

骨髓间充质干细胞移植和动员对重症急性胰腺炎大鼠肝肾细胞凋亡的保护作用

陆 贝 蔡 阳 封 光 华 张 喜 平

摘要 目的 探讨自体骨髓间充质干细胞移植和干细胞动员对重症急性胰腺炎大鼠肝肾细胞凋亡的保护作用。方法 腹腔注射L-精氨酸制备大鼠SAP模型,随机分为假手术组、模型组、骨髓干细胞移植(mesenchymal stem cells, MSC)组、重组人粒细胞集落刺激因子组(G-CSF)及MSC+G-CSF组($n=48$),各组再按术后不同观察时间段分为12、24、48、72h亚组($n=12$)。MSC组造模后6h经股静脉注入自体骨髓间充质干细胞1.2ml, G-CSF组造模前连续3天皮下注入G-CSF 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, MSC+G-CSF组则联合应用,假手术组仅腹腔注射等体积生理盐水。在术后相应时间点观察各组大鼠的死亡率,肝肾组织的病理变化,比较Bax、Bcl-2蛋白水平和细胞凋亡指数差异。结果 各治疗组48h前未见死亡,72h死亡率与模型组比较无显著差异($P>0.05$);肝脏、肾脏病理变化均较模型组减轻;治疗组各时间点肝肾细胞Bax表达较模型组下调,Bcl-2蛋白上调,凋亡指数较模型组有明显下降。MSC+G-CSF组24h点后Bax含量,48h、72h点Bcl-2含量,24h/48h点后细胞凋亡指数与MSC组和G-CSF组比较差异显著($P<0.05$),MSC组和G-CSF组各时间比较无显著差异($P>0.05$)。结论 联合自体骨髓MSC移植与动员能有效抑制重症急性胰腺炎时肝脏和肾脏的细胞凋亡。

关键词 重症急性胰腺炎 间充质干细胞 移植 细胞凋亡

Protection Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplantation and Bone Marrow Stem Cells Mobilization on Liver and Renal Cells Apoptosis in Rats with Severe Acute Pancreatitis. Lu Bei, Cai Yang, Feng Guanghua, Zhang Xiping. Department of Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang 310006, China

Abstract Objective To observe the protective effects of autologous bone marrow mesenchymal stem cells transplantation combined with bone marrow stem cells mobilization on liver and renal cell apoptosis in rats with severe acute pancreatitis, and explore their mechanism. **Methods** 240 SD rats with severe acute pancreatitis were prepared by injecting intraperitoneally with L-arginine and randomly divided into sham-operated group ($n=48$), model control group ($n=48$), bone marrow mesenchymal stem cell transplanted (MSC) group ($n=48$), granulocyte-colony stimulating factor treated (G-CSF) group ($n=48$) and MSC+G-CSF ($n=48$). MSC group were prepared via injection of 1.2ml MSC to femoral vein 6 hours after SAP. G-CSF group were prepared via subcutaneous injection of G-CSF 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for 3 days before SAP. MSC+G-CSF group combined use of MSC and G-CSF. Sham-operated group were injected of equal volume normal saline. According to the difference of time points after operation, the rats in each group were subdivided into 12, 24, 48 and 72h groups ($n=12$). At various time points after operation, the mortality rate, pathological changes, expression levels of Bax, Bcl-2 proteins and apoptosis indexes of liver and renal were observed respectively. The contents were determined to compare the difference of each group by variance analysis. **Results** Compared to the respective model group, the mortality rates of all treated group at 72h showed no difference ($P>0.05$), but no rats died before 48h. The pathological injuries of liver and renal cells were relieved compared to control group. The expression of Bax in liver and renal cells decreased and Bcl-2 protein increased. The cell apoptosis indexes decreased significantly. The difference of bax protein after 24h, Bcl-2 protein in 48, 72h, apoptosis index after 24 or 48h was significant compared to MSC and G-CSF group ($P<0.05$), but no marked difference was observed between the latter two groups ($P>0.05$). **Conclusion** Autologous bone marrow mesenchymal stem cells transplantation combined with bone marrow stem cells mobilization can significantly protect liver and renal cells apoptosis from severe damage in the progress of severe acute pancreatitis.

