显升高, 动脉血氧饱和度明显下降($P < 0.05$); ②与 C组比较, D组肺湿/干质量比值、肺损伤评分、促炎因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 、白细胞介素 6 水平、核因子 κ B 活性、Toll 样受体 mRNA 表达、Toll 样受体蛋白表达均明显降低($P < 0.05$); 而动脉血氧饱和度和抗炎因子白细胞介素 10 水平明显升高($P < 0.05$); ③A组和 B组各指标比较差异均无显著性意义($P > 0.05$); ④光镜下显示 A组和 B组肺组织病理改变不明显; C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; D组上述肺组织损害减轻; ⑤结果表明, 脂肪间充质干细胞可有效降低脓毒症大鼠急性呼吸窘迫综合征的炎症水平, 改善肺损伤, 其机制可能与抑制 Toll 样受体/核因子 κ B 信号转导有关。

关键词:

脓毒症; 急性呼吸窘迫综合征; 脂肪间充质干细胞; Toll 样受体; 核因子 κ B

主题词:

脓毒症; 肺疾病; 呼吸障碍; 脂肪组织; 间质干细胞移植; Toll 样受体; 组织工程

中图分类号: R459.9; R394.2

Feng Fang, Master,
Attending physician,
Department of Intensive Care
Unit, Second Hospital of
Lanzhou University, Lanzhou
730000, Gansu Province,
China

缩略语:

急性呼吸窘迫综合征: acute respiratory distress syndrome, ARDS; 脂肪间充质干细胞: adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, AD-MSCs

Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation for treating septic rats with acute respiratory distress syndrome and the underlying mechanism

Feng Fang, Dong Chenming, Chen Yu, Qi Yan (Department of Intensive Care Unit, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Sepsis with acute respiratory distress syndrome (ARDS) is a fatal disease, and is usually treated by supporting therapy, which can improve prognosis, but not obviously. Therefore, searching a novel effective method is urgent. Mesenchymal stem cells with multilineage differentiation have been shown to be effective in the treatment of various diseases.

OBJECTIVE: To discuss the protective effect of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs) on ARDS complicated by sepsis and its underlying mechanism.

METHODS: (1) AD-MSCs were isolated by tissue adherent culture from rats. (2) Adult male Sprague-Dawley rats provided by Laboratory Animal Center of Lanzhou University, China were randomly divided into normal saline control group (group A), normal saline+AD-MSCs group (group B), sepsis+ARDS group (group C), sepsis+ARDS+AD-MSCs group (group D) ($n=10$ per group). (3) Rats in the groups A and B were taken out of the cecum after laparotomy, which was then put back into the abdominal cavity that was sutured hereupon. Caudal intravenous injection of normal saline (1.0 mL) or normal saline+AD-MSCs (1.2×10^6) was performed 12 hours later. In the groups C and D, cecal ligation and puncture were performed, ARDS was induced by 100% oxygen inhalation for 48 hours, and then caudal intravenous injection of normal saline (1.0 mL) or AD-MSCs (1.2×10^6) was implemented at 12 hours after modeling. (4) The arterial oxygen saturation was detected at 24 hours after modeling. The lung wet/dry ratio was calculated at 48 hours after modeling. The levels of inflammatory cytokines in lung tissue were detected by ELISA. The pathological changes in lung tissue were observed using hematoxylin-eosin staining. Nuclear factor- κ B activity and mRNA and protein levels of toll-like receptors 2 and 4 in lung tissue were determined by electrophoretic mobility shift assay, RT-PCR and western blot assay, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the groups A and B, in the group C, the lung wet/dry ratio, lung injury score, levels of inflammatory cytokines, nuclear factor- κ B activity, mRNA and protein levels of toll-like receptors were significantly increased, and the arterial oxygen saturation was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the group C, in the group D, there was a significant decrease in the lung wet/dry ratio, lung injury score, levels of pro-inflammatory factors (tumor necrosis factor α , interleukin 1β , interleukin 6), nuclear factor- κ B activity, mRNA and protein levels of toll-like receptors, and a significant increase in the arterial oxygen saturation and level of anti-inflammatory factor (interleukin 10) ($P < 0.05$). There were no significant differences in each index between groups A and B ($P > 0.05$). In the groups A and B, pathological changes in the lung were not obvious under light microscope. In the group C, there was significant lung hyperemia and edema fluid; red blood cells and inflammatory cells in the alveolar cavity were also detected. In the group D, lung damages that mentioned above were alleviated. These results indicate that AD-MSCs can down-regulate the levels of inflammatory factors, reduce lung injury possibly through inhibiting toll-like receptors/nuclear factor- κ B signaling pathway in septic rats with ARDS.

Subject headings: Sepsis; Lung Diseases; Respiration Disorders; Adipose Tissue; Mesenchymal Stem Cell Transplantation; Toll-Like Receptors; Tissue Engineering

0 引言 Introduction

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是临床上常见的急危重症, 其病因复杂多变, 常见病因包括脓毒症、休克、创伤等, 死亡率极高^[1]。目前该病以支持治疗为主, 主要包括机械通气、肺保护通气策略、液体管理策略等。这些技术在一定程度上改善了 ARDS 的疗效, 但死亡率仍在 30%~50% 之间。因此, 积极寻找新的、有效的治疗手段是改善 ARDS 患者预后的关键之一^[2]。脂肪间充质干细胞 (adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, AD-MSCs) 是一类存在于脂肪组织中具有多向分化潜能的干细胞。与骨髓间充质干细胞有很多相似的特征, 它们均是来自中胚层的成体间充质干细胞, 在特定条件下具有多向分化能力, 且诱导分化的体系相似。骨髓间充质干细胞虽然是较早被认知的成体干细胞, 但 AD-MSCs 来源更加丰富、取材更为方便、体外扩增更加容易, 而且其免疫原性很低, 可用于多种疾病的治疗^[3-5]。

