

The Effect of Propofol Combined with the Freeze Dried Powder of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on Interleukin10 and Interleukin17 in Partial Hepatectomy

Na Li¹, Huipeng Meng², Huajiang Dong², Ping Wang², Jian Xu^{3*}

¹ENT Department, Baoding Hospital, Peking Children's Hospital, Baoding Hebei

²School of Precision Instrument and Optoelectronic Engineering, Tianjin University, Tianjin

³Logistics University of CAPF, Tianjin

Email: *xuj7910@163.com

Received: Nov. 8th, 2019; accepted: Nov. 22nd, 2019; published: Nov. 29th, 2019

Abstract

Objective: To investigate the effect of propofol combined with umbilical cord mesenchymal stem cell supernatant freeze drying powder and IL-10 and IL-17 after partial hepatectomy (PHT) in rats. **Methods:** 36 male Wistar rats were randomly divided into 3 groups with 12 rats in each group. Anesthesia was induced and maintained with propofol in group A, and the chest was opened to expose the liver (sham operation group). Anesthesia in group B was induced and maintained by propofol and saline intervention, and partial hepatectomy (PHT) was performed. Anesthesia in group C was induced and maintained with propofol combined with mesenchymal stem cell supernatant intervention and partial hepatectomy (PHT) was performed. Rat was executed five days after PHT. The regenerated liver was removed, weighed and evaluated. In addition, rat serum will be collected to measure levels of IL-17 and IL-10. **Results:** There was no difference in IL-17 and IL-10 levels between group A and group C ($P > 0.05$). Compared with group B, plasma levels of IL-17 in group C were significantly decreased, while IL-10 in plasma and western blot was significantly increased ($P < 0.05$). The mean liver regeneration rate of group B and group C was 19.45% and 31.68%, respectively, with significant difference and statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion:** Propofol, as an anesthetic drug, can be used in combination with freeze-drying powder of umbilical cord mesenchymal stem cells, which can effectively reduce the expression of IL-17 and significantly up-regulate the expression of IL-10, promote liver regeneration, and can be used as an important means of liver regeneration after hepatectomy.

Keywords

Diisopropylphenol, Mesenchymal Stem Cells, Liver, Interleukin

*通讯作者。

丙泊酚联合脐带间充质干细胞上清液冻干粉对肝叶切除再生中炎症因子IL-10及IL-17的作用

李娜¹, 孟慧鹏², 董化江², 王平², 徐健^{3*}

¹北京儿童医院保定医院五官科, 河北 保定

²天津大学精密仪器与光电子工程学院, 天津

³武警后勤学院, 天津

Email: *xuj7910@163.com

收稿日期: 2019年11月8日; 录用日期: 2019年11月22日; 发布日期: 2019年11月29日

摘要

目的: 探讨丙泊酚联合脐带间充质干细胞上清液冻干粉在部分肝切除术(PHT)后的大鼠中对白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10)及白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17)的影响。方法: 将36只雄性Wistar大鼠随机分为3组, 每组12只。A组麻醉用丙泊酚进行诱导和维持, 打开胸腔暴露肝脏(假手术组); B组的麻醉用丙泊酚加生理盐水干预进行诱导和维持, 行部分肝切除术(PHT); C组的麻醉用丙泊酚联合间充质干细胞上清液干预进行诱导和维持, 行部分肝切除术(PHT)。在PHT术后第5天将大鼠处死, 取出再生的肝脏, 称重并评估。另外, 将收集大鼠血清, 用于测量IL-17和IL-10的水平。结果: 在A组和C组之间, IL-17和IL-10水平没有差异, 蛋白印迹检验结果显著升高($P > 0.05$); 而C组IL-17的血浆水平跟组B相比明显降低($P < 0.05$), 而IL-10明显升高($P < 0.05$)。B和组C的平均肝再生率分别为19.45%、31.68%, 差异显著, 有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 丙泊酚作为一种麻醉药物, 可联合脐带间充质干细胞上清液冻干粉, 可有效降低促炎因子IL-17的表达, 同时显著上调抗炎因子IL-10的表达, 促进残肝再生, 可作为肝脏切除术后肝再生的重要手段。

