

骨髓间充质干细胞移植治疗小鼠内毒素血症的实验研究

吴远帆,周静,毕立清,黄敏,韩艺,张倩,朱东梅,周苏明*

(南京医科大学第一附属医院老年医学科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:明确骨髓间充质干细胞(MSCs)对内毒素血症小鼠的治疗作用。方法:动物分为4组:对照组、内毒素血症组、间充质干细胞治疗组、间充质干细胞组。分别在內毒素脂多糖(LPS)注射24h和7d后观察小鼠心功能的变化,ELISA方法检测血清细胞因子的水平,组织学方法观察对心肌、肝脏、肺脏和肾脏形态学改变的影响。结果:与对照组小鼠相比,内毒素血症组经LPS刺激后血清白介素 1β (IL- 1β)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)含量增高,间充质干细胞治疗组血清IL- 1β 和TNF- α 含量明显降低;内毒素血症组小鼠心功能明显下降,间充质干细胞治疗组心功能明显恢复;内毒素血症小鼠心肌细胞和肝细胞凋亡增加,肺间质和肺泡水肿,间充质干细胞治疗组上述组织损伤明显改善。结论:MSCs移植抑制了内毒素血症小鼠的炎症反应,改善了心功能,减轻了对心脏、肝脏和肺脏的损害。

[关键词] 骨髓间充质干细胞;内毒素血症;脓毒血症;组织器官损伤

[中图分类号] R515.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)07-921-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140713

Effects of bone marrow mesenchymal stem cell therapy on mice with endotoxemia

Wu Yuanfan, Zhou Jing, Bi Liqing, Huang Min, Han Yi, Zhang Qian, Zhu Dongmei, Zhou Suming*

(Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the effects of bone marrow mesenchymal stem cells on mice with endotoxemia. **Methods:** Mice were divided into the following groups: the control group, the endotoxemia group (the LPS group), the mesenchymal stem cell treatment group (the LPS+MSCs group) and the mesenchymal stem cell group (the MSCs group). The cardiac function of mice was respectively observed at 24 hours and day 7 after LPS administration. ELISA was performed to detect the level of cytokines in the serum, and histological examinations were performed to detect morphological changes of the cardiac muscle, liver, lung and kidney. **Results:** Compared to the control group, serum IL- 1β and TNF- α were increased in the mice of the LPS group, and MSCs treatment decreased serum IL- 1β and TNF- α obviously. The cardiac function of the LPS group mice deteriorated, which was rescued by MSCs treatment. Apoptosis of cardiomyocytes and hepatocytes in the mice of the LPS group was increased. Edema was observed in the pulmonary interstitium and alveolus, and ameliorated by MSCs treatment. **Conclusion:** MSCs inhibit the inflammatory reaction of mice with endotoxemia, improves the cardiac function and reduces the damage of the heart, liver and lung.

[Key words] bone marrow mesenchymal stem cells; endotoxemia; sepsis; tissue and organ injury

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(07): 921-925]

脓毒血症严重威胁患者的生命,是美国ICU患者死亡的第2位因素^[1],既往的治疗方法包括外科手术、应用抗生素和支持治疗,但其治疗的效果尚不明显。脓毒血症易导致多器官功能衰竭综合征,其发生的重要原因是免疫系统的异常激活^[2],表现为

固有免疫系统的激活,适应性免疫的抑制,线粒体功能障碍,伴有胰岛素抵抗的高代谢状态,毛细血管通透性增加导致组织水肿,从而产生异常激活的炎症反应,造成组织器官的损害和功能障碍。

因为炎症反应在脓毒血症的发生中占有重要作用,学者们尝试采用炎症因子受体的单克隆抗体治疗脓毒血症^[3],但脓毒血症是多种炎症因子的相互作用,单克隆抗体由于作用单一而效果有限^[4]。能否寻找更有效的方法抑制异常激活的炎症反应呢?间

[基金项目] 江苏省科技厅基础研究计划(BK20131449)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: zhoumco@aliyun.com

