

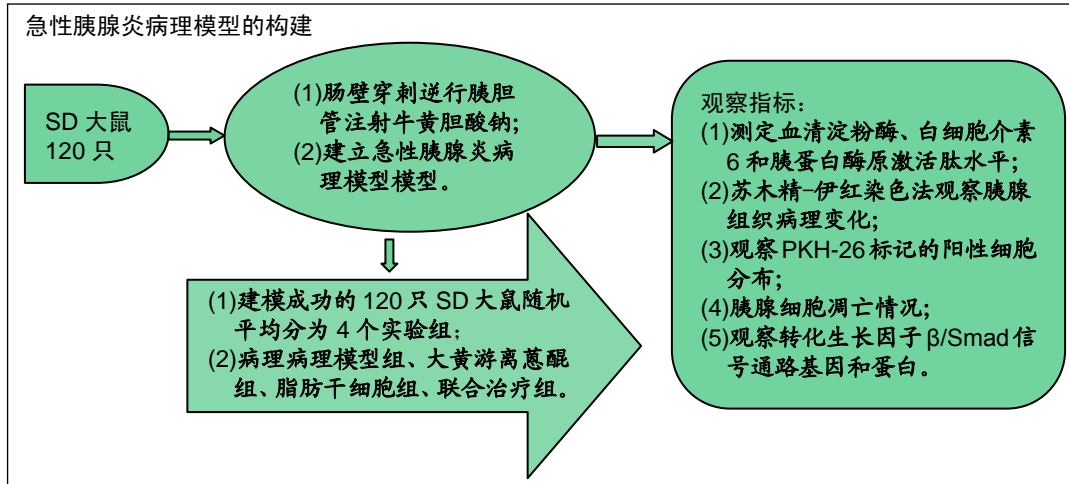
# 大黄游离蒽醌对脂肪干细胞移植治疗大鼠急性胰腺炎的影响

郑俊杰<sup>1</sup>, 田伟军<sup>2</sup>, 王金峰<sup>3</sup>, 叶奎<sup>4</sup> (天津市第四中心医院, <sup>1</sup>肝胆胃肠外科, <sup>4</sup>血管外科, 天津市 300140; <sup>2</sup>天津医科大学总医院普外科, 天津市 300052; <sup>3</sup>辽宁电力中心医院外二科, 辽宁省沈阳市 110000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1612

ORCID: 0000-0003-1683-6067(郑俊杰)

文章快速阅读:



郑俊杰, 1984年生, 浙江省人, 汉族, 2014年天津医科大学毕业, 硕士, 主治医师。

通讯作者: 郑俊杰, 硕士, 主治医师。天津市第四中心医院肝胆胃肠外科, 天津市 300140

文献标识码: B

稿件接受: 2018-12-05



文题释义:

**大黄游离蒽醌:** 是提取自中药大黄的一种羟基蒽醌类化合物, 研究表明其在治疗急性胰腺炎方面效果显著。

**脂肪干细胞移植:** 移植的脂肪干细胞可归巢到损伤的胰腺组织, 并表达胰腺组织表面的标记物, 发挥胰腺组织功能, 起到治疗急性胰腺炎的作用。

摘要

**背景:** 研究表明大黄游离蒽醌能够保护肠黏膜细胞结构和功能的稳定, 但尚未有将其与脂肪干细胞联合治疗大鼠急性胰腺炎的报道。

**目的:** 观察并探讨大黄游离蒽醌对脂肪干细胞移植治疗大鼠急性胰腺炎的影响及其机制。

**方法:** 体外快速复苏并培养源自中国医学科学院的冻存鼠脂肪干细胞, 随后采用 MTT 比色法测定脂肪干细胞的细胞存活率并行 PKH-26 标记。将北京维通利华动物实验技术有限公司提供的 SD 大鼠随机平均分为 4 组, 病理模型组大鼠采用肠壁穿刺逆行胰胆管注射体积分数 5% 牛黄胆酸钠建立急性胰腺炎病理模型, 然后尾静脉注射 0.5 mL 的 L-DMEM 完全培养液; 大黄游离蒽醌建模后给予大黄游离蒽醌 200 mg/kg 灌胃; 脂肪干细胞建模后尾静脉注射 0.5 mL 细胞浓度  $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$  脂肪干细胞; 联合治疗组建模后同时给予以上 2 种干预。各个实验组中所有干预治疗措施每日进行 1 次且连续治疗 3 d。

**结果与结论:** ①与病理模型组的大鼠相比, 大黄游离蒽醌组和脂肪干细胞组大鼠血清淀粉酶活性以及白细胞介素 6 水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 胰蛋白酶原激活肽水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 经过脂肪干细胞移植和大黄游离蒽醌灌胃处理联合治疗, 上述 3 指标水平较单独蒽醌组和脂肪干细胞组进一步降低 ( $P < 0.05$ ); ②苏木精-伊红染色结果显示, 此 2 个单独治疗组大鼠胰腺组织中脂肪变性、出血、细胞坏死及炎症细胞浸润等病理变化程度均有明显减轻, 联合治疗组中大鼠的病理变化的缓解程度则更为明显; ③荧光显微镜下观察可见, PKH-26 标记的阳性细胞数联合治疗组最多, 脂肪干细胞组次之, 而在大黄游离蒽醌组及病理模型组则未见 ( $P < 0.05$ ); ④TUNEL 法检测可见, 与病理模型组比较, 2 个单独治疗组中胰腺组织中的细胞凋亡数明显降低, 联合治疗组进一步降低 ( $P < 0.01$ ); ⑤RT-PCR 和 Western blot 法检测显示, 病理模型组大鼠胰腺组织转化生长因子  $\beta 1$  及 Smad2/3 基因和蛋白表达最高, 联合治疗组最低 ( $P < 0.01$ ), 而 2 个单独干预组均较病理模型组显著降低 ( $P < 0.05$ ); ⑥结果证实, 大黄游离蒽醌联合脂肪干细胞移植治疗大鼠急性胰腺炎可以有效改善模型大鼠急性胰腺炎的血液生化指标水平; 并可明显地缓解急性胰腺炎模型大鼠炎症反应程度和胰腺组织形态学病变以及胰腺细胞的凋亡, 这可能与降低转化生长因子  $\beta$ /Smad 信号通路有关。

