DOI:10.16016/j.1000-5404.201910113

胎盘间充质干细胞移植对大鼠重症急性胰腺炎的保护作用

黄启林[1,2],杨 屹[2],罗 晨[2],李 帅[2],汤礼军[1,2],孙红玉[1,2] 610031 成都,西南交通大学医学院[1];610083 成都,西部战区总医院胰腺损伤与修复四川省重点实验室[2]

[**摘要**] **目的** 研究胎盘间充质干细胞(placenta-derived mesenchymal stem cells, P-MSCs)对大鼠重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)的保护作用。**方法** 健康成年雄性SD大鼠32只,随机分为对照组、P-MSCs组、SAP组和SAP+P-MSCs组,每组8只。采用4%牛磺胆酸钠胆胰管逆行注射法建立SAP大鼠模型,造模结束后12 h与36 h经尾静脉注射P-MSCs(1×10^6个/100 g)。大鼠在P-MSCs第一次输注后72 h处死,HE染色评估胰腺损伤程度,ELISA法测定血清中炎症因子、淀粉酶与脂肪酶浓度,qRT-PCR检测胰腺组织中炎症因子基因表达水平,免疫组化法检测胰腺组织中巨噬细胞浸润情况。**结果** 体外输注的P-MSCs有向损伤部位定植的特性。与SAP组相比,SAP+P-MSCs组胰腺病理评分明显降低($P<0.05$);血清中淀粉酶、脂肪酶、IL-1β、IL-6与TNF-α浓度明显降低($P<0.05$),而IL-10、IL-4和TGF-β浓度明显升高($P<0.05$);胰腺组织中IL-1β与TNF-α mRNA表达水平明显降低($P<0.05$),IL-10与IL-4 mRNA表达水平明显升高($P<0.05$)。此外,P-MSCs可以有效减轻胰腺组织中巨噬细胞浸润。**结论** P-MSCs能有效减轻SAP大鼠胰腺局部炎症反应与全身炎症反应,其减轻胰腺局部炎症反应可能与其减少胰腺局部巨噬细胞与中性粒细胞浸润有关。

[**关键词**] 间充质干细胞;移植;重症急性胰腺炎;胎盘;巨噬细胞

[**中图法分类号**] R329.1; R576; R617 [**文献标志码**] A

Protective effect of placenta-derived mesenchymal stem cell transplantation against severe acute pancreatitis in rats

HUANG Qilin[1,2], YANG Yi[2], LUO Chen[2], LI Shuai[2], TANG Lijun[1,2], SUN Hongyu[1,2] [1]College of Medicine, Southwest Jiaotong University, Chengdu, 610031, Sichuan Province; [2]Key Laboratory of Pancreatic Injury and Repair of Sichuan Province, General Hospital of Western Theater Command, Chengdu, 610083, Sichuan Province, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the protective effects of human placenta-derived mesenchymal stem cell (P-MSC) transplantation against severe acute pancreatitis (SAP) in rats. **Methods** A total of 32 healthy adult male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into control group, P-MSC group, SAP and SAP+P-MSCs group ($n=8$), and in the latter 2 groups, SAP was induced by retrograde injection of 4% sodium taurocholate into the common biliopancreatic duct. P-MSCs (1×10^6 cells/100 g) were delivered through the tail vein of the rats at 12 and 36 h after the induction of SAP. All the rats were sacrificed 72 h after the first P-MSC infusion. HE staining was used to assess the pancreatic pathologies of the rats after the treatments. The serum levels of the pro- and anti-inflammatory mediators, amylase and lipase were determined by ELISA, and the mRNA expression levels of the inflammatory mediators in the pancreatic tissue were

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81772001);国家临床重点专科建设项目(41792113)

[**通信作者**] 孙红玉,E-mail:shongyu2008@163.com

detected using qRT-PCR. Immunohistochemistry was performed to examine macrophage infiltration in the pancreatic tissue of the rats. **Results** Homing of the infused P-MSCs to the injury site was observed in the rats with SAP. Transplantation of P-MSCs significantly ameliorated histopathological injury and lowered pancreatic pathological score of the pancreas, reduced serum levels of amylase, lipase, interleukin-1β (IL-1β), IL-6 and tumor necrosis factor-α (TNF-α) ($P<0.05$), increased serum levels of IL-10, IL-4 and transforming growth factor-β (TGF-β) ($P<0.05$), decreased the expression levels of IL-1β and TNF-α ($P<0.05$) and increased the expression of IL-10 and IL-4 in the pancreatic tissue ($P<0.05$) of the rats with SAP. In addition, P-MSC transplantation effectively reduced macrophage infiltration in the pancreatic tissue of the rats. **Conclusion** Transplantation of P-MSCs can effectively alleviate local inflammatory response in the pancreas and systemic inflammatory response in rats with SAP probably by reducing local macrophage and neutrophil infiltration in the pancreas.

[**Key words**] mesenchymal stem cells; transplantation; severe acute pancreatitis; placenta; macrophages

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81772001) and the National Clinical Key-discipline Construction Program of China (41792113). Corresponding author: SUN Hongyun, E-mail: shongyu2008@163.com

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是一种以胰腺局部炎性损伤和全身炎症反应为特征的疾病,其病情重,病死率高达30%[1]。虽然SAP发病机制尚不完全清楚,但目前普遍认为SAP是多因素导致胰腺腺泡或导管细胞损伤,细胞内钙超载与胰酶过早激活致使胰腺自我消化,最终募集与激活炎性细胞与免疫细胞,导致炎症反应[2-3]。SAP早期主要表现为炎症反应亢进,以全身炎症反应综合征(systemic inflammation response syndrome, SIRS)和器官功能衰竭为主要表现;然而SAP后期,则主要表现为机体免疫力低下,易发生感染。因此如果能有效平衡机体的促炎反应与抗炎反应,调节免疫平衡,或许能有效控制SAP进展,提高SAP治愈率。

巨噬细胞作为固有免疫的主力军,在炎症反应中发挥着重要作用。大量研究表明巨噬细胞在急性胰腺炎的发生、发展中发挥着重要作用[4-5],并且胰腺组织局部大量巨噬细胞浸润后分泌大量炎症因子,这些炎症因子又会进一步加重胰腺组织损伤。近年来,大量研究表明间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)在一些炎症性疾病中能有效控制炎症反应[6-7],并且已有研究证实骨髓与脐带来源的间充质干细胞能有效减轻急性胰腺炎大鼠胰腺损伤与全身炎症反应[6,8-10]。然而,目前关于P-MSCs对大鼠SAP治疗效果及其相关机制的研究鲜有报道。因此本研究主要是观察P-MSCs移植治疗大鼠SAP的安全性与有效性,同时探讨P-MSCs能否有效减轻胰腺组织中炎性细胞浸润。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

