

骨髓间质干细胞抑制大鼠肝纤维化形成的可能性***☆

受体肝内干细胞存活时间、肝星状细胞活化程度及生存分析的7周观察

赵东长¹, 雷俊霞², 陈蕊¹, 张秀明¹, 许瑞云³, 李树浓¹, 项鹏¹¹中山大学干细胞与组织工程研究中心, 广东省广州市 510080; ²中山大学基础医学院病理生理学教研室, 广东省广州市 510080; ³中山大学附属第三医院肝胆外科, 广东省广州市 510630赵东长☆, 男, 1965年生, 河南省南阳市人, 汉族, 中山大学在读博士, 副主任医师, 主要从事血液学及干细胞生物学的基础与临床研究。
zdcyk183@tom.com

通讯作者: 项鹏, 中山大学干细胞与组织工程研究中心, 广东省广州市 510080

国家重点基础研究发展规划项目(2001CB509904)*; 广东省科技攻关重大专项(2003A3020103)*; 广州市科技攻关重大专项(2002U13E0011)*; 国家自然科学基金(30100188)*

中图分类号: R329.2 文献标识码: A 文章编号: 1671-5926(2005)22-0052-04
收稿日期: 2005-05-06 修回日期: 2005-05-27 (05/GH/YH)**Possibility of rat liver fibrogenesis inhibited by bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a 7-week observation on survival time of stem cells and activation of hepatic stellate cells in liver of recipients and a survival analysis** Zhao Dong-chang¹, Lei Jun-xia², Chen Rui¹, Zhang Xiu-ming¹, Xu Rui-yun³, Li Shu-nong¹, Xiang Peng¹¹Center for Stem Cell Biology and Tissue Engineering, ²Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China; ³Department of Hepatobiliary Surgery, Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China**Correspondence to:** Xiang Peng, Center for Stem cell Biology and Tissue Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China**Supported by:** the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. 2001CB509904*; the Key Science and Technology Projects of Guangdong Province, No. 2003A3020103*; the Key Science and Technology Projects of Guangzhou City, No. 2002U13E0011*; the National Natural Science Foundation of China, No. 30100188. ***Received:** 2005-05-06 **Accepted:** 2005-05-27**Abstract****AIM:** To investigate the influence of infusion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) on the liver fibrogenesis in rats according to the strongly proliferative ability of BMSCs and their differential potency into hepatocytes under the condition of culture *in vitro*, analyze the liver function and survival of BMSCs, and perform a controlled comparison among treatment group, blank control group and pathological control group within 7 weeks.**METHODS:** The study was conducted in the laboratory of Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Sun Yat-sen University from August 2003 to December 2004. ① Five male Wistar rats aged 6 weeks old as donors and MSCs were isolated from bone marrow of these rats for their culture and proliferation *in vitro*. Another 60 female Wistar rats aged 6 weeks were studied following the protocol. Fifty random rats were induced to liver fibrogenesis models with dimethylnitrosamine (DMN), and then they were randomly divided into 2 groups on the 10th day: BMSC treatment group (recipient, *n* = 10) which finished experiment after 39-day treatment, and pathological control group (*n* = 40) which was sampled to analyze pathologically. The rest 10 of the 60 rats were designed in blank control group which were intravenously infused with normal saline. ② Establishment of liver fibrogenesis models: On the right day of experiment, 10 g/L DMN (dispensed with saline) was intraperitoneally injected 1 mL/kg body mass 3 consecutive days of each week for 6 weeks. ③ Rats in the BMSC treatment group were infused with BMSCs at a dose of 3 × 10⁶ cells intravenously, and those in the pathological control group were infused with the same volume of normal saline instead of BMSCs. ④ Common living status was detected including daily diet, activity, urine and stool, body mass, fur and breath. ⑤ Liver sections were stained with hematoxylin and eosin to observe the structure and form of liver histocytes. ⑥ The content of smooth muscle α-actin (α-SMA) of liver was detected by immunohistochemistry to observe hepatic stellate cells (HSCs). The activity of HSCs was analyzed semi-quantitatively by IBAS 2.5 imaging analysis software. ⑦ The relative content of the degree of liver collagen was assessed with Masson Trichrome (MT) staining so as to reflect the degree of liver fibrogenesis. ⑧ Hydroxyproline (Hyp) content of liver was assayed by chloramines-T method. ⑨ Levels of serum alanine aminotransferase aspartate (ALT) and serum total bilirubin (TB) were assessed by usingan automatic biochemistry analyzer. ⑩ Levels of laminin (LN) and hyaluronic acid (HA) in serum were tested by radioimmunoassay. ⑪ Sex determination region on the Y chromosome (*sry*) gene in male rats was explored by polymerase chain reaction (PCR) in the liver of female recipients. ⑫ Statistical analysis: Significance difference was determined by *t* test in two groups. Mean of multiple samples were compared by analysis of variance, and the comparison of random two samples assayed by *q* test. Analysis of survival was conducted based on the Kaplan-Meier method.