

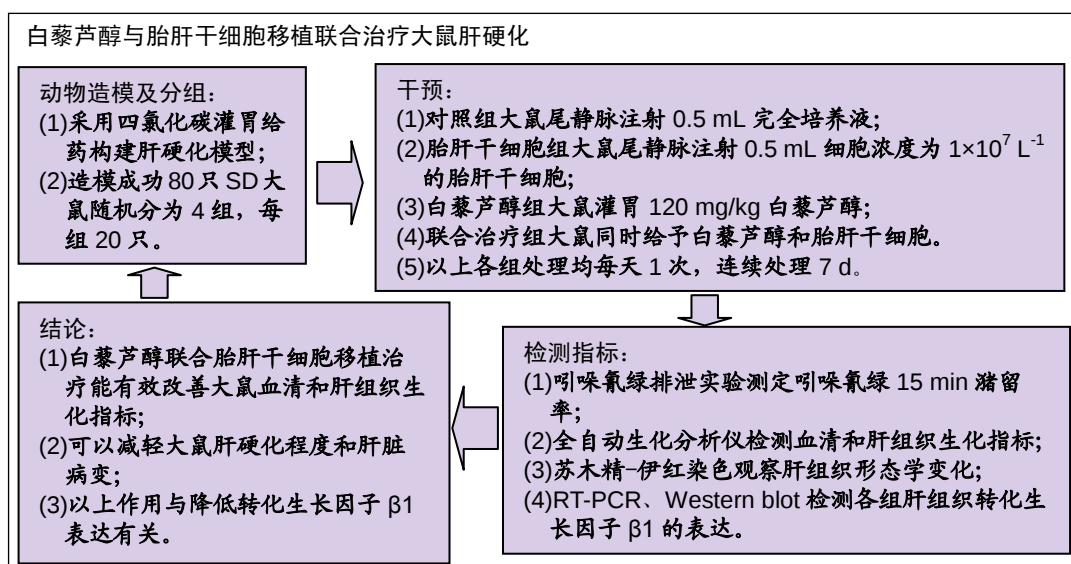
白藜芦醇和胎肝干细胞移植联合治疗大鼠肝硬化

王宇翊(天津市第四中心医院肝胆胃肠外科, 天津市 300140)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1644

ORCID: 0000-0002-6648-0874(王宇翊)

文章快速阅读:



王宇翊, 男, 1978 年生, 汉族, 天津市人, 2002 年哈尔滨医科大学毕业, 主治医师, 主要从事肝胆胃肠外科学方面的研究。

文献标识码:B

稿件接受: 2018-12-15



文题释义:

肝干细胞: 是成体干细胞的一种, 可分化为成熟肝细胞、胆管上皮细胞和胰腺上皮细胞。从理论上讲, 与肝移植相比, 胎肝干细胞移植具有明显优势。目前胎肝干细胞移植主要用于治疗爆发性肝功能衰竭、慢性肝病及代谢性肝病。胎肝干细胞不仅具有治疗潜能, 而且为药理学及肝脏发育学的研究提供一个较好的平台。

白藜芦醇: 是一种多酚类天然化合物, 具有抑制炎症、抵抗癌症、缓解糖尿病和动脉硬化以及抗氧化等生物活性。在肝病治疗方面, 白藜芦醇可以通过改善机体脂肪代谢和诱导细胞自噬缓解肝脏病变, 还可以通过改善肝脏微循环并抑制炎症反应, 从而保护肝脏细胞免受多种病理损伤, 促进肝细胞的更新和再生。

摘要

背景: 研究发现, 低剂量的白藜芦醇能够促进细胞增殖和分化, 对胎肝干细胞移植治疗大鼠肝硬化有协同作用。

目的: 探讨白藜芦醇与胎肝干细胞移植联合治疗大鼠肝硬化的作用及其机制。

方法: 选取 84 只 SD 成年大鼠(由北京维通利华动物实验技术有限公司提供), 采用四氯化碳灌胃给药构建肝硬化模型, 最终成功造模 81 只大鼠。造模成功后从中随机取 80 只大鼠随机分为 4 组, 每组 20 只。对照组大鼠尾静脉注射 0.5 mL 的 L-DMEM, 胎肝干细胞组大鼠尾静脉注射 0.5 mL 胎肝干细胞悬液; 白藜芦醇组大鼠灌胃 120 mg/kg 白藜芦醇, 联合治疗组大鼠进行二者联合治疗, 1 次/d, 连续治疗 7 d。治疗 3 周后采用吲哚氰绿排泄实验测定吲哚氰绿 15 min 滞留率, 采用全自动生化分析仪检测血清和肝组织生化指标, 苏木精-伊红染色观察肝组织形态学变化, RT-PCR、Western blot 检测肝组织转化生长因子 $\beta 1$ 的表达。

