

不同骨髓细胞成分经门静脉移植治疗大鼠肝纤维化的对照研究

陆勤平 曹葆强 魏伟

【摘要】 目的 以不同的骨髓细胞(BMC)成分经门静脉移植,对比其治疗大鼠肝纤维化的效果,为临床应用提供依据。**方法** 采用四氯化碳(CCl_4)综合法制作 Wistar 大鼠肝纤维化模型,8周后经病理检查证实成模者共60只进入实验。随机分为A、B、C三组,每组20只,A、B、C组大鼠分别经门静脉注入骨髓有核细胞、骨髓间质干细胞(MSC)和等体积的生理盐水。以上所有大鼠均在原环境下继续饲养4周后处死,切取肝组织分别作HE及Masson染色肝纤维化分级、羟脯氨酸含量测定、胶原纤维含量测定。**结果** 三组肝脏羟脯氨酸含量分别为(0.5046 ± 0.1288)g、(0.5710 ± 0.4458)g、(0.5960 ± 0.3418)g,A组与B组比较、A组与C组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),而B组与C组比较差异无统计学意义;图像分析大鼠肝脏纤维含量分别为(3.752 ± 0.983)%、(4.842 ± 1.225)%、(5.021 ± 0.442)%,A组与B组比较、A组与C组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),而B组与C组比较差异无统计学意义。**结论** 在 CCl_4 诱导的大鼠肝纤维化模型中,骨髓有核细胞能缓解大鼠肝纤维化程度。

【关键词】 骨髓移植; 肝硬化; 大鼠,Wistar

Transplantation of bone marrow cells through portal veins reduced liver fibrosis in mice LU Qin-ping, CAO Bao-qiang, WEI Wei. Department of Emergency Surgery, The First Affiliated Hospital of Nanjing University, Nanjing 210006, China

Corresponding author: CAO Bao-qiang, Email: caobaoqiang@yahoo.cn

【Abstract】 Objective To study the effect of the bone marrow cells (BMC) transplanted through the portal vein in the hepatic cirrhosis rat models. **Methods** 60 hepatic cirrhosis rat models by carbon tetrachloride (CCl_4) were divided into A, B, C three groups. $500 \mu\text{l}$ (3×10^6) karyocytes from the bone marrow, $500 \mu\text{l}$ (3×10^6) marrow stem cells (MSC) and $500 \mu\text{l}$ saline were respectively injected into the rats in group A, B, C through the portal veins. The rats in the groups of A, B, C were continually hypodermically injected CCl_4 twice every week for 4 weeks. The behaviors and the reactions of each rat were recorded. After 4 weeks, all the rats were executed, and the mortality, the hydroxyproline (Hyp) and the pathological changes of the livers were compared. **Results** With the continual injection of CCl_4 , Hyp in A, B, C was 0.5046 ± 0.1288 , 0.571 ± 0.4458 , 0.596 ± 0.3418 respectively. There was difference between group A and B, A and C ($P < 0.05$) in Hyp; while no difference between group B and C ($P > 0.05$). **Conclusions** Transplantation of the karyocytes from the bone marrow cells through portal vein could reduce liver fibrosis in mice on persistent damage.

【Key words】 Bone marrow transplantation; Liver cirrhosis; Rats, Wistar

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.17.015

基金项目: 安徽省科技厅自然科学基金(090413255); 安徽省人社厅博士后研究人员科研活动经费资助(省)重点项目(皖人社秘[2010]460号)

作者单位: 210006 南京医科大学附属南京第一人民医院急诊科(陆勤平); 安徽医科大学临床药物研究所博士后流动站(曹葆强、魏伟)

通讯作者: 曹葆强, Email: caobaoqiang@yahoo.cn

肝纤维化十分常见,危害性极大,目前尚无确切有效的治疗方法。近年来有关干细胞的研究给治愈这一顽疾带来了希望。干细胞(stem cell)是一类具有自我复制和多向分化潜能的细胞,即是说,干细胞保持着未分化状态,具有无限增殖能力,在适当的条件下,可分化为多种不同类型的成熟细胞。骨髓间质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, MSC)是干细胞的一种,同样也具有向一些成体细胞(包括肝实质细胞)分化的潜能^[1-4],而且,MSC取材方便、简单,适合于临床应用。那么,MSC的这种自我复制和多向分化特性能否用于肝纤维化的逆转治疗?本研究利用四氯化碳(CCl₄)综合法诱导大鼠肝纤维化模型,经门静脉输注不同的骨髓细胞(bone marrow cells, BMC)成分(包括MSC),对MSC的抗肝纤维化效应进行了研究。

