

脐血间充质干细胞移植修复急性肠缺血再灌注损伤

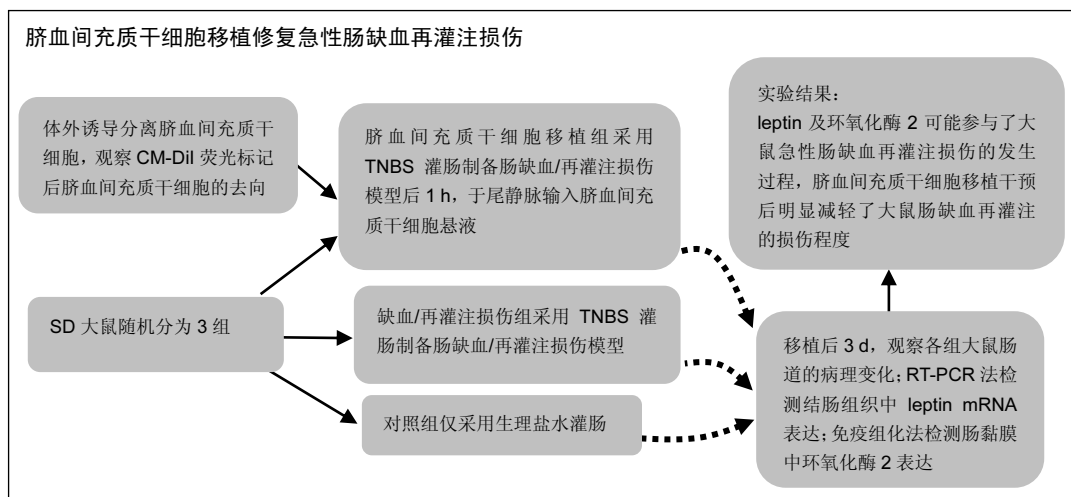
王炳杰¹, 胡延伟², 赵叶芳³, 张仕东²(河北医科大学附属医院邢台市人民医院, ¹肛肠外科, ²普外科, ³妇产科, 河北省邢台市 054001)

引用本文: 王炳杰, 胡延伟, 赵叶芳, 张仕东. 脐血间充质干细胞移植修复急性肠缺血再灌注损伤[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(19):2817-2823.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.19.012

ORCID: 0000-0003-0250-2445(王炳杰)

文章快速阅读:



王炳杰, 男, 1978 年生, 河北省沙河市人, 汉族, 2009 年中国医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事普外、肛肠方面的研究。

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2016)19-02817-07

稿件接受: 2016-03-02

http://www.crter.org

文题释义:

肠缺血/再灌注损伤: 在许多情况下, 如感染、创伤、手术和出血性或感染性休克时是一个常见且重要的问题。肠源性毒血症及败血症的发生与肠缺血/再灌注损伤所致的黏膜功能受损密不可分, 且严重的毒血或败血症可引发或加重全身炎症反应综合征, 最终导致多器官功能衰竭综合征发生。所以, 积极寻找预防或减轻肠缺血/再灌注损伤的方法对于外科手术来说至关重要。

Leptin: 是一种广泛表达于机体多种重要脏器的中分子活性蛋白, 不同物种间其同源性约 80%。它对于肠缺血/再灌注损伤引发的神经-内分泌失调及代谢紊乱有很好的应答性, 并且在外周器官和脂肪组织中呈双向性表达, 这提示其也许为机体稳态的保护性因素。当感染、烧伤、创伤及外科操作等急性炎症反应使机体处于高代谢状态时, leptin 可发挥联系能量状态、神经内分泌和免疫调节的枢纽作用, 因此在炎症反应后机体稳态中至关重要。

摘要

背景: 研究表明, 骨髓间充质干细胞对肠缺血/再灌注有一定的修复作用, 其机制为干预肠缺血/再灌注后的炎症反应从而对肠道屏障功能的完整性起到保护作用。近年来脐血间充质干细胞逐渐成为骨髓间充质干细胞很好的替代来源。

目的: 探讨脐血间充质干细胞移植对大鼠急性肠缺血再灌注损伤的修复作用。

方法: 体外诱导分离脐血间充质干细胞, 观察 CM-Dil 荧光标记后脐血间充质干细胞的去向。63 只 SD 大鼠随机分为 3 组, 每组 20 只。缺血/再灌注损伤组及脐血间充质干细胞移植组采用 TNBS(乙醇稀释)灌肠制备肠缺血/再灌注损伤模型; 脐血间充质干细胞移植组在 TNBS 建模后 1 h, 于尾静脉输入 $1 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 脐血间充质干细胞悬液; 对照组仅采用生理盐水灌肠。移植后 3 d, 分别于各组大鼠取结肠组织行苏木精-伊红染色, 观察肠道的病理变化; RT-PCR 法检测结肠组织中 leptin mRNA 的表达; 利用免疫组化法检测肠黏膜中环氧化酶 2 表达。

