



[DOI]10.3969/j.issn.1001-9057.2021.11.014

<http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2021.11.014>

· 临床研究 ·

间充质干细胞中血红素加氧酶-1 的过表达抑制 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 炎症小体活化改善大鼠急性肺损伤

许欣婷 张瑶 陈丽展 张芳

[摘要] **目的** 探究过表达血红素加氧酶-1 (HO-1) 的骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 对大鼠急性肺损伤 (ALI) 的作用及其可能机制。**方法** 将 40 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、BMSCs-NC 组和 BMSCs-HO-1 组, 每组各 10 只。应用腹腔注射脂多糖 (LPS) 建立 ALI 大鼠模型。BMSCs-NC 组大鼠尾静脉注射阴性对照 BMSCs, BMSCs-HO-1 组大鼠尾静脉注射过表达 HO-1 的 BMSCs, 其余组大鼠尾静脉注射生理盐水。检测各组大鼠肺泡灌洗液 (BALF) 中炎症细胞数; 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测 BALF 中肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、白细胞介素 (IL)-6 和 IL-1 β 水平。采用苏木素-伊红 (HE) 染色检测肺组织病理学变化; 测定大鼠肺组织湿/干重比 (W/D); 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 HO-1、表面活性蛋白 C (SP-C) mRNA 表达水平; 蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 检测 HO-1、SP-C、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 和 cleaved-Caspase-1 蛋白表达水平。**结果** 与对照组相比, 模型组大鼠 BALF 中细胞总数、中性粒细胞数、巨噬细胞数、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平、肺损伤评分及 W/D 均明显升高, 肺组织中 HO-1 和 SP-C mRNA、蛋白表达水平均明显降低, NLRP3、ASC 和 cleaved-Caspase-1 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, BMSCs-NC 组大鼠 BALF 中细胞总数、中性粒细胞数、巨噬细胞数、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平、肺损伤评分及 W/D 均明显升高, 肺组织中 HO-1 和 SP-C mRNA、蛋白表达水平均明显升高, NLRP3、ASC 和 cleaved-Caspase-1 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$)。与 BMSCs-NC 组相比, BMSCs-HO-1 组大鼠各项指标均得到进一步改善 ($P < 0.05$)。**结论** 过表达 HO-1 的 BMSCs 可能通过抑制 NLRP3 炎症小体活化改善大鼠 ALI。

[关键词] 急性肺损伤; 血红素加氧酶-1; 间充质干细胞; NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3; 炎症小体

[中图分类号] R563.8

[文献标识码] A

Mesenchymal stem cells overexpressing heme oxygenase-1 ameliorate rat acute lung injury by inhibiting NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 inflammasome activation

Xu Xinting*, Zhang Yao, Chen Lizhan, Zhang Fang. * Department of Respiratory Medicine, Xi'an International Medical Center Hospital, Xi'an 710100, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) overexpressing heme oxygenase-1 (HO-1) on acute lung injury (ALI) in rats and its possible mechanism. **Methods** Forty SD rats were randomly divided into control group, model group, BMSCs-NC group and BMSCs-HO-1 group, with 10 rats in each group. Intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS) was used to establish a rat model of ALI. The rats in BMSCs-NC group were injected with negative control BMSCs (BMSCs-NC) through tail vein, rats in BMSCs-HO-1 group were injected with BMSCs overexpressing HO-1 (BMSCs-HO-1) through tail vein, rats in other groups were injected with normal saline through tail vein. Number of inflammatory cells in alveolar lavage fluid (BALF) of rats in each group was measured. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6 and IL-1 β in BALF. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect lung histopathological

基金项目:陕西省重点研发计划项目(2019SF-179)

作者单位:710100 西安,西安国际医学中心医院呼吸内科(许欣婷、张瑶、陈丽展);空军军医大学第一附属医院呼吸内科(张芳)

通讯作者:陈丽展, E-mail: chenliz20033clz@163.com

changes. Wet/dry weight ratio (W/D) of rat lung tissue was measured. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect expression of HO-1 and SP-C mRNA. Western blotting was used to detect expression of HO-1, SP-C, NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3), apoptosis-related dot-like protein (ASC) and cleaved-Caspase-1 protein. **Results** Compared with control group, total cells count, neutrophils count, macrophages count, levels of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in BALF, lung injury score and W/D in model group were significantly increased, expression levels of HO-1 and SP-C mRNA and protein in lung tissue were significantly reduced, and expression levels of NLRP3, ASC and cleaved-Caspase-1 protein were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with model group, total cells count, neutrophils count, macrophages count, levels of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in BALF, lung injury score and W/D of rats in BMSCs-NC group were significantly increased, expression levels of HO-1 and SP-C mRNA and protein in lung tissue were significantly increased, expression levels of NLRP3, ASC and cleaved-Caspase-1 protein were significantly reduced ($P < 0.05$). Compared with BMSCs-NC group, all above indicators of BMSCs-HO-1 group were further improved ($P < 0.05$). **Conclusion** BMSCs overexpressing HO-1 may ameliorate acute lung injury in rats by inhibiting NLRP3 inflammasome activation.

