

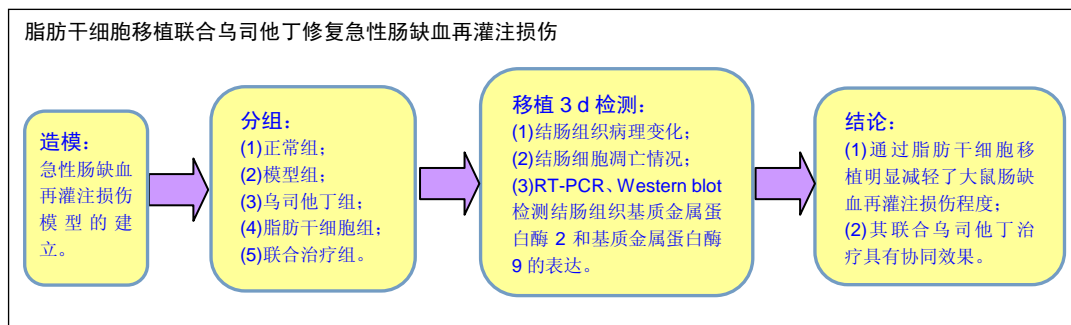
脂肪干细胞移植联合乌司他丁对急性肠缺血再灌注损伤的影响

王树英(天津市第四中心医院ICU2, 天津市 300140)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0995

ORCID: 0000-0002-8856-3152(王树英)

文章快速阅读:



王树英, 女, 1975 年生, 天津市静海县人, 汉族, 2000 年东南大学毕业, 主治医师, 主要从事重症医学研究。

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

稿件接受: 2018-06-28



文题释义:

肠缺血再灌注损伤: 是一种复杂的病理生理改变, 当肠屏障功能发生障碍时, 将导致肠内细菌及毒素移位、促炎因子大量释放, 进而发生全身炎症反应综合征、多器官功能障碍。目前认为, 除氧自由基损伤和细胞凋亡外, 再灌注过程中包括血管内皮细胞等组织细胞的炎症反应造成的损伤也引起了学术界的重视。

脂肪干细胞移植联合乌司他丁治疗肠道缺血再灌注损伤: 近年来多项研究显示乌司他丁可以通过调节机体免疫因子和抑制炎症反应、氧化应激等途径改善急性肠道缺血再灌注损伤。脂肪干细胞移植可以明显缓解心肌、肝脏、脑等器官的缺血再灌注损伤, 其可能是通过缓解炎症反应, 促进细胞功能恢复, 抑制机体氧化应激实现的。

摘要

背景: 研究表明乌司他丁可抑制小肠细胞凋亡, 有助于减轻由于缺血再灌注引起的肠道损伤。另有研究表明移植的间充质干细胞能够迁移并定居到受损肠道, 对肠缺血再灌注损伤也有一定的治疗作用。在乌司他丁治疗的基础上, 联合脂肪干细胞移植可能具有协同作用, 相互提高治疗效果。

目的: 探讨乌司他丁联合脂肪干细胞移植对大鼠急性肠缺血再灌注损伤的修复作用及其可能机制。

方法: 105 只 SD 大鼠, 随机取 20 只为正常对照组采用生理盐水灌肠和尾静脉注射生理盐水, 余 85 只用 TNB 灌肠以建立急性肠道缺血再灌注损伤模型, 最终建模成功 80 只大鼠, 将之随机均分为 4 组, 其中模型组尾静脉注射生理盐水, 脂肪干细胞组尾静脉注射 PKH26 标记的脂肪干细胞悬液, 乌司他丁组腹腔注射乌司他丁; 联合治疗组尾静脉注射脂肪干细胞悬液, 同时腹腔注射乌司他丁, 1 次/d, 连续 3 d。治疗 3 d 后取结肠组织行苏木精-伊红染色、TUNEL 染色、RT-PCR、Western blot 检测。

结果与结论: ①脂肪干细胞组和联合治疗组大鼠结肠组织内可见 PKH26 标记的阳性细胞; ②模型组大鼠肠道组织损伤明显加重, 肠黏膜上皮细胞脱落较多; 脂肪干细胞组和乌司他丁组肠道组织损伤明显减轻, 联合治疗组肠道组织损伤最轻; ③模型组结肠细胞凋亡最多, 脂肪干细胞组和乌司他丁组次之, 联合治疗组最少; ④脂肪干细胞组和乌司他丁组结肠组织中基质金属蛋白酶 2 和基质金属蛋白酶 9 的表达水平较模型组明显降低 ($P < 0.05$), 联合治疗组结肠组织中基质金属蛋白酶 2 和基质金属蛋白酶 9 的表达水平较脂肪干细胞组和乌司他丁组也有明显降低 ($P < 0.05$); ⑤结果表明, 基质金属蛋白酶 2 及基质金属蛋白酶 9 可能参与了急性肠缺血再灌注损伤发生过程, 脂肪干细胞移植联合乌司他丁治疗具有协同作用, 明显减轻了大鼠肠缺血再灌注损伤程度。