**关键词:**

脂肪干细胞; 移植; 大鼠; 急性胰腺炎; 大黄游离蒽醌; 转化生长因子  $\beta$ /Smad; 胰腺组织; 血清淀粉酶; 白细胞介素 6; 胰蛋白酶原激活肽; 凋亡

**主题词:**

胰腺炎; 干细胞; 组织工程

中图分类号: R456; R3648

Zheng Junjie, Master,  
Attending physician,  
Department of Hepatobiliary  
and Gastrointestinal Surgery,  
Tianjin 4<sup>th</sup> Central Hospital,  
Tianjin 300140, China

Corresponding author:  
Zheng Junjie, Department of  
Hepatobiliary and  
Gastrointestinal Surgery,  
Tianjin 4<sup>th</sup> Central Hospital,  
Tianjin 300140, China

## Effect of rhubarb-free anthraquinone in the treatment of acute pancreatitis with adipose-derived stem cell transplantation in rats

Zheng Junjie<sup>1</sup>, Tian Weijun<sup>2</sup>, Wang Jinfeng<sup>3</sup>, Ye Kui<sup>4</sup> (<sup>1</sup>Department of Hepatobiliary and Gastrointestinal Surgery, <sup>4</sup>Department of Vascular Surgery, Tianjin 4<sup>th</sup> Central Hospital, Tianjin 300140, China; <sup>2</sup>Department of General Surgery, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; <sup>3</sup>Second Department of Surgery, Liaoning Electric Power Center Hospital, Shenyang 110000, Liaoning Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Studies have shown that rhubarb-free anthraquinone can protect the stability of the intestinal mucosa cell structure and function. However, the combination of rhubarb-free anthraquinone with adipose-derived stem cells to treat acute pancreatitis in rats has not yet been reported.

**OBJECTIVE:** To investigate the effects of rhubarb-free anthraquinone on the treatment of acute pancreatitis by fat stem cell transplantation in rats.

**METHODS:** Cryopreserved mouse adipose-derived stem cells (provided by the Chinese Academy of Medical Sciences) were rapidly recovered and cultured *in vitro*. The survival cells were labeled using PKH-26, and then the cell survival rate of adipose-derived stem cells was determined by MTT colorimetry. Sprague-Dawley rats provided by Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd. were equally randomized into four groups. Animal models of acute pancreatitis were made in all rats through intestinal wall puncture for retrograde administration of 5% sodium taurocholate to the pancreaticobiliary tube, and then the model rats were given tail vein injection of L-DMEM complete medium (0.5 mL) in the model group, intragastric administration of 200 mg/kg rhubarb-free anthraquinone in the rhubarb-free anthraquinone group, tail vein injection of adipose-derived stem cells ( $1 \times 10^7$  cells/L, 0.5 mL) in the cell transplantation group, and intragastric administration of 200 mg/kg rhubarb-free anthraquinone plus tail vein injection of  $1 \times 10^7$  adipose-derived stem cells (0.5 mL) in the combined treatment group. All interventions in each group were performed once a day, for 3 continuous days.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) The levels of serum amylase and interleukin-6 were significantly reduced in the rhubarb-free anthraquinone group and cell transplantation group compared with the model group ( $P < 0.05$ ), while the level of trypsinogen activation peptide significantly increased ( $P < 0.05$ ). In the combined treatment group, the levels of three indicators mentioned above were significantly decreased compared with the rhubarb-free anthraquinone group and cell transplantation group ( $P < 0.05$ ). (2) The results of hematoxylin-eosin staining showed that the pathological changes in the pancreatic tissue of rats were significantly reduced in the rhubarb-free anthraquinone group and cell transplantation group, such as fatty degeneration, hemorrhage, cell necrosis and inflammatory cell infiltration. The remission of pathological changes was more obvious in the combined treatment group. (3) The number of positive cells labeled by PKH-26 was the highest in the combined treatment group, followed by the cell transplantation group, while there were no PKH-26-positive cells in the rhubarb-free anthraquinone group and model group ( $P < 0.05$ ). (4) Compared with the model group, the number of apoptotic cells in the pancreatic tissue was significantly reduced in the rhubarb-free anthraquinone group and cell transplantation group, and lowest in the combined treatment group ( $P < 0.01$ ). (5) The expression of transforming growth factor- $\beta 1$  and Smad2/3 at gene and protein levels was highest in the model group, followed by the rhubarb-free anthraquinone group and cell transplantation group ( $P < 0.05$ ), and lowest in the combined treatment group ( $P < 0.01$ ). To conclude, the combined intervention of rhubarb-free anthraquinone and adipose-derived stem cell transplantation could effectively improve the blood biochemical index level in the rats with acute pancreatitis, significantly relieve the degree of inflammatory response, pancreatic tissue morphology, and apoptosis of pancreatic cells, which may be related to the reduction of the transforming growth factor- $\beta$ /Smad signal pathway.

**Subject headings:** Pancreatitis; Stem Cells; Tissue Engineering

## 0 引言 Introduction

急性胰腺炎是一种由多种病因引发的较为常见的急腹症,但目前对其治疗措施非常有限,其发病机制尚无统一的定论<sup>[1-3]</sup>,该病呈急性发生,约有近1/3的患者病程发生凶险,其病死率也高达约10%<sup>[4]</sup>。临床上对于急性胰腺炎的治疗多采用药物抗炎干预治疗或者手术治疗,但是其预后效果并不十分理想<sup>[5-6]</sup>。多项研究表明干细胞参与多种受损组织的修复工作<sup>[7-9]</sup>;在糖尿病及其并发症等多种代谢疾病治疗中疗效显著<sup>[10-11]</sup>。脂肪干细胞作为一种源于脂肪组织的间充质干细胞,因其易于获得、遗传稳定、可快速扩增,为代谢性疾病的治疗带来了新希望,移植的干细胞可归巢到损伤的胰腺组织,并表达胰腺组织表面的标记物,发挥胰腺组织功能,起到治疗急性胰腺炎的作用<sup>[12-15]</sup>。庄培涛等<sup>[16]</sup>通过将脂肪间充质干细胞移植到急性胰腺炎模型大鼠,结果表明模型大鼠炎症反应显著减轻,胰腺组织得到了修复。大黄游离蒽醌是提取自中药大黄的一种羟基蒽醌类化合物,研究表明其在治疗急性胰腺炎方面效果显著<sup>[17]</sup>。以往研究表明大黄游离蒽醌及脂肪间充质干细胞对

