

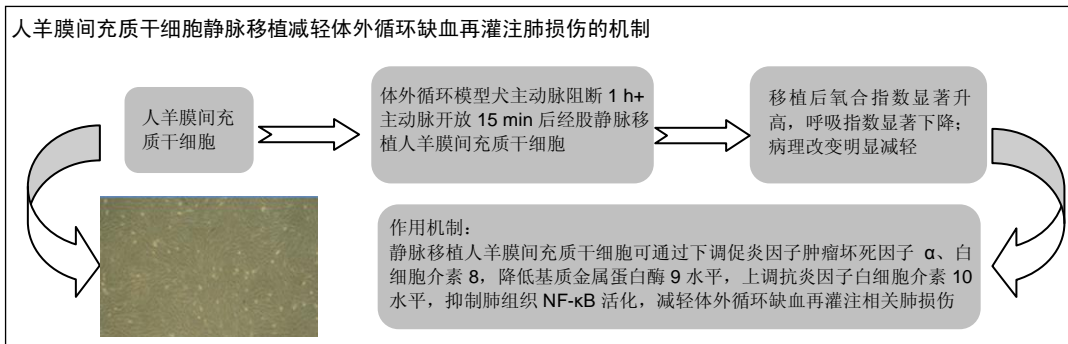
人羊膜间充质干细胞移植减轻体外循环再灌注肺损伤

强勇¹, 梁贵友², 余丽梅³, 齐斌³, 高振宇⁴(¹南京军区南京总医院心胸外科, 江苏省南京市 210002; ²遵义医学院附属医院胸心血管外科, 贵州省遵义市 563000; ³遵义医学院附属医院贵州省细胞工程重点实验室, 贵州省遵义市 563000; ⁴遵义医学院外科动物实验中心, 贵州省遵义市 563000)

引用本文: 强勇, 梁贵友, 余丽梅, 齐斌, 高振宇. 人羊膜间充质干细胞移植减轻体外循环再灌注肺损伤[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(1):70-77.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.01.013 ORCID: 0000-0002-4555-9102(梁贵友)

文章快速阅读:



强勇, 男, 1978 年生, 江苏省兴化市人, 汉族, 硕士, 主治医师, 主要从事体外循环心肺损伤基础及临床研究。

通讯作者: 梁贵友, 博士, 教授, 硕士生导师, 遵义医学院附属医院胸心血管外科, 贵州省遵义市 563000

中图分类号: R394.2

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2016)01-00070-08

稿件接受: 2015-11-15

http://www.crter.org

文题释义:

人羊膜间充质干细胞移植: 来源于人分娩后的胎盘, 具有获取简单、几乎不受伦理学限制、来源丰富、免疫原性低、增殖能力强以及向 3 个胚层来源的组织细胞分化的潜能; 人胎盘羊膜来源间充质干细胞低表达 HLA-A、B、C, 不表达 HLA-DR, 异种移植不发生免疫排斥反应, 这些优势使得人胎盘羊膜来源间充质干细胞相比于其他来源间充质干细胞在器官或组织修复中展现了良好的前景。

体外循环相关肺损伤发生的机制: 目前, 关于体外循环肺损伤的具体机制仍不十分清楚, 但一般认为是多因素、多环节共同作用的结果。多数专家认为可能与下列因素有关: 肺缺血再灌注损伤, 血液成分与体外循环人工管道的接触, 全身炎症反应, 内毒素血症, 手术创伤应激等。

摘要

背景: 近年来, 间充质干细胞在器官或组织修复中展现了良好的前景, 因此, 基于间充质干细胞可塑性的细胞移植为体外循环后肺损伤的细胞再生及功能恢复提供了可能。

目的: 探讨外源性移植人羊膜间充质干细胞对犬体外循环缺血再灌注肺损伤的影响, 从炎症因子角度初步探讨其作用机制。

方法: 健康成年杂种犬 18 只, 随机分为空白组(建立体外循环模型, 主动脉不阻断+股静脉注射 1 mL 生理盐水)、对照组(体外循环+主动脉阻断 1 h+主动脉开放 15 min 后股静脉注射 1 mL 生理盐水)、实验组(体外循环+主动脉阻断 1 h+主动脉开放 15 min 后股静脉注射含 2×10^7 人羊膜间充质干细胞的生理盐水 1 mL), 每组 6 只。分别在体外循环前(T1)、主动脉开放后 15 min(T2)、开放后 1 h(T3)、开放后 2 h(T4)、开放后 3 h(T5)5 个时间点, 各取动脉血 2 mL 计算氧合指数和呼吸指数, 取静脉血 8 mL 分别用 ELISA 法检测血清肿瘤坏死因子 α 、基质金属蛋白酶 9、白细胞介素 8、白细胞介素 10 水平, Western Blot 印迹法检测肺组织 NF- κ B 蛋白表达, 同时光镜下观察各组肺组织病理学变化。

结果与结论: ①与对照组比较, 实验组氧合指数在人羊膜间充质干细胞移植后 2, 3 h 显著升高, 实验组呼吸指数在人羊膜间充质干细胞移植后 1, 2, 3 h 显著下降。②与对照组同时时间点相比, 实验组肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 8 以及基质金属蛋白酶 9 呈明显下降趋势, 白细胞介素 10 有所回升。③与空白组相比, 对照组开放后 3 h 肺组织 NF- κ B 蛋白明显增强, 静脉注入人羊膜间充质干细胞后肺组织 NF- κ B 表达较对照组显著降低。④实验组在主动脉开放后, 病理改变明显轻于对照组, 可见少量间隙内渗出红细胞与中性粒细胞, 微血管扩张、充血。⑤结果表明, 人羊膜间充质干细胞移植可通过下调促炎因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 8, 降低基质金属蛋白酶 9 水平, 上调抗炎因子白细胞介素 10 水平, 抑制肺组织 NF- κ B 活化, 减轻体外循环缺血再灌注相关肺损伤。

关键词:

干细胞; 移植; 体外循环; 缺血再灌注; 肺损伤; 人羊膜间充质干细胞; 核因子 κ B; 细胞因子

主题词:

羊膜; 间充质干细胞移植; 体外循环; 再灌注损伤; 肺损伤; 组织工程

基金资助:

贵州省科技攻关重点项目, 黔科合 SZ 字【2014】3022 号; 遵义市科技攻关重点项目, 遵市科合社字【2013】38 号

Qiang Yong¹, Liang Gui-you², Yu Li-mei³, Qi Bin³, Gao Zhen-yu⁴ (¹Department of Cardiothoracic Surgery, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China; ²Department of Cardiothoracic Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China; ³Key Laboratory of Cell Engineering in Guizhou Province, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China; ⁴Surgical Animal Experiment Center, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China)

