

骨髓间充质干细胞移植多器官功能不全综合征兔心、肝、肺器官中凋亡因子Apaf-1的表达**

凌斌¹, 陈静¹, 王廷华², 潘兴华³, 孙洁¹, 刘萍¹

Apoptotic protease activating factor-1 expression in the heart, liver and lung of rabbits with multiple organ dysfunction syndrome following bone marrow mesenchymal stem cells transplantation

Ling Bin¹, Chen Jing¹, Wang Ting-hua², Pan Xing-hua³, Sun Jie¹, Liu Ping¹

¹Department of ICU, Second People's Hospital, Kunming 650031, Yunnan Province, China; ²Institute of Neuroscience, Kunming Medical College, Kunming 650031, Yunnan Province, China; ³Department of Clinical Trials, Kunming General Hospital of Chengdu Military Area Command of Chinese PLA, Kunming 650031, Yunnan Province, China

Ling Bin, Master, Chief physician, Master's supervisor, Department of ICU, Second People's Hospital, Kunming 650031, Yunnan Province, China
Lingbin02@yahoo.com

Supported by: the Natural Science Foundation of Yunnan Province, No. 2007C249M

Received: 2010-04-27
Accepted: 2010-07-07

¹云南省第二人民医院 ICU 科, 云南省昆明市 650031; ²昆明医学院神经科学研究所, 云南省昆明市 650031; ³解放军成都军区昆明总医院临床实验科, 云南省昆明市 650031

凌斌★, 男, 1967年生, 云南省建水人, 1995年昆明医学院毕业, 硕士, 副院长, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事间充质干细胞移植治疗多器官功能不全综合征疗效及机制的研究。
Lingbin02@yahoo.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225(2010)36-06724-05

收稿日期: 2010-04-27
修回日期: 2010-07-07
(20100427007/GW-Q)

Abstract

BACKGROUND: The multiple organ dysfunction syndrome (MODS) onset and organ tissue injury are associated with cell apoptosis and necrosis. However, bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) as seed cells are effective in repair field.

OBJECTIVE: To observe BMSCs transplantation effects on apoptotic protease-activating factor 1 (Apaf-1) expression in involved organs of rabbits with MODS.

METHODS: Two-hit animal model of MODS was established in the experimental group. Rabbit BMSCs were cultured, amplified and identified *in vitro*, and then labeled with GFP by lentivirus. BMSCs were transplanted *via* the femoral artery. We also set model control and normal groups. The survival of BMSCs in model of MODS was observed. Apaf-1 gene expression was detected in the heart, liver and lung prior to and following transplantation using RT-PCR.

RESULTS AND CONCLUSION: Lentiviral transgenic GFP marker presence of BMSCs was visible in the rabbit liver and lung in the experimental group. RT-PCR results showed that Apaf-1 mRNA expression was determined in the heart, liver and lung tissues of normal group, and significantly increased in the heart, spleen and kidney of model control group. Apaf-1 mRNA expression was decreased in the rabbit heart, spleen and kidney of experimental group. These indicated that BMSCs have good biological activity. Transplanted BMSCs could implant in the damaged organs of rabbits with MODS, downregulate Apaf-1 mRNA expression, which suggested that BMSCs transplantation can provide a new therapeutic method for MODS.

Ling B, Chen J, Wang TH, Pan XH, Sun J, Liu P. Apoptotic protease activating factor-1 expression in the heart, liver and lung of rabbits with multiple organ dysfunction syndrome following bone marrow mesenchymal stem cells transplantation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(36): 6724-6728. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 研究证明多器官功能不全综合征的发病及其器官组织损伤与细胞凋亡和坏死有关, 而近年来骨髓间充质干细胞作为种子细胞在修复领域已初现成效。

目的: 观察骨髓间充质干细胞移植对多器官功能不全综合征兔受累脏组织细胞凋亡蛋白酶活化因子 1 表达的影响。

方法: 实验组建立两次打击多器官功能不全综合征动物模型, 进行兔自体骨髓间充质干细胞体外培养、扩增、鉴定, 慢病毒转基因标记 GFP, 经股动脉移植, 并设立模型对照组及正常组。组织切片观察骨髓间充质干细胞在多器官功能不全综合征动物模型宿主内的存活情况, RT-PCR 测定骨髓间充质干细胞移植前后凋亡因子 Apaf-1 在心、肝、肺重要脏器中的表达。

