

胚胎干细胞治疗博来霉素诱导的小鼠肺纤维化

余慧¹ 胡洋¹ 李惠萍^{1Δ} 褚建新² 唐帆²

(¹上海市同济大学附属上海市肺科医院呼吸科 上海 200433; ²上海交通大学附属新华医院发育生物学实验室 上海 200092)

【摘要】目的 研究静脉注射胚胎干细胞(ESC)对肺纤维化小鼠的治疗作用。**方法** 气管内滴注博来霉素 8.5 mg/kg 制作 C57/BL6 雌性小鼠的肺纤维化模型。治疗组($n=20$)静脉注射 S8 小鼠 ESC,对照组($n=10$)注射生理盐水。治疗组又分为单次治疗($n=10$)和重复治疗($n=10$),两者均在造模后 1 h 静脉注射 ESC,重复治疗组在造模后 3 d 再次静脉注射 ESC。记录小鼠的生存时间,测定小鼠肺组织的羟脯氨酸含量,肺脏病理学观察炎症状态。利用秩和检验统计 3 组小鼠生存时间,方差分析 3 组小鼠肺羟脯氨酸含量的差异。**结果** 接受干细胞治疗后,肺纤维化模型小鼠的生存时间(d)延长,重复治疗组更加明显(对照组、单次治疗组、重复治疗组分别为 7.8 ± 2.8 、 8.4 ± 3.8 、 13.5 ± 5.6 , $P < 0.01$);肺羟脯氨酸含量($\mu\text{g}/\text{mL}$)降低(对照组、单次治疗组、重复治疗组分别为 8.59 ± 1.14 、 8.23 ± 1.09 、 5.51 ± 0.39 , $P < 0.01$);肺脏病理检查显示肺组织炎症程度降低,结构破坏减轻。**结论** 静脉注射胚胎干细胞可以减轻博来霉素诱导的小鼠肺部炎症和肺纤维化,延长肺纤维化小鼠的生存时间。

【关键词】 特发性肺纤维化; 胚胎干细胞; 羟脯氨酸

【中图分类号】 R 563.1⁺3 **【文献标识码】** A

The treatment of embryonic stem cell to pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mouse

YU Hui¹, HU Yang¹, LI Hui-ping^{1Δ}, CHU Jian-xin², TANG Fan²

(¹Department of Respiratory Disease, Shanghai Pneumology Hospital, Tongji University, Shanghai 200433, China;

²Laboratory of Developmental Biology, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China)

【Abstract】Objective To observe the effect of embryonic stem cell (ESC) on mice model of pulmonary fibrosis induced by bleomycin. **Methods** Pulmonary fibrosis was induced in C57/BL6 mice by bleomycin drop-in to trachea. Intravenous ESC were injected in treatment group 2 and 3 ($n=10$ in each group) 1 hour after bleomycin exposure. Sodium chloride was injected in another 10 mice as control in group 1. Mice in group 3 received ESC repeatedly 3 days after bleomycin exposure. The life-spans and hydroxyproline concentrations were examined. The pulmonary inflammation of mice in deferent groups were observed by pathological method. Kruskal-Wallis test and ANOVA were used to tell deference among three groups. **Results** The life-spans of mice were significantly ($P < 0.01$) longer in treatment group 2 (8.4 ± 3.8 days) and group 3 (13.5 ± 5.6 days) than those in control group 1 (7.8 ± 2.8 days). Meanwhile, the hydroxyproline concentration in group 2 [$(8.23 \pm 1.09) \mu\text{g}/\text{mL}$] and group 3 [$(5.51 \pm 0.39) \mu\text{g}/\text{mL}$] decreased significantly ($P < 0.01$) than those in control group 1 [$(8.59 \pm 1.14) \mu\text{g}/\text{mL}$]. Pathological examination showed that inflammation in lungs of treatment group 2 and 3 was less severe than that in control group 1. **Conclusions** ESC injection may inhibit pulmonary inflammation and fibrosis induced by bleomycin in C57/BL6 mice and can lengthen lifetime of the mice.

