

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.36.010 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

盛 闽, 陈志耀, 黄鹤光, 王 锋, 金善丰. 同种异体骨髓间充质干细胞移植治疗重症急性胰腺炎相关肺损伤[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(36):6702-6709.

同种异体骨髓间充质干细胞移植治疗重症急性胰腺炎相关肺损伤*★

盛 闽, 陈志耀, 黄鹤光, 王 锋, 金善丰

福建医科大学附
属协和医院基本
外科, 福建省福州
市 350000盛 闽★, 男, 1977
年生, 湖南省汉寿
县人, 汉族, 福建
医科大学在读硕
士, 主要从事普外
科临床工作。
alison005@
sina.com通讯作者: 黄鹤
光, 主任医师, 博
士生导师, 福建医
学会外科学会主
任委员, 福建医科
大学附属协和医
院基本外科, 福建
省福州市
350000
hhuang2@
yahoo.com.cn中图分类号:R394.2
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2012)36-06702-08收稿日期:2012-01-30
修回日期:2012-04-10
(20111130003/WL-S)

文章亮点: 观察同种异体骨髓间充质干细胞移植对重症急性胰腺炎相关肺损伤大鼠的干预作用, 发现同种异体骨髓间充质干细胞移植能有效减轻重症急性胰腺炎相关肺损伤。

关键词: 重症急性胰腺炎; 肺损伤; 骨髓间充质干细胞; 移植; 器官分布

摘要

背景: 目前骨髓间充质干细胞移植治疗各种炎症性疾病研究甚多, 但在重症急性胰腺炎相关器官损伤干预方面研究甚少。

目的: 观察同种异体骨髓间充质干细胞移植对重症急性胰腺炎相关肺损伤大鼠的干预作用。

方法: 采用全骨髓差异贴壁法培养获得骨髓间充质干细胞。100只SD大鼠随机取32只为假手术组, 仅翻动轻柔胰腺; 另68只制作重症急性胰腺炎肺损伤动物模型, 并分为干预组和对照组, 每组再分为4个时间点。分别经尾静脉注入 $1 \times 10^9 L^{-1}$ 浓度骨髓间充质干细胞悬液和同体积生理盐水。干预组每个时间点随机取1只注射CM-Dil标记的骨髓间充质干细胞悬液用于细胞示踪研究。

结果与结论: 逆行胆胰管注射建模能早期诱发重症急性胰腺炎及相关肺损伤, 炎症因子及E-选择素表达明显增高, 并且胰腺和肺的损伤程度随时间延长而加重; 移植荧光标记的干细胞后肺组织可见红色荧光出现, 并随时间增长而增多; 干预组肺组织损伤情况均较对照组各时间点减轻, 血清淀粉酶及炎症递质肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 较对照组各时间点下降。干预组肺组织中E-选择素表达较对照组下降。提示同种异体骨髓间充质干细胞移植能有效保护肺血管内皮细胞, 减轻重症急性胰腺炎相关肺损伤。

Transplantation of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of severe acute pancreatitis induced lung injury in rats

Sheng Min, Chen Zhi-yao, Huang He-guang, Wang Feng, Jin Shan-feng

Abstract

BACKGROUND: There are many studies describing transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of various inflammatory diseases. But few studies are reported on intervention of injury of organs related to severe acute pancreatitis.

OBJECTIVE: To investigate the effect of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells transplantation on severe acute pancreatitis associated lung injury in rats.

METHODS: Bone marrow mesenchymal stem cells were harvested by whole bone marrow adherence method. In the sham-operated group ($n=32$), SD rats received only light and soft tipping of pancreatic gland. In the model group ($n=68$), SD rats were prepared into severe acute pancreatitis models and randomly subdivided into an intervention subgroup and control subgroup. Four time points were designated for each subgroup. In the intervention subgroup, $1 \times 10^9/L$ bone marrow mesenchymal stem cells suspension was injected *via* the tail vein; while in the control subgroup, equal amount of physiological saline was injected. In each subgroup, one rat per time point was selected for cell tracing by CM-Dil injection.

RESULTS AND CONCLUSION: Retrograde cholangiopancreatography injection molding can induce severe acute pancreatitis and associated lung injury during the early stage. Inflammatory factor and E-selectin expression was significantly increased and pancreatic gland and lung injury was aggravated with prolonged time. After labeling, red fluorescence appeared in the lung tissue and increased with prolonged time. At each time point, lung injury was alleviated, serum amylase and tumor necrosis factor α and interleukin 1β expression was decreased in the intervention subgroup compared with the control subgroup. E-selectin expression in the intervention subgroup was significantly decreased than that in the control subgroup. Transplantation of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells can effectively alleviate severe acute pancreatitis associated lung injury.

Sheng M, Chen ZY, Huang HG, Wang F, Jin SF. Transplantation of allogenic bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of severe acute pancreatitis induced lung injury in rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(36): 6702-6709.