急性胰腺炎都可发挥有利作用<sup>[18]</sup>,探索治疗和预防急性胰腺炎的新途径是目前胰腺病学研究的重点。

实验拟将大黄游离蒽醌与脂肪干细胞移植相联合,通过大黄中游离蒽醌类化合物减轻急性胰腺炎局部组织的炎症反应,改善胰腺局部微环境,为干细胞移植提供有利环境,提高干细胞移植的疗效;研究联合治疗对大鼠急性胰腺炎的治疗效果并进一步探讨其治疗的机制,以期急性胰腺炎的治疗提供依据和借鉴。

## 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2017年7月至2018年4月在天津医科大学总医院动物实验室完成。

### 1.3 材料

**细胞:** 冻存鼠脂肪干细胞购买自中国医学科学院。

**动物:** 共120只体质量200-250 g的成年SD大鼠(七八周龄,雌雄各半)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,实验在天津市

第四医院实验动物中心完成, 实验动物使用许可证号: SYXK(津)2014-0002。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: SYXK20120026。实验用的所有SD大鼠均室温饲养, 湿度60%–70%的SPF级环境下, 大鼠自由摄水摄食。

**药物:** 大黄游离蒽醌, 大黄粉由北京昌平医药药材总公司提供, 经鉴定为掌叶大黄, 测得其大黄游离蒽醌含量为1.21%。牛黄胆酸钠, 1 mL/kg, 购自北京华迈科生物技术有限责任公司。

#### 1.4 实验方法

**1.4.1 体外复苏培养脂肪干细胞及PKH-26标记** 将购买来的液氮冻存的鼠脂肪干细胞置于37 °C恒温水浴箱, 进行鼠脂肪干细胞的30 s快速复苏。冷冻的细胞悬液完全融化后, 通过连续3次稀释离心弃上清的操作进行脂肪干细胞的洗涤; 然后用完全培养液将洗涤后的细胞进行重悬并小心将细胞浓度调整到 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。在细胞培养箱中培养7 d之后对细胞离心弃上清洗涤细胞并将细胞浓度调整到 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。随后参照Tohill等<sup>[19]</sup>对其进行PKH-26的荧光标记, 显微镜下观察检测细胞的形态和细胞标记的情况。

**1.4.2 急性胰腺炎病理模型建立及分组** 取购买来的120只SD大鼠(七八周龄, 雌雄大鼠各占50%), 所有大鼠分别进行肠壁穿刺逆行胰胆管注射体积分数5%牛黄胆酸钠建立急性胰腺炎病理模型<sup>[18]</sup>。于大鼠腹正中剑突下约1.5 cm开腹, 辨认出大鼠的胰胆管后, 用显微血管夹将肝门端胰胆管在距胰腺约0.5 cm处夹闭, 从胰胆管远端逆行穿刺, 0.2 mL/min缓慢匀速向胰胆管注入体积分数5%牛磺胆酸钠完毕后, 加压阻闭针口1 min, 去除血管夹。造模后根据大鼠胰腺组织的病理学变化情况评价急性胰腺炎病理模型建立是否成功。

将急性胰腺炎病理模型建立成功的120只SD大鼠随机平均分为4个实验组, 每组30只。病理模型组大鼠分别尾静脉注射L-DMEM完全培养液0.5 mL; 大黄游离蒽醌组大鼠灌胃200 mg/kg大黄游离蒽醌; 脂肪干细胞组大鼠尾静脉注射细胞浓度为 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的脂肪干细胞悬液0.5 mL; 联合治疗组灌胃200 mg/kg大黄游离蒽醌和尾静脉注射脂肪干细胞。各个实验组中所有的治疗干预措施每日进行1次, 且连续治疗3 d。

**1.4.3 血清淀粉酶、白细胞介素6和胰蛋白酶原激活肽水平的测定** 干预治疗3 d之后, 从各个实验组随机选取5只大鼠采集血液离心取血清, 分别测定血清淀粉酶、白细胞介素6和胰蛋白酶原激活肽水平。血清中淀粉酶水平采取碘-淀粉比色法进行测定, 取0.5 mL底物缓冲液于37 °C预热5 min; 随后向其中加入0.1 mL血清混匀后继续37 °C水浴反应7.5 min后, 并向其中加入0.5 mL碘应用液以及3 mL蒸馏水继续混匀。混匀完成后于酶标仪紫外线660 nm波长下测定其吸光度。采用ELISA法分别测定各个实验组中大鼠白细胞介素6和胰蛋白酶原激活肽的水平, 向ELISA试剂盒的抗体包被微孔板中滴加血清, 震荡反应后加入底物显色。颜色深浅与血清中的目标物浓度呈正相关性, 在酶标仪紫外线450 nm波长下测定吸光度, 计算血清中白细胞介

素6和胰蛋白酶原激活肽的浓度。

**1.4.4 苏木精-伊红染色检测胰腺组织病理变化** 干预治疗3 d后从各个实验组随机取5只小鼠。麻醉并处死小鼠后取出其胰腺组织, 用体积分数10%的甲醛溶液固定胰腺组织以制备胰腺组织切片; 梯度乙醇脱水, 二甲苯中透明, 浸蜡包埋。将包埋好的蜡块固定于切片机上, 切成5–8  $\mu\text{m}$ 厚薄片。将薄片烫平, 再贴到载玻片上, 45 °C恒温烘干。脱蜡后, 进行苏木精-伊红染色。染色后的切片经纯乙醇脱水, 再经二甲苯使切片透明。将已透明的切片滴上加拿大树胶, 盖上盖玻片封固。待树胶干燥后, 荧光显微镜下观察各组小鼠胰腺组织病理形态变化。

**1.4.5 荧光显微镜观察PKH-26标记脂肪干细胞的存活和分布** 在脂肪干细胞移植3 d后收集大鼠的胰腺组织并制备大鼠胰腺组织切片。将大鼠胰腺组织切片行苏木精-伊红染色后在荧光显微镜下进行观察。在荧光显微镜下的图像中随机选取10个视野, 计数每个视野之中PKH-26标记的阳性细胞数并求平均数, 观察阳性细胞在胰腺组织中的分布。

**1.4.6 TUNEL法检测胰腺细胞凋亡情况** 在干预治疗3 d后, 取4个处理组SD大鼠的胰腺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  $\mu\text{L}$ 的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  $\mu\text{L}$ ; 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检测计数, 并比较胰腺组织切片中的凋亡细胞数目, 据此计算胰腺组织细胞凋亡率。