Qiang Yong, Master,
 Attending physician,
 Department of Cardiothoracic
 Surgery, Nanjing General
 Hospital of Nanjing Military
 Command, Nanjing 210002,
 Jiangsu Province, China

Corresponding author: Liang
 Gui-you, M.D., Professor,
 Master's supervisor,
 Department of Cardiothoracic
 Surgery, Affiliated Hospital of
 Zunyi Medical University,
 Zunyi 563000, Guizhou
 Province, China

Subject headings:

Amnion; Mesenchymal Stem
 Cell Transplantation;
 Extracorporeal Circulation;
 Reperfusion Injury; Lung
 Injury; Tissue Engineering
Funding: the Scientific
 Tackle Key Project of
 Guizhou Province, No.
 [2014]3022; the Scientific
 Tackle Key Project of Zunyi
 City, No. [2013]38

Transplantation of human amnion-derived mesenchymal stem cells alleviates ischemia-reperfusion-induced acute lung injury after cardiopulmonary bypass

Abstract

BACKGROUND: In recent years, mesenchymal stem cells exhibit a good prospect in organ or tissue repair and therefore, and therefore, cell transplantation based on mesenchymal stem cell plasticity can promote cell regeneration and functional recovery from lung injury after cardiopulmonary bypass.

OBJECTIVE: To investigate the effects of human amnion-derived mesenchymal stem cells (hAMSCs) transplantation on ischemia-reperfusion-induced acute lung injury in dogs after cardiopulmonary bypass and its mechanism for regulating inflammatory cytokines.

METHODS: Eighteen adult healthy mongrel dogs were randomly divided into three groups ($n=6$ per group): black group (cardiopulmonary bypass with 1 mL physiological saline injection via the femoral vein without blocking the aorta), control group (cardiopulmonary bypass with blocking the aorta for 1 hour and then opening the aorta for 15 minutes plus 1 mL physiological saline injection via the femoral vein), experiment group (cardiopulmonary bypass with blocking the aorta for 1 hour and then opening the aorta for 15 minutes plus femoral vein injection of 1 mL physiological saline containing 2×10^7 hAMSCs). Arterial blood samples of 2 mL were taken to calculate oxygenation index and respiratory index before cardiopulmonary bypass (T1), 15 minutes (T2), 1 hour (T3), 2 hours (T4), 3 hours (T5) after opening the aorta. 8 mL intravenous blood samples were taken to detect the serum tumor necrosis factor α , matrix metalloproteinase-9, interleukin-8 and interleukin-10 by ELISA. Meanwhile, western blot assay was used to detect the expression of nuclear factor- κ B in lung tissues, and histopathological changes of lung tissues observed under optical microscope.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, the oxygenation index was significantly increased in the experimental group at 2 and 3 hours after transplantation, and the respiratory index was remarkably decreased at 1, 2, 3 hours after transplantation. Compared with the control group, the levels of tumor necrosis factor α , matrix metalloproteinase-9 and interleukin-8 were significantly decreased in the experimental group, but the level of interleukin-10 was increased in the experimental group. Compared with the blank group, the expression of nuclear factor- κ B was significantly strengthened in the control group at 3 hours after opening the aorta, but it was decreased significantly after intravenous injection of hAMSCs. After opening the aorta, the pathological changes in the experimental group were remarkably milder than those in the control group, and a small amount of red blood cells and neutrophils exuded, with telangiectasia, and congestion, were found in the experimental group. These findings indicate that hAMSCs transplantation can mitigate ischemia-reperfusion-induced acute lung injury after cardiopulmonary bypass by adjusting the level of nuclear factor- κ B in lung tissues and release of tumor necrosis factor α , matrix metalloproteinase-9, interleukin-8 and interleukin-10.

Cite this article: Qiang Y, Liang GY, Yu LM, Qi B, Gao ZY. Transplantation of human amnion-derived mesenchymal stem cells alleviates ischemia-reperfusion-induced acute lung injury after cardiopulmonary bypass. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(1):70-77.

0 引言 Introduction

体外循环(cardiopulmonary bypass, CPB)是指应用人工管道将人体大血管与人工心肺机连接,从静脉系统引出静脉血,并在体外氧合,再经血泵将氧合血输回动脉系统的全过程^[1-2]。接受体外循环的患者,术后均有不同程度的肺功能减退,轻者仅表现为一过性的亚临床症状,重者则表现为急性呼吸窘迫综合征乃至急性呼吸衰竭,且病死率高达3.9%–36.4%^[3-5]。体外循环所致肺损伤的机制十分复杂,目前与肺缺血及缺血后的再灌注损伤、全身炎症反应综合征等因素有关。相关研究表明,体外循环引起的缺血再灌注损伤是导致肺组织损伤的重要机制之一^[6-7]。伴随着体外循环时心肺血流的阻断和恢复,肺循环中有大量激活的白细胞积聚,激活的白细胞释放多种炎症递质,导致肺损伤。体外循环的机械剪切作用、血液与体外循环的人工材料表面接触,可启动并激活中性粒细胞^[8]。致炎递质随后通过扩增中性粒细胞激活,引发全身炎症反应进一步加重肺损伤^[9]。激活的中性粒细胞可在体循环及肺组织内进一步释放一定数目的蛋白水解酶和氧化化学产物,包括降解的基质金属蛋白酶、弹性蛋白酶、氧自由基,这些物质

可破坏肺组织的超微结构,导致肺泡-内皮通透性增加,使肺泡内炎细胞浸润、水分聚集,肺内分流增加、肺通气/血流比例失调和严重低氧血症等,产生体外循环后肺损伤。针对目前体外循环在缺血再灌注后的相关肺损伤,肺保护方法主要有皮质类固醇类及抑肽酶等药物治疗、改进人工管道、持续血液过滤、体外循环期间维持机械通气等^[10-14],但这些治疗方法,存在难以完全修复体外循环引起的肺组织严重损伤及其导致全身炎症反应等不足。

人胎盘羊膜来源间充质干细胞(human amnion-derived mesenchymal stem cells, hAMSCs)属于成体干细胞,不但具有来源广、低免疫原性、增殖快、不受伦理限制等优点,而且在体外诱导培养条件下,可分化成来自3个胚层的所有细胞^[15-17]。同时,人胎盘羊膜来源间充质干细胞低表达HLA-A、B、C,不表达HLA-DR,异种移植不发生免疫排斥反应^[18]。这些优势使得人胎盘羊膜来源间充质干细胞相比于其他来源间充质干细胞在再生医学领域具有更加广阔的应用前景。近年来,间充质干细胞在脊髓损伤、肝肾损伤等器官或组织修复中展现了良好的前景,因此,基于间充质干细胞可塑性的细胞移植为体外循环后肺损伤的细胞再

