

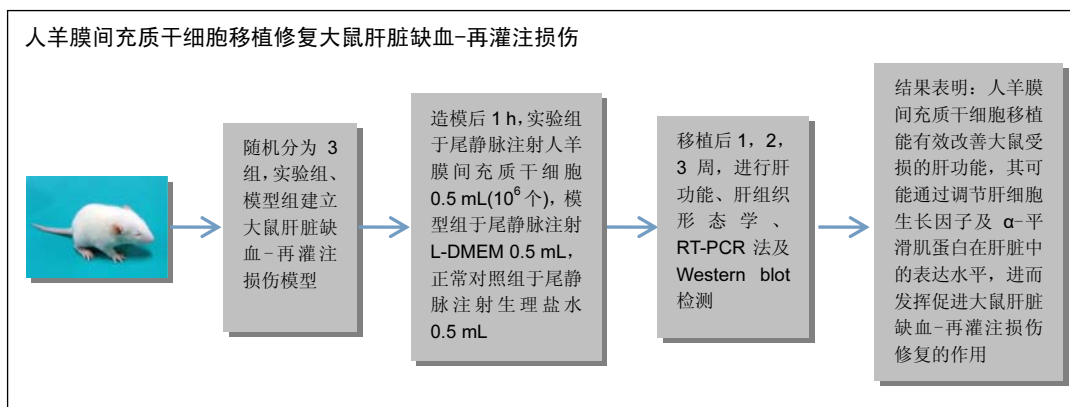
人羊膜间充质干细胞移植修复肝脏缺血-再灌注损伤

王新党¹, 张建军², 叶奎³(¹石家庄市鹿泉区铜冶镇中心卫生院普外科, 河北省石家庄市 050200; ²天津市第四中心医院, ²神经外科, ³肝胆外科, 天津市 300143)

引用本文: 王新党, 张建军, 叶奎. 人羊膜间充质干细胞移植修复肝脏缺血-再灌注损伤[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(45): 6788-6794.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.45.015 ORCID: 0000-0002-6541-9932(王新党)

文章快速阅读:



王新党, 男, 1974 年生, 河北省石家庄市人, 汉族, 2008 年河北医科大学毕业, 主治医师, 主要从事普外科研究。

中图分类号: R394.2

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2016)45-06788-07

稿件接受: 2016-09-28

文题释义:

人羊膜间充质干细胞: 经体外诱导培养后可分化成神经细胞、胰腺细胞、心肌细胞等来自 3 个胚层的细胞。而目前, 国内外研究也表明人羊膜间充质干细胞可以分化为肝细胞样细胞, 提示肝损伤后进行人羊膜间充质干细胞移植为临床肝病治疗提供可能。

肝脏缺血-再灌注损伤: 肝损害的基础是发生肝纤维化, 肝星状细胞激活是肝纤维化发生的中心环节, 肝星状细胞活化后细胞表型改变, 特征性表达 α -平滑肌肌动蛋白, 导致肝纤维化; 其表达量的高低与肝星状细胞活化、肝细胞纤维化程度均呈正相关, 所以, α -平滑肌蛋白表达量的检测, 可较好反映肝损害程度。

摘要

背景: 国内外研究表明, 人羊膜间充质干细胞可分化为肝细胞样细胞, 提示肝损伤后进行人羊膜间充质干细胞移植为临床肝病治疗提供可能。

目的: 观察人羊膜间充质干细胞移植对大鼠肝脏缺血-再灌注损伤的修复作用。

方法: 将 60 只 SD 大鼠随机分为 3 组, 干细胞移植组、模型组建立大鼠肝脏缺血-再灌注损伤模型, 造模后 1 h, 干细胞移植组于尾静脉注射人羊膜间充质干细胞 0.5 mL(10^6 个), 模型组于尾静脉注射 L-DMEM 0.5 mL, 正常对照组于尾静脉注射生理盐水 0.5 mL。移植后 1, 2, 3 周, 进行肝功能、肝组织形态学、RT-PCR 法及 Western blot 检测。

结果与结论: ①肝功能: 与正常对照组比较, 模型组移植后不同时间点的门冬氨酸转移酶、丙氨酸转移酶和丙二醛水平明显升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 干细胞移植组移植后不同时间点的门冬氨酸转移酶、丙氨酸转移酶和丙二醛水平明显降低($P < 0.05$); ②肝组织形态: 移植后 2 周, 模型组肝细胞变性、坏死及纤维化程度严重, 干细胞移植组肝细胞变性、坏死及纤维化程度较模型组明显减轻; ③RT-PCR 法及 Western blot 检测: 移植后 2 周, 与模型组比较, 干细胞移植组肝组织肝细胞生长因子水平明显升高($P < 0.05$), α -平滑肌蛋白明显下降($P < 0.05$); ④结果表明: 人羊膜间充质干细胞移植能有效改善大鼠受损的肝功能, 其可能通过调节肝细胞生长因子及 α -平滑肌蛋白在肝脏中的表达水平, 进而发挥促进大鼠肝脏缺血-再灌注损伤修复的作用。

