

· 基础研究 ·

## 骨髓间充质干细胞对多器官功能不全综合征的模型疗效观察

谢余澄,傅 仅,杨亚丽,唐 静

(云南省第二人民医院病理科,昆明 650021)

**摘要:**目的 观察骨髓间充质干细胞(BMSCs)移植治疗多器官功能不全综合征(MODS)模型兔的临床及心、肺、肝、肾等器官的病理改变。方法 将 35 只兔子随机分为 3 组:正常对照组 5 只,模型组 15 只,模型移植治疗组 15 只。BMSCs 体外培养、扩增、鉴定后,通过股动脉移植到患有 MODS 模型兔左心室。第 28 天处死各组兔后取器官进行病理切片。结果 BMSCs 培养能够贴壁生长,具有分化能力。模型组兔精神萎靡,反应迟钝,结膜苍白,口唇发绀,部分动物出现呼吸急促,双肺湿罗音,心、肺、肝、肾等器官出现淤血、水肿、变性坏死,炎细胞浸润等改变;模型移植治疗组临床症状明显减轻,病理改变明显减轻接近对照组。结论 BMSCs 具有良好的生物学活性,移植后通过整合能替代凋亡坏死细胞并对 MODS 起到治疗作用,对 MODS 组织修复有一定疗效。

**关键词:**骨髓间充质干细胞;多器官功能衰竭;移植;病理改变

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.29.023

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)29-3074-02

### Clinical symptoms and pathological changes in the heart, liver and lung with multiple organ dysfunction syndrome following bone marrow mesenchymal stem cells transplantation

Xie Yucheng, Fu Jin, Yang Yali, Tang Jing

(Department of Pathology, the Second People's Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650021, China)

**Abstract: Objective** To observe clinical symptoms and pathological changes in the heart, lung, liver and kidney of rabbits with multiple organ dysfunction syndrome (MODS) following bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) transplantation. **Methods** 35 rabbits were randomly divided into three groups: the normal control group ( $n=5$ ), the model group ( $n=15$ ) and the treatment group ( $n=15$ ). Rabbit BMSCs were cultured, amplified and identified in vitro, and then, transplanted left ventricle of MODS model rabbits through femoral artery. Each group rabbits were executed on the day of 28th and the organs were harvested for pathological biopsy. **Results** BMSCs could stick wall growth, with differentiation capacity. The model group rabbits were listlessness, unresponsive, pale conjunctiva, cyanotic lips, part of them polypnoea, moist rale in double lung, congestion, dropsy, degeneration necrosis and inflammation etc. changes in heart, lungs, liver, kidney and so on. The treatment group rabbits' clinical symptoms obviously reduced, pathological change significantly reduced close to the control group. **Conclusion** Bone marrow mesenchymal stem cells showed good bioactivity, through integration could substituted apoptosis and necrosis cells, had therapeutic effects on multiple organ dysfunction syndrome, with certain curative effect in tissue repair for MODS.

**Key words:** bone marrow mesenchymal stem cells; multiple organ failure; transplant; pathological change

骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)是骨髓来源的一类具有多向分化潜能的成体干细胞,可分化为骨、软骨、心肌、脂肪和肝、胆管上皮等细胞。本文旨在探索 BMSCs 移植治疗多器官功能不全综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)组织修复病理改变。

#### 1 材料与方 法

**1.1 材料** 35 只健康新西兰大耳白兔,3 个月龄,雌雄不限,体质量 2.5~3.0 kg,由中国人民解放军成都军区昆明总医院实验动物中心提供;实验动物质量合格证号 SYXK(滇)2005-0008;实验动物使用许可证号 SYXK(军)2007-041。实验前适应性饲养 1 周。实验过程中对动物的处置符合 2006 年科技部《关于善待实验动物的指导性意见》的规定。将其随机分为 3 组:(1)正常组 5 只,不做任何处理;(2)模型组 15 只,手术创伤导致失血性休克合并内毒素感染性休克导致多器官功能不全综合征。方法如下:大耳白兔称体质量,3%戊巴比妥钠按 1 mL/kg 耳缘静脉注射麻醉。麻醉后,将兔仰卧位固定于加温手术台上,腹股沟备皮,消毒,逐层分离,充分暴露股动脉和股静脉,游离 3~4 cm 股动脉。用血管夹夹闭一段动脉,在动脉上剪一小斜口,行股动脉插管,并固定导管,连接机能实验转换器,通过 Rm6240BD 多道生理信号采集处理系统监测血压、呼吸流量指标变化。初步估算血容量,一般为体质量的 5%~