健康成年雄性SPF级SD大鼠,体质量200~220 g,购自成都达硕实验动物有限公司。间充质干细胞无血清培养基购自友康恒业生物科技(北京)有限公司,牛磺胆酸钠购自美国Sigma公司,淀粉酶、脂肪酶、IL-1β、IL-6、TNF-α、TGF-β、IL-10与IL-4购自上海江莱生物科技有限公司。髓过氧化物酶(MPO)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。间充质干细胞成骨、成脂肪、成软骨诱导分化培养基试剂盒购自赛业(苏州)生物科技有限公司。流式抗体CD105、CD90、CD73、CD166、CD44、CD19、CD45、CD34、CD14和HLA-DR购自美国Biolgend公司。小鼠抗大鼠抗体CD68购自美国Bio-Rad公司。one step SYBR PrimeScript RT-PCR KitⅡ购自日本TaKaRa公司。引物由上海生工生物工程有限公司设计并合成。CM-Dil购买自美国赛默飞公司。

1.2 方法

1.2.1 胎盘间充质干细胞的分离培养及鉴定 胎盘间充质干细胞分离培养的具体方法见我们前期研

究[11]的方法,选取第 3~5 代细胞用于后续实验。采用流式细胞仪分析 P-MSCs 的表型:FITC-(CD73、CD90、CD105、CD44、CD14、CD34 和 HLA-DR);PE-(CD166、CD45 和 CD19)。采用间质干细胞成骨、成脂肪、成软骨诱导分化培养基进行体外诱导分化,诱导分化结束后分别进行茜素红、油红 O 染液、阿利辛蓝染色。

1.2.2 动物分组及模型制备 SD 大鼠 32 只,术前禁食 12 h,自由饮水,然后采用随机数字表法分为 4 组:对照组、P-MSCs 组、SAP 组与 SAP+P-MSCs 组,每组 8 只。对照组:大鼠经异氟烷麻醉后,开腹翻动胰腺数次然后关闭腹腔,术后 12 h 与 36 h 经尾静脉注射 1 mL PBS 缓冲液。P-MSCs 组:开腹翻动胰腺数次然后关闭腹腔,术后 12 h 与 36 h 经尾静脉注射 P-MSCs(1×10^6 个/100 g,2×10^6 个/mL)。SAP 组:大鼠麻醉后,开腹经胰胆管注入 4%牛磺胆酸钠(0.1 mL/100 g),术后 12 h 与 36 h 经尾静脉注射 1 mL PBS 缓冲液。SAP+P-MSCs 组:在 SAP 造模结束后 12 h 与 36 h,经尾静脉注射 P-MSCs(1×10^6 个/100 g,2×10^6 个/mL)。所有大鼠在 P-MSCs 第 1 次输注后 24、48 h 经眼眶后静脉丛采血,并在 P-MSCs 第 1 次输注后 72 h 处死,收集血清与胰腺组织。

1.2.3 观察 CM-Dil 标记的 P-MSCs 在 SAP 大鼠体内的分部情况 在大鼠 SAP 模型制备后 12 h 与 36 h 分别经尾静脉输注 CM-Dil 标记的 P-MSCs(1×10^6 个/100 g,2×10^6 个/mL),第 1 次 P-MSCs 输注后 72 h,处死所有大鼠,分别取肺、心、肝、胰、脾、肾、十二指肠进行冰冻切片,然后再用 DAPI 染核,荧光显微镜下观察 P-MSCs 在不同器官中的分布情况。

1.2.4 胰腺组织学检查及病理评分 固定后的胰腺组织,经脱水、包埋、切片、HE 染色后,置于显微镜下观察其病理学改变。并由 2 名病理医师在不知道分组的情况下观察切片,并依据 SCHMIDT 等[12]报道的标准,对胰腺水肿、腺泡细胞坏死、出血、炎性细胞浸润程度进行评分,通过计算 10 个独立视野的平均得分作为每张切片的最后评分。

1.2.5 血清淀粉酶、脂肪酶、炎症因子测定 采用 ELISA 法测定血清中淀粉酶、脂肪酶、IL-1β、IL-6、TNF-α、IL-10、IL-4 和 TGF-β 浓度,操作按试剂盒说明书步骤进行。

1.2.6 胰腺组织中髓过氧化物酶活性测定 取 -80 ℃冻存的胰腺组织,超声波匀浆后离心收集上清,按照试剂盒说书步骤操作,测定各组胰腺组织中髓过氧化物酶(MPO)活性。

1.2.7 qRT-PCR 测定胰腺组织炎症因子基因表达水平 称取相同体质量胰腺组织后,采用 TRIzol 法提取总 RNA,然后进行 qRT-PCR 测定各组胰腺中炎症因子基因表达水平。引物序列见表 1。

1.2.8 免疫组化法测定胰腺组织中巨噬细胞 胰腺石蜡切片经过脱蜡之后,采用 S-P 法检测胰腺组织中 CD68 的表达情况。通过计算 5 个独立的视野中 CD68 阳性细胞数的平均值作为每张切片每个视野的巨噬细胞数,然后每个样本再观察不同层面的 3 张切片,取其平均值作为每个样本每个视野(×400)中巨噬细胞数。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析。计量资料若符合正态分布以 $\bar{x}\pm s$ 表示,若方差齐则采用两因素的方差分析,进一步两两比较采用 LSD-t 检验;若方差不齐,则多组间比较采用非参数检验 K-W 法,进一步两两比较采用 Mann-Whitney U 检验。检验水准 $\alpha=0.05$。

表 1 qRT-PCR 引物序列与片段长度

基因	上游引物	下游引物	片段大小/bp
TNF-α	5′-CGTCGTAGCAAACCACCAAG-3′	5′-CACAGAGCAATGACTCCAAAG-3′	426
IL-1β	5′-CCCTGAACTCAACTGTGAAATAGCA-3′	5′-CCCAAGTCAAGGGCTTGGAA-3′	111
IL-10	5′-CAGACCCACATGCTCCGAGA-3′	5′-CAAGGCTTGGCAACCCAAGTA-3′	141
IL-4	5′-AACAAGGAACACCACGGAGA-3′	5′-ATTCACGGTGCAGCTTCTCA-3′	178
GAPDH	5′-GTATGACTCTACCCACGGCAAGT-3′	5′-TTCCCGTTGATGACCAGCTT-3′	72