[Key words] Acute lung injury; Heme oxygenase-1; Mesenchymal stem cells; NOD-like receptor family pyrin domain containing 3; Inflammasome

急性肺损伤 (ALI) 是一种由多种病因引起的以急性进行性呼吸困难和顽固性低氧血症为特征的疾病, 其发病机制复杂, 发病率及死亡率均较高^[1]。ALI 的特征是肺组织水肿和损伤、气体交换受损、严重的炎症反应导致弥漫性肺泡损伤、严重低氧血症、肺顺应性降低^[2]。几十年来, 人们在探索 ALI 治疗策略和措施方面取得了一些进步, 但仍未开发出 ALI 最优的治疗策略^[3]。因此, 有必要继续探究新颖有效的 ALI 治疗策略。NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3) 是一种细胞内信号分子, NLRP3 炎症小体是由 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 和半胱氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1) 组成的复合物。NLRP3 炎症小体的激活与 ALI 疾病进展及炎症反应有关^[4]。最近的研究表明, 间充质干细胞 (MSCs) 可以移植到受损的肺部, 通过归巢, 转移至炎症部位, 分化为肺泡上皮细胞, 并发挥修复气血屏障的多潜能来减轻炎症的发生^[5]。已有研究证明, 骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 移植可减轻香烟烟雾和副流感嗜血杆菌所致的慢性阻塞性肺疾病小鼠肺损伤, 该作用是通过抑制炎症信号通路, 减少炎症发生实现的^[6]。血红素加氧酶-1 (HO-1) 是一种抗氧化和抗凋亡的酶。在缺血/再灌注诱导的急性肾损伤的研究中, HO-1 通过促进 BMSCs 的增殖和分化, 进一步增强 BMSCs 对急性肾损伤大鼠的治疗作用, 改善大鼠肾功能^[7]。综上所述, 本研究旨在探究过表达 HO-1 的 BMSCs 对 ALI 大鼠的作用及其作用机制是否与调控 NLRP3 炎症小体的激活相关, 以期为开发新的 ALI 治疗策略提供依据。

材料与方 法

1. 材料: 实验动物: 50 只雄性 SD 大鼠 (4 周龄, 体重 80 ~ 100 g) 购自空军军医大学实验动物中心 [动物

生产许可证号: SCXK (陕) 2019-001], 饲养在环境温度 24 ~ 26 °C、环境湿度 55% ~ 60% 的动物房中, 光/暗周期为 12 h/12 h, 大鼠自由饮水和进食。实验材料: 茜素红染色液 (G1452)、油红 O 染色液 (G1262) 和脂多糖 (LPS, L8880) 均购自北京索莱宝科技有限公司; 过表达 HO-1 重组慢病毒液和阴性对照 (NC) 重组慢病毒液购自上海吉满生物科技有限公司; FITC-CD44 (ab189524)、FITC-CD90 (181469)、FITC-CD105 (ab252345)、FITC-CD45 (ab40763)、FITC-CD34 (ab81289)、FITC-HLA-DR (ab92511)、NLRP3 (ab263899) 抗体均购自英国 Abcam 公司; PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (6110A) 购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司; 2 × SYBR Green qPCR Master Mix (HY-K0522) 购自美国 MedChemExpress 公司; BCA 蛋白定量检测试剂盒 (PA115-01) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; HO-1 (P249) 和 cleaved-Caspase-1 (4199T) 抗体均购自美国 cell signaling technology 公司; 表面活性蛋白 C (SP-C) (HK4743) 和 ASC 抗体 (HK3961) 均购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; GAPDH 抗体 (A01020) 购自北京义翘神州生物技术有限公司; 肿瘤坏死因子 (TNF)- α (H052-1)、白细胞介素 (IL)-6 (H007-1-1) 和 IL-1 β (H002) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