6%,术后 10 min,以放血量 35%~40%复制失血性休克模型。股静脉插管,将 60%所失血液及 2 倍失血量的平衡液自股静脉 1 h 内回输复苏,造成复苏再灌注损伤<sup>[1]</sup>,为导致 MODS 且不致死亡提供治疗。术毕,把股动、静脉断端分别结扎,拔出插管。逐层缝合后放入兔笼每天进行早晚 2 次观察。根据二次打击学说<sup>[2]</sup>,术后 24 h 腹腔内注射内毒素 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[3]</sup>模拟人类脓毒症时内毒素释放入血的特点,导致 MODS。经历创伤和感染的 2 次打击,使动物能对创伤和感染因素表现出器官功能由代偿到失代偿的反应过程。(3)模型移植治疗组 15 只,手术创伤失血性休克合并内毒素感染性休克导致 MODS,进行骨髓干细胞回输治疗。术前一晚,兔禁食不禁水过夜。实验用材料、试剂等均无菌、无热源。

**1.2 临床表现观察** 通过放血和回输的方法使血压维持 40 mm Hg 1 h,体温下降 2~3  $^{\circ}\text{C}$ ,大小便失禁,血循环发生严重不足,皮肤紫绀。各组观察呼吸、心率、血压、精神状态、肛温、血常规、在第 1、7、14、21、28 天对 3 组抽血化验谷丙转氨酶(ALT)、尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、二氧化碳分压( $\text{PaCO}_2$ )、氧分压( $\text{PaO}_2$ )等。

**1.3 BMSCs 的分离及培养** 另取健康兔 5 只,在兔髂后上棘进行骨髓穿刺,抽取 5 mL 骨髓,轻柔使之充分混匀,经洗涤、离心,制备细胞悬液,采用密度梯度离心法联合贴壁培养分离

纯化的方法,选出较高纯度贴壁生长的细胞,转入 37 ℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养,经 3~4 次传代后,形成较典型的骨髓间充质干细胞。在模型成功制作 24 h 后,将体外分离、扩增、标记的 BMSCs 按照 3×10<sup>6</sup> cells/kg 通过股动脉沿升主动脉至左心室进行回输。

**1.4 病理检查准备** 第 28 天利用空气栓塞处死正常组、模型组和模型移植治疗组兔取心、肺、肾、肝、脾等器官,进行病理检查及切片。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计分析软件处理,比较用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 临床表现** 正常组兔精神好,活动如常,毛发有光泽,饮食、饮水及大便无异常,观察期间无死亡。模型组兔症状、体征变化明显,出现精神萎靡,反应迟钝,结膜苍白,口唇发绀,2 d 后部分动物出现呼吸急促,呼吸频率大于 120 次/分,双肺伴有湿罗音,部分伴有颤抖,进食、进水明显减少,10 d 左右毛发失去光泽,部分出现脱落。肛温明显升高或下降(小于 36 ℃),体质量下降,白细胞最初表现为明显的下降,后表现为持续的上升,表现为全身炎症反应的过程。观察期间超过 50%(8 只)死亡。模型移植治疗组经过干细胞移植回输治疗 15 d 后,兔呼吸状况得到改善,症状出现好转,双肺罗音消失,4 周后大部分动物基本恢复正常。手术后,各项生化指标(PaO<sub>2</sub>、BUN、ALT、CK-MB)升高;打内毒素后,升高更加明显;移植治疗组第 1、7 天与模型组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );第 14、21、28 天各项生化指标明显下降,与模型组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.2 病理检查