【Key words】 idiopathic pulmonary fibrosis; embryonic stem cell; hydroxyprolin

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种慢性、进展性的间质性肺疾病。IPF的主要症状是进行性气促,相应的病理学特征是肺间质的炎症和纤维沉积。IPF作为最常见的间质性肺疾病之一,病死率很高,确诊后5年死亡率为50%~70%^[1]。目前缺乏有效的内科治疗可以逆转或者缓解自然病程。对于严重的IPF患者,肺移植是唯一有效的治疗手段;但是仅有少数患者接受手术,因为手术对患者的心肺功能有一定要求;也因为供体肺的数量不足以满足移植需要。因此,寻找IPF治疗的新方法成为呼吸科研究的热点。

干细胞是一类具有自我更新和分化成为特定种类细胞能力的细胞。胚胎干细胞来源于囊胚期胚胎的内细胞群,具有自我更新和多向分化的潜能。理论上,胚胎干细胞可以分化成为几乎200多种以上不同的已知细胞。多年来,研究人员积极探索,希望用干细胞代替受损或者病变组织的细胞,从而对疾病或残疾造成的组织和器官进行修复和替代,最终重建机体功能。迄今为止,干细胞对帕金森病、糖尿病、肝纤维化、心肌梗死、肾脏疾病均显示出有益的作用^[2-4]。

本试验利用博来霉素制作小鼠的肺纤维化模型,静脉注射胚胎干细胞,观察小鼠的生存时间,测定肺组织羟脯氨酸含量,以此反映胚胎干细胞对小鼠肺纤维化的影响;单次或两次给予胚胎干细胞,比较其作用差异。希望为肺纤维化的治疗提供新的方法。

材料和方法

实验动物及试剂

C57BL/6 小鼠:30只,雌性,6~8周龄,平均体重19.8g。购自中国科学院上海实验动物中心。饲养于新华医院SPF级动物房。

博来霉素针剂:15mg/支,日本化药株式会社(NIPPON KAYAKU CO. LTD)。生理盐水稀释,配制成为终浓度为1.7mg/mL的博来霉素溶液。

S8胚胎干细胞:雄性小鼠来源,发育生物学实验室提供。制成浓度 $1.0 \times 10^6/0.3$ mL的单细胞悬液作为供体。

速眠新针剂:长春军需大学兽医研究所(批号:20040921)。

羟脯氨酸标准品:分析纯,上海市化学试剂公司(批号:2005112304)。

DMBA(二甲氨基苯甲醛)显色剂:12g DMAB溶于20mL无水乙醇,加入20mL无水乙醇于浓硫

酸混合液(V/V = 100:13.7),微热溶解,冰箱保存待用。

X-gal染色试剂盒:上海杰美基因医药科技有限公司。

肺纤维化动物模型的制作 参考文献报道制作小鼠肺纤维化模型^[5]。小鼠经腹腔注射速眠新针剂麻醉,固定、颈部剪毛,75%酒精消毒后剪开皮肤,钝性分离皮下组织暴露气管。注入博来霉素溶液(8.5mg/kg,约需0.1mL)。旋转小鼠变换体位,使得博来霉素均匀分布。止血钳夹合颈部皮肤切口。苏醒后常规饲养。

动物分组及处理 30只雌性小鼠随机分为3组(每组 $n = 10$)。第1组为对照组:如上所述,经气管滴入博来霉素0.1mL制作肺纤维化模型。1h后、3d后经尾静脉注射生理盐水0.3mL。第2组为单次干细胞治疗组:经气管滴入博来霉素0.1mL制作肺纤维化模型,1h后经尾静脉注射S8小鼠来源的胚胎干细胞 $1.0 \times 10^6/0.3$ mL。3d后注射生理盐水0.3mL。第3组为重复干细胞治疗组。经气管滴注博来霉素0.1mL制作肺纤维化模型。1h后经尾静脉注射S8小鼠来源的胚胎干细胞 $1.0 \times 10^6/0.3$ mL。3d后再次经尾静脉注射S8小鼠来源的胚胎干细胞 $1.0 \times 10^6/0.3$ mL。

肺组织中干细胞的检测 S8-ESC中含有半乳糖苷酶Z(LacZ)基因,我们采用x-半乳糖(x-gal)染色的方法来检测S8-ESC中的LacZ基因,以观察干细胞经静脉注射进入体内后是否能够在肺脏中定植。试验方法参考试剂盒说明。表达 β -半乳糖苷酶的细胞为阳性细胞,呈现深蓝色。