材料和方法

一、材料

SPF级Wistar大鼠100只,由安徽医科大学动物实验中心提供,雌雄不限,4周龄,体重200~300g。采用CCl₄综合法诱导大鼠肝纤维化模型^[5],按0.5 ml/100 g给予CCl₄皮下注射,每周2次,共8周。每周随机处死2只大鼠观察肝纤维化形成情况,并以此来判断大鼠肝纤维化造模的进程,8周后经病理检查证实成模后共剩余60只大鼠(处死16只,造模死亡24只)进入实验。每只动物均予以编号标记。将60只成模大鼠随机分为A、B、C三组,每组20只,A、B、C组大鼠分别经门静脉注入500 μl的(3×10⁶个)骨髓有核细胞、MSC和等体积的生理盐水;注入后各组继续皮下注射CCl₄(CCl₄使用方法与前述造模方法相同)。以上各组均在原生长环境下继续观察4周后,结束实验,动物禁食、水24 h后全部处死取材进行相关指标检测。各组大鼠均饲养在安徽医科大学动物实验中心SPF级动物实验室内同一有空调的无菌层流架内,每日接受相同的光照,食料和饮水均不加限制。

二、骨髓有核细胞与MSC的制备

Fisher344大鼠5只由安徽医科大学动物实验中心提供,为SPF级,雌雄不限,2周龄,体重150~200g,购买后即以引颈法处死提取BMC。70%乙醇消毒1 min后,无菌条件下取出股骨和胫骨,剔净附着组织,断开骨端,12号针头在生长面开孔,10 ml注射器抽吸D-Hanks液将BMC冲至盛有含10% FBS培养基的无菌小烧杯中,尖头吸管反复轻轻吹打制成细胞悬液备用。

1. 骨髓有核细胞制备:取部分细胞悬液离心去脂肪层后,再采用密度梯度离心法,将上述细胞悬液置于Percoll(密度1.073 g/ml,Amersham Biosciences公司,美国)的液面上,900 g离心30 min,取中层云雾状有核细胞层,PBS冲洗,300 g离心5 min,弃去上清。收集细胞,用低糖基本培养基(DMEN-LG, GIBCO BRL公司,美国)重悬、计数至单核细胞数为3×10⁶/L备A组应用。

2. MSC制备:将上述细胞悬液以每孔2.30×10⁵个接种于直径30 mm的塑料平皿中,培养于37℃、含5% CO₂的培养箱里,24 h后换培养液。用PE标记的表面分子CD44(Serotec)、CD45(Serotec)抗体对原代MSC进行流式细胞术鉴定。2.5 g/L胰酶消化细胞,PBS洗1遍,1000 r/min离心5 min收集细胞,弃上清,将细胞分至1.5 ml PE管中,每管0.1 ml,分别加入2种检测抗体及PE标记的小鼠IgG作为阴性对照,室温暗处放置30 min,PBS洗2遍,3000 r/min离心30 s,每管用0.5 ml PBS重悬,流式细胞仪检测。用PBS重悬至细胞数为3×10⁶/L备B组应用。

三、经门静脉BMC移植方法

确认大鼠肝硬化模型成模后,在第8次注入CCl₄后的第1天,将大鼠放置于干燥器中,并向干燥器注射乙醚,行吸入法麻醉大鼠,将麻醉好的大鼠放于处理台上,采用腹部正中切口+右侧横切口暴露大鼠肝脏门静脉,解剖并显露其门静脉,按不同组别分别穿刺门静脉注入。注射完后按压止血,腹腔内注射青霉素少许,缝合切口。

四、指标检测

4周后所有大鼠禁食禁水24 h,处死后留取肝脏标本。大鼠经乙醚吸入麻醉成功后,剖腹暴露肝脏。分别取每只大鼠右肝叶相同部位2.0 g,迅速置液氮罐冻存待检肝脏羟脯氨酸的含量,再取部分右叶肝组织以10%甲醛固定,做常规石蜡切片,HE和Masson染色行胶原纤维含量百分比检查。

1. 羟脯氨酸含量测定:采用分光光度比色法,按试剂盒说明操作。试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