**RESULTS:** Sixty female rats were analyzed in the result analysis. ① After 6 weeks of modeling, infusion of BMSCs kept a higher survival rate of rats in the BMSC treatment group (80%) than rats in the pathological control group (10%), while rats in blank control group were all alive at the survival rate of 100%. It implied that infusion of BMSCs could improve the survival condition of rats through the inhibition of liver fibrogenesis. ② Liver histology showed that structure of liver got obvious recovery, inflammation relieved and pseudolobules were reduced or dissipated in rats in the BMSC treatment group. In contrast, massive rearrangement of the liver structure including septal thick fibrosis and bridging necrosis was obviously shown in rats in the pathological control group. Semi-quantitative analysis of MT staining of liver sections demonstrated a significant decrease of collagen in BMSC treatment group as compared with that in pathological control group (8.12 ± 1.98 vs 15.71 ± 2.13, *t* = 6.11, *P* < 0.05). ③ The positive expression of α-SMA (the representative of activation of HSCs): A little expression of α-SMA was found on the vascular wall of rats in the blank control group. Septal fibrosis, sinusoid and portal area were found in the liver of rats in the pathological control group and BMSC treatment group. However, semi-quantitative analysis of positive liver α-SMA staining showed decreased in the BMSC treatment group as compared with pathological control group (11.06 ± 2.03 vs 18.50 ± 3.87, *t* = 4.47, *P* < 0.05). ④ Shown by PCR analysis of liver DNA, the *sry* gene was positive in the liver of female recipients which had been transplanted with BMSCs from male Wistar rats (donors) for 39 days, however that was no any positive signal in the blank control and pathological control groups. The results suggested that BMSCs were capable of engraftment in liver of rats induced with DMN for more than 5 weeks. ⑤ The indexes for liver fibrogenesis: the content of liver Hyp and the levels of LN and HA were significantly reduced in BMSC treatment group as compared with pathological control group (*P* < 0.05), although there was an increase in the content of liver Hyp and the levels of LN and HA in BMSC treatment group compared with blank control group (*P* < 0.05), which demonstrated that infusion of BMSCs could reduce the content of liver collagen, and thus depress the formation of liver fibrosis to make fibrogenesis controllable. ⑥ The levels of serum ALT and TBIL (for reflecting liver function) were lower in BMSC treatment group than that in pathological control group (*P* < 0.05) and were closed to that in blank control group, indicating that the infusion of BMSCs was beneficial to the improvement of liver function.**CONCLUSION:** ① Rats induced with DMN can develop liver fibrosis. ② Infusion of BMSCs can improve the survival status and liver function of DMN-induced rats with liver fibrogenesis. ③ BMSC treatment can decrease collagen deposition in the liver and inhibit forming fibrosis. ④ The results that the activated HSCs get lower after administration of BMSCs may be one of the reasons for inhibition of liver fibrogenesis in rats. ⑤ There was *sry* gene in the liver of female recipients with BMSCs from male donors and it suggests that transplantation of BMSCs in the liver of rats induced with DMN can survive for more than 5 weeks.Zhao DC, Lei JX, Chen R, Zhang XM, Xu RY, Li SN, Xiang P. Possibility of rat liver fibrogenesis inhibited by bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a 7-week observation on survival time of stem cells and activation of hepatic stellate cells in liver of recipients and a survival analysis. *Zhongguo Linchuang Kangfu* 2005; 9(22): 52-5 (China)

