

# 人脐带间充质干细胞移植对脓毒症小鼠的保护作用研究

宋昱庆<sup>1</sup> 朱明<sup>1</sup> 何骁<sup>1</sup> 郭韡<sup>1</sup> 邢伟<sup>1</sup> 梁东兰<sup>1</sup> 安天琛<sup>1</sup> 敖罗权<sup>1</sup>  
黄宏<sup>1</sup> 蒋东坡<sup>2\*</sup> 徐祥<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>第三军医大学第三附属医院野战外科研究所, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400042;

<sup>2</sup>第三军医大学第三附属医院野战外科研究所重症监护室, 重庆 400042)

**摘要** 为了评价人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)移植对脓毒症小鼠的疗效, 作者将90只小鼠随机均分为3组: 假手术(Sham)组、PBS治疗组和hUC-MSCs治疗组。治疗组小鼠采用盲肠结扎穿孔(cecal ligation and puncture, CLP)方式建立脓毒症模型; 假手术组小鼠仅开腹探查盲肠, 不行CLP。Sham组和PBS治疗组术后3 h经尾静脉注射0.2 mL PBS, hUC-MSCs治疗组注射等体积的hUC-MSCs悬液(含细胞 $7.5 \times 10^5$ /mL)。术后24 h, 流式细胞术检测各组小鼠外周血及腹腔灌洗液(peritoneal lavage fluid, PLF)中的中性粒细胞数量, ELISA检测血清炎症因子水平, 生化检验评价肝肾功, HE(hematoxylin and eosin)染色评估肝、肾、肺组织病理变化。观察术后小鼠一般情况, 绘制120 h生存曲线。结果显示, hUC-MSCs可以显著改善脓毒症小鼠一般状况, 减少中性粒细胞浸润, 降低小鼠体内炎症水平, 改善器官功能, 减轻组织器官损伤, 显著提高小鼠存活率。该研究显示了人脐带间充质干细胞移植对脓毒症小鼠的良好保护作用。

**关键词** 人脐带间充质干细胞; 脓毒症; 炎症; 保护作用

## Therapeutic Efficacy of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells in Septic Mice

Song Yuqing<sup>1</sup>, Zhu Ming<sup>1</sup>, He Xiao<sup>1</sup>, Guo Wei<sup>1</sup>, Xing Wei<sup>1</sup>, Liang Donglan<sup>1</sup>, An Tianchen<sup>1</sup>, Ao Luoquan<sup>1</sup>,  
Huang Hong<sup>1</sup>, Jiang Dongpo<sup>2\*</sup>, Xu Xiang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, Institute of Surgery Research Chongqing 400042, China;

<sup>2</sup>ICU, Daping Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

**Abstract** The aim of this study was to evaluate the therapeutic efficacy of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) in septic mice. A total of 90 C57BL/6 mice with cecal ligation and puncture (CLP)-induced sepsis were randomly divided into 3 groups, i.e. PBS treating group (CLP+PBS), hUC-MSCs treating group (CLP+hUC-MSCs), and Sham group treated with sham surgery, then PBS (Sham+PBS). PBS and hUC-MSCs suspension ( $7.5 \times 10^5$  cells/mL) were administered via tail vein injection in a volume of 0.2 mL per mouse at 3 h after CLP or sham surgery. All mice received subcutaneous injection of antibiotics at 6 h and 18 h after surgery. At 24 h after surgery, the abundance of neutrophils in peripheral blood and in peritoneal lavage fluid,

收稿日期: 2017-03-29 接受日期: 2017-05-25

国家自然科学基金(批准号: 81372027)和重庆市基础与前沿研究计划院士专项(批准号: csts2014jcyjys10002)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-68757901, E-mail: 13594231239@163.com; Tel: 023-68757412, E-mail: xiangxu@ymail.com

Received: March 29, 2017 Accepted: May 25, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81372027) and the Foundational and Cutting-Edge Research Plan of Chongqing: Special Projects for Academicians (Grant No.csts2014jcyjys10002)

\*Corresponding authors. Tel: +86-23-68757901, E-mail: 13594231239@163.com; Tel: +86-23-68757412, E-mail: xiangxu@ymail.com

网络出版时间: 2017-07-25 16:23:14

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170725.1623.006.html>

serum inflammatory cytokines, and serum markers of liver and kidney function were analyzed by flow cytometry, ELISA, and biochemical tests, respectively. Meanwhile, the pathological changes in liver, kidney and lung were assessed by the HE (hematoxylin and eosin) staining. The survival rates of mice in each group were evaluated every 12 h till 120 h, and then the survival curves were plotted. The mouse model of sepsis in this study was reproducible. When compared to PBS-treated mice, hUC-MSCs-treated mice showed a significant decrease in the ratios of serum pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6) to an anti-inflammatory cytokine (IL-10) and an obvious improvement in survival and general status. And, it could reduce polymorphonuclear neutrophils infiltration. The levels of serum markers of liver and kidney function (ALT, AST, Crea and Urea) and the pathologic lesion of organs (liver, kidney and lung) were significantly lower in hUC-MSC-treated mice than that in PBS-treated mice. Xenotransplantation of hUC-MSCs into CLP-induced septic mice showed an obvious protective effect.