**1.4.7 RT-PCR法检测转化生长因子 $\beta$ /Smad信号转导通路的基因相对表达水平** 干预治疗3 d之后, 从各组分别取5只小鼠胰腺组织置于液氮中准备进行实验, 测定胰腺组织中RAGE基因相对表达水平。每个检测重复3次。取出胰腺组织, 于冰上充分研磨组织后迅速加入TRIzol试剂裂解细胞抽提总RNA。根据反转录说明书合成相应的cDNA并进行扩增。反应总体积15  $\mu\text{L}$ (SYBR Green 3  $\mu\text{L}$ 、DEPC水10  $\mu\text{L}$ 、上下引物各0.5  $\mu\text{L}$ 、200 mg/L cDNA 1  $\mu\text{L}$ )。扩增条件均为94 °C预变性1 min, 94 °C变性30 s, 59 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 共33个循环。取扩增产物行电泳, 电泳结果通过凝胶图像分析系统进行吸光度值分析。RT-PCR两步法试剂盒购自北京赛百盛基因技术有限公司, 引物由英潍捷基公司设计合成, 引物序列见表1。

表1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

引物	序列	片段长度
转化生长因子 $\beta$	上游: 5'-GTC AGA CAT TCG GGA GCA G-3'	558 bp
	下游: 5'-AGA CAG AAG TTG GCA TGG TAG C-3'	
Smad2	上游: 5'-GAC TATA CCC TCA ATA CCA T-3'	610 bp
	下游: 5'-CGA AAG CCG TAC TCC ATT CCA G-3'	
Smad3	上游: 5'-ACA ATA ACT TGG ACC TAC AGC C-3'	454 bp
	下游: 5'-GTC AAC TGG TAG ACA GCC TCA-3'	
$\beta$ -actin	上游: 5'-CTG CCG CAT CCT CTT CCTC-3'	398 bp
	下游: 5'-GCA GTA ATC TCC TTC TGC ATC C-3'	

**1.4.8 Western-blot检测转化生长因子 $\beta$ /Smad信号转导通路的蛋白表达水平** 治疗3 d后分别从4个处理组取出5只小鼠,并取出所有小鼠胰腺组织,测定胰腺组织中转化生长因子 $\beta$ /Smad信号通路蛋白相对表达水平。将细胞裂解之并将之稀释至相同的蛋白浓度,100 °C煮沸5 min使蛋白变性。每组取蛋白40  $\mu$ g,10% SDS-PAGE凝胶电泳(70 V,30 min;100 V,90 min);转膜(200 mA,3 h)至PVDF膜;5%脱脂牛奶室温封闭2 h(或4 °C过夜);一抗(多克隆HPA及转化生长因子 $\beta$ 1兔抗体购于Proteintech公司)1:500稀释,室温孵育2 h(或4 °C过夜);次日添加各自对应的二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体购于美国Santa Cruz公司)1:500稀释,继续温育2 h,完毕后,应用Tris缓冲液进行彻底冲洗,随后向其中添加DAB显色液进行显色,共计15 min,用扫描分析软件系统(苏州达麦迪生物医学科技有限公司)测定各组胰腺组织中转化生长因子 $\beta$ 1、Smad2和Smad3蛋白相对表达水平。目的蛋白与内参 $\beta$ -actin灰度值的比值作为蛋白相对表达量。

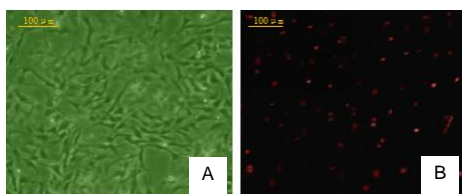
**1.5 主要观察指标** 脂肪干细胞存活率及其PKH-26标记情况;大鼠造模情况;血清淀粉酶、白细胞介素6和胰蛋白酶原激活肽水平;各实验组胰腺组织病理变化;PKH-26标记脂肪干细胞的存活和分布;TUNEL法检测胰腺细胞凋亡情况;转化生长因子 $\beta$ /Smad信号转导通路的基因及蛋白表达水平。

**1.6 统计学分析** 用SPSS 16.0软件进行统计学分析,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,所有数据资料的组间比较采用单因素方差分析和LSD法, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 实验动物数量分析** 理模型组死亡8只;大黄游离蒽醌组死亡5只;脂肪干细胞组死亡6只,联合治疗组死亡3只,无脱失值,及时补充死亡大鼠22只,最终计入结果分析的数量120只。

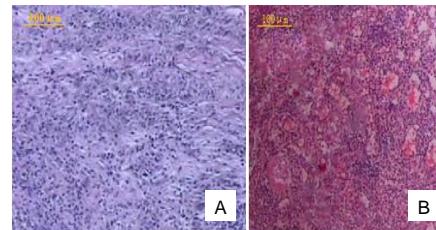
**2.2 脂肪干细胞存活率及其PKH-26标记情况** 显微镜下观察可见,在接种细胞24 h之后脂肪干细胞开始贴壁并呈现出了纤维细胞样的外观;在培养了48 h之后,可见到细胞充分伸展为梭形,随后细胞开始逐渐聚集,在培养6 d后开始形成细胞集落。从不同时间点脂肪干细胞的存活情况可知,脂肪干细胞随着复苏和培养时间的延长,其存活力逐渐增强。见图1。



图注:图A为培养48 h后的脂肪干细胞(普通显微镜,×40);B为PKH-26染色标记脂肪干细胞(免疫荧光染色,×40)。

图1 脂肪干细胞存活率及其PKH-26染色情况(标尺:100  $\mu$ m)  
Figure 1 Survival rate and PKH-26 labeling of adipose-derived stem cells (scale bars=100  $\mu$ m)

**2.3 大鼠造模成功的评价** 苏木精-伊红染色显示,与正常胰腺组织相比,注射牛磺酸钠后胰腺显著充血,且有水肿发生,据此可判定大鼠急性胰腺炎模型建立成功。实验中的120只SD大鼠急性胰腺炎模型建立成功,见图2。



图注:图A、B为正常胰腺和注射牛磺酸钠后胰腺组织形态。标尺:100  $\mu$ m。

图2 大鼠胰腺组织形态(苏木精-伊红染色,×40)

