

骨髓间充质干细胞对多器官功能障碍综合征大鼠炎症因子表达的影响

修光辉 周霞 李秀玲 孙洁 陈献忠 陈晓雷 潘兴华 凌斌

【摘要】目的 探讨骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSC) 对多器官功能障碍综合征 (MODS) 大鼠炎症因子表达的影响。**方法** 体外培养 4 周龄 SD 大鼠 BMSC 并鉴定成功, 取第四代 BMSC 用于实验, 按照随机数字表法将 SD 大鼠分成 3 组 (每组 20 只): 即假手术 (Sham) 组、MODS 组和 BMSC 组。MODS 组大鼠经大隐静脉注射脂多糖 (LPS, 1 mg/kg) 制作动物模型, Sham 组注射等量磷酸盐缓冲液 (PBS), BMSC 组在造模后 2 h 内经尾静脉输注 BMSC (1×10^6 / 只, 0.5 mL)。术后 72 h 观察三组大鼠的存活率并绘制生存曲线; 采用苏木精-伊红 (HE) 染色观察肺脏、肝脏、心脏组织的病理学改变; 血气分析和生化检测评估器官功能; 采用蛋白芯片技术检测 34 种相关炎症因子, 筛选差异表达因子, 用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 验证差异表达因子。多组定量资料采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, 生存曲线差异的比较采用 Log-rank 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。**结果** Sham 组、MODS 组和 BMSC 组大鼠生存率分别为 100%、60%、80%; 生存曲线显示, Sham 组的生存率明显大于 MODS 组及 BMSC 组 (Sham vs. MODS $\chi^2=9.798$, $P=0.0017$; Sham vs. BMSC $\chi^2=4.333$, $P=0.0374$); BMSC 组的生存率大于 MODS 组 (BMSC vs. MODS $\chi^2=2.408$, $P=0.1207$), 但差异无统计学意义。HE 染色结果显示, MODS 组肺脏、肝脏、心脏组织充血水肿, 炎症细胞浸润, BMSC 组组织水肿与炎症细胞浸润减轻; 血气分析及生化指标检测显示, 与 Sham 组比较, MODS 组 pH、PaCO₂、乳酸 (Lac) 的水平明显升高 (均 $P < 0.01$), 总胆红素 (TB) 明显升高 [(0.801 ± 0.501)U/L vs. (2.533 ± 0.382)U/L, $P=0.003$] 及白蛋白 (ALB) 明显降低 [(35.471 ± 4.015)U/L vs. (23.202 ± 4.872)U/L, $P < 0.01$], 肌酸激酶 (CK) 明显升高 [(315.670 ± 41.402)U/L vs. (708.250 ± 219.201)U/L, $P=0.042$]; BMSC 组各器官功能指标较 MODS 组明显改善 (均 $P < 0.05$)。细胞因子蛋白芯片检测示, γ -干扰素 (IFN- γ) 和单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 为差异表达因子, ELISA 验证结果与其一致: 与 Sham 组比较, MODS 组 IFN- γ 与 MCP-1 表达均明显升高 (均 $P < 0.01$); 与 MODS 组比较, BMSC 组 IFN- γ 与 MCP-1 的表达明显降低 ($P < 0.01$)。**结论** BMSC 可抑制炎症因子 IFN- γ 和 MCP-1 的表达来调控 MODS 大鼠的炎症反应, 改善器官功能, 促进组织修复, 从而提高 MODS 大鼠的存活率。

【关键词】 多器官功能障碍综合征; 骨髓间充质干细胞; 干扰素- γ ; 单核细胞趋化因子-1; 炎症因子

Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on the expressions of inflammatory factors in rats with multiple organ dysfunction syndrome Xiu Guanghui, Zhou Xia, Li Xiuling, Sun Jie, Chen Xianzhong, Chen Xiaolei, Pan Xinghua, Ling Bin

ICU Department, the Fourth Affiliated Hospital of Kunming Medical University (the Second People's Hospital of Yunnan Province), Kunming 650021, China (Xiu GH, Zhou X, Sun J, Chen XZ, Chen XL, Ling B); Obstetrics Department, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650031, China (Li XL); Clinical Laboratory Department, Kunming General Hospital of Chengdu Military Region, Kunming 650032, China (Pan XH)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2018.09.007

基金项目: 国家自然科学基金 (81360289); 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项资金 [2017FE468 (-180), 2015FB079, 2013FB185, 2012FB076, 2017FE467 (-194)]; 云南省高层次卫生计生技术人才培养经费资助 (H-2017060)

作者单位: 650021 昆明, 昆明医科大学第四附属医院 (云南省第二人民医院) 重症医学科 (修光辉、周霞、孙洁、陈献忠、陈晓雷、凌斌); 650031 昆明, 云南省第一人民医院产科 (李秀玲); 650032 昆明, 解放军昆明总医院临床实验科 (潘兴华)