实验通过建立脓毒症大鼠 ARDS 模型, 观察其肺组织

炎症因子及病理变化, 探讨 AD-MSCs 的治疗作用及可能机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 以组织细胞为观察对象的体外对照实验。

1.2 时间及地点 实验于 2017 年 8 月至 2018 年 3 月在兰州大学第二医院中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 成年雄性 SD 大鼠 45 只, 体质量 (300±15) g, 其中用于细胞培养大鼠 5 只, 用于模型制作大鼠 40 只, 由兰州大学实验动物中心购进, 动物合格证号: 甘肃省实验动物管委会 GSAL 普-003-01。

1.3.2 实验试剂和仪器 0.1% I 型胶原酶 (美国 Sigma 公司); 低糖 DMEM 完全培养基 (美国 Hyclone 公司); PE 或 APC 标记抗体 CD44、CD45、CD34、CD90 (美国 BD 公司); ELISA 试剂盒 (上海西唐生物科技有限公司); T_4 聚核苷激酶 (美国 Promega 公司); [γ - 32 P]ATP (美国 Amersham 公司); 核因子 κ B (美国 Promega 公司); RT-PCR 试剂盒 (美国 Gibco/BR

公司); RT-PCR引物(兰州大学第二医院中心实验室设计, 上海申友生物技术公司合成); 参照 β -actin抗体(eBioscience, San Diego, CA)。

1.4 实验方法

1.4.1 AD-MSCs的分离培养 麻醉后颈椎脱臼法处死成年雄性SD大鼠5只, 置于盛有体积分数为75%乙醇的烧杯中浸泡10 min, 超净台内分离大鼠腹腔及附睾脂肪组织, 注意避开肉眼可见的小血管, 每0.5 g脂肪组织加200-300 μ L无菌盐水防止脱水, PBS冲洗后将脂肪组织剪成肉糜样小颗粒, 置于15 mL离心管中并加入2倍体积0.1% I型胶原酶, 37 $^{\circ}$ C恒温摇床消化120 min, 加入等体积低糖DMEM完全培养基, 离心、洗涤, 用无菌吸管吸弃上层的脂肪及上清, 保留细胞与组织块沉淀, 完全培养基重悬, 直接接种所有消化后的单细胞及未消化完全的脂肪组织块于6 cm培养皿中, 置于37 $^{\circ}$ C、体积分数为5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。72 h内尽量不移动培养皿, 72 h时可首次更换培养基, 去除未贴壁细胞, 以后隔天半量或3 d全量换液, 细胞生长至80%-90%融合后用0.25%胰酶消化, 以1:2-1:3的比例进行传代接种, 取第3代细胞进行细胞形态学观察及鉴定。每只大鼠能获得(2.0-3.0) $\times 10^6$ AD-MSCs。

1.4.2 细胞免疫表型分析 第3代AD-MSCs生长融合达80%-90%时, 对细胞形态进行观察并拍照, 然后加入胰酶消化细胞, 离心并用PBS洗涤1遍, 血细胞计数板计数, 每管取 10^6 细胞重悬于100 μ L PBS中, 分别加入PE或APC标记抗体CD44、CD45、CD34、CD90, 4 $^{\circ}$ C避光孵育1 h, PBS洗去未标记抗体并重悬, 上流式细胞仪进行分析, 阴性对照为相应抗体的同型IgG。

1.4.3 动物模型制备及分组 成年雄性SD大鼠40只, 按随机数字表法分为生理盐水组、生理盐水+AD-MSCs组、脓毒症+ARDS组、脓毒症+ARDS+AD-MSCs组, 每组10只。

生理盐水组及生理盐水+AD-MSCs组大鼠开腹后, 取出盲肠, 然后放回腹腔, 关腹; 12 h后经尾静脉注射1.0 mL生理盐水或1.0 mL生理盐水+AD-MSCs(1.2×10^6 细胞)。脓毒症+ARDS组及脓毒症+ARDS+AD-MSCs组行盲肠结扎穿孔术, 然后大鼠持续吸纯氧48 h造成肺损伤形成脓毒症ARDS模型^[6], 12 h后经尾静脉注射1.0 mL生理盐水或AD-MSCs(1.2×10^6 细胞)。盲肠结扎穿孔术: 开腹后, 取出盲肠, 用1号无菌手术缝线结扎盲肠近端, 再用22号针刺盲肠挤出粪便, 然后放回腹部, 关腹。

1.4.4 动脉血氧饱和度测定 采集大鼠颈内动脉血1 mL(模型建立24 h), 血气分析仪进行动脉血氧饱和度(SaO₂)测定。

1.4.5 检测指标及方法 模型建立48 h, 麻醉后颈椎脱臼法处死各组大鼠, 取肺组织, 左肺上叶用于病理观察, 右肺上叶称干、湿质量; 其余肺组织置液氮速冻后于-80 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。

1.4.6 肺湿/干质量比值 取右肺上叶称湿质量, 在烤箱里60 $^{\circ}$ C烘干72 h后称干质量, 计算肺湿/干质量比值。

1.4.7 肺组织病理观察

(1)光镜下观察肺组织病理改变: 取左肺上叶, 以40 g/L多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片, 苏木精-伊红染色, 光镜下观察肺组织病理改变。