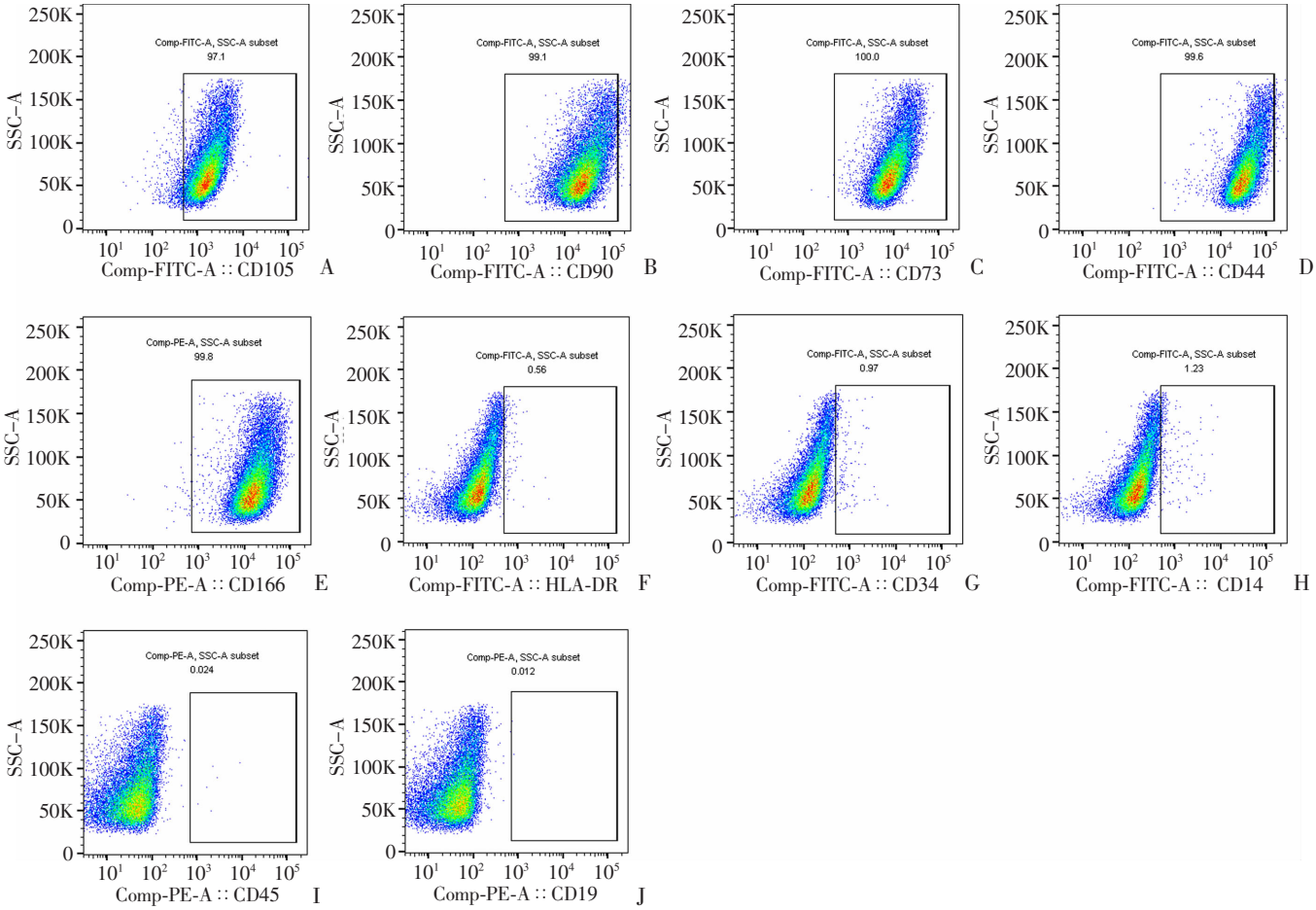
2 结果

2.1 分离培养获得的细胞满足间充质干细胞标准

成功从人胎盘组织中分离得到 P-MSCs,其呈长梭形,MSCs 阳性标志物:CD105、CD90、CD73、CD166、CD44(≥95%);阴性标志物:CD14、CD19、CD45、CD34 和 HLA-DR(≤2%);并且 P-MSCs 成功向骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞分化(图 1、2)。表明分离获得的 P-MSCs 满足 2006 年国际细胞治疗协会提出的间充质干细胞标准。

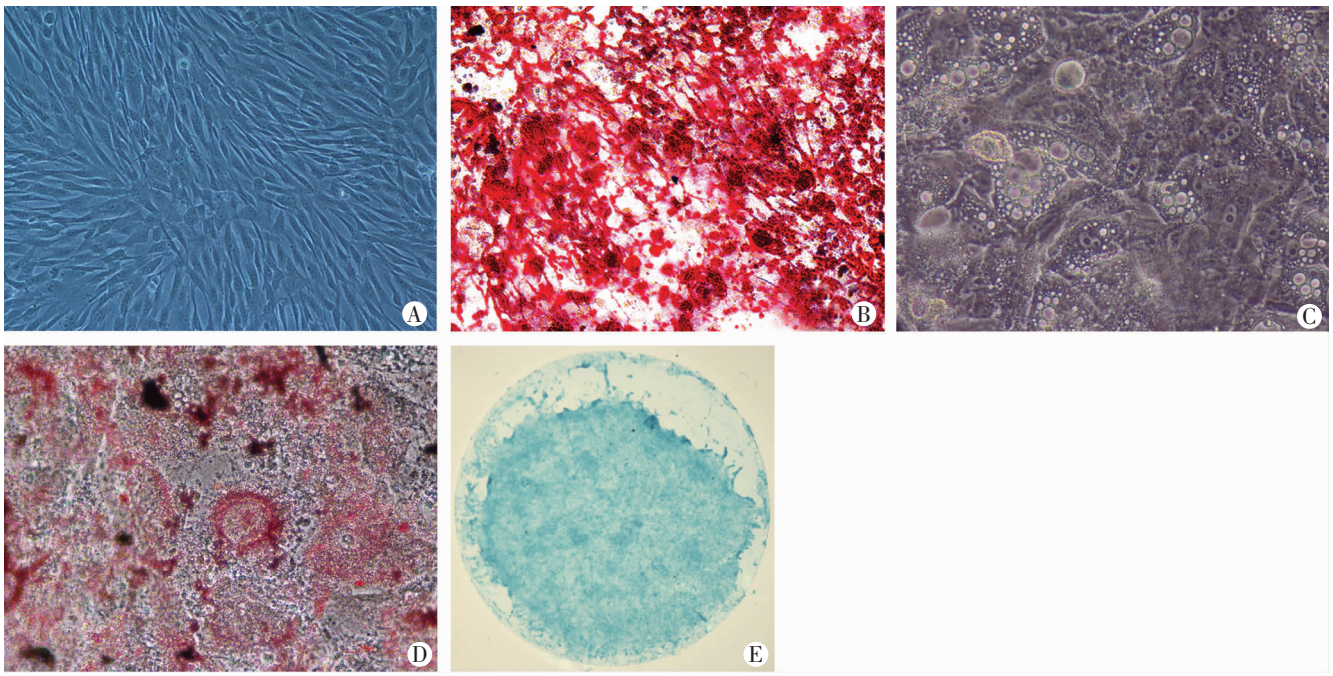
2.2 CM-Dil 标记的 P-MSCs 在 SAP 大鼠体内的分布情况

P-MSCs 移植后,虽然一部分 P-MSCs 滞留在肺部,但大量移植的 P-MSCs 定植在肺外器官中,其中肝脏与脾脏中 P-MSCs 定植较多,并且与对照组相比,SAP 组肝脏、胰腺和十二指肠中有更多的 P-MSCs 定植(图 3)。然而,肺、脾、心脏与肾脏中定植的 P-MSCs 两组之间并无明显差别。说明体外输注的 P-MSCs 有向损伤部分定植的趋势。