通信作者: 凌斌, Email: ynshhyicu@163.com

Corresponding author: Ling Bin, Email: ynshhyicu@163.com

【 Abstract 】 Objective To investigate the effects of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) on the expression of inflammatory factors in rats with multiple organ dysfunction syndrome (MODS). **Methods** BMSC extracted from the 4-week-old Sprague-Dawley (SD) rats was cultivated and identified in vitro, then the 4th passage of which was used in the experimental study. Sixty SD rats were randomly (random number) divided into three groups ($n=20$ in each group): Sham group (SG), MODS group (MG) and BMSC group (BG). Rats in the MG was injected by 1 mg/kg lipopolysaccharide (LPS) via great saphenous vein, rats in the SG injected with the same volume sterile phosphate buffer saline and rats in the BG infused by 1×10^6 /cells BMSCs through the tail vein at 2 h after LPS injection. The survival rate, tissue pathological changes of the lung, liver and heart by hematoxylin and eosin (HE) staining, organ dysfunction measurement by blood gas analysis and biochemical indicators as well as the related inflammatory factors by protein microarray and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), were detected 72 h post operation. Multi-group quantitative data was analyzed by one way ANOVA, paired-comparisons by LSD-*t* test and the comparisons of survival curves in the three groups by Log-rank test. The value of $P < 0.05$ was considered statistically significant. **Results** The survival rate in SG, MG and BG was 100%, 60% and 80%, respectively. The survival curves showed that the survival rate of SG was higher than the MG and BG (SG vs. MG, $\chi^2=9.798$, $P=0.0017$; SG vs. BG, $\chi^2=4.333$, $P=0.0374$), but there was no significant difference comparing the BG to the MG ($\chi^2=2.408$, $P=0.1207$). The tissue congestion and edema, and inflammatory cells infiltration in the lung, liver, and heart of the MG were observed by HE staining, while these changes reduced in the BG. Compared with the SG, the levels of pH and PaCO₂ and lactic acid (Lac) increased significantly (all $P < 0.01$), the level of total bilirubin (TB) significantly increased [(0.801±0.501)U/L vs. (2.533±0.382)U/L, $P=0.003$], while the albumin (ALB) level decreased significantly [(35.471±4.015)U/L vs. (23.202±4.872)U/L, $P < 0.01$], and creatine kinase (CK) level increased significantly in MG [(315.670±41.402) vs. (708.250±219.201), $P=0.042$]. After BMSC treatment, the organ function improved significantly (all $P < 0.05$). Gamma interferon (IFN- γ) and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) were the differential expression factors in protein chips. The results of ELISA were similar to the protein chips: compared with the SG, IFN- γ and MCP-1 expressions in the MG increased significantly ($P < 0.01$). Compared with MG, the expressions of IFN- γ and MCP-1 decreased significantly in the BG ($P < 0.01$). **Conclusion** BMSC administration could modulate the inflammatory response of MODS rats by inhibiting the levels of IFN- γ and MCP-1, and improve the organ function and the survival rate.

【 Key words 】 Multiple organ dysfunction syndrome; Bone marrow mesenchymal stem cells; Interleukin - γ ; Monocyte chemoattractant protein-1; Inflammatory factor

多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS) 是重症医学科最常见的临床综合征, 其病理生理机制比较复杂, 涉及炎症失控、细菌毒素、免疫抑制及缺血-再灌注等, 其中炎症因子的释放在 MODS 的演变过程中发挥着重要作用^[1-2]。临床治疗策略有限, 大量研究表明, 骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSC) 具有抗炎、免疫调节、抗凋亡及组织修复等功能^[3-4], 但其治疗 MODS 炎症调节机制尚不清楚。本实验通过内毒素脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 建立大鼠 MODS 模型,

探讨 BMSC 移植对 MODS 炎症因子调控作用, 为 MODS 的治疗及生物标志物探索提供实验及理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

磷酸盐缓冲液 (PBS) 购自美国 Hyclone 公司 (SH3025601B)、脂多糖 (LPS) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; DMEM/F12 培养基购自美国 Invitrogen 公司; 10% 特级胎牛血清购自美国 Hyclone 公司; 流式细胞仪购自美国 B.D Calibur 公

司; anti-CD34 购自美国 Abcam 公司, anti-CD44、anti-CD45、anti-CD90 均购自美国 Ebioscience 公司, 水合氯醛购自中国 Solarbio 公司, 细胞因子抗体芯片工具、白细胞介素 (IL-4) 及晚期糖基化终产物受体 (RAGE) 的酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒均购自美国 RayBiotech 公司。

1.2 动物分组与 MODS 模型制备

Sprague-Dawley (SD) 大鼠 60 只 (雌雄不限, 体质量 180~220 g), 由成都军区昆明总医院医学动物实验中心提供, 动物合格证号: SYXK(滇), 2014-2015。饲养条件: 室温 20~25 °C, 湿度 50%~70%, 光照/黑暗各 12 h 循环, 自由摄食饮水。按照随机数字表法将动物分成 3 组, 每组 20 只, MODS 组经大隐静脉注射 LPS (1 mg/kg); Sham 组经大隐静脉注射 PBS (剂量与 MODS 组相同); BMSC 组在 LPS 注射后 2 h 内经尾静脉输注 BMSC (10^6 只, 0.5 mL)。本实验动物处置方法符合昆明医科大学动物实验伦理审查委员会的相关要求。整个动物实验过程在解放军昆明总医院动物实验中心完成。