2. 方法

(1) BMSCs 的分离与培养: 随机取 10 只 SD 大鼠, 10% 水合氯醛 (300 mg/kg) 麻醉后处死。取大鼠双侧股骨和胫骨, 剪开两骨骺端, 使用注射器吸取 DMEM 培养基冲洗骨髓腔, 一共冲洗 3 次。将细胞悬液加入到预先装有淋巴细胞分离液的离心管内, 2 000 r/min 离心 20 min, 吸取中层 BMSCs。用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养基重悬细胞, 以 1×10^6 个/ml 的

细胞密度接种于培养瓶中,细胞置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。细胞每 2 天更换一次新鲜培养基,待细胞密度达到 80% ~ 90% 时,以 0.25% 胰酶液消化细胞,以 1:3 比例传代培养。

(2) 茜素红染色检测 BMSCs 成骨分化潜能:取处于对数期生长的 BMSCs,以 3 × 10⁴ 个/孔的密度接种于 6 孔板中,细胞于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养。待细胞密度达到 80% ~ 90% 时,将细胞培养基更换为成骨诱导培养基培养,连续诱导 21 天后,弃去旧培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗细胞后,4% 多聚甲醛室温条件下固定细胞 15 min。PBS 清洗细胞后,加入茜素红染液,染色 5 min, PBS 清洗细胞后,显微镜下观察并拍照,钙沉积阳性细胞呈现橘红色。

(3) 油红 O 染色检测 BMSCs 成脂分化潜能:取处于对数期生长的 BMSCs,以 3 × 10⁴ 个/孔的密度接种于 6 孔板中,细胞于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养。待细胞密度达到 80% ~ 90% 时,弃去旧培养基,添加成脂诱导培养基继续培养,连续诱导 21 天。弃去细胞旧培养基, PBS 清洗细胞,4% 多聚甲醛室温条件下固定细胞 15 min。PBS 清洗细胞后,加入油红 O 染色液染色 10 min。用 75% 酒精漂洗细胞以去除多余的染料。显微镜下观察并拍照,脂类物质呈红色着染,细胞核呈蓝色着染。

(4) 流式细胞术检测 BMSCs 典型表面标志物的表达:取处于对数期生长的 BMSCs,加入 PBS 重悬细胞,再加入 FITC-CD44 (1:200)、FITC-CD90 (1:200)、FITC-CD105 (1:200)、FITC-CD45 (1:200)、FITC-CD34 (1:200)、和 FITC-HLA-DR (1:200) 抗体,避光孵育 30 min,离心收集细胞。PBS 洗涤细胞并重悬。上流式细胞仪检测 CD44、CD90、CD105、CD45、CD34 和 HLA-DR 阳性细胞比例。

(5) 慢病毒感染:取处于对数期生长的 BMSCs,以 1 × 10⁵ 个/孔的细胞数量接种于 6 孔板中,细胞于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养 24 h。将细胞随机分为 BMSCs 组(添加 PBS)、BMSCs-NC 组(添加 50 MOI NC 重组慢病毒液)和 BMSCs-HO-1 组(添加 50 MOI 过表达 HO-1 重组慢病毒液)。弃去新鲜培养基,添加含 2% FBS、6 μg/ml polybrene 的 DMEM 培养基,根据分组添加重组慢病毒液。细胞继续培养 24 h 后,将细胞培养基更换为含 10% FBS 的 DMEM 培养基。细胞继续培养 48 h 后,进行后续实验。

(6) 大鼠 ALI 模型的建立及给药处理:造模前,40 只 SD 大鼠禁食 12 h。将 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、BMSCs-NC 组和 BMSCs-HO-1 组,每组各 10 只,模型组、BMSCs-NC 组和 BMSCs-HO-1 组大鼠应用腹腔

注射 LPS(5 mg/kg) 建立 ALI 大鼠模型^[8],对照组大鼠腹腔注射等量生理盐水。随后 BMSCs-NC 组大鼠尾静脉注射 BMSCs-NC 细胞(1 × 10⁶ 个),BMSCs-HO-1 组大鼠尾静脉注射 BMSCs-HO-1 细胞(1 × 10⁶ 个),对照组和模型组大鼠尾静脉注射生理盐水。48 h 后进行后续实验操作。

(7) 肺泡灌洗液(BALF)炎症细胞计数和炎症因子水平检测:10% 水合氯醛(300 mg/kg)麻醉大鼠,分离大鼠气管,结扎大鼠右主支气管和肺门后,插入灌洗管,用预冷的 PBS 灌洗左肺,并回收 BALF。回收的 BALF 在 4 °C 条件下 1 500 r/min 离心 10 min,取上清液,采用 ELISA 试剂盒检测上清液中炎症因子(TNF-α、IL-6、IL-1β)水平。PBS 重悬细胞沉淀,涂片,进行 Giemsa 染色,采用细胞计数板计数细胞总数、中性粒细胞数和巨噬细胞数。