关键词:

干细胞; 移植; 人羊膜间充质干细胞; 大鼠; 肝脏; 缺血-再灌注损伤; 修复; 肝损伤; 肝细胞生长因子; α -平滑肌蛋白

Wang Xin-dang, Attending physician, Department of General Surgery, Central Health Center of Tongye County, Shijiazhuang 050200, Hebei Province, China

主题词:

干细胞; 间质干细胞移植; 再灌注损伤; 组织工程

缩略语:

人羊膜间充质干细胞: *human amnion-derived mesenchymal stem cells, hAD-MSCs*

Human amniotic mesenchymal stem cell transplantation for the repair of liver ischemia-reperfusion injury

Wang Xin-dang¹, Zhang Jian-jun², Ye Kui³ (¹Department of General Surgery, Central Health Center of Tongye County, Shijiazhuang 050200, Hebei Province, China; ²Department of Neurosurgery, ³Department of Hepatobiliary Surgery, Tianjin Fourth Central Hospital, Tianjin 300143, China)

Abstract

BACKGROUND: Studies have shown that human amniotic mesenchymal stem cells can differentiate into hepatocyte-like cells, suggesting that human amniotic mesenchymal stem cell transplantation provides a new potential for the clinical treatment of liver diseases.

OBJECTIVE: To observe the effect of human amniotic mesenchymal stem cell transplantation on the repair of liver ischemia-reperfusion injury repair.

METHODS: Sixty Sprague-Dawley rats were randomized into stem cell transplantation, model and control groups. Animal models of liver ischemia-reperfusion injury were made in the rats in the stem cell transplantation and model groups. One hour after modeling, rats in the stem cell transplantation were given injection of human amniotic mesenchymal stem cells (0.5 mL, 10^6 cells) *via* the tail vein, while rats in the model and control group were given L-DMEM (0.5 mL) or normal saline (0.5 mL), respectively. Liver function and liver morphology were detected at 1, 2, 3 weeks after transplantation. Meanwhile, RT-PCR detection and western blot assay were also conducted.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Liver function: Compared with the control group, levels of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and malondialdehyde were significantly increased in the model group at different time points after transplantation ($P < 0.05$), while a significant reduction in the levels of these three indicators was found after cell transplantation as compared with the model group ($P < 0.05$). (2) Liver morphology: 2 weeks after transplantation, rats in the model group exhibited hepatocyte degeneration and necrosis, and severe fibrosis, but these changes were remarkably alleviated in the stem cell transplantation group. (3) RT-PCR and western blot detection: 2 weeks after transplantation, a significantly higher level of hepatocyte growth factor in the liver tissue and a lower level of α -smooth muscle protein were found in the stem cell transplantation group compared with the model group ($P < 0.05$). All these experimental findings indicate that human amniotic mesenchymal stem cell transplantation can improve impaired liver function in rats, possibly through regulating hepatocyte growth factor and α -smooth muscle protein expression levels in the liver, and thereby promotes the repair of liver ischemia-reperfusion injury.

Subject headings: Stem Cells; Mesenchymal Stem Cell Transplantation; Reperfusion Injury; Tissue Engineering

Cite this article: Wang XD, Zhang JJ, Ye K. Human amniotic mesenchymal stem cell transplantation for the repair of liver ischemia-reperfusion injury. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(45):6788-6794.

0 引言 Introduction

肝脏在调节身体生理功能及解毒方面发挥重要的作用。由于缺血-再灌注损伤是肝胆外科常见的病理过程之一,且对其发病机制的认识尚不统一,所以对损伤的修复也成为医学界亟待解决的难题。间充质干细胞可用于肝细胞损伤的修复^[1-2]。近年来学者发现人羊膜间充质干细胞(human amnion-derived mesenchymal stem cells, hAD-MSCs)经体外诱导培养后可分化成神经细胞、胰腺细胞、心肌细胞等来自3个胚层的细胞^[3-7]。而目前,国内外研究也表明hAD-MSCs可以分化为肝细胞

样细胞,提示肝损伤后进行hAD-MSCs移植为临床肝病治疗提供可能^[8]。实验主要对大鼠缺血-再灌注损伤肝进行hAD-MSCs移植,通过对肝功能不同指标的检测及肝组织特定蛋白表达比对,反映人hAD-MSCs对大鼠肝脏缺血-再灌注损伤修复的促进作用。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2014年5月至2015年8月在河北医科大学动物实验中心完成。

