

MSC 移植治疗 SAP 大鼠失败的原因探讨

张喜平 封光华 蔡 阳 陈 力 孟立峰 吴志伟 刘达人 贾 忠 陆 贝

摘 要 **目的** 研究 MSC 移植治疗 SAP 大鼠的效果,探讨治疗失败的原因。**方法** 将雄性 SD 大鼠随机分成 5 组:假手术组(SO 组)、重症急性胰腺炎组(SAP 组)、地塞米松治疗组(D 组)、干细胞治疗组(M 组)和干细胞 + G - CSF 治疗组(MC 组)。上述各组再随机分为 6、24 小时组,各治疗组分别给予地塞米松注射液、干细胞或干细胞 + G - CSF 进行治疗,于造模或剖腹探查术后 6、24 小时后分别采取血清、腹腔积液和肝、肺、胰和肾脏组织标本,记录大鼠的病死率,检测血清中肝、肾功能指标和淀粉酶的含量,测定腹腔积液量/体重比值,观察大鼠多脏器病理改变,并进行病理评分。**结果** (1)6 和 24 小时各组大鼠存活率的比较:SO 组 24 小时点存活率明显大于 SAP 组和各个治疗组(P 均 <0.05);D 组 24 小时点存活率明显大于 SAP 组($P < 0.05$),其余组无明显差异($P > 0.05$)。(2)各组 6 小时点多项指标检测结果的比较:D 组胰腺评分、腹腔积液与体重比值、肝肾功能指标、淀粉酶含量明显大于 SO 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。(3)24 小时点 D 组大鼠的胰腺病理评分明显大于 SO 组($P < 0.05$)。(4)M 组及 MC 组大鼠的胰腺组织内均可见荧光染料清晰显影。**结论** 地塞米松能明显降低 SAP 大鼠病死率,疗效优于 M 组及 MC 组。M 组和 MC 组大鼠的存活率、胰腺病理评分,腹腔积液与体重比值和肝肾功能指标,淀粉酶含量与 SAP 组比较,均无明显差别。MSC 收集和培养过程复杂,需要较长的时间才能产生出治疗效果,而采用 MSC 治疗 SAP 需要一定的起效时间,假如贸然用于急、重症疾病的治疗缺乏现实意义和足够的理论支持。因此,我们认为 MSC 难以成为治疗 SAP 的新手段。

关键词 重症急性胰腺炎 大鼠 间充质干细胞 移植 多脏器 地塞米松

Reasons of Failure for MSC Transplantation Treatment to SAP Rats. Zhang Xiping, Feng Guanghua, Cai Yang, et al. Department of Tumor Surgery, Zhejiang Cancer Hospital, Zhejiang 310022, China

Abstract Objective To study the effects of MSC on SAP rats and discuss reasons of the failure. **Methods** We divided rats into 5 groups: sham operation group (SO group), group with severe acute pancreatitis (SAP group), dexamethasone treated group (D group), Mesenchymal stem cells treated group (M group) and mesenchymal stem cells + G - CSF treated group (MC group). The groups above were again divided into 6 - hour and 24 - hour groups according to the molding or laparotomy time. All the treated groups were given dexamethasone injection, stem cells or stem cells + G - CSF, respectively. The mortality rate was recorded. The changes of indexes of liver function and renal function as well as content of amylase in blood serum were detected. Ascites volume/weight ratio was determined and pathological changes and pathological scores of multiple organs were observed and recorded at 6 and 24 hours after operation.

Results (1) Comparison of 6 - hour and 24 - hour survival rate of all groups: 24 - hour survival rate of SO group was significantly higher than that in SAP group and all treated groups ($P < 0.05$); the survival rate at 24 - hour in D group was significantly higher than that of SAP group ($P < 0.05$), but there was no significant difference among other groups ($P > 0.05$). (2) Comparison of the detection results of all groups at 6 - hour point: the pathological score of pancreas, ascites volume/weight ratio, indexes of liver and renal function and content of amylase in D group and SAP group at 6 - hour were significantly higher than those of SO group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). (3) The pathological score of pancreas in D group at 24 - hour was significantly higher than that of SO group ($P < 0.05$). (4) The fluorescence dye for staining pancreas tissues was seen clearly in M group and MC group. **Conclusion** Dexamethasone can significantly decrease the mortality of SAP rats, its curative effect is better than that of M group and MC group. Considering the survival rate, pathological score of pancreas, ascites volume/weight ratio, indexes of liver and renal function as well as content of amylase of rats in M group and MC group have no significant benefit compared to those of SAP group. The MSC collection and training process is complicated. It need take a long time to produce the effect of treatment. To treat SAP with MSC requires the onset time. If we adventure to treat acute or severe diseases with MSC, this method is lack of realistic and sufficient theoretical support. We guess that MSC is less likely to be developed into a new