1.3 BMSC 的提取、培养及鉴定

4 周龄左右 SD 大鼠, 引颈处死, 75% 乙醇浸泡 5 min, 解剖分离出股骨、胫骨, 浸在含双抗的 DEME 培养基中, 用 5 mL 注射器抽取含 10% 特级胎牛血清的低糖 DMEM 培养液从股骨、胫骨两端反复冲洗骨髓腔, 获得细胞悬液 4 mL, 离心 5 min 后接种于 T175 细胞培养瓶中补充 DEME 培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中进行原代培养, 48 h 后首次换液, 去除未贴壁细胞, 当原代细胞融合到 80%~90% 后用胰蛋白酶消化传代培养。经免疫化学分析, 体外培养的 BMSC 细胞表面抗原如 CD34⁺, CD45⁺, CD90⁺, CD44⁺, 采用相应抗体免疫荧光染色, 流式细胞仪鉴定 BMSC。取第四代 BMSC 用于实验, 在 LPS 注射后 2 h 内经尾静脉缓慢注射 (10^6 只, 0.5 mL)。

1.4 观察大鼠存活率、血气、生化指标及苏木精-伊红染色检测

观察各组大鼠 72 h 的存活率, 绘制生存曲线; 术后 72 h 采用 4% 水合氯醛 (400 mg/kg, 腹腔注射) 麻醉动物, 取腹主动脉血进行血气分析和生化检测 (肝功能, 心肌酶学); 然后留取肺脏, 肝脏、心脏组织用 4% 多聚甲醛固定、常规石蜡包埋、切片 (厚 4 μm), 苏木精-伊红 (HE) 染色后, 光镜下观

察组织病理学变化。

1.5 细胞因子蛋白芯片检测

采用细胞因子芯片技术检测术后 72 h 各组血清中相关 34 种炎症因子的表达。根据美国 Ray-Biotech 公司 AAR-CYT-G2 蛋白芯片试剂盒的说明书, 将 34 种目标因子排布于芯片上; 采用膜成像系统检测相关信号, 并将信号强度量化, 不同膜的阳性对照作为标准。

1.6 ELISA 细胞因子的量化

采用 ELISA 技术验证有明显差异的细胞因子。按试剂盒说明进行操作, 使用各种稀释浓度制作标准。根据标准曲线计算这些细胞因子的表达水平。所有样品和标准重复测量 2 次。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行分析 and 处理。多组定量资料采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, 生存曲线差异的比较采用 Log-rank 检验, 数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 Ray Bio AAR-CYT-G2 软件分析细胞因子芯片的数据, 其结果用信号比值来表示, 根据厂家说明书及实验需要, 信号比值 >2 或者 <0.5 认为有明显差异。

2 结果

2.1 BMSC 的培养及鉴定

流式细胞仪鉴定显示, 细胞 91.85% 属于一个细胞群体 (图 1A), 其表面抗原检测: CD90⁺ (95.5%), CD44⁺ (85.44%) (图 1B-C), CD90⁺CD34⁺ 的细胞群占 86.31% (图 1D), CD44⁺CD45⁺ 的细胞群占 78.23% (图 1E), 结果显示培养的细胞为 BMSC。

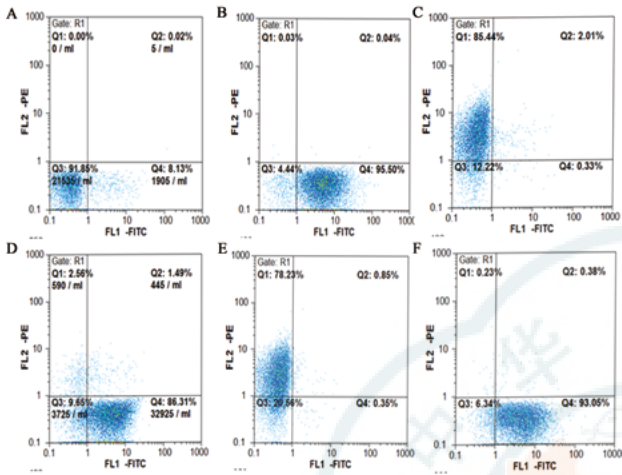
2.2 动物生存曲线比较 (生存率)

Sham 组, MODS 组以及 BMSC 组中大鼠术后 72 h 的生存率分别为 100%、60%、80%。三组生存率进行 log-rank 法检验显示 (图 2): Sham 组的生存率明显大于 MODS 组及 BMSC 组 (Sham vs. MODS $\chi^2=9.798$, $P=0.0017$; Sham vs. BMSC $\chi^2=4.333$, $P=0.0374$), 差异有统计学意义; BMSC 组的生存率大于 MODS 组 (BMSC vs. MODS $\chi^2=2.408$, $P=0.1207$), 但差异无统计学意义。