小鼠平均存活时间 经上述处理的小鼠分组常规饲养,每日2次观察小鼠的生存状态(8:00与20:00)。小鼠自主呼吸停止、四肢伸展判断为死亡。试验当天的生存时间为0d,此后每日2次观察,存活小鼠每次增加存活时间0.5d,死亡小鼠终止计算存活时间并进行肺组织羟脯氨酸测定和病理检查。观察期为28d(根据预实验结果,上述剂量博来霉素制作的肺纤维化模型小鼠,存活时间 ≤ 21 d)。记录各组10只小鼠的存活时间,计算各组小鼠的平均存活时间(d),以均数 \pm 标准差表示。

羟脯氨酸含量测定 采用酸水解法测定羟脯氨酸含量^[6]。基本步骤如下:

制作标准曲线 取羟脯氨酸标准品,双蒸水配制成10、20、30、40、50 μ g/mL的标准品溶液,依次用10mol/L KOH、1mol/L HCL、1mol/L KOH、0.05mol/L HCL、0.05mol/L KOH中和,经还原、沸水浴及萃取后,与0.8mL DMBA试剂混合,室温

显色 30 min, 测定 D_{560} 。以羟脯氨酸浓度为横坐标, D_{560} 数值为纵坐标, 制作标准曲线。

测定肺组织羟脯氨酸含量 小鼠取出肺脏, 右肺烘干研碎成为组织粉末并混匀。称取 7.5 mg 待测肺组织粉末置于水解管中, 加入 3 mL 6 mol/L 盐酸震荡悬浮, 110 °C 酸解 18 h。取 1 mL 酸解液同前所述中和、还原、沸水浴及萃取后, DMBA 显色, 测定 D_{560} , 参照标准曲线计算羟脯氨酸浓度, 以单位体积肺组织酸解溶液中的羟脯氨酸含量表示 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)。羟脯氨酸是胶原蛋白的主要组分, 比较各组小鼠肺组织羟脯氨酸含量的差异, 用以反映肺组织胶原蛋白含量的变化。

病理检查 小鼠取出肺脏, 左肺固定于 10% 中性甲醛 24 h, 经脱水、浸蜡、包埋后制作石蜡切片(切片厚度 4 μm), HE 染色观察肺脏病理学改变, 了解肺脏炎症的程度。

统计学处理 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 3 组间比较采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

平均存活时间 至试验第 28 天, 3 组小鼠的死亡率依次为: 对照组 100%, 单次干细胞治疗组 100%, 重复干细胞治疗组 90% (图 1)。3 组小鼠的平均存活时间依次为: 对照组 (7.8 \pm 2.8) d, 单次干细胞治疗组 (8.4 \pm 3.8) d, 重复干细胞治疗组 (13.5 \pm 5.6) d。秩和检验 H 值 8.95, $0.025 < P < 0.01$, 提示 3 组间存活时间有统计学差异。

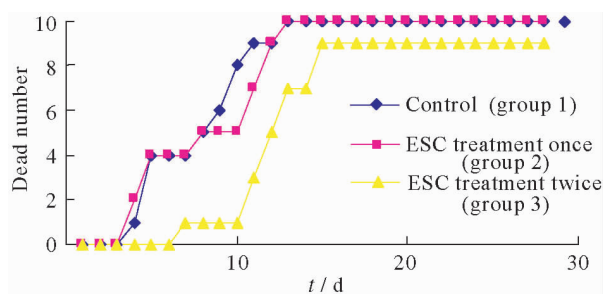


图 1 三组小鼠死亡数

Fig 1 Numbers of mice dead in 3 groups

Bleomycin resulted in death in group 1 and 2 from d4, and in group 3 from d7. By d13 survivors were presented only in group 3.

肺组织羟脯氨酸含量 3 组小鼠的肺组织羟脯氨酸含量依次为: 对照组 (8.59 \pm 1.14) $\mu\text{g}/\text{mL}$, 单次干细胞治疗组 (8.231 \pm 1.09) $\mu\text{g}/\text{mL}$, 重复干细胞治疗组 (5.51 \pm 0.47) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。方差分析 F 值 11.15, $P < 0.01$, 3 组间肺组织羟脯氨酸含量有统计

学差异。

病理观察 由图 2 可见, 对照组肺部病变明显, 肺组织实变、融合成片, 组织中大量梭形细胞、巨噬细胞和少数分叶核细胞。肺泡结构破坏, 难以辨认 (图 2A、B)。单次干细胞治疗组肺泡壁增厚, 毛细血管充血, 间质细胞增生, 较多巨噬细胞和梭形细胞。肺泡内可见渗出, 部分肺泡结构保持完整 (图 2C、D)。重复干细胞治疗组部分区域肺泡壁增厚, 灶性出血。肺泡结构基本完整 (图 2E、F)。