1.3 材料 健康足月剖宫产胎盘由河北医科大学动物实验中心提供, 首先产妇签署知情同意书, 无菌采集后立即进入hAD-MSCs分离提取过程。

实验动物: 六七周龄雌性SD大鼠60只, 体质量(180±20) g, 购自河北省实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK(冀)2013-1007。将60只SD大鼠随机分为干细胞移植组、模型组与正常对照组, 每组20只。

主要试剂: 胰蛋白酶购自上海化工公司; DNase I 消化液购自美国never公司; L-DMEM购自Gibco 公司; MDA试剂盒购自上海生物医学研究所; Total RNA 提取试剂购自TaKaRa 公司; PCR Primer购自上海生工公司; HotStarTaq DNA Polymerase购自QIAamp; 5%脱脂奶粉购自北京生化公司; 焦碳酸二乙酯(DEPC水)、体积分数75%乙醇购自北京化工公司; CDNA提取试剂盒购自北京源博汇通生物科技有限公司; D-PBS缓冲液购自北京化工公司; L-DMEM培养基(含体积分数为10%的胎牛血清、2 mmol/L L-谷氨酰胺、10 g/L非必需氨基酸、55 μmol/L 2-巯基乙醇、1 mmol/L丙酮酸钠、100 U/mL青霉素和100 g/L链霉素)购自北京百奥莱博科技有限公司; 丙氨酸转移酶、门冬氨酸转移酶试剂盒购自北京生化公司; 苏木精-伊红染色试剂盒购自北京博通生化公司。

1.4 实验方法

1.4.1 hAD-MSCs的体外培养^[9] 无菌实验环境下, 从获得的剖宫产胎盘组织上剥离下羊膜组织, 置于D-PBS冲洗液中反复冲洗, 清除羊膜组织表面残留血迹。羊膜剪碎, 加入0.5 g/L胰蛋白酶-0.02% EDTA-2Na进行组织消化, 37 °C旋转(200 r/min)消化10 min, 弃上清后重复加消化液消化30 min, 弃上清, 反复操作2次。D-PBS缓冲液冲洗, 加入0.75 g/L II型胶原酶-0.075 g/L DNase I消化液, 37 °C旋转(200 r/min)消化2.0-3.0 h, 完全消化后过滤, 300目不锈钢网收集细胞滤液, 离心机1 500 r/min, 离心10 min, 弃离心管上清, 于将细胞悬浮液置于L-DMEM培养基, 细胞活力经2%锥虫蓝染色检测合格后, 按 $2.2 \times 10^8 L^{-1}$ 的细胞浓度接种于培养瓶, 培养瓶置于体积分数为5%CO₂环境中, 温度为37 °C, 湿度饱和。3 d后更换培养基, 直至细胞长满80%-90%的培养基进行后续细胞传代培养。移植实验选择第3代细胞。

1.4.2 动物模型的建立及实验分组

动物模型建立^[10]: 将60只SD健康大鼠单笼、禁食饲养12 h。而后干细胞移植组、模型组大鼠经10%水合氯醛(3.0 mL/kg)进行腹腔静脉注射麻醉, 仰卧位固定,

常规手术区域备皮消毒。沿腹正中切口, 切开腹壁暴露肝脏, 止血钳拉开腹壁切口固定, 切缘放置湿纱布, 将要结扎的致缺血区域的肝叶缓慢移出腹壁切口至于其上, 呈竖直状稍向上提起牵拉, 将各叶肝脏的供血血管暴露于视野, 动脉夹夹闭肝叶近肝处的血管基底部, 观察夹闭肝叶表面颜色变化, 结扎40 min, 可见肝叶呈缺血状态, 松开动脉夹后将肝叶还纳腹腔复位, 冲洗腹腔后缝合腹壁。

术后护理: 术后将大鼠置于单笼饲养, 术后严格禁食3 d, 注意保暖, 为预防术后感染, 每日按 $40 \times 10^4 U/kg$ 标准肌注射青霉素。

分组干预: 动物模型制备后2周, 干细胞移植组于尾静脉注射hAD-MSCs 0.5 mL, 约含细胞 10^6 ; 模型组于尾静脉注射L-DMEM 0.5 mL; 正常对照组于尾静脉注射生理盐水0.5 mL。