Key words Severe acute pancreatitis; Mesenchymal stem cell; Transplant; Apoptosis

基金项目:浙江省医药卫生科学研究基金资助项目(2008B144)
作者单位:310006 杭州市第一人民医院肝胆外科
通讯作者:蔡阳,电子信箱:caiyang68@hotmail.com

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)常并发全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),继之发展为多器官功能不全综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS),

具体机制并不完全清楚,近几年在干细胞领域的研究进展为SAP早期治疗带来了新思路。本研究探讨自体骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)移植和动员对SAP大鼠肝脏和肾脏细胞凋亡的保护作用。

材料与方 法

1. 材料:清洁级的健康雄性 Sprague - Dawley 大鼠 240 只,体重 270 ~ 330g,购自浙江大学医学院实验动物中心。L - 精氨酸、戊巴比妥钠购自 Sigma 公司 (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA)。兔抗鼠 Bax、Bcl - 2 抗体购自 Santa 公司 (Santa Cruz, California, USA)。TUNEL 试剂盒购自 Takara 公司 (Jindu, Japan)。粒细胞集落刺激因子 (granulocyte - colony stimulating factor, G - CSF) 购自齐鲁制药有限公司。

2. 方法:(1)动物分组与模型建立:SD 大鼠 240 只随机分为假手术组、模型组、干细胞移植组 (MSC)、重组人粒细胞集落刺激因子组 (G - CSF) 及 MSC + G - CSF 组 ($n = 48$),各组再按术后时间随机分为 12、24、48、72h 亚组 ($n = 12$)。大鼠术前 12h 禁食,自由饮水。用 2.5% 戊巴比妥钠 (0.2ml/100g) 经腹腔内注射麻醉。剪开腹部皮肤暴露股静脉,建立股静脉输液通道,用微量输液泵持续输液 [1ml/(h · 100g)]。通过 2 次腹腔注射 L - 精氨酸 2.0g/kg (浓度 20g/L,间隔 1h) 制作 SAP 模型。MSC 组在造模前 3 天采集自体骨髓间充质干细胞,造模后 6h 经股静脉一次性注入骨髓间充质干细胞悬液 1.2ml, G - CSF 组在造模前 3 天分别皮下注入 G - CSF 液 40 μ g/(kg · d)。假手术组仅腹腔注射等体积生理盐水。(2)自体骨髓干细胞采集和静脉回输:在无菌条件下行股骨穿刺抽取骨髓,立即 1000r/min 离心 10min 后弃上层液体,无菌 PBS 缓冲液离心洗涤 3 次弃上清,细胞沉淀以 PBS 混匀后叠加于 2 倍体积淋巴细胞分离液上 2500r/min 离心 30min,收集骨髓单核细胞层再用 PBS 洗涤 2 次。利用密度梯度离心技术收集骨髓单核细胞,洗涤后铺板培养,根据 MSC 与造血干细胞 (hematopoietic stem cell, HSC) 贴壁性能的差异将两类细胞分离^[1]。将上述骨髓间充质干细胞以约 1ml PBS 液悬浮,备用经股静脉回输。(3)死亡率及肝脏、肾脏病理变化的观察:记录各组的死亡率,直到各组对应的观察时间结束。观察大鼠肝脏和肾脏大体及光镜下的病理改变。(4)肝细胞和肾小管上皮细胞凋亡指数测定:对肝脏和肾小管切片进行 DNA 缺口原位末端标记 (TUNEL) 染色,高倍镜下 ($\times 400$) 观察凋亡细胞的分布,计算凋亡指数 (AI = 视野内的阳性细胞数/视野内总细胞数 $\times 100\%$)。(5)肝细胞和肾小管上皮细胞 Bax、Bcl - 2 蛋白表达检测:采用 SABC 免疫组化染色,具体操作参照试剂盒说明书。结果判定利用图像分析系统分析阳性面积和阳性区域平均灰度值,并将阳性面积和平均灰度值换算成阳性单位 (positive unit, PU),以 PU 值大小定量^[2]。

3. 统计学方法:应用 SPSS 11.5 软件进行统计分析,所有计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,总的比较用 Anova 方差分析,组间比较用 SNK - q 检验,各组间存活率比较用 Fisher 精确概率法,

显著性水准为 $P < 0.05$ 。

结 果

1. 死亡率比较:假手术组大鼠全部存活,模型组 48h、72h 死亡率分别为 8.3% 和 33.3%。MSC 组、G - CSF 组和 MSC + G - CSF 组 48h 前未见死亡,72h 死亡率分别为 8.3%、16.7% 和 8.3%,与模型组比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。

2. 肝脏、肾脏组织病理改变:假手术组大体肝脏、肾脏无明显改变,镜下肝、肾细胞形态大多正常,少量炎性细胞浸润;模型组肝脏 12h 开始色泽晦暗,24h 后多有淤血,可见散在灰色斑块或坏死灶,以肝脏边缘明显;肾脏 12h 开始充血水肿,颜色加深,24h 后可见散在灰色或紫色斑块,随时间延长范围逐渐扩大。光镜下肝脏 12h 可见炎症细胞浸润,肝细胞局灶坏死和点状出血,随时间延长逐渐加重;肾小球 12h 可见肿胀、淤血,肾小管上皮水肿变性,管腔变窄或闭塞,偶见肾小管上皮坏死,肾间质水肿,散在炎症细胞浸润,随时间延长逐渐加重,出现片状或大片状坏死;治疗组各时间点改变较模型组不同程度减轻,以 MSC + G - CSF 组损伤最轻。