赵东长, 雷俊霞, 陈蕊, 张秀明, 许瑞云, 李树浓, 项鹏. 骨髓间质干细胞抑制大鼠肝纤维化形成的可能性: 受体肝内干细胞存活时间、肝星状细胞活化程度及生存分析的7周观察[J]. 中国临床康复, 2005, 9(22): 52-5 (www.zgckf.com)

摘要**目的:** 观察在体外培养条件下, 具有强大的增殖和分化为肝细胞能力的骨髓间质干细胞输注治疗肝纤维化模型大鼠对其肝纤维化形成的影响及肝功能和生存分析, 并对治疗组、空白对照组和病理对照组7周内的相关情

况予以对照比较。

方法:实验于2003-08/2004-10在中山大学基础医学院病理学于病理生理实验室完成。①动物分组:选用雄性6周龄Wistar大鼠5只为供体,供分离骨髓间质干细胞;雌性6周龄Wistar大鼠60只,其中50只被造成肝纤维化模型,在首次用二甲基亚硝胺处理后的第10天,将造模大鼠随机分为2组:骨髓间质干细胞治疗组10只(为受体),于治疗39d后结束实验,取材分析病理对照组40只。另10只作为空白对照组(仅静脉注射生理盐水)。②肝纤维化模型制作:在实验的当天,给予10g/L二甲基亚硝胺溶液(生理盐水配置)1 mL/kg,腹腔注射,每周连续3次,共6周。③骨髓间质干细胞治疗组:每只大鼠输注 3×10^6 个骨髓间质干细胞;病理对照组:使用等体积生理盐水代替骨髓间质干细胞。④动物的一般生活状态:每天观察饮食、活动、二便、体质量、皮毛、呼吸情况等。⑤肝脏的组织细胞形态结构:将肝组织以苏木精-伊红染色后观察。⑥肝星形细胞及其活化程度检测:前者检测肝脏 α -平滑肌肌动蛋白含量,用免疫组织化学染色法,后者以德国IBAS2.5图像分析软件半定量分析。⑦肝脏胶原分布的相对含量检测:采用Masson三色染色法,从而反映肝纤维化程度。⑧肝脏羟脯氨酸含量测定:采用氯胺T法。⑨血清总胆红素和谷丙转氨酶水平检测:采用全自动生化分析仪。⑩血清层粘连蛋白和透明质酸水平测定:采用放射免疫法。⑪雄性大鼠骨髓间质干细胞在雌性大鼠肝内的Y染色体性别决定区基因的表达检测:采用聚合酶链式反应。⑫统计学分析:两组样本均数比较采用t检验;多组样本均数比较采用方差分析,两两比较采用q检验;生存分析采用Kaplan-Meier法。