关键词:

脂肪干细胞; 乌司他丁; 细胞移植; 大鼠; 肠道损伤; 缺血再灌注损伤; 干细胞

主题词:

脂肪组织; 干细胞移植; 结肠; 再灌注损伤; 组织工程

Ulinastatin combined with adipose-derived stromal cell transplantation for treatment of acute intestinal ischemia-reperfusion injury

Wang Shu-ying (ICU2, Fourth Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300140, China)

Abstract

BACKGROUND: Studies have shown that ulinastatin inhibits apoptosis in small intestinal cells and helps relieve intestinal ischemia-reperfusion injury. Transplanted mesenchymal stem cells can migrate and colonize in the damaged intestinal tract, and thereby have a certain therapeutic effect on intestinal ischemia-reperfusion

Wang Shu-ying, Attending physician, ICU2, Fourth Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300140, China

injury. Ulinastatin treatment combined with adipose stem cell transplantation may have synergistic effects and enhance the therapeutic effects.

OBJECTIVE: To explore the repair effect and possible mechanism of ulinastatin combined with adipose-derived stem cells (ADSCs) transplantation on acute intestinal ischemia-reperfusion injury in rats.

METHODS: A total of 105 Sprague-Dawley rats were selected, 20 of which were randomly selected as normal control group and received saline enemas and tail vein injection of normal saline. The remaining 85 rats were used to make animal models of acute intestinal ischemia-reperfusion injury, and equally randomized into 4 groups: model group treated with normal saline *via* tail vein, ADSCs group treated with PKH26 labeled ADSCs suspension *via* tail vein, ulinastatin group treated with intraperitoneal injection of ulinastatin, and combined treatment group treated with ADSCs suspension *via* tail vein and intraperitoneal injection of ulinastatin (once a day, for 3 consecutive days). After 3 days of treatment, the colon tissues of rats in each group were taken for hematoxylin-eosin staining, TUNEL staining, RT-PCR detection and western blot assay.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The positive cells labeled by PKH26 were observed in ADSCs and combined treatment group. (2) Compared with the normal control group, the intestinal damage in the model group significantly aggravated and the exfoliated cells of colon tissue were increased in number, while the tissue damage levels were significantly reduced and the exfoliated cells were also reduced in number in the ADSCs group, ulinastatin group and combined treatment group. The most significant improvement in tissue damage was found in the combined treatment group. (3) The number of apoptotic cells was the most in the model group followed by ADSCs and ulinastatin groups, and least in the combined treatment group. (4) The levels of matrix metalloproteinases 2, 9 in the ADSCs and ulinastatin groups were significantly reduced compared with the model group ($P < 0.05$), but significantly higher than those in the combined treatment group ($P < 0.05$). In conclusion, matrix metalloproteinases 2, 9 may participate in the process of acute intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. ADSCs transplantation combined with ulinastatin have synergistic effects, and can considerably relieve intestinal ischemia-reperfusion injury in rats.

Subject headings: Adipose Tissue; Stem Cell Transplantation; Colon; Reperfusion Injury; Tissue Engineering

0 引言 Introduction

肠缺血再灌注损伤是严重创伤、烧伤和休克后常见的病理生理过程,当肠屏障功能发生障碍时,将导致肠内细菌及毒素移位、促炎因子大量释放,将发生全身炎症反应综合征,进一步发展成多器官功能障碍^[1-4]。乌司他丁目前已经被广泛应用于胰腺炎、慢性阻塞性肺疾病、全身炎症反应综合征、脓毒症等多种危重疾病的治疗^[5-8];研究显示该药物在肠缺血再灌注损伤治疗进程中也表现出非常良好的治疗效果^[9-11]。脂肪干细胞作为一种源于脂肪组织的间充质干细胞,近年颇受医学研究者的青睐^[12-14]。研究显示脂肪干细胞在治疗多种器官缺血再灌注损伤疾病方面具有较好的效果,其可以向损伤细胞分化,抑制炎症反应和氧化应激反应等^[15-18]。在药物治疗的基础上,联合干细胞移植可能具有协同作用,相互提高治疗效果,故该研究将乌司他丁和脂肪干细胞移植联合治疗大鼠急性肠道缺血再灌注损伤,并探究其作用机制,为临床治疗急性肠缺血再灌注损伤提供实验依据。

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 实验于2017年2月至2018年1月在天津医科大学实验动物中心实验室完成。

