

• 短篇论著 •

间充质干细胞治疗重症急性胰腺炎临床疗效的观察

黄少雄 常诚 李文生 宋京翔 涂小煌

【摘要】 目的 探讨间充质干细胞(MSCs)在重症急性胰腺炎(SAP)治疗中的疗效、安全性及相关不良反应。**方法** 收集2010年1~12月SAP患者20例,随机分为常规组和MSCs组。MSCs组入院后第3天及第10天外周静脉注射MSCs,剂量为 1×10^6 个/kg。治疗过程中观察两组患者生命体征、肝、肾功能,定期复查患者CT征象、白细胞计数、血、尿淀粉酶、血小板活化因子、TNF- α 、IL-6、IL-8等指标的浓度,并对比两组患者的死亡率、并发症的发生率、手术率、平均住院时间和出院后随访情况。**结果** (1)两组手术率、并发症的发生率比较无统计学差异($P > 0.05$);MSCs组的平均住院时间较常规组明显缩短,两者比较有统计学差异($P < 0.05$);出院后半年内,MSCs组患者复发率及并发症的发生率低于常规治疗组,但两者比较均无统计学差异($P > 0.05$)。(2)MSCs组患者的CT征象及白细胞计数、血、尿淀粉酶、C-反应蛋白、血小板活化因子、TNF- α 、IL-6、IL-8等指标浓度较常规组明显改善。**结论** MSCs治疗可能有助于改善急性胰腺炎的炎症反应,有并发症少、缩短住院时间等优势。

【关键词】 间质干细胞; 胰腺炎,急性坏死性; 炎症因子

目前重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)常规治疗是给予禁食、胃肠减压、营养支持、抑制胰酶分泌、解痉、镇痛、维持水电解质平衡、血液滤过净化、抗生素应用、中药大黄胃管灌注或者直肠灌肠、营养支持等综合治疗,部分SAP胰腺坏死组织继发感染还需要手术治疗^[1]。尽管近几年SAP病死率和并发症发生率有所下降,但目前的治疗缺乏特异有效性,总体的治疗效果尚不令人满意。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类具有向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌细胞、肝脏细胞和神经细胞等多种细胞分化的多能干细胞^[2]。国外有研究发现MSCs可以通过强大的抗炎作用及促进组织修复等机制明显改善SAP患者的预后。本研究在前人研究的基础上通过病例对照研究进一步探讨MSCs治疗SAP患者的疗效、不良反应等,为SAP的治疗提供一种新的思路及途径。

一、对象与方法

1. 研究对象:选择2010年1~12月福州总医院普通外科的SAP患者20例,均经超声或CT检查及血尿淀粉酶确诊,符合中华医学会消化病学分会制订的《重症急性胰腺炎诊治指南》的SAP诊断标准^[3]。随机分为两组:治疗组10例,男7例,女3例;年龄18~67岁,平均41岁;入院前病程(9.56 $\pm$ 4.45)h;发病原因:胆石感染5例,暴饮暴食2例,饮酒2例,不明原因1例。对照组10例,男5例,女5例;年龄17~65岁,平均42岁;入院前病程(7.12 $\pm$ 5.32)h;发病原因:胆石感染4例,暴饮暴食3例,饮酒2例,不明原因1例。两组患者在年龄、性别、入院前病程等方面无统计学差异($P > 0.05$),具有可比性。

纳入标准:(1)确诊为SAP;在其基础上出现脏器衰竭和(或)出现胰腺坏死、脓肿/假性囊肿等局部并发症;(2)发病48h内入院;(3)前期未接受其他干细胞治疗者;(4)否认药物过敏史;(5)女性患者妊娠试验阴性。