结果:雌性大鼠60只进入结果分析。①实验动物生存状况:造模6周后,骨髓间质干细胞治疗组生存率为80%,而病理对照组生存率为10%,空白对照组生存率为100%,说明骨髓间质干细胞治疗可能通过阻止肝纤维化发展,从而改善大鼠的生存率。②肝脏组织学显示,骨髓间质干细胞治疗组的肝脏结构明显改善,炎症减轻,假小叶结构减少或消散。相反,病理对照组出现广泛的肝脏结构重塑,包括增厚的纤维间隔形成和明显的桥接坏死。半定量分析胶原染色,骨髓间质干细胞治疗组较病理对照组显著减低($8.12 \pm 1.98, 15.71 \pm 2.13, t=6.11, P<0.05$)。③肝星状细胞活化的标志 α -平滑肌肌动蛋白的阳性表达:空白对照组仅见血管壁有少量 α -平滑肌肌动蛋白的阳性表达,而病理对照组和骨髓间质干细胞治疗组可见在纤维间隔、肝窦和汇管区内明显表达。半定量分析 α -平滑肌肌动蛋白的阳性染色,骨髓间质干细胞治疗组较病理对照组显著减低($11.06 \pm 2.03, 18.50 \pm 3.87, t=4.47, P<0.05$)。④Y染色体性别决定区基因的表达:经雄性Wistar大鼠(供体)骨髓间质干细胞治疗39d的雌性大鼠,肝脏DNA经聚合酶链式反应检测结果显示,Y染色体性别决定区基因的表达阳性,而空白对照组和病理对照组则无此阳性信号。说明骨髓间质干细胞移植后,能够在受体肝内存活5周以上。⑤反映肝纤维化程度的肝脏羟脯氨酸含量及血清层粘连蛋白和透明质酸水平:骨髓间质干细胞治疗组明显高于空白对照组($P<0.05$)但明显低于病理对照组($P<0.05$),说明骨髓间质干细胞治疗后能够减少肝脏胶原蛋白的含量,从而减少肝纤维化的形成,使肝纤维化得到控制。⑥反映肝功能的血清总胆红素、谷丙转氨酶水平:骨髓间质干细胞治疗组明显低于病理对照组($P<0.05$),接近空白对照组。说明了骨髓间质干细胞治疗有助于改善肝功能状态。

结论:①二甲基亚硝胺能成功诱导大鼠肝纤维化模型的建立。②骨髓间质干细胞可改善肝纤维化大鼠的生存状况和肝功能。③骨髓间质干细胞能够减少肝脏胶原蛋白的产生,抑制肝纤维化形成。④肝纤维化发生发展过程中活化态的肝星状细胞数量减少可能是骨髓间质干细胞抑制肝纤维化形成的原因之一。⑤雌性大鼠肝脏内存在雌性供体Y染色体性别决定区基因的信号说明骨髓间质干细胞能够在受体肝内存活5周以上。

关键词:干细胞;骨髓细胞;肝纤维化/治疗;大鼠;二甲基亚硝胺

0 引言

尽管肝移植是目前临床上有效的肝纤维化治疗方法,然而供体来源的缺乏影响了大多数患者的肝功能恢复^[1]。研究显示,体外培养的骨髓间质干细胞具有强大的增殖能力和分化为肝细胞的能力,通过扩增能够解决细胞移植的供体来源问题^[2-4]。本实验拟用二甲基亚硝胺诱导的大鼠模型,观察静脉输注骨髓间质干细胞对大鼠肝纤维化形成的作用。

1 材料和方法

设计:完全随机分组设计,对照实验。

单位:中山大学干细胞与组织工程研究中心和基

础医学院病理生理教研室。

材料:实验于2003-08/2004-10在中山大学基础医学院病理学于病理生理实验室完成。选用Wistar大鼠,雄性6周龄(5只),体质量140~150g,供分离骨髓间质干细胞;雌性,6周龄(60只),体质量140~160g。由中山大学医学实验动物中心(许可证号:粤检证字2002A058)提供,均为清洁级。动物饲养在有空调的无菌层流架内,每日接受12h的光照,食料和饮水不加限制。

设计、实施、评估者:设计为第一、五、六作者,干预实施为全部作者,评估为第一、二、五、六作者,均受过正规培训,未采用盲法评估。

方法:主要试剂:Dulbecco改良的Eagle培养基细胞培养液(Hyclon公司),胎牛血清(Hyclon公司),小鼠抗 α -平滑肌肌动蛋白单克隆抗体(SouthernBiotech公司)(1:200),免疫组织化学染色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司),3',3'-二氨基联苯胺显色试剂盒(武汉博士德生物工程公司),层粘连蛋白放射免疫分析试剂盒(上海海研医学生物技术中心),透明质酸(HA)放射免疫分析试剂盒(上海海研医学生物技术中心),羟脯氨酸标准品(上海生工),氯胺T(广州化学试剂厂),对-二甲氨基苯甲醛(广州化学试剂厂),二甲基亚硝胺(Sigma公司)。德国IBAS2.5图像分析软件。

