

不同途径移植骨髓间充质干细胞改善大鼠肝硬化**

吴玉卓

文章亮点: 观察门静脉、肝动脉、尾静脉3种途径移植骨髓间充质干细胞对四氯化碳诱导大鼠肝硬化的作用,发现移植骨髓间充质干细胞均可减轻肝纤维化程度,改善肝功能,但肝动脉及门静脉移植途径优于外周血静脉途径。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 肝硬化; 大鼠; 移植途径; 肝功能

缩略语: 骨髓间充质干细胞: bone mesenchymal stem cells, BMSCs; 半定量计分系统: semiquantitative scoring system, SSS

摘要

背景: 骨髓间充质干细胞移植可减轻肝硬化程度,改善肝功能。

目的: 观察不同途径移植骨髓间充质干细胞对四氯化碳诱导大鼠肝硬化的作用。

方法: 将60只SD大鼠随机分为正常组、对照组、门静脉移植组、肝动脉移植组、尾静脉移植组,后4组采用四氯化碳联合乙醇制作肝硬化模型,对照组不进行移植,其余3组分别经门静脉、肝动脉、尾静脉移植大鼠骨髓间充质干细胞 1×10^6 。

结果与结论: 移植4周后,与对照组比较,移植3组大鼠肝功能均得到明显改善,血清白蛋白、胆碱酯酶显著升高($P < 0.05$),转氨酶、胆红素、凝血时间、IV型胶原显著降低($P < 0.05$),肝纤维化程度显著减轻($P < 0.05$)。门静脉移植组及肝动脉移植组优于尾静脉移植组,前两者之间差异无显著性意义($P > 0.05$)。说明经门静脉、肝动脉、尾静脉移植骨髓间充质干细胞均可减轻肝纤维化程度,改善肝功能,但肝动脉及门静脉移植途径优于外周血静脉途径。

南阳市中心医院
感染肝病科,河南省
南阳市
473000

吴玉卓★,女,
1977年生,河南省
南阳市人,汉族,
2008年兰州大学
毕业,硕士,主治
医师,主要从事干
细胞移植治疗重
型肝炎及终末期
肝病研究。
angel_060@
126.com

中图分类号:R394.2
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2012)41-07677-04

收稿日期:2011-12-26
修回日期:2012-01-20
(2011102015/GW S)

Different transplantation approaches of bone marrow mesenchymal stem cells in a rat model of cirrhosis

Wu Yu-zhuo

Abstract

BACKGROUND: Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells can alleviate cirrhosis and improve liver function.

OBJECTIVE: To investigate the differences among the curative effects of three transplantation approaches of mesenchymal stem cells (MSCs) in a rat model of cirrhosis.

METHODS: 60 SD rats were randomly divided into five groups: normal, control, portal vein transplantation, hepatic artery transplantation and tail vein transplantation groups. The rat model of CC14 and alcohol-induced cirrhosis was prepared in the latter four groups. Rats in the portal vein transplantation, hepatic artery transplantation and tail vein transplantation groups received 1×10^6 allogenic rat bone marrow mesenchymal stem cells via the portal vein, hepatic artery and tail vein, respectively. The control group rats received no transplantation.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, the liver function of cirrhosis rats in the three transplantation groups was improved significantly, the levels of serum albumin and cholinesterase were significantly increased ($P < 0.05$), the levels of transaminases, bilirubin, prothrombin time, type IV collagen were significantly decreased, and the degree of cirrhosis was significantly alleviated ($P < 0.05$) at 4 weeks after transplantation in the three transplantation groups. The outcomes were significantly superior in the portal vein transplantation and hepatic artery transplantation groups than in the tail vein transplantation group ($P > 0.05$). These findings suggest that portal vein transplantation and hepatic artery transplantation can better alleviate the degree of cirrhosis and improve hepatic function than tail vein transplantation, and there is no significant difference between the former two groups.

Wu YZ. Different transplantation approaches of bone marrow mesenchymal stem cells in a rat model of cirrhosis. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(41): 7677-7680.