肺脏组织中干细胞的检测 X-gal 染色证实 (图 3), 模型小鼠经静脉注射 S-8 干细胞后, 肺脏内可以检测到 S-8 干细胞。但是其密度随时间延长而降低, 反映肺内干细胞随时间推移逐渐减少。

讨 论

IPF 的病理改变以胶原沉积和气道重塑为主, 最终导致肺功能丧失。鉴于 IPF 是一种进展性疾病, 内科治疗不能延长生存期, 因此有专家建议, IPF 患者一经诊断, 应当尽早接受肺移植^[7]。但是可供移植的健康肺不易获得, 且移植后需终身维持免疫抑制剂, 带来巨大的费用问题和感染风险, 应用受到限制。

干细胞具有高度的分化潜能, 在重建器官功能方面具有特殊的优势, 这一点正在糖尿病、心脏、肝脏、肾脏、神经系统等疾病中受到越来越多的研究关注^[4]。有学者研究干细胞对肺纤维化的治疗作用, Luis 等发现, 小鼠接受博来霉素暴露后, 静脉给予间充质干细胞, 肺组织的羟脯氨酸含量减少^[5]。提示干细胞治疗有利于减轻肺纤维化。胚胎干细胞从早期的胚泡中分离培养, 可以增殖许多代而仍然保持未分化状态, 从而能在实验室里大量生产。它还可以根据培养条件形成集落, 分化为很多的细胞类型, 用于不同的研究目的。因此本试验选择胚胎干细胞作为治疗用干细胞的来源。

本研究采用 C57/BL6 小鼠制作肺纤维化模型 (该品系小鼠对博来霉素产生反应出现肺纤维化的程度较为理想); 选择 S8 胚胎干细胞作为供体治疗 C57/BL6 小鼠肺纤维化 (根据发育生物学实验室的试验资料, S8 胚胎干细胞可以在 C57/BL6 小鼠体内增殖分化); 观察重点是胚胎干细胞治疗肺纤维化的效果, 包括生存时间和肺纤维化的程度 (以肺组织羟脯氨酸含量表示), 尤其前者与临床的关系更为密切。

本研究发现, 肺纤维化小鼠接受静脉注射胚胎干细胞后, 生存时间延长, 肺组织羟脯氨酸含量降

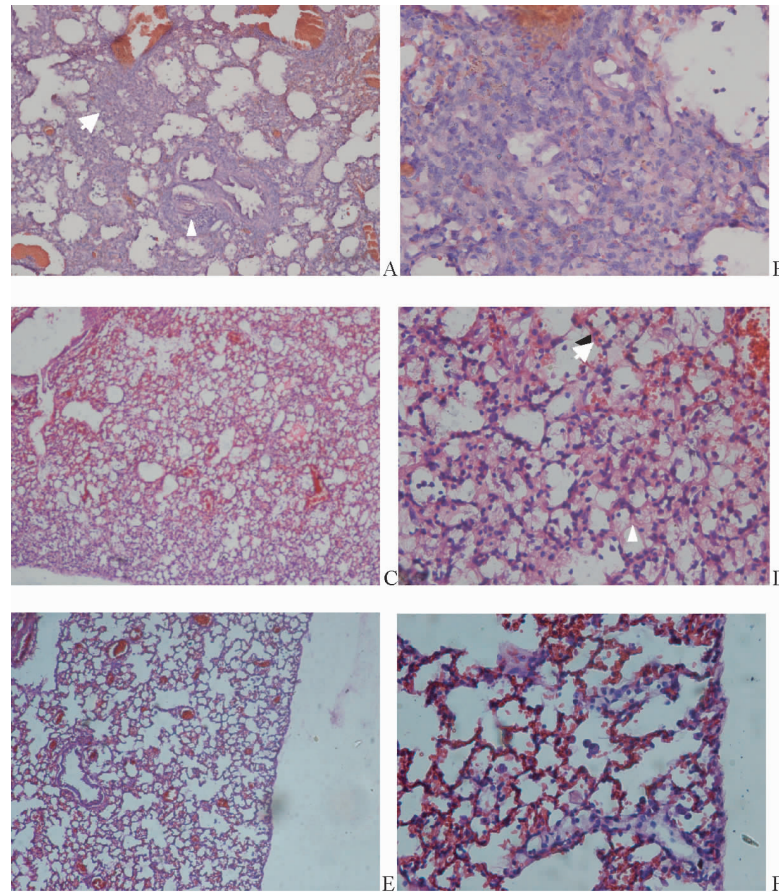


图2 三组小鼠肺组织病理检查

Fig 2 Lung sections from mice of the three groups.