3. 肝脏和肾小管 Bax、Bcl - 2 蛋白表达水平的比较:治疗组各时间点 Bax 表达较模型组下调,Bcl - 2 蛋白上调 ($P < 0.05$)。MSC + G - CSF 组 24h 点后 Bax 含量,48h、72h 点 Bcl - 2 含量与 MSC 组和 G - CSF 组比较差异显著 ($P < 0.05$),MSC 组和 G - CSF 组各时间比较无显著差异 ($P > 0.05$) (表 1)。

4. 肝、肾细胞凋亡指数比较:各治疗组 12h/24h 后凋亡指数均较模型组有明显下降 ($P < 0.05$),其中 MSC + G - CSF 组部分时间点与 MSC 组和 G - CSF 组比较差异显著 ($P < 0.05$) (表 2)。

讨 论

骨髓间充质干细胞在特定条件下可随血液循环到达全身其他器官组织,诱导分化为多种组织细胞,参与组织器官的生理更新和病理损伤修复^[3-6]。MSC 可在多种器官的损伤修复中发挥作用,临床上已用于治疗血液系统疾病、心脏衰竭、肝脏损伤、糖尿病。有学者^[3,7,8]开展动物实验证实了 MSC 参与胰腺的生理更新和病理再生,通过移植或动员骨髓 MSC 可减轻胰腺损伤,但多以病理再生修复理论为主。MSC 除具有自我更新修复受损组织器官的特性外,还能通过分泌细胞因子和调节蛋白发挥调节细胞凋亡和抑制炎症反应的作用^[9,10]。

表1 肝脏和肾小管 Bax、Bcl-2 蛋白表达水平的比较($\bar{x} \pm s$) ($n = 12$)

分组	Bax (PU)				Bcl-2 (PU)				
	12h	24h	48h	72h	12h	24h	48h	72h	
假手术组	肝	3.60 ± 0.15*	3.61 ± 0.16*	3.59 ± 0.16*	3.58 ± 0.15*	6.90 ± 0.13*	6.89 ± 0.14*	6.92 ± 0.12*	6.91 ± 0.13*
	肾	1.60 ± 0.05*	1.61 ± 0.06*	1.57 ± 0.06*	1.58 ± 0.07*	1.60 ± 0.03*	1.59 ± 0.02*	1.62 ± 0.06*	1.57 ± 0.03*
模型组	肝	5.89 ± 0.34	6.17 ± 0.40	6.28 ± 0.40	6.33 ± 0.40	5.24 ± 0.26	4.25 ± 0.24	3.94 ± 0.23	3.89 ± 0.24
	肾	12.80 ± 1.78	15.10 ± 1.90	18.20 ± 2.40	20.30 ± 2.40	4.34 ± 1.20	4.01 ± 1.14	3.74 ± 1.11	3.03 ± 1.06
MSC 组	肝	5.68 ± 0.31	5.88 ± 0.35*	5.93 ± 0.36*	6.01 ± 0.34*	5.41 ± 0.28	4.72 ± 0.28*	4.35 ± 0.26*	4.13 ± 0.25*
	肾	9.68 ± 2.11*	12.88 ± 2.35*	15.63 ± 2.46*	17.01 ± 2.54*	5.57 ± 1.35*	5.25 ± 1.28*	4.91 ± 1.20*	4.13 ± 1.05*
G-CSF 组	肝	5.65 ± 0.27	5.85 ± 0.29*	5.95 ± 0.37*	6.00 ± 0.35*	5.38 ± 0.30	4.68 ± 0.26*	4.28 ± 0.31*	4.09 ± 0.21*
	肾	10.05 ± 2.17*	12.85 ± 2.29*	16.23 ± 2.20*	16.81 ± 2.55*	5.49 ± 1.48*	4.93 ± 1.26*	4.88 ± 1.21*	4.19 ± 1.05*
MSC + G-CSF 组	肝	5.63 ± 0.26*	5.60 ± 0.25* [#] △	5.69 ± 0.22* [#] △	5.73 ± 0.27* [#] △	5.49 ± 0.31*	4.90 ± 0.30* [△]	4.61 ± 0.28* [#] △	4.43 ± 0.28* [#] △
	肾	8.33 ± 2.06*	10.90 ± 2.05* [#] △	14.40 ± 2.10* [△]	14.03 ± 2.27* [#] △	6.60 ± 2.11*	6.45 ± 2.00* [△]	6.11 ± 1.58* [#] △	5.63 ± 1.52* [#] △

