

· 研究简报 ·

氧疗联合骨髓间充质干细胞移植治疗肺气肿大鼠的疗效观察

许爱国

【摘要】目的 观察氧疗联合骨髓间充质干细胞(BMSCs)移植对肺气肿大鼠的治疗效果。**方法** 采取向大鼠气管内注入脂多糖及暴露于烟雾中等措施将 60 只 Wistar 大鼠制成肺气肿动物模型,应用随机数字表法将其分为模型组、移植组及联合治疗组。将体外培养的 BMSCs 经尾静脉注入移植组及联合治疗组大鼠体内,同时联合治疗组大鼠每天还辅以吸氧干预,模型组大鼠则于相同时间点经尾静脉注入生理盐水。于实验进行 6 周后观察 3 组大鼠肺泡形态并进行血气分析比较。**结果** 治疗 6 周后,移植组和联合治疗组肺泡形态及血氧含量[移植组为 (79.81 ± 5.65) mmHg,联合治疗组为 (87.54 ± 3.26) mmHg]均较模型组[(74.36 ± 9.14) mmHg]有不同程度改善,并且以联合治疗组的改善幅度较显著,与移植组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** BMSCs 移植联合吸氧干预治疗肺气肿大鼠具有协同效应,能进一步促进大鼠肺泡组织修复及血氧含量提高,这可能与氧疗能提高移植细胞成活率及生长质量有关。

【关键词】 氧疗; 骨髓间充质干细胞; 肺气肿; 肺泡; 血氧含量

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是呼吸系统常见慢性疾病,由肺气肿或慢性支气管炎所致的持续性气道阻塞容易使肺功能受损,引起患者呼吸困难及活动耐力下降。肺气肿多由于肺泡壁遭到破坏及肺泡扩大所致,是引发 COPD 患者气道阻塞的首要原因,对患者身心健康造成严重威胁^[1]。骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)是一种存在于骨髓等多种组织中具有多向分化潜能的干细胞,该细胞拥有很强的可塑性及趋化性,可移行进入特定组织内,在适宜条件下可分化为多种中胚层来源的组织细胞,从而发挥治疗作用。由于肺气肿患者往往存在缺氧情况,而机体氧含量高低对患者健康状况、生活质量及细胞代谢等均具有重要影响作用。基于上述背景,本研究拟联合采用氧疗及 BMSCs 移植治疗肺气肿大鼠,发现疗效显著。

材料与方法

一、实验试剂及器材

主要实验试剂及器材包括:脂多糖(lipopolysaccharides, LPS);自制玻璃染毒熏箱;Wistar 大鼠 BMSCs 细胞悬液;氧气瓶;国产 LK-3 型气体检测报警仪;PHOX 全自动血气分析仪(美国 NOVA 公司);TE2000-S 型倒置荧光相差数码相机显微镜。

二、实验对象及制模

共选取健康雄性 Wistar 大鼠 60 只,鼠龄 8~10 周龄,体重 (160 ± 12) g,通过向大鼠气管内注入脂多糖并置入玻璃染毒熏箱内,共制作肺气肿大鼠模型 60 只,肺气肿模型建立方法详见文献^[2]。采用随机数字表法将肺气肿大鼠分为 3 组,分别是模型组、移植组及联合治疗组,每组 20 只。3 组大鼠均分笼饲养,自由饮食,保持室内通风良好,室温控制在 24℃ 左右。

三、制模后处理

移植组:于制模成功后第 1 天及第 14 天,采用微量注射器将 5 μ l BMSCs 培养液(约为 5×10^4 个/ μ l)经尾静脉缓慢注入

大鼠体内,在 3 min 内推完,留针 5 min,并用医用生物胶封闭针孔以防止细胞悬液外溢。联合治疗组亦给予 BMSCs 移植,治疗方法及时间均与移植组一致,同时该组大鼠每天还辅以吸氧治疗,把大鼠置于自制玻璃染毒熏箱内,通过氧气瓶给氧,控制氧流量为 1.0~1.5 L/min,由 LK-3 型气体检测报警仪监测 CO、CO₂ 及 O₂ 浓度,控制氧浓度为 20%~29%,每天吸氧 10 h。模型组大鼠于制模成功后第 1 天及第 14 天,经尾静脉注入 2 次生理盐水,每次 0.5 ml,未给予其它特殊干预。