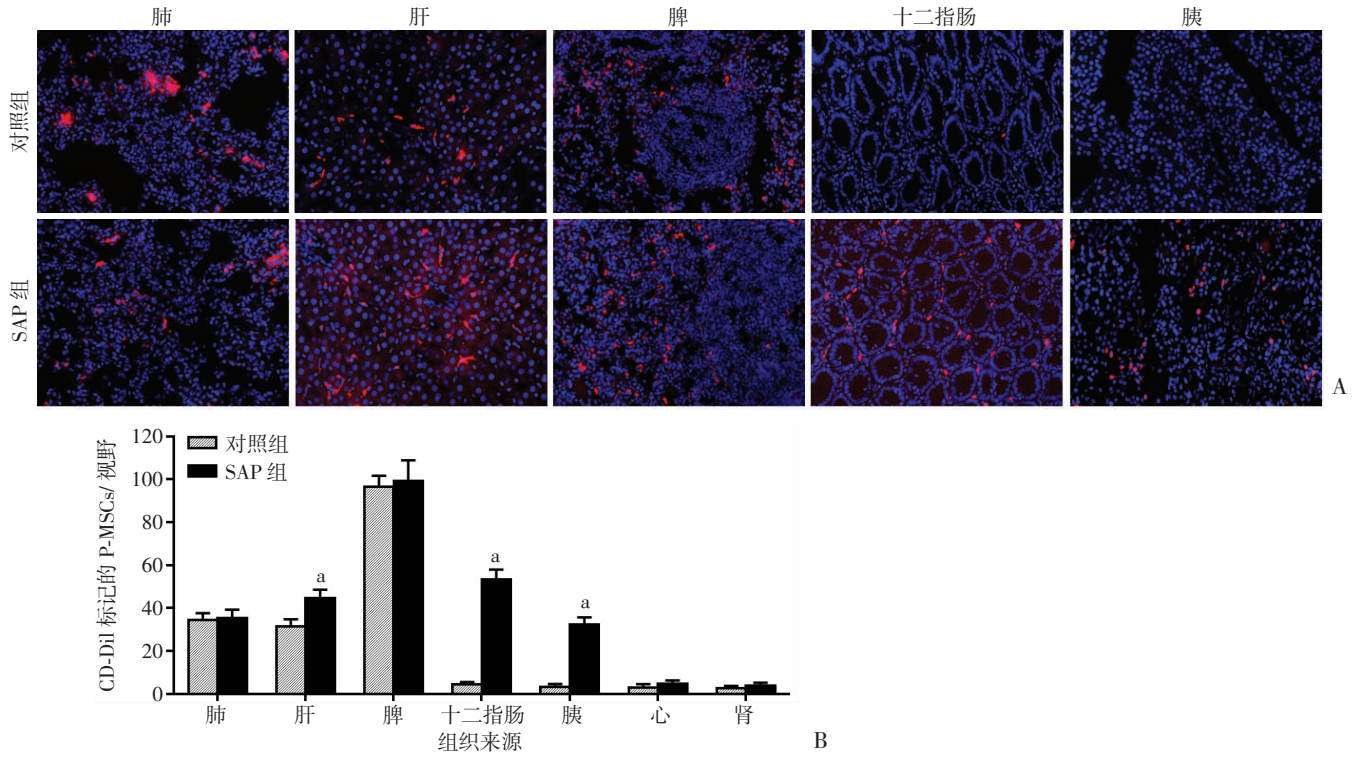
A:CD105;B:CD90;C:CD73;D:CD44;E:CD166;F:HLA-DR;G:CD34;H:CD14;I:CD45;J:CD19

图 1 P-MSCs 流式细胞仪检测结果



A:P-MSCs 诱导分化前(×200);B: P-MSCs 成骨细胞分化茜素红染色(×200);C: P-MSCs 成脂肪细胞分化染色前(×400);D:P-MSCs 成脂肪细胞分化油红 O 染色(×400);E:P-MSCs 成软骨细胞分化阿利辛蓝染色(×4)

图 2 P-MSCs 分化鉴定



A:CM-Dil 标记的 P-MSCs 在 SAP 大鼠肺、肝、脾、十二指肠和胰的分布情况;B:CM-Dil 标记的 P-MSCs 在 SAP 大鼠肺、肝、脾、十二指肠、心和肾分布的统计分析 a:$P<0.05$,与对照组比较