2.3 组织病理学变化

HE 染色结果显示, 与 Sham 组比较, MODS 组的各受损器官肺脏、肝脏、心脏组织细胞充血水

肿, 细胞间隔增宽, 炎症细胞浸润; BMSC 组受损器官组织仍有不同程度的充血水肿, 炎症细胞浸润, 但较 MODS 组组织水肿及炎症细胞浸润有所减轻, 见图 3。



A: 空白对照组; B: 单标抗体 CD90⁺; C: 单标抗体 CD44⁺; D: 双标抗体 CD90⁺CD34⁺; E: 双标抗体 CD44⁺CD45⁺; F: 绿色荧光蛋白 (GFP) 标记的 BMSC; FITC 为异硫氰酸荧光素, PE 为藻红蛋白

图 1 BMSC 的流式细胞仪鉴定

Fig 1 Identification of BMSC by flow cytometry

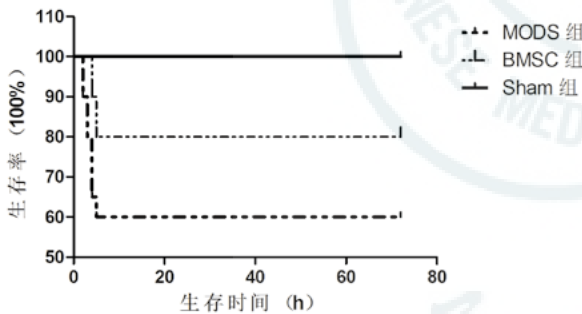


图 2 三组大鼠的生存率比较 (log-rank 法检测)

Fig 2 Survival analysis of rats in the three groups (log-rank test)

2.4 器官功能检测

动脉血气分析结果显示, 与 Sham 组比较, MODS 组中 pH 值显著降低 ($F=14.101, P<0.01$), 动脉二氧化碳分压 PaCO₂ ($F=1.821, P=0.009$), 血乳酸 Lac ($F=85.333, P<0.01$) 显著升高, 而动脉氧分压 PO₂ 虽有变化, 但差异无统计学意义 ($P=0.065$); 与 MODS 组比较, BMSC 组 pH 显著升高 ($F=14.101, P=0.001$), PaCO₂、Lac 显著降低 ($F=1.821, P=0.032; F=85.333, P<0.01$), 而 PaO₂ 的差异无统计学意义 ($P=0.124$)。BMSC 组与 Sham 组比较, pH, PO₂, PaCO₂, Lac 差异均无统计学意义 ($P=0.098, P=0.657, P=0.589, P=0.053$), 见表 1。

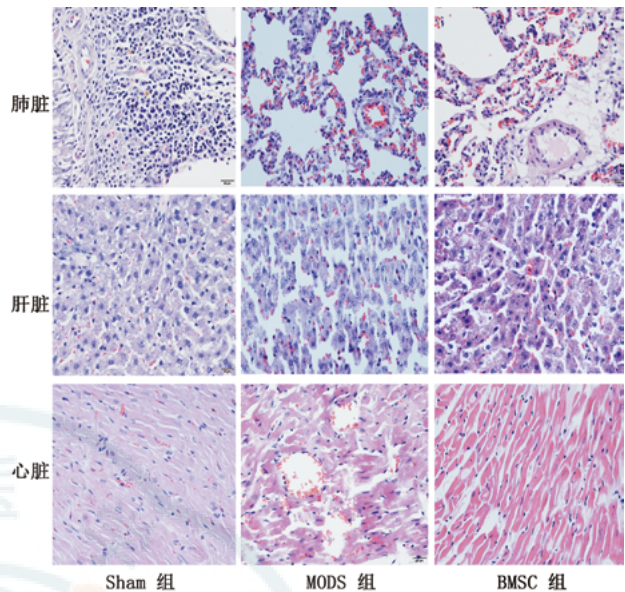


图 3 病理组织 HE 染色 (×400)

Fig 3 Hematoxylin and eosin staining of tissue (original magnification ×400)

生化指标结果显示, 与 Sham 组比较, MODS 组中总胆红素 TB、肌酸激酶 CK 明显升高 ($F=19.000, P=0.003; F=12.582, P=0.002$); 白蛋白 ALB 水平明显降低 ($F=8.697, P=0.006$); BMSC 组 TB 及 CK 的水平显著降低 ($F=19.000, P=0.002; F=12.582, P=0.007$), 白蛋白水平明显升高 ($F=8.697, P=0.039$)。BMSC 组与 Sham 组比较, TB, ALB, CK 差异均无统计学意义 ($P=0.679, P=0.187, P=0.075$); 三组组间比较肌钙蛋白 I 的水平差异无统计学意义 ($F=1.851, P=0.199$), 见表 2。