基金项目:浙江省中医药科技计划项目(2009CB057)

作者单位:310022 杭州,浙江省肿瘤医院肿瘤外科(张喜平);310006 杭州市第一人民医院普外科(封光华、蔡阳、贾忠、陆贝);310009 浙江大学医学院附属第二医院普外科(陈力、孟立峰、吴志伟、刘达人)

通讯作者:张喜平,电子邮箱:zxp99688@sina.com

strategy to treat SAP.

Key words Severe acute pancreatitis; Rats; Mesenchymal stem cells; Transplantation; Multiple organs; Dexamethasone

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是临床上常见的急腹症之一,起病急、进展快、病死率高,并发症多。SAP 初期是一种全身炎症综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)的过程,最终可导致多器官功能衰竭(multiple organ failure, MOF)^[1-3]。干细胞是一类具有自我更新和分化潜能的细胞,包括胚胎干细胞和成体干细胞。成体干细胞存在于已分化的组织器官中,是一群尚未分化的、具有不对称性自我更新能力的细胞,在特定环境下能分化为各种组织细胞类型,维持正常生理更新和修复器官损伤。骨髓来源的成体干细胞分为骨髓造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSC)和骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)^[4,5]。最新研究显示 MSC 具有抗炎作用,并对 SAP 实验动物具有保护作用。Jung 等^[6]将人的 MSC(hcMSCs)通过尾静脉注射到急性胰腺炎大鼠体内,在轻症急性胰腺炎(mild acute pancreatitis, MAP)和 SAP 大鼠的胰腺组织内检测到了比对照组更多的 hcMSCs,同时发现胰腺退化、水肿、炎性细胞浸润情况均减低,炎性细胞因子下降。认为 hcMSCs 能抑制急性胰腺炎模型大鼠炎症反应、减轻胰腺损害。Cui 等^[7]通过移植 MSC 或注射粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)的方法治疗 SAP 实验动物,结果发现治疗组 48 和 72h 测得的血淀粉酶水平明显低于对照组,治疗组胰腺损伤程度亦轻于对照组,提示 MSC 有助于减轻 SAP 的病情。

目前, MSC 治疗 SAP 的研究仅仅处于实验的初级阶段,它在 SAP 早期治疗过程中发挥作用的机制不明确,上述研究还有一定的局限性。虽然有的研究得出了一些的阳性结果,但缺乏对 MSC 治疗 SAP 的量效、时效关系研究。现有的多数实验报道主要集中在证实 MSC 确实在 SAP 动物实验中分化成了胰腺干细胞,起到了修复损伤的胰腺组织的作用,但 MSC 对多脏器损害的影响研究极少。地塞米松是临床上常用于治疗 SAP 的常用药物,本实验采用地塞米松做阳性对照,所用剂量是我们以往研究中常用的有效剂量(0.5mg/100g 体重)^[8,9]。遗憾的是,我们的实验结果证实, MSC 移植治疗 SAP 并没有起到积极的作用,结果是失败的。本研究将对失败原因进行了分析,希望同行们进行相关实验时引以为戒。

材料与方法

1. 材料:取清洁级、健康雄性 SD 大鼠 100 只,体重 210 ~ 250g,购自于浙江中医药大学实验动物中心。牛磺胆酸钠、戊巴比妥钠购自美国 Sigma 公司;地塞米松购自新昌制药有限公司(浙江)。淀粉酶和肝肾功能检测试剂购自希森美康生物科技有限公司(江苏)。荧光染料(bisBenzimide Hoechst 33258)购自美国 Sigma 公司,瑞白针(重组人粒细胞集落刺激因子)购自齐鲁制药有限公司(山东),100 微克/支。