(2)肺损伤评分: 参照文献方法^[7], 请不了解实验分组的专业病理科医师按照盲法进行肺损伤评分, 详细评分标准如下: ①肺泡水肿; ②肺间质水肿; ③炎症细胞浸润; ④肺泡壁的增厚程度; ⑤肺不张; ⑥透明膜形成。上述6项中每一项均划分为5个级别, 分别计算为0, 1, 2, 3, 4分, 其中0分: 无该病变; 1分: < 25%视野范围内存在该病变; 2分: 25%-50%视野范围内存在该病变; 3分: 51%-75%视野范围内存在该病变; 4分: > 75%视野范围内存在该病变。为了保证评分的准确性, 每只大鼠随机选取3张病理切片, 每张切片随机选取10个视野进行观察, 平均后得到该大鼠的肺损伤评分。

1.4.8 ELISA检测炎症因子水平 ELISA检测肺组织肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 、白细胞介素6、白细胞介素10水平, 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。根据标准品质量浓度与吸光度值绘制标准曲线, 再根据样品吸光度值计算样品质量浓度(ng/L)。

1.4.9 Toll样受体/核因子 κ B信号转导通路相关因子表达

(1)EMSA法测定肺组织核因子 κ B活性: 取100 mg肺组织进行核蛋白提取, 采用考马斯亮蓝比色法(Bradford法)测定蛋白浓度, 紫外分光光度计测定波长为595 nm。采用EMSA法测定核因子 κ B活性。用末端标记法以T₄聚核苷激酶将[γ -³²P]ATP(1.11×10^{17} Bq/mol, 3.7×10^{11} Bq/L)标记在核因子 κ B上, 取20 μ g核蛋白提取物, 与1 μ L [γ -³²P]ATP标记的核因子 κ B结合, 将核蛋白-DNA结合反应物点样于质量分数为7%分离胶和5%浓缩胶的非变性聚丙烯酰胺上, 350 V下电泳2 h, 凝胶取下后, 进行真空加热干燥(80 $^{\circ}$ C), 然后与X射线片曝光24 h。核因子 κ B活性以放射自显影相对密度表示。

(2)RT-PCR法测定肺组织Toll样受体2、Toll样受体4 mRNA表达: 取50 mg肺组织, 按照试剂盒的操作步骤以Trizol试剂提取总RNA。提取产物置于紫外分光光度计下检测A₂₆₀值和A₂₈₀值, A₂₆₀/A₂₈₀处于1.7-2.0之间认为所提取的RNA纯度达到要求。取RNA样本2 μ g采用RT-PCR检测Toll样受体2、Toll样受体4的mRNA表达。以 β -actin为内参照基因。引物由兰州大学第二医院中心实验室设计, 上海申友生物技术公司合成, 见表1。取PCR产物8 μ L, 于1.5%琼脂糖凝胶中电泳。电泳凝胶图谱应用VDS图像分析系统进行摄影和图像分析。将目的基因Toll样受体2、Toll样受体4的扩增片段密度与相应内参照 β -actin扩增片段密度的比值作为其mRNA表达水平的定量指标。

表 1 PCR 引物设计

Table 1 Design of PCR primers

基因	引物(5'→3')	长度(bp)
β -actin	GAC ATT AAA GAG AAG TGT GCT ATG TT	527
Toll 样受体 2	TAT CTA GTT TAT CTT CCT CCT GGT TCA	350
Toll 样受体 4	TGT ATC TTT GAA TAT GAG ATT GCT CAG	469

(3)Western Blot检测肺组织Toll样受体2、Toll样受体4蛋白表达: 提取肺组织蛋白, 采用考马斯亮蓝比色法(Bradford法)测定蛋白浓度。上样量50 μ g, 配制10%分离胶和5%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, 37 $^{\circ}$ C封闭1 h, 加大鼠Toll样受体2、Toll样受体4单克隆抗体(1:200)以及参照 β -actin抗体, 4 $^{\circ}$ C下孵育12 h以上, 然后进行洗膜, 用辣根过氧化物酶偶联的羊抗鼠二抗(1:5 000)室温下孵育2 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Toll样受体2、Toll样受体4的灰度值与相应内参照 β -actin的灰度值比值作为表达量。

1.5 主要观察指标 ①大鼠AD-MSCs的形态及细胞表面抗原表达; ②AD-MSCs干预后脓毒症合并ARDS大鼠血氧饱和度、肺质量、病理学及炎症因子的变化; ③AD-MSCs对Toll样受体/核因子 κ B信号转导途径的影响。

1.6 统计学分析 应用SPSS 21.0统计软件处理。结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。以上数据均采用非参数kruskal-Wallis检验比较, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 体外培养AD-MSCs的形态和鉴定结果 通过组织细胞贴壁法分离接种至培养瓶, 7 d后可见有大量原代细胞爬出, 形态呈长条形。传代后, 细胞呈集落样生长, 可见明显的长梭形, 细胞呈漩涡状或放射状排列, 见图1。流式细胞仪检测APC-CD90、PE-CD44双阳性且PE-CD34、PE-CD45双阴性表达的细胞被认为是AD-MSCs^[8], 见图2。

2.2 各组大鼠的动脉血氧饱和度(SaO₂)比较 生理盐水组、生理盐水+AD-MSCs组SaO₂明显高于脓毒症+ARDS组、脓毒症+ARDS+AD-MSCs组($P < 0.05$), 脓毒症+ARDS+AD-MSCs组SaO₂高于脓毒症+ARDS组($P < 0.05$), 但是生理盐水组、生理盐水+AD-MSCs组之间比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 见图3。

2.3 各组大鼠肺湿/干质量比值比较 通过肺湿/干质量比来反映大鼠肺水肿程度, 比值越大, 肺水肿越严重。生理盐水组与生理盐水+AD-MSCs组肺湿/干质量比值比较, 差异无显著性意义($P > 0.05$), 且两组比值均小于脓毒症+ARDS组、脓毒症+ARDS+AD-MSCs组($P < 0.05$); 脓毒症+ARDS+AD-MSCs组肺湿/干质量比值小于脓毒症+ARDS组($P < 0.05$), 见图4。