1.3 材料 冻存脂肪干细胞购买于中国医学科学院。胰蛋白酶(美国Sigma公司);DMEM培养基、胎牛血清、PBS(Hyclone公司);细胞培养箱(Heraeus Sepatech公司);Trizol试剂盒(Invitrogen公司);基质金属蛋白酶2和基质金属蛋白酶9一抗为兔抗人多克隆抗体,二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔多克隆抗体;内参GAPDH一抗为小鼠抗人单克隆抗体,二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠多克隆抗体,所有抗体均由艾康生物技术(杭州)有限公司提供。

雄性成年SD大鼠105只,体质量约240 g,由北京维通利华动物实验技术有限公司提供,生产许可证号:SCXK(京)2012-0001,实验动物使用许可证号:SYXK(津)2014-0002。所有大鼠于室温25℃,湿度50%-80%,SPF环境下自由饮水和采食。

1.4 实验方法

1.4.1 脂肪干细胞复苏与标记 将购买的脂肪干细胞迅速放入38℃水浴中,并不时摇动,在60 s内使其完全融化,然后在无菌环境下取出细胞,进行稀释、离心、弃上清、洗涤细胞等操作,用DMEM完全培养液重悬细胞并调整脂肪干细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$,培养7 d之后对细胞进行荧光标记。向细胞悬液中加入5 μL PKH26,在细胞培养箱中孵育25 min,重复此操作2次后显微镜下观察细胞形态和细胞标记情况。

1.4.2 实验分组与建模 从105只SD大鼠中随机选取20只大鼠作为正常对照组,给剩余的85只大鼠用TNB灌肠以建立急性肠道缺血再灌注损伤模型。最终建模成功的大鼠有80只,随机分为模型组、脂肪干细胞组、乌司他丁组和联合治疗组,每组20只。正常对照组和模型组SD大鼠经尾静脉注射20 μL 生理盐水;脂肪干细胞组经尾静脉注射20 μL PKH26标记的脂肪干细胞悬液(细胞浓度为 $2 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$);乌司他丁组腹腔注射乌司他丁 $10 \times 10^4 \text{ U/kg}$;联合治疗组大鼠经尾静脉注射20 μL PKH26标记的脂肪干细胞悬液(细胞浓度为 $2 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$),同时经腹腔注射乌司他丁 $10 \times 10^4 \text{ U/kg}$,每天治疗1次,连续3 d。治疗3 d后,每组随机挑选5只大鼠水合氯醛注射麻醉,打开胸腔用PBS灌流冲洗2 min,取一部分结肠组织在-80℃下保存用于RT-PCR和Western blot检测,另一部分结肠组织用于病理检测。

1.4.3 结肠组织苏木精-伊红染色 取中段结肠组织,进行脱水浸蜡包埋后制成6 μm 厚的薄片,放到加热的水中熨

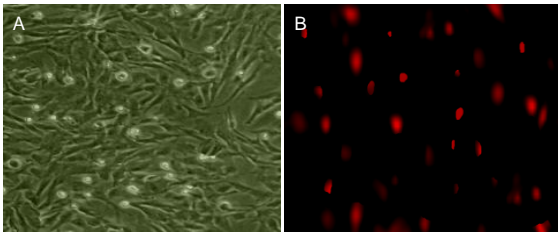
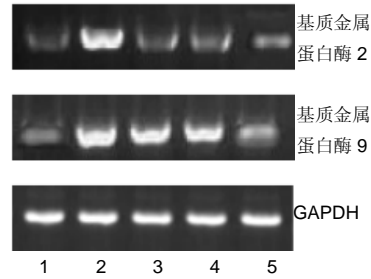


图1 脂肪干细胞的形态和标记效果(×200)

Figure 1 Morphology and marker effect of adipose-derived stem cells (×200)

图注: 图中 A 为接种 24 h 后脂肪干细胞呈现出多角形或者长梭形的形态; B 为 PKH26 标记的阳性细胞。



图注: 1: 正常对照组; 2: 模型组 3: 乌司他丁组; 4: 脂肪干细胞组; 5: 联合治疗组。

图5 各组结肠组织基质金属蛋白酶 2 和基质金属蛋白酶 9 基因表达水平

Figure 5 Expression levels of matrix metalloproteinases 2, 9 proteins in colon tissues

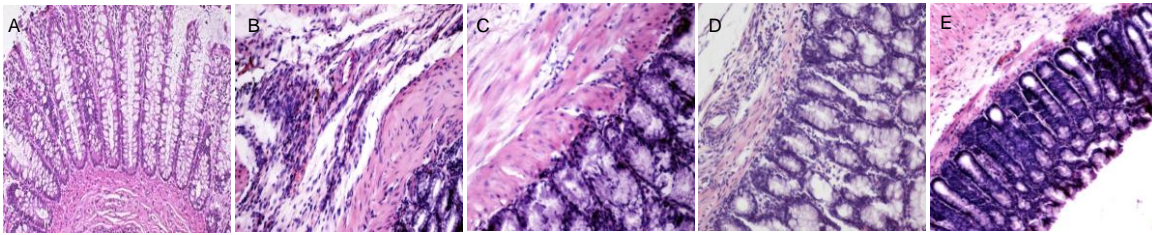


图2 大鼠结肠组织苏木精-伊红染色结果(×200)