排除标准:(1)年龄 >70 岁,或 <18 岁;(2)有严重心、肺、肝

脏疾病及恶性肿瘤者;(3)妊娠期及哺乳期妇女;(4)具有精神疾病、交流方面困难者;(5)既往有过干细胞治疗病史;(6)其他可能影响研究结果及不宜进入研究者。

2. 治疗方法:两组患者均给予常规治疗,包括禁食、胃肠减压、抑制胰腺分泌、抗感染、营养支持、中药大黄胃管灌注及直肠灌肠等对症治疗。MSCs组在常规治疗的基础上于入院第3天及第10天给予外周静脉输注MSCs治疗(同种异体MSCs来源于我院干细胞实验中心,经过医院伦理委员会审核同意使用),输注剂量为 1×10^6 个细胞/kg,输注时间控制在20min左右,治疗过程中注意监测患者的生命体征、肝、肾功能,观察两组的疗效。

3. 观察指标:患者入院后第1、4、10、14天行CT检查。入院后第1天急诊抽血,入院第3、4、6、10、14天清晨空腹抽取外周静脉血进行血常规、生化、血淀粉酶、C-反应蛋白(CRP)等检测。TNF- α 、血小板活化因子(PAF)、IL-6、IL-8均采用ELISA法测定,试剂盒购自北京北方生物技术研究所,根据试剂盒上的说明进行操作。治疗期间严格观察两组患者生命体征、动脉血氧饱和度等。监测患者可能出现的不良反应:发热、血压升高、心率失常、血脂升高、血糖升高等。比较两组患者平均住院时间、手术率、并发症发生率、死亡率等。随访半年,比较两组复发率及并发症的发生率。

4. 疗效判断:主要参考中华医学会消化病学分会制订的《重症急性胰腺炎诊治指南》。

5. 统计学分析:采用SPSS 16.0统计软件分析,计数资料的比较使用 χ^2 检验;计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组资料的比较采用两独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 术后一般情况:两组均无死亡病例。MSCs组手术2例,发生并发症3例,对照组无手术病例,发生并发症1例;MSCs组平均住院时间(14.6 $\pm$ 0.84)d,较常规组[(16.8 $\pm$ 1.23)d]明显缩短,差异有统计学意义($P < 0.05$)。MSCs组患者在治疗的过程中,生命体征、动脉血氧饱和度与常规组对比无明显统计学差异,治疗过程中未出现明显发热、血压升高、心率失常等不良反