结果与结论: 实验组兔肝、肺脏组织内有慢病毒转基因标记 GFP 的骨髓间充质干细胞存在。RT-PCR 结果显示正常组织心、肝、肺中均有 Apaf-1 mRNA 表达, 且模型对照组心、脾、肾 Apaf-1 mRNA 表达较正常组明显增加, 而实验组兔心、脾、肾组织中 Apaf-1 mRNA 表达下降。说明骨髓间充质干细胞具有良好的生物学活性, 移植后的骨髓间充质干细胞能够定植在多器官功能不全综合征兔的受损脏组织内, 并下调 Apaf-1 mRNA 的表达, 提示骨髓间充质干细胞移植有望为多器官功能不全综合征提供新的治疗方法。

关键词: 多器官功能不全综合征; 骨髓间充质干细胞; 慢病毒转基因标记; 兔; 移植; 细胞凋亡; Apaf-1

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.36.017

凌斌, 陈静, 王廷华, 潘兴华, 孙洁, 刘萍. 骨髓间充质干细胞移植多器官功能不全综合征兔心、肝、肺器官中凋亡因子 Apaf-1 的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(36):6724-6728.

[http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

多器官功能不全综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)发展迅速、病情凶险、死亡率高, 寻找治疗的策略与方法是危重医学领域中研究的热点课题。随着人们对 MODS 的认识不断深化, 越来越多的研究证明 MODS 的发病及其器官组织损伤与细胞凋亡和

坏死有关, 而近年来骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)作为种子细胞在修复领域已初现成效^[1-3]。细胞凋亡蛋白酶活化因子1(apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1)是线粒体凋亡途径中的一个重要促凋亡因子, 对调控细胞凋亡起到重要作用。本实验采用纯化的骨髓间充质干细胞进行兔 MODS 模型的移植治疗, 获得骨髓间充质干细胞在受累脏器官中存活和分布的依据, 同时检测 Apaf-1

在、心、肝、肺脏器中的表达变化显著,提示骨髓间充质干细胞移植可抑制受累脏器的细胞凋亡,达到一定的组织修复的疗效,为骨髓间充质干细胞应用于MODS治疗的可能性提供实验依据。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2007-10/2010-06在昆明医学院完成。

材料: 正常健康新西兰大耳白兔35只,雌雄不拘,体质量2.5~3.0 kg,随机数字表法分为3组:正常组5只(不做任何处理)、模型对照组15只(失血性休克+内毒素)、实验组15只(失血性休克+内毒素+骨髓间充质干细胞回输治疗)。所有动物均由解放军成都军区昆明总医院实验动物中心提供,实验动物质量合格证号SYXK(滇)2005-0008;实验过程中对动物处置符合2006年科技部《关于善待实验动物的指导性意见》的规定^[4]。

试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM/F12 培养基和标准胎牛血清	GIBCO, U.S.
胰蛋白酶、内毒素脂多糖 L2880	SIGMA, U.S.
红细胞裂解液,CD34、CD45、CD73、CD105 抗体,慢病毒包装质粒和表达质粒, DEPC	SIGMA, U.S.
DNA marker	TAKARA
Tri201、RT 试剂盒、Taq DNA 聚合酶	Invitrogen, U.S.
DEPC treated Water、dNTP	上海生工生物工程技术有限公司
SYBR Green I 染料	SIGMA, U.S.
SuperTM 反转录酶	Invitrogen, U.S.
Apaf-1 和 GAPDH 引物合成	上海生工生物工程技术有限公司
ABI 7300 实时定量荧光 PCR 仪	ABI, U.S.
普通 PCR、核酸蛋白检测仪	BIO-RAD, U.S.
水平电泳仪	上海天能科技有限公司
倒置相差显微镜	NIKON, Japan
离心机	BECKMAN, U.S.
细胞培养箱,激光共聚焦显微镜,流式细胞仪	B.D, U.S.
Rm6240BD 多道生理信号采集处理器, HITACHI-7171A 自动生化分析仪	日本日立