结果与结论: ①荧光示踪结果显示, 移植的脐血间充质干细胞分布于肠黏膜淋巴组织内和腺上皮细胞间, 表明脐血间充质干细胞可能参与了肠缺血再灌注损伤的修复过程; ②苏木精-伊红染色观察到与对照组相比, 缺血/再灌注损伤组肠道损伤明显加重, 肠黏膜上皮细胞脱落较多, 脐血间充质干细胞移植组肠道损伤明显减轻, 细胞脱落也明显见少; leptin mRNA 在缺血/再灌注损伤组呈现高表达, 其表达量明显大于对照组及脐血间充质干细胞移植组, 脐血间充质干细胞移植组又明显大于对照组, 各组间比较,

Wang Bing-jie, Master,
Attending physician,
Department of Anorectal
Surgery, Affiliated Xingtai
People's Hospital of Hebei
Medical University, Xingtai
054001, Hebei Province,
China

差异有显著性意义($P < 0.05$); ③免疫组化结果显示, 缺血/再灌注损伤组肠黏膜环氧酶 2 表达明显高于对照组($P < 0.05$), 脐血间充质干细胞移植组环氧酶 2 表达明显低于缺血/再灌注损伤组($P < 0.05$); ④提示 leptin 及环氧酶 2 可能参与了大鼠急性肠缺血再灌注损伤的发生过程, 脐血间充质干细胞移植干预后明显减轻了大鼠肠缺血再灌注的损伤程度, 为人类急性肠缺血损伤的治疗提供了实验依据。

关键词:

干细胞; 移植; 脐血间充质干细胞; 移植; 大鼠; 肠道损伤; 缺血再灌注损伤

主题词:

干细胞; 脐血干细胞移植; 间质干细胞; 再灌注损伤; 组织工程

Umbilical cord blood mesenchymal stem cell transplantation for acute intestinal ischemia-reperfusion injury

Wang Bing-jie¹, Hu Yan-wei², Zhao Ye-fang³, Zhang Shi-dong² (¹Department of Anorectal Surgery, ²Department of General Surgery, ³Department of Obstetrics and Gynecology, Affiliated Xingtai People's Hospital of Hebei Medical University, Xingtai 054001, Hebei Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Bone marrow mesenchymal stem cells can repair intestinal ischemia-reperfusion injury by interfering inflammatory reactions after intestinal ischemia-reperfusion to protect intestinal barrier functions. In recent years, umbilical cord blood mesenchymal stem cells are gradually used as a substitute source of bone marrow mesenchymal stem cells.

OBJECTIVE: To investigate the effects of umbilical cord blood mesenchymal stem cells on acute intestinal ischemia-reperfusion injury.

METHODS: Umbilical cord blood mesenchymal stem cells were induced, isolated *in vitro* and tracked by CM-Dil fluorescent labeling. Sixty-three Sprague-Dawley rats were equivalently randomized into three groups: control group received normal saline enema, intestinal ischemia-reperfusion injury group with ethanol diluted trinitro-benzene-sulfonic acid and transplantation group administrated with 1×10^{10} /L umbilical cord blood mesenchymal stem cell suspension *via* the tail vein at 1 hour after trinitro-benzene-sulfonic acid modeling. At 3 days after transplantation, colon tissues were removed in each group to observe pathological changes of the intestinal tract by hematoxylin-eosin staining. Besides, expression of leptin mRNA in the colon tissues and cyclooxygenase-2 in the mucosa were detected by RT-PCR and immunohistochemistry method, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: Transplanted umbilical cord blood mesenchymal stem cells distributed in the intestinal lymphoid tissue and among glandular epithelial cells, suggesting that these stem cells might be involved in the process of intestinal ischemia-reperfusion injury repair. Compared with the control group, intestinal injury in the injury group was significantly aggravated, and most intestinal epithelial cells shed; and the transplantation group appeared to have significantly reduced intestinal damage and significantly less cell shedding. Expression of leptin mRNA was significantly higher in the injury group than the transplantation group followed by the control group, and there were significant differences among the three groups ($P < 0.05$). Additionally, expression of cyclooxygenase-2 in the injury group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$); compared with the injury group, expression of cyclooxygenase-2 was significantly lower in the transplantation group ($P < 0.05$). To conclude, leptin and cyclooxygenase-2 may be involved in acute intestinal ischemia-reperfusion injury, and umbilical cord blood mesenchymal stem cell transplantation significantly lessens intestinal ischemia-reperfusion injury, which provides an experimental basis for human treating acute intestinal ischemic injury.