2. 图像定量分析纤维含量:采用 JVC KY-F30B 3-CCD 摄像头,德国 ZEISS Axiotron 研究型显微镜,德国 KONTRONIBAS 2.5 全自动图像分析系统,对肝组织标本纤维含量百分比进行定量测定。由同一专业人员在未知肝组织病理诊断的情况下,采用同一设定条件对所有标本进行分析测定。将肝组织标本于显微镜下放大 400 倍,在标本四角及中央随机选取 5 个视野,测定视野中胶原纤维含量,以胶原纤维占视野面积的百分比表示,取平均值。

五、统计学处理

统计软件用 SPSS 11.0。各组数据统计采用方差分析, LSD-*t* 检验法进行组内两两比较。

结 果

1. 肝脏 HE 及 Masson 染色(图 1~3):A 组大鼠肝脏病理切片显示肝细胞呈点片状坏死,大部分肝细胞脂肪样变性严重,炎性细胞浸润,胶原纤维自中央静脉向窦周隙延伸;而 B 和 C 组大鼠肝细胞呈大片状坏死,肝脏形成完整的纤维分割,肝小叶结构消失;Masson 染色结果显示 A 组大鼠肝脏纤维较细而薄,纤维密度低,呈细条状向肝小叶周围延伸,而 B、C 组大鼠肝脏汇管区有大量纤维组织增生,呈宽带状,纤维组织粗大,纤维密度高,伸展包绕或分割肝小叶将肝脏分割成大小不一的结节。

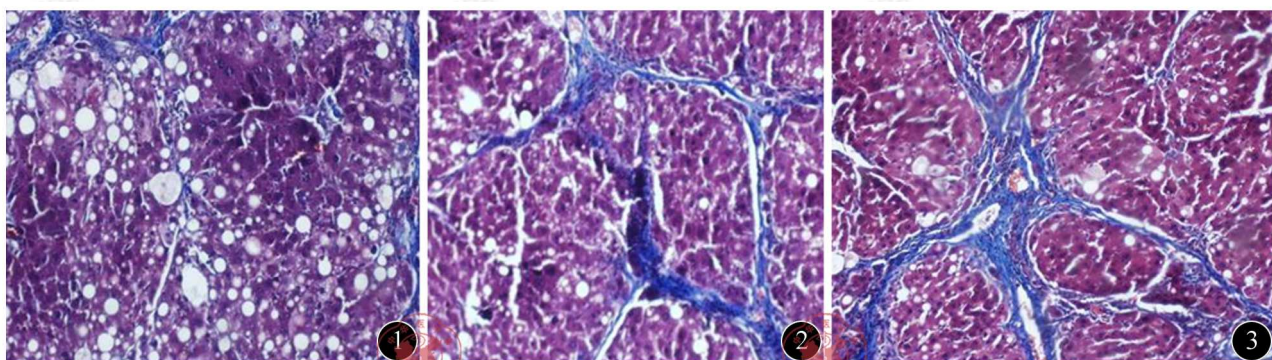


图1 A组大鼠肝脏病理(HE ×100) 图2 B组大鼠肝脏病理(HE ×100) 图3 C组大鼠肝脏病理(HE ×100)

2. 各组间肝纤维化指标比较:三组肝脏羟脯氨酸含量分别为 (0.5046 ± 0.1288) g、 (0.5710 ± 0.4458) g、 (0.5960 ± 0.3418) g, A 组与 B 组比较、A 组与 C 组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),而 B 组与 C 组比较差异无统计学意义;图像分析三组大鼠肝脏纤维含量分别为 $(3.752 \pm 0.983)\%$ 、 $(4.842 \pm 1.225)\%$ 、 $(5.021 \pm 0.442)\%$, A 组与 B 组比较、A 组与 C 组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),而 B 组与 C 组比较差异无统计学意义。

讨 论

近年来,干细胞在基础研究领域和临床应用中都有了很大的进展。干细胞在体内来源广泛,而骨髓源性干细胞由于易于获得,具有长时间持续增生的能力,移植后在体内也能增生,并且没有社会伦理学的干扰而受到人们越来越多的重视。Theise 等^[6]报道,鼠科动物肝脏在没有明显损伤的情况下,6 个月内有 1% ~ 2% 的肝细胞来自骨髓。在人类也取得了类似的结果,这说明骨髓参与正常肝脏细胞损耗的补充。Crosby 等^[7]发现人和啮齿类动物在骨髓移植后,肝脏中表达 C-kit 或 CD34 的造血干细胞,可转化成卵圆细胞,并最终分化为肝细胞和胆管上皮细胞,证实了骨髓来源的肝脏干细胞样细胞就是原始胆管上皮细胞。这些研究进展极大地拓展了骨髓干细胞在肝硬化治疗上的应用前景。