**Keywords** human umbilical cord mesenchymal stem cells; sepsis; inflammation; protective effect

脓毒症(sepsis)是严重烧伤、创伤及感染的常见并发症,也是导致临床危重症患者死亡的最主要原因<sup>[1]</sup>。尽管有着众多的治疗手段和强有力的生命支持系统,脓毒症的发病率及死亡率仍居高不下。据统计,每年全世界约有1 900万新发脓毒症病例,并且这一数据还呈逐年递增的趋势,给各国带来了沉重的医疗负担<sup>[1-3]</sup>。脓毒症的病理、生理机制复杂多样且具有网络效应,因此,无论是活化蛋白C、抗生素、糖皮质激素,还是其他针对单一炎症因子受体的单克隆抗体等药物,均难以奏效<sup>[4-5]</sup>,目前尚无针对脓毒症的特效治疗方法。

脓毒症的本质是由于机体对感染反应失调而导致的严重危及生命的器官功能障碍<sup>[6]</sup>。随着对脓毒症研究的深入,目前普遍认为,免疫失衡是脓毒症发展的关键并最终导致多器官功能衰竭。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类来源于中胚层的具有多向分化潜能的干细胞,具有较好的免疫调节功能,被广泛应用于组织的再生修复和细胞替代治疗<sup>[7]</sup>。基于此,有学者利用骨髓来源的间充质干细胞治疗脓毒症,并在动物实验中取得良好的效果,显著提高了脓毒症小鼠的生存率<sup>[8-9]</sup>。但是,骨髓采集的有创性及并发症等风险可能会限制其临床应用。人脐带含有丰富的MSCs,具有扩增迅速、免疫原性低等特点,并且脐带来源广泛、采集方便。然而,人脐带间充质干细胞对脓毒症是否具有治疗作用,目前国内在此方面研究较少。为此,本研究利用盲肠结扎穿孔术建立小鼠脓毒症模型,经外周静脉输入人脐带间充质干细胞,观察脓毒症小鼠一般状况、生存率、炎症水平、器官功能等,探讨人脐带间充质干细胞对脓毒症小鼠的保护作用及可能机制,为干细

胞治疗脓毒症的应用提供实验基础及理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

人脐带间充质干细胞培养基(Ultra Culture™ Serum-free Medium)和人脐带间充质干细胞三系诱导分化试剂盒(成骨诱导:基础培养基175 mL、专用血清20 mL、青/链双抗2 mL、谷氨酰胺2 mL、抗坏血酸400  $\mu$ L、 $\beta$ -甘油磷酸钠2 mL、地塞米松20  $\mu$ L;成软骨诱导:基础培养基97 mL、丙酮酸钠100  $\mu$ L、抗坏血酸300  $\mu$ L、ITS1 mL、脯氨酸100  $\mu$ L、TGF- $\beta$ 3 1 mL、青/链双抗1 mL;成脂分化A液:基础培养基175 mL、专用血清20 mL、青/链双抗2 mL、谷氨酰胺2 mL、胰岛素400  $\mu$ L、IBMX 200  $\mu$ L、罗格列酮200  $\mu$ L、地塞米松200  $\mu$ L;成脂分化B液:基础培养基175 mL、专用血清20 mL、青/链双抗2 mL、谷氨酰胺2 mL、胰岛素400  $\mu$ L)均购自赛业(广州)生物科技有限公司;胰蛋白酶购自美国Gibco公司;红细胞裂解液购自美国Hyclone公司;抗人CD29、CD34、CD45、CD90、CD105、抗小鼠Ly-6G抗体购自美国BD公司;注射用亚胺培南/西司他丁钠购自杭州默沙东制药有限公司;三气培养箱购自美国Thermo公司;小鼠TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10 ELISA Kit购自武汉博士德生物工程有限公司;流式细胞仪购自艾森生物(杭州)有限公司。其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 人脐带间充质干细胞的培养与鉴定

1.2.1 人脐带间充质干细胞的分离、培养 采用植块法提取人脐带间充质干细胞<sup>[10]</sup>。从新鲜脐带(经第三军医大学大坪医院伦理委员会批准及产妇家属知情同意)中分离出华通氏胶(Wharton's Jelly)。将