2. 实验动物分组:本实验在浙江省中医学实验动物中心完成。将大鼠随机分为 5 组:假手术组(SO 组)、重症急性胰腺炎(SAP 组)、地塞米松治疗组(D 组)、干细胞治疗组(M 组)、干细胞 + G-CSF 治疗组(MC 组)。上述各组再随机分为 6、24 小时组,SO 组 6 小时点 8 只、24 小时点 10 只;SAP 组 6 小时点 8 只、24 小时点 24 只;D 组 6 小时点 8 只、24 小时点 10 只;M 和 MC 组 24 小时点均为 16 只,由于实验费用不足, M 和 MC 组没有设立 6 小时点组。

3. SAP 模型的建立和药物、干细胞的使用方法: SAP 模型建立方法参考我们前期报道(图 1)^[8,9]。制备模型成功后 15min, D 组经尾静脉一次性注入地塞米松注射液(0.5mg/100g 体重)。涉及干细胞的两个治疗组的实验时间与前几组有所不同,造模术前 72h 两个治疗组的大鼠均经尾静脉一次性注入用核素标记的 1ml 移植细胞悬液, 72h 后制备 SAP 大鼠模型。干细胞 + G-CSF 治疗组除了注入相同剂量的移植干细胞悬液以外,另外再注入 G-CSF 40μg/(kg·d),共 3 天,此剂量参考文献[10]有报道。于术后 6、24h 后取血清、腹腔积液和肝、肺、胰和肾脏组织标本进行 HE 染色和多脏器病理评分。检测肝肾功能指标和血淀粉酶的含量,测定腹腔积液量/体重比值,观察多脏器病理变化,记录死亡率。



图 1 SAP 模型制备

4. 血液指标的检测和病理变化的观察:在术后相应时间点取材,观察多脏器病理变化,记录腹腔积液量,在全自动生化分析仪上检测血清淀粉酶、肝肾功能指标含量,利用第一作者发表在国外杂志的相关病理评分标准,进行多脏器病理评分^[11,12]。

5. 骨髓的采集、分离、标记、回输: MSC 来源于清洁级、雄

性 SD 大鼠的骨髓,由浙江大学医学院附属第二医院刘达人博士赠送。按照有关要求对骨髓的采集、分离、标记、回输。参照 Piltenger 法,即利用密度梯度离心技术,收集位于培养基和悬浮液界面上的骨髓单个核细胞,洗涤后铺板培养。根据 MSC 和 MSC 贴壁性能的差异,将两类细胞分离(图 2)。将待标记的 MSC 加入 Hoechst33258 储存液,使其终浓度为 10ng/ml,5% 饱和湿度的 CO₂ 数箱中孵育 15min,然后用 PBS 洗涤 5 次,充分洗去未掺入的染料。反复用预冷的 D-Hank's 液离心淘洗细胞,再以 D-Hank's 液悬浮细胞,并调整细胞密度为 10⁸/L。将上述原代骨髓间充质干细胞经尾静脉注射,移植给

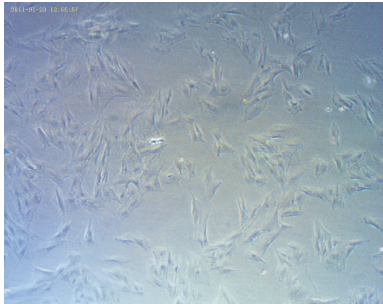


图 2 培养后的骨髓 MSC(×20)

表 1 各组 6 小时点多项指标检测结果的比较

分组	肺组织 评分	肾组织 评分	胰腺评分	肝脏评分	腹腔积液与 体重比值	GPT (U/L)	GOT (U/L)	BUN (mmol/L)	CREA (μmol/L)	AMYL (U/L)
NC 组	1.0(1.0)	1.0(1.0)	0.5(1.0)	1.0(1.0)	0.003(0.008)	37(32)	371(716)	8.12(4.08)	24(5)	1579(346)
SAP 组	1.5(1.5)	1.0(0.0)	4.5(3.0)**	1.0(2.0)	0.0563(0.043)**	170(495)**	1356(4166)*	13.24(8.91)**	37(18)**	16798(6603)**
D 组	1.5(1.0)	1.0(1.0)	3.0(6.0)**	1.0(0.0)	0.034(0.017)**	96(137)**	995(980)**	16.23(7.81)**	30(27)*	6074(11269)**

