

骨髓干细胞移植加动员在重症急性胰腺炎大鼠小肠黏膜细胞凋亡中的调节作用

蔡 阳 陆 贝 项爱斋

摘 要 **目的** 探讨骨髓间充质干细胞对重症急性胰腺炎大鼠肠黏膜细胞凋亡的保护机制。**方法** 240 只 SAP 大鼠分为对照组、SAP 组、干细胞组、动员组及联合组,各组再平分术后 12、24、48、72h 组。干细胞动员组用 G-CSF 液动员 3 天,干细胞组一次性静脉注射 MSC 液,联合组动员加注射 MSC。记录大鼠的病死率,肠黏膜上皮细胞的 Chiu 评分,凋亡蛋白 Bax、Bcl-2 基因水平,细胞凋亡指数 AI,比较联合治疗效果。**结果** 各组 72h 病死率差异不显著($P > 0.05$);治疗组肠黏膜上皮损伤程度较轻,联合组 48h 后 Chiu 病理评分与单独治疗组比较差异显著($P < 0.05$);治疗组 AI 及 Bax 蛋白水平随时间延长较 SAP 组下调,Bcl-2 蛋白水平上调,联合组与干细胞组、动员组比较差异显著($P < 0.05$),而动员组与干细胞组之间并无显著差异($P > 0.05$)。**结论** MSC 静脉移植与动员能抑制肠黏膜上皮细胞过度凋亡,维持肠黏膜屏障完整性,能有效减轻重症急性胰腺炎小肠黏膜的损伤,联合治疗效果优于单独治疗。

关键词 重症急性胰腺炎 间充质干细胞 移植 细胞凋亡 小肠

Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplantation Combined with Mobilization on Cell Apoptosis of Intestinal Mucosa in Rats with Severe Acute Pancreatitis. Cai Yang, Lu Bei, Xiang Aizhai. Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang 310006, China

Abstract **Objective** To discuss the protective mechanism of MSCs transplantation and mobilization in acute intestinal mucosa injury with SAP. **Methods** Totally 240 SAP rats were randomly divided into comparing group, SAP group, MSC group, mobilization group and combination group. Rats in each group were subdivided into 12h, 24h, 48h and 72h groups. Rats in mobilization group were injected G-CSF 40 μ g/kg for 3 days, in MSC group were injected 1.2ml MSC, in combination group both were injected MSC and G-CSF. The mortality rate, Chiu pathological scores, levels of Bax, Bcl-2 proteins and apoptosis indexes of intestinal mucosa epithelium cells were recorded. The difference of each group was compared. **Results** The mortality rate of each group showed no difference at 72h ($P > 0.05$). The pathological injuries of treat groups were relieved. Chiu scores in combination group at 48h was different from single groups. The apoptosis indexes and Bax protein level in treated groups were lower than those in SAP group. Bcl-2 protein level was also higher. The difference between combination treatment group and single treatment group was obvious ($P < 0.05$), but no difference between two single treat groups was found ($P > 0.05$). **Conclusion** MSC transplantation and mobilization can inhibit cell apoptosis, maintain intestinal mucosa epithelium cells barrier. Combination group is superior than single groups.

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

肠黏膜屏障受损是重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)常见的胰外器官损伤,是引发全身炎症反应综合征和多脏器功能衰竭的关键环节。研究证实 SAP 大鼠肠黏膜上皮细胞过度凋亡会导致肠黏膜屏障受损,肠道细菌易位诱发二次打击。本研究拟观察大鼠 MSC 静脉移植和动员对肠黏膜细胞凋亡的调节及肠道屏障的保护作用。

材料与方法

1. 实验动物:选用 SD 大鼠,浙江大学实验动物中心提供,

体重 269.5 ~ 330.4g。大鼠术前禁食 12h,不禁水。

2. 实验试剂与材料:戊巴比妥钠(pentobarbitalum natrium)和 L-精氨酸(L-Arginine),USA Sigma-Aldrich 提供;粒细胞集落刺激因子(granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF)齐鲁制药有限公司提供;抗鼠 Bax、Bcl-2 抗体 USA Santa 提供;TUNEL 凋亡检测试剂盒 Japan Takara 提供。