Figure 2 Hematoxylin-eosin staining of rat colon tissues (×200)

图注: 图中 A 为正常对照组; B 为模型组, 可见大鼠结肠组织黏膜肌层消失, 炎症细胞浸润明显; C, D 为乌司他丁组和脂肪干细胞组, 结肠组织黏膜肌层得到恢复, 炎症细胞浸润减轻; E 为联合治疗组, 结肠组织恢复明显。

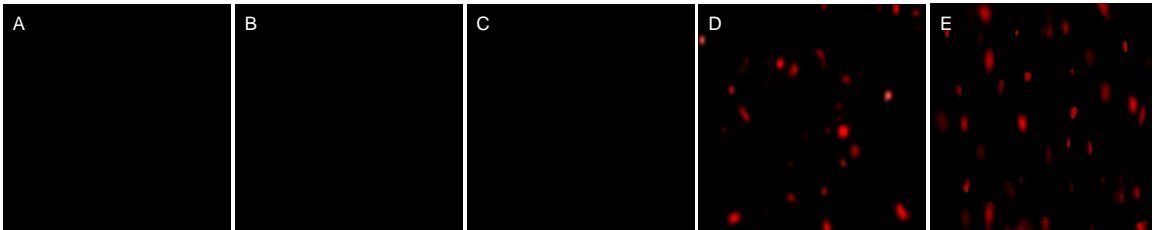


图3 PKH26 标记的脂肪干细胞的存活及分布(×200)

Figure 3 Survival and distribution of adipose-derived stem cells labeled by PKH26 (×200)

图注: 图中 A-C 为正常对照组、模型组以及乌司他丁组, 均未见阳性细胞; D 为脂肪干细胞组, 可见 PKH26 标记的脂肪干细胞; E 为联合治疗组, 可见有较多的 PKH26 标记的脂肪干细胞。

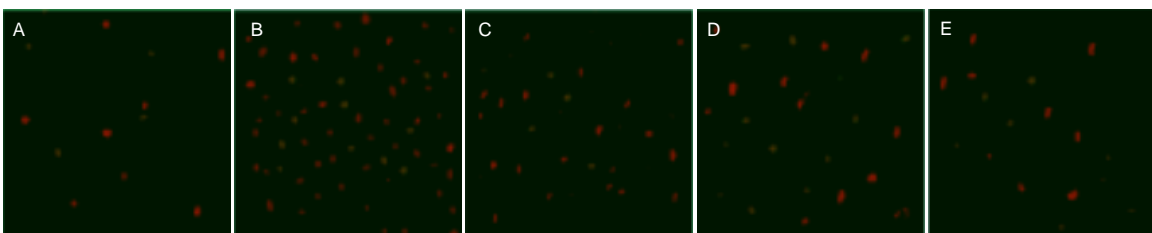


图4 各组大鼠结肠细胞凋亡情况(×200)

Figure 4 Apoptosis of colon cells in rats (×200)

图注: 图中 A 为正常对照组, 仅有少量凋亡细胞; B 为模型组, 凋亡细胞最多; C, D 为乌司他丁组和脂肪干细胞组, 凋亡细胞较少; E 为联合治疗组, 凋亡细胞明显减少。

表 1 基质金属蛋白酶 2、基质金属蛋白酶 9 及 GAPDH 引物序列

Table 1 Primer sequences of matrix metalloproteinases 2, 9 and GAPDH

引物	上游序列	下游序列	长度
基质金属蛋白酶2	5'-CCA ACA ATT TCA GAG AGT AC-3'	5'-AGT TAT AGC ATC AAA GGT TAC-3'	253 bp
基质金属蛋白酶9	5'-GGG CTA CGT GAC CTA TGA CAT CCT-3'	5'-CCC ACC TCC ACT CCT CCC TTTC-3'	166 bp
GAPDH	5'-CCC ATC ACC ATC TTC CAG GAG CG-3'	5'-CAT CCA CAG TCT TCT GAG TG-3'	411 bp

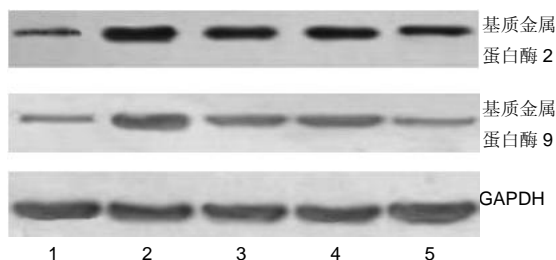


图6 各组结肠组织基质金属蛋白酶2和基质金属蛋白酶9蛋白表达水平

Figure 6 Expression levels of matrix metalloproteinases 2, 9 proteins in colon tissues

