

自体骨髓间充质干细胞移植加动员在重症急性胰腺炎大鼠胰腺保护中的作用

项爱斋 蔡 阳 封光华 陆 贝 单毓强 贾 忠 杨祺俊 方 欣

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胰腺的保护作用。**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,观察胰腺病理改变并评分,测定 Bax 蛋白水平和细胞凋亡指数,检测血清中 TNF- α 、IL-6、AMY、CRP 含量,用方差分析比较各治疗组间的指标差异。**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($P>0.05$);胰腺病理变化较模型组减轻;治疗组各时间点 Bax 蛋白水平和凋亡指数均较模型组增高($P<0.05$), MSC+G-CSF 组 48、72h 凋亡指数及 24、48、72h Bax 蛋白含量与 MSC 和 G-CSF 组比较差异显著($P<0.05$);各治疗组血清 TNF- α 、IL-6、AMY、CRP 含量 24h/48h 后较模型组明显降低($P<0.05$), MSC+G-CSF 组 48h/72h 各指标与 MSC 组和 G-CSF 组比较差异显著($P<0.05$);MSC 组与 G-CSF 组各项指标比较均无显著性差异($P>0.05$)。**结论** 联合自体骨髓 MSC 移植与动员能有效保护重症急性胰腺炎早期大鼠胰腺的损伤,可能与 MSC 的抗炎症及促进胰腺腺泡细胞凋亡等机制有关。

关键词 重症急性胰腺炎 间充质干细胞 移植 胰腺 细胞凋亡

Protective Effects of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplantation and Mobilization on Mouse Pancreatic Acinar Cells in Severe Acute Pancreatitis. Xiang Aizhai, Cai Yang, Feng Guanghua, et al. Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang 310006, China

Abstract **Objective** To observe the protective effects of autologous bone marrow mesenchymal stem cells(MSC) transplantation combined with mobilization on pancreatic cells in rats with severe acute pancreatitis, and explore their mechanisms. **Methods** Totally 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 proteins and apoptosis indexes of pancreas were observed respectively. The contents of serum TNF- α , IL-6, AMY and CRP were simultaneously 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 lesions of pancreas were less than control group. Compared to model group, the pancreatic Bax protein levels and apoptosis indexes of the three treated groups were all significantly higher. Compared with MSC and G-CSF group, the differences of apoptosis indexes at 48h, 72h and Bax protein levels at 24, 48, 72h in MSC+G-CSF were significant($P<0.05$). The serum TNF- α , IL-6, AMY and CRP decreased obviously at 24h/48h of each treated group($P<0.05$). MSC+G-CSF group showed a more significant action to each indexes than MSC group and G-CSF group after 48 h($P<0.05$), but no marked difference was observed between the latter two groups($P>0.05$). **Conclusion** Autologous bone marrow mesenchymal stem cells transplantation combined with mobilization can significantly protect pancreas from severe damage in the early

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普通外科

通讯作者:陆贝,电子信箱:lubei_2000@hotmail.com

progress of severe acute pancreatitis. The probable mechanism is related to anti-inflammatory effect and apoptosis inhibition promotion of MSC.

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

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是常见高危急腹症之一,其早期主要的病理特点是胰腺细胞的凋亡、坏死和全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),可导致多脏器功能衰竭甚至死亡。目前,治疗上仍缺乏特异有效的手段来控制早期炎症级联反应阻止病程的进展。近几年对骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)的研究发现其有组织修复、抗炎和调节细胞凋亡的功能,为SAP早期治疗带来了新希望。本研究拟观察大鼠自体MSC移植和动员对SAP胰腺的保护作用^[1-3]。

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. 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。剪开股部皮肤暴露股静脉,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。

3. 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。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^[4]。

4. 死亡率及胰腺病理变化的观察:记录各组的死亡率,直到各组对应的观察时间结束。观察大鼠胰腺大体及光镜下的

病理改变,主要观察有无水肿、出血、细胞坏死和间质炎症细胞浸润及各自程度,按照 Kusser 方法进行评定,各项分值均为 0~4 分,总分 0~16 分^[5]。

5. 胰腺细胞凋亡指数(apoptosis index, AI)和腺泡细胞 Bax 蛋白测定:对胰腺组织切片进行 DNA 缺口原位末端标记(TUNEL)染色,高倍镜下(400 倍)随机选取 10 个视野,计数 1000 个腺泡细胞中的凋亡细胞数,计算凋亡指数(AI=视野内的阳性细胞数/视野内总细胞数 $\times 100\%$)。Bax 蛋白测定采用 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。