大鼠骨髓间质干细胞的制备:按本室常规方法^[5],制备雄性大鼠骨髓间质干细胞。将第8~10代骨髓间质干细胞用无菌生理盐水悬浮,锥虫蓝染色计算细胞活力和数目,调节细胞浓度为 $3 \times 10^9 L^{-1}$,细胞活力为99%以上,供细胞移植使用。

肝纤维化模型制作:参照文献[6],在实验的当天,给予10g/L二甲基亚硝胺溶液(生理盐水配置)1 mL/kg,腹腔注射,每周连续3次,共6周。每次用二甲基亚硝胺前称体质量,根据体质量计算用药剂量。

骨髓间质干细胞移植:在首次用二甲基亚硝胺处理后的第10天,将造模大鼠随机分为2组:骨髓间质干细胞治疗组10只,病理对照组40只。骨髓间质干细胞治疗组:每只大鼠输注 3×10^6 个骨髓间质干细胞;病理对照组:使用等体积生理盐水代替骨髓间质干细胞。其余10只大鼠为空白对照组:仅使用单一生理盐水。大鼠用2g/L的戊巴比妥钠进行麻醉后,在腹股沟处剪开皮肤,暴露腹股沟静脉,将细胞及相应的替代物经该静脉注入,输注后压迫止血,缝合皮肤。在骨髓间质干细胞治疗39d后,结束治疗试验,取材进行分析。

动物的一般生活状态:每天观察饮食、活动、二便、体质量、皮毛、呼吸等情况。肝脏病理组织学检查:采用苏木精-伊红染色法,了解肝脏的组织细胞形态结构;采用免疫组织化学染色法检测肝脏 α -平滑肌肌动蛋白,利用德国IBAS2.5图像分析软件半定量分析了解活化态肝星状细胞的表达情况;采用Masson三色染色法检测肝脏胶原的分布相对含量,从而反映肝

纤维化程度。

肝脏羟脯氨酸含量:采用氯胺 T 法测定。

血清总胆红素和谷丙转氨酶水平:采用日本日立 7170 型全自动生化分析仪检测。

血清层黏蛋白和透明质酸水平:按试剂盒说明,采用放射免疫法。

聚合酶链式反应:检测雄性大鼠骨髓间质干细胞在雌性大鼠肝内的 Y 染色体性别决定区基因的表达,该基因的引物序列为:上游:5'-cat cga agg gtt aaa gtg cca-3';下游:5'-ata gtg tgt agg ttg ttc-3',所得产物为 104 bp;同时扩增 β -actin 作为内参,其引物序列为:上游:5'-tgt tgt ccc tgt atg cct ct-3';下游:5'-taa tgt cac gca cga ttc c-3',所得产物为 206 bp;为排除假阴性信号,设立雄性 Wistar 大鼠作为阳性对照。

主要观察指标:①各组大鼠肝脏纤维化程度、肝功能变化比较。②各组大鼠生存状况。

统计学分析:数据由第一作者采用 SPSS 9.0 软件完成统计分析。实验结果采用 $\bar{x} \pm s$;两组样本均数比较采用 *t* 检验;多组样本均数比较采用方差分析,两两比较采用 *q* 检验。生存分析采用 Kaplan-Meier 法。

2 结果

2.1 描述性统计

2.1.1 实验动物生存状况分析结果 骨髓间质干细胞治疗组体质量增长得到改善,大部分动物皮毛光滑,活动度接近正常;相反,病理对照组体质量急速下降,特别是当体质量降至近 100 g 时,在 2 d 内将死亡,在实验结束时,仅存 4 只动物,表现明显乏力,呼吸困难,皮毛干枯、皱缩。采用 Kaplan-Meier 生存分析,见图 1。

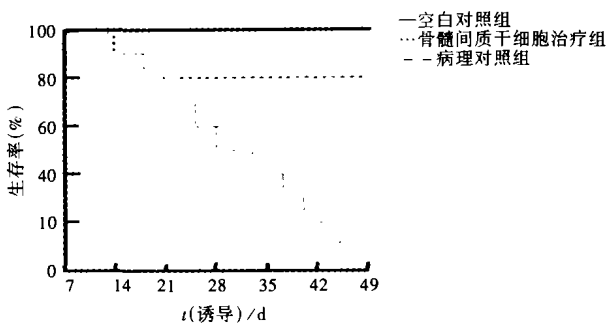


图1 二甲基亚硝胺诱导的大鼠生存曲线分析

二甲基亚硝胺诱导 6 周后,骨髓间质干细胞治疗组生存率为 80%,而病理对照组生存率仅为 10%,空白对照组生存率为 100%,说明骨髓间质干细胞治疗可能通过阻止肝纤维化发展,从而改善大鼠的生存率。