结果与结论: ①与对照组比较, 胎肝干细胞组及白藜芦醇组大鼠血清丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶、血清总胆红素以及肝组织丙二醛水平均显著降低($P < 0.05$); 血清白蛋白、总蛋白、白蛋白/球蛋白以及肝组织谷胱甘肽过氧化物酶及环磷酸鸟苷水平均显著升高($P < 0.05$); 联合治疗组上述生化指标水平均优于胎肝干细胞组及白藜芦醇组($P < 0.05$); ②胎肝干细胞组、白藜芦醇组大鼠肝细胞变性、坏死及纤维化程度均有明显减轻, 联合治疗组减轻更明显; ③与对照组比较, 白藜芦醇干预治疗和胎肝干细胞移植治疗后吲哚氰绿 15 min 滞留率显著升高($P < 0.05$), 联合治疗组吲哚氰绿 15 min 滞留率进一步升高($P < 0.01$); ④与对照组比较, 白藜芦醇组及胎肝干细胞组转化生长因子 $\beta 1$ 表达明显降低($P < 0.05$), 联合治疗组进一步降低($P < 0.01$); ⑤结果表明, 白藜芦醇干预联合胎肝干细胞移植治疗能有效改善肝硬化大鼠生化指标水平, 可以明显减轻大鼠肝硬化程度和肝脏病变, 这可能与降低转化生长因子 $\beta 1$ 表达有关。

关键词:

肝硬化; 胎肝干细胞; 干细胞移植; 白藜芦醇; 转化生长因子 $\beta 1$; 肝脏病变; 血清总胆红素; 肝组织形态

主题词:

肝硬化; 肝; 干细胞移植; 转化生长因子 $\beta 1$; 组织工程

中图分类号: R459.9; R394.2

Wang Yuxuan, Attending physician, Department of Hepatobiliary and Gastrointestinal Surgery, Tianjin 4th Center Hospital, Tianjin 300140, China

Combination of resveratrol and fetal liver stem cell transplantation for treatment of liver cirrhosis in rats

Wang Yuxuan (Department of Hepatobiliary and Gastrointestinal Surgery, Tianjin 4th Center Hospital, Tianjin 300140, China)

Abstract

BACKGROUND: Low-dose resveratrol can promote cell activation and show synergy with fetal liver stem cell transplantation for liver cirrhosis in rats.

OBJECTIVE: To observe and investigate the effects of resveratrol and fetal liver stem cell transplantation on the rat with liver cirrhosis.

METHODS: Eighty-four Sprague-Dawley adult rats were intragastrically administered with carbon tetrachloride to induce liver cirrhosis, and the animal model of liver cirrhosis was successfully made in 81 rats. After the successful modeling, 80 of the 81 model rats were randomly divided into four groups ($n=20/\text{group}$): the rats in the control group were injected with 0.5 mL of low-dose Dulbecco's modified Eagle's medium into the tail vein; the rats in the fetal liver stem cell group were injected with 0.5 mL of fetal liver stem cell suspensions into the tail vein; the rats in the resveratrol group was intragastrically administered with 120 mg/kg resveratrol; and the rats in the combination group were given injection of fetal liver stem cell suspension and administration of resveratrol. All treatments were given once daily for 7 consecutive days. After 3 weeks of treatment, the indocyanine green excretion test was used to determine the 15-minute retention rate of indocyanine green. The biochemical indicators of the serum and liver tissues were detected by an automatic biochemical analyzer. Morphological changes of the liver tissue were observed by hematoxylin-eosin staining. Transforming growth factor $\beta 1$ gene and protein expression in the liver tissue was detected by RT-PCR and western blot, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Compared with the control group, the levels of serum alanine aminotransferase, serum aspartate aminotransferase, serum total bilirubin and malondialdehyde in the liver tissue were significantly reduced in the fetal liver stem cell group and resveratrol group ($P < 0.01$), while serum albumin level, total protein level, albumin/globulin, and glutathione peroxidase level and cyclic guanosine monophosphate level in the liver tissue were significantly increased in these two groups ($P < 0.05$). These aforementioned biochemical indicators in the combination group were significantly improved as compared with the fetal liver stem cells group and resveratrol group ($P < 0.05$). (2) Hepatocyte degeneration, necrosis and fibrosis were significantly reduced in the three treatment groups, especially in the combination group. (3) Compared with the control group, the 15-minute retention rate of indocyanine green was significantly increased after resveratrol intervention and fetal liver stem cell transplantation ($P < 0.05$), and further increased after combination treatment ($P < 0.01$). (4) Compared with the control group, the expression of transforming growth factor $\beta 1$ was significantly decreased in the resveratrol group and fetal liver stem cell group ($P < 0.05$), and further decreased in the combination group ($P < 0.01$). To conclude, resveratrol treatment combined with fetal liver stem cell transplantation can effectively improve the levels of blood biochemical markers and significantly reduce the degree of liver cirrhosis and hepatic histopathological changes in the rats with liver cirrhosis. This may be related to the decreased expression of transforming growth factor $\beta 1$ gene and protein.