6. 血清 TNF- α 、IL-6、AMS、CRP 水平的检测:在全自动生化分析仪上进行检测,具体操作参照试剂盒说明书。

7. 统计学方法:所有计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,应用 SPSS 11.5 软件进行统计分析,总的比较用 ANOVA 方差分析,组间比较用 SNK- q 检验,显著性水准为 $P<0.05$ 。各组间存活率比较用 Fisher 精确概率法。

结 果

1. 死亡率比较:假手术组大鼠全部存活,模型组 48、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. 胰腺组织病理改变比较:假手术组胰腺大体标本无明显改变,镜下胰腺细胞形态结构大多正常,未见实质出血、坏死和间质炎性细胞浸润。模型组大体 6h 即可见胰腺肿胀,并有散在小出血点和灰黑色坏死灶;光镜下 6h 可见胰腺间质炎性细胞浸润,血管扩张、实质出血,胰腺腺泡细胞和脂肪细胞散在变性、坏死,且随时间延长逐渐加重。MSC 组、G-CSF 组和 MSC+G-CSF 组各时间点病理改变较模型组不同程度减轻,以 MSC+G-CSF 组改变最轻。具体评分见表 1。

3. 胰腺 Bax 蛋白表达水平和凋亡指数(AI)的比较:治疗组各时间点 Bax 蛋白表达水平和 AI 均较模型组上调($P<0.05$)。MSC+G-CSF 组 24、48、72h 点 Bax 蛋白含量,48、72h 点 AI 与 MSC 组、G-CSF 组比较差异显著($P<0.05$)。MSC 组和 G-CSF 组各时间点比较无显著差异($P>0.05$),见表 2、表 3。

表 1 胰腺病理评分比较($\bar{x} \pm s$) ($n = 12$)

组别	病理评分			
	12h	24h	48h	72h
假手术组	0.00 ± 0.00 *	0.95 ± 0.20 *	1.10 ± 0.55 *	1.35 ± 0.45 *
模型组	10.72 ± 1.31	12.08 ± 1.43	12.81 ± 1.50	14.95 ± 1.52
MSC 组	9.04 ± 1.50 *	11.40 ± 1.05 *	11.94 ± 1.21 *	12.53 ± 1.06 *
G - CSF 组	9.20 ± 1.36 *	11.83 ± 1.07 *	12.05 ± 1.15 *	12.84 ± 1.35 *
MSC + G - CSF 组	9.10 ± 0.95 *	10.06 ± 1.04 *	10.83 ± 0.98 * [△]	10.35 ± 1.45 * [△]

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 各组胰腺 Bax 蛋白表达水平的比较($\bar{x} \pm s$) ($n = 12$)

组别	Bax (PU)			
	12h	24h	48h	72h
假手术组	3.07 ± 0.23 *	3.11 ± 0.19 *	2.98 ± 0.26 *	3.10 ± 0.28 *
模型组	10.74 ± 0.43	10.93 ± 0.38	9.64 ± 0.27	7.58 ± 0.65
MSC 组	15.78 ± 1.13 *	13.88 ± 1.35 *	13.07 ± 1.56 *	10.42 ± 1.34 *
G - CSF 组	15.65 ± 2.27 *	13.85 ± 1.79 *	12.95 ± 1.37 *	10.73 ± 1.35 *
MSC + G - CSF 组	15.73 ± 1.45 *	15.60 ± 1.25 * ^{##} [△]	15.69 ± 1.72 * ^{##} [△]	13.73 ± 1.32 * ^{##} [△]

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 3 各组胰腺腺泡细胞凋亡指数比较($\bar{x} \pm s$) ($n = 12$)

组别	凋亡指数(AI)			
	12h	24h	48h	72h
假手术组	0.87 ± 0.13 *	1.08 ± 0.20 *	0.94 ± 0.17 *	0.95 ± 0.17 *
模型组	7.64 ± 1.45	4.71 ± 1.07	3.85 ± 0.81	3.02 ± 0.67
MSC 组	14.82 ± 1.93 *	6.63 ± 1.70 *	5.25 ± 0.98 *	5.07 ± 1.07 *
G - CSF 组	14.11 ± 2.04 *	6.08 ± 1.21 *	5.32 ± 0.72 *	4.89 ± 0.63 *
MSC + G - CSF 组	15.01 ± 1.39 *	6.92 ± 0.73 *	6.69 ± 0.94 * ^{##} [△]	6.33 ± 1.01 * ^{##} [△]