(8) 苏木素-伊红(HE)染色检测肺组织病理学变化:10% 水合氯醛(300 mg/kg)麻醉后处死大鼠。取大鼠肺组织,10% 福尔马林固定组织 24 h。梯度酒精脱水,二甲苯透明。将组织块置于融化的石蜡中,直至石蜡完全浸入。组织包埋、切片。石蜡切片常规脱蜡至水化。苏木素染液染色 3 min,自来水冲洗;1% 盐酸酒精分化 3 s,自来水冲洗;0.6% 氨水返蓝,自来水冲洗。伊红染液染色 1 min;梯度酒精脱水,二甲苯透明。滴加中性树胶,盖上盖玻片封固,显微镜下观察拍照。根据中性粒细胞浸润、肺泡壁透明膜形成、肺泡壁水肿增厚、肺泡腔内出血及水肿情况进行肺损伤程度评分:0 分:无病理变化;1 分:轻度病理变化;2 分:中度病理变化;3 分:重度病理变化;4 分:非常严重的病理变化^[9]。

(9) 大鼠肺组织湿/干重比(W/D)测定:取大鼠肺组织,先用滤纸吸干组织表面的水分和残留的血液,称量此时肺组织的湿重(W)。随后将肺组织置于 65 °C 烘箱中干燥 24 h,称量此时肺组织的干重(W),计算大鼠肺组织湿/干重比(W/D)。

(10) 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测细胞和肺组织中 HO-1 和 SP-C mRNA 表达水平:收集 BMSCs 及各组大鼠肺组织,加入 Trizol 试剂,提取细胞和组织中的总 RNA。随后按照 PrimeScriptTM 1st strand cDNA Synthesis Kit 说明书所示,合成 cDNA,此为 qRT-PCR 实验中所需的模板。按照 2 × SYBR Green qPCR Master Mix 说明书所示,配制 qRT-PCR 反应体系,反应程序为:94 °C 3 min;94 °C 15 s,60 °C 20 s,72 °C 30 s,40 个循环;72 °C 10 min。以 GAPDH 为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 HO-1 和 SP-C mRNA 表达水平。实验中所需引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 实验中所需引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
HO-1 正向引物	ATGCCCCAGGATTTGTCAGA
HO-1 反向引物	ACCTGGCCCTTCTGAAAAGTT
SP-C 正向引物	TTACCACTGCCACCTTCTCC
SP-C 反向引物	TCAAGACTGGGGATGCTCTC
GAPDH 正向引物	GATGGTGAAGGTCGGGTGTG
GAPDH 反向引物	GAGGTCAATGAAGGGTCCG

(11) 蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 检测 BMSCs 和大鼠肺组织中 HO-1、SP-C、NLRP3、ASC 和 cleaved-Caspase-1 蛋白表达水平: 收集 BMSCs 及各组大鼠肺组织, 采用蛋白裂解液裂解细胞和组织, 冰上反应 30 min。离心收集上清液, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒检测上清液蛋白水平。取 30 μg 蛋白加入凝胶上样孔中, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 湿转法将凝胶中的蛋白质转印至聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 膜上。封闭液室温封闭 3 h。加入 HO-1 (1:1 000)、SP-C (1:1 000)、NLRP3 (1:1 000)、ASC (1:1 000)、cleaved-Caspase-1 (1:1 000) 和 GAPDH (1:5 000) 抗体, 于 4 °C 冰箱内孵育过夜。加入二抗 (1:5 000), 室温条件下孵育 1 h。滴加 ECL 超敏化学发光液至膜上, 暗室曝光, 应用 Image J 软件进行蛋白条带半定量分析。

3. 统计学处理: 应用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 *LSD-t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 大鼠 BMSCs 的分离与鉴定: 原代 BMSCs 培养 7 d 后, 可见细胞已贴壁, 细胞形态较为规整, 形态多呈纺锤形。诱导成骨分化后, 在 BMSCs 中也观察到大量致密的钙结节。同时, 诱导成脂分化后, 在 BMSCs 中观察到弥漫分布的红色脂滴。流式细胞术检测 BMSCs 典型表面标志物的表达情况, 结果显示, BMSCs 表达 CD44、CD90 和 CD105, 但不表达 CD45、CD34 和 HLA-DR。以上数据表明成功分离得到了 BMSCs, 可应用于后续实验。