2.1.2 肝纤维化程度胶原染色结果及肝脏病理组织形态 苏木精-伊红染色结果:空白对照组肝细胞呈放射状排列,结构整齐;病理对照组肝小叶结构紊乱,肝细胞变性、坏死,伴炎症细胞浸润,汇管区扩大,假小叶形成;骨髓间质干细胞治疗组假小叶结构减少或消散,纤维间隔变窄,肝细胞排列较规则,炎症减轻。

Masson 三色染色结果:胶原染色分布于纤维间隔和汇管区,空白对照组仅见血管壁有少量纤维胶原

(见图 2a),骨髓间质干细胞治疗组(见图 2b)与病理对照组比较(见图 2c),则胶原染色淡切且分布范围小。

2.1.3 肝脏组织 α -平滑肌动蛋白的阳性表达 α -平滑肌动蛋白阳性表达是肝脏星状细胞活化的标志,而活化的肝脏星状细胞能够产生大量的细胞外基质,是肝纤维化发生的中心环节,测定肝脏组织 α -平滑肌动蛋白有助于反映肝纤维化形成的动态变化特点。空白对照组仅见血管壁有少量 α -平滑肌动蛋白的阳性表达(见图 3a),而病理对照组(见图 3b)和骨髓间质干细胞治疗组可见在纤维间隔、肝窦和汇管区内明显表达(见图 3c)。

2.1.4 雄性大鼠骨髓间质干细胞在雌性大鼠肝内的 Y 染色体性别决定区基因 见图 4。

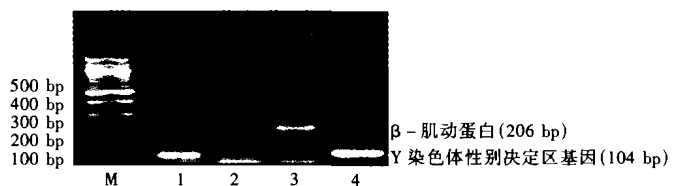


图4 聚合酶链式反应检测大鼠肝脏的 Y 染色体性别决定区基因 M: DNA maker(100 bp);1:骨髓间质干细胞治疗组;2:病理对照组;3:空白对照组;4:雄性 Wistar 大鼠阳性对照

雄性 Wistar 大鼠肝脏 DNA 和髓间质干细胞治疗后 39 d 的雌性大鼠肝脏 DNA 经聚合酶链式反应检测,分析显示 Y 染色体性别决定区基因的表达阳性,而空白对照组和病理对照组则无此阳性信号。说明骨髓间质干细胞移植后,能够在受体肝内存活 5 周以上。

2.2 统计推断

2.2.1 肝脏羟脯氨酸含量与血清层黏蛋白和透明质酸水平和肝脏功能状态 见表 1。

表1 骨髓间质干细胞对二甲亚硝胺诱导的大鼠的血清肝纤维化指数及肝脏羟脯氨酸的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	透明质酸 ($\mu\text{g/L}$)	层黏蛋白 ($\mu\text{g/L}$)	总胆红素 (mg/L)
空白对照组	10	142.3 \pm 18.9	44.5 \pm 16.4	5.1 \pm 1.5
病理对照组	4	981.4 \pm 110.5 ^a	214.2 \pm 56.5 ^a	21.6 \pm 5.5 ^a
骨髓间质干细胞治疗组	8	395.2 \pm 43.1 ^{ab}	83.1 \pm 43.1 ^{ab}	9.1 \pm 4.7 ^b