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

4. 各组血清 TNF - α 、IL - 6、AMY、CRP 含量比较:模型组各指标含量于造模 24h 后达到高峰。治疗组各指标含量随时间延长有不同程度下降,24、48h

后与模型组比较差异有显著性($P < 0.05$)。MSC + G - CSF 组 48、72h 上述各指标含量明显低于 MSC 组和 G - CSF 组($P < 0.05$),见表 4。

表 4 血清 TNF - α 、IL - 6、AMY、CRP 含量比较($\bar{x} \pm s$) ($n = 12$)

时间(h)	假手术组	模型组	MSC 组	G - CSF 组	MSC + G - CSF 组
TNF - α (ng/L)	12 45.1 ± 3.8 *	205.4 ± 32.8	205.0 ± 40.1	204.4 ± 38.7	202.8 ± 41.2
	24 48.0 ± 6.0 *	231.3 ± 33.1	210.3 ± 30.6	211.2 ± 32.3	202.5 ± 31.7 *
	48 43.5 ± 4.1 *	247.2 ± 38.3	215.6 ± 32.1 *	216.8 ± 31.3 *	190.3 ± 29.2 * [△]
	72 51.3 ± 6.7 *	237.1 ± 35.5	204.2 ± 31.0 *	207.0 ± 30.4 *	178.7 ± 28.9 * ^{##} [△]
IL - 6 (ng/L)	12 158.7 ± 20.8 *	1224.1 ± 180.6	1105.9 ± 159.0	1101.4 ± 172.1	1080.2 ± 150.0 *
	24 153.5 ± 25.4 *	1408.3 ± 251.1	1224.1 ± 170.6 *	1222.1 ± 175.4 *	1215.3 ± 172.1 *
	48 160.1 ± 21.5 *	1374.5 ± 198.7	1170.3 ± 160.2 *	1198.9 ± 164.3 *	1032.1 ± 150.6 * ^{##} [△]
	72 155.4 ± 20.3 *	1289.2 ± 179.4	995.6 ± 143.7 *	1052.0 ± 155.2 *	861.4 ± 140.9 * ^{##} [△]
AMY (U/L)	12 690.7 ± 101.4 *	3706.9 ± 982.7	3416.1 ± 736.0	3846.7 ± 834.3	3671.0 ± 506.8
	24 701.2 ± 91.8 *	5738.8 ± 887.2	4502.1 ± 954.9	4717.2 ± 760.1	4016.9 ± 485.2 *
	48 687.6 ± 99.3 *	6084.2 ± 1005.8	4102.4 ± 854.7 *	3905.7 ± 683.1 *	3074.3 ± 503.1 * ^{##} [△]
	72 697.3 ± 105.1 *	5436.0 ± 658.3	3436.5 ± 745.9 *	3075.7 ± 654.4 *	2483.8 ± 550.7 * ^{##} [△]
CRP (mg/L)	12 0.95 ± 0.24 *	4.70 ± 2.52	2.93 ± 1.82	3.03 ± 2.05	1.76 ± 0.65 *
	24 1.01 ± 0.31 *	4.85 ± 2.81	3.09 ± 1.91	3.13 ± 2.11	1.85 ± 0.73 *
	48 1.10 ± 0.22 *	5.43 ± 2.74	3.21 ± 2.28 *	3.29 ± 2.02 *	1.90 ± 0.71 * [△]
	72 1.06 ± 0.27 *	5.18 ± 2.69	3.16 ± 1.95 *	3.20 ± 2.06 *	1.71 ± 0.58 * ^{##} [△]

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

讨 论

骨髓间充质干细胞在体内体外均有较强可塑性,在特定条件下可通过血液循环到达其他组织器官,并经微环境诱导分化为不同胚层来源的组织细胞,参与组织器官的生理更新和病理损伤修复。目前,临床上 MSC 已用于血液系统疾病、心脏衰竭、肝脏损伤、糖尿病等多种疾病的治疗,并取得了确切的疗效。MSC 对 SAP 治疗效果的研究主要来自于动物实验,在病理再生修复方面也得到了证实,如江学良等应用核染料标记胰腺炎大鼠自体 MSC 并跟踪测定,在损伤的第 2 周观察到 MSC 归巢至损伤的胰腺组织并部分分化,在损伤后的第 8 周 MSC 转化为成熟的胰腺功能细胞,证实其参与了胰腺细胞的病理再生,在胰腺损伤的后期修复中发挥了重要作用。另有一些研究表明, MSC 还能通过分泌调节蛋白和细胞因子等发挥调节细胞凋亡和抑制炎症反应的作用,而炎症级联反应是 SAP 早期(急性炎症期)最主要的病生理过程,从而推断 MSC 可能成为 SAP 早期一个新的特异有效的治疗手段^[6,7]。