Department of General Surgery, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350000, Fujian Province, China

Sheng Min★, Studying for master's degree, Department of General Surgery, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350000, Fujian Province, China
 alison005@sina.com

Corresponding author: Huang He-guang, Chief physician, Doctoral supervisor, Department of General Surgery, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350000, Fujian Province, China
 hhuang2@yahoo.com.cn

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 81070369*

Received: 2012-01-30
 Accepted: 2012-04-10

0 引言

重症急性胰腺炎是一种病情险恶、并发症多、病死率较高的急腹症。在短时间内会迅速损伤机体多个器官, 并发多器官功能障碍综合征, 其中以呼吸系统衰竭病变最为常见^[1]。重症急性胰腺炎引发急性肺损伤, 进而发展为急性呼吸窘迫综合征, 急性肺损伤是重症急性胰腺炎最常见和最严重的全身并发症, 是治疗的难点, 而且患者预后评估也很不理想^[2]。白细胞外参与过度激活及细胞因子级联反应学说被认为是引发上述结局的重要原因和机制^[3], 尤其在重症急性胰腺炎早期急性炎症期十分关键。E-选择素是内皮细胞特有的选择素, 其增高反映内皮细胞活化, 它是诱导性黏附分子, 能参与白细胞在血管内皮的滚动、附壁及迁移外渗过程, 从而导致肺血管内皮细胞及其他肺组织损伤。

骨髓间充质干细胞对重症急性胰腺炎动物具有保护作用^[4], 其生物学功能丰富。虽然干细胞治疗方面的研究较多, 但其干预机制尚未明确。实验由SD大鼠来源的同种异体骨髓间充质干细胞移植干预重症急性胰腺炎诱发肺损伤SD大鼠, 观察其在肺损伤区域的迁移和定植, 及其对炎症反应的调节功能和对局部肺组织的修复情况, 观察干预前后肺组织中E-选择素表达情况, 为干细胞治疗重症急性胰腺炎相关肺损伤提供实验依据及相关机制做初步探讨。

1 材料和方法

设计: 细胞学体内观察实验。

时间及地点: 实验于2011-02/2012-06在福建医科大学附属协和医院中心实验室及动物实验中心完成。

材料:

实验动物: 清洁级雄性SD大鼠100只, 体质量200-250 g, 由上海斯莱克动物中心提供, 动

物质量合格证号: 许可证号SCXK(沪)2007-0005。实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM/F12、胎牛血清	Hyclone 公司
青-链霉素、0.25%胰酶-0.1%EDTA	Gibco 公司
Anti-CD29、34、45、90/PE吸头、细胞培养瓶	Biolegend 公司
脱氧牛磺胆酸钠	Axygen 公司
动物手术器械包	Inalco Spamilano 福建医科大学实验动物中心
CK40 型倒置相差显微镜	OLYMPUS
低温冰箱	Thermo Forma725
FAST 型荧光定量 PCR 仪	ABI 7500
CellTrackerTMCM-Dil(C7000)、Trizol 试剂	Invitrogen 公司
PrimeScript Reverse Transcriptase	Takara 公司
SybrGreen qPCR Master Mix(2X)	上海睿安生物公司
兔抗大鼠 E-选择素(ab18981)	abCAM
TNF-α 及 IL-1β ELISA 测定试剂盒	eBioscience 公司
免疫组织化学二抗试剂盒、DAB 显色试剂盒、SABC 即用型试剂盒	武汉博士德公司
全自动生化分析仪	LX20, Beckman

实验方法:

骨髓间充质干细胞的全骨髓贴壁培养法: 按照全骨髓差异贴壁培养法^[5-6], 取SD大鼠股骨及胫骨, 超净台上剪去两骨端, DMEM/F12冲洗髓腔, 200目滤网过滤后细胞悬液1 000 r/min离心5 min, 弃上清。加入体积分数为10%胎牛血清/DMEM-F12+1%青链霉素培养基重悬细胞, 按 3×10^5 细胞浓度接种于25 cm²培养瓶中, 放入37 °C、饱和湿度、体积分数5%CO₂培养箱中孵育。48 h后首次换液, 以后两三天换液一次, 定期观察细胞分裂增殖和形态特征变化。细胞长满培养瓶底部90%后按1:2或1:3传代。传至P3代, 胰酶消化, 收获细胞, 计数后备用。

细胞表面标记物流式细胞仪检测: 0.25%胰酶-0.1%EDTA消化并收集生长良好的P3代骨髓间充质干细胞, PBS漂洗重悬, 经200目过滤网处

理制成单细胞悬液。细胞板计数后, 分装入7个EP管, 每管100 μL , 约 1×10^6 个细胞。分别为CD29、CD34、CD45和CD90及其相应的同型对照管(CD45和CD90为同一同型对照)。通过光电倍增管PMT2通道检测PE的荧光强度, 分析lin-CD29⁺、CD90⁺、CD34⁻、CD45⁻细胞比例, 测定骨髓间充质干细胞纯度。

骨髓间充质干细胞的荧光标记: 取P3代约90%融合的骨髓间充质干细胞, 吸尽旧培养液, PBS漂洗2次, 0.25%胰酶-0.1%EDTA消化1.0-2.0 min, 吹打制成单细胞悬液离心, 计数后, 1 000 r/min离心5 min, 去上清, 按 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 浓度培养液重悬细胞。50 μg CM-Dil冻干粉加二甲亚砜溶解并用DMEM/F12稀释成50 μL 标记液备用, 按 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 浓度每毫升加入2 μL CM-Dil标记液混匀细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15 min, 1 000 r/min离心5 min后弃上清, PBS漂洗后生理盐水吹打重悬备用。

重症急性胰腺炎肺损伤模型制备: 根据文献[7-8]改进方法, SD大鼠实验前禁食12 h, 10%水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射麻醉。剑突下腹前正中线上开腹约1.0 cm, 入腹腔, 充分暴露胰腺, 显微镜下, 将靠近肝门段的胆胰管先用小动脉夹予以夹闭, 聚乙烯穿刺导管(直径0.45 mm)在十二指肠壁后, 紧贴胆胰管汇入十二指肠降部处自肠外穿刺进入胆胰管约0.5 cm, 远端予以小动脉夹夹闭。接入微注泵, 逆行注射5%脱氧牛磺胆酸钠溶液, 按1 mL/kg标准, 以0.04 mL/min速度控制, 并保持压力10 min, 确认模型制作成功。胆胰管与十二指肠降部交汇处(穿刺点近端)予以11-0丝线缝扎。假手术组仅轻柔翻动胰腺后关腹。