与 NC 组比较,**P*<0.05,***P*<0.01

3. SO 组和 D 组 24 小时点多项指标检测结果的比较:D 组胰腺病理评分大于 SO 组(*P*>0.05),详见表 2。

表 2 24 小时点病理评分,腹腔积液与体重比值结果比较

分组	肺组织 评分	肾组织 评分	胰腺 评分	肝脏 评分	腹腔积液与 体重比值
NC	1.0(1.5)	1.0(0.0)	1.0(2.0)	1.0(1.0)	0.003(0.010)
D	1.8(0.5)	1.0(0.0)	3.5(3.0)*	1.0(1.0)	0.058(0.025)

与 NC 组比较,**P*<0.05

4. 涉及干细胞治疗组的胰腺免疫荧光染色:各组胰腺组织内均可见荧光染料清晰显影(图 3)。

5. 各组大体病理变化:假手术组:各时间点胰腺呈浅黄色,胰腺、胰周脂肪、网膜无明显异常;肝脏、肺、肾脏颜色、形态正常。(1)胰腺:6 小时组(SAP 组及各治疗组):胰腺出现出血、坏死、水肿较明显,腹腔积液为淡血性。D 组的胰腺病理损害程度较 SAP

相应组别的大鼠。MSC 治疗后各组大鼠胰腺组织在激光共聚焦显微镜下扫描,采用免疫荧光染色方法检测样本的荧光标记,如果组织显示荧光,则证实干细胞已经迁移到胰腺组织。

6. 统计学方法:计量资料用 *M*(*Rang*)表示,组间比较用秩和检验,存活率比较用 *Fisher's* 精确概率法。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1.6 和 24 小时点各组大鼠存活率的比较:SO 组 6、24 小时点大鼠全部存活。SAP 组 6 小时点大鼠全部存活,24 小时点全部死亡。D 组 6 小时点大鼠全部存活,24 小时点存活 4 只。M 组 24 小时点存活 3 只;MC 组 24 小时点大鼠存活 2 只。SO 组 24 小时点存活率明显大于 SAP 组和各个治疗组(*P*均<0.05),D 组 24 小时点存活率明显大于 SAP 组(*P*<0.05)。其余组无明显差异(*P*>0.05)。

2. 各组 6 小时点多项指标检测结果的比较:D 组胰腺评分、腹腔积液与体重比值、肝肾功能指标、淀粉酶含量明显大于 SO 组(*P*<0.05 或 *P*<0.01),详见表 1。

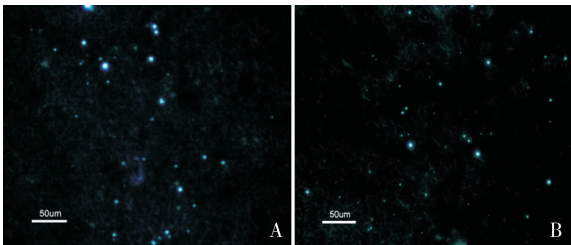


图 3 胰腺组织荧光染色

A. M 组-24 小时,胰腺组织荧光染色显示阳性;B. MC 组-24 小时,胰腺组织荧光染色显示阳性

组减轻,但是其他治疗组和 SAP 组无明显差别。24 小时组(治疗组):胰腺出血、坏死、水肿程度加重,多数胰腺组织呈胶冻状改变,胰周可见较多皂化斑,腹腔积液为血性。D 组病变比其他治疗组轻。(2)肺脏:6 小时组(SAP 组及各治疗组):肺叶出现充血水肿,局部可见暗红色的细小出血点,胸腔内有少量淡黄色稀薄的渗出液。但是 D 组病变比其他组轻。24

小时组(治疗组):肺脏表面可见小片状紫红色斑块,胸腔内渗出液增加,呈淡血性。但是D组病变比其他治疗组轻。(3)肝脏:6小时组(SAP组及各治疗组):肝脏颜色较为混浊,各组病变无明显差别。24小时组(治疗组):肝脏颜色更加混浊、灰暗,呈现淤血改变,局部可见散在形态不规则的灰色斑块。各个治疗组间比较无明显差别。(4)肾脏:6小时组(SAP组及各治疗组):肾脏肿胀,少部分可见散在出血点。各组无明显差别。24小时组(治疗组):肾包膜紧张,肾脏颜色变暗,呈缺血改变,可见散在出血点。各治疗组之间无明显差别。