与模型组比较, * $P < 0.05$; 与 MSC 组比较, [#] $P < 0.05$; 与 G-CSF 组比较, [△] $P < 0.05$

表2 各组肝、肾细胞凋亡指数比较($\bar{x} \pm s$) ($n = 12$)

分组	凋亡指数 (AI)				
	12h	24h	48h	72h	
假手术组	肝	32.2 ± 2.3*	32.1 ± 2.2*	31.8 ± 2.3*	32.1 ± 2.0*
	肾	1.25 ± 0.3*	1.20 ± 0.2*	1.30 ± 0.5*	1.31 ± 0.3*
模型组	肝	93.6 ± 6.3	142.5 ± 8.4	209.8 ± 9.3	226.1 ± 9.5
	肾	12.65 ± 2.3	19.51 ± 3.0	28.83 ± 4.3	35.10 ± 5.5
MSC 组	肝	89.2 ± 6.1	116.4 ± 7.6*	126.8 ± 7.7*	135.5 ± 9.8*
	肾	6.20 ± 1.5*	11.40 ± 2.6*	16.80 ± 2.7*	17.50 ± 2.8*
G-CSF 组	肝	88.7 ± 6.5	120.2 ± 7.8*	127.1 ± 8.2*	133.3 ± 10.2*
	肾	6.41 ± 1.6*	10.82 ± 2.5*	17.23 ± 2.7*	17.14 ± 2.7*
MSC + G-CSF 组	肝	88.5 ± 7.0	112.4 ± 7.5* [△]	107.1 ± 7.0* [#] △	110.3 ± 8.6* [#] △
	肾	5.80 ± 1.5*	8.40 ± 1.8* [#] △	10.10 ± 2.0* [#] △	12.30 ± 2.4* [#] △

与模型组比较, * $P < 0.05$; 与 MSC 组比较, [#] $P < 0.05$; 与 G-CSF 组比较, [△] $P < 0.05$

本研究结果显示 MSC + G-CSF 组大鼠 72h 死亡率较模型组和 G-CSF 组低, 肝脏和肾脏病理损害最轻, 表明 MSC 可能通过减轻肝脏等、肾脏多器官损害降低 SAP 死亡率。同时我们发现 MSC + G-CSF 组能明显降低肝细胞和肾小管上皮细胞凋亡指数, 下调 Bax 并上调 Bcl-2 蛋白, 与凋亡指数变化同步 ($P < 0.05$), 表明 MSC 可能通过调节 Bax 和 Bcl-2 参与了细胞凋亡途径。

MSC 组与 G-CSF 组对 SAP 后的凋亡调控指标无明显差别, 与文献报道一致, 认为骨髓 MSC 移植动员技术途径不同但作用相似。我们认为注射 G-CSF 动员骨髓 MSC 途径的安全性及便捷性高于骨髓移植, 静脉骨髓 MSC 移植应用较少, 技术操作上要求更高, 但可在 SAP 后及时进行注射, 迅速提高外周血 MSC 浓度, 较骨髓动员更具临床治疗意义。通过本研究我们看到了骨髓干细胞对 SAP 肝脏和肾脏损害

保护作用确切, 证明了 MSC 抑制细胞凋亡的特性, 为 MSC 治疗 SAP 提供理论依据。

参考文献

- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284 (5411): 143-147
- 申洪. 免疫组织化学染色定量方法研究 (III) [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 1995, 4(1): 89-92
- Cui HF, Bai ZL. Protective effects of transplanted and mobilized bone marrow stem cells on mice with severe acute pancreatitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(10): 2274-2277
- Meirelles Lda S, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization [J]. *Br J Haematol*, 2003, 123(4): 702-711
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, *et al.* Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo [J]. *Nat Med*, 2000, 6(11): 1229-1234
- Mezey E, Chandross KJ, Harta G, *et al.* Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow [J]. *Science*, 2000, 290(5497): 1779-1782
- 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
- 吴海军, 肖恩华. 骨髓干细胞移植治疗肝脏疾病的若干问题 [J]. *世界华人消化杂志*, 2008, 16(25): 2859-2866
- Rojas M, Xu J, Woods CR, *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 33(2): 145-152
- Gupta N, Su X, Popov B, *et al.* Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice [J]. *J Immunol*, 2007, 179(3): 1855-1863

(收稿: 2011-03-13)