充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是来源于中胚层的多能干细胞,学者们发现其对免疫系统有广泛的抑制作用,因此设想利用它治疗脓毒血症,并已取得了一定的效果。由于脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏染色阴性细菌主要的致病因子,因此采用注射 LPS 制作内毒素血症动物模型模拟脓毒血症是常用的方法。本实验制作内毒素血症小鼠模型,采用骨髓间充质干细胞移植治疗内毒素血症并观察其治疗效果,将为临床开展 MSCs 移植治疗脓毒血症提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

C57BL/6 小鼠(南京医科大学实验动物中心), DMEM 培养基(Gibco 公司,美国),胎牛血清(FBS, Hyclone 公司,美国),脂多糖(Sigma 公司,美国), TUNEL 凋亡试剂盒及细胞因子 ELISA 检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 MSCs 的培养和鉴定

取 8 周龄 C57BL/6 小鼠颈椎脱臼处死,75%酒精浸泡消毒 15 min。无菌条件下取出双侧股骨干,用 5 ml 无菌注射器以磷酸盐缓冲液(PBS) 10 ml 冲洗骨髓腔,冲洗干净后弃股骨干,将冲出的骨髓吹打混匀。1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,以含 10% FBS 的高糖 DMEM 重悬,接种于 10 cm 培养皿中,置于 37℃,5%CO₂ 培养箱中。4 d 后首次换液,以后隔日换液。待细胞 80%融合时 1:2 传代,取第 3 代细胞使用。同时将第 3 代 MSCs 分别向成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞诱导培养,采用碱性磷酸酶染色、番红 O 染色和油红 O 染色鉴定细胞。

1.2.2 MSCs 治疗小鼠内毒素血症

预先配制 LPS 浓度为 0.5 mg/ml,干细胞浓度为 2×10^6 个/ml。选用 8~10 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,体重在 25 g 左右。实验分为 4 组,每组 10 只小鼠。对照组(Control 组):腹腔注射 PBS 0.5 ml,1 h 后尾静脉注射 PBS 0.5 ml。内毒素血症组(LPS 组):腹腔注射 LPS 10 mg/kg,1 h 后尾静脉注射 PBS 0.5 ml。骨髓 MSCs 治疗组(LPS+MSCs 组):腹腔注射 LPS 10 mg/kg,1 h 后尾静脉注射 1×10^6 个骨髓 MSCs。骨髓间充质干细胞组(MSCs 组):腹腔注射磷酸盐缓冲液 0.5 ml,1 h 后尾静脉注射 1×10^6 个骨髓 MSCs。小鼠在饲养过程中未发现死亡,分别在 LPS 注射 24 h 和 7 d 后各处死 5 只小鼠,取相关器官组

织进行检测。

1.2.3 对心脏影响的观察

采用二维超声心动图记录小鼠心功能的变化,同时取心肌组织,采用 TUNEL 法检测组织切片中心肌细胞的凋亡,400 倍光镜下随机选取 10 个视野计算凋亡细胞数目。

1.2.4 对肺脏影响的观察

取小鼠肺脏组织,甲醛固定后常规石蜡切片,HE 染色后进行组织学评分^[5]。评分标准如下:①每个高倍镜下炎性细胞数目(<5 个:0 分;6~10 个:1 分;11~15 个:2 分;16~20 个:3 分;>20 个:4 分);②肺间质水肿(无,0 分;轻到中度,1 分;严重,2 分);③肺水肿(<5%肺泡水肿:0 分;5%~25%肺泡水肿:1 分;>25%肺泡水肿:2 分);④肺泡完整性(正常:0 分;不正常:1 分)。将各项评分相加后作为肺脏组织学评分的总分。

1.2.5 对肝脏影响的观察

取肝脏组织,采用 TUNEL 法检测组织切片中凋亡的肝细胞,400 倍光镜下随机选取 10 个视野计算凋亡细胞数目。

1.2.6 对肾脏影响的观察

肾脏组织甲醛固定后常规石蜡切片,HE 染色后 200 倍光镜下随机选取 10 个视野进行评分,从肾小管坏死、间质性水肿、刷状缘消失、管型形成等方面进行评分^[6],无:-0 分,有:-1 分,显著:-2 分,将各项评分相加后作为组织学评分的总分。