2.4 各组大鼠肺组织病理观察结果

2.4.1 光镜下观察肺组织病理改变 苏木精-伊红染色可见: 生理盐水组和生理盐水+AD-MSCs组大鼠肺泡结构完整, 肺泡腔干净无出血, 肺泡间隔和肺间质血管结构基本正常。脓毒症+ARDS组肺泡结构紊乱, 肺泡腔出血水肿明显, 炎性细胞浸润, 肺泡壁增厚, 肺泡间隔和肺间质明显水肿、增厚。脓毒症+ARDS+AD-MSCs组肺间质及肺泡间隔充血、水肿较脓毒症+ARDS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, 见图5。

2.4.2 肺损伤评分 与生理盐水组及生理盐水+AD-MSCs组相比, 脓毒症+ARDS组及脓毒症+ARDS+AD-MSCs组肺损伤评分升高, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。经过AD-MSCs干预后, 肺组织病理学得到不同程度改善, 脓毒症+ARDS+AD-MSCs组比脓毒症+ARDS组肺组织损伤评分明显降低, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 见图6。

2.5 各组大鼠肺组织炎症因子水平比较 与生理盐水组相比, 生理盐水+AD-MSCs组肺组织肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 、白细胞介素6、白细胞介素10水平均无明显变化(均 $P > 0.05$); 脓毒症+ARDS组及脓毒症+ARDS+AD-MSCs组各指标均明显升高(均 $P < 0.05$)。与脓毒症+ARDS组相比, 脓毒症+ARDS+AD-MSCs组肺组织肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 、白细胞介素6水平均明显降低(均 $P < 0.05$), 抗炎因子白细胞介素10水平明显升高($P < 0.05$), 见图7。

2.6 Toll样受体/核因子 κ B信号转导通路相关因子表达

2.6.1 肺组织核因子 κ B活性 EMSA结果显示, 与生理盐水组相比, 生理盐水+AD-MSCs组肺组织核因子 κ B活性无变化($P > 0.05$)。与生理盐水组及生理盐水+AD-MSCs组比较, 脓毒症大鼠肺组织核因子 κ B活性明显增强($P < 0.05$); 与脓毒症+ARDS组相比, 脓毒症+ARDS+AD-MSCs组肺组织核因子 κ B活性明显降低($P < 0.05$), 见图8。

2.6.2 肺组织Toll样受体2、Toll样受体4 mRNA表达 与生理盐水组相比, 生理盐水+AD-MSCs组肺组织Toll样受体2、Toll样受体4 mRNA表达无变化($P > 0.05$)。与生理盐水组及生理盐水+AD-MSCs组比较, 脓毒症大鼠肺组织Toll样受体2、Toll样受体4 mRNA表达明显增强($P < 0.05$); 与脓毒症+ARDS组相比, 脓毒症+ARDS+AD-MSCs组Toll样受体2、Toll样受体4 mRNA表达明显降低($P < 0.05$), 见图9。

2.6.3 肺组织Toll样受体2、Toll样受体4蛋白表达 与生理盐水组相比, 生理盐水+AD-MSCs组肺组织Toll样受体2、Toll样受体4蛋白表达无变化($P > 0.05$)。与生理盐水组及生理盐水+AD-MSCs组比较, 脓毒症大鼠肺组织Toll样受体2、Toll样受体4蛋白表达明显增强($P < 0.05$); 与脓毒症+ARDS组相比, 脓毒症+ARDS+AD-MSCs组肺组织Toll样受体2、Toll样受体4蛋白表达明显降低($P < 0.05$), 见图10。

3 讨论 Discussion

脓毒症是一种宿主对感染反应失调导致的系统性炎症反应,进而发展为威胁生命的器官功能紊乱,而肺成为其首当其冲受累的脏器,这种肺功能的紊乱进展迅速、难以在短时间内恢复,进而发展为ARDS^[9]。近年来,尽管对脓毒症的认识不断深入,诊疗手段不断改善,但脓毒症预后却未明显改善。研究表明,脓毒症本质是感染引起的宿主免疫、炎症和凝血机制失调,但由于宿主反应的复杂性和多样性,决定了单一针对脓毒症发病机制中的某一环节的治疗措施效果并不显著,只有从整体上逆转宿主体内免疫反应平衡才能维持重要脏器功能,并有效防治脓毒症^[10]。

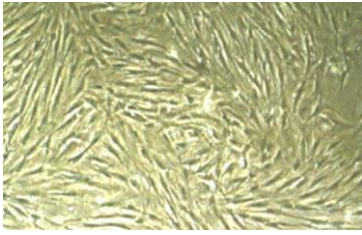
间充质干细胞来源于中胚层,具有多向分化潜能,可分化为成骨细胞、成软骨细胞、心肌细胞,甚至肺泡上皮细胞等。骨髓间充质干细胞具有易于分离培养,不涉及伦理道德问题等诸多优点,是最常用的研究对象。然而,间充质干细胞在成人骨髓中含量稀少,分离并扩增高纯度的骨髓间充质干细胞比较困难,且骨髓中间充质干细胞的数量及增殖分化能力随着年龄的增长显著降低。而AD-MSCs因其取材方便、损伤小、细胞活力好、能快速增殖、纯化等特点而受到越来越多研究人员关注。在功能方面,AD-MSCs具有与骨髓间充质干细胞相似的生物学特性,如自我更新及分化功能,通过分泌抗炎因子和抑制促炎因子减轻宿主的炎症反应等^[11-12],而且其免疫调节功能更强^[13-14],更适于细胞治疗的基础研究与临床应用,尤其是免疫、炎症相关性疾病。该研究运用贴壁法成功从大鼠脂肪组织中分离到AD-MSCs,实验结果显示其形态呈长梭形,类似成纤维细胞,同时APC-CD90、PE-CD44双阳性且PE-CD34、PE-CD45双阴性表达,证明分离得到的细胞符合国际公认标准定义的AD-MSCs。