生及功能恢复提供了可能。研究表明, 人胎盘羊膜来源间充质干细胞可有效改善四氯化碳诱导的肝损伤的肝组织生理功能, 定位修复肝细胞, 还可修复心肌细胞治疗心肌梗死, 治疗创伤性脑损伤等^[19-20], 这些均为人胎盘羊膜来源间充质干细胞定位移植治疗相关疾病提供了重要参考。此次实验旨在探讨人胎盘羊膜来源间充质干细胞静脉移植对犬体外循环后肺缺血再灌注肺损伤NF- κ B和炎症递质的影响, 为人胎盘羊膜来源间充质干细胞治疗体外循环相关缺血再灌注肺损伤提供实验依据和理论支持。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外对比观察实验。

1.2 时间及地点 于2013年7月至2014年6月在遵义医学院附属医院胸心血管外科、遵义医学院附属医院贵州省细胞工程重点实验室、遵义医学院外科动物实验中心完成。

1.3 材料

1.3.1 人胎盘 经产妇或家属知情同意并经医院伦理委员会批准后, 收集足月剖宫产新鲜胎盘。无菌条件下剥离羊膜, 置于含D-Hank's无菌瓶中, 无菌瓶置于4 °C冰盒中, 2 h内进入实验流程。产妇产前检查排除HBV、HCV、HIV和梅毒螺旋体病毒感染。

1.3.2 实验动物 健康杂种犬18只, 雌雄不限, 体质量(12.6 \pm 2.5) kg, 由遵义医学院外科动物实验中心提供, 动物许可证号20130028。饲养于遵义医学院动物实验中心SPF级屏障环境中, 饲养环境温度(23 \pm 1) °C, 相对湿度(70 \pm 4)%, 自由饮食, 适应性喂养1周后用于实验, 实验前禁食8 h, 禁水4 h。实验过程中对动物的处置符合相关动物实验伦理学标准。

1.3.3 主要试剂 抗人波形蛋白抗体购自美国Sigma公司, 犬肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素8、白细胞介素10、基质金属蛋白酶9 ELISA试剂盒购自北方生物技术研究所以, NF- κ B p65购自美国CST公司。

1.4 实验方法

1.4.1 人羊膜间充质干细胞分离、培养 参照Kim等^[21-24]方法, 无菌条件下, 用D-Hank's冲洗去羊膜上的血块, 无菌玻片刮除羊膜上的黏液, 剪碎羊膜, 装入离心管内。离心管内加入约2倍羊膜体积的0.05%胰蛋白酶-0.02% EDTA-2Na液, 置于摇床中振荡, 200 r/min, 37 °C振荡消化15 min, 弃去上清液, 沉淀重新加入0.05%胰蛋白酶-0.02% EDTA-2Na液。共消化3次, 时间分别为15、20和25 min。最后一次消化后的羊膜组织用D-Hank's液冲洗2至3次, 转入新的离心管, 加入约2倍羊膜体积的0.75 g/L II型胶原酶和0.075 g/L Dnase I液, 置于摇床中消化1.5-2.0 h, 300目钢网过滤, 留取滤液, 加入等体积含体积分数为10%胎牛血清的LG-DMEM培养基终止消化, 2 000 r/min离心10 min, 弃去上清液, 沉淀用LG-DMEM完全培养基悬浮。细胞计数仪计数, 分析细胞活力, 以

2.0 \times 10⁵/cm²接种于25 cm²培养瓶内, 37 °C, 体积分数为5% CO₂饱和湿度培养, 48 h后弃去培养液, 除去未贴壁的细胞, 加入新的培养液继续培养。倒置相差显微镜下观察其生长情况。待原代培养的人羊膜间充质干细胞融合至70%-80%, 弃去培养液, D-PBS洗涤3次, 加入0.125%胰蛋白酶-0.02% EDTA-2Na液1.0-2.0 mL, 37 °C消化3 min, 显微镜下观察其消化程度, 待细胞回缩、变圆, 立即加入等体积含体积分数为10%胎牛血清的LG-DMEM培养基终止消化, 1 000 r/min离心10 min, 弃去上清, 细胞沉淀用含体积分数为10%胎牛血清的LG-DMEM完全培养基悬浮, 以1.0 \times 10⁵/cm²接种于25 cm²培养瓶内, 37 °C, 体积分数为5% CO₂饱和湿度下培养。

1.4.2 人羊膜间充质干细胞表型鉴定 消化、收集第3代人羊膜间充质干细胞, D-PBS洗涤1次, 调整细胞浓度为1.5 \times 10⁹ L⁻¹, 取细胞悬液100 μ L按组合方案加10 μ L荧光素标记的CD19、CD29、CD34、CD44、CD45、CD73、CD80、CD86、CD166振荡混匀, 设同型对照。室温避光孵育25 min, 每管加入2 mL含0.1%牛血清白蛋白的PBS, 振荡混匀, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 振荡混匀细胞。每管加入10 g/L多聚甲醛200 μ L, 振荡混匀, 2-8 °C避光放置, 24 h内上机, FACS Calibur流式细胞仪检测, Cell Quest软件进行表型分析。

1.4.3 免疫细胞化学染色 取第3代人羊膜间充质干细胞制备细胞爬片, 采用免疫细胞化学染色检测人羊膜间充质干细胞波形蛋白表达情况, 具体操作步骤如下: 细胞爬片用PBS洗涤3次, 每次5 min; 40 g/L多聚甲醛室温固定10 min, PBS洗涤3次, 每次5 min; 滴加0.3% Triton-X100, 室温作用15-20 min, PBS洗涤1次; 加入山羊血清封闭液, 室温孵育30 min; 滴加一抗: 小鼠抗人波形蛋白单克隆抗体(1: 100), 4 °C避光孵育过夜, 对照组用PBS替代一抗; PBS漂洗3次, 每次5 min, 滴加通用二抗(EnVisionTM Detection Systems Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse), 37 °C孵育30 min, PBS漂洗3次, 每次5 min; DAB显色3-5 min, 自来水充分冲洗; 苏木精复染3 min, 自来水冲洗, 干燥后脱水封固拍照, 阳性表达胞浆呈现棕色颗粒。

1.4.4 实验动物分组 健康杂种犬18只, 按随机数字表法随机分为3组: 空白组(建立体外循环模型, 但主动脉不阻断)、对照组(体外循环+主动脉阻断1 h+主动脉开放15 min后股静脉注射生理盐水)、实验组(体外循环+主动脉阻断1 h+主动脉开放15 min后股静脉注射人羊膜间充质干细胞), 每组6只。