华通氏胶剪至约1~3 mm<sup>3</sup>大小,转移至25 cm<sup>2</sup>培养瓶中,加入适量干细胞培养基,置于三气培养箱中培养约2周,细胞迁出长至适量后用0.25%胰蛋白酶/EDTA消化传代,为P1代细胞。本实验选择P3~P5代细胞。

**1.2.2 人脐带间充质干细胞的表型鉴定** 将1.2×10<sup>6</sup>个第3代MSCs用1.6 mL PBS重悬,均分到6支1.5 mL EP管中,离心去上清,各加入95 μL PBS以及5 μL的Isotype Control-PE、CD29-PE、CD34-FITC、CD45-FITC、CD90-PE、CD105-PE,混匀后室温避光反应30 min,然后离心去上清,再各加入50 μL PBS重悬细胞,流式细胞仪采样分析。

**1.2.3 人脐带间充质干细胞的体外诱导分化** (1)成骨分化:将第4代MSCs以1×10<sup>5</sup>/孔接种于预先用0.1%明胶包被的12孔板,待细胞生长至60%~70%,将培养基更换为成骨诱导培养基,每2~3 d换液1次。诱导21 d,4%多聚甲醛固定细胞后用茜素红染色5 min。(2)成软骨分化:将第4代MSCs以1.0×10<sup>5</sup>/孔接种至12孔板,生长至70%后,将培养基更换为成软骨诱导培养基,每2~3 d换液1次。诱导21 d,4%多聚甲醛固定细胞后用阿尔新蓝染色10 min。(3)成脂分化:将第4代MSCs以1×10<sup>5</sup>/孔接种至12孔板,至细胞生长汇合达100%,将培养基更换为成脂诱导培养基A液,维持3 d后更换为B液,24 h后再次更换为A液,共交替作用5个周期后,用B液维持培养7 d(每2~3 d换液1次)。4%多聚甲醛固定细胞后用油红O工作液染色30 min。染色后,显微镜下鉴定上述分化效果。

### 1.3 动物实验

**1.3.1 动物分组及脓毒症模型的建立** SPF级雄性C57BL/6小鼠,8~10周龄,体重23~25 g,由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供[合格证号:SCXK(渝)20131018]。动物实验经第三军医大学大坪医院伦理委员会批准。将60只小鼠随机分为Sham组、PBS治疗组和hUC-MSCs治疗组,每组20只,采用盲肠结扎穿孔(cecal ligation and puncture, CLP)方式建立小鼠脓毒症模型<sup>[11]</sup>。小鼠用1%戊巴比妥腹腔注射(40 mg/kg)麻醉后,取腹正中1 cm长切口,探查腹腔并取出盲肠,距盲端1 cm处以3-0丝线结扎,21号针头在结扎远段的中间贯穿盲肠,形成两个穿刺孔,轻轻挤压盲肠,确认穿刺孔畅通,然后还纳入腹腔原位,逐层缝合关腹。Sham组仅开腹,并探查盲肠,即缝合关腹,不行CLP。小鼠术后立即皮下注射温生理盐水(50 mL/kg)复苏,术后6 h经皮下给予亚胺培

南/西司他丁钠(14 mg/kg),之后每12 h重复给药1次(7 mg/kg)。Sham组和PBS治疗组于术后3 h经尾静脉注射0.2 mL PBS, hUC-MSCs组注射等体积的hUC-MSCs悬液(7.5×10<sup>5</sup>/mL)。

另取30只小鼠,随机分为3组,每组10只,建模及给药方式同上,用于采血、收集腹腔灌洗液和组织器官。

**1.3.2 小鼠生存率曲线的绘制** CLP术后连续观察120 h,记录小鼠精神状态、饮食等一般生存状况,并绘制生存率曲线。

**1.3.3 小鼠血清细胞因子及生化指标的检测** CLP术后24 h,将各组小鼠摘眼球取血,每只留取100 μL用于中性粒细胞计数,余血分离血清后用ELISA法检测炎症因子TNF-α(tumor necrosis factor-α)、IL-1β(interleukin-1β)、IL-6、IL-10的水平,具体操作按试剂盒说明书进行。部分血清送我院检验科检测丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、肌酐(creatinine, Crea)、血尿素(Urea)的水平。

**1.3.4 小鼠外周血及腹腔灌洗液中中性粒细胞(polymorphonuclear leukocyte, PMN)计数** 取100 μL外周血,加入1 mL红细胞裂解液裂解3 min,再加入PBS终止后,离心去上清,加入95 μL PBS和5 μL Ly-6G-PE,混匀后避光反应30 min,离心去上清,再加入50 μL PBS重悬,流式细胞仪采样分析。取原手术切口开腹,以2 mL无菌PBS冲洗腹腔,尽量回收,流式细胞术分析步骤同前。