1.5 主要观察指标

大鼠肝功能检测: 移植1, 2, 3周后, 各组随机抽选5只大鼠静取血4 mL, 离心后取上清液置于全自动生化分析仪中检测丙氨酸转移酶、门冬氨酸转移酶变化。随后各组分别取肝组织0.5 g, 制备10%组织匀浆。按分光光度计比色法试剂盒说明进行肝组织丙二醛检测, 分析变化。

苏木精-伊红染色观察肝组织形态学变化: 将各组大鼠于移植后2周处死5只, 取肝组织大小约2 cm×2 cm, 40 g/L多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 组织切片, 常规苏木精-伊红染色, 显微镜下观察肝组织病理学改变。

RT-PCR法检测肝细胞生长因子及α-平滑肌蛋白的基因表达: 移植后2周, 大鼠肝组织于研钵中反复研磨后置入无酶管中, 据RNA提取试剂盒说明书提取RNA; 然后根据PrimeScript RT reagent Kit Perfect Real Time (Takara 公司)反转录体系说明书合成cDNA。检索基因库中肝细胞生长因子、α-平滑肌蛋白正常序列, 利用Primer 5.0软件设计引物, 南方基因研究中心负责引物合成。

引物序列:

基因	引物(5'-3')	长度(bp)
肝细胞生长因子	正向: TTC CCA GCT GGT CTA TGG TC	236
	反向: TGG TGC TGA CTG CAT TTC TC	
α-平滑肌蛋白	正向: CTG ACA GAG GCA ACC ACT GAA	143
	反向: CAT CTC CAG AGT CCA GCA CA	
GAPDH	正向: CAA GTT CAA CGG CAC AGT CA	258
	反向: CCA CCA CAT ACT CAG CAC CAG	

将反转录后cDNA分别按梯度稀释 10 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 和 1×10^5 倍后进行qPCR; 反应体系为 $20 \mu\text{L}$: SYBR Primer EX Taq 酶TM II ($2 \times$) $10 \mu\text{L}$, 上下游引物各 $0.5 \mu\text{L}$, cDNA $1 \mu\text{L}$, ddH₂O $8 \mu\text{L}$ 。反应程序为: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ (预变性) 30 s ; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 s ; $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s , 40 个循环; 添加溶解曲线 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s ; $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s ; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s , 选取线性较好的3-4点绘制标准曲线; 反应液配置需要在冰上进行, 以GAPDH为内参, ddH₂O代替样本cDNA 为阴性对照实验, 实验重复3次。

Western blot法检测肝细胞生长因子及 α -平滑肌蛋白的蛋白表达: 移植后2周, 将少量大鼠肝组织置于研钵中磨碎, 加入蛋白裂解液, 通过超声破碎仪充分裂解, 以上过程于冰上进行低温操作, 离心机设置 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ $12\ 000 \text{ r/min}$ 离心 10 min , 取上清后BCA法测定肝细胞生长因子及 α -平滑肌蛋白的蛋白浓度, 按 $30 \mu\text{g}$ 蛋白量作为标准上样量。SDS-PAGE浓缩胶 80 V , 30 min ; 分离胶 120 V , 120 min , 然后转膜 100 V , 100 min ; 加入5%脱脂奶粉室温封闭 1 h , 一抗 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 封闭过夜, 之后将HRP标记二抗室温孵育 1 h , ECL法曝光、显影、照相。过程以 β -Actin为内参基因。

1.6 统计学分析 实验采用SPSS 17.0统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析法, 以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 hAD-MSCs的形态观察 hAD-MSCs在体外培养五六天可传代, 传代后 24 h 内即完全贴壁, 细胞呈梭形或多角形, 增殖速度加快, 培养至 10 d 左右时细胞生长面积可达 $80\% \sim 90\%$ 融合。传1代后的hAD-MSCs细胞生长迅速, 呈长梭形集落生长, 传第3代hAD-MSCs细胞形态单一, 呈漩涡状分布, 细胞排列紧密, 形态均匀, 纯度较好, 实验选取第3代hAD-MSCs细胞实施实验, 第3代hAD-MSCs细胞见图1。

2.2 各组大鼠肝功能检测结果 干细胞移植组与模型组大鼠均造模成功, 进入结果分析。

移植后1周, 干细胞移植组、模型组门冬氨酸转移酶、丙氨酸转移酶和丙二醛明显高于正常对照组($P < 0.05$), 干细胞移植组门冬氨酸转移酶、丙氨酸转移酶和丙二醛明显低于模型组($P < 0.05$)。移植后2周, 模型组门冬氨酸转移酶、丙氨酸转移酶和丙二醛明显高于正常对照组($P < 0.05$); 干细胞移植组门冬氨酸转移酶、丙氨酸转移酶和丙二醛水平明显低于模型组($P < 0.05$),