图 3 P-MSCs 在 SAP 大鼠体内的分布

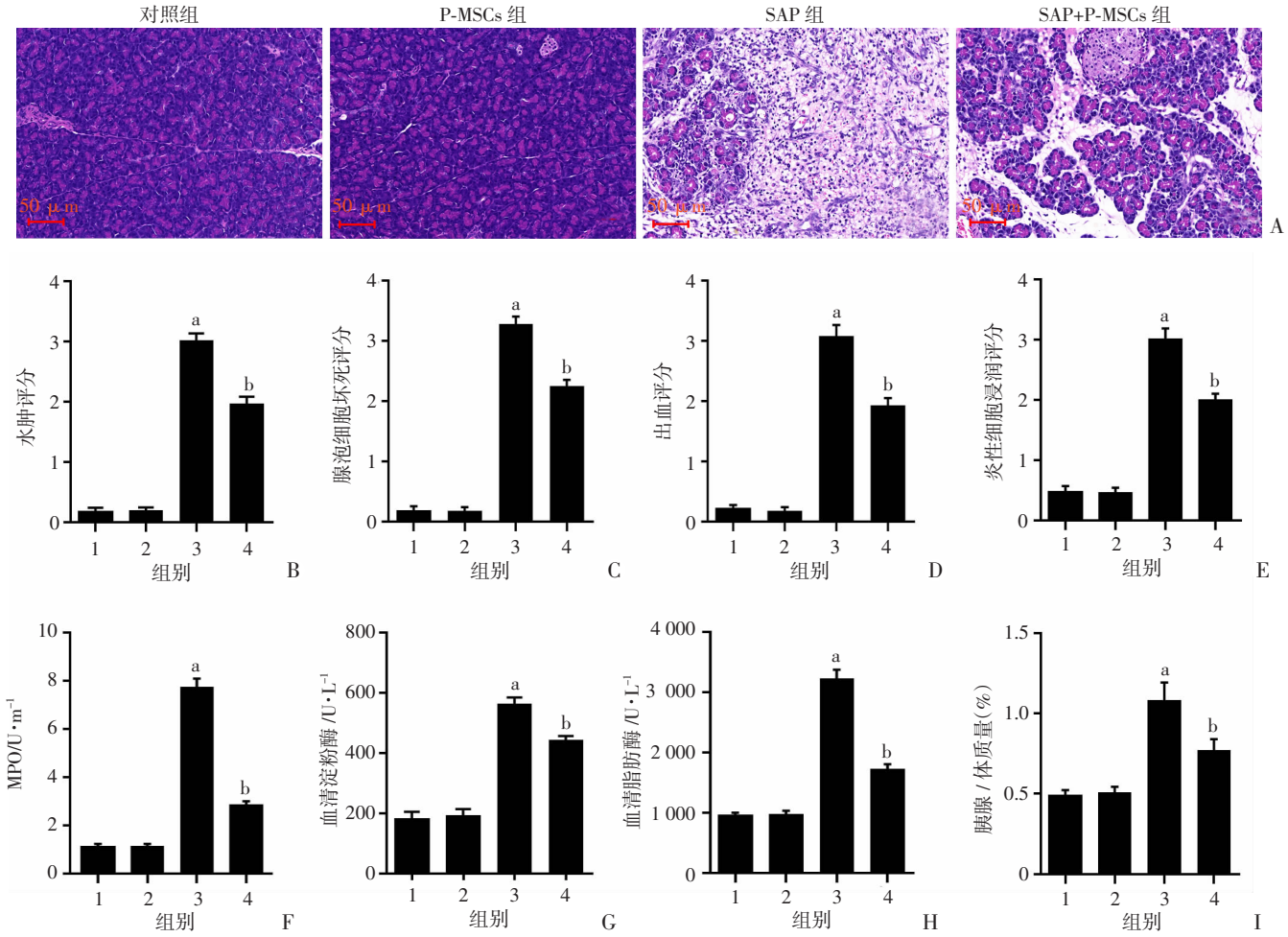
2.3　P-MSCs 能有效减轻 SAP 大鼠胰腺病理损伤

胰腺 HE 染色结果显示,对照组与 P-MSCs 组胰腺组织结构清晰,形态未见明显异常;SAP 组可见胰腺间质广泛性水肿,腺泡细胞大片坏死,胰腺小叶结构紊乱,大量炎性细胞浸润与红细胞渗出;然而 SAP+P-MSCs 组,其胰腺损伤相比 SAP 组明显减轻,仅见部分胰腺组织水肿,腺泡细胞呈小片状坏死,见少量炎性细胞浸润与红细胞渗出(图 4A)。对照组与 P-MSCs 组胰腺水肿、腺泡细胞坏死、出血、炎细胞渗出评分差异无统计学意义($P>0.05$,图 4B~E)。与 SAP 组相比,SAP+P-MSCs 组胰腺水肿、腺泡细胞坏死、出血、炎细胞渗出评分显著降低,差异有统计学意义($P<0.001$,图 4B~E)。对照组与 P-MSCs 组胰腺/体质量的比值差异无统计学意义($P>0.05$,图 4I)。与 SAP 组相比,SAP+P-MSCs 组胰腺/体质量的比值显著降低,差异有统计学意义($P<0.001$,图 4I)。

通过测定胰腺组织中髓过氧化物酶(myeloperoxidase,MPO)活性发现对照组与 P-MSCs 组胰腺组织中 MPO 活性差异无统计学意义($P>0.05$,图 4F);与 SAP 组相比,SAP+P-MSCs 组胰腺组织中 MPO 活性明显降低,差异有统计学意义($P<0.001$,图 4F)。ELISA 法测定血清淀粉酶与脂肪酶,结果显示对照组与 P-MSCs 组血清淀粉酶与脂肪酶浓度差异无统计学意义($P>0.05$,图 4G、H);与 SAP 组相比,SAP+P-MSCs 组血清淀粉酶与脂肪酶浓度显著降低,差异有统计学意义($P<0.001$,图 4G、H)。