实验方法:

骨髓间充质干细胞的培养、鉴定及转基因标记: 对实验组15只新西兰大耳白兔进行自体移植,无菌条件下在抽取骨髓10 mL。Percoll密度梯度离心获取单个核细胞,以 $1 \times 10^9 L^{-1}$ 的细胞浓度接种于 $25 cm^2$ 塑料培养瓶,DMEM/F12+体积分数10%FBS+青链双抗、 $37^\circ C$ 、体

积分数5%CO₂条件下静置培养24 h后,清除未贴壁细胞。以后视生长情况两三天换液1次。待细胞融合至90%以上时,消化,传代。应用流式细胞仪对第3代培养的骨髓间充质干细胞细胞表面抗原进行表型鉴定。采用脂质体介导转染法将含绿色荧光蛋白的慢病毒通过脂质体转染兔骨髓间充质干细胞。

两次打击MODS动物模型的复制: 新西兰大耳白兔耳缘静脉麻醉后,手术充分暴露股动静脉,经股动脉放血,保持平均动脉压(MAP)维持在35~40 mm Hg (1 mm Hg=0.133 kPa),1 h(通过Rm6240BD多道生理信号采集处理系统监测血压指标变化),导致兔失血性休克,并将60%所失血液及两倍失血量的平衡液自股静脉1 h内回输复苏,造成再灌注损伤,术毕,把股动脉断端分别结扎,缝合观察。术后第1天腹腔内注射内毒素10 μg/kg,参照Hu等^[5]的动物MODS的诊断标准,检测肌酸激酶同工酶、谷丙转氨酶、谷草转氨酶、肌酐等生化指标,检验模型是否成功。

骨髓间充质干细胞移植: 用传至第3代的骨髓间充质干细胞,经胰酶消化后,制备成细胞浓度为 $1 \times 10^{10} L^{-1}$ 的2 mL细胞悬液。按照 $3 \times 10^6/kg$ 经另一侧股动脉插管至左心室回输骨髓间充质干细胞。

实时荧光定量反转录聚合酶链反应(FQ-RT-PCR)测定重要脏器组织中Apaf-1基因的表达变化: 总RNA 抽提及RT-PCR 操作方法按试剂盒说明书操作。用美国ABI公司引物设计软件Primer Express3.0,设计Apaf-1和GAPDH的定量荧光PCR引物,并由上海生工生物技术服务公司合成,Apaf-1上游引物:5' AGG CTG TG TGCG CTG CTC TG3',下游引物:5' AGT CAC CCA GCC TCC GTG GG 3',扩增片段166 bp,将管家基因GAPDH作为内对照,上游引物:5' TCA T GA CCA CGG TGC ACG CC 3',下游引物:5' CCA CGA CCG ACA CGT TGG GG 3',扩增产物210 bp。荧光定量PCR反应体系25 μL: cDNA模板1 μL。SYBR GREEN I 荧光染料1 μL,10×PCR buffer 2.5 μL,25 mmol/L Mg²⁺ 2.0 μL,Invitrogen Hot-start Taq ase 0.2 μL,10 mmol/L dNTP 0.5 μL,上下游引物(10 μmol/L)各0.5 μL,去离子水补足至25 μL,每个样品均做3个复孔。美国应用生物系统公司的7300型实时定量PCR仪器上进行如下反应:95 °C,10 min,接着95 °C,15 s,60 °C 20 s,68 °C 1 min 并收集荧光信号,重复40循环。PCR结束后产物进行1.5 %琼脂糖凝胶电泳分析并采用熔解曲线确定产物特异性,ABI7300随机软件会自动计算出每个样本的Apaf-1基因和管家基因GAPDH的CT值(Cycle of Threshold),而样本中Apaf-1的相对表达量则需利用相对定量公式计算得到,相对定量公式为Fold Value)Apaf-1/GAPDH)=2^{-ΔΔCT}; ΔΔCt=Ct Apaf-1-Ct GAPDH,数