**1.3.5 小鼠主要脏器的病理学检查** 各组小鼠取血及腹腔灌洗后,颈椎脱臼处死,迅速摘取肝、肾、肺组织,以4%多聚甲醛固定,常规脱水、石蜡包埋切片后行HE(hematoxylin and eosin)染色,观察细胞及组织形态学变化。

### 1.4 统计学分析

数据采用SPSS 19.0统计软件进行分析,所有数据以均数±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,以P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 hUC-MSCs的培养及鉴定

hUC-MSCs形态为短梭形,贴壁生长,呈极性排列,集落表现为典型的漩涡状,增殖旺盛,培养2~3 d汇合度即可达80%以上。经流式细胞术检测细胞表

面标志物, CD29、CD34、CD45、CD90、CD105的表达情况符合国际细胞治疗协会(International Society for Cellular Therapy, ISCT)2006年推荐的标准<sup>[12]</sup>。经体外定向诱导分化培养后, 我们分离得到的hUC-MSCs可以向成骨细胞、成软骨细胞和成脂肪细胞分化(图1), 与文献报道一致<sup>[10]</sup>。

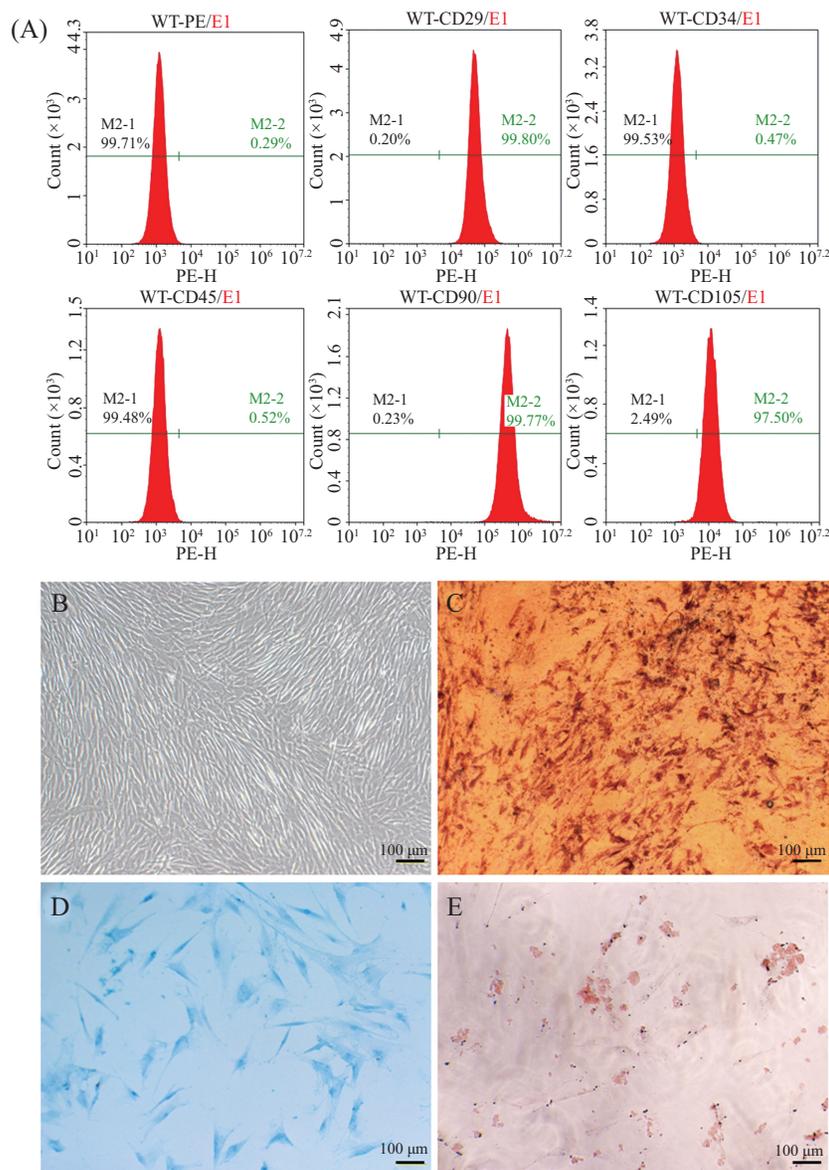
## 2.2 hUC-MSCs移植对脓毒症小鼠一般状况及生存率的影响

盲肠结扎穿孔术后, 小鼠一般情况较差, 出现

精神萎靡、蜷缩、竖毛、饮食减少、眼角分泌物增多、腹泻等症状。经尾静脉输入hUC-MSCs治疗, 小鼠上述症状会减轻, 恢复较快, 术后120 h生存率由15%上升到55%, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ , 图2)。