表 1 三组动物术后 72 h 的动脉血气分析结果

Table 1 Results of arterial blood gas analysis 72 h after surgery in the three groups

| 组别 | pH | PaO ₂ (mmHg) | PaCO ₂ (mmHg) | Lac (mmol/L) |
|--------|----------------------------|-------------------------|------------------------------|----------------------------|
| Sham 组 | 7.337 ± 0.062 | 91.752 ± 11.352 | 46.665 ± 3.783 | 1.351 ± 0.241 |
| MODS 组 | 7.219 ± 0.064 ^a | 64.671 ± 28.911 | 65.667 ± 17.612 ^a | 6.172 ± 0.632 ^a |
| BMSC 组 | 7.299 ± 0.054 ^b | 86.333 ± 6.431 | 50.333 ± 13.312 ^b | 2.432 ± 0.353 ^b |

注: 与 Sham 组比较, ^a $P<0.05$; 与 MODS 组比较, ^b $P<0.05$; PaO₂, 动脉血氧分压; PaCO₂, 动脉血二氧化碳分压; Lac, 乳酸

表 2 三组动物术后 72 h 的生化指标检测结果

Table 2 Biochemical indices 72 h after surgery in the three groups

| 组别 | TB (U/L) | ALB (U/L) | cTnI (ng/mL) | CK (U/L) |
|--------|----------------------------|-----------------------------|---------------|--------------------------------|
| Sham 组 | 0.801 ± 0.501 | 35.471 ± 4.015 | 0.026 ± 0.134 | 315.670 ± 41.402 |
| MODS 组 | 2.533 ± 0.382 ^a | 23.202 ± 4.872 ^a | 0.114 ± 0.129 | 708.250 ± 219.201 ^a |
| BMSC 组 | 0.934 ± 0.211 ^b | 31.031 ± 0.401 ^b | 0.106 ± 0.047 | 471.502 ± 153.363 ^b |

注: 与 Sham 组比较, ^a $P<0.05$; 与 MODS 组比较, ^b $P<0.05$; TB, 总胆红素; ALB, 白蛋白; cTnI, 肌钙蛋白 I; CK, 肌酸激酶

2.5 细胞因子蛋白芯片分析

34 种目标因子在蛋白芯片上清晰可见, 蛋白芯片 (图 4) 及分析结果 (表 3) 显示, 与 Sham 组比较, MODS 组 IFN- γ 和 MCP-1 的表达水平升高 (信号比值分别为 5.763, 3.474)。BMSC 移植治疗后, IFN- γ 和 MCP-1 的表达水平明显降低 (信号比值分别 0.104, 0.185); 各因子排布情况见图 5。

2.6 血清差异细胞因子的量化

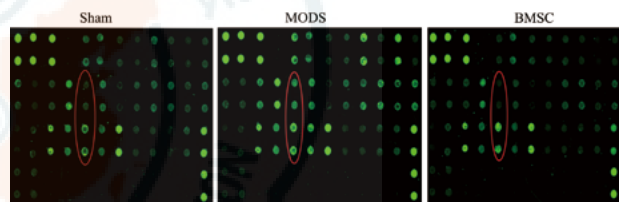
酶联免疫吸附实验 (ELISA) 对蛋白芯片显示的差异蛋白进行量化验证, 其检测结果与芯蛋白芯片结果一致 (表 4): 与 Sham 组比较, MODS 组 IFN- γ 和 MCP-1 的表达水平显著上调 ($F=61.511, P<0.01; F=193.295, P<0.01$); 与 MODS 组比较, BMSC 组 IFN- γ 和 MCP-1 的表达水平显著下调 ($F=61.511, P=0.001; F=193.295, P<0.01$); BMSC 组与 Sham 组比较, 差异无统计学意义 ($P=0.051, P=0.834$)。

3 讨论

本实验运用 LPS 成功制作了 MODS 大鼠模型, 血清中细胞因子 IFN- γ 与 MCP-1 表达明显上调, 受损器官 (肺、肝、心) 出现组织形态学的改变及器官功能的下降, 动物存活率的明显降低, 而

给予 BMSC 移植干预后, 血清中细胞因子 IFN- γ 与 MCP-1 表达明显下调, 受损组织修复及器官功能改善, 动物存活率提高。实验结果表明 BMSC 能够促进 MODS 大鼠器官修复及功能改善, 可能与抑制 MODS 的炎症细胞因子释放有关, 特别是 IFN- γ 与 MCP-1 密切相关。

BMSC 作为组织工程及再生医学中常用的干细胞, 具有广泛的生物学作用, 可抑制炎症, 改善凝血功能, 调节先天性和获得性免疫反应, 促进缺血组织和血管再生, 促进受损器官的修复等^[4-8], 但具体机制不清。本实验探讨了 BMSC 调控 LPS 所致 MODS 炎症反应的潜在机制, 其结果表明 BMSC 可抑制炎症细胞因子 IFN- γ 与 MCP-1 的表达与释放, 进而调节机体的促炎与抗炎反应的平衡, 促进受损器官组织的修复。