1.2.7 血清炎症因子的检测

在 24 h 和 7 d 分离获取各组小鼠血清,采用 ELISA 法检测血清中 IL-1 β 和 TNF- α 的含量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理,所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐性比较采用通用的 *F* 检验,数据均采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间比较采用 LSD 法, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MSCs 的培养和鉴定

MSCs 形态为梭形或多角形,适应能力强,贴壁率高,体外增殖旺盛,生长特征稳定。经诱导培养后可分别向成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞分化(图1)。

2.2 血清中炎症因子的变化

LPS 组 24 h 和 7 d 后 IL-1 β 和 TNF- α 水平升高,MSCs 治疗后明显下降。MSCs 组炎症因子与对

照组相比均无明显变化(图 2)。

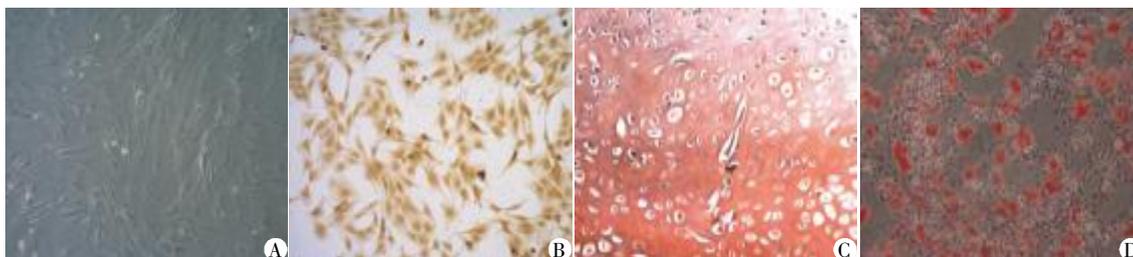
2.3 对心脏的影响

射血分数(ejection fraction,EF)水平 LPS 组 24 h 和 7 d 均明显下降, MSCs 治疗后均有不同程度的恢复,但仍低于正常对照组。缩短分数(fractional

shortening,FS)与此类似,LPS 组 24 h 和 7 d 也明显下降, MSCs 治疗后有不同程度的恢复,但仍低于正常对照组(图 3)。

2.4 心肌细胞和肝脏细胞的凋亡

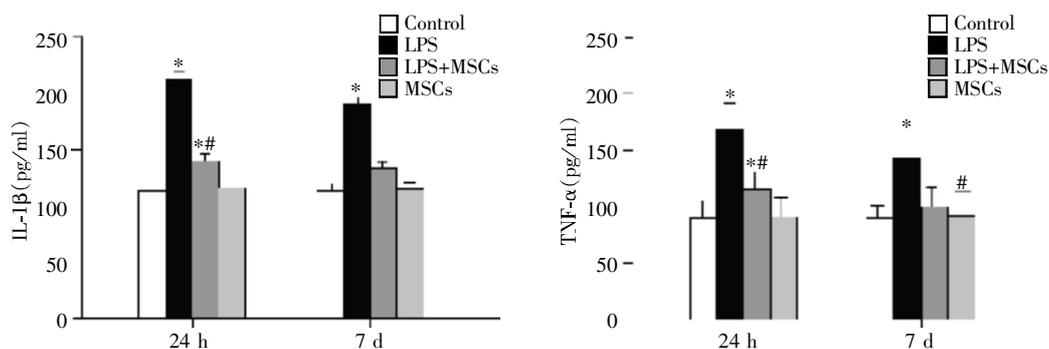
LPS 组心肌细胞的凋亡在 24 h 和 7 d 均明显高



A:培养至第3代 MSCs;B:诱导向成骨细胞分化;C:诱导向软骨细胞分化;D:诱导向脂肪细胞分化。

图 1 MSCs 生长及诱导图像($\times 100$)