关键词

丙泊酚, 间充质干细胞, 肝脏, 白细胞介素

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

临床上肝部分切除或损伤后, 肝脏的细胞数量急剧减少, 各种反馈信号刺激肝细胞进行增殖, 肝细胞通过细胞增殖由基本不生长状态转变为快速生长状态, 从而得以补偿丢失损伤的肝组织和恢复肝的生理功能, 这个过程称为肝再生。肝再生包括肝实质细胞再生和肝组织结构的重建, 肝细胞在肝再生中起着重要的作用, 体内的多种细胞因子和生长因子通过不同的机制对肝再生进行调控。肝脏再生依赖于细胞死亡和增殖之间的平衡, 细胞死亡可以通过坏死或凋亡发生[1]。丙泊酚是临床上通过静脉途径广泛使用麻醉药物, 研究报道, 在缺血再灌注损伤模型中丙泊酚具有抗氧化和抗炎活性[2], 而脐带间充质干细

胞(Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells, UC-MSCs)因其强大的免疫调节功能和分化增殖的特性广泛应用于再生医学领域[3]。本研究旨在确定在部分肝切除术(partial hepatectomy, PHT)中丙泊酚联合 UC-MSCs 上清提取物对肝叶切除后再生及炎症因子 IL-10、IL-17 的影响,为临床 PHT 的治疗奠定基础。

2. 材料与方法

2.1. UC-MSCs 的获取

脐带来源于本院产妇,获取后常规消毒,生理盐水反复冲洗,以去除脐带内的红细胞。然后去除脐带表皮以及脐带内部的血管(2 条动脉和 1 条静脉),留取华通氏胶。将华通氏胶剪碎,冲洗、离心、培养,约 10 d 后有较多的 UCMSCs 从华通氏胶组织块周围爬出。选取形态规则、活力旺盛的第 3 代 UCMSCs 用于后续实验。

2.2. 动物模型的建立与干预

2.2.1. 实验大鼠分组与 PHT 模型的复制

本研究所使用的实验大鼠为符合实验动物护理和使用指南(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)以及赫尔辛基宣言,处死实验动物采用安乐死,符合动物伦理学要求。36 只成年 Wistar 大鼠(235~275 g),雌性不计。分笼喂养,每笼 12 只,室温范围($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$),湿度范围($60\% \pm 5\%$)。12 h 光照周期(光照时间:07:00~19:00),提供充足的食物和洁净的水,术前禁食 12 h,禁水 8 h。按照随机数字法分为 3 组,每组 12 只,A 组(假手术组)麻醉用丙泊酚进行诱导和维持,打开胸腔暴露肝脏(不进行部分肝脏切除);B 组的麻醉用丙泊酚进行诱导和维持,术前一天尾静脉注射生理盐水干预,行部分肝切除术(PHT);C 组的麻醉用丙泊酚进行诱导和维持,术前一天给与间充质干细胞上清液干预,行部分肝切除术(PHT)。在术后第 10 天将大鼠处死,取出再生的肝脏,称重并评估。另外,将收集大鼠血清,用于 IL-10、IL-17 的水平。手术操作后,将切口分层缝合。

2.2.2. 各组实验大鼠术前处理

A、B 组:生理盐水干预组大鼠尾静脉注射 100 μl 生理盐水;C 组:在术前 1 天 UCMSCs 上清提取物干预治疗组将第 3 代 UCMSCs 扩增至 1×10^8 个,留取扩增期间的所有上清低温冻干,冻干粉溶于 100 μl 生理盐水,过滤除菌后尾静脉注射(总细胞数为 1×10^8 个,全程留取更换的上清液)。

2.3. 试剂与仪器

胎牛血清(美国 Gibco 公司),UltraCULYURETM 培养基(美国 Lonza),CD90、CD73、CD105 流式抗体(美国 BD 公司)、CX23OLYMPUS 奥林巴斯显微镜(日本 OLYMPUS 公司),生物安全柜(中国苏净集团安泰公司)。thermo 实验室用离心机(美国 Thermo Electron 公司生产,批号:75002493),细胞培养箱(德国 BINDER 公司,批号:BD400),电泳仪、电转仪、电泳槽(美国 Bio-Rad 公司型号:BE6085)、PCR 仪(美国 MJ Research 公司,型号:PTC-200 PCR)、4%多聚甲醛(上海樊克生物科技有限公司生产,批号:P0099)。