3. 实验分组与模型制备:240 只大鼠按随机数字表法平均进入 5 组,分别为:(1)对照组:腹腔两次注射与其他组等体积量生理盐水。(2)SAP 组:腹腔注射 2.5% 戊巴比妥钠 0.2ml/100g 麻醉成功后,腹腔注射 20g/L 的 L-精氨酸 2.0g/kg,1 次/小时,共 2 次。(3)干细胞组:SAP 后 6h 自股静脉注入 MSC 液 1.2ml。(4)动员组:术前皮下注射 G-CSF 液 3 天,每天 40 μ g/(kg·d)。(5)联合组:兼使用 MSC 和 G-CSF 液。各组再进入

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

随机数数字表,按 SAP 后 12、24、48、72h 平均分为 4 组,12 只/组。

4. 骨髓干细胞采集:经股骨穿刺抽取骨髓液,1000r/min 离心 10min 后弃上清,PBS 液洗涤 3 次弃上清,加淋巴细胞分离液 2500r/min 离心 30min,利用密度梯度离心技术收集单核细胞层,洗涤 2 次后铺板培养,利用 MSC 与 HSC 贴壁性能差异将两类细胞分离^[1]。

5. 观察指标及方法:(1)病死率:记录各亚组对应观察时间点大鼠的病死率(死亡数/总数×100%)。(2)末端回肠病理变化的观察:72h 后处死大鼠,解剖观察大鼠回肠大体及镜下的病理改变,按 Chiu 标准进行病理评分:0 分:正常黏膜;1 分:绒毛顶端上皮间隙增大;2 分:上皮层和固有层中度分离;3 分:绒毛向两侧倒伏伴有顶端绒毛成块脱落;4 分:上皮完全脱落,固有层暴露;5 分:固有层破坏、出血及溃疡。评分总和为小肠病理评分^[2]。(3)肠黏膜上皮细胞凋亡蛋白表达检测:对肠黏膜上皮细胞进行 SABC 染色,计算阳性面积和平均灰度值,换算成阳性单位 PU 定量 Bax、Bcl-2 蛋白表达水平^[3]。(4)肠黏膜上皮细胞凋亡指数测定:对末端回肠切片进行 TUNEL 染色,400 倍镜下随机取 10 个视野,观察凋亡细

胞数,凋亡指数 AI = 阳性细胞数/总细胞数。

6. 统计学方法:应用 SPSS 13.0 软件进行方差分析,组间比较用 *q* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 病死率:对照组大鼠未见死亡,SAP 组大鼠 72h 共死亡 4 只,病死率为 33.3% (4/12),干细胞组 72h 死亡 1 只(1/12)、动员组 72h 死亡 2 只(2/12),联合组 72h 死亡 1 只(1/12)。各治疗组间及与 SAP 组比较无显著差异。

2. 肠黏膜病理改变及 Chiu 评分:对照组大体小肠组织无炎症征象,镜下肠黏膜上皮细胞排列整齐,完整平滑;SAP 组肠黏膜上皮细胞变性坏死,部分脱落以至固有层裸露,绒毛排列紊乱及脱落,毛细血管扩张充血,并随时间推移逐渐加重;治疗组肠黏膜上皮损伤程度较轻,联合组 48h 后病理评分与单独治疗组比较差异显著(表 1)。

表 1 肠黏膜上皮病理评分比较($\bar{x} \pm s$)