动物分组和干细胞干预: 清洁级SD大鼠100只, 随机取32只为假手术组, 另68只制作重症急性胰腺炎肺损伤动物模型, 重症急性胰腺炎肺损伤动物模型再随机分为重症急性胰腺炎肺损伤组(对照组)和骨髓间充质干细胞移植组(干预组), 各组再依时间点分为造模后3, 6, 12, 24 h组(假手术组与对照组每时间点各8只; 干预组每时间点各9只, 其中各时间点随机取1只用于干细胞示踪观察)。建模1 h后, 干预组骨髓间充质干细胞悬液按10 mL/kg ($1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$), 经尾静脉注入重症急性胰腺炎肺损伤SD大鼠体内, 6 h重复1次。对照组同法注射同体积生理盐水。用于干细胞示踪观察的SD大鼠同法仅注射一次CM-Dil标记干细胞悬液。每组分别于对应时间点处死动物, 心尖穿刺抽血, 快速获取多块固定位置的肺及胰腺组织标本。

血清指标、肺组织湿干质量比检测及胰脏病理评估: 使用全自动生化分析仪检测血清淀粉酶、白蛋白水平。血清肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 按照说明书操作。吸

干左肺表面水分, 称湿质量(m), 置于70 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱中72 h至恒质量, 称其干质量(D), 计算肺湿干比= $m(\text{g})/D(\text{g})$ 。采用盲法由病理科医师在光镜下阅片, 观察胰腺和肺组织损伤程度, 参照Thome肺损伤评价标准评分^[9]。

肺组织E-选择素免疫组织化学检测: 采用链霉菌亲和素-生物素-过氧化物酶法检测E-选择素的免疫组织化学表达, 一抗为兔抗大鼠多克隆E-选择素抗体(工作液浓度1:100), 二抗为生物素化山羊抗兔IgG。阴性对照标本以PBS代替一抗。阳性反应为细胞胞膜及胞浆出现棕黄色颗粒。每只大鼠免疫组织化学切片400倍光镜下随机选取5个视野, 用image-Pro Plus 6.0图像分析系统分析, 表达强度用平均吸光度(MA)表示。

肺组织E-选择素mRNA的测定: ①引物序列, E-选择素: 上游5'-CTG CGA TGC TGC CTA CTT G-3', 下游5'-CCT GAT TGC TCG CAT CTT AGA-3', 扩增片段长度为231 bp; 内参照为GAPDH, 上游5'-AAG TTC AAC GGC ACA GTC AAG-3', 下游5'-CCA GTA GAC TCC ACG ACA TAC TCA-3', 扩增片段长度为137 bp。②肺组织按序匀浆、离心, 提取RNA; 在PCR仪上按(30 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 60 min, 75 $^{\circ}\text{C}$ 15 min)条件反转录; GAPDH、E-选择素基因混液: 总体积25 μL [Syb rGreen qPCR Master Mix 12.5 μL , 引物F(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , 引物R(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , ddH₂O 9.5 μL , Template (cDNA) 2 μL], 反应条件预变性95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 45次循环, 将加好样品的96孔板放在ABI 7500 FAST型荧光定量PCR仪反应。

主要观察指标: 骨髓间充质干细胞形态学; 细胞流式检测结果; 骨髓间充质干细胞移植后在重症急性胰腺炎肺损伤区域红色荧光形态学; 胰腺及肺病理变化; 实时荧光定量PCR检测肺E-选择素mRNA表达水平, 免疫组织化学分析E-选择素的定位和表达量; 血清淀粉酶、白蛋白、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 浓度及肺组织湿/干比值。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 15.0软件完成统计处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 纳入SD大鼠100只, 4只用于观察骨髓间充质干细胞在重症急性胰腺炎肺内分布及定植情况, 96只进入结果分析。

2.2 光镜下骨髓间充质干细胞形态学观察 原代细胞

培养1 d后可观察到多数死亡红细胞悬浮于培养基面, 部分沉淀细胞已贴壁; 经过2 d换液后, 大量未贴壁细胞被剔除, 贴壁细胞体积较小, 形态多样, 多呈圆形或椭圆形, 见图1。



Figure 1 After primary culture for 2 d, the majority of cells show irregular and diverse morphology (x100)
图1 原代培养2 d, 绝大多数贴壁细胞形态不规则、多样性(x100)

4-6 d细胞增殖加快, 多呈较瘦小梭形, 体积较前稍大, 迅速铺满瓶底局部区域, 紧密处可见铺路石样形态, 并有放射状密集排列的细胞集落。传代接种后一两天可贴壁, P2代骨髓间充质干细胞, 细胞形态绝大多数为成纤维样, 漩涡样分布增多。P3代骨髓间充质干细胞多数呈较宽长梭形, 似膜状铺展在瓶底, 保持旺盛的生长状态; 漩涡样分布较P2代更为明显, 见图2。

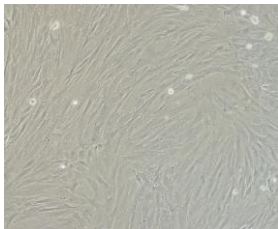
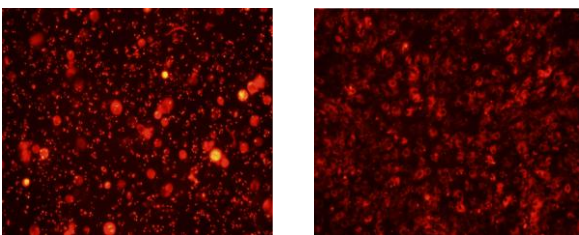