红框表示有差异的细胞因子 (自上而下分别是 IFN- γ 与 MCP-1, 每个因子重复两次) 荧光强度越强表示蛋白质越多

图 4 细胞因子芯片中各因子的表达情况
Fig 4 Expressions of cytokines in the chips

表 3 目标因子在三组的信号比值变化 (Fold Changes)
Table 3 Fold changes of the target factors in the three group

| 目标因子 | Sham 组 | MODS 组 | BMSC 组 | MODS 组/Sham 组 | BMSC 组/MODS 组 | BMSC 组/Sham 组 |
|---------------|--------|--------|--------|---------------|---------------|---------------|
| IFN- γ | 3 271 | 18 851 | 1 955 | 5.763 | 0.104 | 0.598 |
| MCP-1 | 8 749 | 30 395 | 5 628 | 3.474 | 0.185 | 0.643 |

注: 细胞因子信号值 >400, 信号比值 >2 或 <0.5, 表示该因子为差异性表达因子。IFN- γ , 干扰素 - γ ; MCP-1, 单核细胞趋化因子 -1

| | | | | | | | | | | | |
|---------------|-------------|--------|------------|---------------|----------------|--------------|--------------|-------------|-----------------|---------------------|--------|
| POS 1 | POS 2 | POS 3 | NEG | Activin A | Agrin | B7-2/CD86 | β -NGF | CINC-1 | CINC-2 α | CINC-3 | CNTF |
| POS 1 | POS 2 | POS 3 | NEG | Activin A | Agrin | B7-2/CD86 | β -NGF | CINC-1 | CINC-2 α | CINC-3 | CNTF |
| Fas Ligand | Fractalkine | GM-CSF | ICAM-1 | IFN- γ | IL-1 α | IL-1 β | IL-1 R6 | IL-2 | IL-4 | IL-6 | IL-10 |
| Fas Ligand | Fractalkine | GM-CSF | ICAM-1 | IFN- γ | IL-1 α | IL-1 β | IL-1 R6 | IL-2 | IL-4 | IL-6 | IL-10 |
| IL-13 | Leptin | LIX | L-Selectin | MCP-1 | MIP-3 α | MMP-8 | PDGF-AA | Prolactin R | RAGE | Thymus Chemo kine-1 | TIMP-1 |
| IL-13 | Leptin | LIX | L-Selectin | MCP-1 | MIP-3 α | MMP-8 | PDGF-AA | Prolactin R | RAGE | Thymus Chemo kine-1 | TIMP-1 |
| TNF- α | VEGF | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | POS 1 |
| TNF- α | VEGF | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | POS 1 |

POS, 阳性对照; NEG, 阴性对照; CINC, 中性粒细胞趋化因子; Fractalkine, 一种趋化因子; CNTF, 睫状神经营养因子; GM-CSF, 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子; ICAM-1, 细胞间黏附分子 -1; IFN- γ , 干扰素 - γ ; IL, 白介素; LIX, 一种趋化因子; MCP, 单核细胞趋化因子; MIP, 巨噬细胞炎症蛋白质; MMP-8, 基质金属蛋白酶 -8; PDGF-AA, 血小板源生长因子 -AA; PRLR, 催乳素受体; RAGE, 晚期糖化终产物受体; ThymusChemokine1, 胸腺趋化因子; TIMP-1, 金属蛋白组织抑制剂 1; TNF- α , 肿瘤坏死因子 - α 。每个抗体每组重复 2 次, 阳性与阴性对照用于确定数组之间的信号变化

图 5 AAR-CYT-G2 检测的 34 种细胞因子在芯片上的排布
Fig 5 Maps of 34 cytokines detected by AAR-CYT-G2

表 4 ELISA 检测目标因子的变化
Table 4 The test results of target factors by ELISA

| 组别 | IFN- γ (pg/mL) | MCP-1 (pg/mL) |
|--------|---|--------------------------------------|
| Sham 组 | 7 540.523 \pm 1 052.901 | 104.601 \pm 6.523 |
| MODS 组 | 21 383.053 \pm 1 823.453 ^a | 1 384.217 \pm 160.075 ^a |
| BMSC 组 | 13 563.526 \pm 1 617.063 ^b | 87.997 \pm 8.985 ^b |

注：与 Sham 组比较，^a $P < 0.01$ ；与 MODS 组比较，^b $P < 0.01$ ；IFN- γ ，干扰素- γ ；MCP-1，单核细胞趋化因子-1