Subject headings: Liver Cirrhosis; Liver; Stem Cell Transplantation; Transforming Growth Factor beta1; Tissue Engineering

0 引言 Introduction

肝硬化是一种主要由肝炎病毒引起的肝脏结构和功能改变的危重疾病, 治疗手段主要以缓解肝硬化造成的门静脉高压、腹水以及感染等症状为主^[1-3]。尽管目前肝脏移植是唯一有效彻底治疗肝硬化的手段, 但该疗法供源严重缺乏且手术治疗费用较高, 此外长期服用免疫抑制剂也给患者带来极大的痛苦^[4]。白藜芦醇是一种多酚类天然化合物, 具有抑制炎症、抵抗癌症、缓解糖尿病和动脉硬化以及抗氧化等生物活性^[5-6]。在肝病治疗方面, 白藜芦醇可以通过改善机体脂肪代谢和诱导细胞自噬缓解肝脏病变, 还可以通过改善肝脏微循环并抑制炎症反应, 从而保护肝脏细胞免受多种病理损伤, 促进肝细胞的更新和再生^[7-8]。众所周知干细胞是一类具有多向分化潜能的多能细胞, 在多种代谢疾病治疗中疗效显著^[9-13]。胎肝干细胞具有多向分化潜能, 其可分化为成熟肝细胞等维持肝脏系统的稳态, 修复肝损伤^[14]。研究表明白藜芦醇干预可以促进移植干细胞的增殖和存活^[15]。因此, 该研究旨在探讨白藜芦醇和胎肝干细胞移植联合治疗肝硬化的作用及其机制。

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2017年5月至2018年1月在天津医科大学内分泌研究所完成。

1.3 材料

1.3.1 实验细胞 冻存鼠胎肝干细胞购买自中国医学科学院。

1.3.2 实验试剂 胰蛋白酶(美国Sigma公司); DMEM培养基、胎牛血清和PBS(Hyclone公司); Trizol试剂盒(Invitrogen公司); 细胞培养箱(Heraeus Sepatech公司)。

1.3.3 实验动物 成年SD大鼠84只, 雌雄各半, 体质量200-250 g, 由北京维通利华动物实验技术有限公司提供, 生产许可证号: SCXK(京)2012-0001, 实验动物使用许可证号: SYXK(津)2014-0002。大鼠均饲养于25 °C, 湿度60%-70%的SPF环境下, 自由饮水和采食。

1.4 实验方法

1.4.1 胎肝干细胞复苏与标记 将液氮冻存的鼠胎肝干细胞, 放于37 °C恒温水浴箱30 s快速复苏。待到冻存的细胞悬液完全融化之后进行稀释、离心、弃上清、洗涤细胞等步骤, 然后用完全培养液重悬细胞并将其细胞浓度调整为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 在细胞培养箱中培养7 d之后对其进行CM-Dil荧光标记: 向细胞悬液中加入5 μL CM-Dil, 在细胞培养箱中孵育25 min, 重复此操作2次后显微镜下观察细胞形态和细胞标记情况, 随后用完全培养液将其细胞浓度调整为 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 供以下实验使用。

1.4.2 实验分组与建模 将84只成年SD大鼠给予CCl₄灌胃处理, 每周一、三、五灌胃, 每次灌胃剂量为3.0 mL/kg,

连续10周,诱导大鼠发生肝硬化,最终造模成功81只SD大鼠^[16]。从81只SD大鼠中选取80只大鼠,随机分为4组,每组20只。对照组大鼠尾静脉注射0.5 mL完全培养液,胎肝干细胞组大鼠尾静脉注射0.5 mL细胞浓度为 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的胎肝干细胞,白藜芦醇组大鼠灌胃120 mg/kg白藜芦醇,联合治疗组大鼠灌胃120 mg/kg白藜芦醇、尾静脉注射0.5 mL细胞浓度为 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的胎肝干细胞。以上各组处理均每天1次,连续处理7 d。

1.4.3 吲哚氰绿排泄实验测定吲哚氰绿15 min滞留率 在治疗第3周,每组随机取5只大鼠进行吲哚氰绿排泄实验。吲哚氰绿用蒸馏水进行稀释后,在30 s内经大鼠尾静脉快速注射完成(剂量0.25 mg/kg),准确记录时间,在15 min后采集心脏血液,检测15 min的吲哚氰绿滞留率,然后取出大鼠肝脏,迅速放入液氮中保存。

1.4.4 全自动生化分析仪检测血清生化指标 治疗第3周,每组随机取5只大鼠,打开腹腔,穿刺下腔静脉,抽取2 mL血液,利用全自动生化分析仪检测血清生化指标变化,包括血清丙氨酸氨基转移酶、门冬氨酸氨基转移酶、总胆红素、白蛋白、总蛋白、白蛋白/球蛋白水平。