组别	Chiu 评分			
	12h	24h	48h	72h
对照组	1.30 ± 0.32 *	1.21 ± 0.24 *	1.30 ± 0.50 *	1.31 ± 0.35 *
SAP 组	4.72 ± 4.31	4.50 ± 4.40	4.81 ± 4.80	4.13 ± 5.52
干细胞组	2.44 ± 3.50 *	2.42 ± 4.01 *	2.84 ± 4.32 *	2.93 ± 4.81 *
动员组	2.20 ± 3.63 *	2.83 ± 4.24 *	3.05 ± 4.15 *	3.06 ± 4.76 *
联合组	1.80 ± 3.55 *	1.81 ± 3.82 * [△]	2.03 ± 4.08 * ^{##△}	2.05 ± 4.45 * ^{##△}

与对照组比较,**P* < 0.05;与干细胞组比较,[#]*P* < 0.05;与动员组比较,[△]*P* < 0.05

3. 肠黏膜上皮细胞 Bax、Bcl-2 凋亡蛋白:各治疗组随时间延长 Bax 水平较 SAP 组下调,Bcl-2 水

平上调,干细胞组和动员组间比较无显著差异(表 2)。

表 2 肠黏膜上皮细胞 Bax、Bcl-2 比较

组别	Bax				Bcl-2			
	12h	24h	48h	72h	12h	24h	48h	72h
对照组	3.55 ± 1.05 *	3.61 ± 1.06 *	3.57 ± 1.06 *	3.58 ± 1.07 *	5.60 ± 1.03 *	5.59 ± 1.02 *	5.62 ± 1.06 *	5.57 ± 1.03 *
SAP 组	51.80 ± 14.78	58.10 ± 15.90	65.25 ± 21.40	70.30 ± 23.40	42.34 ± 12.20	32.01 ± 10.14	25.74 ± 9.11	20.03 ± 8.06
干细胞组	38.68 ± 9.11 *	43.08 ± 13.35 *	51.63 ± 13.46 *	57.01 ± 15.54 *	50.57 ± 14.35 *	41.25 ± 13.28 *	35.71 ± 10.20 *	29.13 ± 9.55 *
动员组	40.05 ± 9.17 *	45.85 ± 13.29 *	53.24 ± 14.20 *	56.81 ± 15.05 *	52.49 ± 15.48 *	43.93 ± 12.76 *	33.88 ± 10.51 *	28.59 ± 10.23 *
联合组	32.13 ± 8.06 * [△]	36.90 ± 10.05 * [△]	41.40 ± 12.10 * ^{##△}	45.03 ± 12.27 * ^{##△}	56.60 ± 15.11 *	49.45 ± 14.30 * [#]	43.94 ± 13.28 * ^{##△}	37.63 ± 11.52 * ^{##△}

与对照组比较,**P* < 0.05;与干细胞组比较,[#]*P* < 0.05;与动员组比较,[△]*P* < 0.05

4. 肠黏膜上皮 AI 比较:各治疗组凋亡指数与 SAP 组比较有不同程度下降,联合组 24h 后与单独治疗组比较有差异,干细胞组和动员组间比较无显著差异(表 3)。

讨 论

外源性 MSC 能够随血液循环到达肠道,主要定

植于肠黏膜隐窝的结肠上皮祖细胞定居的部位,损伤和炎症均能引导 MSC 向该部位迁移^[4,5]。目前研究认为 SAP 的高致死率主要由肠黏膜屏障受损使肠道细菌和内毒素易位,导致 SAP 继发胰周及全身感染所致。而肠道屏障完整性的维持依赖于肠黏膜上皮细胞增殖和凋亡的动态平衡,感染、缺血再灌注损伤

表 3 肠黏膜上皮细胞 AI 比较

组别	AI			
	12h	24h	48h	72h
对照组	3.25 ± 0.30 *	3.20 ± 0.25 *	3.30 ± 0.50 *	3.31 ± 0.36 *
SAP 组	28.65 ± 7.32	33.51 ± 9.06	39.83 ± 10.32	45.10 ± 12.51
干细胞组	10.20 ± 2.51 *	25.44 ± 7.61 *	30.80 ± 8.72 *	35.50 ± 9.85 *
动员组	9.41 ± 2.60 *	24.82 ± 6.55 *	31.23 ± 9.76 *	36.14 ± 9.73 *
联合组	8.80 ± 3.53 *	16.40 ± 4.80 * #△	21.12 ± 5.05 * #△	26.30 ± 6.40 * #△