表1 两组患者不同时间点各项指标测定结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	WBC($\times 10^9$ /L)					
		1 d	3 d	4 d	6 d	10 d	14 d
常规组	10	16.13 $\pm$ 2.61	15.58 $\pm$ 1.71	15.54 $\pm$ 1.69	10.73 $\pm$ 1.39	7.68 $\pm$ 1.64	7.31 $\pm$ 1.99
MSCs组	10	16.47 $\pm$ 2.18	15.55 $\pm$ 1.82	13.74 $\pm$ 2.06 ^a	8.23 $\pm$ 2.13 ^a	5.92 $\pm$ 1.97 ^a	5.50 $\pm$ 1.73 ^a
P值		0.757	0.708	0.047	0.006	0.043	0.048
组别		CRP(mg/L)					
		1 d	3 d	4 d	6 d	10 d	14 d
常规组		182.46 $\pm$ 27.20	178.7 $\pm$ 21.98	176.02 $\pm$ 18.81	132.42 $\pm$ 21.89	89.53 $\pm$ 19.49	31.27 $\pm$ 14.88
MSCs组		179.51 $\pm$ 27.36	166.21 $\pm$ 20.06	153.69 $\pm$ 22.54 ^a	112.60 $\pm$ 15.07 ^a	67.94 $\pm$ 25.78 ^a	7.22 $\pm$ 5.21 ^a
P值		0.811	0.200	0.027	0.030	0.049	0.037
组别		TNF(pg/ml)					
		1 d	3 d	4 d	6 d	10 d	14 d
常规组		11.12 $\pm$ 4.11	10.43 $\pm$ 2.30	9.89 $\pm$ 2.75	7.20 $\pm$ 2.26	3.92 $\pm$ 1.60	1.92 $\pm$ 0.88
MSCs组		12.70 $\pm$ 5.43	10.28 $\pm$ 1.34	9.79 $\pm$ 3.59 ^a	4.78 $\pm$ 2.59 ^a	2.16 $\pm$ 1.38 ^a	1.17 $\pm$ 0.64 ^a
P值		0.471	0.926	0.033	0.039	0.017	0.042
组别		PAF(ng/ml)					
		1 d	3 d	4 d	6 d	10 d	14 d
常规组		878.16 $\pm$ 6.46	870.66 $\pm$ 8.61	736.30 $\pm$ 5.60	490.72 $\pm$ 6.21	207.35 $\pm$ 9.27	160.73 $\pm$ 4.23
MSCs组		876.64 $\pm$ 4.59	868.68 $\pm$ 7.17	730.53 $\pm$ 5.75 ^a	455.85 $\pm$ 4.52 ^a	146.96 $\pm$ 4.54 ^a	107.10 $\pm$ 6.69 ^a
P值		0.502	0.992	0.035	<0.001	<0.001	<0.001
组别		IL-6(pg/ml)					
		1 d	3 d	4 d	6 d	10 d	14 d
常规组		491.3 $\pm$ 6.74	496.34 $\pm$ 16.29	514.1 $\pm$ 27.9	481.7 $\pm$ 37.8	244.7 $\pm$ 27.4	207.52 $\pm$ 29.2
MSCs组		480.5 $\pm$ 7.47	491.02 $\pm$ 13.78	535.9 $\pm$ 16.4 ^a	624.2 $\pm$ 37.9 ^a	280.8 $\pm$ 43.3 ^a	109.9 $\pm$ 18.15 ^a
P值		0.123	0.441	0.047	<0.001	0.039	<0.001
组别		IL-8(pg/ml)					
		1 d	3 d	4 d	6 d	10 d	14 d
常规组		36.6 $\pm$ 2.48	37.95 $\pm$ 1.595	41.4 $\pm$ 2.2	37.53 $\pm$ 3.89	28.79 $\pm$ 2.2	14.2 $\pm$ 3.00
MSCs组		37.3 $\pm$ 3.97	37.53 $\pm$ 1.81	37.7 $\pm$ 3.8 ^a	32.34 $\pm$ 3.28 ^a	24.45 $\pm$ 3.02 ^a	9.2 $\pm$ 1.92 ^a
P值		0.652	0.579	0.015	0.005	0.002	<0.001

注:与常规治疗组比较,^a $P < 0.05$

应,血脂、血糖常规组对比也无明显统计学差异。两组患者肝功能、肾功能比较也无明显统计学差异。MSCs组患者在治疗前后未出现明显排斥反应。MSCs组患者治疗后影像学检查见图1。随访半年, MSCs组患者复发1例,发生假性囊肿1例,常规治疗组无复发及并发症,两者比较无统计学差异($P > 0.05$)。

2. 两组患者住院期间胰腺炎相关指标的比较(表1):入院第1天两组患者血WBC、CRP、TNF- α 、PAF等均高于正常值,但两组比较无统计学差异($P > 0.05$),入院经相关治疗后,各项指标均开始下降,第3天两组比较也无统计学差异($P > 0.05$),第4天MSCs组各指标下降速度明显快于常规治疗组,两组比较有统计学差异($P < 0.05$)。入院第1天两组患者血IL-6、IL-8浓度均较高,两组比较无明显统计学差异($P > 0.05$);入院后经相关治疗,第3天两组患者IL-6、IL-8浓度均升高,两组比较无明显统计学差异($P > 0.05$);第4天开始, MSCs组IL-6、IL-8浓度升高更加明显,两组比较有统计学差异($P < 0.05$);以后开始下降,

MSCs组患者IL-6、IL-8浓度下降更明显,两组比较有统计学差异。入院第1天两组患者血、尿淀粉酶浓度均较高,两组比较无明显统计学差异($P > 0.05$),入院后经相关治疗后,两组患者血淀粉酶浓度均开始下降,常规组1、3、4、6、10、14 d分别为(955.66 $\pm$ 20.8)U/L、(671.39 $\pm$ 20.9)U/L、(556.37 $\pm$ 88.44)U/L、(43.54 $\pm$ 10.41)U/L、(20.86 $\pm$ 4.62)U/L、(21.5 $\pm$ 5.25)U/L, MSCs组分别为(959.39 $\pm$ 29.9)U/L、(667.39 $\pm$ 26.9)U/L、(547.56 $\pm$ 90.25)U/L、(40.23 $\pm$ 12.68)U/L、(23.20 $\pm$ 4.23)U/L、(20.22 $\pm$ 3.21)U/L, MSCs组患者血、尿淀粉酶浓度下降速度较常规治疗组快,但血淀粉酶两者比较无统计学差异, MSCs组尿淀粉酶在4 d[(1892.2 $\pm$ 200.2)U/L]与常规组[(2100.3 $\pm$ 212.4)U/L]比较均有统计学差异($P < 0.05$)。