研究表明 BMC 在形态上均表现为单个核细胞,通称为有核细胞,除含有大部分血细胞外,还含大量的干细胞及各种细胞因子,如造血干细胞、MSC 和骨髓源性基质细胞。1988 年, Owen 等^[8-9]首次提出了骨髓基质

细胞系统的概念,他认为骨髓基质细胞系统是伴随造血细胞系统生长的微环境细胞,可以自我更新并分化为各种间充质源性的基质细胞,主要包括 MSC、巨噬细胞、脂肪细胞、内皮细胞等。而 MSC 是利用干细胞具有贴壁生长的特点分离出来的,剔除了各种细胞因子。

已有研究表明^[10],BMC 成分移植入肝纤维化大鼠模型中可减轻肝纤维化程度,本实验也验证了这个结论。但同时,与以往一些研究不同,本实验发现单纯应用 MSC 组与盐水组之间肝脏羟脯氨酸含量及图像定量分析肝脏纤维含量这两项指标的比较差异均无统计学意义($P < 0.05$)。

造成这种现象的原因可能是多方面的,推测 MSC 可能需要合并细胞因子才能发挥作用,有核细胞可能通过重要的细胞-细胞接触和支持造血的生长因子来发挥作用,当然这还需进一步实验验证。目前仍然不清楚 BMC 成分中哪部分发挥修复作用,Oh 等^[11]通过 BMC 体外培养,采用肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)诱导,首先在体外观察了 HGF 对 BMC 向肝细胞的转化作用。所以有核细胞组由于仅去除了血细胞,可能保留了血液中一些信号因子,从而发挥较好疗效,所以,信号因子的研究,特别是与干细胞的协调作用的研究需进一步开展。目前关于 BMC 减轻肝纤维化的研究还存在许多争议,这些差异是否与各实验中心使用的模型或 BMC 类型的不同有关,需要进一步多个研究中心多个动物模型验证。

关于 BMC 成分减轻肝纤维化的机制,国内学者赵东长等^[12]发现将 MSC 和肝星状细胞共培养 24 h,肝星状细胞表现轻度抑制,随着培养时间的延长,肝星状细胞增殖活性受抑制更明显,48 h 和 72 h 抑制率达 15.7% 和 30.3%,共培养 72 h,发现 α -平滑肌肌动蛋白明显降低,作者认为 MSC 具有分泌细胞因子抑制肝星状细胞增殖活性的潜能,在治疗肝纤维化中可能发挥作用。国外学者^[13]发现,BMC 可诱导分泌肝细胞生长因子,可减少肝脏分泌胶原蛋白。其可能的作用机制有:(1)在肝损伤的体内微环境中所产生的各种信号因子刺激或诱导下,骨髓源性干细胞转化为肝系细胞或肝细胞样细胞而行使正常肝细胞的功能;(2)骨髓源性干细胞直接行使部分肝细胞的功能;(3)骨髓源性干细胞输注后可以诱导机体分泌生长因子,刺激机体产生新的肝细胞;(4)骨髓源性干细胞与体内的肝细胞融合后基因重排而行使了肝细胞的功能。