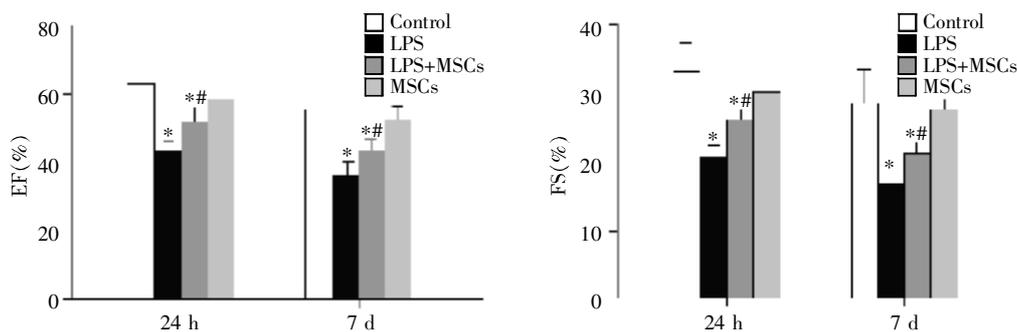
Figure 1 Growth and induction culture of mesenchymal stem cells($\times 100$)



与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, # $P < 0.05$ 。

图 2 LPS 注射后各组血清炎症因子的变化

Figure 2 Changes of serum inflammatory cytokine levels after LPS injection in each group



与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, # $P < 0.05$ 。

图 3 LPS 注射后各组心功能变化

Figure 3 Changes of cardiac function after LPS injection in each group

于对照组,经 MSCs 治疗后明显下降。7 d 后各组心肌细胞的凋亡较 24 h 有明显下降,值得注意的是单纯 MSCs 组心肌细胞的凋亡也有所增加。LPS 组肝脏细胞的凋亡在 24 h 和 7 d 均明显高于对照组,经 MSCs 治疗后明显下降。7 d 后各组心肌细胞的凋亡较 24 h 有明显下降,与心肌细胞类似,单纯 MSCs