三、讨论

SAP早期即可发生全身炎症反应综合征(systemic inflammation response, SIRS)和多器官功能障碍综合征(multiple organ

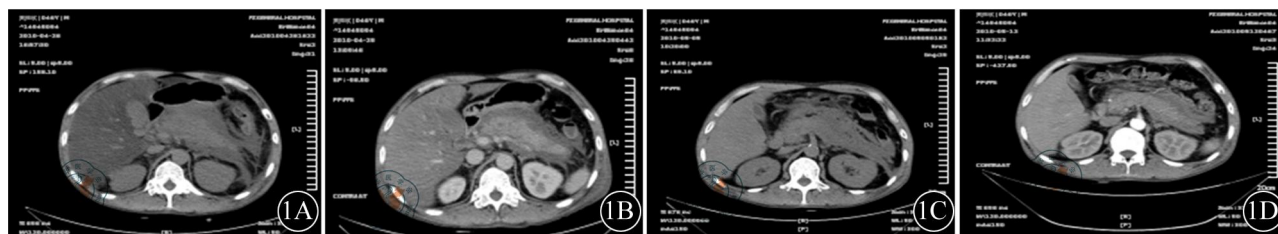


图1 静脉注射MSCs治疗疗效观察。1A: 第1天, 可见胰腺及周围组织大量水肿坏死, 边界模糊不清, 肝实质平均CT值为22.72 HU; 1B: 第4天, 可见胰腺及周围组织水肿较前好转, 肝实质平均CT值为39.29 HU; 1C: 第10天, 可见胰腺及周围水肿组织较前好转, 边界更加清楚, 肝实质平均CT值80.76 HU; 1D: 第14天, 可见胰腺及周围组织水肿基本消退, 肝实质平均CT值91.31 HU

dysfunction syndrome, MODS), 目前 SAP 的常规治疗后死亡率仍高达 10% ~ 20%^[4]。研究^[5]认为 SAP 患者白细胞过度激活及细胞因子级联反应学说被认为是引起 SIRS、MODS 以至死亡的重要原因和发病机制, 尤其是 SAP 早期(急性炎症期)的炎症级联反应是影响 SAP 病程发展的关键环节, 但其机制尚不完全清楚。

在本研究中, 通过病例对照研究探讨了 MSCs 治疗 SAP 的疗效及相关不良反应, 结果发现 SAP 在常规治疗基础上给予 MSCs 外周静脉注射治疗后, 胰腺炎相关因子如 WBC 计数、CRP、PAF、IL-8、TNF- α 、淀粉酶浓度等的下降均较常规组快, 两组比较有统计学差异, 表明 MSCs 能够对胰腺炎患者的炎症反应水平产生影响, 并且这种影响与患者自身的炎症反应程度有一定的关系。另外 MSCs 治疗后 1 d 之内对多种细胞因子, 如 CRP、INF- α 等的影响更显著, 提示 MSCs 可能在 SAP 早期发挥着更重要的治疗作用。通过比较 IL-6 及 IL-8 的变化趋势可以发现静脉注射 MSCs 早期, IL-6 及 IL-8 有所升高, 可能与 MSCs 自身分泌 IL-6、IL-8 有关, 而后者能够抑制 T 淋巴细胞的增殖^[6]。