图注: 1: 正常对照组; 2: 模型组 3: 乌司他丁组; 4: 脂肪干细胞组; 5: 联合治疗组。

平, 再贴到载玻片上, 放入恒温箱中烘干, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇脱水, 进行苏木精-伊红染色, 在显微镜下观察结肠组织病理变化。

1.4.4 TUNEL法检测结肠细胞凋亡情况 取中段结肠组织制作石蜡切片后脱蜡处理, 向切片上滴加复合消化酶室温孵化20 min; 洗涤后滴加50 μL TUNEL标记反应混合液, 在湿盒中37 °C孵育1 h, 滴加POD2转化液50 μL, 湿盒37 °C孵育30 min, PBS冲洗3次, DAB显色; 进行苏木精-伊红复染后即可在荧光显微镜下观察凋亡细胞数目。

1.4.5 RT-PCR检测基质金属蛋白酶2和基质金属蛋白酶9基因表达 取出冻存结肠组织, 研磨匀浆后使用Trizol试剂提取大鼠结肠组织中的总RNA, 反转录获得cDNA, 进行RT-PCR反应检测基质金属蛋白酶2和基质金属蛋白酶9基因表达。通过Primer Primer 5.0软件设计引物, 见表1。采用Image proplus6.0图像分析软件分析电泳条带的吸光度值, 进而计算其相对表达量。

1.4.6 Western blot检测基质金属蛋白酶2和基质金属蛋白酶9蛋白表达 取出冻存结肠组织, 加入裂解液制成匀浆液, 离心取上清液, 采用BCA法测定总蛋白浓度, 然后进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、摇床封闭2 h; 加入一抗孵育过夜, 加入二抗孵育2 h, PBS洗涤后用化学发光试剂显影, 扫描图像并半定量分析, 测定基质金属蛋白酶2和基质金属蛋白酶9蛋白相对表达水平, 以GAPDH为内参。

1.5 主要观察指标 ①各组结肠组织苏木精-伊红染色结果; ②各组结肠细胞凋亡情况; ③各组结肠组织中基质金属蛋白酶2和基质金属蛋白酶9的基因表达水平; ④各组结肠组织中基质金属蛋白酶2和基质金属蛋白酶9的蛋白表达水平。

1.6 统计学分析 采用SPSS 16.0进行统计学分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 用t检验来比较组间差异, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 脂肪干细胞的形态 细胞复苏6 h后即可见到有少量

表2 各组结肠组织基质金属蛋白酶2和基质金属蛋白酶9表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Expression of matrix metalloproteinases 2, 9 in colon tissues at mRNA and protein levels

组别	基质金属蛋白酶2		基质金属蛋白酶9	
	基因水平	蛋白水平	基因水平	蛋白水平
正常对照组	1.78±0.10	0.54±0.02	1.86±0.08	0.74±0.12
模型组	3.29±0.24 ^a	1.85±0.03 ^a	3.22±0.17 ^a	1.69±0.03 ^a
乌司他丁组	2.17±0.19 ^b	0.73±0.03 ^b	2.14±0.09 ^b	0.90±0.04 ^b
脂肪干细胞组	2.32±0.09 ^b	0.82±0.01 ^b	2.39±0.09 ^b	0.91±0.05 ^b
联合治疗组	1.91±0.21 ^c	0.60±0.03 ^c	1.95±0.21 ^c	0.79±0.03 ^c

表注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与脂肪干细胞组和乌司他丁组比较, ^c $P < 0.05$ 。

的脂肪干细胞贴壁, 接种24 h后脂肪干细胞呈现出多角形或者长梭形的形态(图1A)。PKH26标记脂肪干细胞发出红色荧光, 标记后细胞生长状态良好(图1B)。

2.2 结肠组织苏木精-伊红染色结果 见图2。与正常对照组比较, 模型组结肠组织具有明显的损伤, 可见较多的脱落细胞。与模型组相比, 脂肪干细胞组和乌司他丁组结肠组织损伤明显减轻, 细胞脱落也明显较少, 联合治疗组结肠组织损伤最轻, 结肠组织细胞脱落最少。

2.3 PKH26标记的脂肪干细胞的存活及分布情况 见图3。脂肪干细胞组和联合治疗组大鼠结肠组织镜下可见PKH26标记的脂肪干细胞, 其数目分别为(13.58±2.09)个/高倍镜视野和(25.27±2.76)个/高倍镜视野。而正常对照组、模型组以及乌司他丁组均未见到PKH26标记的脂肪干细胞, 由此可以表明移植的脂肪干细胞经过迁移已到达并分布于大鼠结肠组织中。