Figure 2 After culture of passage 3 bone marrow mesenchymal stem cells for 4 d, cells are arranged orderly and exhibit a swirling appearance (x100)
图2 P3代BMSCs培养4 d, 细胞排列具有较强方向性, 漩涡状分布明显(x100)

2.3 骨髓间充质干细胞荧光标记结果 见图3。



a: The CM-Dil-labeled passage 3 BMSCs after trypsin digestion;
b: Morphology of CM-Dil-labeled BMSCs after culture for 3 d under fluorescence microscope

Figure 3 The CM-Dil-labeled passage 3 bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) after trypsin digestion (x100)
图3 骨髓间充质干细胞荧光标记结果(x100)

荧光显微镜观察P3代骨髓间充质干细胞消化后CM-Dil标记的阳性细胞情况, 见图3a, 骨髓间充质干细胞的细胞膜标记率达96%以上。继续培养3 d, 细胞呈集落样旺盛生长, 显示强红色荧光。一致发现红色荧光颗粒物质沿细胞膜呈类似环状分布, 而细胞核未染荧光, 见图3b。

2.4 细胞流式检测结果 流式细胞仪检测P3代骨髓间充质干细胞细胞表面标志物, CD90阳性细胞93.5%, CD29阳性细胞91.3%, CD34阳性细胞0.82%, CD45阳性细胞2.22%, 见图4。

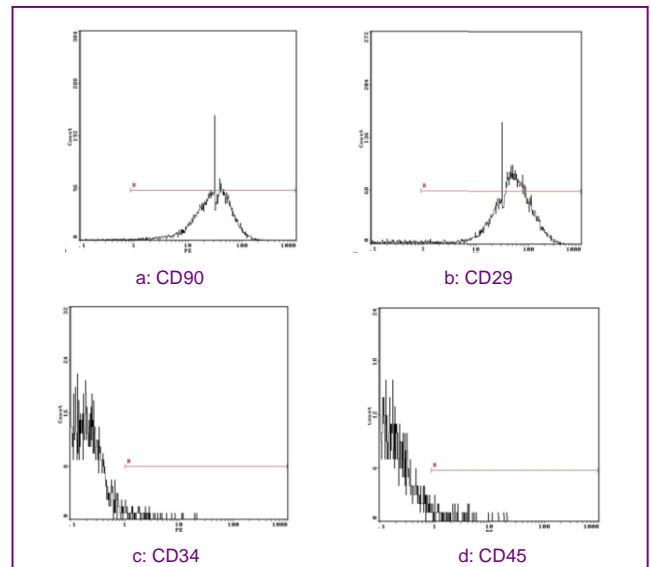
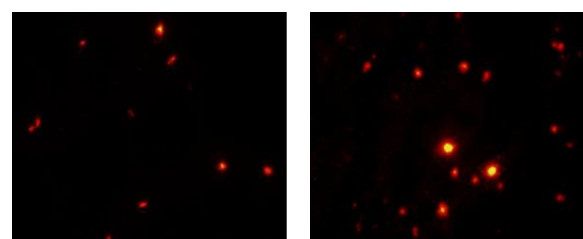


Figure 4 Surface marker expression of passage 3 bone marrow mesenchymal stem cells by flow cytometry
图4 流式细胞仪检测P3代BMSCs细胞表面标志物表达

2.5 移植后的骨髓间充质干细胞在肺脏中的定植 注射CM-Dil标记干细胞的大鼠肺组织经快速冰冻切片后, 在荧光倒置显微镜下观察, 可见肺组织中出现红色荧光细胞, 即CM-Dil阳性细胞, 并且随病程时间的推移, CM-Dil阳性细胞数量不断增加, 范围不断扩大, 见图5。



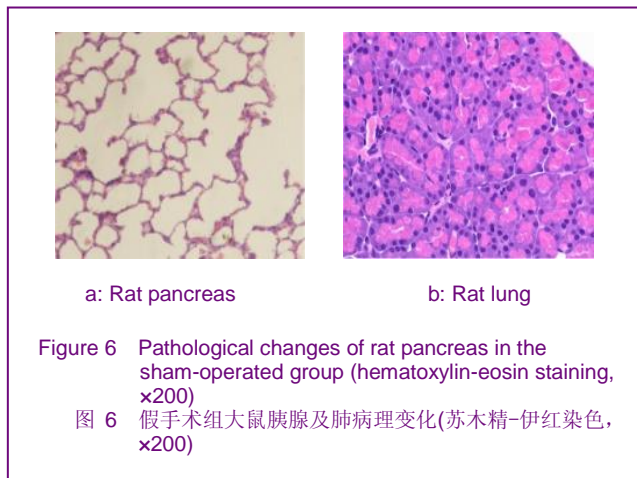
a: BMSCs distribution at 3 h b: BMSCs distribution at 24 h

Figure 5 Red fluorescent cells in lung tissue increased time-dependently after transplantation of CM-Dil-labeled-bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) (x100)