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与干细胞组比较, # $P < 0.05$; 与动员组比较, △ $P < 0.05$

等因素都会引发凋亡上调,伴有促凋亡基因 Bax 的高表达和凋亡抑制基因 Bcl-2 低表达。MSC 对肠黏膜的保护作用可能通过组织细胞增殖修复,调控细胞凋亡和抑制炎症反应实现的^[6]。

本实验通过 2 次腹腔注射 L-精氨酸 2.0g/kg 制备 SAP 模型,经股静脉注入自体 MSC 液 1.2ml,或术前 3 天皮下注射 G-CSF 液 40μg/(kg·d),对比研究了干细胞注射与干细胞动员的作用。结果显示 SAP 组大鼠小肠黏膜上皮细胞病理评分明显高于对照组和各治疗组,Bax 蛋白水平明显高于治疗组,Bcl-2 水平低于治疗组,细胞凋亡指数呈现同趋势变化,说明骨髓间充质干细胞能有效减轻 SAP 术后肠黏膜的病理损伤,抑制正常细胞凋亡反应,为证明骨髓间充质干细胞发挥抗凋亡作用提供有效的依据。但注射治疗组与动员治疗组之间各项数据比较显示不同方法的抗凋亡作用无明显差别。同时本实验设计了联合应用干细胞注射及动员的方法,结果显示联合组大鼠小肠 Chiu 评分最低,凋亡调节作用最为显著,联合治疗组的疗效较单独治疗组理想。因国内外文献无相关报道,故笔者推测一方面可能和 MSC 的剂量效应作用有关,另一方面也可能与造血干细胞的

促协同及免疫调节作用有关,有待进一步深入探讨。本实验证实了 MSC 对肠黏膜上皮细胞的凋亡调节作用,能有效减轻 SAP 导致肠黏膜屏障的损害。

参考文献

1 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science,1999,284(5411): 143-147

2 Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, *et al.* Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal[J]. Arch Surg,1970,101(4):478-483

3 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

4 韩钦, 何东南, 刘艳宁, 等. FFIK-1* 间充质干细胞和 SP 细胞参与肠道损伤修复的比较[J]. 基础医学与临床, 2008,28(6):563-569

5 Brown SL, Riehl TE, Walker MR, *et al.* Myd88-dependent positioning of Ptg2-expressing stromal cells maintains colonic epithelial proliferation during injury[J]. J Clin Invest, 2007,117(1):258-269

6 Hagiwala M, Shen B, Chao L, *et al.* Kallikrein-modified mesenchymal stem cell implantation provides enhanced protection against acute isehemie kidney injury by inhibiting apoptosis and inflammation[J]. Hum Gene Ther, 2008,19(8):807-819

(收稿:2011-11-20)

SDF-1/CXCR4 的表达与喉癌组织 VEGF-C 表达、淋巴管生成及预后的相关性

王莹 李文媛 梁金花 丁利 赵斯达

摘要 目的 探讨趋化因子 SDF-1 及其受体 CXCR4 在喉癌组织中的表达与喉癌中 VEGF-C 表达、淋巴管生成及预后的相关性。**方法** 应用免疫组化法检测 SDF-1、CXCR4 和 VEGF-C 在 45 例喉癌和 20 例声带息肉组织中的表达,应用 5'-核

基金项目:黑龙江省卫生厅科研基金资助项目(2010243);黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划项目(1152G050)

作者单位:157011 牡丹江医学院解剖教研室(王莹、李文媛、丁利、赵斯达);牡丹江医学院红旗医院检验科(梁金花)

通讯作者:李文媛,电子邮箱:yuanyuan19800413@163.com