2.4 结肠细胞凋亡情况 见图4。与正常对照组[(3.80±0.63)%]相比, 模型组结肠组织细胞凋亡率显著升高[(39.1±0.72)%]; 乌司他丁组和脂肪干细胞组细胞凋亡率[(24.8±0.46)%、(24.4±0.43)%]显著低于模型对照组, 但高于正常对照组; 联合治疗组结肠细胞凋亡率明显减少[(10.1±0.74)%]。

2.5 各组结肠组织基质金属蛋白酶2和基质金属蛋白酶9表达水平 见表2和图5, 6。与正常对照组相比, 模型组结肠组织基质金属蛋白酶2和基质金属蛋白酶9的基因和蛋白表达水平均显著提高($P < 0.05$), 脂肪干细胞组和乌司他丁组表达水平较模型组明显降低($P < 0.05$), 联合治疗组基质金属蛋白酶2和基质金属蛋白酶9基因和蛋白表达水平明显低于脂肪干细胞组和乌司他丁组($P < 0.05$)。

3 讨论 Discussion

急性肠道缺血再灌注是临床上常见的一种损伤, 在严重感染、休克、手术、外伤等疾病的病理演变过程中起重要作用, 其可以引发严重的败血症或者毒血症, 甚至引起严重的多种器官炎症反应乃至衰竭^[19-21]。因此, 寻求一种

可靠有效的治疗方案显得尤为重要。近年来多项研究显示乌司他丁可以通过调节机体免疫因子和抑制炎症反应、氧化应激等途径改善急性肠道缺血再灌注损伤^[22-27]。脂肪干细胞移植可以明显缓解心肌、肝脏、脑等器官的缺血再灌注损伤,其可能是通过缓解炎症反应,促进细胞功能恢复,抑制机体氧化应激实现的^[28-34]。

实验将脂肪干细胞移植与乌司他丁治疗相互结合,研究二者联合对大鼠急性肠道缺血再灌注损伤的修复作用,以期为该病的治疗提供借鉴和依据。脂肪干细胞复苏标记后,显微镜下可见到明显的PKH26标记的活力正常阳性细胞,由此可知脂肪干细胞标记成功^[35-36]。根据模型组大鼠机体结肠组织形态变化和结肠细胞凋亡情况可知急性肠道缺血再灌注模型建立成功^[37]。治疗3 d之后,脂肪干细胞组和联合治疗组大鼠结肠组织中可见到较多的脂肪干细胞分布于结肠组织中,由此可知在发生急性肠道缺血再灌注后脂肪干细胞成功移植到了损伤结肠部。根据组织形态和凋亡细胞数目比较可知,脂肪干细胞和乌司他丁可以显著缓解肠道缺血再灌注引起的机体损伤,而二者联合的治疗作用更强。该研究显示模型组大鼠结肠组织中的基质金属蛋白酶2、基质金属蛋白酶9基因和蛋白呈高表达,脂肪干细胞组和联合治疗组结肠组织中基质金属蛋白酶2、基质金属蛋白酶9的表达则低于模型组,联合治疗组则低于单独治疗组。基质金属蛋白酶是锌离子依赖蛋白酶家族,该家族可以参与细胞外基质的代谢,其对保持细胞外基质的营养和防止底物堆积具有重要的作用^[38-40]。基质金属蛋白酶2和基质金属蛋白酶9的激活参与了细胞外基质的降解,是一类结构中含Zn²⁺和Ca²⁺的蛋白水解酶类,主要参与细胞外基质的代谢。它们在血管形成、伤口愈合、肿瘤浸润和纤维化等方面起着重要的作用^[41-43]。该研究显示急性肠道缺血再灌注模型大鼠结肠组织中基质金属蛋白酶2、基质金属蛋白酶9基因和蛋白表达水平显著升高,其可能在损伤进程中促进了细胞外基质的降解,从而导致了细胞的凋亡和组织器官功能的退化^[44]。研究结果显示单独治疗组中大鼠结肠组织中基质金属蛋白酶2和基质金属蛋白酶9的表达水平显著降低;而联合治疗组中大鼠结肠组织中基质金属蛋白酶2和基质金属蛋白酶9表达水平则显著低于单独治疗组。据此可知脂肪干细胞移植和乌司他丁可能通过降低基质金属蛋白酶2和基质金属蛋白酶9的表达水平减少细胞外基质降解从而缓解肠道缺血再灌注损伤。

总之,将脂肪干细胞和乌司他丁相互联合治疗急性肠道缺血再灌注损伤,其能够减少结肠细胞凋亡,降低结肠组织中基质金属蛋白酶2和基质金属蛋白酶9的表达水平,并促进结肠组织修复。

致谢: 感谢天津第四中心医院闫渭清老师的指导和帮助!