2. 3 组 BMSCs 中 HO-1 mRNA 和蛋白表达水平比较: 与 BMSCs 组相比, BMSCs-NC 组 BMSCs 中 HO-1 mRNA 和蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 BMSCs-NC 组相比, BMSCs-HO-1 组 BMSCs 中 HO-1 mRNA 和蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。见表 2。

3. 4 组大鼠 BALF 中炎症细胞计数比较: 与对照组相比, 模型组大鼠 BALF 中细胞总数、中性粒细胞数和巨噬细胞数均明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比,

表 2 3 组 BMSCs 中 HO-1 mRNA 和蛋白表达水平比较

组别	($\bar{x} \pm s, n = 10$)	
	HO-1 mRNA	HO-1 蛋白
BMSCs 组	1.00 ± 0.07	0.27 ± 0.03
BMSCs-NC 组	1.05 ± 0.08	0.26 ± 0.03
BMSCs-HO-1 组	3.92 ± 0.35 ^a	1.18 ± 0.09 ^a

注: 与 BMSCs-NC 组比较, ^a $P < 0.05$

BMSCs-NC 组大鼠 BALF 中细胞总数、中性粒细胞数和巨噬细胞数均明显降低 ($P < 0.05$); 与 BMSCs-NC 组相比, BMSCs-HO-1 组大鼠 BALF 中细胞总数、中性粒细胞数和巨噬细胞数均明显降低 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 4 组大鼠 BALF 中炎症细胞计数比较

组别	($\times 10^6/\text{ml}, \bar{x} \pm s, n = 10$)		
	细胞总数	中性粒细胞数	巨噬细胞数
对照组	3.89 ± 0.45	1.92 ± 0.20	0.43 ± 0.05
模型组	13.37 ± 1.48 ^a	7.23 ± 0.79 ^a	1.31 ± 0.15 ^a
BMSCs-NC 组	8.92 ± 0.91 ^b	5.44 ± 0.58 ^b	0.76 ± 0.06 ^b
BMSCs-HO-1 组	6.31 ± 0.54 ^c	3.82 ± 0.35 ^c	0.58 ± 0.05 ^c

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与 BMSCs-NC 组比较, ^c $P < 0.05$

4. 4 组大鼠 BALF 中炎症因子水平比较: 与对照组相比, 模型组大鼠 BALF 中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, BMSCs-NC 组大鼠 BALF 中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平明显降低 ($P < 0.05$); 与 BMSCs-NC 组相比, BMSCs-HO-1 组大鼠 BALF 中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平明显降低 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 4 组大鼠 BALF 中炎症因子水平比较

组别	(pg/ml, $\bar{x} \pm s, n = 10$)		
	TNF- α	IL-6	IL-1 β
对照组	274.38 ± 37.24	186.92 ± 23.24	37.36 ± 2.89
模型组	523.45 ± 35.88 ^a	414.36 ± 47.63 ^a	91.07 ± 8.32 ^a
BMSCs-NC 组	435.74 ± 40.21 ^b	332.74 ± 25.19 ^b	74.68 ± 6.55 ^b
BMSCs-HO-1 组	322.58 ± 28.79 ^c	273.52 ± 22.44 ^c	48.37 ± 5.13 ^c

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与 BMSCs-NC 组比较, ^c $P < 0.05$

5. 4 组大鼠肺组织中 HO-1 mRNA 和蛋白表达水平比较: 与对照组相比, 模型组大鼠肺组织中 HO-1 mRNA 和蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, BMSCs-NC 组大鼠肺组织中 HO-1 mRNA 和蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与 BMSCs-NC 组相比, BMSCs-HO-1 组大鼠肺组织中 HO-1 mRNA 和蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。见表 5。

6. 4 组大鼠肺组织病理学变化情况及 W/D 比较: 对照组大鼠肺组织无明显异常; 与对照组相比, 模型组

表 5 4 组大鼠肺组织中 HO-1 mRNA 和蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	HO-1 mRNA 表达	HO-1 蛋白表达
对照组	1.00 ± 0.06	1.22 ± 0.13
模型组	0.23 ± 0.02 ^a	0.26 ± 0.03 ^a
BMSCs-NC 组	0.54 ± 0.06 ^b	0.62 ± 0.05 ^b
BMSCs-HO-1 组	1.17 ± 0.13 ^c	1.35 ± 0.15 ^c

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与 BMSCs-NC 组比较,^c $P < 0.05$