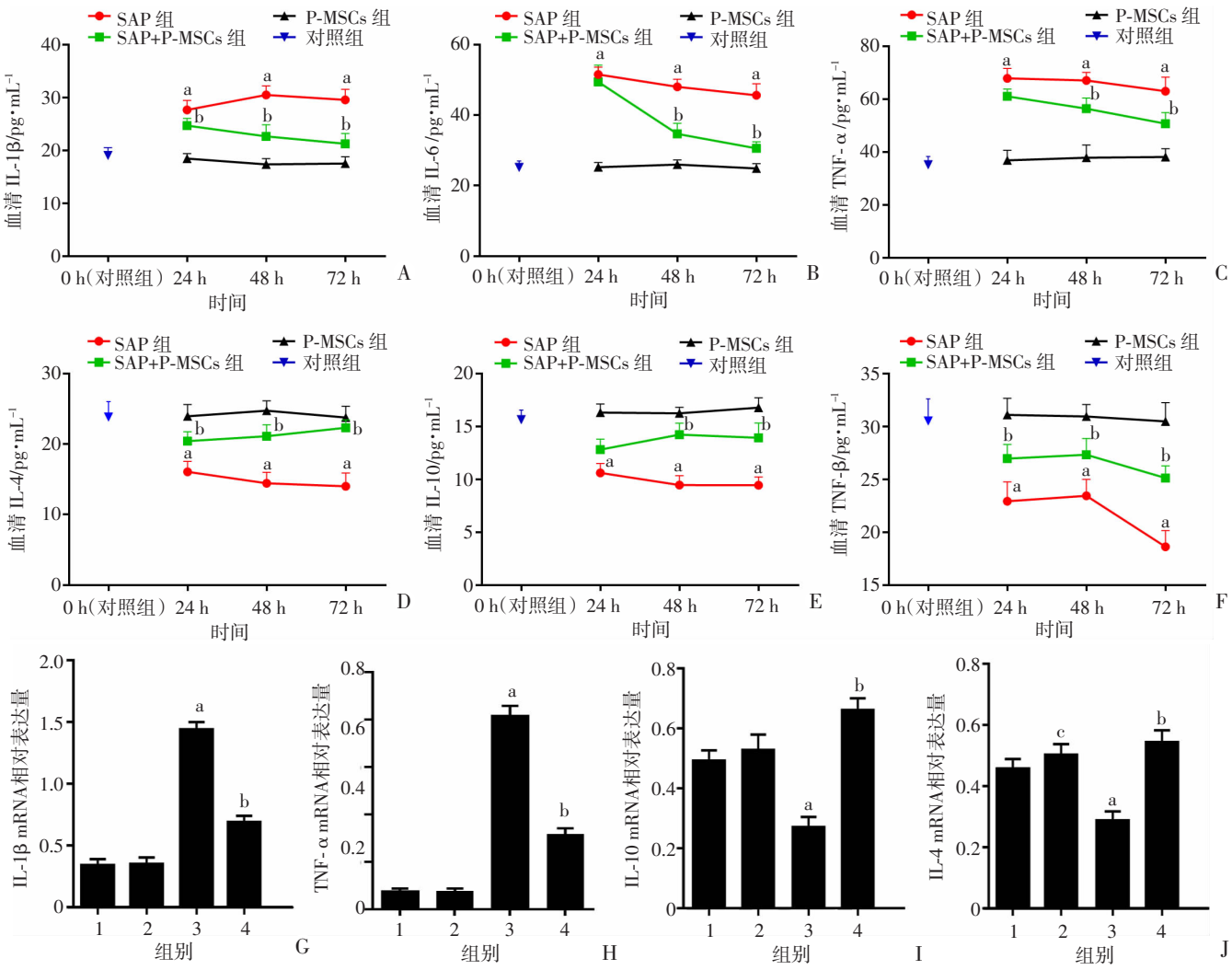
2.4　P-MSCs 能有效减轻 SAP 大鼠全身炎症反应

ELISA 检测结果表明,与 SAP 组相比,SAP+P-MSCs 组大鼠血清中促炎因子 IL-1β、IL-6 与 TNF-α 浓度明显降低($P<0.01$,图 5A~C);而抗炎因子 IL-10、IL-4 和 TGF-β 浓度明显升高($P<0.01$,图 5D~F)。



A:胰腺 HE 染色(×100);B:胰腺水肿程度评分;C:胰腺腺泡细胞坏死程度评分;D:胰腺出血程度评分;E:胰腺炎性细胞浸润程度评分;F:胰腺组织中髓过氧化物酶(MPO)活性;G:血清淀粉酶浓度;H:血清脂肪酶浓度;I:胰腺与体质量比值　1:对照组;2:P-MSCs 组;3:SAP 组;4:SAP+P-MSCs 组;a:$P<0.001$,与对照组比较;b:$P<0.001$,与 SAP 组比较

图 4　胰腺病理损伤严重程度评估



A:血清 IL-1β 浓度;B:血清 IL-6 浓度;C:血清 TNF-α 浓度;D:血清 IL-4 浓度;E:血清 IL-10 浓度;F:血清 TGF-β 浓度;G:胰腺组织 IL-1β mRNA 相对表达量;H:胰腺组织 TNF-α mRNA 相对表达量;I:胰腺组织 IL-10 mRNA 相对表达量;J:胰腺组织 IL-4 mRNA 相对表达量 1:对照组;2:P-MSCs 组;3:SAP 组;4:SAP+P-MSCs 组;a:$P<0.001$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与 SAP 组比较;c:$P<0.05$,与对照组比较

图 5 胰腺组织与全身炎症反应状况

2.5 P-MSCs 能有效减轻 SAP 大鼠胰腺局部炎症反应

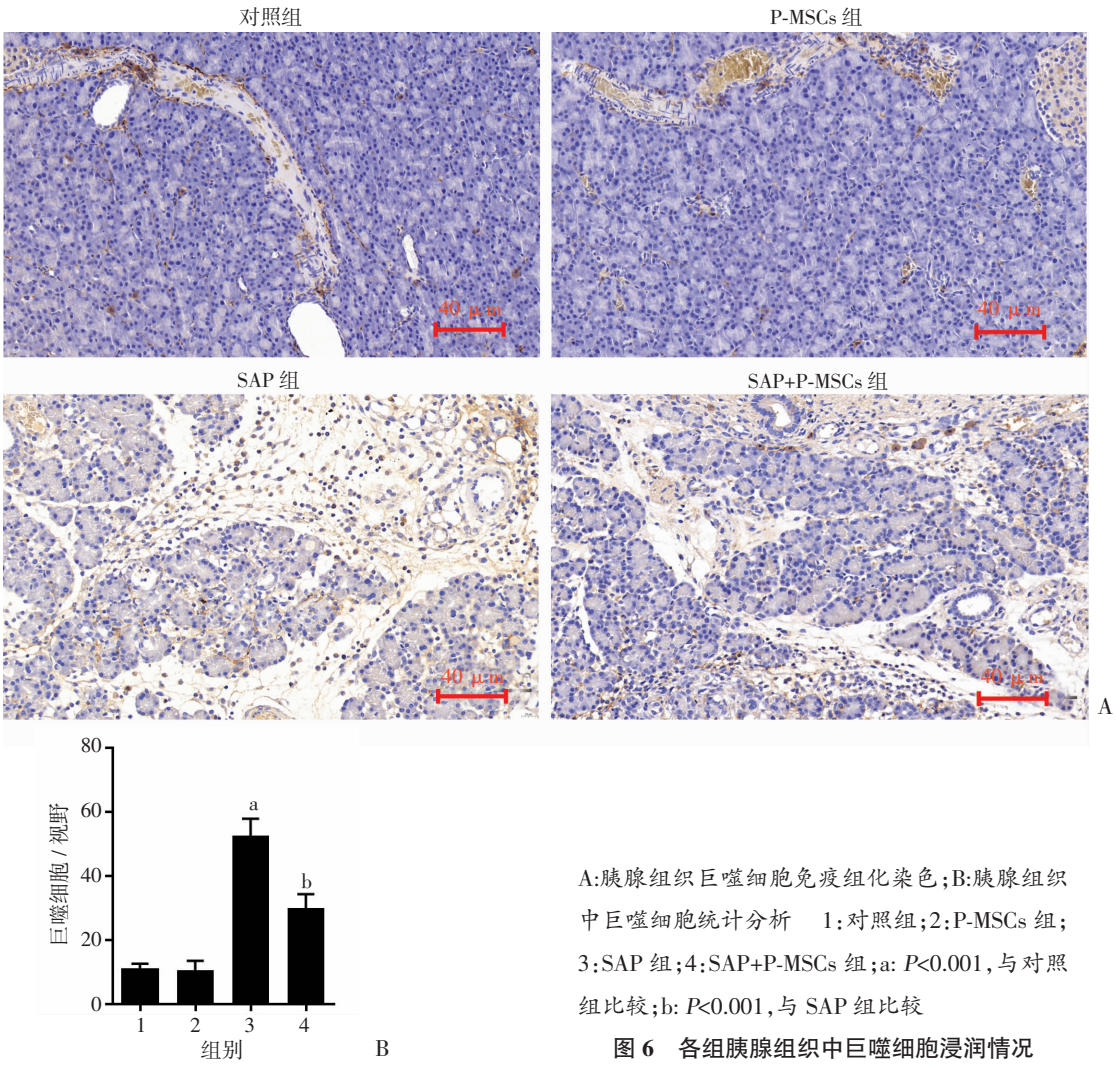
PCR 检测结果显示,相比 SAP 组,SAP+P-MSCs 组大鼠胰腺组织中促炎因子 IL-1β 与 TNF-α mRNA 表达水平明显降低,差异有统计学意义($P<0.001$,图 5G~H);而抗炎因子 IL-10 与 IL-4 mRNA 表达水平明显升高,差异有统计学意($P<0.01$,图 5I~J)。对照组与 P-MSCs 组胰腺组织中 IL-1β、TNF-α 与 IL-10 mRNA 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$,图 5G~I),而 IL-4 mRNA 表达水平 P-MSCs 组较对照组轻度升高,差异有统计学意义($P<0.05$,图 5J)。