脓毒症的动物模型种类繁多,目前脂多糖法和盲肠结扎穿孔术法建立大鼠脓毒症模型为广泛所接受^[6]。与脂多糖法导致的系统急性炎症相比,盲肠结扎穿孔术法能较好的模拟临床上脏器穿孔所致的急性腹膜炎性脓毒症的特点,其原理是肠道细菌移位,引起腹腔细菌感染,从而激活免疫系统,产生持久的细胞因子和炎性因子刺激,最终出现全身炎症反应综合征、脓毒症休克等多脏器衰竭。因此利用此法建立脓毒症动物模型也成为金标准^[15]。

影响脓毒症模型的因素较多,如大鼠体质量、周龄、手术方式等,故该研究制备脓毒症大鼠模型是统一标准,同批成年雄性SD大鼠,体质量(300±15)g,饲养方式、手术方式及纯氧吸入时间方式等均相同。结果发现,脓毒症+ARDS组苏木精-伊红染色肺组织有肺泡结构紊乱、肺泡间隔破坏、炎性细胞浸润、肺泡腔出血水肿等典型ARDS表现,生理盐水组及生理盐水+AD-MSCs组肺脏无明显损伤表现,提示所制备的脓毒症ARDS模型可靠。该研究中,与脓毒症+ARDS组相比,脓毒症+ARDS+AD-MSCs组通过尾静脉注射AD-MSCs,能提高大鼠血氧饱和度,降低肺

湿/干质量比值,改善肺间质及肺泡充血、水肿并降低肺损伤评分,证明AD-MSCs可以修复受损的肺组织。肺湿/干质量比值可以反映肺水肿的程度,该项研究中,与生理盐水组及生理盐水+AD-MSCs组相比,脓毒症+ARDS组、脓毒症+ARDS+AD-MSCs组肺湿/干质量比值明显增高,间接证明脓毒症ARDS模型建立成功。关于脓毒症ARDS发病机制多集中在炎症激活、氧化应激损伤、细胞凋亡等方面。脓毒症时各炎症因子构成一个复杂的网络,作用多效、相互协同或彼此拮抗,一旦平衡被打破,则发生炎症失控,导致肺组织及全身靶器官组织的损伤^[16]。该研究对肺组织中的4个炎症因子水平进行测定,造模后肺组织中促炎因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 、白细胞介素6水平表达明显增高,抗炎因子白细胞介素10水平也有增高,当AD-MSCs干预后,则促炎因子水平明显降低,抗炎因子则明显增高,证明AD-MSCs可以抑制炎症反应。以上研究表明AD-MSCs辅助治疗脓毒症ARDS,可以改善氧合,减轻肺水肿及肺组织损伤,促进抗炎反应及抑制炎症反应,这与近年的临床及动物实验结果一致,肯定了AD-MSCs治疗脓毒症ARDS的有效性。

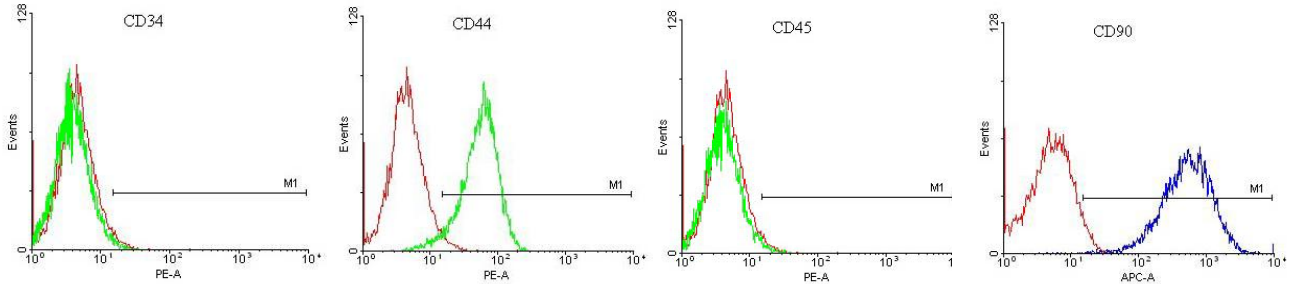
Toll样受体/核因子 κ B信号转导通路在脓毒症ARDS发生发展中占重要地位^[17]。Toll样受体是最早在果蝇体内发现的一种信号转导蛋白,是天然免疫系统重要组成部分,至今已发现10多种人类Toll样受体,是一类具有信号转导功能的跨膜蛋白,也是介导生物源性及非生物源性刺激而启动炎症反应的“门户”蛋白,可激活机体先天性免疫系统,其信号通路最直接效应是通过活化核因子 κ B和(或)MAPK促进前炎症细胞因子和趋化因子分泌如白细胞介素6、白细胞介素8、肿瘤坏死因子 α 等,诱导炎症反应。Toll样受体在肺分布广泛,从气道上皮细胞、肺泡上皮细胞、肺泡巨噬细胞到肺动脉上皮细胞均有功能表达;大量的动物和体外细胞实验均已证实Toll样受体与肺部感染性疾病产生的炎症反应密切相关,且Toll样受体家族成员中Toll样受体2/4作为识别细菌共有成分“模式”受体在感染的发生与发展中可能居核心地位^[18-20]。Toll样受体2具有广泛识别能力,可识别革兰阳性细菌的肽聚糖、磷壁酸和革兰阴性细菌、真菌、螺旋体以及支原体等^[21]。Toll样受体4是第一个被发现的存在于人细胞表面的Toll样蛋白,主要识别革兰阴性细菌的细胞壁成分,如参与脂多糖的识别与信号转导过程^[22-24]。Toll样受体识别相应配体后通过一系列跨膜信号转导激活细胞内的转录因子核因子 κ B,活化的核因子 κ B获自由从胞质移入胞核内从而促进一系列炎症递质表达,最终促进ARDS的发生。该研究运用EMSA、RT-PCR、Western Blot方法分别检测肺组织中核因子 κ B活性、Toll样受体mRNA表达、Toll样受体蛋白水平以及AD-MSCs对其干预的效应,结果发现,与生理盐水组及生理盐水+AD-MSCs组相比,脓毒症+ARDS组、脓毒症+ARDS+AD-MSCs组经盲肠结扎穿孔术诱导了大鼠肺组织核因子 κ B活性,同时