2.4. 各组肝脏再生情况

术后第 5 天处死,将再生的肝脏移除并称重。肝脏再生计算按照贝克尔公式[4],即:肝再生率($\%$)= $100 \times [C - (A - B)]/A$ 。

注:A:部分肝切除术的大鼠的肝脏质量的平均值;

B:部分肝切除术被切除的肝脏组织的平均质量;

C: 术后 5 天实验动物被处死的时候的肝脏质量的平均值。

2.5. 白细胞介素-10、白细胞介素-17 的检测

从大鼠左心房采集血液标本 3000 rpm·min, 取上清, 使用酶联免疫吸附测定试剂盒(Biosource International, Camarillo, CA, 美国)检测血清 IL-10、IL-17 的水平, 酶联免疫吸附测定试剂盒(上海乔羽生物技术有限公司); 术后 10 天处死实验动物留取手术区域附近肝组织待检测, 该实验处理动物的实验方法符合伦理学要求。

2.6. 统计学分析

计量以 $x \pm s$ 表示, 采用软件 SPSS 13.0 分析。数据资料符合正态分布的计量数据以均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示, 三组比较采用方差分析, 两两比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 流式细胞术检测

采集脐带干细胞后用无血清间充质干细胞培养液培养, CD73 与 CD105 双阳性细胞数为 95.5%、CD90 阳性细胞数为 96.2%, CD34 阳性细胞数 $< 3\%$, 细胞活力 $\geq 95\%$, 病原菌排查未检出细菌, 培养至第 3~4 代时使用。

3.2. 各组大鼠血清中 IL-10 和 IL-17 及肝组织中 mRNA 表达水平

大鼠血清中 TNF- α 和 VEGF 表达情况: 与 A 组相比较, C 组 IL-10 和 IL-17 水平没有差异, 无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 C 组相比较, IL-17 血浆水平跟组 B 相比明显降低 ($P < 0.05$), 而 VEGF 明显升高, $P < 0.05$; 大鼠肝组织中 IL-17 和 IL-10 表达情况: 与 A 组相比较, B 组 IL-17mRNA 水平显著升高, 差异显著, 有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 B 组相比较, IL-17mRNA 水平明显升高, 差异显著, 有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 A 组相比较, B 组 IL-10-mRNA 水平显著升高, 差异显著, 有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 B 组相比较, C 组 VEGF-mRNA 水平亦明显升高, 差异显著, 有统计学意义 ($P < 0.05$) 见表 1。

Table 1. The expression of IL-10 and IL-17 in level of mRNA and in serum (Mean \pm SD)

表 1. 各组大鼠血清中 IL-10 和 IL-17 及 mRNA 表达水平 (Mean \pm SD)

组别	<i>n</i>	IL-17 pg/mL	IL-10 pg/mL	IL-17mRNA	IL-10mRNA
A 组	12	19.5 \pm 3.3	15.7 \pm 6.1	0.32 \pm 0.008	0.29 \pm 0.054
B 组	12	45.7 \pm 9.0 ^a	31.9 \pm 9.2 ^a	0.89 \pm 0.098 ^a	0.58 \pm 0.080 ^a
C 组	12	24.9 \pm 8.2 ^b	45.8 \pm 3.4 ^b	0.51 \pm 0.065 ^b	0.76 \pm 0.211 ^b

注: TNF- α : 肿瘤坏死因子- α ; VEGF: 血管内皮生长因子 ^a $P < 0.01$; ^b $P < 0.01$ 。

3.3. 各组大鼠肝脏再生率比较

A 组为假手术对照组。B 和组 C 的平均肝再生率分别为 19.45%、31.68%, 差异显著, 有统计学意义 ($P < 0.05$)。

4. 讨论

在行肝脏的部分切除术后, 炎性介质明显升高, 是影响残肝再生的重要因素[1] [2] [3], 同时残存肝脏再生是患者术后恢复的关键, 研究证实常用的麻醉药品丙泊酚可显著降低了炎症介质 TNF- α 和白介素