大鼠肺组织出现明显病变,肺泡水肿、炎症细胞堆积和肺泡上皮细胞变性坏死,肺损伤评分和 W/D 明显升高($P < 0.05$);与模型组相比,BMSCs-NC 组大鼠肺组织病理学变化得到明显改善,肺损伤评分和 W/D 明显降低($P < 0.05$);与 BMSCs-NC 组相比,BMSCs-HO-1 组大鼠肺组织病理学变化得到明显改善,肺损伤评分和 W/D 明显降低($P < 0.05$)。见表 6。

表 6 4 组大鼠肺损伤评分和 W/D 比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	肺损伤评分(分)	W/D
对照组	0.33 ± 0.16	4.61 ± 0.18
模型组	3.67 ± 0.32 ^a	6.78 ± 0.35 ^a
BMSCs-NC 组	2.27 ± 0.38 ^b	5.69 ± 0.27 ^b
BMSCs-HO-1 组	1.36 ± 0.25 ^c	5.03 ± 0.23 ^c

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与 BMSCs-NC 组比较,^c $P < 0.05$

7.4 组大鼠肺组织中 SP-C mRNA 和蛋白表达水平比较:与对照组相比,模型组大鼠肺组织中 AT II 细胞特异性标志物 SP-C mRNA 和蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$);与模型组相比,BMSCs-NC 组大鼠肺组织中 SP-C mRNA 和蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$);与 BMSCs-NC 组相比,BMSCs-HO-1 组大鼠肺组织中 SP-C mRNA 和蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$)。见表 7。

表 7 4 组大鼠肺组织中 SP-C mRNA 和蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	SP-C mRNA	SP-C 蛋白
对照组	1.00 ± 0.05	1.12 ± 0.13
模型组	0.34 ± 0.04 ^a	0.31 ± 0.03 ^a
BMSCs-NC 组	0.67 ± 0.05 ^b	0.66 ± 0.07 ^b
BMSCs-HO-1 组	0.92 ± 0.08 ^c	0.97 ± 0.10 ^c

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与 BMSCs-NC 组比较,^c $P < 0.05$

8.4 组大鼠肺组织中 NLPR3、ASC 和 cleaved-Caspase-1 蛋白表达水平比较:与对照组相比,模型组大鼠肺组织中 NLPR3、ASC 和 cleaved-Caspase-1 蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$);与模型组相比,BMSCs-NC 组大鼠肺组织中 NLPR3、ASC 和 cleaved-Caspase-1 蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$);与 BMSCs-NC 组相

比,BMSCs-HO-1 组大鼠肺组织中 NLPR3、ASC 和 cleaved-Caspase-1 蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$)。见表 8。

表 8 4 组大鼠肺组织中 NLPR3、ASC 和 cleaved-Caspase-1 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	NLPR3 蛋白	ASC 蛋白	cleaved-Caspase-1 蛋白
对照组	0.16 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.10 ± 0.01
模型组	0.63 ± 0.07 ^a	0.68 ± 0.06 ^a	0.47 ± 0.05 ^a
BMSCs-NC 组	0.43 ± 0.05 ^b	0.36 ± 0.04 ^b	0.22 ± 0.02 ^b
BMSCs-HO-1 组	0.21 ± 0.02 ^c	0.23 ± 0.03 ^c	0.15 ± 0.01 ^c

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与 BMSCs-NC 组比较,^c $P < 0.05$

讨 论

ALI 的发病机制主要是过度的肺部炎症和中性粒细胞过度浸润肺组织,释放促炎细胞因子,损伤肺内皮和上皮细胞,导致肺水肿和气体交换功能受损^[10]。目前,尽管 ALI 的治疗干预措施(如肺保护性机械通气和液体管理)取得了较大进展,但 ALI 总死亡率仍保持在 40% 左右^[11]。因此,继续探索 ALI 新的治疗策略对 ALI 的临床防治具有重要意义。