作者贡献: 实验设计、实施、评估均为王树英。

经费支持: 该文章没有接受任何经费支持。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中

不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经天津医科大学动物实验伦理委员会批准,批准号为 SYXK20120026。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

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。

生物统计学声明: 文章统计学方法经天津第四中心医院闫渭清老师审核。

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。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] 陈诗哲. 肠缺血再灌注损伤研究进展[J]. 现代医药卫生, 2017, 33(13):1990-1992.
- [2] 杨牟, 张居文, 陈萍, 等. 肢体远隔缺血后适应对兔急性肠道缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(1):84-85.
- [3] James IA, Chen CL, Huang G, et al. HB-EGF protects the lungs after intestinal ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res*. 2010;163(1):86-95.
- [4] Lenaerts K, Ceulemans LJ, Hundscheid IH, et al. New insights in intestinal ischemia-reperfusion injury: implications for intestinal transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2013;18(3):298-303.
- [5] 毛刚, 吴清安, 刘磊. 乌司他丁的药理作用机制及临床应用进展[J]. 山东医药, 2015, 55(30):94-96.
- [6] 朱瑶丽, 朱春丽, 王小华. 乌司他丁对脓毒症休克患者血常规、血乳酸及降钙素原的影响[J]. 西北药学杂志, 2015, 30(5): 618-620.
- [7] 张丽梅, 陈炜, 古旭云, 等. 乌司他丁对老年严重脓毒症患者心脏保护作用的临床观察[J]. 中国临床药理学杂志, 2014, 30(12): 1089-1091.
- [8] Li HF, Zhao SX, Xing BP, et al. Ulinastatin suppresses endoplasmic reticulum stress and apoptosis in the hippocampus of rats with acute paraquat poisoning. *Neural Regen Res*. 2015;10(3):467-472.
- [9] 周爱国, 赵瑾, 欧阳军. 乌司他丁对大鼠小肠缺血再灌注氧自由基抑制作用的研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2013, 12(15): 1182-1184.
- [10] 范玲玲, 侯明星, 都义日, 等. 乌司他丁对肠缺血-再灌注大鼠血清 TNF- α , IL-6 的影响[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(31): 6011-6013.
- [11] 韦玮. 肠道缺血再灌注损伤中乌司他丁抗炎作用新靶点—自身消化假说[D]. 广州: 南方医科大学, 2013.
- [12] Ma T, Sun J, Zhao Z, et al. A brief review: adipose-derived stem cells and their therapeutic potential in cardiovascular diseases. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):124.
- [13] Tabatabaei Qomi R, Sheykhhasan M. Adipose-derived stromal cell in regenerative medicine: A review. *World J Stem Cells*. 2017;9(8):107-117.