A,B: Control group. Ten days after bleomycin exposure, severe pulmonary inflammation destroyed pulmonary architecture. Bronchiolitis (arrowhead) and widespread alveolar consolidation (arrow) were noticed. (Hematoxylin and Eosin stain, A: 100 \times ; B: 400 \times);

C,D: Treatment once. Ten days after bleomycin exposure and ESC injection, thickened septum (arrow) and alveolar exudates (arrowhead) appeared. (Hematoxylin and Eosin stain, A: 100 \times ; B: 400 \times)

E,F: Treatment twice. Ten days after bleomycin exposure and ESC injection twice, there occurred patchy alveolar bleeding. Alveolar structure kept almost intact. (Hematoxylin and Eosin stain, A: 100 \times ; B: 400 \times)

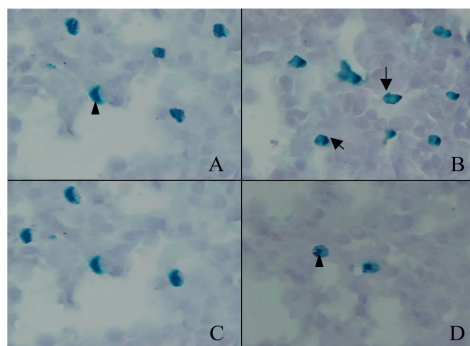


图3 肺纤维化模型小鼠接受干细胞移植后不同时间肺脏标本中的干细胞检测

Fig 3 Lung sections stain from C57/BL6 mice exposed by bleomycin and transplanted by S8-ESC at different times

Embryonic stem cells (stained as dark blue cells) located in alveolus (arrows) or septum (arrowheads). The density of ESC descended with time. (X-gal stain, 4000 \times)

A: 1 h B: 3 h; C: 12 h; D: 24 h.

低;对小鼠肺组织的病理学观察也发现,接受胚胎干细胞治疗的肺纤维化小鼠,博来霉素诱导的肺部炎症减轻,结构破坏减轻。肺纤维化的病理特点即肺泡间质的胶原沉积,考虑到胶原沉积对肺功能的影响,我们认为,干细胞治疗延长模型小鼠的生存时间,可能是通过抑制博来霉素诱导的肺部炎症,减轻肺纤维化从而改善肺功能实现的。在其他以纤维化为主要病理改变的疾病如肝脏纤维化、肾脏纤维化中,也有关于细胞治疗的研究。Ueno 的研究小组将原始的成血管细胞注射进入肝脏纤维化模型大鼠的病变肝脏中,检测肝脏的羟脯氨酸含量,发现肝脏纤维化程度减轻^[3]。Ninichuk 发现,对于慢性肾损伤模型小鼠每周注射多能间充质干细胞(6~10周),可以使得肾脏的间质容量和间质胶原减少,表达平滑肌肌动蛋白的间质细胞数量减少,从而减轻小鼠的肾脏纤维化^[4]。而干细胞对梗死心肌的功能