## 2.3 hUC-MSCs移植对脓毒症小鼠血清炎症因子的影响

CLP术后24 h, PBS组血清中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10的水平有明显上升( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ )。而hUC-MSCs组小鼠血清TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6水平

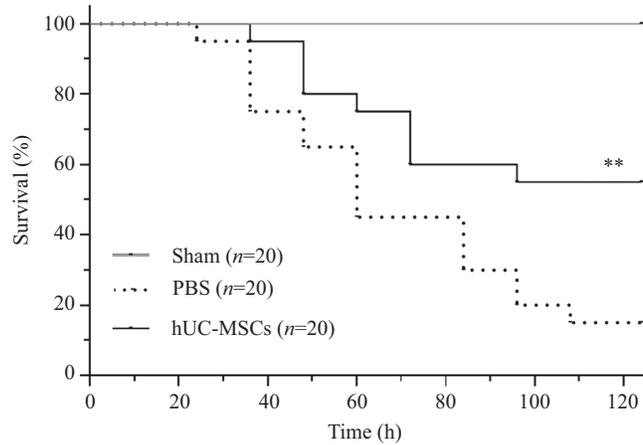


A: 流式细胞术检测干细胞表面标志物CD29、CD34、CD45、CD90和CD105; B: 正常培养的hUC-MSCs; C-E: hUC-MSCs的成骨、成软骨和成脂分化(依次为茜素红、阿尔新蓝和油红O染色)。

A: CD29, CD34, CD45, CD90 and CD105 in hUC-MSCs detected by flow cytometry; B: hUC-MSCs in cultures from Wharton's Jelly; C-E: the analysis of the differentiation capacity of the hUC-MSCs (osteogenesis, chondrogenesis, and adipogenesis identified by staining with Alizarin Red, Alcian Blue, and Oil Red O, respectively).

图1 人脐带间充质干细胞的培养及鉴定

Fig.1 The culture and identification of hUC-MSCs

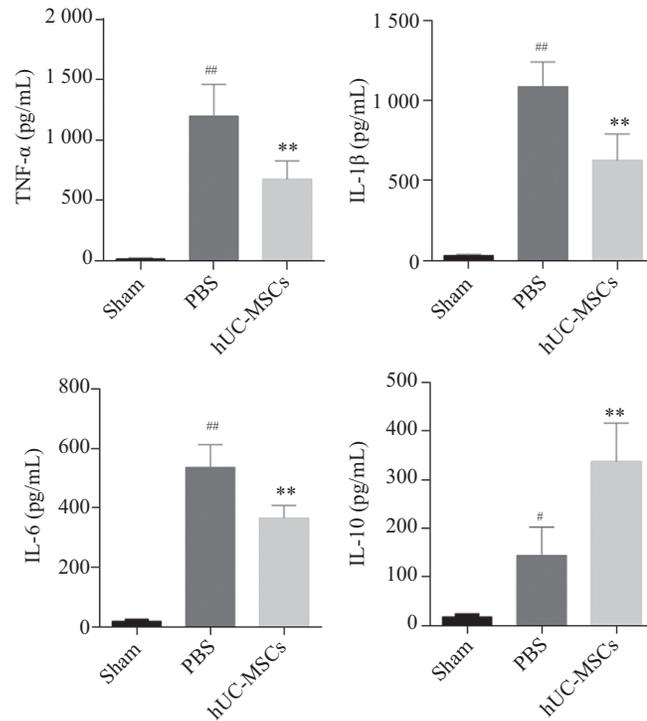


\*\* $P < 0.01$ , 与PBS组相比较。

\*\* $P < 0.01$  compared with the PBS group.

图2 各组小鼠术后生存率曲线

Fig.2 The survival curves of mice after CLP



# $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , 与Sham组相比较; \*\* $P < 0.01$ , 与PBS组相比较。  $n = 7$ 。

# $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  compared with the Sham group; \*\* $P < 0.01$  compared with the PBS group.  $n = 7$ 。

图3 各组小鼠术后24 h血清中炎症因子的水平

Fig.3 The serum levels of inflammatory cytokines in mice from different groups at 24 h after CLP