Department of
Infection and
Hepatopathy,
Nanyang Central
Hospital, Nanyang
473000, Henan
Province, China

Wu Yu-zhuo★,
Master, Attending
physician,
Department of
Infection and
Hepatopathy,
Nanyang Central
Hospital, Nanyang
473000, Henan
Province, China
angel_060@126.com

Supported by:
Medical Foundation
Program of Lanzhou
University, No.
LZUYX200655*

Received: 2011-12-26
Accepted: 2012-01-20

0 引言

肝硬化指肝细胞弥漫性变性坏死,肝细胞结节性再生或纤维化,发病率高,药物疗效差。干细胞移植已成为代替肝移植治疗肝纤维化的另一可行途径^[1]。大量研究证明,骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)移植可减轻肝硬化程度,改善肝功能^[2-4]。但临床上有关肝动脉、门静脉及外周静脉移植方法对疗效影响的对比研究极少。本实验将BMSCs通过3种移植方式输入到肝硬化模型大鼠体内,通过移植后大鼠纤维化程度、肝功能、凝血等指标评价其优劣。

1 材料和方法

设计: 随机分组对照动物实验。

时间及地点: 于2010年7月至2012年2月在兰州大学第一医院实验室及南阳市中心医院生化室、病理室完成。

材料:

实验动物: 6周龄雌性SD大鼠61只,体质量200~250 g,由兰州大学动物实验室提供,1只用于BMSCs制备。

试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
四氯化碳液	广州
CD29、CD34、CD44 及 CD45	Lab vision, 美国
单克隆抗体	WJ-12D MGF,
倒置光学显微镜	Opton IM35, 德国
流式细胞仪	Coulter Epics XL,

实验方法:

BMSCs的获取及培养: 无菌条件下分离大鼠股骨和胫骨,DMEM冲洗出骨髓,移入含相同体积Percoll淋巴细胞分离液的离心管上层,离心,吸取白色界面层,PBS冲洗3次,加入含体积分数20%胎牛血清的DMEM培养基中,调整细胞浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$,接种于培养瓶中,于孵箱内培养,9 d后首次换液,以后每3 d换液1次,细胞长到80%融合时,按1:2传代,并标记为P1,传代细胞隔日首次换液,以后每隔3 d换液1次,细胞长到90%融合时继续传代,并标记为P2,依次类推标记为P3, P4, P5等。

BMSCs的鉴定: 取第3代BMSCs, 0.25%胰酶和1 mmol/L的EDTA液消化收获细胞 1×10^6 ,加入鼠抗人CD29、CD34单克隆抗体工作液0.1 mL,室温孵育30 min, PBS洗涤2次,弃上清,加入兔抗鼠FITC标记

的二抗液100 μL ,避光孵育30 min,加入PBS离心,弃上清,流式细胞仪检测细胞表面分子。

肝硬化大鼠模型的建立: 取60只SD大鼠,分为2组:正常组($n=5$)予以普通食盐水喂养;肝硬化模型组($n=55$)予以四氯化碳橄榄油混合液皮下注射及乙醇喂养,并逐渐增加四氯化碳及乙醇浓度,建立大鼠肝硬化模型^[5]。8周后,各取5只正常和肝硬化模型大鼠进行肝脏大体形态观察及病理学检查,判断肝硬化形成情况。将其余存活的40只肝硬化模型大鼠按随机数字表法分为对照组、门静脉组、肝动脉组、尾静脉组。BMSCs移植后,予以40%四氯化碳橄榄油混合液,按3 mL/kg对4组模型大鼠继续进行皮下注射,每4 d 1次,移植4周后处死大鼠取肝脏标本^[6]。

BMSCs移植方法: 将BMSCs分别按3种途径移植,每只大鼠注入BMSCs 1 mL,数量为 1×10^6 个细胞。①对照组未移植。②门静脉途径: 无菌下暴露门静脉,胰岛素注射器从门静脉中下段快速注入BMSCs悬液,关闭腹腔。③肝动脉途径: 无菌下暴露肝总动脉、肝固有动脉和胃十二指肠动脉;在手术显微镜下,结扎胃十二指肠动脉远端,动脉夹阻断肝总动脉血流,胰岛素注射器在胃十二指肠动脉结扎的前方快速注入BMSCs悬液,结扎胃十二指肠动脉前端,复通肝总动脉,关闭腹腔。④尾静脉途径: 从尾静脉注入BMSCs悬液。移植后4周时间中,继续皮下注射60%的四氯化碳-大豆油,剂量1.5 mL/kg。移植4周后处死大鼠。