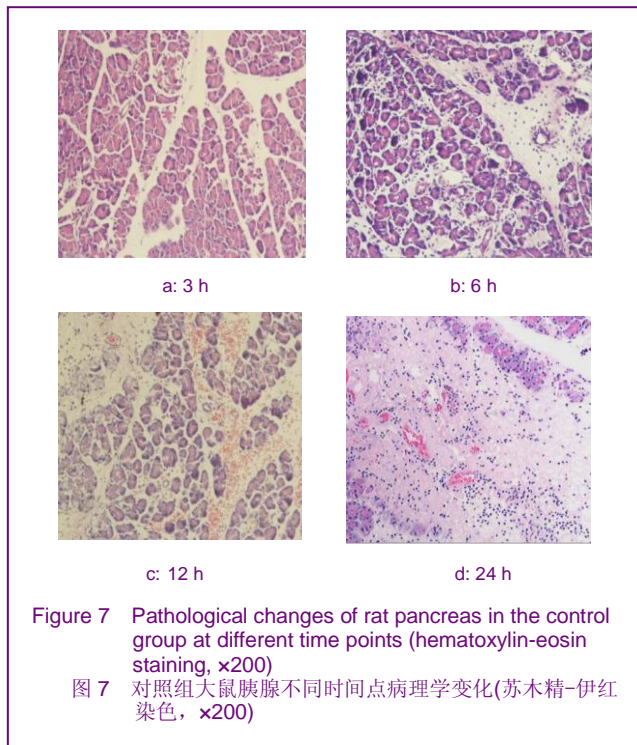
图5 荧光显微镜观察移植CM-Dil染色的BMSCs后肺组织可见呈时序性增多的红色荧光细胞(x100)

2.6 胰腺及肺损伤病理变化

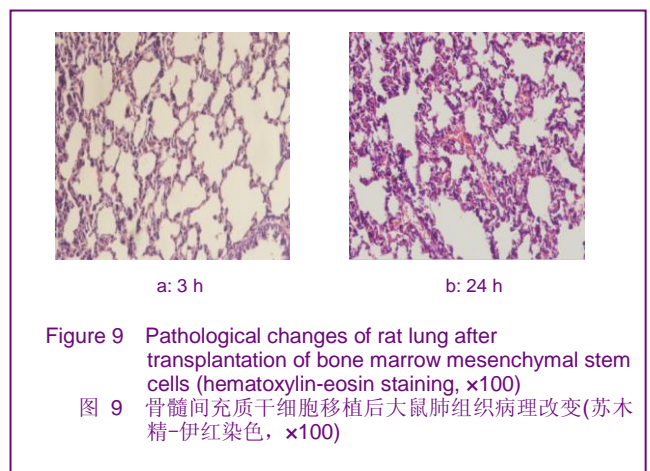
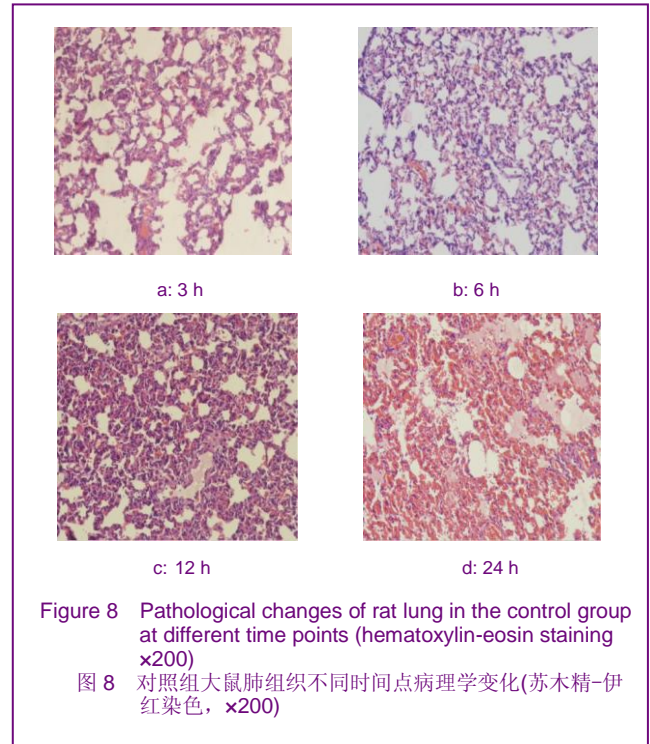
假手术组: 胰腺及肺未见明显异常, 见图6。



对照组: 胰腺出现腺叶间隙增宽, 胰腺水肿、出血、血管破裂出血, 炎症细胞浸润, 胰腺细胞坏死, 腺体结构破坏, 见图7。肺组织出现肺间质水肿, 肺泡腔大小不均一, 腔内淡红色渗液, 部分肺泡萎陷不张, 少许肺泡代偿扩张, 肺泡结构紊乱, 肺泡壁破裂, 大量炎症细胞浸润, 散在出血, 部分肺组织出现实变等, 见图8。



干预组: 经骨髓间充质干细胞移植干预后, 实验大鼠肺组织损伤程度明显好转, 具体表现为肺间质充血水肿、渗血和增生, 炎症细胞浸润, 肺泡积液等损伤减轻, 见图9。



各组不同时间点肺组织病理评分见表1。

表 1 各组不同时间点肺组织病理评分
Table 1 Pathological scoring in the lung tissue at different time points ($\bar{x} \pm s$, $n=96$, score)

Group	3 h	6 h	12 h	24 h
Sham-operated	0.06 \pm 0.25	0.13 \pm 0.34	0.06 \pm 0.25	0.13 \pm 0.34
Control	3.75 \pm 0.87 ^a	12.31 \pm 1.58 ^a	21.63 \pm 2.09 ^a	28.06 \pm 1.44 ^a
Intervention	2.63 \pm 0.96 ^b	6.38 \pm 1.20 ^b	9.13 \pm 1.75 ^b	10.56 \pm 1.93 ^b

^a $P < 0.05$, vs. sham-operated group; ^b $P < 0.05$, vs. control group

2.7 血清淀粉酶、白蛋白、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 浓度及肺湿干比值比较 经骨髓间充质干细胞移植治疗后, 血清淀粉酶和炎症递质肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 浓度明显下降, 白蛋白不同程度升高, 肺组织含水量不同程度降低($P < 0.05$), 见表2。

