

骨髓间充质干细胞(BMSCs)移植于大鼠肝硬化模型的动物实验研究

王海久 任利 汪庚申 王聪 张鹏 樊海宁

(青海大学附属医院肝胆胰外科 青海 西宁 810001)

摘要 目的 探讨骨髓间充质干细胞应用于肝硬化模型的实验疗效,为临床试验提供数据。方法 制作大鼠肝硬化模型,将肝硬化大鼠随机分为两组,实验组和对照组,每组 25 只。将骨髓间充质干细胞通过门静脉注射入实验组大鼠肝脏,术后两组大鼠仍然以 0.5mL/100g 的维持剂量腹腔注射 40%CCl₄ 植物油溶液,3 周后处死所有实验动物,取其静脉血检测 ALT、TBIL、ALB、AFP,并取大鼠肝脏做组织切片观察。结果 实验大鼠肝脏可观察到诱导分化的肝细胞。实验组大鼠死亡 3 只,对照组死亡 2 只。对照组与实验组肝功能指标 ALT、ALB、TBIL、AFP 有显著差异, $P < 0.05$,具有统计学意义,AST 差异无统计学意义, $P > 0.05$ 。结论: BMSCs 注入肝硬化大鼠模型中能明显改善肝脏的生理功能,对临床试验有很好的指导作用。

关键词 BMSCs; 大鼠肝硬化模型; 分化

中图分类号: Q95-3, R657.3 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)01-46-03

The Experimental Study of BMSCs Transplanted Into Rat Models of Liver Cirrhosis

WANG Hai-jiu, REN Li, WANG Geng-shen, WANG Cong, ZHANG Peng, FAN Hai-ning

(The second Hepatopancreatobiliary Surgery Department, affiliated hospital to Qinghai University, Qinghai Xining 810001)

ABSREACT Objective: To evaluate the clinical effects of bone marrow mesenchymal stem cells used in liver cirrhosis rats and collect data for the clinical trials. **Methods:** Liver cirrhosis rat models were prepared and then divided randomly into two groups, experimental group and control group, 25 in each group. The BMSCs were transplanted into rats' liver of experimental group. After surgery, all the rats were still intraperitoneally injected with 40% CCl₄ solution in a dose of 0.5mL/100g. After three weeks, animals were sacrificed. Venous blood was collected to test the indexes such as ALT, TBIL, ALB and AFP, and rats' liver were for pathological observation. **Results:** Differentiated liver cells could be observed in experimental group. Three rats died in experimental group and two in control group. There were significant differences in ALT, ALB, TBIL and AFP between two groups, $P < 0.05$. However, the AST of two groups hasn't significant difference. **Conclusion:** BMSCs injected into rat models of liver cirrhosis can greatly improve liver function and also give a guide to clinical trials.

Key words: BMSCs; Rat models of liver cirrhosis; Differentiation

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R657.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)01-46-03

前言

肝脏移植是肝病终末期最理想最有效的治疗方法,但是,由于供体紧张以及肝脏移植后出现的免疫排斥反应、高昂的移植费等等使得众多的患者得不到满意有效的治疗,因而需要一种更为安全、有效、经济的治疗方法。干细胞移植是目前治疗肝功能衰竭的一个新的研究方向。骨髓间充质干细胞不断的进行自我更新,同时具有多系横向分化的潜能,在一定条件下经体内外生长因子诱导可定向分化为肝样细胞,骨髓间充质干细胞易于分离、培养,而且易于外源基因的导入和表达,遗传背景稳定,培养过程中长期保持多细分化的潜能,是有效进行肝移植治疗肝硬化的新型种子细胞^[1]。本实验使用大鼠肝硬化模型植入骨髓间充质干细胞,探讨 BMSCs 治疗肝硬化的疗效,为临床治疗研究提供依据。

1 材料与方法

作者简介:王海久(1970-),男,硕士,副教授,从事肝胆胰肿瘤基础研究, E-mail: wanghaijiuqy@126.com; Tel: 13086269918
(收稿日期: 2011-04-15 接受日期: 2011-05-10)

1.1 材料

主要试剂:胎牛血清(杭州四季清),80 只健康 Wistar 大鼠,体重 240~290g(***,医学实验动物中心),CCl₄(成都化工厂),胰蛋白酶(宝泰克),L-DMEM(Gibco),乙醇溶液(分析纯),流式细胞仪(USA)。