较PBS组有显著下降( $P < 0.01$ ), IL-10的水平则有明显上升( $P < 0.01$ , 图3)。

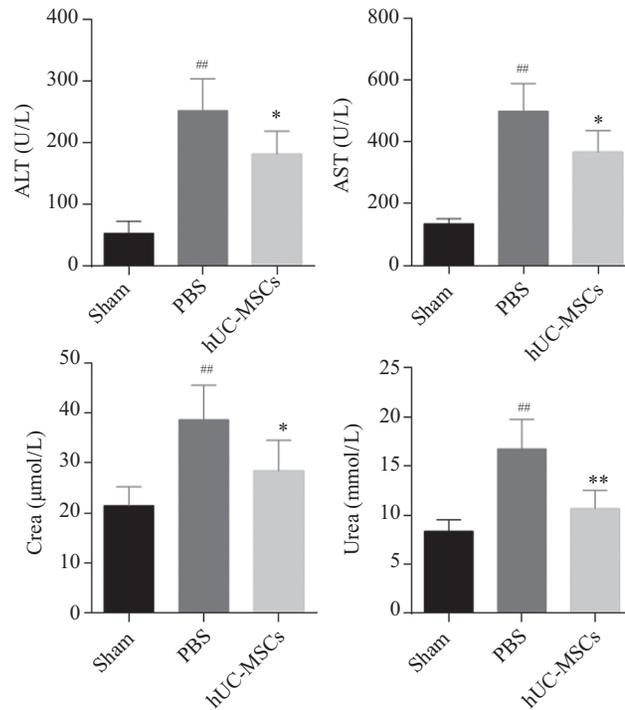
#### 2.4 hUC-MSCs移植对脓毒症小鼠血清生化指标的影响

肝、肾等器官是脓毒症时受攻击的主要器官,尤其是脓毒症后期会发生多器官的功能衰竭。我们检测到CLP术后24 h,脓毒症小鼠血液中ALT、

AST、Crea、Urea等生化指标的水平较Sham组有明显升高( $P < 0.01$ ),给予hUC-MSCs治疗后,则有显著下降( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ , 图4)。

#### 2.5 hUC-MSCs移植对脓毒症小鼠外周血及PLF中性粒细胞数量的影响

中性粒细胞在固有免疫中扮演重要角色,尤其是在急性感染期,发挥吞噬和杀菌功能,但是其

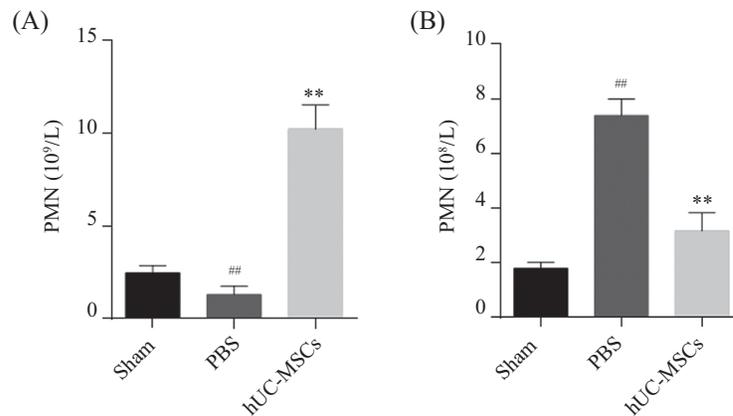


<sup>##</sup> $P < 0.01$ , 与Sham组相比较; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , 与PBS组相比较;  $n = 7$ 。

<sup>##</sup> $P < 0.01$  compared with the Sham group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  compared with the PBS group;  $n = 7$ 。

图4 各组小鼠术后24 h血清中ALT、AST、Crea和Urea的水平

Fig.4 The levels of ALT, AST, Crea and Urea in sera from different mice at 24 h after CLP



A: 外周血中的PMN计数; B: 腹腔灌洗液中的PMN计数。<sup>##</sup> $P < 0.01$ , 与Sham组相比较; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , 与PBS组相比;  $n = 7$ 。

A: the counts of PMN in peripheral blood; B: the counts of PMN in PLF. <sup>##</sup> $P < 0.01$  compared with the Sham group; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  compared with the PBS group;  $n = 7$ 。

图5 各组小鼠术后24 h时外周血和PLF中的PMN计数

Fig.5 The counts of PMN in peripheral blood and PLF from different mice at 24 h after CLP

过度活化及在组织中过多堆积又会加重组织的损伤。我们观察到, 术后24 h, hUC-MSCs组小鼠外周血中PMN计数较PBS组增高更明显( $P < 0.01$ ), 而在腹腔灌洗液中, 则是PBS组的PMN计数升高更明显( $P < 0.01$ , 图5)。

### 2.6 hUC-MSCs移植对脓毒症小鼠肝、肾及肺组织的病理损伤的影响

术后24 h, Sham组小鼠肝脏未见明显异常, PBS

组可见大量炎性细胞浸润、肝索紊乱、肝细胞空泡变性等改变, 经hUC-MSCs治疗, 上述肝组织病理改变明显减轻。Sham组肾小球、肾小管结构完整, PBS组肾小球毛细血管扩张、充血, 有炎性细胞浸润, 球囊间隙变窄, 肾小管上皮细胞水肿、空泡变性, 近端肾小管刷状缘脱落, 部分肾小管基底膜裸露, 经移植hUC-MSCs, 肾组织病理损伤有明显改善。Sham组小鼠肺组织未见异常, PBS组肺泡结构受破坏, 正