1.4.5 体外循环模型建立与人羊膜间充质干细胞移植 参照Gibbon等^[25]和张贺等^[26]方法建立犬体外循环模型。2.5%戊巴比妥钠25 mg/kg腹腔注射, 麻醉后仰卧位固定, 气管插管建立机械通气, 胸骨正中切口, 打开胸膜, 游离主动脉, 在主动脉根部做荷包后行主动脉插管(4 mm), 同样于右心耳插管(36Fr)建立体外循环模型, 同时各组均行

股静脉插管。空白组建立体外循环模型, 但主动脉不阻断; 实验组建立体外循环+主动脉阻断1 h+主动脉开放15 min后, 将人羊膜间充质干细胞用生理盐水悬浮成单细胞悬液, 调整细胞浓度为 $2 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$, 无菌注射器抽取后, 经犬股静脉缓慢注射细胞悬液, 确保无细胞悬液漏出, 每只犬注射细胞悬液1 mL; 对照组股静脉注射同等剂量生理盐水, 其他同实验组。

1.5 主要观察指标 分别在体外循环前(T1)、主动脉开放后15 min(T2)、开放后1 h(T3)、开放后2 h(T4)、开放后3 h(T5)5个时间点, 取动脉血2 mL进行血气分析计算氧合指数(OI)和呼吸指数(RI)变化, 取静脉血采用ELISA法检测各时间点血清肿瘤坏死因子 α 、基质金属蛋白酶9、白细胞介素8、白细胞介素10变化。在T5后处死动物, 取右肺组织采用Western Blot印迹法检测NF- κ B蛋白表达, 并于光镜下观察各组肺组织病理学变化, 计算湿质量/干质量比。氧合指数= PaO_2 (氧分压)/ FiO_2 (吸入氧浓度), 呼吸指数可通过以下公式算出:

$$\text{呼吸指数} = \frac{P(A-a)\text{O}_2}{\text{PaO}_2} = \frac{[(\text{PB}-\text{PH}_2\text{O}) \times \text{FiO}_2 - \text{PaCO}_2] - \text{PaO}_2}{\text{PaO}_2}$$

其中, $P(A-a)\text{O}_2$ 为肺泡、动脉血氧分压差; PB为大气压, PH_2O 为饱和水蒸气压, FiO_2 (%)为吸入氧浓度; PaCO_2 为动脉血二氧化碳分压。

1.6 统计学分析 采用SPSS 16.0统计软件进行分析, 计量实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析, 率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 人羊膜间充质干细胞形态特征 体外培养的人羊膜间充质干细胞呈贴壁生长, 原代培养48 h后, 可见较多细胞贴壁, 细胞形态不一, 呈多边形、梭形或星形等(图1A)。细胞传代培养至第3-5代, 可见细胞呈纤维样排列紧密, 漩涡状生长(图1B)。免疫细胞化学染色结果显示, 体外培养的第3代人羊膜间充质干细胞胞浆表达波形蛋白(图2)。

2.2 人羊膜间充质干细胞免疫表型鉴定 流式细胞仪检测第3代人羊膜间充质干细胞免疫表型, 结果显示, 人羊膜间充质干细胞高表达CD29、CD34、CD44、CD45、CD73、CD166, 不表达或低表达CD19、CD80、CD86和HLA-DR(图3)。

2.3 实验动物数量和动物一般情况分析 参加正式动物实验数量18只。对照组1只犬术后2.8 h死亡, 数据未进入统计, 其他动物直至实验结束, 无脱落。对照组动物精神明显弱于其他两组。

2.4 各组病理组织学变化 与空白组相比, 对照组肺泡间隔明显增宽, 微血管扩张、充血, 肺间质间隙内可见渗出的红细胞, 间隙内可见中性粒细胞浸润。实验组在主动脉开放后, 病理改变明显轻于对照组, 可见少量间隙内渗出红细胞与中性粒细胞, 微血管扩张、充血(图4)。

2.5 各组氧合指数和呼吸指数变化比较 与空白组比较, 对照组氧合指数在主动脉开放后15 min, 1 h, 2 h, 3 h均显著下降($P < 0.01$); 与对照组比较, 实验组氧合指数在人羊膜间充质干细胞移植后2, 3 h明显升高, 差异有显著性意义(2 h: $P < 0.05$, 3 h: $P < 0.01$)。与空白组比较, 对照组呼吸指数在主动脉开放后1, 2, 3 h均有不同程度升高(1 h: $P < 0.05$, 2 h和3 h: $P < 0.01$); 与对照组比较, 实验组呼吸指数在人羊膜间充质干细胞移植后1, 2, 3 h显著下降, 差异有显著性意义(1 h: $P < 0.05$, 2 h和3 h: $P < 0.01$), 见图5。

2.6 血清肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素8、白细胞介素10、基质金属蛋白酶9比较 为观察人羊膜间充质干细胞移植对体外循环缺血再灌注犬炎症递质的影响, 采用酶联免疫法检测血清肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素8、白细胞介素10、基质金属蛋白酶9水平。与空白组比较, 对照组肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素8在主动脉开放后15 min, 1 h, 2 h, 3 h均有明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与对照组比较, 实验组血清肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素8在主动脉开放后15 min, 1 h, 2 h, 3 h有不同程度降低, 差异均有显著性意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与空白组比较, 对照组血清白细胞介素10在体外循环缺血再灌注后15 min开始即开始降低, 随着时间延长, 1, 2, 3 h呈显降低趋势愈加明显($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。实验组人羊膜间充质干细胞移植后血清白细胞介素10在体外循环缺血再灌注后15 min虽有下降, 但无显著性意义, 1, 2, 3 h均较对照组有明显升高(1 h: $P < 0.05$, 2 h和3 h: $P < 0.01$)。与空白组相比, 对照组血清基质金属蛋白酶9水平在体外循环主动脉开放后15 min, 1 h, 2 h有显著的升高, 尤其是在开放后15 min达高峰, 3 h差异无显著性意义($P > 0.05$); 与对照组相比, 实验组在人羊膜间充质干细胞移植后15 min, 1 h较低($P < 0.05$), 其他时间点比较, 差异无显著性意义($P > 0.05$), 见图6。

2.7 Western Blot印迹法检测肺组织NF- κ B蛋白表达变化与空白组相比, 对照组开放后3 h肺组织NF- κ B蛋白明显增强($P < 0.01$), 静脉注入人羊膜间充质干细胞后肺组织NF- κ B表达较对照组显著降低($P < 0.01$), 见图7。

3 讨论 Discussion

人羊膜间充质干细胞直接由中胚层发育而来, 分化程度较低, 具有比其他组织来源间充质干细胞更弱的免疫原性, 且获取方便, 对供者无伤害, 无论伦理道德等问题, 使其成为继骨髓间充质干细胞之后另一备受关注的间充质干细胞。