肝功能及肝纤维化指标的检测: 移植后4周,从腹腔静脉抽取静脉血2 mL,检测白蛋白、谷丙转氨酶、谷草转氨酶、胆碱酯酶、凝血时间、IV型胶原。

组织学检测: 取大鼠肝组织,放入体积分数10%甲醛溶液中固定,做石蜡包埋,然后切成厚度为4.0~5.0 μm 的切片,行苏木精-伊红染色。镜下每个样本随机选取含有汇管区的6个视野,观察小叶中央静脉、窦周间隙、汇管区、纤维隔的病理改变,并按照Chevallier肝纤维化组织学半定量计分系统(semiquantitative scoring system, SSS)进行评分^[7],纤维化程度重,SSS评分高。

主要观察指标: 各组大鼠肝功能、纤维化及组织学检查结果。

统计学分析: 采用SPSS 13.0统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示表示,5组样本均数间的比较行单因素方差分析。

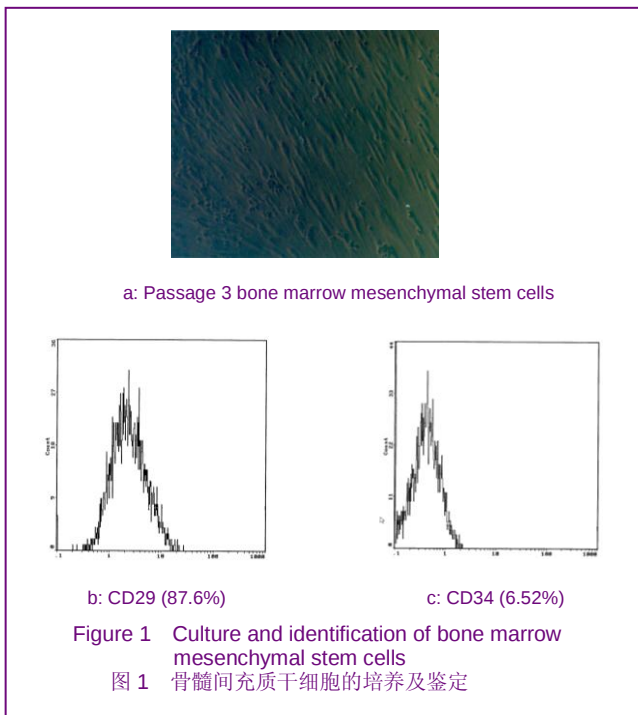
2 结果

2.1 实验动物数量分析 40只大鼠均进入结果分析。

2.2 肝硬化大鼠肝脏大体形态学观察 正常大鼠肝色泽红润, 表面光滑无结节, 质地柔软。肝硬化模型大鼠肝色泽晦暗, 弥漫直径为0.2~0.5 cm大小不等结节, 质地明显变硬。

肝脏切片苏木精-伊红染色, 正常大鼠肝小叶结构清晰, 肝细胞索规则, 肝窦无扩张, 肝细胞形态正常; 模型大鼠肝小叶结构模糊不清, 有多个大小不等的假小叶形成, 肝细胞疏松、浊肿, 部分细胞变性、坏死, 有炎细胞浸润。

2.3 BMSCs的培养及鉴定 第3代BMSCs细胞大小均匀, 呈梭型, 纤维型, 见图1a。BMSCs表面分子显示: CD29阳性(87.6%), CD34阴性(6.52%), 见图1b, c。



2.4 各组肝组织病理学检查 不同途径移植组BMSCs移植后肝细胞损伤减轻, 纤维化有所改善; 对照组肝组织学仍呈现典型肝硬化改变, 见图2。与对照组比较, 3移植组大鼠肝脏的纤维化明显减轻($P < 0.05$); 移植组的肝脏病理学改善程度及肝纤维化程度比较, 门静脉组及肝动脉组优于尾静脉组, 前两者之间差异无显著性意义($P > 0.05$)。见表1。

2.5 各组肝功能、凝血指标及肝纤维化检查结果 与对照组比较, 3种移植组血清白蛋白、胆碱酯酶显著增高($P < 0.05$), 胆红素、转氨酶、IV型胶原、凝血时间显著降低($P < 0.05$)。

肝动脉及门静脉组上述指标比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 此两组与尾静脉移植组比较差异有非常显著性意义($P < 0.01$), 见表2, 3。