6. 各组光镜下病理变化:(1)胰腺:假手术组:各时间点大部分大鼠胰腺组织正常,少数大鼠胰腺组织出现局灶性水肿及少量的炎症细胞浸润。SAP组及各治疗组:可见胰腺小叶间或腺泡间水肿,腺泡坏死,伴有出血和炎症细胞浸润,24小时组胰腺组织出血和坏死表现更加明显。D组的病变较相应时间段的各组大鼠轻,如间质水肿程度变轻,炎症细胞浸润减少,红细胞渗出减少,可见少量小灶性出血、坏死,仅少数出现片状出血、坏死,但是出血、坏死范围缩小。其余组之间无明显差别。见图4A、B。(2)肺脏:假手术组:各时间点大部分大鼠的肺组织间质可见慢性

炎细胞浸润,少部分大鼠无异常。SAP组及各治疗组:各组均有部分大鼠肺间质内可见炎症细胞浸润,间隔增厚。少部分可见出血、肺泡间隔增厚、毛细血管扩张和淤血。上述病变在24小时点最重,D组病变比其他组稍轻,其余组无明显差别。见图4C~E。(3)肾脏:假手术组:各时点组织基本正常。少数出现肾小管上皮细胞肿胀,肾间质水肿,管腔狭窄。极少数出现肾小球细胞增生。SAP组及各治疗组:绝大部分标本存在肾小球毛细血管淤血,肾间质水肿伴炎症细胞的浸润。肾小管上皮细胞肿胀管腔狭窄,管腔内可见蛋白管型。肾小管上皮细胞坏死程度及范围随着时间的延长而加重,24小时点最明显。但是上述病变在各组间无明显差别。见图4F、G。(4)肝脏:假手术组:肝小叶结构完整,偶见汇管区内炎症细胞浸润,肝细胞形态大多正常。少数标本局部肝细胞可见轻度肿胀、肝细胞嗜酸性变,肝窦狭窄。部分有库普弗细胞增生。SAP组及各治疗组:肝脏细胞肿胀明显,肝小叶内肝细胞索因较多的肝细胞灶性坏死导致完整性破坏而引起塌陷,局部肝窦变窄或消失,可见局灶性或片状坏死,坏死灶内可见炎症细胞浸润,部分肝窦可见明显淤血;上述病变在24小时点最明显,但是各组间病变无明显差别,详见图4H~J。