四、检测指标

于治疗 6 周后每组大鼠分别经腹主动脉取血 2 ml,经抗凝处理后进行血气分析,采用 PHOX 全自动血气分析仪(美国 NOVA 公司产),检测指标包括动脉血氧分压(arterial pressure of oxygen, PaO₂)及二氧化碳分压(partial pressure of carbon dioxide, PaCO₂);随后选用脊椎脱臼法统一处死各组大鼠并分离肺组织,采用生理盐水冲洗肺腔后用多聚甲醛固定,取右肺中下叶行常规石蜡包埋、切片、苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,应用美国 IMAGEEX 影像分析软件观察各组大鼠肺组织切片,每张切片选取 2 个视野($\times 200$),分别测量下列指标,包括:①平均肺泡数(mean alveolar number, MAN),即单个视野内肺泡数与该视野面积的比值,其数值反映肺泡密度情况;②肺泡腔与肺总面积比(proportion of alveolar area, PAA),通过测量单个视野内肺实质灰度值,计算肺泡腔面积与肺总面积的比值,其数值反映肺泡大小。

五、统计学分析

本研究所得计量数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 SPSS 13.0 版统计学软件包进行数据分析,各组大鼠血气分析指标、肺泡 MAN 及 PAA 比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

模型组大鼠在实验进行 32、33 及 36 d 时各死亡 1 只,提取死亡大鼠肺组织进行显微镜观察,发现大部分纤毛脱落,细支气管、肺泡管及肺泡囊均有扩张,肺泡壁变薄,并有不同程度断裂或消失,部分融合成肺大泡,呈肺泡型肺气肿,且肺泡间隔可

见严重瘀血、水肿及炎症反应,死亡原因诊断为肺气肿致肺功能衰竭。移植组及联合治疗组大鼠实验期间均无死亡现象。各组大鼠肺泡形态指标及血气分析结果详见表 1,表中数据显示,移植组与联合治疗组肺泡形态指标及血气分析结果均较模型组明显改善(均 $P < 0.05$),并且以联合治疗组的改善幅度较显著,与移植组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 治疗 6 周后各组大鼠肺泡形态指标及血气分析结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	MAN (个/mm ²)	PAA(%)	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)
模型组	17	173.51 ± 15.2	77.58 ± 4.32	74.36 ± 9.14	67.12 ± 7.31
移植组	20	242.71 ± 16.31 ^a	63.32 ± 3.64 ^a	79.81 ± 5.65 ^a	60.33 ± 5.67 ^a
联合治疗组	20	321.31 ± 16.82 ^{ab}	58.35 ± 3.17 ^{ab}	87.54 ± 3.26 ^{ab}	55.72 ± 4.82 ^{ab}

注:与模型组比较,^a $P < 0.05$;与移植组比较,^b $P < 0.05$;1 mmHg = 0.133 kPa

讨 论

目前采用 BMSCs 移植治疗肺气肿大鼠的研究较多,并被证实具有一定疗效。如 Krause 等^[3]研究证实 BMSCs 可分化为肺泡细胞,通过同种异体移植,在受体内发现由供体干细胞分化的组织细胞存在,其中超过 20% 为表达角蛋白和表面活性物质 B 的肺泡 II 型细胞;Abe 等^[4]采用全骨髓移植方法得到肺泡 I 型、II 型细胞及成纤维细胞;国内方翔等^[5]也证实,在移植大鼠肺内可检测到经 Brdu 标记的 BMSCs,并且部分 Brdu 阳性细胞亦表达细胞角蛋白,表明移植的 BMSCs 在肺内能分化成上皮细胞。由此可见,通过移植 BMSCs 对促进肺气肿大鼠肺组织修复确有一定疗效,而如何提高移植细胞的成活率及促进细胞成长、分化则是影响移植疗效的重要因素。