在动物实验中,骨髓源性干细胞移植入肝内的途径主要有尾静脉移植,股静脉移植,脾脏移植,直接肝内注射和门静脉移植。国外实验一般是通过尾静脉移植,但这种移植效率非常低,移植率只能达到(0.5%~2%)。国内学者王平等发现经门静脉注入 MSC 后,细胞大约在 1 周开始通过血管内皮细胞间隙向肝实质移行,至第 4 周几乎全部散在分布于肝实质内,与肝细胞紧密结合呈索状排列。本试验我们采用经门静脉移植骨髓成分治疗肝纤维化,发现移植后肝纤维化有了明显的改善,证实了经门静脉移植是肝内细胞移植的有效途径。它存在以下优点:(1)移植细胞达到较高的浓度,避免了尾静脉注射时全身分布降低了移植细胞的浓度。(2)门静脉移植有利于在肝脏定位,骨髓源性干细胞可以直接进入肝脏,且门静脉血流缓慢,移植的细胞经门静脉进入肝血窦后,肝血窦对细胞的移动有机械停留作用,有利于骨髓干细胞向肝索迁移。(3)直接由门静脉移植,肝脏微环境(微龛)的直接刺激细胞的分化,损伤的肝细胞形成微龛,释放刺激因子,在刺激因子的直接诱导下,门静脉移植的干细胞更有利于在肝脏定位和分化。(4)经门静脉移植可以减少不良反应的发生。我们移植骨髓源性干细胞是希望其尽可能在肝脏定位,而不希望其在肺部等其他器官定位,如果有尾静脉或其他外周静脉移植可能会加强这种危险的发生。曾有报道犬经外周静脉移植骨髓源性干细胞后,发现其双肺出现多个骨髓移植造成的骨化位点,死于呼吸衰竭。而由门静脉移植,MSC 由门静脉进入肝血窦,避免了 MSC 向其他器官的分布,且由于肝血窦的阻留作用,可能能够减少这种其他器官定位的发生。

在本实验中,我们将 Fisher344 大鼠来源的骨髓成分输入 Wistar 大鼠体内,大鼠生存状态良好,无异常反应,无明显排斥反应,提示 BMC 具有免疫耐受性。最近研究^[14]观察到了 BMC 能够抑制 T 细胞增殖、诱导 T 细胞失能等现象,可能由于 BMC 通过直接接触来调节宿主 T 细胞功能。干细胞的免疫耐受现象给干细胞的临床应用带来了希望,因为这使得干细胞移植不受不同个体间主要组织相容性复合体的限制,可能成为再生治疗中的万能供者。

本实验利用不同预处理的 BMC 经门静脉输注给 CCl₄ 综合法诱导的肝硬化大鼠模型,观察大鼠肝脏病理学改变、测定肝脏羟脯氨酸含量和图像定量分析肝脏纤维含量,证实了在肝脏持续损伤因素作用下,骨髓

有核细胞可降低肝脏纤维化程度,这一结果开阔了 BMC 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。

参 考 文 献

- [1] Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, 1999, 284:1168-1170.
- [2] Toshihior M. Hepatic stem cells: from bone marrow cells to hepatocytes. *Biochem Biophys Commu*, 2001, 281:1-5.
- [3] Vessey CJ, de la Hall PM. Hepatic stem cells: a review. *Pathology*, 2001, 33:130-141.
- [4] Strain AJ, Crosby HA. Hepatic stem cells. *Gut*, 2000, 46:743-745.
- [5] Mullen KD, Mropi MD, Mocollough AJ. Problems with animal models of chronic liver disease: suggestions for improvement in standardization. *Hepatology*, 1989, 9:500-503.
- [6] Theise ND, Badve S, Saxena R, et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myelobalation. *Hepatology*, 2000, 31:235-240.
- [7] Crosby HA, Kelly DA, Strain AJ. Human hepatic stem-like cells isclated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithlium. *Gastroenterology*, 2001, 120:534-544.
- [8] Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl*, 1988, 10:63-76.
- [9] Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells; marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*, 1988, 136:42-60.
- [10] Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology*, 2004, 40:1304-1311.
- [11] Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, et al. Hepatocyte growth factor induced differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 279:500-504.
- [12] 赵东长, 陈蕊, 项鹏, 等. 骨髓间质干细胞抑制肝星状细胞增殖与活化的体外研究. *中国病理生理杂志*, 2005, 21:1139-1142.
- [13] Matsuda-Hashii Y, Takai K, Ohta H, et al. Hepatocyte growth factor plays roles in the induction and autocrine maintenance of bone marrow stromal cell, IL-11, SDF-1 alpha, and stem cell factor. *Exp Hematol*, 2004, 32:955-961.
- [14] Rasmusson I, Ringdén O, Sundberg B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens by different mechanisms. *Exp Cell Res*, 2005, 305:33-41.

(收稿日期:2011-05-16)

(本文编辑:马超)

陆勤平, 曹葆强, 魏伟. 不同骨髓细胞成分经门静脉移植治疗大鼠肝纤维化的对照研究[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2011, 5(17):4992-4996.