据经处理后得到经GAPDH标准化后的Apaf-1基因的标化值, 该标化值反映样本中Apaf-1基因的真实表达情况。

主要观察指标: 各组Apaf-1在心、肝、肺重要脏器中的表达。

设计、实施、评估者: 第一作者构思并设计本实验, 分析并设计相关数据, 所有作者共同实施, 第一作者对本文负责。

统计学分析: 使用SPSS 11.5统计软件进行统计学处理。全部数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义, $P < 0.01$ 为差异有非常显著性意义, $P > 0.05$ 为差异无显著性意义。各实验组不同时间点采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)对资料进行分析。

2 结果

2.1 神兔骨髓间充质干细胞的形态变化 光镜观察发现骨髓间充质干细胞接种24 h即可见部分细胞贴壁; 培养36~48 h后, 贴壁的单核细胞开始增多; 5~7 d, 逐渐形成分散的细胞集落, 集落之间彼此相连, 细胞紧密排列, 呈旋涡状、网状、放射状向周围扩展, 逐渐与邻近集落相融合; 12~14 d, 细胞各个集落间相互融合达85%, 细胞相互间紧密贴附, 单个细胞呈狭长梭形, 大多数细胞沿胞体长轴呈有序排列; 经三四次传代后, 形成较典型的骨髓间充质干细胞。

2.2 兔骨髓间充质干细胞表面抗原分析及GFP标记 经流式细胞仪分析结果显示, 体外培养的骨髓间充质干细胞不表达血细胞表面标记如CD34、CD45, 但表达CD73、CD105。慢病毒转染后培育48 h, 激光共聚焦显微镜观察转染效果, 见图1。

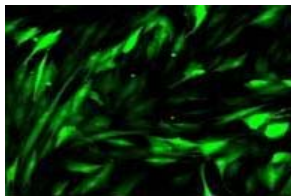


Figure 1 Slow virus cultivation for 48 h after transfection, under 488 nm wavelength light excitation, the laser confocal microscope of green fluorescent protein (GFP) labeled bone marrow mesenchymal stem cells (×40)
图1 慢病毒转染后培育48 h, 488 nm 波长光激发下激光共聚焦显微镜观察 GFP 标记的骨髓间充质干细胞(×40)

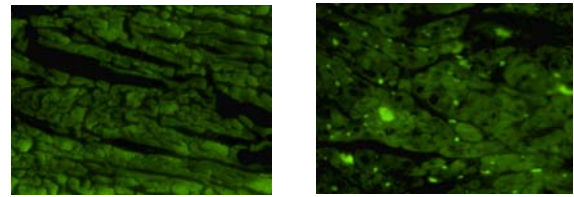
2.3 MODS模型兔的评价 经生化检测, 模型组PaO₂降到对照值的50%左右; 谷丙转氨酶、谷草转氨酶、肌酐、尿素氮分别为对照值的2倍左右, 血肌酸激酶同工酶为对照值的3倍以上, 证明模型成功。35只兔均进入

结果分析。见表1。

表 1 正常值与打内毒素后各指标的比较 Table 1 Comparison of normal values with each indexes after endotoxin injection (x±s)			
Index	Alanine aminotransferase (μkat/L)	Aspartate aminotransferase (μkat/L)	Blood urea nitrogen (mmol/L)
Normal value	1.14±0.30	0.76±0.46	3.51±1.45
Endotoxin	2.04±1.04 ^b	1.64±0.39 ^b	8.69±4.86 ^b
Index	Creatine kinase-MB (U/L)	Creatinine (μmol/L)	PaO ₂ (kPa)
Normal value	686.00±571.24	69.88±12.60	12.58±0.51
Endotoxin	3 829.63±2 580.98 ^a	181.63±103.17 ^b	10.36±0.48 ^b