1.4.5 肝组织丙二醛、谷胱甘肽过氧化物酶及环磷酸鸟苷水平 治疗第3周,取出液氮中保存的大鼠肝脏,取同一部位的0.5 g肝脏在冰上切碎,用PBS制成10%匀浆液,低温离心取上清液,按照试剂盒说明检测各组大鼠肝脏组织匀浆液中丙二醛、谷胱甘肽过氧化物酶及环磷酸鸟苷水平。

1.4.6 肝组织苏木精-伊红染色 治疗第3周,每组随机取5只大鼠给予水合氯醛注射麻醉处死,取出肝脏组织,用体积分数为10%甲醛溶液固定后制备肝脏组织切片,切成5-8 μm 厚的薄片。将薄片烫平,再贴到载玻片上,放入45 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中烘干,梯度乙醇脱水,二甲苯脱蜡,树胶封固,进行苏木精-伊红染色,显微镜下观察各组大鼠肝脏组织形态变化。

1.4.7 荧光显微镜观察胎肝干细胞存活及分布情况 治疗第3周,每组随机取5只大鼠给予水合氯醛注射麻醉处死,取出肝脏组织,制备冰冻切片进行DAPI染色。显微镜下每张冷冻切片随机选取3个视野进行拍照记录;假设每张照片的总亮度为1,为每张照片选取1个光亮度点,利用ACDsee5.0软件确定其坐标。在图像中随机选取8个视野,计数每个视野中CM-Dil标记的阳性细胞数。

1.4.8 RT-PCR、Western blot检测各组肝组织转化生长因子 $\beta 1$ 的表达 治疗第3周,取出液氮中保存的大鼠肝脏,采用RT-PCR法和Western blot法检测肝组织中转化生长因子 $\beta 1$ 的mRNA和蛋白相对表达水平。每个实验重复3次。通过Oligo 7.36 Demo软件设计引物,转化生长因子 $\beta 1$ 上游引物:5'-GCT AAT GGT GGA CCG CAA C-3',下游引物:5'-CAG TGA GCA CTG AAG CGA-3',扩增片段212 bp;内参GAPDH上游引物:5'-GTG CTG AGT ATG TCG TGG A-3',下游引物:5'-CAC AGT CTT CTG AGT GGC A-3',

扩增片段121 bp。提取细胞RNA并反转录为cDNA,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 分析法,以GAPDH基因作为内参,测定转化生长因子 $\beta 1$ 的mRNA相对表达水平。反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性20 s,54 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸90 s,扩增45个循环,最终72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸7 min。

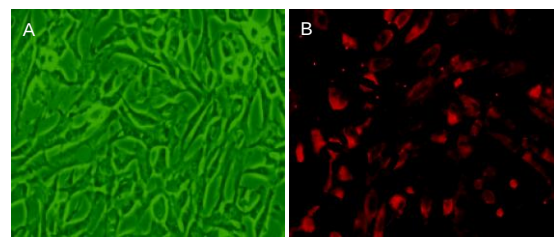
根据BCA试剂盒说明书提取并检测肝组织蛋白浓度,每组取蛋白40 μg ,10%SDS-PAGE凝胶电泳(70 V,30 min;100 V,90 min);转膜(200 mA,3 h)至PVDF膜;5%脱脂牛奶室温封闭2 h(或4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜);一抗(1:500)室温孵育2 h(或4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜);TPBS洗涤3次,PBS洗涤1次;加入HRP标记的二抗(1:5 000),PBS洗涤后用化学发光试剂显影,扫描图像并半定量分析,测定各组肝组织中转化生长因子 $\beta 1$ 蛋白相对表达水平。

1.5 主要观察指标 ①吲哚氰绿排泄实验测定吲哚氰绿15 min滞留率(ICGR 15);②全自动生化分析仪检测血清和肝组织生化指标;③苏木精-伊红染色观察肝组织形态学变化;④RT-PCR、Western blot检测肝组织转化生长因子 $\beta 1$ 的表达。

1.6 统计学分析 采用SPSS 16.0软件进行统计分析,多组间均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 胎肝干细胞形态及CM-Dil标记效果 在细胞复苏6 h后即可见到有少量的胎肝干细胞贴壁,接种24 h后可见胎肝干细胞呈现出多角形或者长梭形的形态,镜下可见明显的团簇状,见图1A。CM-Dil标记的胎肝干细胞在荧光显微镜下呈红色荧光,见图1B。



图注:图中A为接种24 h的胎肝干细胞;B为CM-Dil标记的胎肝干细胞。

图1 胎肝干细胞的形态和标记效果($\times 200$)

Figure 1 Morphology and labeling effect of fetal liver stem cells ($\times 200$)