但丙二醛水平与正常对照组比较仍较高($P < 0.05$)。移植后3周, 3组间门冬氨酸转移酶、丙氨酸转移酶和丙二醛水平两两比较差异均有显著性意义, 见表1-3。

表1 各组大鼠移植后不同时间点的门冬氨酸转移酶水平变化 ($\bar{x} \pm s$, U/L)

Table 1 Changes of aspartate aminotransferase level in rats in each group at different time points after cell transplantation

组别	移植后1周	移植后2周	移植后3周
正常对照组	31.36 \pm 1.02	31.35 \pm 1.05	31.47 \pm 1.03
模型组	77.18 \pm 0.54 ^a	60.56 \pm 1.18 ^a	52.37 \pm 1.07 ^a
干细胞移植组	64.32 \pm 0.51 ^b	48.02 \pm 1.10 ^b	35.32 \pm 1.06 ^b

表注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$ 。

表2 各组大鼠移植后不同时间点的丙氨酸转移酶水平变化 ($\bar{x} \pm s$, U/L)

Table 2 Changes of alanine aminotransferase level in rats in each group at different time points after cell transplantation

组别	移植后1周	移植后2周	移植后3周
正常对照组	130.24 \pm 1.22	131.20 \pm 1.05	131.34 \pm 1.16
模型组	208.56 \pm 1.34 ^a	198.62 \pm 1.04 ^a	177.64 \pm 1.12 ^a
干细胞移植组	188.63 \pm 1.38 ^b	150.38 \pm 1.09 ^b	142.31 \pm 1.10 ^b

表注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$ 。

表3 各组大鼠移植后不同时间点的丙二醛浓度变化 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Table 3 Changes of malondialdehyde content in rats in each group at different time points after cell transplantation

组别	移植后1周	移植后2周	移植后3周
正常对照组	5.37 \pm 0.02	5.36 \pm 0.04	5.35 \pm 0.03
模型组	22.29 \pm 1.74 ^a	20.63 \pm 1.56 ^a	18.77 \pm 1.50 ^a
干细胞移植组	19.81 \pm 0.43 ^b	17.65 \pm 0.39 ^b	15.36 \pm 0.48 ^b

表注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$ 。

2.3 各组大鼠肝组织形态学变化 移植后2周, 模型组肝脏病理切片显示肝脏纤维化较严重, 肝细胞出现水肿, 脂肪样变性坏死, 肝窦内出血, 肝窦结构消失, 假小叶形成明显, 可见核固缩、溶解, 炎性细胞浸润明显, 肝小叶结构破坏较为严重, 见图2A; 干细胞移植组肝细胞坏死较少, 亦可见假小叶形成, 但数量较损伤组减少, 肝脏水肿、纤维化、肝脂肪变性程度明显减轻, 肝小叶结构明显恢复, 见图2B; 正常对照组肝脏结构完整清晰, 质软、色红, 无炎性细胞浸润及细胞水肿、变性、坏死等现象, 见图2C。

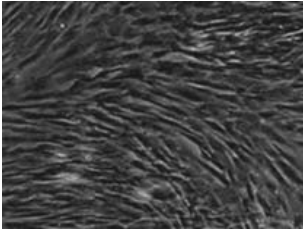


图1 第3代的人羊膜间充质干细胞(×100)
Figure 1 The third generation of human amniotic mesenchymal stem cells (×100)
图注: 细胞形态单一, 呈漩涡状分布, 细胞排列紧密, 形态均匀, 纯度较好。

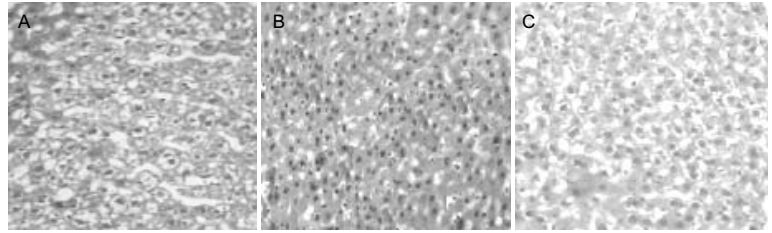


图2 各组大鼠移植后2周肝组织形态学变化(苏木精-伊红染色, ×200)
Figure 2 Morphological changes of the liver tissue in rats at 2 weeks after cell transplantation (hematoxylin-eosin staining, ×200)
图注: 图中A为模型组, 肝窦结构消失, 核固缩、溶解; B为干细胞移植组, 炎性细胞浸润明显减少, 肝小叶结构基本恢复; C为正常对照组, 肝组织结构完整清晰。