实验采用人羊膜二酶消化法分离细胞, 并进行原代和传代培养。结果发现人羊膜间充质干细胞体外培养呈现贴壁生长, 细胞呈现纤维样, 梭形, 漩涡状排列, 符合间充质干细胞的形态学特征, 且高表达CD44、CD105、CD90、CD73, 不表达CD34、CD45、CD11b、CD19和HLA-DR,

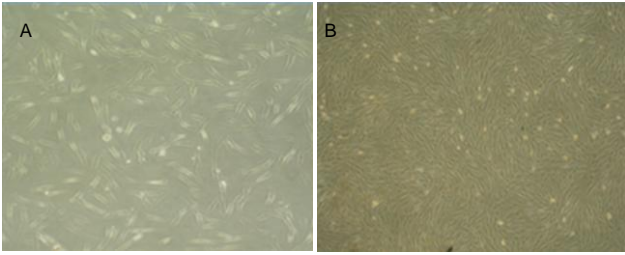


图1 人羊膜间充质干细胞生长形态($\times 100$)
Figure 1 Morphology of cultured human amnion-derived mesenchymal stem cells ($\times 100$)

图注: 图中 A 为原代培养的人羊膜间充质干细胞形态, 有较多细胞贴壁, 细胞形态不一, 呈多边形、梭形或星形; B 为第 3 代培养的人羊膜间充质干细胞形态, 细胞呈纤维样排列紧密, 漩涡状生长。

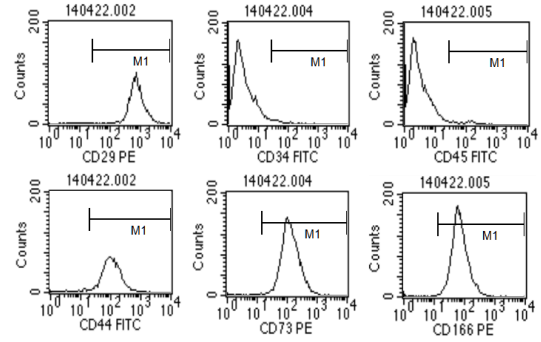


图3 流式细胞术分析人羊膜间充质干细胞免疫表型
Figure 3 Immunophenotypic analysis of human amnion-derived mesenchymal stem cells by flow cytometry

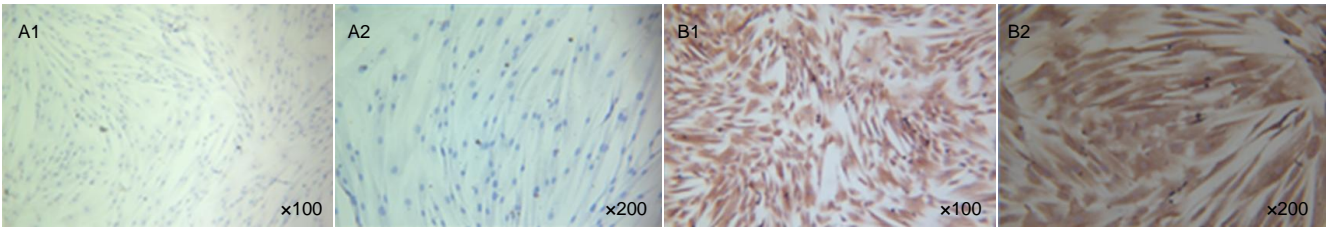


图2 第3代人羊膜间充质干细胞波形蛋白表达(免疫细胞化学染色)
Figure 2 Vimentin positive expression in passage 3 human amnion-derived mesenchymal stem cells (immunocytochemical staining)

图注: 图中 A1, A2 为波形蛋白阴性对照; B1, B2 为免疫组化显示第 3 代人羊膜间充质干细胞胞浆表达波形蛋白。

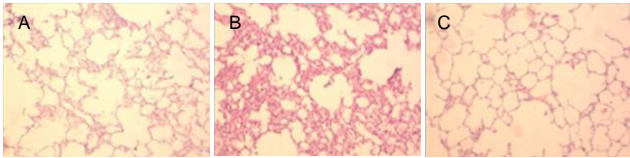


图4 体外循环缺血再灌注 3 h 犬肺组织病理学的变化(苏木精-伊红染色, $\times 200$)
Figure 4 Pathological changes of the lung tissue at 3 hours of ischemia-reperfusion after cardiopulmonary bypass in dogs (hematoxylin-eosin staining, $\times 200$)

图注: 图中 A 为空白组犬正常肺组织病理学表现; B 为对照组肺泡间隔明显增宽, 微血管扩张、充血, 肺实质间隙内可见渗出的红细胞, 间隙内可见中性粒细胞浸润; C 为实验组在主动脉开放后, 病理改变明显轻于对照组, 可见少量间隙内渗出红细胞与中性粒细胞, 微血管扩张、充血。

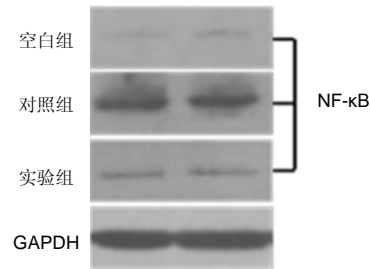


图7 人羊膜间充质干细胞对体外循环缺血再灌注 3 h 犬肺组织 NF- κ B 蛋白表达的影响
Figure 7 Effect of human amnion-derived mesenchymal stem cells on the nuclear factor- κ B expression in lung tissues of dogs at 3 hours of ischemia-reperfusion after cardiopulmonary bypass

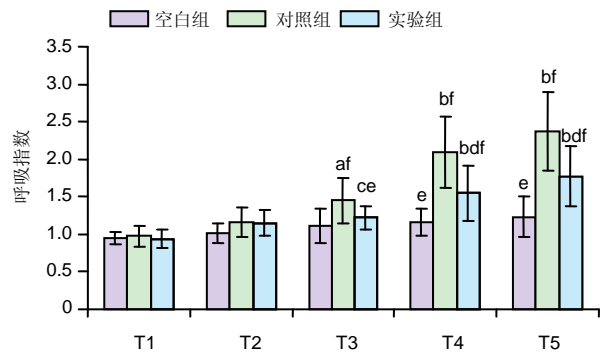
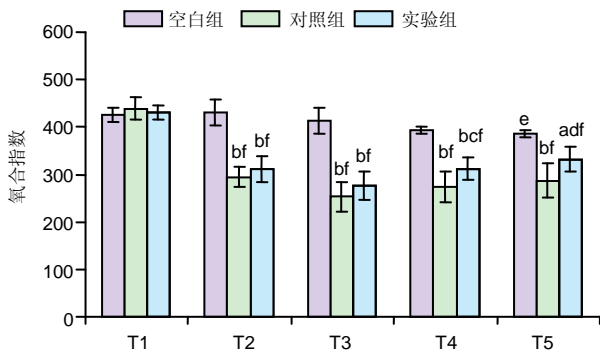