图注: 培养第3代脂肪间充质干细胞形态呈均一纤维样、漩涡状或放射状。

图1 第3代脂肪间充质干细胞的形态($\times 40$)

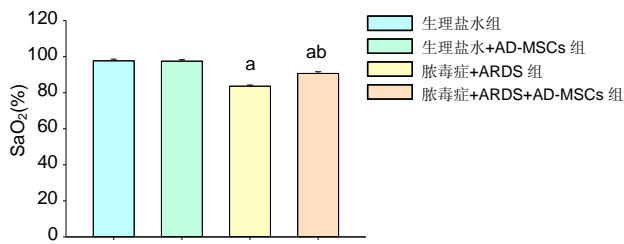
Figure 1 Morphology of passage 3 adipose tissue-derived mesenchymal stem cells ($\times 40$)



图注: 流式细胞仪检测 APC-CD90、PE-CD44 双阳性表达, PE-CD34、PE-CD45 双阴性表达。

图2 脂肪间充质干细胞的表型鉴定

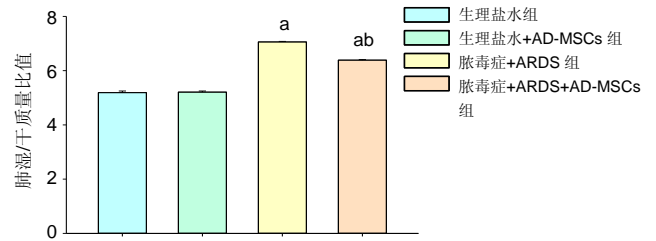
Figure 2 Phenotypic characterization of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells



图注: 与生理盐水组、生理盐水+AD-MSCs 组比较, $^aP < 0.05$; 与脓毒症+ARDS 组比较, $^bP < 0.05$ 。ARDS: 急性呼吸窘迫综合征; AD-MSCs: 脂肪间充质干细胞。

图3 各组大鼠动脉血氧饱和度比较

Figure 3 Arterial oxygen saturation of rats in each group



图注: 与生理盐水组、生理盐水+AD-MSCs 组比较, $^aP < 0.05$; 与脓毒症+ARDS 组比较, $^bP < 0.05$ 。ARDS: 急性呼吸窘迫综合征; AD-MSCs: 脂肪间充质干细胞。

图4 各组大鼠肺湿/干质量比值比较

Figure 4 Lung wet/dry ratio of rats in each group

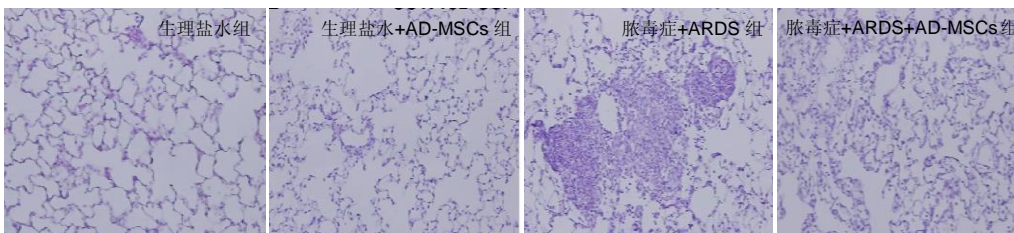
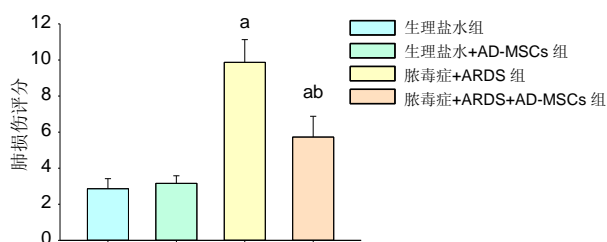


图5 光镜下观察各组大鼠肺组织病理改变($\times 100$)

Figure 5 Histopathological findings in the rat lung under light microscope ($\times 100$)