2.2 各组大鼠血液生化指标 见表1。与对照组比较,胎肝干细胞组及白藜芦醇组大鼠血清丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶、血清总胆红素水平均显著降低($P < 0.05$),联合治疗组上述血液生化指标水平进一步降低($P < 0.01$);与对照组相比较,胎肝干细胞组及白藜芦醇组血清白蛋白、总蛋白、白蛋白/球蛋白均明显升高($P < 0.05$),联合治疗组上述血液生化指标水平进一步升高($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠血液生化指标 (x±s, n=5)
Table 1 Blood biochemical indicators in each group

指标	对照组	白藜芦醇组	胎肝干细胞组	联合治疗组
丙氨酸氨基转移酶(U/L)	5.11±0.51	3.44±0.38 ^a	3.18±0.36 ^a	2.76±0.29 ^b
天冬氨酸氨基转移酶(U/L)	5.10±0.52	3.45±0.37 ^a	3.19±0.39 ^a	2.75±0.28 ^b
总胆红素(mg/L)	110.17±32.80	80.64±20.40 ^a	80.02±16.80 ^a	75.30±12.20 ^b
总蛋白(g/L)	38.68±5.47	48.12±4.71 ^a	51.31±4.94 ^a	59.56±5.32 ^b
白蛋白(g/L)	18.12±4.12	25.38±3.12 ^a	28.58±3.30 ^a	35.55±3.28 ^b
白蛋白/球蛋白	2.39±0.55	3.08±0.89 ^a	3.57±1.01 ^a	4.10±1.13 ^b

表注：与对照组比较，^a*P* < 0.05，^b*P* < 0.01。

2.3 各组大鼠肝脏组织生化指标 见表2。与对照组比较，胎肝干细胞组及白藜芦醇组大鼠肝组织中丙二醛水平均下降(*P* < 0.05)，而联合治疗组则进一步降低(*P* < 0.01)；而白藜芦醇组和胎肝干细胞组大鼠肝组织中谷胱甘肽过氧化物酶及环磷酸鸟苷水平较对照组均升高(*P* < 0.05)，联合治疗组则进一步升高(*P* < 0.01)。

表 2 各组大鼠肝脏组织生化指标 (x±s)
Table 2 Biochemical indicators of the liver tissue in each group

指标	对照组	白藜芦醇组	胎肝干细胞组	联合治疗组
丙二醛(mol/mg)	5.19±0.32	3.48±0.26 ^a	3.19±0.34 ^a	2.78±0.28 ^b
谷胱甘肽过氧化物酶(U/L)	2.76±0.28	3.49±0.25 ^a	3.18±0.33 ^a	5.18±0.46 ^b
环磷酸鸟苷(nmol/g)	2.37±0.45	3.16±0.77 ^a	3.57±0.16 ^a	4.11±1.12 ^b

表注：与对照组比较，^a*P* < 0.05，^b*P* < 0.01。

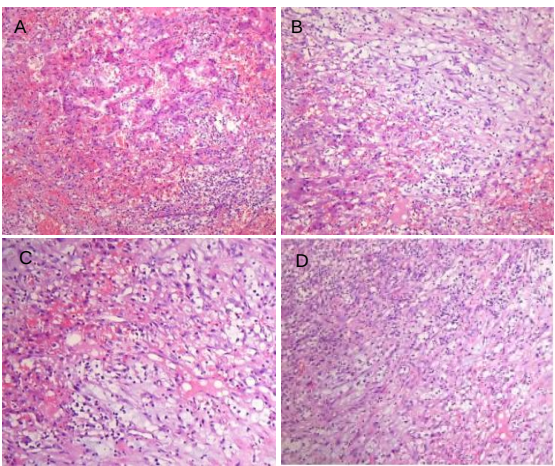
2.4 大鼠肝脏组织形态学变化 见图2。对照组大鼠肝组织中细胞变性严重，出现明显的纤维化且有炎症细胞渗出。胎肝干细胞组和白藜芦醇组大鼠肝细胞变性、坏死及纤维化程度均有明显减轻，联合治疗组进一步明显缓解。

2.5 荧光显微镜观察胎肝干细胞的存活和分布情况 见图3。白藜芦醇组和对照组大鼠肝脏细胞中未见有CM-Dil标记的阳性细胞；胎肝干细胞组和联合治疗组大鼠肝脏组织中可见较多的CM-Dil标记阳性细胞，联合治疗组大鼠肝脏组织中阳性标记细胞数量明显多于胎肝干细胞组。

2.6 各组大鼠吲哚氰绿15 min滞留率 见图4。对照组大鼠血液中的吲哚氰绿15 min滞留率较低，而白藜芦醇组和胎肝干细胞组治疗后吲哚氰绿15 min滞留率显著升高(*P* < 0.05)，联合治疗组吲哚氰绿15 min滞留率进一步升高(*P* < 0.01)。