本研究通过皮下注射 G-CSF 动员 SAP 大鼠的自体骨髓 MSC,以及直接静脉移植两种方式,了解各自的治疗疗效,同时比较联合与单独治疗的差异。结果显示治疗组中的 MSC + G-CSF 组大鼠 72h 死亡率较模型组和 G-CSF 组低,胰腺病理损害最轻,提示 MSC 有助于减轻 SAP 病情,降低死亡率。同时我们发现治疗组能明显上调胰腺腺泡细胞 Bax 蛋白表达($P < 0.05$),且与凋亡指数变化正相关,表明 MSC 可能通过调节 Bax 蛋白的表达在 SAP 早期诱导胰腺腺泡细胞凋亡。细胞凋亡不释放炎症介质,与细胞坏死不同,对胰腺组织是一种保护作用。Lugea 等^[8]研究发现抑制胰腺腺泡细胞凋亡后,坏死细胞明显增多,胰腺炎的严重程度加重,从反面也证实了凋亡在胰腺炎中对胰腺腺泡细胞的保护作用。3 个治疗组 48、72h 血清中 TNF- α 、IL-6、AMY、CRP 含量均下降,而 TNF- α 已有研究证实是 SAP 的始动因子,IL-6 参与 SAP 的多脏器功能损害,说明 MSC 可通过抑制 SAP 早期的炎症级联反应,减轻胰腺和胰外组织细胞的损伤。

MSC 组与 G-CSF 组对 SAP 的凋亡调控及炎症抑制指标无明显差别,与文献报道一致。我们认为骨髓 MSC 移植和动员技术途径不同但作用相似,G-CSF 也有促进骨髓 MSC 增殖的效果,与 Wexler 的研究一致,但动员后外周血 MSC 含量是否和静脉移植

一样稳定未进一步评估,且动员所需的时间偏长,在本实验中给予提前 3 天给药,有一定的局限性。静脉骨髓 MSC 移植技术操作上要求更高,优点是在 SAP 后可以及时注射,迅速提高并稳定外周血 MSC 浓度,节省动员等待期,在 SAP 早期即可发挥治疗作用,较骨髓动员更具临床治疗意义。另外,我们发现联合治疗组的实验结果优于单独治疗组,推测联合治疗不仅有利于促进 MSC 量的表达,甚至还可能与 G-CSF 同时动员其他类型干细胞有关。有研究显示,骨髓中存在 CD34⁺ 的原始造血干细胞,具有更强大的自我更新和分化潜能,可能是 HSC、MSC 和 EPC 的共同谱系祖先,在一定微环境下可以转化为组织细胞^[9]。通过本研究我们看到了骨髓干细胞对 SAP 胰腺损害保护作用确切,在 SAP 早期可提高胰腺细胞的凋亡及减少炎症介质的释放,以及其他研究中证实的病理再生修复特性,使 MSC 极有可能成为治疗 SAP 的新希望。

参考文献

- 1 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
- 2 Scolding N, Marks D, Rice C. Autologous mesenchymal bone marrow stem cells: practical considerations[J]. J Neurol Sci, 2008, 265(1-2):111-115
- 3 Omary MB, Lugea A, Lowe AW, *et al.* The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases[J]. J Clin Invest, 2007, 117(1):50-59
- 4 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. Science, 1999, 284(5411):143-147
- 5 Kusser AM, Rongione AJ, Ashley SW, *et al.* Interleukin-10 prevents death in lethal necrotizing pancreatitis in mice [J]. Surgery, 1999, 120: 284
- 6 Fortunato F, Bürgers H, Bergmann F, *et al.* Impaired autolysosome formation correlates with Lamp-2 depletion: role of apoptosis, autophagy, and necrosis in pancreatitis[J]. Gastroenterology, 2009, 137: 350-360, 360.e1-360.e5
- 7 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
- 8 Lugea A, Nan L, French SW, *et al.* Pancreas recovery following cerulein-induced pancreatitis is impaired in plasminogen-deficient mice[J]. Gastroenterology, 2006, 131: 885-899
- 9 姚巍,王凤芝.骨髓间充质细胞静脉移植联合自体骨髓干细胞动员对心脏病心力衰竭大鼠心功能的影响[J].中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(29): 5645-5648

(收稿:2011-12-31)