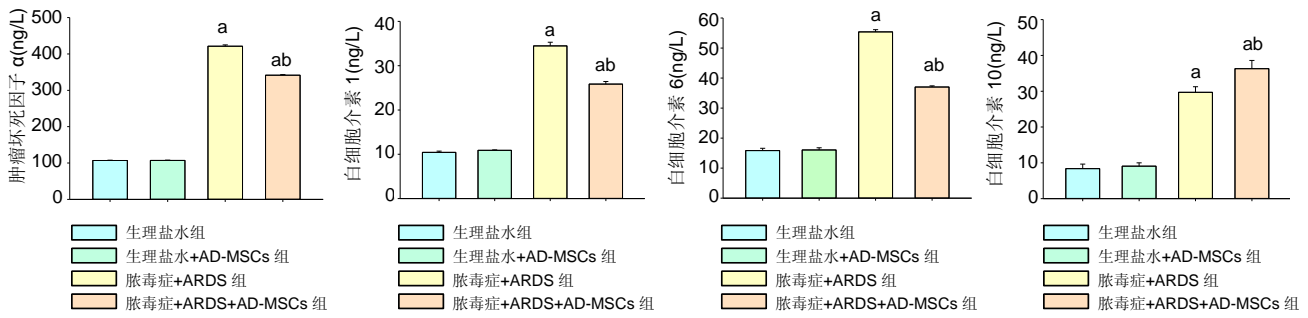
图注: ARDS: 急性呼吸窘迫综合征; AD-MSCs: 脂肪间充质干细胞。



图注: 与生理盐水组、生理盐水+AD-MSCs 组比较, $^aP < 0.05$; 与脓毒症+ARDS 组比较, $^bP < 0.05$ 。ARDS: 急性呼吸窘迫综合征; AD-MSCs: 脂肪间充质干细胞。

图6 各组大鼠肺损伤评分比较

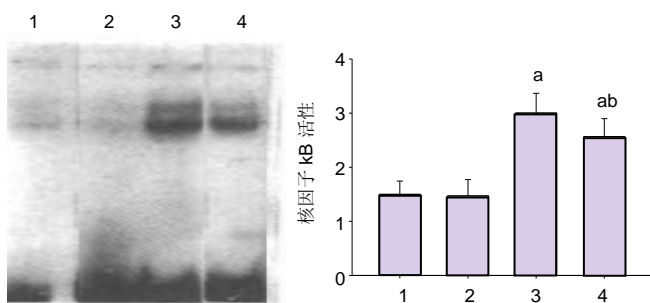
Figure 6 Lung injury score of rats in each group



图注: 与生理盐水组、生理盐水+AD-MSCs 组比较, ^a $P < 0.05$; 与脓毒症+ARDS 组比较, ^b $P < 0.05$ 。ARDS: 急性呼吸窘迫综合征; AD-MSCs: 脂肪间充质干细胞。

图 7 各组大鼠肺组织炎症因子水平比较

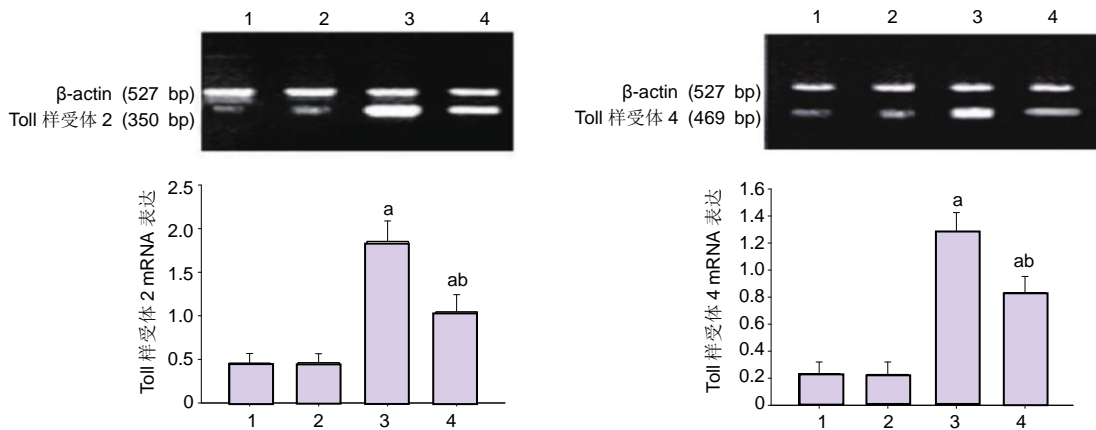
Figure 7 Levels of inflammatory factors in the rat lung tissue



图注: 1: 生理盐水组; 2: 生理盐水+AD-MSCs 组; 3: 脓毒症+ARDS 组; 4: 脓毒症+ARDS+AD-MSCs 组。与生理盐水组、生理盐水+AD-MSCs 组比较, ^a $P < 0.05$; 与脓毒症+ARDS 组比较, ^b $P < 0.05$ 。ARDS: 急性呼吸窘迫综合征; AD-MSCs: 脂肪间充质干细胞。

图 8 各组大鼠肺组织核因子 κB 活性

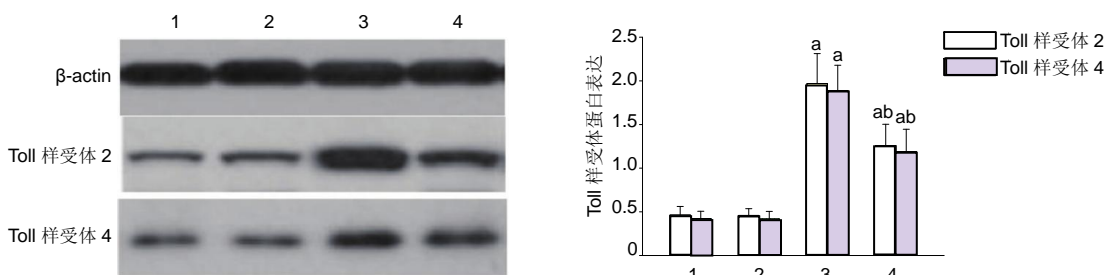
Figure 8 Nuclear factor-κB activity in the rat lung tissue