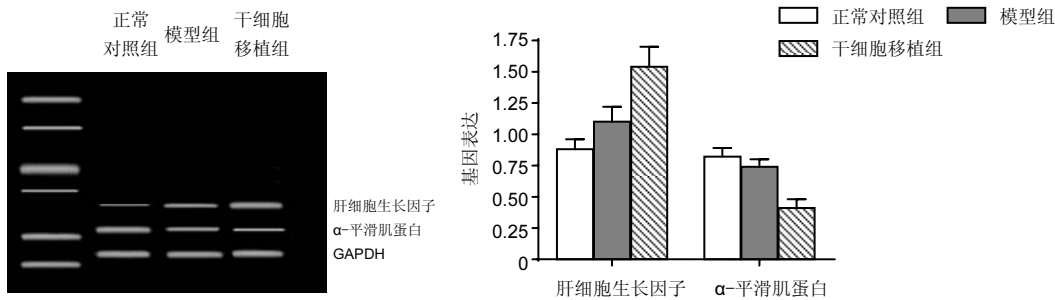


图3 RT-PCR法检测各组肝组织肝细胞生长因子及α-平滑肌蛋白基因的表达
Figure 3 RT-PCR detection of hepatocyte growth factor and α-smooth muscle protein expression in the liver tissue of rats
图注: 与模型组比较, 干细胞移植组中肝细胞生长因子基因表达水平明显升高($P < 0.05$), α-平滑肌蛋白基因表达水平明显下降($P < 0.05$); 模型组、干细胞移植组肝细胞生长因子、α-平滑肌蛋白基因表达与正常对照组比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。

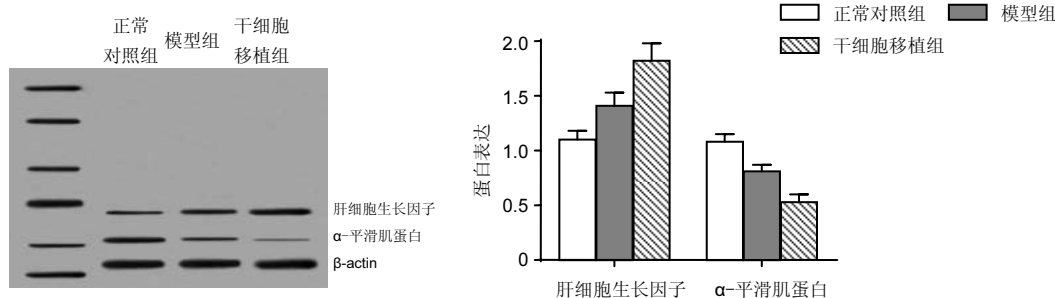


图4 Western blot法检测各组肝组织肝细胞生长因子及α-平滑肌蛋白的表达
Figure 4 Western blot detection of hepatocyte growth factor and α-smooth muscle protein expression in the liver tissue of rats
图注: 与模型组比较, 干细胞移植组中肝细胞生长因子蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$), α-平滑肌蛋白表达水平明显下降($P < 0.05$); 模型组、干细胞移植组肝细胞生长因子、α-平滑肌蛋白表达与正常对照组比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.4 各组肝细胞生长因子及α-平滑肌蛋白基因表达
肝细胞生长因子主要由肝脏间质细胞产生; α-平滑肌蛋白主要分布于肝窦周围、汇管区、纤维间隔及增生的胆管周围细胞。移植后2周, RT-PCR法检测得知, 与模型组比较, 干细胞移植组中肝细胞生长因子基因表达水平明显升高($P < 0.05$), 而α-平滑肌蛋白基因表达水平明显下降($P < 0.05$); 模型组、干细胞移植组肝细胞生长因子、α-平滑肌蛋白基因表达与正常对照组比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 见图3。

2.5 各组肝细胞生长因子及α-平滑肌蛋白表达
移植后2周, Western blot法检测得知, 与模型组比较, 干细胞移植组中肝细胞生长因子蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$), α-平滑肌蛋白表达水平明显下降($P < 0.05$); 模型组、干细胞移植组肝细胞生长因子蛋白、α-平滑肌蛋白与正常对照组比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 见图4。