Subject headings: Stem Cells; Cord blood Cell Transplantation; Mesenchymal Stem Cells; Reperfusion Injury; Tissue Engineering

Cite this article: Wang BJ, Hu YW, Zhao YF, Zhang SD. Umbilical cord blood mesenchymal stem cell transplantation for acute intestinal ischemia-reperfusion injury. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(19):2817-2823.

0 引言 Introduction

肠缺血/再灌注损伤在许多情况下, 如感染、创伤、手术和出血性或感染性休克时是一个常见且重要的问题^[1]。肠源性毒血症及败血症的发生与肠缺血/再灌注损伤所致的黏膜功能受损密不可分, 且严重的毒血或败血症可引发或加重全身炎症反应综合征, 最终导致多器官功能衰竭综合征发生^[2-4]。所以, 积极寻找预防或减轻肠缺血/再灌注损伤的方法对于外科手术来说至关重要。尽管目前已经提出多种措施来预防其发生, 但方法的可靠性及有效性尚待进一步研究证实^[5]。因此, 寻求新的、有效的方法来减轻肠缺血/再灌注损伤, 对外科手术的开展及术后患者的费用有重要意义。

间充质干细胞是一种具有多向分化潜能的成体干细胞, 有很强的可塑性, 在不同的环境条件下, 能够分化为不同组织种类的非造血细胞^[6-9]。长久以来, 因骨髓间充质干细胞在机体组织受损伤时, 经骨髓动员到达损伤部位, 可在局部微环境诱导下分化为特异的组织细胞, 参与自身修复^[10-11]; 加之间充质干细胞具有的易培养、增殖快的优点而成为缺血/再灌注损伤治疗的重要工具^[12-13]。在损伤区域行骨髓间充质干细胞移植后, 因局部微环境的影响, 存在于移植区的骨髓间充质干细胞可增生、分化, 以取代受损组织。有学者认为, 该细胞要想在移植区发挥作用, 需要先在体外条件下培养, 当分化为神经前体细胞后再移植到受损部位, 才会发挥相应的作用^[14-15]。此外, 骨髓间充质干细胞对肠缺血/再灌注后的炎症反应从而对肠道屏障功能的完整性起到保护作用。近年来脐血间充质干细胞被人们所熟知, 并逐渐成为骨髓间充质干细胞很好的替代来源^[16], 其表面标志和生物学特性与骨髓来源的间充质干细胞相似, 且同样具有取材方便、低免疫原性和含有少量的免疫细胞等特点。如果脐血间充质干细胞对肠缺血/再灌注损伤也能起到很好的治疗效果, 则会有很广阔的应用前景。

实验通过复制小鼠肠缺血/再灌注损伤模型, 给予注射脐血间充质干细胞后观察对损伤的修复程度, 为后续治疗提供了实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 于2012年9月至2015年3月在河北医科大学研究所动物实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 选择63只SD大鼠, 雌雄不限, 体重150-200 g, 按随机数字表法分为3组, 单独放于3个笼子里。保持动物良好的卫生条件, 允许其自由采食, 并给供水。其中, 造模过程中死亡1只, 做脐血间充质干细胞培养时处死2只, 将剩余的动物分为以下3组: ①对照组(20只): 生理盐水灌肠。②缺血/再灌注损伤组(20只): 采用TNBS(乙醇稀释)灌肠。③脐血间充质干细胞移植组(20只): 在TNBS建模后1 h, 于尾静脉输入 $1 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 脐血间充质干细胞悬液。

1.3.2 主要试剂、仪器 脐带血(由河北医科大学附属邢台市人民医院提供); 二氧化碳培养箱(美国Forma公司); 倒置显微镜(TE300, 日本Nikon公司); 培养瓶(Corning公司); CM-Dil(Molecular Probes公司); 胰蛋白酶-EDTA消化液(Solarbio公司); PBS 缓冲液粉剂(福州迈新); TRIzol, Taq DNA聚合酶及 β -actin引物购自北京鼎国®公司; Leptin引物由上海生工®公司合成; 过氧化酶2多克隆抗体及 Envision法免疫组化试剂盒(Da-Ko公司)。