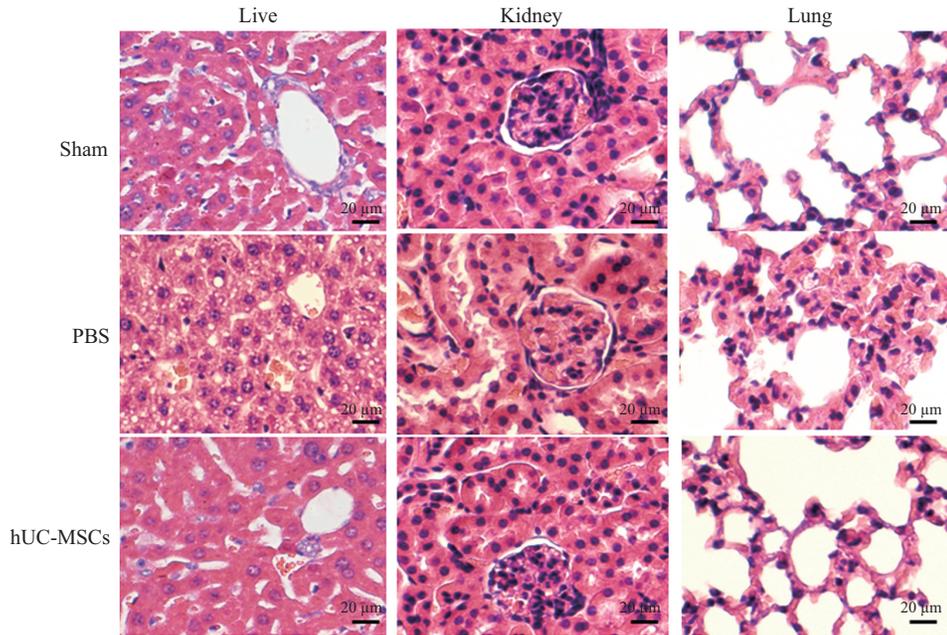


图6 各组小鼠术后24 h肝、肾、肺组织病理学变化(HE染色)

Fig.6 HE staining for evaluating the pathological changes of liver, kidney and lung tissues in each group at 24 h after CLP

常肺泡消失或融合,肺泡壁明显水肿增厚,间质淤血并有大量炎性细胞浸润,肺泡腔内可见透明膜形成,而hUC-MSCs组上述肺组织病理改变有明显减轻(图6)。

### 3 讨论

脓毒症长期以来都是ICU面临的棘手难题,是全球范围内致死、致残的主要原因之一。随着对脓毒症病理生理过程研究的深入,目前已基本明确,脓毒症时机体发生过度的系统性炎症反应,这一反应可被体内多种因素影响而产生放大效应<sup>[1,13]</sup>。在这一过程中不仅有促炎反应,也有抗炎反应的发生<sup>[14]</sup>。失调的免疫及炎症反应导致机体组织器官的损伤,并最终出现多器官功能的衰竭。间充质干细胞由于在组织工程、免疫系统疾病的治疗等方面的优异表现而在近年受到广泛关注,成为临床细胞治疗的种子细胞,而脐带间充质干细胞因为取材容易、培养扩增方便、生物性能稳定等优势而被认为是比脐带血、脂肪来源的MSCs更有潜力的干细胞<sup>[15]</sup>。

本研究中,流式细胞术检测表面标志物及体外诱导分化结果证实,我们利用人脐带中的华通氏胶成功分离培养出了人脐带间充质干细胞。经过hUC-MSCs治疗,脓毒症小鼠的一般生存状况有了改善,5日生存率也有明显提高。脓毒症时,机体免疫系统在病程早期即被过度激活,并相互作用而产

生“瀑布效应”,放大了炎症反应,造成内稳态的失衡。既往多项动物实验研究证实,脓毒症时动物体内的多种炎症因子水平升高<sup>[8-10]</sup>;在临床治疗中亦发现,脓毒症患者的血清中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6等促炎症因子及IL-10等抗炎症因子水平升高。本研究中,MSCs治疗组小鼠在术后早期(24 h)时血清中的TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6水平与PBS组相比显著下降,而IL-10水平则明显上升,说明hUC-MSCs能够较早发挥免疫调节作用,抑制早期过度的炎症反应,使“促炎”及“抗炎”效应趋于平衡。