Figure 2 Morphology of rat pancreas tissues (hematoxylin-eosin staining, ×40)

**2.4 各组血清淀粉酶、白细胞介素6和胰蛋白酶原激活肽水平** 与病理模型组的大鼠相比,大黄游离蒽醌组和脂肪干细胞组大鼠血清淀粉酶活性以及白细胞介素6水平显著降低( $P < 0.05$ ),胰蛋白酶原激活肽水平显著升高( $P < 0.05$ );经过脂肪干细胞移植和大黄游离蒽醌灌胃处理联合治疗,上述3指标水平较大黄游离蒽醌组和脂肪干细胞组进一步降低( $P < 0.05$ )。见表2。

表2 各组血清淀粉酶、白细胞介素6和胰蛋白酶原激活肽水平变化  
( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=5$ )

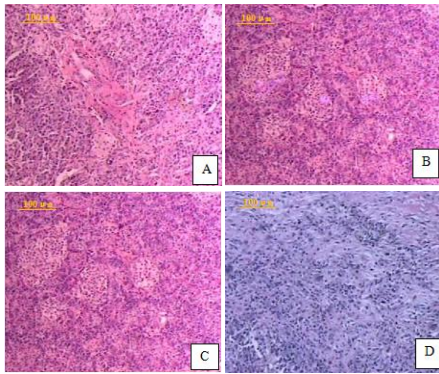
Table 2 Levels of serum amylase, interleukin-6 and trypsinogen activation peptide

组别	淀粉酶(U/L)	白细胞介素6( $\mu$ g/L)	胰蛋白酶原激活肽(nmol/L)
病理模型组	2 443.51±557.07	37.11±3.08	12.78±1.48
大黄游离蒽醌组	1 409.32±542.36 <sup>a</sup>	27.84±2.70 <sup>a</sup>	23.65±1.32 <sup>a</sup>
脂肪干细胞组	1 486.72±582.17 <sup>a</sup>	25.84±2.53 <sup>a</sup>	23.63±1.30 <sup>a</sup>
联合治疗组	803.51±89.87 <sup>b</sup>	20.72±2.02 <sup>b</sup>	19.28±1.21 <sup>b</sup>

表注:与病理模型组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与大黄游离蒽醌及脂肪干细胞组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

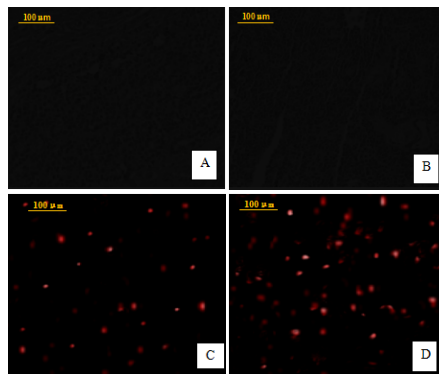
**2.5 各组胰腺组织病理变化** 图3所示为急性胰腺炎模型大鼠胰腺组织病理变化,病理模型大鼠胰腺组织中脂肪变性,可见有明显的出血以及细胞坏死,且可见有较多的炎症细胞浸润。大黄游离蒽醌组和脂肪干细胞组大鼠胰腺组织可见脂肪变性明显减轻,胰腺组织中仅有少量出血和轻微炎症细胞浸润;联合治疗组大鼠胰腺组织未见有明显的出血和脂肪变性。

**2.6 各组PKH-26标记脂肪干细胞的存活和分布** 由图4可见在病理模型组和大黄游离蒽醌组中大鼠胰腺组织中未见有PKH-26的阳性细胞数,在脂肪干细胞组中大鼠胰腺组织PKH-26标记的脂肪干细胞数量较多[(24.69±3.64)个/高倍镜视野],在联合治疗组中PKH-26标记的阳性细胞数量最多[(43.58±4.25)个/高倍镜视野]。



图注: 图 A 为病理模型组, 可见胰腺组织中脂肪变性, 较多的炎症细胞浸润; B, C 为大黄游离蒽醌组和脂肪干细胞组, 脂肪变性明显减轻, 出血和炎症细胞浸润减少; D 为联合治疗组, 出血和脂肪变性比单独治疗组明显减轻。标尺: 100  $\mu\text{m}$ 。

图 3 各组胰腺组织病理变化(苏木精-伊红染色,  $\times 40$ )  
Figure 3 Pathological changes in rat pancreas tissues (hematoxylin-eosin staining,  $\times 40$ )



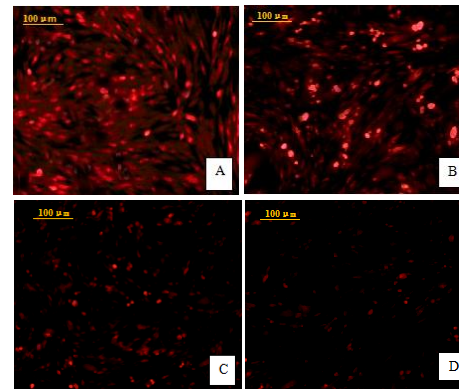
图注: 图 A, B 为病理模型组及大黄游离蒽醌组, 未见 PKH-26 荧光标记的细胞; C 为脂肪干细胞组, 有少量的 PKH-26 荧光标记的细胞; D 为联合治疗组, 有较多的 PKH-26 荧光标记的细胞。标尺: 100  $\mu\text{m}$ 。

图 4 各组胰腺组织 PKH-26 标记脂肪干细胞的存活和分布(免疫荧光染色,  $\times 200$ )  
Figure 4 Survival and distribution of PKH-26-labeled adipose-derived stem cells in the rat pancreas tissues

2.7 TUNEL法检测各组胰腺细胞凋亡情况 与病理模型组大鼠胰腺组织中细胞凋亡率[(58.2 $\pm$ 4.1)%]相比, 大黄游离蒽醌组[(37.2 $\pm$ 3.5)%]及脂肪干细胞组[(30.1 $\pm$ 2.9)%]大鼠胰腺组织中胰腺细胞的凋亡率显著降低, 而联合治疗组大鼠胰腺细胞的凋亡率[(14.5 $\pm$ 1.9)%]最低, 见图5。