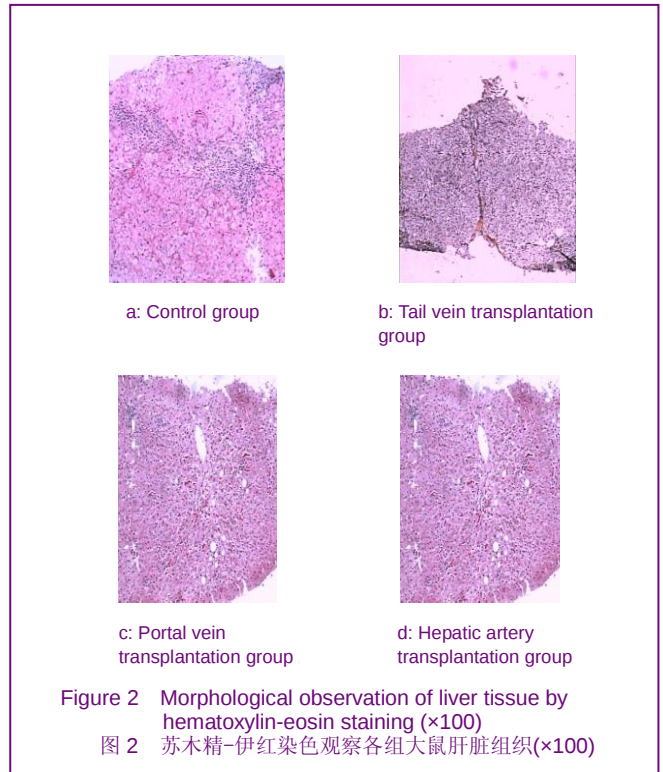


表 1 各组大鼠肝纤维化组织学分析结果
Table 1 Liver fibrosis indexes in all groups ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Group	Semi-quantitative score	Inflammation grading	Fibrosis
Normal	0.36±0.61	0.01	0.01
Control	13.29±4.37	2.98±0.75	3.45±0.90
Tail vein transplantation	4.28±3.64	2.01±1.07	2.30±0.59
Portal vein transplantation	2.19±1.28	1.57±0.86	1.26±0.46
Hepatic artery transplantation	2.30±1.41	1.60±0.91	1.31±0.52
<i>F</i>	105.786	63.126	49.738
<i>P</i>	0.021	0.034	0.018

表 2 各组大鼠IV型胶原、胆碱酯酶及凝血时间比较
Table 2 Type IV collagen, cholinesterase and coagulation time in all groups ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Group	Type IV collagen (μg/L)	Cholinesterase (U/L)	Prothrombin time (s)
Normal	17.40±3.32	51.53±6.28	11.97±0.94
Control	56.23±4.47	15.06±2.85	22.17±2.15
Tail vein transplantation	36.21±3.70	26.57±2.55	17.92±0.52
Portal vein transplantation	22.32±2.47	33.81±3.20	14.08±1.19
Hepatic artery transplantation	23.56±2.59	36.04±3.08	13.97±0.98
<i>F</i>	106.470	36.376	26.105
<i>P</i>	0	0	0

表3 各组大鼠肝功能比较
Table 3 Liver function test in all groups ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Group	Albumin (g/L)	Total bilirubin ($\mu\text{mol/L}$)
Normal	36.34 $\pm$ 4.13	2.34 $\pm$ 1.13
Control	17.25 $\pm$ 3.64	16.78 $\pm$ 1.95
Tail vein transplantation	24.92 $\pm$ 3.64	10.35 $\pm$ 0.78
Portal vein transplantation	30.19 $\pm$ 3.81	4.62 $\pm$ 0.84
Hepatic artery transplantation	29.88 $\pm$ 3.75	3.79 $\pm$ 0.98
<i>F</i>	65.340	73.984
<i>P</i>	0.013	0.001

Group	Alanine aminotransferase (U/L)	Aspartate aminotransferase (U/L)
Normal	33.74 $\pm$ 4.15	30.40 $\pm$ 5.40
Control	270.70 $\pm$ 60.30	376.30 $\pm$ 65.85
Tail vein transplantation	160.00 $\pm$ 18.50	300.95 $\pm$ 29.70
Portal vein transplantation	123.10 $\pm$ 16.80	236.20 $\pm$ 15.90
Hepatic artery transplantation	119.96 $\pm$ 17.02	239.89 $\pm$ 16.01
<i>F</i>	228.203	39.406
<i>P</i>	0.000	0.014