由于中性粒细胞在炎症及免疫反应中有重要作用,本研究对各组小鼠循环及腹腔中的中粒细胞进行了计数。结果显示,输入hUC-MSCs的脓毒症小鼠循环中的中性粒细胞有了明显的增多,而在腹腔中则有下降。脓毒症时,循环中较多的中性粒细胞有助于降低细菌负荷,但是在组织及腹腔中,由于髓过氧化物酶的副作用,中性粒细胞可以导致氧化应激损伤<sup>[8]</sup>。本文结果表明,输入体内的hUC-MSCs将循环和组织中的免疫细胞达到最佳平衡,从而最大限度地杀死血液中的细菌,同时将由于中性粒细胞浸润导致的器官损害降到最低。

多器官功能衰竭是脓毒症患者的最主要死亡原因,而肝、肾、肺组织是脓毒症早期最常见的受损器官<sup>[8,16]</sup>。本研究发现,经过给予hUC-MSCs治疗,术后早期(24 h)时脓毒症小鼠的肝功(AST、ALT)、

肾功(Crea、Urea)与PBS组相比明显好转;组织病理检查结果也显示,脓毒症小鼠受损的肝、肾、肺组织结构得到修复。结果充分说明,hUC-MSCs对脓毒症时受损的肝、肾、肺器官有保护作用,小鼠的病情出现好转。然而,MSCs发挥器官保护作用的具体机制尚不清楚。较多的研究证实,输入体内的干细胞大部分于数天之内即发生大量而快速的凋亡<sup>[17-18]</sup>,尽管也有研究发现,输入体内的MSCs可定植在损伤模型的肝、肾、肺等器官,但是由于数量极少而无法证实干细胞是否发生了定向分化,而且即使分化为局部组织细胞,这极少量的细胞仍无法解释MSCs的器官保护作用<sup>[19]</sup>。

综上所述,脓毒症时经外周血移植脐带间充质干细胞可以调节体内失控的炎症反应,平衡机体稳态,发挥器官保护作用,从而改善脓毒症小鼠的一般状况,延长生存时间,提高生存率。虽然在本研究中确实观察到hUC-MSCs对脓毒症小鼠有较好的保护作用,然而干细胞发挥作用的具体机制以及向临床转化的真实疗效仍需要进一步研究。

### 参考文献 (References)

- 1 Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *New Engl J Med* 2013; 369(21): 2063.
- 2 Adhikari NK, Fowler RA, Bhagwanjee S, Rubenfeld GD. Critical care and the global burden of critical illness in adults. *Lancet* 2010; 376(9749): 1339-46.
- 3 Jawad I, Luksic I, Rafnsson SB. Assessing available information on the burden of sepsis: Global estimates of incidence, prevalence and mortality. *J Glob Health* 2012; 2(1): 010404.
- 4 Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Lossier MR, Heshmati F, *et al.* Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: A multicenter study. *JAMA* 1999; 282(6): 561-8.
- 5 Fisher CJ Jr, Dhainaut JF, Opal SM, Pribble JP, Balk RA, Slotman GJ, *et al.* Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group. *JAMA* 1994; 271(23): 1836-43.
- 6 Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA* 2016; 315(8): 801-10.
- 7 Maumus M, Guerit D, Toupet K, Jorgensen C, Noel D. Mesenchymal stem cell-based therapies in regenerative medicine: Applications in rheumatology. *Stem Cell Res Ther* 2011; 2(2): 14.
- 8 Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, *et al.* Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 2009; 15(1): 42-9.
- 9 Mei SH, Haitsma JJ, Dos Santos CC, Deng Y, Lai PF, Slutsky AS, *et al.* Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182(8): 1047-57.
- 10 Condor JM, Rodrigues CE, Sousa Moreira R, Canale D, Volpini RA, Shimizu MH, *et al.* Treatment with human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells attenuates sepsis-induced kidney injury, liver injury, and endothelial dysfunction. *Stem Cells Transl Med* 2016; 5(8): 1048-57.
- 11 Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc* 2009; 4(1): 31-6.
- 12 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315-7.
- 13 Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, van der Poll T. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence* 2014; 5(1): 36-44.
- 14 Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: From cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2013; 13(12): 862-74.
- 15 Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaca LL, Cerqueira A, Carvalho MD, *et al.* Multipotent stem cells from umbilical cord: Cord is richer than blood! *Stem Cells* 2008; 26(1): 146-50.
- 16 Luo CJ, Zhang FJ, Zhang L, Geng YQ, Li QG, Hong Q, *et al.* Mesenchymal stem cells ameliorate sepsis-associated acute kidney injury in mice. *Shock* 2014; 41(2): 123-9.
- 17 Matri M, Lin H, Lee T. Enhancing the efficacy of mesenchymal stem cell therapy. *World J Stem Cells* 2014; 6(2): 82-93.
- 18 Robey TE, Saiget MK, Reinecke H, Murry CE. Systems approaches to preventing transplanted cell death in cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 45(4): 567-81.
- 19 Tögel F, Weiss K, Yang Y, Hu Z, Zhang P, Westenfelder C. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292(5): F1626-35.