图5 人羊膜间充质干细胞对体外循环缺血再灌注犬氧合指数和呼吸指数的影响
Figure 5 The effects of human amnion-derived mesenchymal stem cells on oxygenation index and respiratory index in dogs undergoing cardiopulmonary bypass

图注: ①T1: 体外循环前; T2: 主动脉开放后 15 min; T3: 开放后 1 h; T4: 开放后 2 h; T5: 开放后 3 h。②与空白组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与对照组比较, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 与同组内 T1 比较, ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ 。

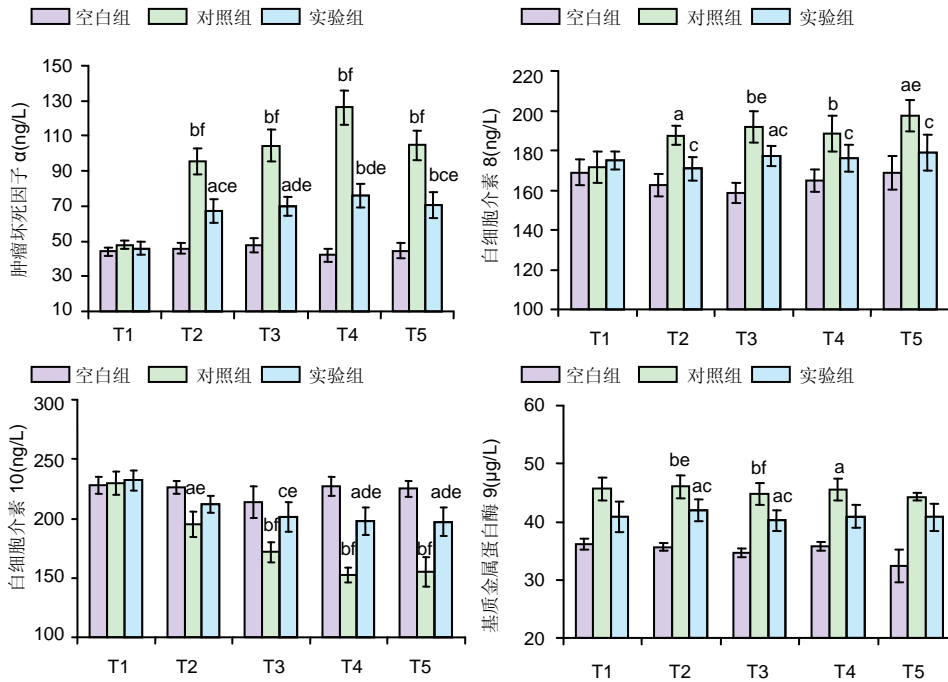


图6 人羊膜间充质干细胞对体外循环缺血再灌注犬血清肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素8、白细胞介素10、基质金属蛋白酶9的影响

Figure 6 The effects of human amnion-derived mesenchymal stem cells on tumor necrosis factor α , interleukin-8, interleukin-10, and matrix metalloproteinase-9 in dogs undergoing cardiopulmonary bypass

图注: ①T1: 体外循环前; T2: 主动脉开放后 15 min; T3: 开放后 1 h; T4: 开放后 2 h; T5: 开放后 3 h。②与空白组比较, $^{\circ}P < 0.05$, $^bP < 0.01$; 与对照组比较, $^{\circ}P < 0.05$, $^dP < 0.01$; 与同组内 T1 比较, $^{\circ}P < 0.05$, $^fP < 0.01$ 。

胞浆波形蛋白阳性, 符合间充质干细胞的免疫学鉴定标准和间质来源细胞蛋白标志特征及国际细胞治疗协会(International Society for Cellular Therapy, ISCT)关于间充质干细胞对表型特征的界定, 说明实验成功分离得到纯度较高的人羊膜间充质干细胞, 建立了其体外培养体系, 实验中作为治疗的供体细胞是纯度较高的人羊膜间充质干细胞。胎盘在母儿体内起着免疫屏障和激素分泌的作用, 实验所取胎盘均来自健康产妇, 胎盘间充质干细胞免疫原低, 致瘤性和病毒、细菌污染可能性较骨髓间充质干细胞低。实验组未出现强烈的急性排斥反应, 表明人羊膜间充质干细胞静脉移植安全性较高。另外, 术后移植区未见移植的供体细胞, 这可能归因于宿主晚期的局部吞噬、清除作用, 需要进一步深入研究。

细胞因子是由机体各种细胞分泌的具有重要生物学功能的小分子调节蛋白, 是介导全身炎症反应及缺血再灌注损伤的主要内源性介质。肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素8为重要的促炎因子。肿瘤坏死因子 α 是炎症反应中最早释放且最重要的细胞因子, 其通过增强单核细胞、巨噬细胞活性, 增加细胞黏附因子表达介导组织损伤; 白细胞介素8在炎症组织中白细胞聚集起关键作用。体外循环期间, 补体激活、缺血再灌注、细胞因子间相互作用都可使细胞因子大量释放。细胞因子在引起体外循环后肺损伤中发挥重要作用, 与肺损伤有明确关系的主要有肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1、白细胞介素6、白细胞介素8、白细胞介素10^[27]。肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素1协同NF- κ B产生细胞因子, 不仅启动早期炎症反应, 诱导中性粒细胞迁移和聚集, 而且维持炎症^[28-29]。这种炎症反应可直接损伤血管内皮细胞, 使毛细血管通透性增高, 促进毛细血管渗漏和中性粒细胞、巨噬细胞在损伤部位聚集, 积聚的水肿液进

一步阻碍肺泡内细胞灌流和氧气交换, 引起肺损伤。白细胞介素10可在转录水平抑制促炎细胞因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1、白细胞介素6和白细胞介素8的合成与释放, 抑制细胞间黏附分子1表达, 减少白细胞黏附于肺血管内皮细胞, 减轻肺缺血再灌注损伤。大量研究表明人羊膜间充质干细胞还可通过分泌多种细胞因子如血管内皮生长因子、胰岛素样生长因子1、肝细胞生长因子等发挥免疫调节作用^[30-33]。研究结果显示, 与空白组相比, 对照组犬血清促炎因子肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素8质量浓度在体外循环并缺血再灌注后15 min, 1 h, 2 h, 3 h均有明显升高, 而血清白细胞介素10在体外循环缺血再灌注后15 min开始即开始降低, 随着时间延长, 1, 2, 3 h呈显降低趋势愈加明显, 这表明犬在体外循环并缺血再灌注后促炎因子肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素8释放增加, 而抑炎因子白细胞介素10释放减少, 这些炎症因子的正常平衡状态被打破, 将启动早期炎症反应, 诱导中性粒细胞聚集, 介导损伤肺组织。经静脉移植人羊膜间充质干细胞后发现, 犬的血清肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素8质量浓度在缺血再灌注后15 min, 1 h, 2 h, 3 h降低明显, 而血清白细胞介素10水平则有显著增加。研究结果表明静脉移植人羊膜间充质干细胞能够替代损伤的肺组织细胞, 自分泌多种炎症因子或细胞因子, 调节体外循环缺血再灌注后体内致炎/抗炎因子水平, 从而缓解肺功能细胞的继发性损伤, 进而改善肺功能。