组别	n	谷丙转氨酶 (nkat/L)	羟脯氨酸 ($\mu\text{g/g}$)
空白对照组	10	545.1 \pm 113.4	450 \pm 110
病理对照组	4	3 535.7 \pm 856.8 ^a	2 250 \pm 650 ^a
骨髓间质干细胞治疗组	8	1 128.6 \pm 548.4 ^b	1 010 \pm 580 ^b

与空白对照组比较,^a*q* = 2.5 ~ 26.9, *P* < 0.05; 与病理对照组比较,^b*q* = 5.6 ~ 18.3, *P* < 0.05

反映肝脏纤维化的程度的肝脏羟脯氨酸含量及血清血清层黏蛋白和透明质酸水平:骨髓间质干细胞治疗组明显高于空白对照组 (*P* < 0.05),但明显低于病理对照组 (*P* < 0.05),说明骨髓间质干细胞治疗后能够减少肝脏胶原蛋白的含量,从而减少肝纤维化的形成,使肝纤维化得到控制。反映肝功能的血清总胆红素、谷丙转氨酶水平:骨髓间质干细胞治疗组明显高于空白对照组 (*P* < 0.05),但明显低于病理对照组 (*P* < 0.05)。说明了骨髓间质干细胞治疗有助于改善肝功能状态。

2.2.2 肝脏纤维化程度 以空白对照组的阳性染色

为标准,半定量分析肝脏 Masson 染色,骨髓间质干细胞治疗组 ($n=8$) 明显少于病理对照组 ($8.12 \pm 1.98, 15.71 \pm 2.13, t=6.11, P < 0.05$)。以空白对照组的阳性染色为基准,肝脏纤维化程度半定量分析结果:骨髓间质干细胞治疗组 ($n=8$) 明显少于病理对照组 ($n=4$) ($11.06 \pm 2.03, 18.50 \pm 3.87, t=6.11, 4.47, P < 0.05$)。说明骨髓间质干细胞治疗后,活化态肝星状细胞数量少,反映了肝纤维化形成受到抑制。

3 讨论

目前认为,二甲基亚硝胺诱导的大鼠模型比较接近人类的肝纤维化病理过程,在诱导 2 周后肝脏出现细胞变性、坏死和出血,但肝纤维化形成不明显;诱导 3 周后肝脏胶原沉积增多,细胞变性、坏死严重,6 周后肝结构损坏严重,假小叶形成,动物死亡率超过 90%^[6,7],本实验的病理对照组也显示了肝脏典型的假小叶形成特征。本实验在二甲基亚硝胺诱导的第 10 天给予骨髓间质干细胞静脉输注,观察对肝纤维化形成的影响。结果表明,使用骨髓间质干细胞改善动物的生存状况,而对照组则在二甲基亚硝胺诱导的 6 周末仅有 4 只动物生存,皮毛干枯、皱缩,体质量明显下降,腹部解剖时发现存在大量腹水。

本实验病理观察结果显示,骨髓间质干细胞治疗后肝脏组织结构得到明显恢复,纤维间隔变窄,假小叶结构明显减少或消失。分析肝脏胶原染色和肝脏羟脯氨酸含量,尽管骨髓间质干细胞治疗组超出正常水平,但与病理对照组相比明显降低,具有统计学意义,说明骨髓间质干细胞能够减少肝脏胶原蛋白的产生。同时,骨髓间质干细胞治疗组的血清层黏蛋白和透明质酸水平明显低于病理对照组,从另一个侧面说明了肝脏产生的细胞外基质成分减少,提示肝纤维化形成得到抑制。血清总胆红素和谷丙转氨酶水平的恢复进一步支持了骨髓间质干细胞治疗能够恢复肝脏的功能。本实验的结果与 Fang 等^[8]报道的骨髓间质干细胞治疗四氯化碳诱导小鼠的结果不尽相同,Fang 等^[8]认为延迟到四氯化碳诱导 1 周后开始使用血管内皮细胞生长因子的受体 2 β kl1⁺ 的骨髓间质干细胞,其治疗效果不大。然而,Sakaida 等^[9]的结果则与本实验相似,他们发现四氯化碳诱导 4 周后开始用全骨髓成分移植治疗,能够明显减轻肝纤维化,同时利用抗胎肝蛋白 8 抗体分离的抗胎肝蛋白 8 骨髓非造血细胞治疗,也具有抑制肝纤维化的作用。这些差异是否与各实验中心使用的模型或骨髓间质干细胞亚型的不同有关,需要进一步多个研究中心多个动物模型验证。