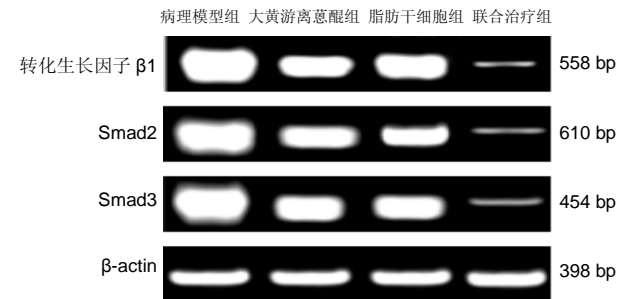
2.8 各组转化生长因子  $\beta$ /Smad 信号转导通路的基因表达水平 病理模型组大鼠胰腺组织中的转化生长因子  $\beta 1$  及 Smad2、Smad3 基因相对表达水平最高, 大黄游离蒽醌组及脂肪干细胞组大鼠胰腺组织 3 种基因相对表达水平显著降低( $P < 0.05$ ), 而联合治疗组中大鼠 3 种基因相对表达水平最低( $P < 0.05$ )。见图 6 和表 3。

2.9 各组转化生长因子  $\beta$ /Smad 信号转导通路的蛋白表达水平 病理模型组大鼠胰腺组织中的转化生长因子  $\beta 1$ 、Smad2 及 Smad3 蛋白相对表达水平最高( $P < 0.05$ ), 单纯治疗组中大鼠胰腺组织中 3 种蛋白相对表达水平显著降低( $P < 0.05$ ), 而联合治疗组中大鼠 3 种蛋白相对表达水平最低( $P < 0.05$ )。见图 7 和表 4。



图注: 图 A 为病理模型组, 有较多的凋亡细胞; B, C 为大黄游离蒽醌组及脂肪干细胞组, 凋亡细胞较病理模型组明显减少; D 为联合治疗组, 凋亡细胞较大黄游离蒽醌组及脂肪干细胞组明显减少。标尺: 100  $\mu\text{m}$ 。

图 5 各组胰腺组织细胞凋亡情况(TUNEL 染色,  $\times 200$ )



图注: 病理模型组大鼠胰腺组织中的转化生长因子  $\beta 1$ 、Smad2 及 Smad3 基因相对表达水平最高, 大黄游离蒽醌组及脂肪干细胞组中 3 个基因相对表达水平显著降低, 而联合治疗组中 3 个基因相对表达水平较 2 个单纯治疗组更明显降低。标尺: 100  $\mu\text{m}$ 。

图 6 各组转化生长因子  $\beta$ /Smad 基因表达差异  
Figure 6 Differential expression of transforming growth factor  $\beta$ /Smad gene in each group

表 3 各组胰腺组织转化生长因子  $\beta$ /Smad 基因表达水平  
( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ , 吸光度值)  
Table 3 mRNA levels of transforming growth factor  $\beta$ /Smad in the rat pancreas tissues

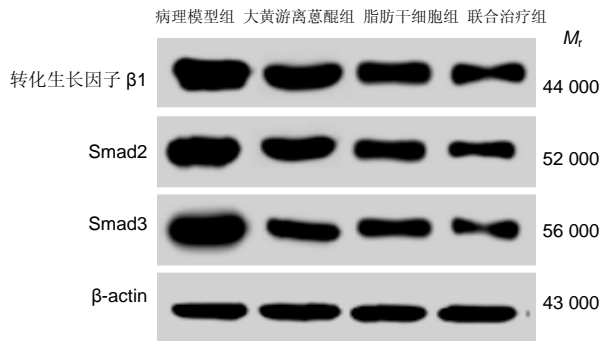
基因	病理模型组	大黄游离蒽醌组	脂肪干细胞组	联合治疗组
转化生长因子 $\beta 1$	31.08 $\pm$ 3.10	21.85 $\pm$ 2.19 <sup>a</sup>	21.72 $\pm$ 2.17 <sup>a</sup>	15.46 $\pm$ 1.55 <sup>b</sup>
Smad2	25.37 $\pm$ 2.54	18.83 $\pm$ 1.89 <sup>a</sup>	18.75 $\pm$ 1.78 <sup>a</sup>	10.18 $\pm$ 1.02 <sup>b</sup>
Smad3	25.32 $\pm$ 2.54	17.58 $\pm$ 1.76 <sup>a</sup>	17.45 $\pm$ 1.75 <sup>a</sup>	10.10 $\pm$ 1.02 <sup>b</sup>

表注: 与病理模型组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , 与 大黄游离蒽醌及脂肪干细胞组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

表 4 各组胰腺组织转化生长因子  $\beta$ /Smad 蛋白表达水平  
( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ , 灰度值比值)  
Table 4 Protein levels of transforming growth factor  $\beta$ /Smad in the rat pancreas tissues

蛋白	病理模型组	大黄游离蒽醌组	脂肪干细胞组	联合治疗组
转化生长因子 $\beta 1$	38.91 $\pm$ 3.89	30.02 $\pm$ 3.01 <sup>a</sup>	30.08 $\pm$ 3.02 <sup>a</sup>	22.08 $\pm$ 2.21 <sup>b</sup>
Smad2	28.58 $\pm$ 2.86	21.31 $\pm$ 2.13 <sup>a</sup>	21.29 $\pm$ 2.12 <sup>a</sup>	15.63 $\pm$ 1.56 <sup>b</sup>
Smad3	28.49 $\pm$ 2.85	21.28 $\pm$ 2.13 <sup>a</sup>	21.25 $\pm$ 2.12 <sup>a</sup>	14.87 $\pm$ 1.48 <sup>b</sup>

表注: 与病理模型组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , 与 大黄游离蒽醌及脂肪干细胞组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。



图注: 病理模型组大鼠胰腺组织中的转化生长因子  $\beta$ 1、Smad2 及 Smad3 蛋白相对表达水平最高, 大黄游离蒽醌组及脂肪干细胞组中 3 个蛋白相对表达水平显著降低, 而联合治疗组中 3 个蛋白相对表达水平较 2 个单纯治疗组更明显降低。

图 7 各组转化生长因子  $\beta$ /Smad 蛋白表达差异

Figure 7 Expression of transforming growth factor  $\beta$ /Smad protein in each group