1.4 方法

1.4.1 脐血间充质干细胞的分离培养 取脐血前均征得产妇和/或家属的同意, 且签署书面同意书, 并经伦理委员会同意后进行。采用淋巴细胞分离液将新鲜脐带血单个核细胞分离提取, 并且分装到2个各加入了5 mL培养液的培养瓶中, 放于恒温培养箱中, 观察其生长状态。由于细胞呈显贴壁生长的特性, 故3 d以后弃去未贴壁的细胞, 并加入新鲜的培养液, 继续进行培养。当细胞达到完全融合状态时, 用胰酶进行消化。完成后按1:5的比例进行细胞传代。将 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度的第2代传代细胞加入到96孔板。细胞融合达70%-80%时加入诱导剂。

1.4.2 脐血间充质干细胞示踪 取50 μg 染液(CM-Dil), 于无菌、避光条件下溶于50 μL 二甲基亚砜中, 充分溶解, 制成染色原液。将装有脐血间充质干细胞的瓶中的上清液去除, 用PBS冲洗并再次加入2 mL, 并加入2 μL 的CM-Dil保存液, 轻轻晃动瓶身, 使细胞表面覆盖完全。将培养瓶置于恒温培养箱中温育5 min, 再放到4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中15 min。弃去染液, PBS冲洗2次并弃去。将2 mL胰蛋白酶-EDTA消化液缓慢注入培养瓶中, 轻轻摇晃, 使细胞表面均附有一层消化液, 用移液管多次反复吹打瓶壁, 制成细胞悬液。后置于培养箱中。两至三分钟后取出并置于显微镜下进行观察, 当发现胞质回缩、细胞间隙增大后终止消化。将细胞悬液移入离心

管中, 放入离心机中进行离心。弃去上清, PBS冲洗2次。加入生理盐水使细胞重悬, 并接种于培养瓶中。再次观察细胞的形态及标记状况。

1.4.3 肠缺血/再灌注损伤大鼠模型制备及分组 缺血/再灌注损伤组及脐血间充质干细胞移植组采用100 mg/kg的TNBS(乙醇稀释)灌肠制备肠缺血/再灌注损伤模型; 脐血间充质干细胞移植组在TNBS建模后1 h, 于尾静脉输入 $1 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 脐血间充质干细胞悬液; 对照组仅采用生理盐水灌肠。

1.4.4 苏木精-伊红染色观察肠道病理变化 移植后3 d, 将肠缺血/再灌注小鼠采用颈椎脱臼处死并迅速切开皮肤、皮下, 进入腹腔, 观察肠管的一般状况。各组大鼠于相同部位取2 cm结肠组织, 去掉周围的系膜及脂肪组织, 纵行切开, PBS洗净肠内容物, 用体积分数10%甲醛进行固定, 并行常规石蜡包埋及切片。将切片进行脱蜡至水、苏木精染色、系列盐酸乙醇分化、自来水反蓝、伊红染色、再次进行乙醇脱水、透明及封固处理。将染好的切片置于镜下进行观察。

1.4.5 RT-PCR法检测结肠组织中leptin mRNA的表达 移植后3 d, 按照Trizol试剂说明书中的具体步骤对组织样品的总RNA进行提取, 空白对照采用三蒸水, 以紫外分光光度计检测样品吸光度并对纯度及浓度进行计算。按照说明书进行反转录反应。反转录体系(20 μL)包括: 总RNA 2.5 μg , 5 $\times$ 反转录缓冲液4 μL , AMV反转录酶667 nkat, Oligo(dT)15 μg , RNA酶抑制剂20 U, 10 mmol/L dNTPs 2 μL 及焦碳酸二乙酯处理的水6.5 μL 。将反转录样品置于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴箱中2 h, 然后95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴5 min将AMV酶进行灭活处理, 快速冰镇后按4 $^{\circ}\text{C}$, 1 000 r/min离心5 min, 保存cDNA样品于-20 $^{\circ}\text{C}$ 。PCR反应体系中cDNA合成及PCR反应的内参照以 β -actin为准。Leptin和 β -actin PCR体系(50 μL)包括: cDNA 4 μL , 25 $\mu\text{mol/L}$ 上游及下游引物1 μL ; 10 mol/L dNTPs 4 μL , Taq 酶33 nkat; 10 $\times$ PCR缓冲液(含20 mmol/L MgCl_2)5 μL 及灭菌去离子水34 μL 。