- [14] Jang S, Cho HH, Kim SH, et al. Transplantation of human adipose tissue-derived stem cells for repair of injured spiral ganglion neurons in deaf guinea pigs. *Neural Regen Res*. 2016;11(6):994-1000.
- [15] Saidi RF, Rajeshkumar B, Shariffabrizi A, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells attenuate liver ischemia-reperfusion injury and promote liver regeneration. *Surgery*. 2014;156(5):1225-1231.
- [16] Chen L, Qin F, Ge M, et al. Application of adipose-derived stem cells in heart disease. *J Cardiovasc Transl Res*. 2014;7(7):651-663.
- [17] Chen YT, Yang CC, Zhen YY, et al. Cyclosporine-assisted adipose-derived mesenchymal stem cell therapy to mitigate acute kidney ischemia-reperfusion injury. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(3):62.
- [18] Yip HK, Chang YC, Wallace CG, et al. Melatonin treatment improves adipose-derived mesenchymal stem cell therapy for acute lung ischemia-reperfusion injury. *J Pineal Res*. 2013;54(2):207-221.
- [19] Czeiger D, Osyntsov A, Osyntsov L, et al. Examining the safety of colon anastomosis on a rat model of ischemia-reperfusion injury. *World J Emerg Surg*. 2013;8:24.
- [20] Chen Z, Wang G, Zhai X, et al. Selective inhibition of protein kinase C $\beta 2$ attenuates the adaptor P66 Shc-mediated intestinal ischemia-reperfusion injury. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1164.
- [21] Pirenne J. Intestinal failure: autologous reconstruction, intestinal transplantation and intestinal ischemia reperfusion injury. *Curr Opin Organ Transplant*. 2013;18(3):285.
- [22] 李佩铂,袁苑,贺翠莲.乌司他丁对大鼠肠缺血再灌注时肝组织 Bcl-2、Bax蛋白表达的影响[J].中国煤炭工业医学杂志, 2013, 16(2):274-275.
- [23] 卢化祥,贾一韬,俞为荣,等.乌司他丁对小鼠不同程度肠缺血-再灌注损伤的作用[J].上海交通大学学报(医学版), 2014,34(5):626-630.
- [24] 朱国松,罗刚健,叶志强,等. $\alpha 7nAChR$ 激动剂和乌司他丁对大鼠肠缺血再灌注后肺组织IL-1 β 、IL-6和TNF- α 作用的比较[J].实用医学杂志,2013,29(8):1231-1233.
- [25] 邵壮.乌司他丁对大鼠肢体缺血再灌注损伤的保护作用及其机制[D].北京:中国人民解放军医学院,2014.
- [26] 刘彦西,高大宽,马亚玲,等.乌司他丁对大鼠脑缺血再灌注损伤后的保护作用及其机制研究[J].现代生物医学进展, 2015,15(23):4462-4466.
- [27] 范玲玲,侯明星,都义日,等.乌司他丁对肠缺血-再灌注损伤大鼠血清 SOD 活性及 MDA 水平的影响[J].山东医药, 2014,54(10):39-40.
- [28] Yip HK, Chang YC, Wallace CG, et al. Melatonin treatment improves adipose-derived mesenchymal stem cell therapy for acute lung ischemia-reperfusion injury. *J Pineal Res*. 2013;54(2):207-221.
- [29] Chang CL, Sung PH, Sun CK, et al. Protective effect of melatonin-supported adipose-derived mesenchymal stem cells against small bowel ischemia-reperfusion injury in rat. *J Pineal Res*. 2015;59(2):206-220.
- [30] Lee SC, Kim JO, Kim SJ. Secretome from human adipose-derived stem cells protects mouse liver from hepatic ischemia-reperfusion injury. *Surgery*. 2015;157(5):934-943.
- [31] Jang HR, Park JH, Kwon GY, et al. Effect of preemptive treatment with human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells on the development of renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;307(10):F1149-1161.
- [32] Shen ZY, Zhang J, Song HL, et al. Bone-marrow mesenchymal stem cells reduce rat intestinal ischemia-reperfusion injury, ZO-1 downregulation and tight junction disruption via a TNF- α -regulated mechanism. *World J Gastroenterol*. 2013;19(23):3583-3595.
- [33] 刘明.胎盘间充质干细胞对大鼠脑缺血再灌注损伤Nogo-A及NgR的影响[D].青岛:青岛大学,2015.
- [34] Li Y, Xu W, Cheng LY. Adipose-derived mesenchymal stem cells accelerate nerve regeneration and functional recovery in a rat model of recurrent laryngeal nerve injury. *Neural Regen Res*. 2017;12(9):1544-1550.
- [35] Li P, Zhang R, Sun H, et al. PKH26 can transfer to host cells in vitro and vivo. *Stem Cells Dev*. 2013;22(2):340-344.
- [36] 郭凯,罗燕,李涛,等.人脂肪间充质干细胞向视网膜色素上皮样细胞的诱导分化及其在体应用研究[J].中华实验眼科杂志, 2015, 33(9):794-797.
- [37] 王炳杰,胡延伟,赵叶芳,等.谷氨酰胺联合脐间充质干细胞移植在大鼠肠缺血再灌注损伤中的作用[J].中国比较医学杂志, 2016, 26(10):25-31.
- [38] Maradni A, Khoshnevisan A, Mousavi SH, et al. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) and MMP inhibitors on intracranial aneurysms: a review article. *Med J Islam Repub Iran*. 2013;27(4):249-254.
- [39] Liu Y, Xu B, Wu N, et al. Association of MMPs and TIMPs With the Occurrence of Atrial Fibrillation: A Systematic Review and Meta-analysis. *Can J Cardiol*. 2016;32(6):803-813.
- [40] Pandey AK, Bhattacharya P, Shukla SC, et al. Resveratrol inhibits matrix metalloproteinases to attenuate neuronal damage in cerebral ischemia: a molecular docking study exploring possible neuroprotection. *Neural Regen Res*. 2015;10(4):568-575.
- [41] 胡光强,杜曦,陈碧琼,等.橄榄苦苷对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤和炎性反应的作用[J].神经解剖学杂志,2016,32(1):82-86.
- [42] 孟星.脑脉泰对血管性痴呆大鼠脑白质的保护作用及机制探索[D].长春:吉林大学,2015.
- [43] 李兵,易良,徐伦山,等.MMP1 MMP2 MMP9与TIMP-1 TIMP-2检测对脑胶质瘤的诊断作用分析[J].中国实用神经疾病杂志, 2013, 16(23):4-6.
- [44] 龚霞.压力性尿失禁患者宫骶韧带中MMPs/TIMPs表达量、细胞外基质成分含量与细胞凋亡的关系[J].海南医学院学报, 2017, 23(15):2113-2115.