图注: 1: 生理盐水组; 2: 生理盐水+AD-MSCs 组; 3: 脓毒症+ARDS 组; 4: 脓毒症+ARDS+AD-MSCs 组。与生理盐水组、生理盐水+AD-MSCs 组比较, ^a $P < 0.05$; 与脓毒症+ARDS 组比较, ^b $P < 0.05$ 。ARDS: 急性呼吸窘迫综合征; AD-MSCs: 脂肪间充质干细胞。

图 9 各组大鼠肺组织 Toll 样受体 mRNA 表达

Figure 9 mRNA expression of toll-like receptors in the rat lung tissue



图注: 1: 生理盐水组; 2: 生理盐水+AD-MSCs 组; 3: 脓毒症+ARDS 组; 4: 脓毒症+ARDS+AD-MSCs 组。与生理盐水组、生理盐水+AD-MSCs 组比较, ^a $P < 0.05$; 与脓毒症+ARDS 组比较, ^b $P < 0.05$ 。ARDS: 急性呼吸窘迫综合征; AD-MSCs: 脂肪间充质干细胞。

图 10 各组大鼠肺组织 Toll 样受体蛋白表达

Figure 10 Protein expression of toll-Like receptors in the rat lung tissue

Toll样受体2、Toll样受体4 mRNA表达及蛋白水平上调, 而AD-MSCs干预能抑制核因子 κ B活性, 降低Toll样受体2、Toll样受体4 mRNA表达及蛋白水平。根据结果推测AD-MSCs下调炎症递质、减轻肺损伤可能通过抑制Toll样受体/核因子 κ B信号转导通路实现, 但并没有进一步应用特异性的阻断剂进行观察, 因此并不能排除其他途径也参与AD-MSCs的抗炎作用。

作者贡献: 实验设计、实施为冯芳, 实验评估为董晨明, 资料收集为陈宇、齐艳。

经费支持: 该文章没有接受任何经费支持。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经兰州大学第二医院动物实验伦理委员会批准, 批准号为016765980。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南: 本研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过兰州大学公共卫生学院统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Phua J, Badia JR, Adhikari NK, et al. Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time? : A systematic review. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179(3):220-227.
- [2] Silversides JA, Ferguson ND. Clinical review: Acute respiratory distress syndrome - clinical ventilator management and adjunct therapy. *Crit Care*. 2013;17(2):225.
- [3] 许婧.脂肪间充质干细胞增殖和定向分化能力与p16ink4a基因表达的关系[D]. 长沙:湘雅医学院,2013.
- [4] Lu F, Mizuno H, Uysal CA, et al. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg*. 2008;121(1):50-58.
- [5] Fernandes M, Valente SG, Sabongi RG, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. *Neural Regen Res*. 2018;13(1):100-104.
- [6] Sun CK, Lee FY, Kao YH, et al. Systemic combined melatonin-mitochondria treatment improves acute respiratory distress syndrome in the rat. *J Pineal Res*. 2015;58(2):137-150.
- [7] Hayes M, Curley G, Ansari B, et al. Clinical review: Stem cell therapies for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome - hope or hype. *Crit Care*. 2012;16(2):205.
- [8] Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002;105(1):93-98.
- [9] Sharifov OF, Xu X, Gaggar A, et al. Anti-inflammatory mechanisms of apolipoprotein A-I mimetic peptide in acute respiratory distress syndrome secondary to sepsis. *PLoS One*. 2013;8(5):e64486.
- [10] Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003;348(2):138-150.
- [11] Nakanishi C, Nagaya N, Ohnishi S, et al. Gene and protein expression analysis of mesenchymal stem cells derived from rat adipose tissue and bone marrow. *Circ J*. 2011;75(9):2260-2268.
- [12] Toyoda M, Matsubara Y, Lin K, et al. Characterization and comparison of adipose tissue-derived cells from human subcutaneous and omental adipose tissues. *Cell Biochem Funct*. 2009;27(7):440-447.
- [13] Melief SM, Zwaginga JJ, Fibbe WE, et al. Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts. *Stem Cells Transl Med*. 2013;2(6):455-463.
- [14] Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, et al. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev*. 2012;21(14):2724-2752.
- [15] Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc*. 2009;4(1):31-36.
- [16] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801-810.
- [17] Xiang M, Fan J. Pattern recognition receptor-dependent mechanisms of acute lung injury. *Mol Med*. 2010;16(1-2):69-82.
- [18] Abel B, Thieblemont N, Quesniaux VJ, et al. Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *J Immunol*. 2002;169(6):3155-3162.
- [19] Wang X, Moser C, Louboutin JP, et al. Toll-like receptor 4 mediates innate immune responses to Haemophilus influenzae infection in mouse lung. *J Immunol*. 2002;168(2):810-815.
- [20] Branger J, Knapp S, Weijer S, et al. Role of Toll-like receptor 4 in gram-positive and gram-negative pneumonia in mice. *Infect Immun*. 2004;72(2):788-794.
- [21] Su Q, Grabowski M, Weindl G. Recognition of Propionibacterium acnes by human TLR2 heterodimers. *Int J Med Microbiol*. 2017;307(2):108-112.
- [22] 张玖强,张兴毅,李莹.ToLL样受体4的临床应用研究进展[J].中国急救医学,2012,32(9):849-851.
- [23] Gosemann JH, van Griensven M, Barkhausen T, et al. TLR4 influences the humoral and cellular immune response during polymicrobial sepsis. *Injury*. 2010;41(10):1060-1067.
- [24] Gaikwad S, Naveen C, Agrawal-Rajput R. Toll-like receptor-4 antagonism mediates benefits during neuroinflammation. *Neural Regen Res*. 2016;11(4):552-553.