PCR所用的引物序列及反应条件如下: leptin引物: 上游引物: 5'-CCT GTG GCT TTG GTC CTA TCG G-3', 下游引物: 5'- CTG CTC AAA GTC ACC ACC TCG G-3', β -actin: 上游引物: 5'- CAT CTC TTG CTC GAA GTC CA-3', 下游引物: 5'-ATC ATG TTT GAG ACC TTC AAC A-3'。变性94 $^{\circ}\text{C}$, 45 s, 退火60 $^{\circ}\text{C}$, 45 s, 延伸72 $^{\circ}\text{C}$, 60 s, 循环35次。

检测PCR产物采用琼脂糖凝胶电泳, 并用凝胶分析仪拍摄和分析电泳图像。

1.4.6 免疫组化法检测肠黏膜中环氧化酶2表达 移植后3 d, 按照Envision两步法试剂盒染色步骤进行免疫组化观察。主要步骤: 常规脱蜡, 并浸泡在 EDTA/枸橼酸钠溶液中, 于微波炉中进行抗原修复处理。用去离子水孵育15 min后滴加一抗, 处理完毕后置于4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下过夜, 次日37 $^{\circ}\text{C}$ 复温30 min, 并滴加Envision, 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下温育45 min。滴加2滴已配置好的DAB染色液于每张切片上, 于镜下观察并控制反应时间。进行苏木精复染, 脱水, 透明及封固, 按1:100稀释一抗、二抗, 以PBS作为空白对照。

参照文献[17], 以细胞质呈棕色颗粒状染色为环氧化酶2阳性表达的标准, 阳性细胞以背景不着色而细胞着色或着色明显高于背景者代表。在100倍视野下选定5个明显染色区域, 再在400倍视野下计数每个区域中一个视野内的阳性细胞数, 取其平均值。判定标准参照Mattein等^[18]的方法进行。

1.5 主要观察指标 移植后3 d, 分别于各组大鼠取结肠组织行苏木精-伊红染色, 观察肠道的病理变化; RT-PCR法检测结肠组织中leptin mRNA的表达; 利用免疫组化法检测肠黏膜中环氧化酶2表达。

1.6 统计学分析 所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验数据采用SPSS 17.0进行分析, 采用单因素方差分析进行不同组别之间的差异, 多重比较采用SNK-*q* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 选择63只SD大鼠, 按随机数字表法分为3组, 单独放于3个笼子里。其中造模过程中死亡1只, 做脐血间充质干细胞培养时处死2只, 将剩余的动物分为3组, 每组20只。

2.2 脐血间充质干细胞的形态观察 脐血间充质干细胞在培养5 d左右时, 贴壁细胞明显增多, 形态以长梭形或多角形为主, 部分细胞呈集落状生长, 可见有丝分裂。培养八至九天时, 细胞铺满培养瓶底面, 成漩涡状生长, 细胞集落不断增多。

10-14 d细胞集落进一步扩大, 互相融合, 可达80%融合率, 传代脐血间充质干细胞很快贴壁, 呈梭形均匀分布, 且增殖迅速。经多次传代后, 脐血间充质干细胞呈漩涡状排列, 见图1。

流式细胞仪检测结果显示CD29、CD34、CD45、CD49、CD90及CD105阳性, 脐血间充质干细胞均一性好, 纯度达95%以上。

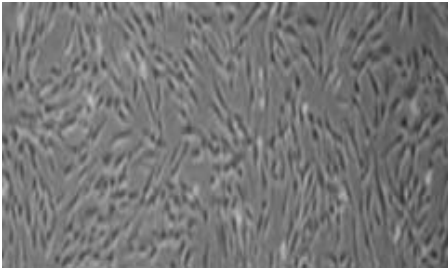


图 1 扩增纯化后的第 3 代脐血间充质干细胞(×200)

Figure 1 Amplified and purified passage 3 umbilical cord blood mesenchymal stem cells (×200)

表 1 各组大鼠结肠组织中 leptin mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

Table 1 Expression of leptin mRNA in the colon tissue of rats

组别	leptin mRNA
对照组	0.056±0.002
缺血/再灌注损伤组	0.274±0.013
脐血间充质干细胞移植组	0.769±0.015

表 2 各组大鼠肠黏膜中环氧化酶 2 的表达变化 ($n=20$, n)

Table 2 Expression of cyclooxygenase-2 in the intestinal mucosa of rats

组别	环氧化酶 2 表达				阳性率 (%)
	-	+	++	+++	
对照组	20	0	0	0	0
缺血/再灌注损伤组	0	7	8	5	100% ^a
脐血间充质干细胞移植组	13	4	1	2	35% ^b