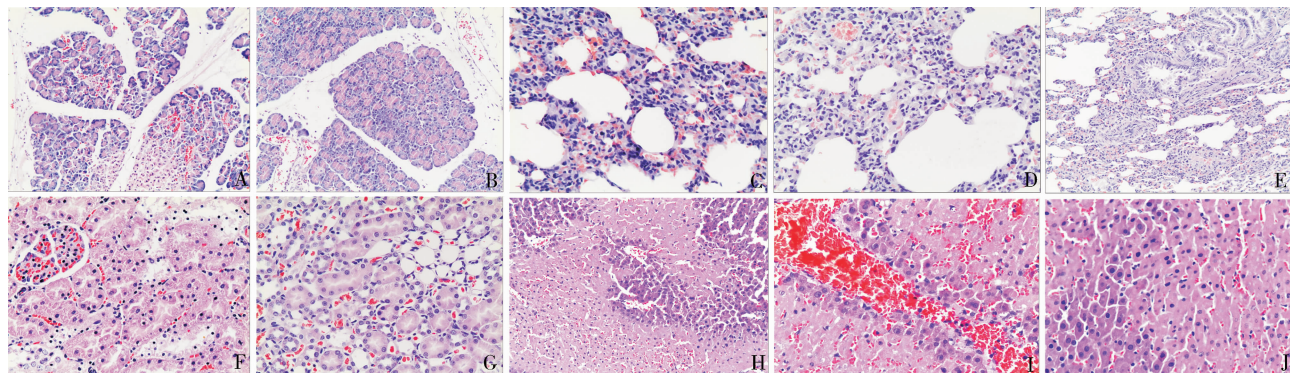


图4 各组光镜下病理变化

A. SAP组-6小时,胰腺(HE, ×200) 胰腺组织水肿,少量炎症和坏死;B. D组-6小时,胰腺(HE, ×200) 胰腺组织水肿,少量炎症细胞浸润;C. SAP组-6小时,肺脏(HE, ×200), 肺泡间隔增厚,明显充血和多量炎症细胞浸润;D. M组-6小时,肺脏(HE, ×200), 肺泡间隔增厚,伴有充血和少量炎症细胞浸润;E. D组-6小时,肺脏(HE, ×100), 部分肺泡隔增厚,伴少量炎症细胞浸润;F. SAP组-6小时,肾脏(HE, ×200) 肾小管上皮细胞坏死严重;G. D组-6小时,肾脏(HE, ×200), 肾组织结构清楚,有少量肾小管变性;H. SAP组-6小时,肝脏(HE, ×100), 大部分肝组织坏死;I. M组-6小时,肝脏(HE, ×200), 大部分肝组织坏死;J. D组-6小时,肝脏(HE, ×200), 肝细胞坏死

讨 论

江学良等^[10]应用核素染料标记MSC并跟踪测定,证实自体MSC可参与胰腺的生理更新和病理再生,特别是在胰腺损伤修复中发挥了重要作用。还有研究发现,MSC到达局部组织后,通过细胞的变形作用迁移出血管,定位于损伤组织,并能够促进新生血

管的生成,从而促进组织细胞的增殖^[13]。刘锐等^[14]研究通过移植MSC的方法治疗L-精氨酸诱导的SAP实验动物,结果发现治疗组48h和72h的血淀粉酶水平明显低于模型组,病理检查结果显示治疗组胰腺损伤程度亦轻于模型组,提示骨髓间充质干细胞有助于减轻SAP病情。王建祥等^[15]采用雨蛙素联合脂

多糖造成大鼠 SAP 模型,经静脉移植体外扩增培养并用 Hoechst33258 标记的异体大鼠的 MSC,检测损伤后不同时间段大鼠血浆中的 TNF- α 、IL-6 的水平变化,以及胰腺和肺组织病理变化,同时观察标记的 MSC 在胰腺、肺脏和肝脏中的分布情况。结果发现与对照组相比,MSC 能降低治疗组大鼠血浆中各个时间点的 TNF- α 、IL-6 的水平,同时降低肺湿/干重比值,减轻胰腺和肺脏炎性损伤,认为 MSC 移植对 SAP 大鼠具有保护作用。综上所述,上述研究显示 MSC 移植对 SAP 实验动物多脏器具有保护作用,但是,我们的研究得出了相反结论。

地塞米松(dexamethasone)为长效类糖皮质激素,能抑制多种原因造成的炎症反应,临床上地塞米松对 SAP 的治疗有一定效果^[16]。对地塞米松治疗 SAP 的实验研究也大多定位在它对炎症介质的抑制作用上^[17]。本研究证实地塞米松能明显降低 SAP 大鼠死亡率,改善胰腺和肺脏病变,也证明了它对 SAP 有良好疗效。本实验发现 MSC 移植并不能降低 SAP 大鼠的死亡率,缓解大鼠多脏器的病理改变,不能改善肝肾功能,也不能降低淀粉酶的含量,没有起到治疗 SAP 的作用,与目前文献报道不同。我们认为主要原因有以下几点:

首先,SAP 发病急、进展快,而 MSC 移植治疗某一种疾病需要一段时间,这是我们必须面对的实际问题。目前,文献报道最多的是 MSC 移植治疗慢性疾病,如血液系统疾病、心脏病、肝脏损伤、糖尿病等,并取得了较好的疗效。我们认为尽管有一些文献报道对 MSC 移植治疗 SAP 持肯定态度,但是,理论上还是有难以解决的问题,制约着 MSC 移植治疗的效果。最主要的是 MSC 起效的时间较长,如用于治疗 SAP,可能没等起效,SAP 个体已经产生了不可逆病理损害。因此,本实验的阴性结果是可以解释的。至于其他文献为何证实 MSC 移植治疗 AP 或 SAP 有较好效果,我们无法进行验证。

其次,本实验成败的关键主要有两个,一个是模型诱导是否成功,另外一个为地塞米松和 MSC 使用剂量和时机。第一,笔者在采用 L-精氨酸诱导 SAP 大鼠模型时,参考的是江学良的一篇文献报道,但是,经过很多次尝试,没有诱导出一只合格的 SAP 模型。最后改为笔者最为熟悉的 3.5% 牛磺胆酸钠逆行胰胆管内注射,诱导出的 SAP 模型全部成功。笔者深知用牛磺胆酸钠诱导的模型要比 L-精氨酸重,存活时间更短,这种情况制约着我们实验结果的可信度。