**2.2.1 正常组兔心、肝、脾、肾结构清晰未见异常,部分肺稍显充血。**

**2.2.2 模型组兔大体检查及镜下改变** 心脏:大体检查,体积增大,部分心室稍肥厚。镜下见心肌细胞水肿变性。间质充血水肿,炎性细胞浸润。以心内膜下充血水肿为明显,部分可见心内膜分离。观察期间死亡兔:心肌肌浆溶解或呈颗粒状凝聚致染色分布不均,呈强嗜伊红染色,部分横纹模糊不清或消失,心肌出现大小不等的空泡,心肌凝固性坏死或液化性坏死。间质水肿,大量炎性细胞浸润。肺脏:双肺大体检查,饱满肿胀,多有点片状出血,有的呈灰红色实变。镜下:肺泡水肿,淤血,肺泡腔大量红细胞、白细胞及细胞碎片,并见有肺实变。肺间质水肿,炎性细胞浸润,部分以中性粒细胞聚积为主,局部组织细胞增生,可见核分裂。毛细血管内皮细胞肿胀,红细胞淤积,形成微血栓。观察期间死亡兔部分肺显著水肿、部分实变明显。肝脏:大体检查,肝肿胀、包膜紧张,肝实质呈暗红,淤血明显,部分可见黄白色坏死灶,偶有点状出血。镜下:肝细胞排列紊乱,大部分细胞变性浊肿甚至空泡样改变,可见嗜酸性变化和毛玻璃样变性,核固缩,有细胞凋亡,部分脂肪变性,部分可见肝细胞萎缩、点状或小片状坏死,周围炎性细胞浸润。肝窦淤血扩张,门管区明显炎性细胞浸润,枯否细胞明显增生。肾脏:大体检查,肾体积增大,肿胀,呈片状淤血性改变。镜下:肾小球显著淤血或缺血,部分肾小球萎缩、消失,肾小管上皮细胞浊肿,毛玻璃样变性,部分可见上皮细胞坏死脱落,肾小管管腔变小。肾间质充血水肿,大量炎性细胞浸润。部分间质弥漫性出血,大量红细胞堆积,部分肾小管坏死钙盐沉积。脾脏:大体检查呈暗红色,镜下检查脾窦扩张淤血。

**2.2.3 模型移植治疗组兔大体检查及镜下改变** 心、肺、肝、

肾、脾大体检查无明显变化。镜下见心肌细胞少数水肿变性;肺部分充血,部分伴少量淋巴细胞为主的炎性细胞浸润。肝轻度淤血,肝细胞稍浊肿、少数空泡样改变,可见单个肝细胞坏死。肾部分肾小球轻度充血、近曲小管轻度水肿;脾轻度淤血。3 组兔重要器官显微镜下病理改变比较,见彩插 I、II 图 1~4。

## 3 讨 论

MODS 是指在严重感染、创伤、大手术及心肺复苏后等状态下,机体同时或相继发生 2 个或 2 个以上器官系统功能衰竭的临床综合征。MODS 一直是当今创伤外科和危重病医学领域中研究的热点课题。Friedenstein 等在骨髓单核细胞体外培养过程中观察到一种牢固贴壁的梭状细胞群,并建立了贴壁培养法。Piersma 等将这类骨髓中含有的具备自我更新能力和多向分化潜能的干细胞命名为 BMSCs。目前,对于 BMSCs 的分离纯化方法主要有密度梯度离心法、贴壁培养/筛选法、流式细胞仪分离法(FACS)和免疫磁珠分离法(MACS)。BMSCs 在特定条件诱导下,体外培养 BMSCs 可向成骨细胞、成软骨细胞、骨骼肌细胞、平滑肌细胞、心肌细胞和脂肪细胞、神经元样细胞、神经胶质细胞等分化<sup>[4-8]</sup>。有研究发现,BMSCs 可在一定条件诱导下能跨胚层横向分化为肝、胰岛、肾小管等细胞<sup>[9-11]</sup>。

本研究通过二次打击成功造模,MODS 模型兔消化、呼吸、神经系统临床症状明显,并有超过 50% 死亡。心、肺、肝、肾等重要脏器显著淤血、肿胀、变性坏死,肝细胞和肾小管空泡变性,部分肾小管坏死钙盐沉积;肺实变,炎性细胞浸润,通气功能障碍。体外分离培养筛选纯化骨髓干细胞,并成功把 BMSCs 移植进入模型组兔,经 BMSCs 移植治疗的 MODS 模型组兔的临床症状、生化指标及病理改变明显减轻,14 d 后 PaCO<sub>2</sub>、BUN、ALT、CK-MB 等项生化指标逐渐恢复正常。治疗组兔逐渐好转,消化功能正常,呼吸平稳,大小便正常并全部存活。