王凤琼等^[6]研究指出,氧疗对 COPD 患者具有明显益处,如 COPD 患者每天进行低浓度吸氧 15 h 以上,持续 4 周后发现其肺功能指标及 PaO₂ 明显改善;另有研究表明,氧疗能提高机体肺泡及动脉血氧分压,增加组织供氧能力,稳定及降低肺动脉压,下调血液黏稠度,改善呼吸困难,对缓解 COPD 患者病情具有重要意义^[7]。上述研究表明在一定条件下氧疗对肺气肿患者具有治疗作用,可改善患者血氧含量及呼吸功能,进而提高其生活质量。

自从 Gross 等^[8]发现木瓜蛋白酶滴入气管内可诱发肺气肿,人们设计了许多肺气肿动物模型用于临床研究。宋一平等^[9]通过向气道内滴入 LPS 加熏烟成功复制出肺气肿大鼠样本,本研究亦参考该方法制作肺气肿大鼠模型,于制模成功后分别给予 BMSCs 移植或氧疗。通过组间比较发现,移植组及联

合治疗组肺泡形态指标 MAN、PAA 和血气分析结果均较模型组明显改善(均 $P < 0.05$),并且上述指标均以联合治疗组的改善幅度较显著($P < 0.05$),表明 BMSCs 移植联合氧疗对肺气肿大鼠具有协同治疗作用,能进一步改善 BMSCs 移植治疗效果。本研究中联合治疗组大鼠血氧含量较移植组显著提高,这可能与氧疗干预有关。由于氧是机体生理代谢中不可缺少的重要物质基础,肺气肿个体由于呼吸功能障碍导致其长期处于慢性缺氧状态,在一定程度上可能抑制了细胞分化及生长,故肺气肿大鼠即使给予 BMSCs 移植,由于机体缺氧也会影响移植细胞的成活率及分化、生长。本研究中联合治疗组在 BMSCs 移植治疗基础上辅以氧疗,发现治疗 6 周后该组大鼠肺泡形态指标显著改善,这可能与氧疗干预能提高 BMSCs 移植大鼠氧供有关,一方面氧疗可显著改善机体缺氧状态,为其自身代谢提供基础保障,另一方面氧疗还可能提高了移植细胞的成活率及生长质量,加速其向肺泡细胞分化,至于其确切治疗机制还需进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 袁璐,崔笑荷.慢性阻塞性肺疾病患者肺康复的研究进展.中华物理医学与康复杂志,2010,32:155-157.
- [2] 方翔,汤兵祥.骨髓间充质干细胞移植对肺气肿大鼠血浆 TNF 的作用.中国实用医刊,2010,37:18-20.
- [3] Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. Cell, 2001, 105: 369-377.
- [4] Abe S, Lauby G, Boyer C, et al. Transplanted BM and BM side population cells contribute progeny to the lung and liver in irradiated mice. Cytotherapy, 2003, 5: 523-533.
- [5] 方翔,汤兵祥,张曼林,等.骨髓间充质干细胞移植对肺气肿大鼠的影响.郑州大学学报(医学版),2010,45:395-397.
- [6] 王凤琼,易隽.长期家庭氧疗对缓解期 COPD 患者的影响研究.临床肺科杂志,2008,13:1139-1140.
- [7] 许立民,孔磊,肖泉,等.高压氧治疗对重型颅脑损伤气管切开后患者肺部感染的影响.中华物理医学与康复杂志,2011,33:770-774.
- [8] Gross P, Pfitzer EA, Tolker E, et al. Experimental emphysema: its production with papain in normal and silicotic rats. Arch Environ Health, 1965, 11: 50-58.
- [9] 宋一平,崔德健,茅培英,等.慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立及药物干预的影响.中华内科杂志,2000,39:556-558.

(修回日期:2012-12-28)

(本文编辑:易 浩)