LPS 是革兰阴性菌细胞壁的主要成分,可引起机体免疫和炎症反应的紊乱,可用于制备 ALI 动物模型,诱导 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等促炎细胞因子的产生^[12]。越来越多的证据表明,BMSCs 治疗能够抑制 ALI 小鼠肺部炎症,减少氧化损伤和中性粒细胞胞外陷阱的释放,最终提高治疗动物的生存率。该研究表明,BMSCs 是基于细胞治疗 ALI 的一种有效方式^[13]。此外,BMSCs 表现出免疫调节特性,可以保护肺泡毛细血管膜免受免疫损伤,并通过分泌有益的可溶性因子恢复肺泡液的清除^[14]。然而,在持续缺氧缺血和过度炎症的环境下,移植的 MSCs 存活率较低,这成为 MSCs 用于治疗炎症性疾病的主要限制性因素^[15]。因此,提高移植 MSCs 的存活率对修复受损组织具有重要意义。此外,MSCs 具有自我更新、低免疫原性和易扩张性的特点,这使得 MSCs 可以作为一种理想的载体以加载保护性基因,最大限度地发挥 MSCs 的益处^[16]。HO-1 是抑制氧化应激、促炎细胞因子和促凋亡因子作用的关键成分^[17]。上调 HO-1 的表达可改善 ALI 动物模型肺组织病理损伤、肺水肿、脂质过氧化,阻止细胞死亡^[18]。有证据显示,MSCs 与肺微血管内皮细胞(PVECs)共培养可明显抑制 LPS 诱导的 PVECs 损伤,抑制炎症和氧化应激的产生;而与 MSCs 相比,过表达 HO-1 的 MSCs 可进一步改善 LPS 诱导的 PVECs 损伤,抑制炎症和氧化应激的产生,表明过表达 HO-1 可增强 MSCs 对 LPS 诱导的 PVECs 损伤的抑制作用^[19]。本研究结果显

示, LPS 诱导建立的 ALI 大鼠肺组织出现明显病变, 肺泡水肿、炎症细胞堆积和肺泡上皮细胞变性坏死, AT II 细胞特异性标志物 SP-C 表达水平降低, 炎症细胞数和炎症因子水平明显升高。BMSCs 治疗可明显改善 ALI 大鼠肺组织病理学变化, 促进 SP-C 表达, 抑制炎症细胞数和炎症因子水平的升高, 而与 BMSCs 相比, 过表达 HO-1 的 BMSCs 对 ALI 的改善作用进一步增强, 表明过表达 HO-1 可增强 BMSCs 对 ALI 的保护作用。

NLRP3 是一种细胞质模式识别受体, 可被某些病原体相关分子模式或损伤相关分子模式激活, 如细菌、病毒和 ATP^[20]。NLRP3 的激活导致适配器 ASC 的组装, 导致 pro-Caspase-1 的自激活并裂解为酶成熟的 Caspase-1, 进一步将 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 分别裂解为成熟的 IL-1 β 和 IL-18^[21]。尽管 NLRP3 炎症小体的激活是一种宿主防御机制, 以消除感染性疾病中入侵的病原体, 但 NLRP3 炎症小体的过度激活也是异常炎症、组织损伤和器官功能障碍的核心因素^[22]。最近的研究表明, 在 ALI 小鼠模型中, NLRP3 炎症小体被激活, 而抑制 NLRP3 炎症小体激活可抑制 TNF- α 和 IL-1 β 的产生, 改善 ALI 小鼠肺组织病理学变化^[23]。在一项关于 2 型糖尿病的研究中发现, MSCs 可通过抑制 NLRP3 炎症小体的激活, 抑制 IL-1 β 、IL-18 和 TNF- α 的产生, 从而减轻胰岛素抵抗^[24]。另外, MSCs 在柯萨奇病毒 B3 诱导的心肌炎中具有心脏保护作用, 该作用主要是通过抑制 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 的表达实现^[25]。本研究中, BMSCs 治疗可明显抑制 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 的表达, 降低 IL-1 β 和 TNF- α 水平。有研究发现, 一氧化碳作为 HO-1 氧化代谢的产物, 可以通过抑制 NLRP3 炎症小体的激活来保护肺免于炎症损伤^[26]。因此我们通过给予过表达 HO-1 的 BMSCs。进一步促进体内 BMSCs 的增殖和分化, 并且由于 HO-1 具有抑制炎症小体激活的作用, ALI 大鼠肺组织中 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 表达水平明显升高, IL-1 β 和 TNF- α 水平明显升高, 与 BMSCs 相比, 过表达 HO-1 的 BMSCs 对 ALI 的抑制作用进一步增强, 从而发挥对 ALI 的治疗作用。本研究结果表明, 过表达 HO-1 可增强 BMSCs 对 ALI 大鼠 NLRP3 炎症小体激活的抑制作用。