### 3 讨论 Discussion

实验通过将大黄游离蒽醌和脂肪干细胞移植相联合, 探讨了大黄游离蒽醌对脂肪干细胞移植治疗大鼠急性胰腺炎的作用。急性胰腺炎是一种发病机制较为复杂的疾病, 该病会导致患者胰腺结构和功能损伤, 并诱发严重的炎症反应。多项中医研究显示采用大黄及其复方治疗急性胰腺炎时疗效较为显著<sup>[19-20]</sup>。有人研究了大黄中游离蒽醌类化合物对急性胰腺炎大鼠的效果, 结果表明其具有显著的疗效<sup>[21-23]</sup>, 主要是因为其可显著缓解炎症反应。庄培涛等<sup>[16]</sup>通过移植脂肪间充质干细胞研究其对急性胰腺炎的治疗效果, 结果显示其参与胰腺组织损伤修复, 并可缓解炎症反应<sup>[24-26]</sup>。但就二者结合是否具有协同治疗的作用尚无研究, 实验旨在通过探究二者联合的作用, 以期为急性胰腺炎的治疗提供借鉴和依据。

实验结果显示大黄游离蒽醌与脂肪干细胞移植相联合可以显著缓解大鼠的急性胰腺炎, 效果较好。结果表明联合治疗组大鼠血液中淀粉酶活性以及白细胞介素6、胰蛋白酶原激活肽水平显著低于大黄游离蒽醌组与脂肪干细胞组 2 个单独治疗组。患者发生急性胰腺炎时, 胰腺内的胰蛋白酶原异常激活并引起胰蛋白酶原激活肽释放入体液, 从而激活胰腺的自消化进程<sup>[27-29]</sup>。白细胞介素6在全身性炎症反应的发生发展中发挥着重要的作用, 其是炎症反应的敏感指标<sup>[30-32]</sup>。急性胰腺炎发生时, 患者胰腺内的淀粉酶也释放入血液中, 其也是急性胰腺炎发生的重要指标。据此可知联合治疗显著缓解了大鼠急性胰腺炎对胰腺功能的损伤和炎症反应。这与庄培涛等<sup>[16]</sup>的研究较为一致。苏木精-伊红染色和TUNEL染色的结果表明, 大黄游离蒽醌和脂肪干细胞移植联合显著缓解了病理模型大鼠胰腺的结构性损伤并显著抑制了胰腺细胞的凋亡。这可能是由于急性胰腺炎发生后引起胰腺组织的细胞自噬、胰腺自消化以及炎症反应, 从而诱发胰腺组织的结果性病变和细胞凋亡。荧光

显微镜下观察结果显示, 脂肪干细胞组中PKH-26阳性细胞数量较多, 而联合治疗组中阳性细胞数量最多。据此可知, 大黄游离蒽醌的干预显著提高了脂肪干细胞在胰腺中的分布和存活, 促进了脂肪干细胞向急性胰腺炎病变组织的归巢和迁移, 提高了治疗效果。

实验进一步探讨和阐述了联合治疗的治疗机制。转化生长因子 $\beta$ 1是器官纤维化启动和进程的关键因子, 该分子的活化激活了其信号通路下游受体激活型Smad2/3等成员的活化<sup>[33-35]</sup>, 进而引发下游一系列的基因表达变化, 促进了胰腺纤维化和病理性损伤的进程<sup>[34]</sup>。实验中转化生长因子 $\beta$ 1/Smad信号转导通路表达水平的结果显示, 病理模型组大鼠胰腺组织中转化生长因子 $\beta$ 1、Smad2/3表达水平最高, 由此可知病理模型组大鼠胰腺发生了损伤。大黄游离蒽醌干预和脂肪干细胞移植联合治疗显著降低了转化生长因子 $\beta$ 1和Smad2/3基因和蛋白相对表达水平。由此可知联合治疗通过抑制了转化生长因子 $\beta$ 1/Smad信号转导通路, 缓解胰腺损伤, 促进了胰腺的修复。这可能是大黄游离蒽醌联合脂肪干细胞移植治疗急性胰腺炎的作用机制之一。

综上所述, 实验通过将大黄游离蒽醌和脂肪干细胞移植相联合, 首次研究了二者联合作用对急性胰腺炎的治疗作用, 并阐述了其可能的机制。实验探讨大黄游离蒽醌和脂肪干细胞移植对急性胰腺炎的作用, 结果表明大黄游离蒽醌干预联合脂肪干细胞移植治疗大鼠急性胰腺炎可以有效地改善模型大鼠急性胰腺炎的血生化指标水平; 并且可以明显地减轻大鼠急性胰腺炎程度和胰腺组织形态学病变。脂肪干细胞易于获得、遗传稳定、能够快速扩增, 为代谢性疾病的治疗带来了新方法, 移植的脂肪干细胞能够归巢到损伤的胰腺组织, 并表达胰腺组织表面的标记物, 发挥胰腺组织的功能, 起到对急性胰腺炎的治疗作用。脂肪间充质干细胞移植到急性胰腺炎模型大鼠, 结果表明模型大鼠炎症反应显著减轻, 胰腺组织得到了修复。大黄游离蒽醌与脂肪干细胞移植相联合, 通过大黄中游离蒽醌类化合物减轻急性胰腺炎局部组织的炎症反应, 改善胰腺局部微环境, 为干细胞移植提供有利环境, 提高干细胞移植的疗效, 这可能与大黄中游离蒽醌类化合物降低转化生长因子 $\beta$ /Smad信号通路有关, 但有关大黄游离蒽醌的具体治疗机制有待进一步深入研究。

**致谢:** 感谢天津医科大学总医院普外科的田伟军老师对实验的评估、实施及资料收集, 感谢辽宁电力中心医院外二科的王金峰老师对实验实施的贡献, 感谢天津市第四中心医院的叶奎老师对实验实施的贡献。

**作者贡献:** 实验设计为郑俊杰。实验实施为田伟军、王金峰及叶奎。资料收集和实验评估为田伟军和郑俊杰。

**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 and 文章撰写过程, 没有因其岗位角色影响文章观点和对数据结果的报道, 不存在利益冲突。

**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。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。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**作者声明:** 第一作者和通讯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。

**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他任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

[1] 阮俊, 张家骏, 曹志刚. 重视肠道衰竭在重症急性胰腺炎发病中的作用[J]. 中国急救医学, 2015, 35(s2): 5-6.

[2] 磨庆福. 重症急性胰腺炎的发病原因及发病机制研究进展[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2014, 23(9): 1107-1110.

[3] 赵宁. 重症急性胰腺炎诊治进展[J]. 中华急诊医学杂志, 2014, 23(10): 67-68.