在脓毒血症中，炎症因子的过度分泌诱发瀑布级联反应，导致 MODS 的发生发展。IFN- γ 是重要的炎症细胞因子，可调控机体的免疫炎症反应；同时作为主要的巨噬细胞活化因子，又可提高巨噬细胞对 LPS 反应的敏感性，并促进其他炎症细胞因子（如 TNF- α 、IL-1、IL-6）的过度表达，从而加重炎症风暴的发生，导致组织的损伤^[9]。IFN- γ 与其他炎症因子相互作用，一方面可增强机体杀灭微生物的能力，然而其 IFN- γ 的过度分泌又会引起机体的促炎与抗炎反应的失衡，导致疾病的进一步发展，最终导致 MODS 的发生发展。本研究中 BMSC 的治疗可明显抑制 IFN- γ 的过度表达，从而减轻炎症级联反应，促进组织修复。已有研究证明 BMSC 可以减弱巨噬细胞分泌大量炎症因子^[10]，减弱 1 型成熟树突状细胞对 TNF- α 释放^[11]，减轻炎症反应。亦有研究表明，当脓毒症患儿病情逐渐好转时，IFN- γ 、TNF- α 、IL-8 逐渐降低，提示 IFN- γ 的降低可作为反映治疗细菌感染有效的指标^[12]。

在 MODS 的发展过程中，除促炎因子参与外，趋化因子在调控中性粒细胞活化和游走过程中亦起到关键作用。MCP-1 是最重要的单核细胞趋化因子，参与了脓毒症组织损伤过程，其可调节单核/巨噬细胞的迁移和浸润，加重血管内皮及其周围组织的损害。Bozza 等^[13]研究发现细胞因子浓度与器官功能紊乱的程度及进展相关，在脓毒性休克患者中 MCP-1 的浓度比在严重脓毒症患者中明显升高，且与疾病预后差正相关，其高表达水平可作为预测脓毒症患者病死率的指标之一。有研究表明，MCP-1 不仅趋化单核细胞到达损伤及感染部位，而且可促进抗炎因子 IL-10 的合成，MCP-1 可能是脓毒症由促炎阶段向免疫抑制阶段演变的一个关键要素^[14]。MCP-1 有望作为判断炎症反应阶段的一个新的生物标记物^[15]。

促炎和抗炎因子的相互平衡对机体内环境保持稳定具有重要意义。脓毒症时促炎因子和抗炎因子同时升高提示预后不佳，导致失控性炎症介质

释放，可能与免疫反应的极度紊乱有关^[13]。因此，减少失控性炎症介质释放，调节促炎和抗炎因子的平衡是治疗脓毒症所致 MODS 的重点。本研究运用 LPS 建立大鼠 MODS 模型，诱发了严重的炎症反应，发现肺脏、肝脏以及心脏组织充血水肿明显，大量炎症介质浸润，内皮细胞损伤与破坏，血气分析及生化检测也发现受损器官功能出现障碍，动物的存活率大大降低。这可能与脓毒症导致的炎症介质、补体和凝血系统的大量激活，内皮和上皮细胞屏障的破坏，炎症及免疫系统的紊乱密切相关^[16]，最终导致机体器官衰竭。

综上所述，本实验探讨了 BMSC 对 LPS 诱导的 MODS 大鼠中炎症因子表达的调控作用，结果显示 BMSC 可抑制 IFN- γ 和 MCP-1 的表达来调控 MODS 大鼠的炎症反应，从而促进损伤组织的修复，改善器官功能，提高大鼠的存活率。本研究结果有助于为临床上脓毒症及 MODS 的治疗提供新的方法及实验理论依据。

参考文献

- [1] Shukla P, Rao GM, Pandey G, et al. Therapeutic interventions in sepsis: current and anticipated pharmacological agents [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(22):5011-5031. DOI:10.1111/bph.12829.
- [2] Rosenthal MD, Moore FA. Persistent inflammation, immunosuppression, and catabolism: evolution of multiple organ dysfunction[J]. *Surg Infect (Larchmt)*, 2016, 17(2): 167-172. DOI:10.1089/sur.2015.184.
- [3] Zhou J, Jiang LY, Long X, et al. Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells inhibit gastric aspiration lung injury and inflammation in rats[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(9): 1706-1717. DOI:10.1111/jcmm.12866.
- [4] Xie XL, Liu HH, Wu JH, et al. Rat BMSC infusion was unable to ameliorate inflammatory injuries in tissues of mice with LPS-induced endotoxemia[J]. *Biomed Mater Eng*, 2017, 28(s1): S129-138. DOI:10.3233/BME-171634.
- [5] Xu SY, Zhou Z, Li H, et al. BMSCs ameliorate septic coagulopathy by suppressing inflammation in cecal ligation and puncture-induced sepsis[J]. *J Cell Sci*, 2018, 131(3). pii: jcs.211151. DOI: 10.1242/jcs.211151.
- [6] Monsel A, Zhu YG, Gennai S, et al. Cell-based therapy for acute organ injury: preclinical evidence and ongoing clinical trials using mesenchymal stem cells[J]. *Anesthesiology*, 2014, 121(5): 1099-1121. DOI:10.1097/ALN.0000000000000446.
- [7] Miao CM, Jiang XW, He K, et al. Bone marrow stromal cells attenuate LPS-induced mouse acute liver injury via the prostaglandin E 2-dependent repression of the NLRP3 inflammasome in Kupffer