本研究发现在 SAP 常规治疗的基础上通过外周静脉注射 MSCs, 有助于改善急性胰腺炎的炎症反应, 降低相关不良反应的发生率, 可能与以下机制有关: (1) MSCs 迁移至损伤胰腺组织及促进损伤胰腺组织修复; MSCs 具有向损伤组织迁移和骨髓“归巢”的特性。骨髓基质产生基质源性因子 1 (stromal cell derived factor-1, SDF-1) 是一种趋化因子, 能够对 MSCs 细胞表面表达的 CXCR4 作出移动反应。而血管损伤后平滑肌细胞也分泌 SDF-1, 促进 MSCs 向损伤组织迁移。IGF-1 能够提高 CXCR4 的表达, 并能提高 MSCs 对 SDF-1 的反应^[7]。MSCs 还能表达基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs)^[8], MMPs 协助降解 I 型胶原, 有助于骨髓 MSCs 离开骨髓、迁移、定位于损伤组织。MSCs 经血液循环到达损伤组织血管内皮后, 可通过内皮屏障定位于损伤组织^[9]。MSCs 迁移至损伤胰腺组织后, 可能通过以下机制发挥修复作用。①自身分化: 大量实验已经证实, MSCs 具有多向分化潜能, 江学良等^[10]研究证明了 MSCs 可参与胰腺的生理更新和病理再生, 特别是在胰腺损伤修复中发挥重要作用。②旁分泌机制: MSCs 能够分泌多种细胞因子, 如胎盘生长因子、肝细胞生长因子、内皮生长因子、粒细胞集落刺激因子等多种细胞介质, MSCs 通过细胞因子在组织修复中发挥复杂的调节作用。③内源性修复: 研究显示, MSCs 移植后可能对内源性干细胞具有刺激作用, 诱导其加速增殖分化^[11]。MSCs 也可能对胰腺干细胞有这种作用, 从而促进胰腺组织的分化^[12]。(2) MSCs 减轻炎症对胰腺组织的损伤: SAP 早期重要的病理生理环节之一就是 SIRS。MSCs 有强大的免疫调节作用, 在胰腺损伤引起的炎症反

应中能够发挥强大的抗炎功能, 减轻炎症损伤。MSCs 抑制了 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞的功能, 也影响了树突状细胞细胞的活性。此外, MSCs 还能够产生多种生长因子、细胞因子、趋化因子以及可能在细胞免疫调节或迁移过程中起关键作用的蛋白酶^[13], 如 MSCs 在体内迁移和分化过程中, 能分泌 IFN- γ 、IL-12、TNF- α ^[14]等, 并可以促进 IL-4、IL-10 等抑制性炎症介质的释放^[5], 而后者能够抑制巨噬细胞和 T 细胞功能, 对抗 IL-1、IL-6、IL-8 等炎症介质。(3) MSCs 能够抑制多种免疫细胞的活性: 树突状细胞是激活初始 T 细胞最重要的抗原呈递细胞。MSCs 能够抑制树突状细胞的迁移、抑制其成熟, 进而抑制树突状细胞的抗原提呈作用^[6, 15]。MSCs 还可以通过有丝分裂原^[16]、同种抗原以及 CD3、CD28 抗体等^[17]以剂量依赖性方式抑制 T 淋巴细胞的活化和增殖。同种异体 MSCs 可以通过 IL-2 和 IL-15 阻止静息状态的 NK 细胞激活增殖, 减弱 NK 细胞的细胞毒性^[18]。MSCs 还影响调节性 T 细胞^[19]。

研究发现尽管 MSCs 定向诱导胰腺干细胞的应用有诸多好处, 但由于目前对干细胞的临床研究有限, 仍存在很多疑点, 使 MSCs 应用于临床存在许多有待解决的问题: (1) 植入的 MSCs 在体内扩增、分化时, 怎样控制其增殖与分化。(2) MSCs 虽然抗原性较弱, 但不同个体来源的干细胞其组织相容性抗原不尽相同, 对敏感个体进行移植将引起免疫排斥反应, 如何避免异源组织之间的相互排斥。(3) MSCs 定向诱导分化得到的胰腺细胞或胰岛细胞分泌胰岛素的量可能很小, 不能满足临床的需要。(4) MSCs 植入多少、如何植入及植入哪里才能起到最大的效果并且副作用最小, 植入后 MSCs 能在体内存活多长时间, 移植后多长时间发挥作用等。