基质金属蛋白酶是一组能水解胶原、弹性蛋白、氨基葡聚糖等多种细胞外基质的内源性蛋白水解酶。基质金属蛋白酶9主要来源于炎症细胞, 如中性粒细胞、单核/巨噬细胞、淋巴细胞等, 在体内以酶原的形式释放, 并通过蛋白酶的级联反应被激活, 其作用底物为IV型和V型胶原^[34-36]。基质金

属蛋白酶9可降解由IV型胶原组成的肺泡-毛细血管基膜,引起微血管通透性增加、肺内分流增加、低氧血症等,导致急性肺损伤甚至急性呼吸窘迫综合征^[37-38]。实验结果显示,体外循环犬血清基质金属蛋白酶9水平在缺血再灌注后15 min, 1 h, 2 h有显著升高,尤其是在主动脉开放后15 min达高峰,其后差异均无显著性意义。Eichler等^[39]在小猪的体外循环模型中证实了支气管肺泡灌洗液中基质金属蛋白酶9的水平与术后肺泡-动脉血氧分压差的增加呈明显正相关,认为肺内高水平的基质金属蛋白酶9与体外循环后急性肺损伤的发生、发展有相关性。实验在体外循环犬缺血再灌注后立即予以人羊膜间充质干细胞静脉移植发现,人羊膜间充质干细胞可降低体外循环早期血清中的基质金属蛋白酶9水平,提示人羊膜间充质干细胞可能通过抑制基质金属蛋白酶9水平,从而减弱其微血管通透性增加、肺内分流增加、低氧血症的作用,防止体外循环犬缺血再灌注引发的肺损伤。

NF- κ B是由转录因子Rel家族组成的异源二聚体蛋白,是一种广泛存在并具有多向性调节作用的蛋白质分子,在细胞的信号传递和基因的诱导表达过程中起重要作用。实验结果表明,对照组缺血再灌注后3 h肺组织NF- κ B蛋白明显增强,静脉注入人羊膜间充质干细胞后肺组织NF- κ B表达较对照组显著降低,提示肺组织NF- κ B蛋白在体外循环犬缺血再灌注后明显被活化,表达增强,而人羊膜间充质干细胞则抑制其活化,降低其表达。研究表明,NF- κ B在静息细胞胞质中与抑制蛋白I κ B结合成无活性的三聚体^[40-41]。细胞在受到肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1、氧自由基等刺激后I κ B激酶IKK- α 和IKK- β 被激活,引起I κ B- α 磷酸化降解,使NF- κ B活化,活化的NF- κ B可增强肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1的转录,进而再次激活NF- κ B增强炎症信号;白细胞介素10则抑制NF- κ B活化,以负反馈的形式调节其活性。体外循环中肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1、氧自由基、内毒素等刺激使NF- κ B活化从而增强多种基因的转录,诱导细胞因子、趋化因子、细胞黏附分子大量表达,导致严重失控的全身炎症反应综合征^[42]。因此,有理由推测体外循环犬在缺血再灌注后肺组织NF- κ B蛋白活化可能受到肿瘤坏死因子 α 的刺激,并增强其活化,导致肺炎症反应;NF- κ B也可能被人羊膜间充质干细胞提高的白细胞介素10水平所负反馈抑制。

综上所述,静脉移植人羊膜间充质干细胞可明显促进犬体外循环缺血再灌注所致的肺组织损伤的功能恢复,其作用机制可能与抑制促炎因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素8表达,降低基质金属蛋白酶9表达,加强抗炎因子白细胞介素10表达,抑制肺组织NF- κ B活化等有关。虽然,研究表明了人羊膜间充质干细胞对体外循环并缺血再灌注后肺损伤的治疗价值和意义,阐明了部分机制,但是体外循环并缺血再灌注后肺损伤机制复杂,调节网络复杂多变,需要进一步深入探讨和研究。

作者贡献: 实验设计为强勇和梁贵友,实验实施为强勇、余丽梅、齐斌及高振宇,实验评估为梁贵友,资料收集为强勇。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: ①实验方案经遵义医学院动物实验伦理委员会批准,批准号为2013017。实验动物在麻醉下进行所有手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。②经产妇或家属知情同意并遵义医学院附属医院伦理委员会批准,收集足月剖宫产新鲜胎盘。

文章查重: 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度,文章经国内小同行外审专家审核,符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一、二作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Sevuk U, Cakil N, Altindag R, et al. Relationship between nadir hematocrit during cardiopulmonary bypass and postoperative hyperglycemia in nondiabetic patients. *Heart Surg Forum*. 2014;17(6):E302-307.
- [2] Engels M, Bilgic E, Pinto A, et al. A cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest rat model for the investigation of the systemic inflammation response and induced organ damage. *J Inflamm (Lond)*. 2014;11:26.
- [3] Ranucci M, Isgrò G, Carlucci C, et al. Central venous oxygen saturation and blood lactate levels during cardiopulmonary bypass are associated with outcome after pediatric cardiac surgery. *Crit Care*. 2010;14(4):R149.
- [4] Chen H, Cheng ZB, Yu RG. Procalcitonin as a predictor of moderate to severe acute respiratory distress syndrome after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: a study protocol for a prospective cohort study. *BMJ Open*. 2014;4(10):e006344.
- [5] Nakamura H, Yamaguchi H, Amano A, et al. Venovenous extracorporeal membrane oxygenation is effective against post-cardiotomy acute respiratory failure in adults. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2013;61(7):402-408.
- [6] Cheng C, Li S, Wang Y, et al. Ischemic postconditioning alleviates lung injury and maintains a better expression of aquaporin-1 during cardiopulmonary bypass. *Chin Med J (Engl)*. 2014;127(23):4012-4018.
- [7] Dolkart O, E A, S S, et al. Temporal determination of lung NO system and COX-2 upregulation following ischemia-reperfusion injury. *Exp Lung Res*. 2014;40(1):22-29.
- [8] Gu YJ, Boonstra PW, Graaff R, et al. Pressure drop, shear stress, and activation of leukocytes during cardiopulmonary bypass: a comparison between hollow fiber and flat sheet membrane oxygenators. *Artif Organs*. 2000;24(1):43-48.
- [9] Banz Y, Rieben R, Zobrist C, et al. Addition of dextran sulfate to blood cardioplegia attenuates reperfusion injury in a porcine model of cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008;34(3):653-660.