2.6 P-MSCs 能有效减轻 SAP 大鼠胰腺组织中巨噬细胞浸润

胰腺免疫组化检测结果显示,在对照组与 P-MSCs 组,巨噬细胞主要位于血管旁,少许存在胰腺小叶间隙中,并且两组巨噬细胞浸润程度无明显差异。SAP 组胰腺组织中浸润的巨噬细胞明显增多,而 SAP+P-MSCs 组胰腺组织中的巨噬细胞相比 SAP 组明显减少(图 6)。

3 讨论

MSCs 因其具有高度的自我更新、多向分化潜能、低免疫原性以及免疫调节功能等优势,因此成为再生医学中组织器官修复的理想种子细胞。近年来大量研究表明 MSCs 可以通过免疫调节与促血管新生作用来减轻组织炎症反应加速组织修复从而发挥治疗作用[13-15]。目前关于 MSCs 与急性胰腺炎的研究已有较



A:胰腺组织巨噬细胞免疫组化染色;B:胰腺组织中巨噬细胞统计分析　1:对照组;2:P-MSCs 组;3:SAP 组;4:SAP+P-MSCs 组;a: $P<0.001$,与对照组比较;b: $P<0.001$,与 SAP 组比较

图 6　各组胰腺组织中巨噬细胞浸润情况

多报道,但主要集中在骨髓源性 MSCs(Bone marrow-derived, BM-MSCs)与脐带源性 MSCs(Umbilical cord-derived MSCs, UC-MSCs)对急性胰腺炎的治疗作用[16-17],而关于 P-MSCs 与急性胰腺炎的研究却鲜有报道。然而,一些研究表明从骨髓中分离 BM-MSCs 具有较低的细胞获得率和较高的病毒污染率,此外随着供体年龄的增长其增殖与分化能力会逐渐减低,同时骨髓的获取是一种有创操作,因此限制了其在临床中的应用。UC-MSCs 与 P-MSCs 近年来逐渐引起广大研究者的关注。脐带与胎盘组织在胎儿娩出后,常作为医疗垃圾被抛弃,因此从其中分离 MSCs 不会给捐赠者带来不适,并且从脐带与胎盘中获取的 MSCs 相比 BM-MSCs 具有更强的增殖能力与免疫调节特性[18-19]。此外,一项研究表明 P-MSCs 相比 UC-MSCs 具有更强的增殖活性与免疫调节能力[20]。因此,本研究主要是探讨 P-MSCs 在 SAP 大鼠治疗中的安全性与有效性。

本研究成功从人胎盘组织中分离培养获得 P-MSCs,并且流式细胞分析与诱导分化实验均表明获得的 P-MSCs 满足 2006 年国际细胞治疗协会提出的间充质干细胞标准[21]。本研究发现对照组与 P-MSCs 组,其胰腺病理损伤程度及评分,血清淀粉酶、脂肪酶、炎性因子,以及胰腺局部炎症反应程度差异无统计学意义,说明人源 P-MSCs 输注到大鼠体内不会引起明显的排异反应,P-MSCs 输注是安全的。这也同时说明 P-MSCs 也具有低免疫原性,异种移植时不会引起明显排异反应。

大量研究表明体外输注的 MSCs 有向损伤部位迁移与定植的特性[22],但关于 MSCs 在急性胰腺炎中是否向胰腺损伤部位定植尚未达成共识。有研究认为在急性胰腺模型中体外输注的 MSCs 主要滞留在肺部,而到达损伤部位的细胞较少,因此他们认为 MSCs 对急性胰腺的治疗作用主要是通过旁分泌完成的[23]。

然而,另一些研究则认为体外输注的 MSCs 有向损伤胰腺定植的特性,并且还发现在胰腺定植的 MSCs 有向胰腺腺泡细胞分化的特性[6, 24]。因此本研究首先探讨了体外输注的 P-MSCs 在 SAP 大鼠体内的定植情况,研究表明虽然肺部也有部分 P-MSCs 定植,但大多数细胞主要定植在肺外器官中,特别是肝脾,并且相比对照组,SAP 组十二指肠、肝脏与胰腺中有更多 P-MSCs 定植。因此,本研究表明体外输注的 P-MSCs 有向胰腺损伤部位定植的特性。

SAP+P-MSCs 组胰腺组织中 MPO 活性相比 SAP 组明显降低,而 MPO 是成熟中性粒细胞所特有的,因此组织中 MPO 活性可以用来反映组织中中性粒细胞浸润情况。中性粒细胞是胰腺腺泡细胞发生损伤后最先到达的细胞,其在清除坏死细胞的同时也会释放大量炎症介子以及水解酶,这些炎症介质又会诱使更多中性粒细胞向损伤部位聚集,同时也会诱使大量巨噬细胞向损伤部位聚集,中性粒细胞与巨噬细胞的大量聚集又会加重组织损伤。因此 P-MSCs 减轻胰腺组织中中性粒细胞与巨噬细胞浸润对减轻胰腺炎症反应促进损伤胰腺组织修复具有重要作用。

胰腺 HE 染色结果显示,相比 SAP 组,SAP+P-MSCs 组胰腺水肿、出血、腺泡细胞坏死、炎性细胞浸润明显减轻;此外,qRT-PCR 检测结果显示胰腺组织中促炎因子 IL-1β 与 TNF-α mRNA 表达水平显著降低,而抗炎因子 IL-10 与 IL-4 mRNA 表达水平明显升高。ELISA 实验结果显示 SAP+P-MSCs 组血清淀粉酶与脂肪酶浓度相比 SAP 组显著降低。因此,以上实验结果均表明 P-MSCs 可以有效减轻胰腺组织病理损伤及炎症反应从而有利于损伤胰腺组织修复。