^aP < 0.05, ^bP < 0.01, vs. normal value

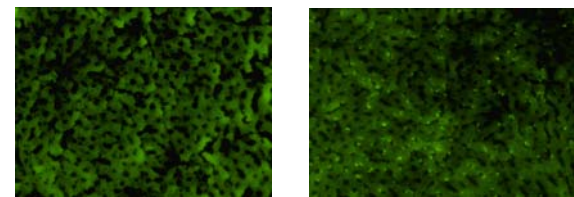
2.4 心、肝、肺器官的骨髓间充质干细胞移植 光显微镜下观察移植28 d, 肝、肺组织器官内有移植的骨髓间充质干细胞存在, 见图2~4。



a: Transplanted mesenchymal stem cells, without green fluorescence b: Transplanted mesenchymal stem cells, with green fluorescence

Figure 2 Bone marrow mesenchymal stem cells in the myocardial tissues under a fluorescence microscope(×40)

图2 荧光显微镜下观察心肌组织切片中移植的骨髓间充质干细胞(×40)



a: Transplanted mesenchymal stem cells, without green fluorescence b: Transplanted mesenchymal stem cells, with green fluorescence

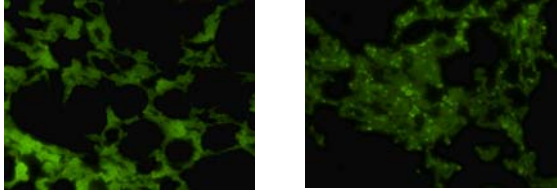
Figure 3 Bone marrow mesenchymal stem cells in the liver tissues under a fluorescence microscope (×40)

图3 荧光显微镜下观察肝组织切片中移植的骨髓间充质干细胞(×40)

2.5 RT-PCR检测心、肝、肺组织Apaf-1基因mRNA的表达 心、肝、肺组织PCR产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳分析, 管家基因GAPDH作为内对照, 看其产物是否符合预期大小, 是否条带清晰锐利。见图5。

RT-PCR检测Apaf-1的结果显示: 在第28天, 正常心、

肝、肺组织中均有Apaf-1 mRNA的表达, 模型组心、肝、肺Apaf-1 mRNA的表达较正常组明显增加($P < 0.01$), 而治疗组Apaf-1 mRNA的表达低于模型组($P < 0.01$). 见图6, 7、表2。



a: Transplanted mesenchymal stem cells, without green fluorescence
b: Transplanted mesenchymal stem cells, with green fluorescence

Figure 4 Bone marrow mesenchymal stem cells in the lung tissues under a fluorescence microscope($\times 20$)
图 4 荧光显微镜下观察肺组织切片中移植的骨髓间充质干细胞($\times 20$)

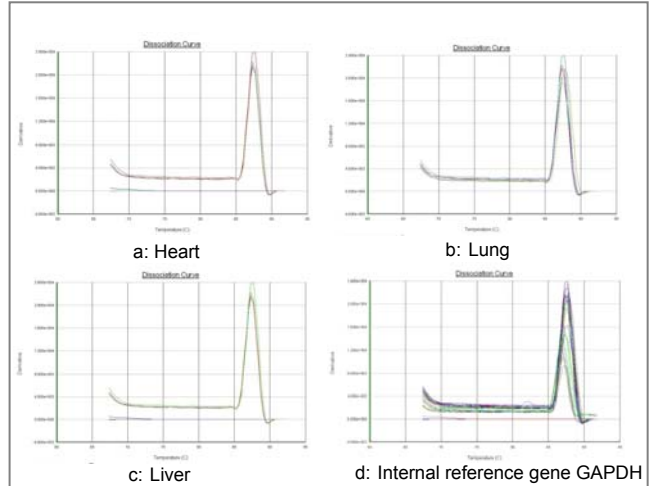
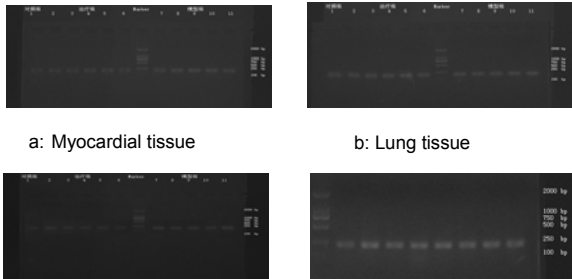