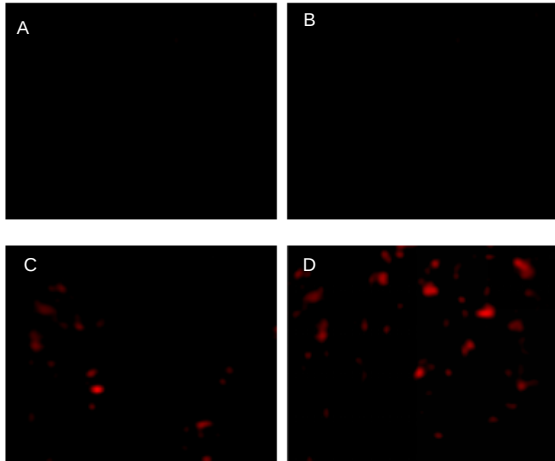
2.7 各组大鼠肝组织中转化生长因子β1 mRNA和蛋白的相对表达水平 见表3和图5。对照组大鼠肝组织中转化生长因子β1 mRNA和蛋白相对表达水平最高，白藜芦醇组及胎肝干细胞组较对照组明显降低(*P* < 0.05)，联合治疗组进

一步降低(*P* < 0.01)。



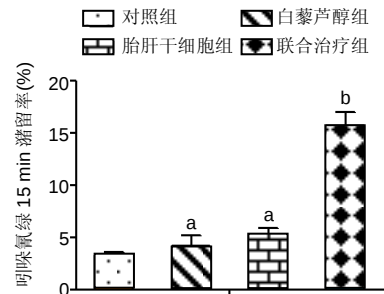
图注：图中 A 为对照组，肝组织中细胞变性严重，出现明显的纤维化且有炎症细胞渗出；B，C 为白藜芦醇组和胎肝干细胞组，肝细胞变性、坏死及纤维化程度均有明显减轻；D 为联合治疗组，上述病理变化进一步减轻。

图 2 各组大鼠肝组织苏木精-伊红染色结果(x40)
Figure 2 Hematoxylin-eosin staining of the rat liver tissue (x40)



图注：图中 A，B 为对照组、白藜芦醇组，均未见阳性细胞；C 为胎肝干细胞组，可见 CM-Dil 标记的胎肝干细胞；D 为联合治疗组，可见有较多的 CM-Dil 标记的胎肝干细胞。

图 3 CM-Dil 标记的胎肝干细胞的存活及分布(x200)
Figure 3 Survival and distribution of fetal liver stem cells labeled by CM-Dil (x200)



图注：与对照组比较，^a*P* < 0.05，^b*P* < 0.01。

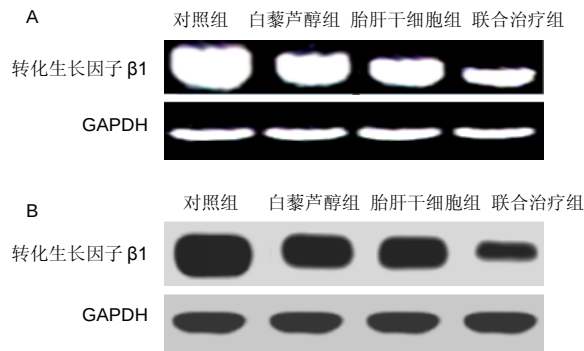
图 4 各组大鼠吲哚氰绿 15 min 滞留率
Figure 4 The 15-minute retention rate of indocyanine green in each group

表 3 各组大鼠肝脏组织中转化生长因子 $\beta 1$ mRNA 和蛋白的相对表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Relative expression levels of transforming growth factor $\beta 1$ mRNA and protein in the liver tissues of rats

组别	转化生长因子 $\beta 1$ mRNA 相对表达	转化生长因子 $\beta 1$ 蛋白 相对表达
对照组	28.01±0.73	22.01±0.81
白藜芦醇组	12.01±0.18 ^a	15.03±0.16 ^a
胎肝干细胞组	15.45±1.04 ^a	19.48±1.02 ^a
联合治疗组	7.38±2.13 ^b	9.27±2.10 ^b

表注：与对照组比较，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ 。



图注：图中 A 为 mRNA 表达水平；B 为蛋白表达水平。

图 5 各组大鼠肝脏组织中转化生长因子 $\beta 1$ 的表达水平

Figure 5 Expression levels of transforming growth factor $\beta 1$ in the liver tissues of rats