-17 (interleukin-6, IL-17)水平,进一步确定丙泊酚在肝脏在部分切除术后良好的抗炎与抗氧化损伤的作用。脐带间充质干细胞(umbilical cord derived-mesenchymal stem cells, UCMSCs)是一种可在体内外实现自我更新和多系分化的“种子”细胞,其可较为简单的进行体外培养扩增,同时该种子细胞免疫原性低,可进行异体甚至是异种间的移植[4] [5]。UC-MSCs 具有取材无创、来源广、细胞数量多等优势,已成为基础研究或临床试验的首选种子细胞,UC-MSCs 可用于治疗组织损伤和缺血缺氧性疾病,具有十分广阔的应用前景。UC-MSCs 其治疗作用包括细胞替代作用及其强大的旁分泌作用;UC-MSCs 可分泌大量具有生物学功能的分子物质和细胞因子,这些物质对组织修复至关重要,并可有效促进组织损伤修复、血管再生以及血运重建[5] [6] [7]。PTH 后肝脏再生需要充足的血运和种子细胞的补充,且由于损伤的微环境局部组织呈慢性缺氧-缺血状态和炎症反应状态,而干细胞具有向损伤区域组织及缺血缺氧组织“归巢”的特性以及免疫调节的特性[8] [9] [10],因此课题组利用无细胞条件下的“cell-free”干细胞技术干预 PTH 并与丙泊酚相联合探讨其可行性具有可行性。

IL-17 可促使多种炎性介质释放,引起炎症反应的级联放大效应[11] [12] [13],同时 TNF- α 又是重要的炎症因子,对炎症反应的级联放大作用具有“扳机作用”;TNF- α 既可使多种炎症细胞趋化至损伤组织,又能使炎症细胞不断释放炎症因子,如白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1)、IL-6、IL-17 等,还可通过一系列的病理生理过程向炎症部位迁移,进一步放大炎症反应。在本研究中,与假手术组相比较,丙泊酚联合脐带间充质干细胞上清冻干粉干预组炎症因子 IL-17 的表达水平没有差异;而与丙泊酚联合生理盐水干预组相比较,丙泊酚联合脐带间充质干细胞上清冻干粉干预组 IL-17 血浆水平明显下调,进一步明确丙泊酚联合脐带间充质干细胞上清冻干粉可在降低 PTH 术后炎症反应的进程中起到较好的协同作用。

UC-MSCs 的治疗作用可能既包括损伤细胞的替代作用,又包括干细胞代谢产物的“旁观者效应”。MSCs 所分泌的生物活性物质可在促进血管再生及血管生成、免疫调节方面发挥强大的作用[14] [15]。MSCs 外泌体在调节靶细胞功能中发挥重要作用,外泌体囊泡内含 MSCs 源 mRNA、微 RNA、酶等成分,这些物质均参与受损组织的修复[16]。UC-MSC 修复损伤的作用机制主要包括损伤细胞的替代作用、MSCs 的分泌作用、促进血管再生与重建等[17] [18] [19]。因此提高 VEGF 的表达水平,对 PTH 术后残肝的再生具有重要的意义。在本实验中,C 组 VEGF 水平较 B 组显著上调,同时 C 组的残肝再生率明显高于 B 组,即 C 组的平均肝再生率分别为 31.68%,B 组的残肝再生率为 19.45%。

综上所述,丙泊酚作为临床上一种常规的通过静脉注射途径给药的常用麻醉药物,可以通过联合再生医学的种子细胞 UC-MSCs 实现在 PHT 术后恢复的“老药”新用,既可实现在 PHT 术后有效地下调炎症因子表达和释放,起到减低炎症反应的协同效应,又可上调炎症因子的表达一举两得。基于研究结果课题组认为:丙泊酚联合脐带间充质干细胞上清冻干粉干预可作为 PHT 术后抗炎,促进肝再生的良好用药,可作为肝脏手术的首选干预手段,对实现减弱肝脏术后炎症反应和肝脏再生具有重要的借鉴意义。