表2 各组大鼠不同时间点各项实验指标对比
Table 2 Comparison of indices in each group at different time points

($\bar{x} \pm s$, $n=96$)

Group	Amylase (IU/L)	Albumen (g/L)	Interleukin-1 β (ng/L)	Tumor necrosis factor- α (ng/L)	Wet lung tissue/dry lung tissue
Sham-operated					
3 h	815.88 \pm 61.35	15.88 \pm 0.83	31.88 \pm 5.01	19.68 \pm 2.13	4.51 \pm 0.21
6 h	842.50 \pm 89.50	15.63 \pm 0.74	33.63 \pm 3.91	19.23 \pm 2.67	4.46 \pm 0.17
12 h	833.34 \pm 69.34	15.75 \pm 0.89	30.12 \pm 4.53	18.45 \pm 1.83	4.50 \pm 0.12
24 h	854.88 \pm 80.92	16.00 \pm 1.07	31.21 \pm 3.15	18.79 \pm 1.38	4.54 \pm 0.16
Control					
3 h	1 640.13 \pm 255.50 ^a	14.88 \pm 0.64	97.41 \pm 18.98 ^a	104.43 \pm 14.09 ^a	4.82 \pm 0.20
6 h	3 960.75 \pm 400.85 ^a	13.00 \pm 1.06 ^a	120.54 \pm 17.71 ^a	136.44 \pm 16.36 ^a	5.35 \pm 0.16 ^a
12 h	6 564.13 \pm 557.08 ^a	11.25 \pm 1.04 ^a	159.25 \pm 14.73 ^a	207.35 \pm 16.03 ^a	6.07 \pm 0.30 ^a
24 h	2 679.50 \pm 340.93 ^a	7.25 \pm 1.03 ^a	178.17 \pm 13.45 ^a	163.14 \pm 14.57 ^a	6.64 \pm 0.22 ^a
Intervention					
3 h	1 390.00 \pm 144.35 ^b	14.75 \pm 0.71	87.43 \pm 11.21	85.11 \pm 10.41 ^b	4.69 \pm 0.12
6 h	2 662.13 \pm 255.14 ^b	14.13 \pm 0.83 ^b	98.65 \pm 12.40 ^b	97.21 \pm 10.78 ^b	4.98 \pm 0.18 ^b
12 h	4 017.75 \pm 330.66 ^b	12.50 \pm 0.93 ^b	108.42 \pm 11.60 ^b	111.77 \pm 16.32 ^b	5.29 \pm 0.19 ^b
24 h	1 831.00 \pm 172.83 ^b	9.63 \pm 0.52 ^b	99.14 \pm 10.53 ^b	93.77 \pm 9.73 ^b	5.43 \pm 0.19 ^b

^a $P < 0.05$, vs. sham-operated group; ^b $P < 0.05$, vs. control group

2.8 实时荧光定量PCR检测肺E-选择素mRNA表达
实时荧光定量PCR E-选择素mRNA表达相对定量结果($2^{-\Delta\Delta Ct}$)见表3。

表3 各组不同时间点肺组织E-选择素mRNA表达及平均吸光度变化
Table 3 E-selectin mRNA expression and mean absorbance in lung tissue at different time points ($\bar{x} \pm s$, $n=96$)

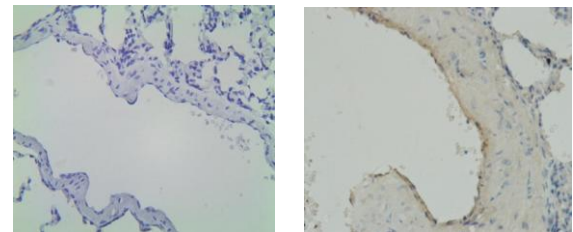
Group	E-selectin mRNA			
	3 h	6 h	12 h	24 h
Sham-operated	1.00 \pm 0.00	0.95 \pm 0.16	0.98 \pm 0.13	1.05 \pm 0.09
Control	2.12 \pm 0.24 ^a	3.51 \pm 0.45 ^a	2.48 \pm 0.26 ^a	1.71 \pm 0.16 ^a
Intervention	1.87 \pm 0.18 ^b	2.76 \pm 0.33 ^b	1.81 \pm 0.30 ^b	1.23 \pm 0.14 ^b

Group	Mean absorbance			
	3 h	6 h	12 h	24 h
Sham-operated	0.058 \pm 0.009	0.060 \pm 0.006	0.062 \pm 0.008	0.057 \pm 0.011
Control	0.103 \pm 0.017 ^a	0.174 \pm 0.019 ^a	0.159 \pm 0.026 ^a	0.112 \pm 0.015 ^a
Intervention	0.096 \pm 0.012	0.149 \pm 0.020 ^b	0.129 \pm 0.016 ^b	0.089 \pm 0.010 ^b

^a $P < 0.05$, vs. sham-operated group; ^b $P < 0.05$, vs. control group

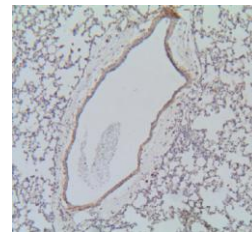
假手术组大鼠肺组织E-选择素mRNA水平各时间点相比无显著性差异, 对照组大鼠肺组织E-选择素mRNA各时间点表达均高于假手术组($P < 0.05$)。经骨髓间充质干细胞移植干预治疗后, E-选择素mRNA表达量逐渐减少, 均低于对照组同期水平($P < 0.05$)。