组 24 h 时肝脏细胞的凋亡也有所增加,但 7 d 后与对照组无明显差别(图 4)。

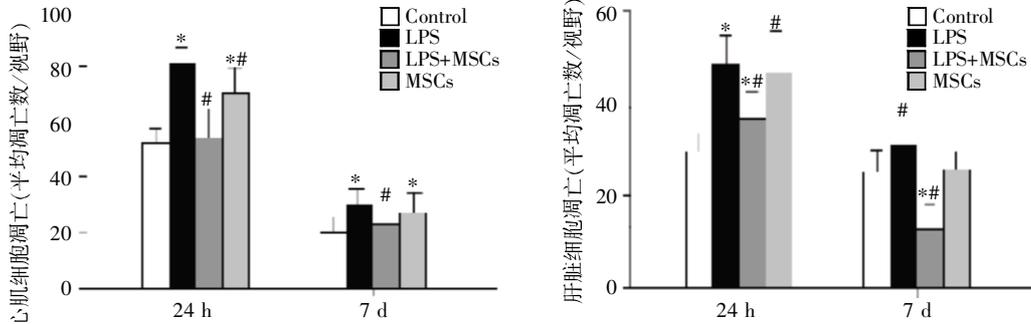
2.5 肺、肾组织评分

LPS 组在 24 h 和 7 d 时表现为肺间质和肺泡水肿,炎性细胞增加,组织学评分明显高于对照组,经 MSCs 治疗后组织学评分明显下降,但仍高于正常

对照组。LPS 组在 24 h 时表现为肾间质水肿,组织学评分高于对照组,经 MSCs 治疗后组织学评分虽有降低,但无统计学差异。7 d 时各组间无明显统计

学差异(图 5)。

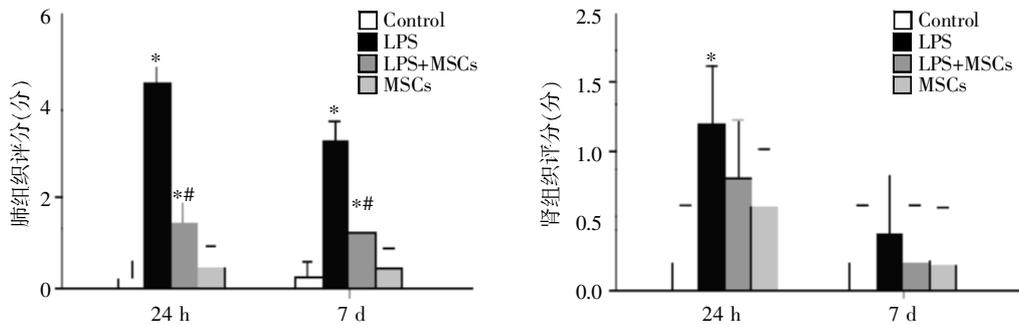
3 讨论



与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, * $P < 0.05$ 。

图 4 LPS 注射后各组心肌细胞和肝脏细胞凋亡的变化

Figure 4 Changes of the apoptosis of myocardial cells and hepatocytes after LPS injection in each group



与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, * $P < 0.05$ 。

图 5 LPS 注射后各组肺组织学和肾组织学评分的变化

Figure 5 Changes of the histological scores of the lung and renal after LPS injection in each group

脓毒血症早期往往过度表达细胞因子,因此此前治疗的观察期多在 1~3 d 以内,但临床上脓毒血症的病程长, MSCs 治疗的中长期效果尚不明确。本文采用 MSCs 治疗内毒素血症小鼠,既观察造模早期干细胞对内毒素血症小鼠器官功能和免疫系统的影响,又观察 7 d 后干细胞治疗的效果。本实验结果也表明,小鼠注射 LPS 后血清炎症因子的水平上升,心功能明显下降,心肌细胞和肝细胞的凋亡增加,肺脏组织水肿,且 7 d 组与 24 h 组比较,小鼠的炎症水平和器官损害已有所恢复。

由于炎症因子在脓毒血症中发挥了重要作用,因此学者们提出寻找能够诊断和预测疾病预后的生物标记物,并针对这些炎症因子进行干预,从而提高脓毒血症治疗的疗效^[7]。在其作用途径的研究中,学者们发现 LPS 激活固有免疫系统主要通过 Toll 样受体-4 (Toll like receptor-4, TLR-4) 途径,因此学者们设想采用 TLR-4 的拮抗剂治疗脓毒血症,阻断 LPS 对免疫系统的激活。但遗憾的是,最近一项大型

三期临床试验表明采用 TLR-4 的拮抗剂 eritoran 治疗后并未减少严重脓毒血症患者的病死率^[8]。上述设想失败的原因之一是 TLR-4 途径并非 LPS 对人体作用的唯一途径,不依赖 TLR-4 途径的 caspase-11 通路在 LPS 导致细胞凋亡等方面也发挥重要作用^[9]。因此,由于脓毒血症时伴有免疫系统多方面的激活,针对单一因素的治疗方法难以对脓毒血症发挥有效的治疗作用。

大量的研究已经证实, MSCs 对固有免疫系统和适应性免疫系统具有抑制作用^[10-11]。因此学者们设想采用 MSCs 抑制脓毒血症时异常激活的免疫反应,减轻对组织器官的损害, Weil 等^[12]采用 MSCs 治疗脂多糖注射后的大鼠 6 h 后,心功能改善,血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 明显下降。由于脓毒血症的病史较长,为进一步观察 MSCs 对脓毒血症的治疗作用,在 LPS 注射后 24 h 和 7 d 分别观察对组织器官损害的影响。结果表明 MSCs 对内毒素血症小鼠有明显的治疗作用,治疗后心功能有不同程度的恢复,心