然而,急性胰腺炎除了胰腺局部病理损伤外,同时还伴有严重的全身炎症反应。因此要评估 P-MSCs 对 SAP 大鼠的治疗效果,就必须同时评估其对全身炎症反应的影响。全身炎症反应程度,常常通过测定血清中促炎因子与抗炎因子浓度来间接反应。本研究发现相比 SAP 组,SAP+P-MSCs 组大鼠血清中促炎因子 IL-1β 与 TNF-α 浓度明显降低,而抗炎因子 IL-4 与 IL-10 浓度显著升高。因此,P-MSCs 可以有效减轻 SAP 大鼠全身炎症反应。

综上,本研究初步表明 P-MSCs 在 SAP 大鼠治疗中是安全有效的,P-MSCs 减轻胰腺病理损伤与炎症反应可能与其减轻胰腺组织中巨噬细胞与中性粒细胞浸润有关,但具体机制尚不清楚。

参考文献:

[1] FORSMARK C E, SWAROOP VEGE S, WILCOX C M. Acute pancreatitis[J]. N Engl J Med, 2016, 375(20): 1972-1981. DOI: 10.1056/nejmra1505202.

[2] GUKOVSKAYA A S, GUKOVSKY I, ALGÜL H, *et al*. Autophagy, inflammation, and immune dysfunction in the pathogenesis of pancreatitis[J]. Gastroenterology, 2017, 153(5): 1212-1226. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.08.071.

[3] MANOHAR M, VERMA A K, VENKATESHAIAH S U, *et al*. Pathogenic mechanisms of pancreatitis[J]. World J Gastrointest Pharmacol Ther, 2017, 8(1): 10. DOI: 10.4292/wjgpt.v8.i1.10.

[4] SHRIVASTAVA P, BHATIA M. Essential role of monocytes and macrophages in the progression of acute pancreatitis[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(32): 3995-4002. DOI: 10.3748/wjg.v16.i32.3995.

[5] GEA-SORLÍ S, CLOSA D. Role of macrophages in the progression of acute pancreatitis[J]. World J Gastrointest Pharmacol Ther, 2010, 1(5): 107-111. DOI: 10.4292/wjgpt.v1.i5.107.

[6] JUNG K H, SONG S N, 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. DOI: 10.1053/j.gastro.2010.11.047.

[7] WALTER J, WARE L B, MATTHAY M A. Mesenchymal stem cells: mechanisms of potential therapeutic benefit in ARDS and sepsis[J]. Lancet Respir Med, 2014, 2(12): 1016-1026. DOI: 10.1016/S2213-2600(14)70217-6.

[8] MA Z L, SONG G D, ZHAO D B, *et al*. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells ameliorate severe acute pancreatitis in rats *via* hemeoxygenase-1-mediated anti-oxidant and anti-inflammatory effects[J]. Cytotherapy, 2019, 21(2): 162-174. DOI: 10.1016/j.jcyt.2018.11.013.

[9] QIAN D H, SONG G D, MA Z L, *et al*. MicroRNA-9 modified bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) repair severe acute pancreatitis (SAP) via inducing angiogenesis in rats[J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 282. DOI: 10.1186/s13287-018-1022-y.

[10] YANG J, SU J, XI S S, *et al*. Human umbilical cord mesenchymal stem cells pretreated with angiotensin-Ⅱ attenuate pancreas injury of rats with severe acute pancreatitis[J]. Biomedecine Pharmacother, 2019, 117: 109052. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109052.

[11] HUANG Q, YANG Y, LUO C, *et al*. An efficient protocol to generate placental chorionic plate-derived mesenchymal stem

cells with superior proliferative and immunomodulatory properties[J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 301. DOI: 10.1186/s13287-019-1405-8.

[12] SCHMIDT J, RATTNER D W, LEWANDROWSKI K, *et al*. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy [J]. Ann Surg, 1992, 215(1): 44-56. DOI: 10.1097/00000658-199201000-00007.

[13] SHI Y F, WANG Y, LI Q, *et al*. Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases[J]. Nat Rev Nephrol, 2018, 14(8): 493-507. DOI: 10.1038/s41581-018-0023-5.

[14] SHI Y H, SHI H, NOMI A, *et al*. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: a new impetus of promoting angiogenesis in tissue regeneration[J]. Cytotherapy, 2019, 21(5): 497-508. DOI: 10.1016/j.jcyt.2018.11.012.

[15] LIANG L, LI Z J, MA T, *et al*. Transplantation of human placenta-derived mesenchymal stem cells alleviates critical limb ischemia in diabetic nude rats[J]. Cell Transplant, 2017, 26(1): 45-61. DOI: 10.3727/096368916X69 2726.

[16] KAWAKUBO K, OHNISHI S, KUWATANI M, *et al*. Mesenchymal stem cell therapy for acute and chronic pancreatitis [J]. J Gastroenterol, 2018, 53(1): 1-5. DOI: 10.1007/s00535-017-1363-9.

[17] AHMED S M, MORSI M, GHONEIM N I, *et al*. Mesenchymal stromal cell therapy for pancreatitis: A systematic review[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 3250864. DOI: 10.1155/2018/3250864.

[18] XU LL, LIU Y M, SUN Y X, *et al*. Tissue source determines the differentiation potentials of mesenchymal stem cells: a comparative study of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue[J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1): 275. DOI: 10.1186/s13287-017-0716-x.

[19] LI X Y, BAI J P, JI X F, *et al*. Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation[J]. Int J Mol Med, 2014, 34(3): 695-704. DOI: 10.3892/ijmm.2014.1821.

[20] TALWADEKAR M D, KALE V P, LIMAYE L S. Placenta-derived mesenchymal stem cells possess better immunoregulatory properties compared to their cord-derived counterparts-a paired sample study[J]. Sci Rep, 2015, 5: 15784. DOI: 10.1038/srep15784.

[21] DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, *et al*. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement[J]. Cytotherapy, 2006, 8(4): 315-317. DOI: 10.1080/14653240600855905.

[22] ZHAO W A, PHINNEY D G, BONNET D, *et al*. Mesenchymal stem cell biodistribution, migration, and homing *in vivo*[J]. Stem Cells Int, 2014, 2014: 292109. DOI: 10.1155/2014/292109.

[23] HE Z G, HUA J, QIAN D H, *et al*. Intravenous hMSCs ameliorate acute pancreatitis in mice via secretion of tumor necrosis factor-α stimulated gene/protein 6[J]. Sci Rep, 2016, 6: 38438. DOI: 10.1038/srep38438.

[24] QU B, CHU Y J, ZHU F, *et al*. Granulocyte colony-stimulating factor enhances the therapeutic efficacy of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in rats with experimental acute pancreatitis[J]. Oncotarget, 2017, 8(13): 21305-21314. DOI: 10.18632/oncotarget.15515.

(收稿:2019-10-18;修回:2019-12-13)

(编辑 黄 超)