笔者反复分析过 L-精氨酸造模失败的原因,但是一直没有找到答案,希望同行们能给予提示。第二,地塞米松给药剂量和时机均是按照笔者以往的实验报道,这方面笔者拥有非常成熟的实验经验,MSC 使用剂量和时机均是参考江学良的一篇文献报道。尽管笔者的实验结果和国内外文献报道不符,但是笔者最终选择了面对现实,实事求是,将实验结果如实地公布于众。

第三,由于实验经费短缺,导致笔者使用的大鼠数目偏少,在一定程度上影响了对实验结果的判断。但是由于统计学方法合理,实验结果是可信的。如果有更多经费支持,我们计划将 MSC 用于 AP 大鼠的治疗,而非 SAP,因为 AP 大鼠存活时间更长,能够给 MSC 更多的起效时间。

综上所述,笔者认为,MSC 治疗 SAP 虽然有一些潜在优势,但是应用到临床上的前景非常渺茫,应当谨慎从事,不要浪费大量人力和实验经费去做无意义的尝试。

参考文献

- 1 Di Fabio F, Abu HM, Johnson CD. Acute pancreatitis: mild, severe or potentially fatal[J]. *Pancreatology*, 2011, 11(4):373-375
- 2 Zhang XP, Zhang J, Ma ML, *et al.* Pathological changes at early stage of multiple organ injury in a rat model of severe acute pancreatitis[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2010, 9(1):83-87
- 3 Zhang XP, Zhang L, Yang P, *et al.* Protective effects of baicalin and octreotide on multiple organ injury in severe acute pancreatitis[J]. *Dig Dis Sci*, 2008, 53(2):581-591
- 4 Gonzalez MA, Bernad A. Characteristics of adult stem cells[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 741:103-120
- 5 Xue M, Wang ZD, Dong L. Mesenchymal stem cells as salvage therapy for steroid resistant acute graft-versus-host disease following haploidentical hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 2011, 32(12):878-880
- 6 Jung KH, Song SU, Yi T, *et al.* Human bone marrow-derived clonal mesenchymal stem cells inhibit inflammation and reduce acute pancreatitis in rats[J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(3):998-1008
- 7 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
- 8 Zhang XP, Zhang L, Xu HM, *et al.* Application of tissue microarrays to study the influence of Dexamethasone on NF- κ B expression of pancreas in rat with severe acute pancreatitis[J]. *Dig Dis Sci*, 2008, 53(2):571-580
- 9 Zhang XP, Xu HM, Jiang YY, Y *et al.* Influence of Dexamethasone on mesenteric lymph node of rats with severe acute pancreatitis[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(22):3511-3517
- 10 江学良,李兆申,崔慧斐. MSC 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
- 11 Zhang XP, Wang C, Wu DJ, *et al.* Protective effects of ligustrazine,

- kakonein and Panax notoginsenosides on multiple organs in rats with severe acute pancreatitis [J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2010, 32(9):631-644
- 12 Ou JM, Zhang XP, Wu CJ, *et al*. Effects of dexamethasone and Salvia miltiorrhiza on multiple organs in rats with severe acute pancreatitis [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2012, 13(11):919-931
- 13 Alison MR, Lovell MJ, Direkze NC, *et al*. Stem cell plasticity and tumour formation [J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42(9):1247-1256
- 14 刘锐, 刘洪斌, 石钊, 等. 骨髓间充质干细胞对慢性胰腺炎胰腺损伤修复的价值 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2010, 19(9):1163-1164
- 15 王建祥, 王平, 吴海龙, 等. 骨髓间充质干细胞在大鼠重症急性胰腺炎中的作用 [J]. *中国生化药物杂志*, 2010, 31(6):381-382
- 16 Xiping Z, Jun F, Jie Z, *et al*. Influence of dexamethasone on the expression levels of P-selectin protein in multiple organs of rats with severe acute pancreatitis [J]. *Inflamm Res*, 2010, 59(1):31-39
- 17 盛闽, 黄鹤光. 骨髓间充质干细胞对急性胰腺炎与肺损伤作用机制的研究 [J]. *武警医学*, 2011, 22(10):903-906
- (收稿日期:2013-07-09)
- (修回日期:2013-08-22)