[4] 龙靓, 刘湘, 郭小兰, 等. 2012-2014年我院急性胰腺炎患者营养药物使用情况调查[J]. 药物流行病学杂志, 2015(12): 740-743.

[5] 刘大晟, 罗羽宏, 李接兴. 重症急性胰腺炎早期手术与延期手术治疗效果Meta分析[J]. 肝胆胰外科杂志, 2014, 26(4): 289-292.

[6] 张芬, 杨柳, 王浩, 等. 急性胰腺炎的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(15): 2983-2986.

[7] Tang Y, Gan X, Cheheltani R, et al. Targeted delivery of vascular endothelial growth factor improves stem cell therapy in a rat myocardial infarction model. *Nanomedicine*. 2014; 10(8): 1711-1718.

[8] Atashi F, Modarressi A, Pepper MS. The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. *Stem Cells Dev*. 2015; 24(10): 1150-1163.

[9] Jeong H, Yim HW, Cho Y, et al. Efficacy and safety of stem cell therapies for patients with stroke: a systematic review and single arm meta-analysis. *Int J Stem Cells*. 2014; 7(2): 63.

[10] Bruin JE, Saber N, Braun N, et al. Treating diet-induced diabetes and obesity with human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitor cells and antidiabetic drugs. *Stem Cell Rep*. 2015; 4(4): 605-620.

[11] Morigi M, Coppi PD. Cell therapy for kidney injury: different options and mechanisms-mesenchymal and amniotic fluid stem cells. *Nephron Nephrol*. 2014; 126(2): 59.

[12] Teng M, 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 RQ, Sheykhasan M. Adipose-derived stromal cell in regenerative medicine: a review. *World J Stem Cell*. 2017; 9(8): 107.

[14] Saidi RF, Rajeshkumar B, Sharifabrizi A, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells attenuate liver ischemia-reperfusion injury and promote liver regeneration. *Surgery*. 2014; 156(5): 1225-1231.

[15] Chen L, Qin F, Ge M, et al. Application of adipose-derived stem cells in heart disease. *J Cardiovasc Transl*. 2014; 7(7): 651-663.

[16] 庄培涛, 谭雪莹, 邱建涛, 等. 人脂肪间充质干细胞对急性坏死性胰腺炎大鼠治疗疗效的观察[J]. 中华胰腺病杂志, 2017, 17(2): 82-87.

[17] 竹林, 赵健蕾, 彭小航, 等. 大黄中游离蒽醌类化合物在实验性急性胰腺炎大鼠的组织药理学研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(2): 304-308.

[18] 刘媛琪, 王璐璐, 陈立, 等. 大黄游离蒽醌对重症急性胰腺炎大鼠肝脏的影响[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(8): 1827-1829.

[19] Tohill M, Terenghi G. Stem-cell plasticity and therapy for injuries of the peripheral nervous system. *Biotechnol Appl Biochem*. 2011; 40(1): 17-24.

[20] 陈立, 范玲, 谭小勇, 等. 大黄游离蒽醌对重症急性胰腺炎大鼠肠道免疫功能的影响及其作用机制[J]. 山东医药, 2016, 56(24): 13-16.

[21] 刘京伟, 陈玲玲, 赵安成. 血清SAA、CRP、PCT及TAP联合检测在急性重症胰腺炎早期诊治中的临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(13): 1811-1813.

[22] 范永熙, 单海滨, 李兆然. 急性胰腺炎患者血清PCT、IL-6和hs-CRP水平变化的临床意义[J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(10): 46-49.

[23] 于宁, 王晓倩, 张欣. IL-10、TGF- $\beta$ 及其mRNA在急性胰腺炎合并肝、肾损伤中的表达[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(17): 2610-2612.

[24] Zhang J, Ning X, Cui W, et al. Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ -induced microRNA-216a promotes acute pancreatitis via Akt and TGF- $\beta$  pathway in mice. *Digest Dis Sci*. 2015; 60(1): 127-35.

[25] Akbarshahi H, Sam A, Chen C, et al. Early activation of pulmonary TGF- $\beta$ 1/Smad2 signaling in mice with acute pancreatitis-associated acute lung injury. *Mediators Inflamm*. 2014; 2014(1): 148029.

[26] Sakao M, Okazaki K, Uchida K, et al. The role of Smad2/3 linker phosphorylation in the regenerative phase of acute pancreatitis. *Pancreatol*. 2016; 16(4): S84-S85.

[27] 杨芳勇, 王丽娜, 岳小强, 等. 中药大黄在急性胰腺炎治疗中的临床应用[J]. 中华胰腺病杂志, 2015, 15(3): 212-214.

[28] 王璐璐, 刘媛琪, 陈立, 等. 大黄游离蒽醌对重症急性胰腺炎大鼠肾损伤的影响[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(2): 31-34.

[29] 杨永茂, 王平, 张艳, 等. 大黄游离蒽醌在正常和重症急性胰腺炎犬体内吸收动力学比较研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(4): 494-498.

[30] 金佳佳, 陈建华, 杨伟刚. 经皮芒硝超声导入对急性胰腺炎患者炎症因子的影响[J]. 湖北中医杂志, 2018, 40(1): 6-8.

[31] 彭智, 邱彬. 基因重组干扰素 $\gamma$ 对呼吸道合胞病毒毛细支气管炎患儿血清SP-D、TGF- $\beta$ 以及IL-4水平的影响[J]. 中国医师杂志, 2018, 20(4): 612-614.

[32] 许希燕, 王巧稚, 罗茂, 等. 阿魏酸联合脂肪间充质干细胞调节TGF- $\beta$ /Smad信号转导通路对肝星状细胞凋亡的影响研究[J]. 重庆医学, 2018, 47(15): 1997-2000.

[33] 范惠. 中医药干预肾纤维化TGF- $\beta$ 1/Smad信号转导通路的体外研究概况[J]. 泸州医学院学报, 2017, 40(2): 221-224.

[34] 孙红, 李凤飞, 孙子林. 转化生长因子 $\beta$ 1在胰腺星状细胞致胰腺纤维化中作用研究进展[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2012, 4(5): 51-53.

[35] 石占利, 方堃, 孙静, 等. 大黄素对重症急性胰腺炎大鼠胰腺细胞凋亡的干预作用[J]. 中华全科医学, 2017, 15(11): 1830-1834.