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与缺血/再灌注损伤组比较, ^b $P < 0.05$ 。



图 3 各组大鼠肠道组织学观察结果(苏木精-伊红染色, ×400)

Figure 3 Histological observations of the rat intestinal tract (hematoxylin-eosin staining, ×400)

图注: 图中 A 为对照组, 未见肠道组织病变; B 为缺血/再灌注损伤组, 可见大量脱落的肠黏膜上皮细胞, 肠道结构破坏较为严重; C 为脐血间充质干细胞移植组, 可见细胞脱落也明显见少, 肠道结构逐渐恢复正常。

2.3 CM-Dil 标记的脐血间充质干细胞形态观察 通过荧光示踪法观察到 CM-Dil 标记的脐血间充质干细胞在荧光显微镜下呈红色荧光, FCM 检测细胞标记率达 100%, 见图 2A。进一步观察可见 CM-Dil 标记的红色脐血间充质干细胞分布于肠黏膜淋巴组织内和腺上皮细

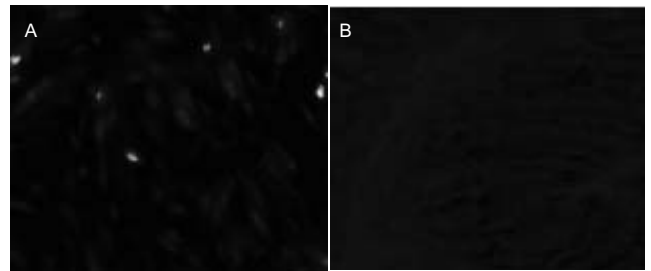


图 2 CM-Dil 标记的脐血间充质干细胞(×200)

Figure 2 CM-Dil labeled umbilical cord blood mesenchymal stem cells (×200)

图注: 图 A 示 CM-Dil 标记的脐血间充质干细胞在荧光显微镜下呈红色荧光; 图 B 示 CM-Dil 标记的红色脐血间充质干细胞分布于肠黏膜淋巴组织内和腺上皮细胞间。

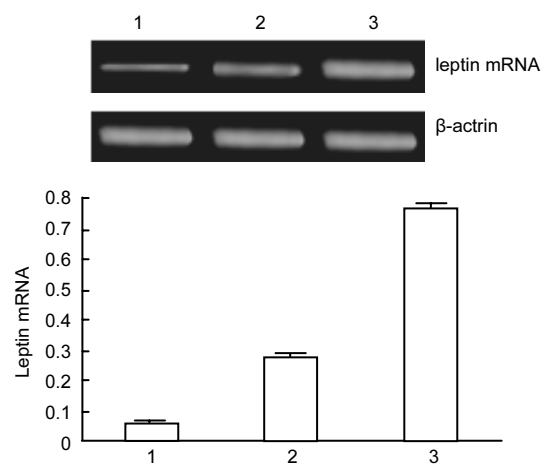


图 4 各组大鼠结肠组织中 leptin mRNA 的表达

Figure 4 Expression of leptin mRNA in the colon tissue of rats

图注: 1: 对照组; 2: 缺血/再灌注损伤组; 3: 脐血间充质干细胞移植组。

胞间, 表明脐血间充质干细胞可能参与了肠缺血再灌注损伤的修复过程, 见图 2B。

2.4 苏木精-伊红染色观察肠道病理变化 苏木精-伊红染色观察到与对照组相比, 缺血/再灌注损伤组肠道损伤明显加重, 肠黏膜可见较大面积的溃疡、糜烂、充血

及水肿, 肠黏膜上皮细胞脱落较多。脐血间充质干细胞移植组肠道损伤明显减轻, 溃疡面积显著减轻, 细胞充血、脱落现象明显好转。各组大鼠于移植后3 d肠道病理变化比较见图3。

2.5 RT-PCR法检测结肠组织中leptin mRNA的表达 RT-PCR法检测结果显示, leptin mRNA在缺血/再灌注损伤组呈现高表达, 其表达量明显大于对照组及脐血间充质干细胞移植组, 脐血间充质干细胞移植组又明显大于对照组, 对照组的leptin mRNA呈弱表达, 各组间比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 见表1及图4。