本研究的不足之处在于: (1) 病例有限, 样本量较少, 样本研究不能代表总体; (2) 给药途径及剂量单一, 无法分析比较 MSCs 治疗的不同剂量及不同给药途径的相关疗效; (3) MSCs 治疗的费用较昂贵, 很多患者不能接受, 致使 MSCs 治疗 SAP 的研究尚处于初级阶段, 开展不够广泛和深入。

综上, 尽管本研究存在很多不足, 但是通过本课题初步研究可以发现 MSCs 治疗可能有助于改善急性胰腺炎的炎症反应, 有并发症少、缩短住院时间等优势。且由于 MSCs 具有取材方便、创伤性小、移植免疫排斥较小等优点, 在临床上有广泛的应用前景。

参考文献

- [1] 秦仁义, 高军. 重症胰腺炎的治疗现状. 腹部外科, 2005, 18: 204-206.
- [2] Sgodda M, Aurich H, Kleist S, et al. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue in vitro and in

- vivo. *Exp Cell Res*, 2007, 313:2875-2886.
- [3] 中华医学会外科学分会胰腺外科学组. 重症急性胰腺炎诊治指南. *中华外科学杂志*, 2007, 6:727-729.
- [4] 董鑫, 吴育连. 急性胰腺炎治疗研究的进展. *中华肝胆外科杂志*, 2005, 10:711-713.
- [5] 贾忠, 封光华. 骨髓间充质干细胞移植对重症急性胰腺炎早期炎症级联反应的调控机制. *医学研究杂志*, 2008, 37:22-24.
- [6] Garidad M, Ted JH, Roberta M, et al. Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface maker for the identification of MSCs. *Blood*, 2007, 109:4245.
- [7] Bhakta S, Hong P, Koc O. The surface adhesion molecule CXCR4 stimulates mesenchymal stem cell migration to stromal cell-derived factor-1 in vitro but does not decrease apoptosis under serum deprivation. *Cardiovasc Resusc Med*, 2006, 7:19-24.
- [8] Lu C, Li XY, Hu Y, et al. MT1-MMP controls human mesenchymal stem cell trafficking and Differentiation. *Blood*, 2010, 115:221-229.
- [9] English K, Barry FP, Mahon BP. Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation. *Immunol Lett*, 2008, 115:50-58.
- [10] 江学良, 李兆申, 崔慧斐. MSC 在胰腺生理更新和病理再生中的作用. *世界华人消化杂志*, 2006, 14:398-404.
- [11] Mazhari R, Hare JM. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: potential influences on the cardiac stem cell niche. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2007, 4:S21-26.
- [12] Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: the IACT study. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46:1651-1658.
- [13] Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, et al. Mesenchymal stem cells: A Promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40:815.
- [14] van den Berk LC, Jansen BJ, Siebers-Vermeulen KG, et al. Mesenchymal stem cells respond to TNF but do not produce TNF. *JLB*, 2010, 87:283-289.
- [15] 赵霞, 贺韦东, 马秀明, 等. 骨髓间充质干细胞体外对 T 淋巴细胞分泌 IL-2、IL-4 功能的影响. *中国免疫学杂志*, 2008, 24:126-130.
- [16] Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 2002, 99:3838-3843.
- [17] Zou Z, Zhang Y, Hao L, et al. More insight into mesenchymal stem cells and their effects inside the body. *Expert Opin Biol Ther*, 2010, 10:215-230.
- [18] Maccario R, Podesta M, Moretta A, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4 + T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*, 2005, 90:516-525.
- [19] Carrion F, Novas EL, Ruiz CS, et al. Autologous mesenchymal stem cell treatment increased T regulatory cells with no effect on disease activity in two systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*, 2010, 19:317-322.

(收稿日期:2011-12-21)

(本文编辑: 马超)

黄少雄, 常诚, 李文生, 等. 间充质干细胞治疗重症急性胰腺炎临床疗效的观察[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2012, 6(11):3093-3096.