2.9 免疫组织化学分析E-选择素的定位和表达量 假手术组大鼠肺血管内皮细胞仅少量E-选择素阳性表达, 见图10a, b; 对照组大鼠肺组织见广泛E-选择素强阳性表达, 阳性产物为棕黄色颗粒, 见图10c, d; 经骨髓间充质干细胞干预, 大鼠损伤肺组织血管内皮细胞E-选择素蛋白表达在6 h后开始缓和降低($P < 0.05$), 见图10e, 表3。

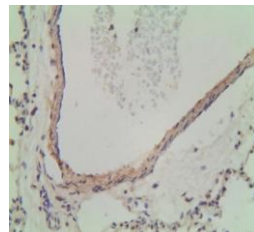


a: E-selectin negative expression in the sham-operated group (x400)

b: Weakly positive E-selectin expression in the sham-operated group (x400)

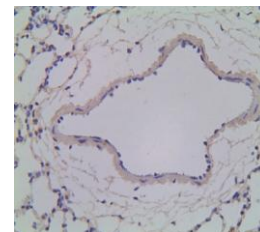


c x100



d: x400

A large number of E-selectin positive cells can be observed in the pulmonary vascular endothelial cells in the control group. E-selectin positive cells are brown yellow granules. Cell membrane and cytoplasm are mainly stained



e: E-selectin expression in pulmonary vascular endothelial cells in the intervention group was weakened and distributed in smaller area compared to those the control group (x400)

Figure 10 E-selectin expression in the pulmonary vascular endothelial cells in each group
图 10 各组肺血管内皮细胞 E-选择素表达

3 讨论

急性肺损伤是重症急性胰腺炎腹外器官功能不全中最常见的表现,特征是肺泡-毛细血管膜弥散性损伤导致肺水肿和肺不张,临床表现为呼吸窘迫和顽固性低氧血症综合征^[10]。在急性肺损伤早期病理变化中,肺血管内皮细胞损伤是其中的关键环节。一旦肺血管内皮细胞选择性通透屏障作用和内分泌功能受到干扰和破坏^[11],将发生肺血管内皮细胞的高通透性,血管内大分子物质大量外渗。随后出现肺顺应性降低和通气功能的损害,进而发展为急性呼吸窘迫综合征,最终演变成多器官功能不全,届时各种治疗措施将很难起效。实验通过逆行性胆胰管注射法诱导重症急性胰腺炎,模拟临床上胆总管下端完全梗阻后化学药物诱发重症急性胰腺炎的发病模式,诱导“瀑布式”的全身炎症反应。该模型方法能激活机体多种酶系统和补体系统从而导致全身炎症反应,导致严重的肺损伤,能有效复制重症急性胰腺炎临床表现及肺组织损害病理结果。

实验采用全骨髓差异贴壁法分离培养SD大鼠骨髓间充质干细胞,并根据骨髓间充质干细胞特异性表型对其进行鉴定,证实此法具有较强的可靠性和可行性,其所获取的干细胞纯度高、活性好、增殖力强。通过流式细胞检测鉴定SD大鼠提取并培养的骨髓间充质干细胞,发现表面标记物特征与相关文献结果相似^[12]。鉴于骨髓间充质干细胞来源丰富,取材便捷,易于在体外扩增,可异体移植,不受伦理和移植免疫排斥影响,为治疗重症急性胰腺炎诱发肺损伤提供了充足的“种子细胞”。

骨髓间充质干细胞是目前备受关注的具有多向分化潜能的干细胞,其终末分化可跨越胚层界限^[13],骨髓间充质干细胞可通过细胞间的相互作用及产生细胞因子,发挥免疫调节及重建的功能^[14],而且这种作用随着骨髓间充质干细胞数量的增加而加强。当组织损伤后,骨髓会迅速动员多种干细胞迁移至病变处,产生自然的代偿性修复;而外源性骨髓间充质干细胞也会“归巢”在损伤靶器官中,发挥生物学作用。实验通过尾静脉直接输注CM-Dil标记的骨髓间充质干细胞于大鼠体内,能客观直接的反应干细胞于重症急性胰腺炎病理情况下在肺组织中的迁移与分布。最新研究显示,骨髓间充质干细胞对重症急性胰腺炎有治疗作用^[15-18],可能为重症急性胰腺炎提供有效的新的治疗手段。

肿瘤坏死因子 α 可直接损伤血管内皮细胞,促进

PMN延迟凋亡;白细胞介素1能刺激PMN的产生、释放、活化及超化能力。E-选择素参与白细胞(特别是PMN)在血管内皮细胞上的滚动、附壁及外渗,促进肺损伤^[19],其高表达有助于提示血管病变中内皮细胞活化程度及血管内皮屏障功能的失衡,特别是在呼吸系统炎症病变时尤为明显。

在本实验中,E-选择素及炎症递质水平升高,加重了肺血管损伤及肺实质的破坏。骨髓间充质干细胞移植治疗后,血清淀粉酶及炎症递质肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 水平较对照组明显下降,白蛋白升高;肺组织E-选择素表达明显得到抑制。病理观察显示白细胞在肺血管内皮细胞上的黏附减少,肺泡和肺间质内白细胞浸润与渗液等血管内物质渗漏现象明显减轻。大鼠呼吸系统异常症状及精神不佳状况得到有效改善,气促缓解,口鼻较少见粉红色泡沫样分泌物,肺充血水肿程度减轻。表明骨髓间充质干细胞能够通过抑制大鼠体内的炎症反应水平及E-选择素产生,对重症急性胰腺炎肺损伤起积极作用。实验还证明,经CM-Dil标记后的骨髓间充质干细胞细胞形态及活性未发生改变,是较为可靠的标记示踪手段。