3 讨论 Discussion

肝硬化已经成为严重威胁患者生命安全的一大杀手，由于治疗手段的缺乏和限制，导致该病的治愈率较低且病情恶化率较高^[16]。白藜芦醇在肝病治疗方面具有较好的效果，其可以通过改善机体的物质代谢以及抑制炎症等途径缓解肝脏疾病的发生和进展^[17]。胎肝干细胞可以分化为成熟的肝脏细胞^[18]，此外其还可以抑制炎症反应、分泌多种细胞因子等缓解肝脏疾病的发生和发展^[19]。由于微环境以及其他因素的影响，干细胞移植后的存活率和增殖活性是制约其效果的一大重要因素。研究表明白藜芦醇干预可以显著促进胎肝干细胞的增殖活性和存活率^[20]，进而提高胎肝干细胞移植的治疗效果。该研究将白藜芦醇和胎肝干细胞移植进行联合，探讨其对肝硬化大鼠的治疗效果。

研究结果显示在胎肝干细胞移植3周之后，胎肝干细胞组和联合治疗组大鼠肝脏组织中可见较多的CM-Dil标记阳性细胞，联合治疗组大鼠肝脏组织中阳性标记细胞数量明显多于胎肝干细胞组。由此可知白藜芦醇可提高胎肝干细胞在肝脏组织中的分布和存活，进而提高其治疗效果^[21]。移植3周后胎肝干细胞组及白藜芦醇组血清丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶、总胆红素水平较对照组明显降低，白蛋白/球蛋白、白蛋白、总蛋白水平则显著升高，且联合治疗组效果显著优于单独治疗组。

肝硬化引起肝细胞的脂质分子氧化产生丙二醛，细胞中的抗氧化酶谷胱甘肽过氧化物酶活性下降从而引发氧化

应激^[22]；此外因肝硬化导致的炎症反应会引起血液循环障碍和门静脉压升高，而环磷酸鸟苷分子是血管舒张性的关键分子^[23]。实验结果表明，白藜芦醇和胎肝干细胞移植显著缓解氧化应激反应，且降低了肝脏门静脉压，缓解了肝硬化造成的组织代谢障碍。

肝脏组织苏木精-伊红染色结果显示胎肝干细胞组和白藜芦醇组大鼠肝细胞变性、坏死及纤维化程度均有明显减轻，联合治疗组减轻更明显，进一步证明了联合治疗的有效性。与模型对照组比较，胎肝干细胞组及白藜芦醇组吡咯啉绿15 min滞留率及肝纤维化程度均减轻，联合治疗组降低明显。肝硬化发生后肝脏清除异物的能力随之下降，从而导致物质滞留增多，这是肝脏功能损伤的一个重要标志^[24]。结果表明，联合治疗显著提高了肝脏的清除能力，改善了肝脏的功能。

研究显示转化生长因子 $\beta 1$ 在胚胎形成和器官发育过程发挥着极其重要的作用，其能促进肝脏纤维化并加重肝脏疾病的进程^[25-30]。研究结果显示，3个治疗组大鼠肝脏组织中的转化生长因子 $\beta 1$ mRNA和蛋白表达水平均较对照组降低，而联合治疗组显著低于单独治疗组。由此可知白藜芦醇和胎肝干细胞移植联合治疗可能通过降低转化生长因子 $\beta 1$ 的表达水平从而缓解肝脏纤维化的进程。

研究将白藜芦醇和胎肝干细胞移植相互联合，探讨了其对肝硬化大鼠的治疗效果。结果表明，二者联合治疗可以显著提高胎肝干细胞在肝脏组织的存活和分布，可以明显减轻大鼠肝硬化程度和肝脏病变，这可能与降低转化生长因子 $\beta 1$ 表达有关。

作者贡献：实验设计、资料收集、评估均为作者王宇翊。

经费支持：该文章没有接受任何经费支持。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题：实验方案经天津医科大学动物实验伦理委员会批准，批准号为 SYXK(津)2014-0002。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

生物统计学声明：文章统计学方法已经通过天津医科大学生物统计学专家审核。

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。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] 马雄.原发性胆汁性肝硬化诊治进展[J].临床肝胆病杂志, 2016, 32(4):21-22.