3 讨论 Discussion

肝脏作为人体重要的调节身体机能和解毒器官, 其

损伤修复过程是医学界研究的热点话题。干细胞移植为肝损伤的修复提供可能^[11-13]。干细胞可根据不同发育阶段分为胚胎干细胞和成体干细胞, 胚胎干细胞的研究受阻于社会伦理道德的争议与其致癌性风险^[14-15]。骨髓干细胞做为成体干细胞中应用做多, 却由于获取骨髓干细胞的方式难免对供者造成创伤, 且随着年龄增长, 可获得的数量逐渐减少, 病毒感染风险增加^[16-17]。所以研究者将目光逐渐投向非骨髓来源的成体干细胞, 逐渐从脂肪组织、胰腺、羊水、胎盘、脐带等组织中分离出干细胞^[18-21]。hAD-MSCs 细胞比骨髓干细胞增殖分化能力更强^[22-26]。hAD-MSCs 细胞在体内外能够诱导成为脂肪、骨、软骨、神经等多种组织细胞^[27-28], 其活跃的增殖能力与广阔的临床应用前景备受研究者的关注。国内外日益增多的研究发现, hAD-MSCs 在治疗和修复肝损伤、胰腺损伤、神经损伤等动物模型中发挥着显著作用。肝脏损伤后产生大量氧自由基、血管内皮损伤等, 可能与缺血-再灌注肝损害有关。血管内皮在肝脏缺血期可释放大量氧自由基, 灌注期致血管功能障碍。所以, 修复血管内皮细胞是肝缺血-再灌注损伤修复的首要步骤。丙二醛是脂质过氧化反应后的氧化终产物, 可引起肝组织的损伤。实验通过检测丙二醛的表达量, 了解肝细胞中氧自由基的表达水平及氧化程度, 进一步评估肝组织的损伤程度。

研究结果显示, 移植后 1 周, 干细胞移植组、模型组门冬氨酸转移酶、丙氨酸转移酶及丙二醛表达量较正常对照组升高($P < 0.05$); 移植后 2, 3 周, 干细胞移植组门冬氨酸转移酶、丙氨酸转移酶和丙二醛表达量较模型组下调($P < 0.05$), 但丙二醛仍较正常对照组高($P < 0.05$)。结果也说明了干细胞移植组大鼠肝能在 hAD-MSCs 细胞移植后明显改善, 脂质过氧化反应程度减轻, 进一步论证了 hAD-MSCs 细胞移植可促进修复肝脏缺血-再灌注损伤。

肝损害的基础是发生肝纤维化, 肝星状细胞活化是肝纤维化发生的中心环节, 肝星状细胞活化后细胞表型改变, 特征性表达 α -平滑肌肌动蛋白, 导致肝纤维化; 其表达量的高低与肝星状细胞活化、肝细胞纤维化程度均呈正相关, 所以, α -平滑肌蛋白表达量的检测, 可较好反映肝损害程度。此次实验结果表明, 干细胞移植组大鼠肝组织 α -平滑肌蛋白表达水平显著低于模型组, 说明 hAD-MSCs 细胞可抑制损伤肝组织中肝星状细胞的活化, 抑制肝细胞发展为纤维母细胞, 减轻肝损害程度。肝细胞生长因子是发现的刺激原代培养肝细胞生长的

细胞因子, 具有多种生物学功能, 做为强效地促有丝分裂剂, 在促进成熟肝细胞分裂、血管新生与侧支微循环的建立方面发挥重要作用。已有研究发现, 肝细胞生长因子在肝细胞发生变形、坏死等病理改变后表达增高, 表明肝细胞生长因子可促使肝组织再生与修复。研究通过利用 RT-PCR 与 Western blot 技术检测后发现, 干细胞移植组肝细胞生长因子表达量显著高于模型组, 表明 hAD-MSCs 细胞移植后肝细胞生长因子的表达量增加, 促使肝细胞增殖与再生, 抑制细胞凋亡, 进一步改善肝细胞纤维化。实验中经移植后, 苏木精-伊红染色肝组织后发现, 干细胞移植组大鼠肝细胞变性、坏死及纤维化程度轻于模型组。以上均表明 hAD-MSCs 细胞移植可改善肝功, 促进肝细胞再生, 修复肝脏缺血-再灌注损伤。

致谢: 十分感谢天津市第四中心医院神经外科的张建军老师与肝胆外科的叶奎老师!

作者贡献: 王新党进行实验设计, 实验实施为王新党、张建军、叶奎, 实验评估为王新党、张建军, 资料收集为王新党、张建军、叶奎, 王新党成文, 张建军审校。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容无相关利益冲突。

伦理问题: 实验方案经河北医科大学动物实验伦理委员会批准, 批准号为 SCXK(冀)20050001。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Fox IJ, Chowdhury JR. Hepatocyte transplantation. *Am J Transplant*. 2004; 4: Supply 6: 7-13.
- [2] Strom SC, Bruzzone P, Cai H, et al. Hepatocyte transplantation: clinical experience and potential for future use. *Cell Transplant*. 2006; 15 Suppl 1: S105-110.
- [3] Soncini M, Vertua E, Gibelli L, et al. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007; 1: 296-305.