实验初步证实了骨髓间充质干细胞可以在重症急性胰腺炎诱发肺损伤大鼠损害器官肺脏中的定植,通过阻断炎症反应的信号通路,下调内皮细胞E-选择素表达,有效阻止介导白细胞对肺血管内皮细胞的损伤,保护血管内皮屏障等途径,发挥对受损肺组织的积极干预作用。其治疗机制还需要更深入的探讨和研究,为临床治疗提供更扎实的理论基础。

4 参考文献

- [1] Zhou MT, Chen CS, Chen BC, et al. Acute lung injury and ARDS in acute pancreatitis: mechanisms and potential intervention. *World J Gastroenterol*. 2010;16(17):2094-2099.
- [2] Pezzilli R, Bellacosa L, Felicani C. Lung injury in acute pancreatitis. *JOP*. 2009;10(5):481-484.
- [3] Rinderknecht H. Fatal pancreatitis, a consequence of excessive leukocyte stimulation? *Int J Pancreatol*. 1988;3(2-3):105-112.
- [4] Cui HF, Bai ZL. Protective effects of transplanted and mobilized bone marrow stem cells on mice with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2003;9(10):2274-2277.
- [5] Yang YX, Zheng JL, Zhang P, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2007;11(3):584-586. 杨玉霞,郑健樑,张平,等.密度梯度离心结合贴壁法培养成年大鼠骨髓间充质干细胞的生物学特性[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(3):584-586.
- [6] Tseng PY, Chen CJ, Sheu CC, et al. Spontaneous differentiation of adult rat marrow stromal cells in a long-term culture. *J Vet Med Sci*. 2007;69(2):95-102.

- [7] Yang B, Huang HG, Chen DL, et al. Fujian Yike Daxue Xuebao. 2002;36(1):71-72.
杨波, 黄鹤光, 陈大良, 等. 逆行性胰胆管注射法制作重症急性胰腺炎大鼠模型[J]. 福建医科大学学报, 2002, 36(1): 71-72.
- [8] Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, et al. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. Ann Surg. 1992; 215(1):44-56.
- [9] Thome UH, Schulze A, Schnabel R, et al. Partial liquid ventilation in severely surfactant-depleted, spontaneously breathing rabbits supported by proportional assist ventilation. Crit Care Med. 2001;29(6):1175-1180.
- [10] Lee WL, Downey GP. Neutrophil activation and acute lung injury. Curr Opin Crit Care. 2001;7(1):1-7.
- [11] Zhang ZD, Mu E, Ma XC. Zhongguo Shiyong Waike Zazhi. 2007;27(4):310-312.
章志丹, 穆恩, 马晓春. 急性肺损伤大鼠血管内皮细胞损伤的研究[J]. 中国实用外科杂志, 2007, 27(4): 310-312.
- [12] Kemp KC, Hows J, Donaldson C. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Leuk Lymphoma. 2005;46(11): 1531-1544.
- [13] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature. 2002;418(6893):41-49.
- [14] Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2004;95(5):209-214.
- [15] Jiang XL, Li ZS, Cui HF. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi. 2006; 14(4):398-404.
江学良, 李兆申, 崔慧斐. 骨髓间充质干细胞在胰腺生理更新和病理再生中的作用[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(4): 398-404.
- [16] Lee SH, Jang AS, Kim YE, et al. Modulation of cytokine and nitric oxide by mesenchymal stem cell transfer in lung injury/fibrosis. Respir Res. 2010;11:16.
- [17] Sun J, Han ZB, Liao W, et al. Intrapulmonary delivery of human umbilical cord mesenchymal stem cells attenuates acute lung injury by expanding CD4+CD25+ Forkhead Boxp3 (FOXP3)+ regulatory T cells and balancing anti- and pro-inflammatory factors. Cell Physiol Biochem. 2011;27(5): 587-596.
- [18] Chen W, Zhu F, Guo GH. Shiyong Yixue Zazhi. 2011;27(2): 169-170.
陈雯, 朱峰, 郭光华. 骨髓间充质干细胞应用于急性肺损伤的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(2): 169-170.
- [19] Martins JO, Campos CA, Cruz JW, et al. Insulin modulates cytokine release and selectin expression in the early phase of allergic airway inflammation in diabetic rats. BMC Pulm Med. 2010;10:39.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 国家自然科学基金资助项目 (81070369)。

作者贡献: 第一、二作者进行实验设计, 实验实施为全部作者, 实验评估为第三作者, 资料收集为第一、二作者, 第一作者成文, 通讯作者审校, 第一作者对文章负责。

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。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

文章要点: ①观察在重症急性胰腺炎病理情况下, 骨髓间充质干细胞在损伤肺组织定植情况。②分析标记后的骨髓间充质干细胞生物学活性和功能状态, 探讨其对损伤肺组织 E-选择素及炎症递质等指标的抑制作用, 进一步证实其对肺血管内皮屏障的保护和修复作用。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

向 SCI 收录期刊投稿: “行为学跟踪实验(一步完成法被动回避行为学测试)”

— “Step-through passive avoidance behavioral testing” — 外国专家修饰的医学英语句型

中文	修前	修后
神经干细胞移植到已损伤的脑内之后, 无法使得神经干细胞移行定位到目的靶区并进一步分化。	Neural stem cells cannot move to the target site for further differentiation following transplantation in the damaged brain.	Following transplantation, neural stem cells are not able to migrate to the target site for further differentiation.
以生理盐水快速冲洗血液, 随后用预冷的含 4% 多聚甲醛的磷酸盐缓冲液。	They were washed in saline, and fixed in 250 mL of cool phosphate buffer saline.	The rats were first perfused with saline, followed by 250 mL chilled phosphate-buffered saline.
行为学跟踪实验(一步完成法被动回避行为学测试)。	Behavioral testing by step-through	Step-through passive avoidance behavioral testing