- cells[J]. Immunol Lett, 2016, 179: 102-113. DOI:10.1016/j.imlet.2016.09.009.
- [8] Eirin A, Lerman LO. Mesenchymal stem cell treatment for chronic renal failure[J]. Stem Cell Res Ther, 2014, 5(4): 83. DOI:10.1186/scrt472.
- [9] 田园, 丁壮, 岳玉环. 干扰素 γ 生物学功能及其应用的研究进展 [J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 23(10): 1147-1150. DOI:10.13200/j.cjb.2010.10.118.tiany.016.
- [10] 李香琴, 朱俊宇, 马妮, 等. 咪唑克生对内毒素攻击小鼠体内及体外活化巨噬细胞炎症介质释放的抗炎效应 [J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28(5): 445-449. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.05.013.
- [11] Krasnodembskaya A, Samarani G, Song YL, et al. Human mesenchymal stem cells reduce mortality and bacteremia in gram-negative sepsis in mice in part by enhancing the phagocytic activity of blood monocytes[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012, 302(10): L1003-1013. DOI:10.1152/ajplung.00180.2011.
- [12] 林丹梅. 脓毒症患儿血清 TNF- α 、IL-8、IFN- γ 的动态变化 [J]. 中国医药科学, 2014, 4(24): 180-182. DOI: 10.16281/j.cnki.jocml.2014.12.182.
- [13] Bozza FA, Salluh JI, Japiassu AM, et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis[J]. Crit Care, 2007, 11(2):R49. DOI:10.1186/c C5783.
- [14] Faix JD. Biomarkers of sepsis[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2013, 50(1): 23-36. DOI:10.3109/10408363.2013.764490.
- [15] Wang YC, Liu QX, Liu T, et al. Early plasma monocyte chemoattractant protein 1 predicts the development of sepsis in trauma patients: A prospective observational study[J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(14): e0356. DOI:10.1097/MD.00000000000010356.
- [16] Papadopoulou A, Krance RA, Allen CE, et al. Systemic inflammatory response syndrome after administration of unmodified T lymphocytes[J]. Mol Ther, 2014, 22(6): 1134-1138. DOI:10.1038/mt.2014.48.

(收稿日期: 2018-02-19)

(本文编辑: 郑辛甜)

硫化钠对脓毒症小鼠心肌细胞 PGC-1 α 和 Nrf2 水平的影响

梁冬施 金益梅 何时军 林苗苗 夏小娇 陈晓丽 刘磊 黄爱蓉

脓毒症是一种由于外界病原微生物感染所造成的严重全身性炎症反应综合征^[1], 可快速发展为严重脓毒症、脓毒性休克和多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS), 是导致全世界感染患者致死致残的重要因素^[2]。目前研究认为, 线粒体损伤和功能障碍是脓毒症重要分子机制之一^[3]。线粒体是重要的能量代谢中心, 也是活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 产生的主要场所^[4], 脓毒症时过度产生的活性氧可导致氧化应激, 造成线粒体损伤^[3]。

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1 α (peroxisome proliferator activated receptor gamma co-activator 1 α , PGC-1 α) 为转录共激活因子, 具有潜在整合转录因子的多样性的生物学效果, 可促进线粒体的氧化表达, 提高线粒体的氧化功能^[5]。PGC-1 α 可诱导核转录

因子 (nuclear related factor 2, Nrf2) 基因的表达, 共同调节线粒体生物合成^[6]。研究显示, 外源性化合物硫化钠 (sodium hydrosulfide, NaHS) 是体内硫化氢 (hydrogen sulfide, H₂S) 的供体, 可增强线粒体生物功能^[7]。本研究通过分析 NaHS 对脓毒症小鼠心肌细胞 PGC-1 α 和 Nrf2 表达水平的影响, 探讨 NaHS 保护线粒体功能的分子机制, 为脓毒症治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象

C57BL/6 小鼠 60 只, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司 [SCKK (京) 2014-0004], SPF 级, 6~8 周龄, 体质量 20~30 g, 动物合格证号: 11401300037498。实验操作前在温度约 20~22 $^{\circ}$ C、湿度约 40%、无特殊病原菌的环境中 (SPF 级) 适应性饲养 1 周, 饲养过程中小鼠自由饮水、摄食, 以标准颗粒饲料饲养, 每日 12 h 昼/夜交替。按随机数字表法分为 6 组, 每组 10 只: 假手术组、脓毒症组、脓毒症 +25 μ mol/L NaHS 组、脓毒症 +50 μ mol/L NaHS 组、脓毒症 +100 μ mol/L NaHS 组、脓毒症 +200 μ mol/L NaHS 组。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2018.09.008

基金项目: 温州市公益性科技计划项目 (Y20150020)

作者单位: 325000 浙江省温州, 温州医科大学附属第二医院 育英儿童医院儿童急诊科

通信作者: 黄爱蓉, Email: huangairong@139.com