关于 BMSCs 用于 MODS 治疗未见报道,但有通过细胞分化、细胞融合和自分泌或旁分泌等机制治疗血管病变、冠心病、脑梗死、肝损伤、肾病、肺损伤等的研究报道<sup>[12]</sup>。多项研究证实,BMSCs 具有向缺血或损伤组织归巢的特性,植入模型兔进到缺血组织后与宿主受损组织相互作用,能够自分泌或旁分泌一系列因子,参与移植治疗后的免疫调节<sup>[13]</sup>。可使抗炎细胞因子 IL-10、FGF-2、TNF- $\alpha$  和 Bcl-2 蛋白明显上调,提示,BMSCs 诱导的早期肝脏和肾脏保护可能主要是通过旁分泌的抗炎功能实现的<sup>[14]</sup>。通过抗凋亡,诱导血管生成而改善梗死心肌的功能<sup>[15]</sup>,抗炎和促进增殖及存活等效应明显改善缺血后心脏、肝脏及肾脏等器官功能,促进组织修复,表明对 MODS 的治疗可能。本研究结果提示,BMSCs 移植治疗的 MODS 模型组兔是成功的,但仍需再增加病例数及观察项目,更加细致地观察治疗过程中的改变。

### 参考文献:

- [1] Chang TW. Improvement of survival from hemorrhagic shock by enterectomy in rats: finding to implicate the role of the gut for irreversibility of hemorrhagic shock[J]. J Trauma Inj Infec Crit Ca, 1997, 24(2): 202-223.
- [2] Deitch EA. Multiple organ failure: Pathophysiology and basic concepts of therapy[M]. New York: Thieme, 1990: 68-70.
- [3] 卢媛媛,尹文. 家兔失血性休克并内毒(下转第 3078 页)

TLR4 缺陷小鼠的皮质神经元在体外糖剥夺培养中有更高的生存率<sup>[8]</sup>, 结果表明神经元自身分布的 TLR4 对其存活有重要影响。

生理状态下, AST 在提供 CNS 代谢和营养支持、维持正常神经元功能、参与血脑屏障、调节突触活性等方面发挥重要作用<sup>[10-12]</sup>。脑缺血后, 兴奋性谷氨酸释放、胞外离子失衡、即早基因(c-fos, c-jun 等)的表达上调等因素引起 AST 的广泛激活并表达其标志蛋白 GFAP, 活化的 AST 向神经元传递乳酸盐、丙酮酸盐、糖原等能量物质, 并积极清除细胞外兴奋性氨基酸, 从而发挥微调节神经元微环境作用。此外, AST 还可通过合成 NGF、减少自由基形成、抑制白细胞和血小板的黏附聚集、抑制细胞凋亡、减少钙超载等效应, 以及参与神经元突触的生成等环节发挥神经保护和促神经修复的作用<sup>[13]</sup>。本研究结果显示, 无论 CIP 组还是 MCAO 组, 随着再灌注时间延长, 脑梗死灶周围 GFAP 的表达均有增加趋势, 与 MCAO 组比较, 同时段 CIP 组 GFAP 阳性细胞数目明显较多, 鉴于 AST 在神经元保护中的重要作用, 有理由相信这种早期 CIP 引发的 AST 活化参与了 BIT 的发生过程。同时, 本实验也提示 GFAP 表达上调的激发与维持并不完全依赖 TLR4 信号通路的活化, 该过程是否有其他 TLRs(如 TLR2、TLR9)参与、AST 的 GFAP 表达增强与其神经保护功能的具体机制等问题尚需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Plamondon H, Davignon G, Khan S. Cerebral ischemic preconditioning induces lasting effects on CA1 neuronal survival, prevents memory impairments but not ischemia-induced hyperactivity[J]. *J Behav Brain Res*, 2008, 189(1):145-147.
- [2] Longa EZ, Weinstein PR, Calson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-86.
- [3] 龚彪, 李长清, 黄剑. 大鼠线栓法局灶性脑缺血/再灌注模

型的改进[J]. *重庆医学*, 2006, 35(4):313-316.