改善也与干细胞抑制心肌重塑有关^[8,9]。我们考虑,干细胞移植可以抑制病变器官修复过程中的组织重塑与纤维化过程,从而对器官功能的保护有利。

值得一提的是,试验中我们采用 X-半乳糖(X-gal)染色的方法来检测移植后小鼠的肺组织中的 S8 胚胎干细胞[S8 胚胎干细胞中含有半乳糖苷酶 Z (LacZ)基因],结果发现,移植后 24 h 内可以检测到供体干细胞,证实移植成功(图 3);但是注射后 3 d 不能检测到供体干细胞,可能因为排异,或者因为干细胞不能在受体肺组织的微环境中传代,从而自然死亡。但是,纤维化小鼠的生存时间仍然得到延长,肺组织的羟脯氨酸含量减少。这一现象出乎意料,它提示我们,干细胞对肺纤维化的作用可能并不依赖于干细胞本身分化重建组织结构。类似情况也见于干细胞治疗心肌梗死的研究。冠状动脉注射干细胞可以改善梗死后心脏的功能,这一点已经在动物试验和人体试验中多次得到证实^[12-14]。干细胞治疗心梗的机制,以 Orlic 等人的研究为代表^[10],多数研究者认为,移植后他们在病变部位检测到了存活并分化为心肌细胞的干细胞,认为是干细胞分化成为心肌细胞代替坏死的心肌细胞发挥功能。但是晚近发表在 *Nature* 的研究认为,经过严格的检测,并未发现干细胞分化成心肌细胞^[11,16]。*Nature* 为此发表编者评论,认为干细胞治疗的机制和效果需要重新认识^[15]。干细胞改善器官功能不仅在于重建组织结构,而且可能通过改变局部微环境促进组织修复。其分子生物学机制尚未明确,但可能是多方面的,如干细胞的旁分泌功能减轻炎症反应;干细胞促进/分化血管新生改善局部血供,干细胞产生细胞因子促进肺泡上皮修复等,需要进一步探索。

本试验在造模后第 3 天重复给予胚胎干细胞治疗,结果证实,模型小鼠的生存时间进一步延长,肺组织羟脯氨酸含量进一步降低,胚胎干细胞的重复治疗可以得到更好的效果。但是如图 1 所示,干细胞对小鼠死亡率的改善作用,随着时间的延长而减弱。究其原因,首先可能因为干细胞在肺脏不能长期生存传代,随时间延长肺脏内的干细胞逐渐减少,对肺部炎症的治疗作用减弱;其次,细胞之间存在相互作用,博来霉素诱导的肺部炎症可能影响到外源的干细胞,使之最终失去“活性”。如同药物在体内代谢存在半衰期一样,注射进入小鼠体内的干细胞也可能存在衰减周期,导致治疗作用有一定的时限。理论上,如果首次治疗给予较大剂量的干细胞,或者在

干细胞的 2 到 3 个“半衰期”后重复给予新的干细胞,治疗作用可能加强。这需要大量的探索性研究。复习文献,干细胞的重复治疗并未见到报道,本试验为干细胞治疗提供了新的思路。

综上所述,本研究证实,静脉注射胚胎干细胞可以抑制肺的炎症反应和胶原沉积从而减轻肺纤维化,延长博来霉素诱导的肺纤维化小鼠的生存时间。本研究还首次发现,胚胎干细胞的重复治疗可以使得疗效增强。此外,胚胎干细胞的治疗作用并不仅仅依赖于干细胞在病变组织的存活与分化,其机制非常值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 康健. 特发性肺纤维化. 侯显明. 间质性肺病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 222-234.
- [2] Tendera M, Wojakowski W. Clinical trials using autologous bone marrow and peripheral blood-derived progenitor cells in patients with acute myocardial infarction [J]. *Folia Histochem Cytobio*, 2005, 43(4): 233-235.
- [3] Ueno T, Nakamura T, Torimura T, et al. Angiogenic cell therapy for hepatic fibrosis [J]. *Med Mol Morpho*, 2006, 39(1): 16-21.
- [4] Ninichuk V, Gross O, Segerer S, et al. Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3-deficient mice [J]. *Kidney Int*, 2006, 70(1): 121-129.
- [5] Endo M, Oyadomari S, Terasaki Y, et al. Induction of arginase I and II in bleomycin-induced fibrosis of mouse lung [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 285(2): L313-321.
- [6] Kivirikko KI. Modifications of a specific assay for hydroxyproline in urine [J]. *Anal Biochem*, 1967, 19(2): 249-255.
- [7] Khalil N, O'Connor R. Idiopathic pulmonary fibrosis: current understanding of the pathogenesis and the status of treatment [J]. *CMAJ*, 2004, 171(2): 153-160.
- [8] Xu X, Xu Z, Xu Y, et al. Selective down-regulation of extracellular matrix gene expression by bone marrow derived stem cell transplantation into infarcted myocardium [J]. *Circ J*, 2005, 69: 1 275-1 283.
- [9] Chachques JC, Acar C, Herreros J, et al. Cellular cardiomyoplasty: clinical application [J]. *Ann Thorac Surg*, 2004, 77(3): 1 121-1 130.
- [10] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. [J] *Nature*, 2001, 410(6829): 701-705.

(下转第 426 页)