肌细胞和肝细胞的凋亡减少,肺水肿明显减轻。

本研究发现 MSCs 治疗后血清中炎症因子的含量下降,这说明 MSCs 可能通过抑制炎症反应减轻了对组织器官的损害。Xu 等^[13]发现在内毒素血症小鼠肺中应用 MSCs,可以减轻全身炎症反应和肺损伤,将脓毒血症小鼠的肺细胞与 MSCs 共培养, MSCs 抑制了肺细胞分泌炎症因子。Yagi 等^[14]也发现 LPS 注射后的大鼠血清内 TNF- α 水平明显上升,而 MSCs 治疗脓毒血症大鼠后,通过激活 NF- κ B 途径分泌可溶性肿瘤坏死因子受体 1 (soluble tumor necrosis factor receptor 1, sTNFR1),对抗了 LPS 引起的炎症反应。这说明 MSCs 通过对免疫系统的抑制减轻了脓毒血症时的器官损害。

尽管 MSCs 在动物体内显示了治疗脓毒血症的前景,但距离临床应用还需要漫长的过程。首先动物体内应用的 MSCs 数量远高于目前在临床研究中应用的数量(小鼠应用的细胞数量多为 $2.5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个,而小鼠体重约为 25~30 g)。其次脓毒血症的患者免疫系统异常激活发生在疾病早期,疾病后期多伴随的是免疫系统的抑制。目前实验中 MSCs 在脓毒血症早期应用(数小时或数天)可通过抑制异常激活的免疫系统发挥作用,但临床工作时很难在这个时间段应用 MSCs,若在疾病后期应用 MSCs 可能使免疫系统进一步受到抑制造成不良后果。MSCs 虽然免疫原性较小,但仍然存在一定的免疫原性,可能对机体造成损害。将异体的 MSCs 植入主要组织相容性复合物(MHC)不符的小鼠体内,遭遇了排斥反应^[15]。本实验中发现单纯骨髓 MSCs 组小鼠心肌细胞和肝脏细胞的凋亡增加,可能和排斥反应有关,这也对 MSCs 治疗的安全性提出了更高要求。因此,临床上采用 MSCs 治疗脓毒血症还需要进一步的研究和探索。

[参考文献]

[1] Martin GS, Mannino DM, Eaton S, et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000 [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(16):1546-1554

[2] Marshall JC, Charbonney E, Gonzalez PD. The immune system in critical illness [J]. *Clin Chest Med*, 2008, 29(4):605-616

[3] Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia [J]. *Nature*, 1987, 330(6149):662-664

[4] Ianaro A, Tersigni M, D'Acquisto F. New insight in LPS antagonist [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2009, 9(3):306-

317

[5] Claridge JA, Enelow RI, Young JS. Hemorrhage and resuscitation induce delayed inflammation and pulmonary dysfunction in mice [J]. *J Surg Res*, 2000, 92(2):206-213

[6] Todorovic Z, Nestic Z, Stojanovic R, et al. Acute protective effects of simvastatin in the rat model of renal ischemia-reperfusion injury: it is never too late for the pretreatment [J]. *J Pharmacol Sci*, 2008, 107(4):465-470

[7] Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine [J]. *Chest*, 1992, 101(6):1644-1655

[8] Opal SM, Laterre PF, Francois B, et al. Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial [J]. *JAMA*, 2013, 309(11):1154-1162

[9] Hagar JA, Powell DA, Aachoui Y, et al. Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock [J]. *Science*, 2013, 341(6151):1250-1253

[10] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses [J]. *Blood*, 2005, 105(4):1815-1822

[11] Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW, et al. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle [J]. *Transplantation*, 2007, 83(1):71-76

[12] Weil BR, Manukyan MC, Herrmann JL, et al. Mesenchymal stem cells attenuate myocardial functional depression and reduce systemic and myocardial inflammation during endotoxemia [J]. *Surgery*, 2010, 148(2):444-452

[13] Xu J, Woods CR, Mora AL, et al. Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 293(1):L131-L141

[14] Yagi H, Soto-Gutierrez A, Navarro-Alvarez N, et al. Reactive bone marrow stromal cells attenuate systemic inflammation via sTNFR1 [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(10):1857-1864

[15] Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, et al. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting [J]. *Blood*, 2006, 108(6):2114-2120