- [2] 田耀洲.难治性原发性胆汁性肝硬化治疗进展[C]. 重庆:中华中医药学会脾胃病分会第二十七届全国脾胃病学术交流会,2015.
- [3] 张静雯,时永全,韩英.肝硬化的治疗进展[J].临床肝胆病杂志, 2015,31(3):465-468.
- [4] O'Grady JG. Liver transplantation. *Jama*. 2015; 43(11): 686-688.
- [5] Pangen R, Sahni JK, Ali J, et al. Resveratrol: review on therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2014;11(8):1285-1298.
- [6] Faghihzadeh F, Hekmatdoost A, Adibi P. Resveratrol and liver: A systematic review. *J Res Med Sci*. 2015;20(8):797-810.
- [7] 罗德兰,杨丹,舒梅铃,等.白藜芦醇抗肝癌作用机制的研究进展[J].世界华人消化杂志,2014, 22(31):4769-4773.
- [8] Chan CC, Lee KC, Huang YH, et al. Regulation by resveratrol of the cellular factors mediating liver damage and regeneration after acute toxic liver injury. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014;29(3):603-613.
- [9] Tang Y, Gan X, Cheheltani R, et al. Targeted delivery of vascular endothelial growth factor improves stem cell therapy in a rat myocardial infarction model. *Nanomedicine*. 2014; 10(8):1711-1718.
- [10] Atashi F, Modarressi A, Pepper MS. The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. *Stem Cells Dev*. 2015; 24(10):1150-1163.
- [11] Jeong H, Yim HW, Cho YS, et al. Efficacy and safety of stem cell therapies for patients with stroke: a systematic review and single arm meta-analysis. *Int J Stem Cells*. 2014;7(2):63-69.
- [12] Bruin JE, Saber N, Braun N, et al. Treating diet-induced diabetes and obesity with human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitor cells and antidiabetic drugs. *Stem Cell Reports*. 2015;4(4):605-620.
- [13] Morigi M, De Coppi P. Cell therapy for kidney injury: different options and mechanisms--mesenchymal and amniotic fluid stem cells. *Nephron Exp Nephrol*. 2014;126(2):59.
- [14] 陆炼,于兵,胡以平.肝干细胞研究进展[J].第二军医大学学报, 2017,38(4):493-500.
- [15] Hardin H, Yu XM, Harrison AD, et al. Generation of Novel Thyroid Cancer Stem-Like Cell Clones: Effects of Resveratrol and Valproic Acid. *Am J Pathol*. 2016;186(6):1662-1673.
- [16] 韩海燕,宋文广.脂肪间充质干细胞移植后肝硬化大鼠血生化指标的变化[J].中国组织工程研究,2016,20(36):5364-5370.
- [17] Singh A, Ahmad I, Iqbal Z, et al. Resveratrol nanoparticles improve oral delivery and arrests the progression of paracetamol-induced liver cirrhosis: stability assessment, in-vitro and in-vivo studies. *National Biotechnology Conference*.2015.
- [18] Habeeb MA, Vishwakarma SK, Bardia A, et al. Hepatic stem cells: A viable approach for the treatment of liver cirrhosis. *World J Stem Cells*. 2015;7(5):859-865.
- [19] Ulrich H. Stem Cell Reviews and Reports: Induced Pluripotent Stem Cells, Embryonic Stem Cells and Development Section. *Stem Cell Rev*. 2017;13(1):3.
- [20] Zhang H, Zhai Z, Wang Y, et al. Resveratrol ameliorates ionizing irradiation-induced long-term hematopoietic stem cell injury in mice. *Free Radic Biol Med*. 2013;54:40-50.
- [21] Rimmelé P, Lofek-Czubek S, Ghaffari S. Resveratrol increases the bone marrow hematopoietic stem and progenitor cell capacity. *Am J Hematol*. 2014;89(12): E235-238.
- [22] 李静,杨雅娟,李常娟,等.牛磺酸对四氯化碳所致大鼠肝硬化门静脉高压的影响[J].中国中医药信息杂志,2016,23(9):65-69.
- [23] 陈振宙,张雪丹.熊果酸对四氯化碳所致大鼠肝纤维化及门静脉高压的影响[J].安徽医药,2017,21(4):635-639.
- [24] 吴志强,王卫东,林杰,等.吡啶菁绿清除试验在肝癌术前评估肝脏储备功能的临床应用[J].岭南现代临床外科, 2015,15(4): 389-393.
- [25] 杨博,罗庆,康权,等.TNF- α 、TGF- β 1在胆汁淤积性肝硬化中平衡调控肝脏干细胞分化[J].南方医科大学学报, 2018,38(4): 375-383.
- [26] El-Youssef M, Mu Y, Huang L, et al. Increased expression of transforming growth factor-beta1 and thrombospondin-1 in congenital hepatic fibrosis: possible role of the hepatic stellate cell. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1999;28(4):386-392.
- [27] Tang LY, Heller M, Meng Z, et al. Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Directly Activates the JAK1-STAT3 Axis to Induce Hepatic Fibrosis in Coordination with the SMAD Pathway. *J Biol Chem*. 2017;292(10):4302-4312.
- [28] Ji H, Minuk GY, Peng Z, et al. Active immunization against transforming growth factor beta1 prevents hepatic fibrosis in a rat model of liver disease. *Can J Physiol Pharmacol*. 2017; 95(6):743-749.
- [29] Wang Y, Zhao L, Jiao FZ, et al. Histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid alleviates liver fibrosis by suppressing the transforming growth factor- β 1 signal pathway. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2018;17(5):423-429.
- [30] Liu F, Zhang J, Qian J, et al. Emodin alleviates CCl4-induced liver fibrosis by suppressing epithelial-mesenchymal transition and transforming growth factor- β 1 in rats. *Mol Med Rep*. 2018;18(3):3262-3270.