三黄抗氧化方抑制乳腺癌 MCF-7 细胞氧化应激与增殖的实验研究

张晓清 卞卫和 李琳 姚昶 任晓梅 应语 郭檬檬 曹东阳 陈灵

摘要 目的 探查三黄抗氧化方抑制乳腺癌 MCF-7 细胞氧化应激与增殖的疗效。**方法** 将实验分为空白组:MCF-7 细胞培养;实验组按黄芪、制大黄、片姜黄比例分:实验组 1:1:1:1,实验组 2:3:1:1,实验组 3:6:1:1;氧化应激组:以过氧化氢模拟细胞氧化应激状态;乙酰谷氨酸液(NAC)还原组:氧化应激组中加入 NAC 还原应激反应;免疫荧光法评价其抗 MCF-7 细胞产生反应性氧化物疗效及 ELISA 法评价氧化应激后细胞培养液中 VEGF 含量;同时 MTT 法评价三黄抗氧化方抑制 MCF-7 细胞的增殖率。**结果** 实验组 2 抗氧化氧化应激结果优于其他两组,并显著降低细胞培养液中 VEGF 水平;同时各实验组 MCF-7 细胞增殖率得到显著抑制并呈现明显的浓度依耐性,相对空白组,实验组 1~3 在 8mg/ml 浓度下分别抑制 MCF-7 细胞增殖率达 57%、67% 及 56%,实验组 2 的 MCF-7 细胞增殖抑制率显著高于实验组 1 与 3,有统计学差异($P < 0.01$)。**结论** 三黄抗氧化方抑制 MCF-7 细胞氧化应激同时抑制其增殖率,并降低氧化应激引起的 VEGF 表达。

关键词 三黄抗氧化方 乳腺癌 MCF-7 细胞 氧化应激

Experimental Rresearch of Effects of Anti-oxidative Stress of Breast Cancer MCF-7 Cells and the Mechanism with Traditional Chinese Decoction of Sanhuangkang Oxide. Zhang Xiaqing, Bian Weihe, Li lin, *et al*. Department of Breast diseases, Jiangsu Province Hospital of TCM, Jiangsu 210000, China

Abstract Objective To explore the effects of anti-oxidative stress and suppressing proliferation rate of breast cancer MCF-7 cells with traditional Chinese decoction of Sanhuangkang Oxide. **Methods** Blank group with only MCF-7 cells culture, 3 experimental groups of experimental group1 with the ratios of Hangqi; Zhidahuang; Jianghuang to 1:1:1, followed by 3:1:1 and 6:1:1 for experimental group2 and 3, oxidative group with hydrogen peroxide stimulation and deoxidation group with NAC interfered were established for the research. The efficiency of suppressing reactive oxide produced from MCF-7 cells was measured by immunofluorescence technique. The VEGF level was measured in the super fluid of cell culture with ELISA experiment. The cell proliferative rate of Sanhuangkang oxide was measured by MMT. **Results** The group 2 was superior to other two groups in the aspect of anti-oxidative stress and reducing the VEGF level in the super fluid of cell culture. Compared with control group, the groups could significantly suppress the proliferation rate of MCF-7 cells, which depended on concentrations. The proliferation rate of groups were 57%, 67% and 56%, respectively in the concentration of 8mg/ml. Significant differences gotten from the experimental group 2 with the highly inhibition of MCF-7 cells proliferation of p value less than 0.01. **Conclusion** Traditional Chinese decoction of Sanhuangkang Oxide have the ability to inhibition of MCF-7 cells proliferation, reducing the oxidative stress, followed by down regulating the secretion of VEGF.

Key words Sanhuangkang oxide decoction; Breast cancer; MCF-7 cells; Oxidative stress

基金项目:江苏省中医药领军人才基金资助项目(LJ2009002)

作者单位:210000 南京,江苏省中医院乳腺科(张晓清、卞卫和、李琳、姚昶、任晓梅、应语);南京中医药大学硕士研究生(郭檬檬、曹东阳、陈灵)

通讯作者:姚昶,主任中医师,博士生导师,电子信箱:yaochang67@126.com