2.6 免疫组化法检测肠黏膜中环氧化酶2表达 免疫组化法检测到, 对照组肠黏膜环氧化酶2呈阴性表达, 损伤组肠黏膜环氧化酶2的阳性表达率为100%, 明显高于对照组($P < 0.05$), 脐血间充质干细胞移植组环氧化酶2表达明显低于损伤组, 但较对照组高($P < 0.05$)。各组大鼠肠黏膜环氧化酶2表达变化见表2。

3 讨论 Discussion

多项研究表明, 在不同条件下脐血间充质干细胞可分化为不同的组织^[19]。此次研究中也发现将脐血间充质干细胞移植入SD大鼠体内, 可在肠黏膜淋巴组织内和腺上皮细胞间检测到其存在, 并且可减少肠道损伤, 表明脐血间充质干细胞可能参与了肠缺血/再灌注损伤的修复过程。因此有理由相信肠上皮的再生与脐血间充质干细胞密不可分。

Leptin是一种广泛表达于机体多种重要脏器的中分子活性蛋白, 不同物种间其同源性约80%^[20]。它对于肠缺血/再灌注损伤引发的神经-内分泌失调及代谢紊乱有很好的应答性, 并且在外周器官和脂肪组织中呈双向性表达, 这提示其也许为机体稳态的保护性因素。当感染、烧伤、创伤及外科操作等急性炎症反应使机体处于高代谢状态时, leptin可发挥联系能量状态、神经内分泌和免疫调节的枢纽作用, 因此在炎症反应后机体稳态中至关重要。此次研究发现, 与对照组和移植组相比, leptin mRNA在损伤组呈现高表达状态, 且显著性差异较为显著, 与以往研究结果一致。然而, leptin作用的发挥, 需与其特异性受体结合而实现。leptin受体(OB-R)属于I型细胞因子受体家族, 主要通过Janus激酶-酪氨酸激酶途径进行信号转导^[21-23]。研究发现, OB-R在机体组织中存在广泛^[24-26], 据此可以推测出leptin基因可能在机体多处组织内均表达, 但目前研究中仅有关于leptin mRNA在角质、胃、胰腺、内皮细胞和结肠表达

的极少报道^[27]。如能进一步对leptin进行研究, 可能对救治消化系统损伤有重要意义。

环氧化酶是催化花生四烯酸转化为前列腺素的限速酶, 有环氧化酶1和环氧化酶2两种亚型, 环氧化酶1也被称为“管家基因”, 参与生理性前列腺素合成以及维持机体稳态调节。环氧化酶2也被称为“快速反应基因”。可通过炎症因子以及生长因子诱发不同信号经p38MAPK传导系统的瀑布传递而产生, 而环氧化酶2的过度表达又可激活核因子 κB 途径, 形成正反馈, 导致炎症级联反应和组织损害。在消化系统中, 炎症黏膜上皮中表达的环氧化酶2与炎症的程度呈正相关。环氧化酶2作为催化前列腺素合成的关键诱导酶, 病理情况下可催化其合成, 从而使机体发热、痛觉过敏及诱导其他炎症因子的释放, 导致组织损伤。文章中损伤组环氧化酶2表达量显著高于对照组($P < 0.05$), 脐血间充质干细胞移植组环氧化酶2表达量明显低于损伤组($P < 0.05$)。提示环氧化酶2参与了大鼠肠缺血/再灌注损伤。

总之, 通过研究发现, 脐血间充质干细胞可在肠黏膜淋巴组织内和腺上皮细胞存在; 并且Leptin及环氧化酶2可能参与了急性肠缺血/再灌注损伤发生过程。仍需进一步加强对脐血间充质干细胞移植对肠缺血/再灌注损伤相关方面的研究, 为人类急性肠缺血/再灌注损伤的治疗提供实验依据。

致谢: 对本次研究过程的相关参与人员以及为本次研究提供帮助的机构和人员表示感谢。

作者贡献: 所有作者均负责实验设计、实施、数据分析整理以及文章的撰写。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

伦理问题: 取脐血前均征得产妇和/或家属的同意, 且签署书面同意书, 并经伦理委员会同意后。实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