基金项目

国家自然科学基金资助项目(编号:81801240),中国医学科学院医学与健康科技创新工程(No.2018-12M-AI-012)。

参考文献

- [1] 王永顺,刘蓉,吴迪.丙泊酚对大鼠部分肝切除术后肝再生和炎症因子的影响[J].武汉大学学报(医学版),2019,40(6):883-885.
- [2] Runzer, T.D., Ansley, D.M., Godin, D.V., et al. (2002) Tissue Antioxidant Capacity during Anesthesia: Propofol Enhances *in Vivo* Red Cell and Tissue Antioxidant Capacity in a Rat Model. *Anesthesia & Analgesia*, **94**, 89-93. <https://doi.org/10.1097/00005339-200201000-00017>

- [3] Okano, T., Ohwada, S., Nakasone, Y., *et al.* (2001) Blood Transfusion Causes Deterioration in Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Rats. *Journal of Surgical Research*, **101**, 157-165. <https://doi.org/10.1006/jsre.2001.6284>
- [4] 商崇智, 杨细平, 董化江, 等. 脐带间充质干细胞移植对急性脑缺血/再灌注损伤大鼠脑组织内 CD-31 及白细胞介素 6 的作用[J]. 医学综述, 2018, 24(8): 1638-1642.
- [5] Caplan, A.I. (1991) Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Orthopaedic Research*, **9**, 641-650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>
- [6] He, H., Zhao, Z.H., Han, F.S., *et al.* (2016) Overexpression of Protein Kinase C ϵ Improves Retention and Survival of Transplanted Mesenchymal Stem Cells in Rat Acute Myocardial Infarction. *Cell Death & Disease*, **7**, e2056. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.417>
- [7] Lee, R.H., Pulin, A.A., Seo, M.J., *et al.* (2009) Intravenous hMSCs Improve Myocardial Infarction in Mice Because Cells Embolized in Lung Are Activated to Secrete the Anti-Inflammatory Protein TSG-6. *Cell Stem Cell*, **5**, 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.003>
- [8] Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., *et al.* (1999) Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, **284**, 143-147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
- [9] Mareschi, K., Biasin, E., Piacibello, W., *et al.* (2001) Isolation of Human Mesenchymal Stem Cells: Bone Marrow versus Umbilical Cord Blood. *Haematologica*, **86**, 1099-1100.
- [10] Li, J.P., Wang, D.W. and Song, Q.H. (2015) Transplantation of Erythropoietin Gene-Transfected Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells as a Treatment for Limb Ischemia in Rats. *Genetics and Molecular Research*, **14**, 19005-19015. <https://doi.org/10.4238/2015.December.29.8>
- [11] 徐海环, 董化江, 赵明亮. 脐带间充质干细胞上清提取物对糖尿病皮肤溃疡大鼠肿瘤坏死因子- α 及血管内皮生长因子的影响[J]. 新乡医学院学报, 2017, 34(2): 90-93.
- [12] 张明亮, 陈晓龙, 刘方洲, 等. 苦参素对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠 Th1/Th17 细胞表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(10): 4792-4795.
- [13] 薛妮娜, 季鸣, 张明祎, 刘羿晨, 陈晓光. IL-17 信号通路抑制剂细胞筛选模型的优化及应用[J/OL]. 药学报, 1-10.
- [14] 蒋星海, 赵彪, 吴凯, 等. 血管内皮生长因子 165、神经营养因子 3、血管生成素 1 基因转染诱导骨髓间充质干细胞向神经元及血管内皮细胞分化[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(25): 3956-3962.
- [15] 张欣, 谢加兵. 骨髓间充质干细胞旁分泌: 在血管生成、免疫及炎症调整方面的作用[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(1): 139-143.
- [16] 何伟. 骨髓间充质干细胞来源的外泌体促进骨再生的效果与机制研究[D]: [硕士学位论文]. 南昌: 南昌大学, 2018.
- [17] 高小月, 张玉泉, 杨晓清. 人脐带间充质干细胞在组织损伤修复中的研究进展[J]. 生物医学工程与临床, 2018, 22(2): 208-213.
- [18] 徐海环, 董化江, 商崇智, 等. 脐带间充质干细胞移植急性脑创伤大鼠损伤区域微血管密度的变化[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(33): 5320-5324.
- [19] Roura, S., Pujal, J., Galven, M., *et al.* (2015) The Role and Potential of Umbilical Cord Blood in an Era of New Therapies: A Review. *Stem Cell Research & Therapy*, **6**, 123. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0113-2>