- [4] 金生, 张大志, 陈压西. Toll 样受体研究进展与临床免疫[J]. *重庆医学*, 2004, 33(9):1423-1424.
- [5] Kielian T. Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis[J]. *J Neurosci Res*, 2006, 83(5):711-713.
- [6] Hyakkoku K, Hamanaka J, Tsuruma K, et al. Toll-like receptor 4(TLR4), but not TLR3 or TLR9, knock-out mice have neuroprotective effects against focal cerebral ischemia[J]. *Neuroscience*, 2010, 171(2):258-261.
- [7] Laflamme N, Rivest S. Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram negative bacterial cell wall components[J]. *Mol Immunol*, 2005, 42(2):155-157.
- [8] Tang SC, Arumugam TV, Xu X, et al. Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2007, 104(6):798-801.
- [9] Thiruma V, Arumuga M, Okun E, et al. Toll-like receptors in ischemia-reperfusion injury[J]. *Shock*, 2009, 32(1):4-6.
- [10] Feeney CJ, Stys PK. Astrocyte: response to injury[J]. *J Encyc of Neurosci*, 2009, 58(7):837-839.
- [11] 张敬军. 星形胶质细胞的研究[J]. *中国药理学通报*, 2006, 22(7):788-790.
- [12] Benarroch EE. Astrocyte-neuron interactions: Implications for epilepsy[J]. *J Neurology*, 2009, 73(16):1323-1325.
- [13] Moxon-Emre I, Schlichter LC. Evolution of inflammation and white matter injury in a model of transient focal ischemia[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2010, 69(1):1-3.

(收稿日期:2012-03-09 修回日期:2012-04-21)

(上接第 3075 页)

- 素诱发多器官功能障碍综合征模型制备[J]. *江苏医药*, 2005, 31(6):448-451.
- [4] Ouyang HW, Cao T, Zou XH, et al. Mesenchymal stem cells sheets revitalize nonviable dense grafts; implications for repair of large bone and tendon defects[J]. *Transplant*, 2006, 82(2):170-174.
- [5] Sim WY, Park SW, Park SH, et al. A pneumatic micro cell chip for the differentiation of human mesenchymal stem cells under mechanical stimulation[J]. *Lab Chip*, 2007, 7(12):1775-1778.
- [6] Wang X, Dong Z, Zhong XH, et al. Transforming growth factor-beta1 enhanced vascular endothelial growth factor synthesis in mesenchymal stem cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 365(3):548-550.
- [7] Pansky A, Roitzheim B, Tobiasch E. Differentiation potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Clin Lab*, 2007, 53(1):81-84.
- [8] Benayahu D, Akaviau D, Shur I. Differentiation of bone marrow stroma-derived mesenchymal cells[J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14(2):173-179.
- [9] Lange C, Bassler P, Lioznov MV, et al. Hepatocytic gene

expression in cultured rat mesenchymal stem cells[J]. *Transplant Proc*, 2005, 37(1):276-279.

- [10] Wang PP, Wang JH, Yan ZP, et al. Expression of hepatocyte like phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320(3):712-716.
- [11] John ML, Wang PP, Carol KL, et al. Hepatic potential of bone marrow stromal cells: development of in vitro coculture and intra-portal transplantation models[J]. *J Immunol Methods*, 2005, 305(1):39-47.
- [12] 冯刚, 罗利琼, 陈焕朝. 骨髓间充质干细胞在肝脏疾病中的研究[J]. *重庆医学*, 2010, 39(20):2814-2816.
- [13] 杨媛媛, 周诺. 骨髓间充质干细胞作为组织工程种子细胞的研究进展[J]. *广西医学*, 2010, 32(5):586-589.
- [14] Di Campli C, Zocco MA, Saulnier N, et al. Safety and efficacy profile of G-CSF therapy in patients with acute on chronic liver failure[J]. *Dig Liver Dis*, 2007, 39(12):1071-1076.
- [15] 冯吉, 陈东风. 骨髓间充质干细胞的旁分泌作用[J]. *重庆医学*, 2011, 40(13):1332-1333.

(收稿日期:2012-03-09 修回日期:2012-04-22)