- [10] Liakopoulos OJ, Schmitto JD, Kazmaier S, et al. Cardiopulmonary and systemic effects of methylprednisolone in patients undergoing cardiac surgery. *Ann Thorac Surg.* 2007;84(1):110-118.
- [11] Warren O, Darzi A, Athanasiou T. What is the role of leukocyte depletion in cardiac surgery. *Heart Lung Circ.* 2007;16(5):398-399.
- [12] Eisses MJ, Velan T, Aldea GS, et al. Strategies to reduce hemostatic activation during cardiopulmonary bypass. *Thromb Res.* 2006;117(6):689-703.
- [13] Williams GD, Ramamoorthy C, Chu L, et al. Modified and conventional ultrafiltration during pediatric cardiac surgery: clinical outcomes compared. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006;132(6):1291-1298.
- [14] Manuelpillai U, Moodley Y, Borlongan CV, et al. Amniotic membrane and amniotic cells: potential therapeutic tools to combat tissue inflammation and fibrosis. *Placenta.* 2011;32 Suppl 4:S320-325.
- [15] Chang CJ, Yen ML, Chen YC, et al. Placenta-derived multipotent cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon-gamma. *Stem Cells.* 2006;24(11):2466-2477.
- [16] Banas RA, Trumpower C, Bentelejewski C, et al. Immunogenicity and immunomodulatory effects of amnion-derived multipotent progenitor cells. *Hum Immunol.* 2008;69(6):321-328.
- [17] 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. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-317.
- [18] Bailo M, Soncini M, Vertua E, et al. Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta. *Transplantation.* 2004;78(10):1439-1448.
- [19] 丛姗, 白立恒, 李岩, 等. 人羊膜间充质干细胞移植对CCI4诱导的小鼠损伤肝HGF、SIRT-1、 α -SMA及P27kip1表达的影响[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2015, 31(3):292-300.
- [20] Zhao P, Ise H, Hongo M, et al. Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. *Transplantation.* 2005;79(5):528-535.
- [21] Kim J, Kang HM, Kim H, et al. Ex vivo characteristics of human amniotic membrane-derived stem cells. *Cloning Stem Cells.* 2007;9(4):581-594.
- [22] Kim J, Lee Y, Kim H, et al. Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. *Cell Prolif.* 2007;40(1):75-90.
- [23] Han K, Lee JE, Kwon SJ, et al. Human amnion-derived mesenchymal stem cells are a potential source for uterine stem cell therapy. *Cell Prolif.* 2008;41(5):709-725.
- [24] 丛姗, 宋瑾, 张惠娟, 等. 人羊膜间充质干细胞(hAMSCs)的分离、体外培养及诱导分化[J]. *农业生物技术学报*, 2015, 23(1):20-31.
- [25] Gibbon JH Jr. Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. *Minn Med.* 1954;37(3):171-185.
- [26] 张贺, 王承利, 王洋, 等. 犬体外循环模型建立及麻醉处理[J]. *中国比较医学杂志*, 2010, 20(10):44-47.
- [27] Halter J, Steinberg J, Fink G, et al. Evidence of systemic cytokine release in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Extra Corpor Technol.* 2005;37(3):272-277.
- [28] Zhou E, Li Y, Wei Z, et al. Schisantherin A protects lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome in mice through inhibiting NF- κ B and MAPKs signaling pathways. *Int Immunopharmacol.* 2014;22(1):133-140.
- [29] Shembade N, Harhaj NS, Liebl DJ, et al. Essential role for TAX1BP1 in the termination of TNF- α -, IL-1- and LPS-mediated NF- κ B and JNK signaling. *EMBO J.* 2007;26(17):3910-3922.
- [30] Karlsson H, Samarasinghe S, Ball LM, et al. Mesenchymal stem cells exert differential effects on alloantigen and virus-specific T-cell responses. *Blood.* 2008;112(3):532-541.
- [31] Miyazawa T, Matsumoto K, Ohmichi H, et al. Protection of hippocampal neurons from ischemia-induced delayed neuronal death by hepatocyte growth factor: a novel neurotrophic factor. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18(4):345-348.
- [32] Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney Int.* 2001;59(6):2023-2038.
- [33] Sharma HS. Neuroprotective effects of neurotrophins and melanocortins in spinal cord injury: an experimental study in the rat using pharmacological and morphological approaches. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1053:407-421.
- [34] Fares RC, Gomes Jde A, Garzoni LR, et al. Matrix metalloproteinases 2 and 9 are differentially expressed in patients with indeterminate and cardiac clinical forms of Chagas disease. *Infect Immun.* 2013;81(10):3600-3608.
- [35] Välimäki J, Uusitalo H. Matrix metalloproteinases (MMP-1, MMP-2, MMP-3 and MMP-9, and TIMP-1, TIMP-2 and TIMP-3) and markers for vascularization in functioning and non-functioning bleb capsules of glaucoma drainage implants. *Acta Ophthalmol.* 2015;93(5):450-456.
- [36] Toufaily C, Charfi C, Annabi B, et al. A Role for the Cavin-3/Matrix Metalloproteinase-9 Signaling Axis in the Regulation of PMA-Activated Human HT1080 Fibrosarcoma Cell Neoplastic Phenotype. *Cancer Growth Metastasis.* 2014;7:43-51.
- [37] Petrovska-Cvetkovska D, Dolnec-Baneva N, Nikodijevik D, et al. Correlative study between serum matrix metalloproteinase 9 values and neurologic deficit in acute, primary, supratentorial, intracerebral haemorrhage. *Prilozi.* 2014;35(2):39-44.
- [38] Wang C, Li D, Qian Y, et al. Increased matrix metalloproteinase-9 activity and mRNA expression in lung injury following cardiopulmonary bypass. *Lab Invest.* 2012;92(6):910-916.
- [39] Eichler W, Bechtel JF, Schumacher J, et al. A rise of MMP-2 and MMP-9 in bronchoalveolar lavage fluid is associated with acute lung injury after cardiopulmonary bypass in a swine model. *Perfusion.* 2003;18(2):107-113.
- [40] Bours V, Bentires-Alj M, Hellin AC, et al. Nuclear factor- κ B, cancer, and apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 2000;60(8):1085-1089.
- [41] Xiao W. Advances in NF- κ B signal ling transduction and transcription. *Cell Mol Immunology.* 2004;1(6):425-435.
- [42] Fei XJ, Zhu LL, Xia LM, et al. *Acanthopanax senticosus* attenuates inflammation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting the NF- κ B pathway. *Genet Mol Res.* 2014;13(4):10537-10544.