综上所述, 过表达 HO-1 的 BMSCs 可能通过抑制 NLRP3 炎症小体激活, 抑制炎症反应, 促进 AT II 细胞的形成, 改善大鼠 ALI。

参 考 文 献

[1] Mowery NT, Terzian WTH, Nelson AC. Acute lung injury [J]. *Curr Probl Surg*, 2020, 57(5):100-107.
[2] Nieman GF, Andrews P, Satalin J, et al. Acute lung injury: how to stabilize

a broken lung [J]. *Crit Care*, 2018, 22(1):136-145.
[3] Mokra D, Mikolka P, Kosutova P, et al. Corticosteroids in Acute Lung Injury: The Dilemma Continues [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19):4765-4773.
[4] Ying Y, Mao Y, Yao M. NLRP3 Inflammasome Activation by MicroRNA-495 Promoter Methylation May Contribute to the Progression of Acute Lung Injury [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 18:801-814.
[5] Zaroni M, Cortesi M, Zamagni A, et al. The Role of Mesenchymal Stem Cells in Radiation-Induced Lung Fibrosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(16):3876-3884.
[6] Liu HM, Liu YT, Zhang J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate lung injury through anti-inflammatory and antibacterial effect in COPD mice [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2017, 37(4):496-504.
[7] Liu N, Wang H, Han G, et al. Enhanced proliferation and differentiation of HO-1 gene-modified bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the acute injured kidney [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(2):946-956.
[8] 赵诗雯, 张宗泽. 右美托咪定预处理抑制 NLRP3 炎症小体活性减轻脂多糖诱导的大鼠急性肺损伤 [J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2020, 41(4):578-582.
[9] 王志华, 杨焕章, 傅晓燕, 朱念, 高波, 蔡振荣. 血管内皮细胞生长因子在急性肺损伤大鼠中的表达及意义 [J]. *临床肺科杂志*, 2016, 21(12):2230-2233 + 2237.
[10] Butt Y, Kurdowska A, Allen TC. Acute Lung Injury: A Clinical and Molecular Review [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2016, 140(4):345-50.
[11] Otrock ZK, Liu C, Grossman BJ. Transfusion-related acute lung injury risk mitigation: an update [J]. *Vox Sang*, 2017, 112(8):694-703.
[12] Gross CM, Kellner M, Wang T, et al. LPS-induced Acute Lung Injury Involves NF- κ B-mediated Downregulation of SOX18 [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2018, 58(5):614-624.
[13] Pedraza L, Cunha AA, Luft C, et al. Mesenchymal stem cells improves survival in LPS-induced acute lung injury acting through inhibition of NETs formation [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(12):3552-3564.
[14] Harrell CR, Sadikot R, Pascual J, et al. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy of Inflammatory Lung Diseases: Current Understanding and Future Perspectives [J]. *Stem Cells Int*, 2019, 19:423-431.
[15] Xiang Q, Liao Y, Chao H, et al. ISLI overexpression enhances the survival of transplanted human mesenchymal stem cells in a murine myocardial infarction model [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1):51-62.
[16] Chen Y, Zhao Y, Chen W, et al. MicroRNA-133 overexpression promotes the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells on acute myocardial infarction [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1):268-278.
[17] Drummond GS, Baum J, Greenberg M, et al. HO-1 overexpression and underexpression: Clinical implications [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 673:108-116.
[18] Dong H, Qiang Z, Chai D, et al. Nrf2 inhibits ferroptosis and protects against acute lung injury due to intestinal ischemia reperfusion via regulating SLC7A11 and HO-1 [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(13):12943-12959.
[19] Chen X, Zhang Y, Wang W, et al. Mesenchymal Stem Cells Modified with Heme Oxygenase-1 Have Enhanced Paracrine Function and Attenuate Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory and Oxidative Damage in Pulmonary Microvascular Endothelial Cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(1):101-122.
[20] Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics [J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19(8):477-489.
[21] Kelley N, Jeltama D, Duan Y, et al. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13):3328-3336.
[22] Mangan MSJ, Olhava EJ, Roush WR, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(8):588-606.
[23] Hong CY, Zhang HD, Liu XY, et al. Attenuation of hyperoxic acute lung injury by Lycium barbarum polysaccharide via inhibiting NLRP3 inflammasome [J]. *Arch Pharm Res*, 2019, 42(10):902-908.
[24] Sun X, Hao H, Han Q, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells ameliorate insulin resistance by suppressing NLRP3 inflammasome-mediated inflammation in type 2 diabetes rats [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1):241-252.
[25] Miteva K, Pappritz K, Sosnowski M, et al. Mesenchymal stromal cells inhibit NLRP3 inflammasome activation in a model of Coxsackievirus B3-induced inflammatory cardiomyopathy [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):2820-2829.
[26] Jin L, Batra S, Jeyaseelan S. Deletion of Nlrp3 Augments Survival during Polymicrobial Sepsis by Decreasing Autophagy and Enhancing Phagocytosis [J]. *J Immunol*, 2017, 198(3):1253-1262.

(收稿日期:2021-04-29)

(本文编辑:周三凤)