Figure 7 Apaf-1 gene dissolution curve in the heart, lung and liver
图 7 心、肺、肝组织 Apaf-1 基因溶解曲线图



a: Myocardial tissue
b: Lung tissue
c: Liver tissue
d: Internal reference gene GAPDH

Lane 1: production of Apaf-1 gene in the normal control group; Lane 2, Lane 3, Lane 4, Lane 5, Lane 6: production of Apaf-1 gene in mesenchymal stem cells group; Lane 7: Marker; Lane 8, Lane 9, Lane 10, Lane 11: production of Apaf-1 gene in the model group

Figure 5 Electrophoretogram of Apaf-1 mRNA amplification products in heart, lung and liver
图 5 心、肝、肺组织 Apaf-1 基因 mRNA 扩增产物电泳图

表 2 Apaf-1 基因的标准化值
Table 2 Apaf-1 gene in standardized values ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Heart	Liver	Lung
Normal	5	0.22±0.03	0.70±0.01	0.73±0.02
Model control	15	0.39±0.07 ^a	0.82±0.04 ^a	0.86±0.04 ^a
Experimental	15	0.62±0.05 ^a	0.97±0.04 ^a	0.93±0.05 ^a

^a $P < 0.01$, vs. normal group

各组织产物在87 °C左右有一个单一的特异峰, 85 °C之前没有杂峰, 说明产物均为特异性的扩增。

3 讨论

MODS是临床上常见的危重病症, 器官组织损伤是其重要的病理过程, 目前研究证实与器官组织细胞凋亡坏死有关^[6], 目前临床治疗MODS尚无有效的药物和措施。近年来研究发现骨髓间充质干细胞作为种子细胞在组织修复中起重要作用。本实验发现体外培养获得的兔骨髓间充质干细胞表现骨髓间充质干细胞形态学特征; 移植后的骨髓间充质干细胞能够定植在MODS兔的受损脏器组织内; 骨髓间充质干细胞能够下调Apaf-1 mRNA在MODS的心、脾、肾组织中的表达。提示体外培养获得骨髓间充质干细胞, 可经股动脉全身血液循环, 定植到受损器官内, 能够下调Apaf-1 mRNA在心、脾、肾组织中的表达, 有望为MODS提供新的治疗方法。骨髓间充质干细胞最早由Friedenstein等^[7]发现的来源于胚胎发育早期中胚层的一类具有良好组织融合性和低免疫源性的多能干细胞, 具有自我更新和增生能力, 在特定条件下可分化为多种组织谱系的细胞^[8-12], 具有向缺血或损伤组织归巢的特性, 鉴于骨髓间充质干细胞的多种优点^[13], 目前已作为理想的种子细胞广泛应用于

组织工程、细胞移植、基因治疗等领域。然而细胞凋亡和坏死是MODS治疗中罪魁祸首, 已经有部分学者开始对Apaf-1等凋亡因子进行研究, 发现它们在缺氧、局部缺血或某些毒素等作用导致的MODS中也起到一定的调控作用, Apaf-1是一种相对分子质量为130 000的蛋白质, 它广泛存在于各种组织里, 是凋亡体的真正核心, 在成人脾、外周血白细胞及胚胎脑、肾、肺中的表达较高, 与这些组织中高水平的凋亡率相一致。1997年, Zou等^[14]首次从HeLa细胞胞浆内纯化和克隆出Apaf-1的cDNA, 并证实Apaf-1为CED-4的人类同源类似物, 由于人体内一系列信号转导级联反应均以Apaf-1为靶子而调节凋亡体。目前研究证实, Apaf-1是线粒体凋亡途径中一个重要促凋亡因子, 在调控细胞凋亡作用中起重要作用。研究表明MODS发展过程中各类细胞既存在坏死也存在凋亡。已经有部分学者对Apaf-1的研究发现, Apaf-1在缺氧、局部缺血或某些毒素等作用导致的MODS中起到一定的调控作用^[15]。所以对凋亡因子的研究有助于从全新角度研究MODS的发病机制、病因、诊断和治疗。根据以上研究, 我们检测Apaf-1在心、肝、肺器官的表达变化, 结果提示模型组心、脾、肾Apaf-1 mRNA的表达较正常组明显增加, 而移植组下调Apaf-1 mRNA在MODS的心、脾、肾组织中的表达, 提示Apaf-1可能在MODS的发病中具有一定的作用, 推测Apaf-1可能作为治疗MODS的一个潜在靶点, 骨髓间充质干细胞移植有望为MODS提供新的治疗方法。