- [4] Ventura C, Cantoni S, Bianchi F, et al. Hyaluronan Mixed Esters of Butyric and Retinoic Acid Drive Cardiac and Endothelial Fate in Term Placenta Human Mesenchymal Stem Cells and Enhance Cardiac Repair in Infarcted Rat Hearts. *J Biol Chem.* 2007; 282: 14243-14252.
- [5] 张路, 方宁, 陈代雄, 等. 人羊膜间充质细胞有向心肌样细胞分化的特性[J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(12): 84-89.
- [6] Alviano F, Fossati V, Marchionni C, et al. Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol.* 2007; 7: 11.
- [7] De Coppi P, Bartsch G, Jr Siddiqui M, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol.* 2007; 1(25): 100-106.
- [8] Song XJ, Chen DX, Fang N, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2007; 11(50): 10056-10060.
- [9] 方宁, 张路, 宋秀, 等. 人羊膜间充质干细胞的分离、培养及鉴定[J]. *遵义医学院学报*, 2009, 32(3): 234-236.
- [10] 朴正福, 丁淑琴, 张海燕, 等. 人羊膜间充质干细胞的分离及分化潜能的研究[J]. *生物医学工程与临床*, 2010, 14(1): 15-19.
- [11] Kobayashi M, Yakuwa T, Sasaki K, et al. Multilineage potential of side population cells from human amnion mesenchymal layer. *Cell Transplantat.* 2008; (17): 291-301.
- [12] Kita K, Gauglitz GG, Phan TT, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the sub-amniotic human umbilical cord lining membrane. *Stem Cells Dev.* 2010; 19(4): 491-502.
- [13] Perin L, Sedrakyan S, Giuliani S. Protective effect of human amniotic fluid stem cells in an immunodeficient mouse model of acute tubular necrosis. *PLoS One.* 2010; 5(2): e9357.
- [14] Takashima S, Ise H, Zhao P, et al. Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions. *Cell Struct Funct.* 2004; 29: 73-84.
- [15] Chien CC, Yen BL, Lee FK, et al. In Vitro Differentiation of Human Placenta-Derived Multipotent Cells into Hepatocyte-Like Cells. *Stem Cells.* 2006; 24: 1759-1768.
- [16] Tamagawa T, Oi S, Ishiwata I, et al. Differentiation of mesenchymal cells derived from human amniotic membranes into hepatocyte-like cells in vitro. *Human Cell.* 2007; 20(3): 77-84.
- [17] Gong LM, Fang N, Chen DX, et al. Differentiation of human amnion derived-mesenchymal stem cells into hepatocytes in rat injured Liver. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res.* 2011; 15(36): 6709-6713.
- [18] 任红英, 赵钦军, 刘拥军, 等. 脐带间充质干细胞体外诱导分化为肝细胞样细胞的研究[J]. *山东医药*, 2008, 48(30): 24-26.
- [19] Tanabe S, Sato Y, Suzuki T, et al. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells for identification of novel markers in early- and late-stage cell culture. *J Biochem.* 2008; 144(3): 399-408.
- [20] Zeddou M, Briquet A, Relic B, et al. The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood. *Cell Biol Int.* 2010; 34(7): 693-701.
- [21] Kretlow JD, Jin YQ, Liu W, et al. Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells. *BMC Cell Biol.* 2008; 9: 60.
- [22] Zhang X, Hirai M, Cantero S, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem.* 2011; 112(4): 1206-1218.
- [23] Montanucci P, Basta G, Pescara T, et al. New simple and rapid method for purification of mesenchymal stem cells from the human umbilical cord Wharton jelly. *Tissue Eng Part A.* 2011; 17(21-22): 2651-2661.
- [24] Tsagias N, Koliakos I, Karagiannis V, et al. Isolation of mesenchymal stem cells using the total length of umbilical cord for transplantation purposes. *Transfus Med.* 2011; 21(4): 253-261.
- [25] Shi M, Zhang Z, Xu R, et al. Human mesenchymal stem cell transfusion is safe and improves liver function in acute-on-chronic liver failure patients. *Stem Cells Transl Med.* 2012; 1(10): 725-731.
- [26] In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells.* 2004; 22(7): 1338-1345.
- [27] Casey ML, MacDonald PC. Interstitial collagen synthesis and processing in human amnion: a property of the mesenchymal cells. *Biol Reprod.* 1996; 55(6): 1253-1260.
- [28] Sakuragawa N, Kakinuma K, Kikuchi A, et al. Human amnion mesenchyme cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells. *J Neurosci Res.* 2004; 78(2): 208-214.