文章查重: 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Wang F, Shen Y, Tsuru E, et al. Syngeneic transplantation of newborn splenocytes in a murine model of neonatal ischemia-reperfusion brain injury. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015;28(7):824-827.
- [2] 杜莉莉,杨晓漪,吕润潇,等.胎盘间充质干细胞对小鼠小肠缺血再灌注损伤的作用[J]. *解剖学进展*, 2015,21(4): 371-374.
- [3] Diepenhorst GM, van Gulik TM, Hack CE. Complement mediated ischemia-reperfusion injury: lessons learned from animal and clinical studies. *Ann Surg.* 2009;249(6): 889-899.
- [4] Marshman E, Booth C, Potten CS. The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays.* 2002;24(1): 91-98.
- [5] Khanna A, Rossman J, Caty MG, et al. Beneficial effects of intraluminal nitroglycerin in intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *J Surg Res.* 2003;114(1):15-24.
- [6] 马晓博,赵瑛.肠内肠外营养对大鼠肠道损伤后屏障功能恢复的实验研究[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2012, 6(12):3194-3197.
- [7] Yang X, Liu YN, Han Q, et al. Injured microenvironment directly guides the differentiation of engrafted Flk-1(+) mesenchymal stem cell in lung. *Exp Hematol.* 2007;35(9):1466-1475.
- [8] Zhang YJ, Hao HJ, Liu JJ, et al. Repair and regeneration of skin injury by transplanting microparticles mixed with Wharton's jelly and MSCs from the human umbilical cord. *Int J Low Extrem Wounds.* 2012;11(4):264-270.
- [9] Biazar E, Keshel SH. The healing effect of stem cells loaded in nanofibrous scaffolds on full thickness skin defects. *J Biomed Nanotechnol.* 2013;9(9):1471-1482.
- [10] Heo JS, Choi SM, Kim HO, et al. Neural transdifferentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on hydrophobic polymer-modified surface and therapeutic effects in an animal model of ischemic stroke. *Neuroscience.* 2013;238(6):305-318.
- [11] Manley NC, Steinberg GK. Tracking stem cells for cellular therapy in stroke. *Curre Pharm Des.* 2012;18(25):3685-3693.
- [12] 余奇劲,杨洁,陈娟.却学前和缺血后联合应用丙泊酚对兔脊髓缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中华临床医师杂志*, 2011,5(20):5955-5959.
- [13] 张瑞平,李健丁,刘强,等.蛛网膜下腔移植磁标间充质干细胞治疗脊髓损伤[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(1): 74-78.
- [14] 冯玉,白文芳,许伟成,等.低频电磁场促进骨髓间充质干细胞移植修复大鼠脊髓损伤的实验研究[J]. *中国组织工程研究*, 2013,17(32):5819-5826.
- [15] 高平,孙占胜,王伯珉,等.骨髓间充质干细胞诱导成神经元样细胞移植治疗脊髓损伤[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(23):4256-4263.
- [16] Majore I, Moretti P, Stahl F, et al. Growth and differentiation properties of mesenchymal stromal cell populations derived from whole human umbilical cord. *Srem Cell Rev.* 2011;7(1):17-31.
- [17] Lu H, Ge ZZ, Liu WZ, et al. Expression of cyclooxygenase-2 protein in colonic diseases. *Chin J Gastroenterol.* 2000;5(3):158-160.
- [18] Mattein J, Koomagi R, Volm M, et al. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. *Br J Cancer.* 1996;73(7):931-934.
- [19] Le Blanc K, Ringden O. Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Curr Opin Immunol.* 2006;18(5):586-591.
- [20] Harvey J. Leptin: a diverse regulator of neuronal function. *J Neurochem.* 2007;100(2): 307-313.
- [21] Myers MG Jr. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Recent Prog Horm Res.* 2004;59: 287-304.
- [22] Munzberg H, Bjornholm M, Bates SH, et al. Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(6): 642-652.
- [23] Stefanou N, Satra M, Papanikolaou V, et al. Leptin receptor isoforms mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic viral hepatitis. *Exp Biol Med (Maywood).* 2006;231(10): 1653-1663.
- [24] Chelikani PK, Glimm DR, Kennelly JJ. Short communication: Tissue distribution of leptin and leptin receptor mRNA in the bovine. *J Dairy Sci.* 2003; 86(7): 2369-2372.
- [25] Gallardo N, Arribas C, Villar M, et al. ObRa and ObRe are differentially expressed in adipose tissue in aged food-restricted rats: effects on circulating soluble leptin receptor levels. *Endocrinology.* 2005; 146(11):4934-4942.
- [26] Sayed-Ahmed A, Kulcsar M, Rudas P, et al. Expression and localisation of leptin and leptin receptor in the mammary gland of the dry and lactating non-pregnant cow. *Acta Vet Hung.* 2004;52(1):97-111.
- [27] Buyse M, Aparicio T, Guilmeau S, et al. Paracrine actions of the stomach-derived leptin. *Med Sci (Paris).* 2004;20(2): 183-188.