本实验通过聚合酶链式反应分析显示了雌性大鼠肝脏内存在雄性供体 Y 染色体性别决定区基因的

信号,这一结果肯定了骨髓间质干细胞能够在受体肝内存活 5 周以上。然而,有关骨髓间质干细胞在受体肝内如何影响肝纤维化形成的详细机制还不清楚。一般认为,肝纤维化实质上是一种损伤组织愈合过程中过度、过强及失控的修复反应,当致病因素长期持续作用于肝细胞,造成损伤坏死,产生许多细胞因子,进而激活位于狄氏腔的肝星状细胞,促使其细胞表型改变,特征性表达 α -平滑肌肌动蛋白,产生大量细胞外基质沉积于肝内,导致一系列肝纤维化的临床症状^[10]。本实验发现,骨髓间质干细胞治疗后,肝脏 α -平滑肌肌动蛋白阳性细胞明显少于对照组,提示肝纤维化发展过程中活化态的肝星状细胞数量减少可能是骨髓间质干细胞抑制肝纤维化形成的原因之一。而 Sakaida 等^[9]则发现植入在受体肝内的骨髓干细胞能够高水平表达基质金属蛋白酶 9,后者是细胞外基质降解的关键酶,因此提出骨髓干细胞可能直接参与了肝脏细胞外基质的清除。Fang 等^[8]虽然在受体肝脏内能够检测到供体来源分化的肝细胞,但数量极少,按 Kanazawa 等^[11]的观点,这些分化的肝细胞根本无法实现治疗的功效。显然,骨髓间质干细胞植入肝脏后,由于环境的改变,可能影响到其增殖分化等命运,对肝纤维化的抑制机制可能相当复杂,有必要结合原位杂交技术进一步明确其分布和分化特征^[12]。

本实验利用体外扩增的骨髓间质干细胞静脉输注给二甲基亚硝胺诱导的大鼠,通过肝脏病理学与肝脏羟脯氨酸含量和血清纤维化指数测定等方法证实了骨髓间质干细胞对肝纤维化形成的抑制作用,这一结果开阔了骨髓间质干细胞修复组织损伤的研究范围,为肝纤维化的细胞移植治疗提供了一个新的途径。

(图 2,3 见插图 22-2 页)

4 参考文献

- 1 Lee DS, Gil WH, Lee HH, et al. Factors affecting graft survival after living donor liver transplantation. *Transplant Proc* 2004; 36(8): 2255-6
- 2 Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol* 2004; 32(5): 414-25
- 3 单守杰, 陈绍良, 刘煜昊, 等. 自体骨髓间质干细胞移植对梗死心肌的修复作用[J]. 中国临床康复, 2005, 9(7): 63-5
- 4 桂莉, 李露斯, 范文辉. 骨髓间质干细胞移植对脑梗死大鼠神经功能的恢复作用[J]. 中国临床康复, 2004, 8(28): 6060-2
- 5 肖庆忠, 李浩威, 温冠媚, 等. 大鼠骨髓间质干细胞基本生物学特性的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 19(3): 289-94
- 6 Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, et al. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med* 1999; 5(2): 226-30
- 7 George J, Rao KR, Stern R, et al. Dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats: the early deposition of collagen. *Toxicology* 2001; 156(2-3): 129-38
- 8 Fang B, Shi M, Liao L, et al. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation* 2004; 78(1): 83-8
- 9 Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2004; 40(6): 1304-11
- 10 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115(2): 209-18
- 11 Kanazawa Y, Verma IM. Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100 Suppl 1: 11850-3
- 12 Shaekel N, Rockey D. In pursuit of the "Holy Grail"-stem cells, hepatic injury, fibrogenesis and repair. *Hepatology* 2005; 41(1): 16-8