4 参考文献

- [1] Bentazon JF, Stenderup K, Hansen FD, et al. Tissue distribution and engraftment of human mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene. *Biophys Res Commun*. 2005; 330(3):633-640.
- [2] Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med*. 2003; 5(12):1038-1038.
- [3] Nagaya N, Fujii T, Iwase T, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 287(6):2670-2676.
- [4] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见 [OL]. 2006-09-30. [2008-08-22]. http://www.most.gov.cn/zfwj2006/200512/t20051214_54389.htm
- [5] Hu S, Sheng Z, Zhou B, et al. Study on delay two-phase multiple organ dysfunction syndrome. *Chin Med J*. 1998; 111(2):1012-1018.
- [6] Bhatia M, Mochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol*. 2004; 202: 145.

- [7] Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet*. 1987; 20:263-272.
- [8] Pansky A, Roitzheim B, Tobiasch E. Differentiation potential of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Lab*. 2007; 53(1-2):81-84.
- [9] Benayahu D, Akavia UD, Shur I. Differentiation of bone marrow stroma-derived mesenchymal cells. *Curr Med Chem*. 2007; 14(2):173-179.
- [10] Battula VL, Bareiss PM, Trembl S, et al. Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SS EA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation*. 2007 75(4):279-291.
- [11] Zhang W, Zeng YS, Zhang XB, et al. Combination of adenoviral vector-mediated neurotrophin-3 gene transfer and retinoic acid promotes adult bone marrow cells to differentiate into neuronal phenotypes. *Neurosci Lett*. 2006; 408(2):98-103.
- [12] Chun-Mao H, Su-Yi W, Ping-Ping L, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiate into epidermal-like cells in vitro. *Differentiation*. 2007; 75(4):292-298.
- [13] Maede K, Abello PA, Abraham MR, et al. Endotoxin induces organ specific endothelial cell injury. *Shock*. 1995; 3(1): 46.
- [14] Zou H, Henzel WJ, Liu X, et al. Apaf-1, a human protein homologous to c. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. 1997; 90(3):405-413.
- [15] Kiang JG, Bowman PD, Lu X, et al. Geldanamycin inhibits hemorrhage-induced increases in caspase-3 activity: role of inducible nitric oxide synthase. *J Appl Physiol*. 2007; 103(3):1045-1055.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 云南省自然科学基金资助 (2007C249M) 项目, 课题名称《间充质干细胞移植治疗多器官功能不全综合征疗效及机制的研究》。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点: 对文献查新后发现, 开展间充质干细胞对多器官功能不全综合征疗效和机制的研究工作在本省尚无先例, 在国内也无报道。本工作既是在理论上的探索, 又是在临床医学技术上的创新。

课题评估的“金标准”: 本实验根据“二次打击”学说, 参照胡森的动物多器官功能不全综合征新的标准, 成功建立兔多器官功能不全综合征模型; 骨髓间充质肝细胞的分离、培养、荧光标记技术也很成熟; 根据荧光显微镜观察组织切片, 可以判断间充质干细胞朝受损部位发生归巢; 根据生化指标的检测观察移植效果。

提供临床借鉴的价值: 本实验拟采用纯化的间充质干细胞进行狗多器官功能不全综合征模型的移植治疗, 试图获得间充质干细胞在多器官功能不全综合征模型受累脏器中存活和分布的证据, 观察间充质干细胞参与脏器损伤修复的客观疗效, 了解间充质干细胞治疗中对抑制受累脏器的细胞凋亡、下调 Apaf-1 的表达等情况, 为间充质干细胞用于多器官功能不全综合征的治疗提供理论依据和技术基础, 从而可能会对多器官功能不全综合征的恢复带来新的希望。