3 讨论

近年来干细胞移植治疗重型肝炎, 终末期肝病均取得了良好效果。Sato等^[8]研究表明BMSCs是应用于向肝细胞诱导方面最为理想的种子细胞。但大多数学者多采用自体骨髓中分离的骨髓源性肝干细胞直接进行肝内移植的技术路线, 并在肝脏疾病的治疗方面取得了一定的效果, 但总体效果并不理想。原因是这种细胞在骨髓中的含量稀少, 难以获得足够数量的骨髓源性肝干细胞供移植, 加上该细胞的生理性定居场所在骨髓而不在肝脏, 致使移植到肝内的骨髓源性肝干细胞也只有极小部分能在肝脏定居并发挥治疗作用。研究表明骨髓源性肝干细胞经体外培养诱导与扩增后肝内移植是安全的, 实验所用的体外培养、扩增方案未改变干细胞的抗原特性。

实验比较3种常见移植方法治疗肝硬化大鼠效果, 结果表明BMSCs移植治疗肝硬化效果确切, 肝动脉及门静脉移植途径效果略优于外周血静脉途径。其原因可能是经静脉移植后的BMSCs在大脑、心脏、肺及全身多个部位均有发现, 说明其向肝脏的定植率不高, 但因其方法简单, 安全性更高, 所以同样值得推崇。

至于BMSCs修复肝脏的可能机制是: ①分化形成正常肝细胞, 补充肝细胞数量, 改善肝功能。②BMSCs分泌多种细胞因子和生长因子, 抑制炎症反应, 促进肝细胞再生。③直接抑制肝脏星形细胞的活化, 减少细胞外基质的产生。④降解肝内过量的细胞外基质。⑤细胞融合: 研究证明BMSCs可与肝细胞融合, 然后启动细

胞增殖分裂过程。⑥激活受损肝细胞, 启动内源性肝细胞分裂再生过程。

本实验表明不同途径移植BMSCs治疗肝硬化动物模型具有一定的治疗作用。根据比较, 且结合临床操作难易度和可行性, 初步认为进行BMSCs移植治疗终末期肝病, 可以首选经肝动脉及门静脉途径移植, 次选外周静脉途径, 但这尚需在临床大规模开展多种移植途径的随机对照及双盲研究方可得出更科学的结论。

致谢: 感谢兰州大学感染科陈红主任指导早期课题的设计, 南阳市中心医院感染肝病科张怀宏主任对课题资料的整理及对论文审核的大力支持。

4 参考文献

- [1] Lysy PA, Campard D, Smets F, et al. Stem cells for liver tissue repair: current knowledge and perspectives. *World J Gastroenterol*. 2008;14(6):864-875.
- [2] Jung KH, Shin HP, Lee S, et al. Effect of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in a cirrhotic rat model. *Liver Int*. 2009;9(6): 898- 909.
- [3] Kharaziha P, Hellstrom PM, Noorinayer B, et al. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009;21(10):1199-1205.
- [4] Wang F, Zhang J, Zhou XR, et al. Shiyong Ganzangbing Zazhi. 2011;14(3):200-201.
王方, 张静, 周新人, 等. 经门静脉自体骨髓干细胞移植治疗失代偿期肝硬化18例疗效观察[J]. 实用肝病杂志, 2011, 14(3):200-201.
- [5] Zheng M, Chen C, Zhao YP, et al. Gandan Waikie Zazhi. 2006; 12(2): 136-137.
郑敏, 陈聪, 赵雅萍, 等. 探讨大鼠肝硬化动物模型的建立方法[J]. 肝胆外科杂志, 2006, 12(2): 136-137.
- [6] Zeng MD, Tai L. Zhonghua Ganzangbing Zazhi. 2002;10(5): 327-328.
曾民德, 秦龄. 宝恩肝纤维化诊断及疗效评估共识[J]. 中华肝病杂志, 2002, 10(5):327-328.
- [7] He Q, Zhu LD, Chen H. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(23): 4437-4441.
何琼, 朱陇东, 陈红. 骨髓间充质干细胞移植在大鼠急性肝损伤组织中的定植能力[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(23): 4437-4441.
- [8] Sato Y, Araki H, Kato J, et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*. 2005;106(2):756-763.

来自本文课题的更多信息——

基金声明: 兰州大学医学基金项目(LZUYX200655)。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。