大鼠肝硬化模型:80 只大鼠诱导前以每升蒸馏水中含 0.35 g 苯巴比妥钠的溶液作为惟一饮用水 2 周。食用普通大鼠饲料。按 0.5mL/100g 剂量予以腹腔注射 40%CCl₄ 中性植物油溶液,每周 2 次,持续 4 周,同时以 10%乙醇溶液为其惟一饮用水。第 5 周开始改为用 50% CCl₄ 中性植物油溶液,以 0.5mL/100g 标准腹腔注射,每周 2 次,持续 4 周,同时改为以 30%乙醇溶液为其惟一饮用水至实验结束。制备肝硬化大鼠模型时间共计 9 周^[2,3]。9 周后随机选取 10 只大鼠,取肝脏组织做病理学检查,检验大鼠肝硬化模型情况。

1.2 方法

1.2.1 骨髓间充质干细胞培养:取成年大鼠,处死,75%乙醇浸泡 15min,无菌条件下取大鼠双侧股骨和胫骨,剔除表面的软组织,用 L-DMEM 反复冲洗骨髓腔,收集细胞悬液至离心管,

加入适量 PBS 缓冲液混匀 ,离心 10 min ,弃去上清液。重悬细胞沉淀 ,加入含 10%胎牛血清的 L-DMEM 培养基中,调整细胞密度 ,置于 37℃、饱和湿度的 CO₂ 孵箱内培养 ,3d 首次换液 ,以后每 2~3 d 换液 1 次 ,8~10 d 左右细胞达 80%融合 ,用 0.25%胰蛋白酶消化 1~2 min ,加入含血清培养基终止消化 ,制成细胞悬液 ,1:3 接种传代 ,传代至第三代注入大鼠动物模型。

1.2.2 骨髓间充质干细胞鉴定 取 P3 代 BMSCs ,近 80%融合 ,加 0.25%胰蛋白酶消化 ,制成细胞悬液 ,PBS 缓冲液冲洗 3 次 ,乙醇固定 30 分钟。蒸馏水冲洗后再用 PBS 缓冲液洗 3 次 ,制成浓度为 1× 10⁶/mL 溶液。滴入 CD29、CD44、CD80、CD166 单克隆抗体 ,静置 30 分钟 ,PBS 洗 3 次然后滴入 FITC 荧光标记 ,应用流式细胞仪检测细胞表面抗原 CD29、CD44、CD80、CD166 的表达。

1.2.3 BMSCs 移植 随机选取取造模大鼠 50 只 ,并随机分为对照组和实验组 ,各 25 只。术前青霉素 40 万 μ/kg 肌肉注射 ,实验组大鼠乙醚麻醉 ,腹部消毒 ,腹部正中切开皮肤组织 ,暴露门静脉主干 ,经门静脉注射 BMSCs 悬液 1ml ,缝合皮肤。各组大鼠仍然以 0.5mL/100g 的维持剂量腹腔注射 40% CCl₄ 植物油溶液 ,予以正常饮食喂养。3 周后处死所有实验动物 ,取其静脉血检测 ALT、TBIL、ALB、AFP。取大鼠肝脏 ,福尔马林固定 ,清水冲洗 2h ,常规浓度梯度酒精脱水 ,二甲苯透明 ,石蜡包埋肝脏组织 ,连续切片 ,镜下观察。

1.3 统计分析

所有资料均由同一位研究人员收集整理 ,均以均数± 标准差 (x± s) 的形式表示。使用 SPSS10.0 软件分析。检验水准 :P<0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况及肝脏组织观察

BMSCs 移植后实验组大鼠精神萎靡 ,进食较少 ,1~2 天后恢复饮水 ,进食。实验组三只大鼠死亡 ,对照组大鼠两只死亡。立即将死亡大鼠解剖 ,见肝脏色泽暗黄 ,肿大。取血检测 ALT 均大于 2300 U/L ,推测死亡原因为肝衰竭。

肝硬化模型 :肉眼观 ,模型建立成功 ,大鼠肝脏缩小 ,质地较硬 ,棕褐色 ,表面有小结节 ,腹腔内少量腹水。镜下 ,肝小叶结构消失 ,可见假小叶取代正常结构 ,假小叶内纤维分隔 ,肝细胞坏死 ,脂肪浸润 ,结缔组织增生。

诱导分化情况 :注入 BMSCs3 周后 ,可见实验组大鼠肝脏内骨髓间充质干细胞诱导分化细胞 ,肝脏损害减轻 ,可见有细胞团生长 ,细胞排列整齐就够清晰 ,胞质内无空泡 ,不同于增生的肝细胞。

2.2 BMSCs 的观察与鉴定

BMSCs 的培养观察 :刚分离的 BMSCs 观察有大量红细胞 ,换液后 ,可见贴壁细胞形态呈三角形、梭形 ,大小不一 ,交接在一起呈网状。3 天后三角形和梭形细胞集落式生长增殖 ,10 天基本融合。融合 80%时开始传代 ,传代后 BMSCs 有长突起 ,细胞长梭形 ,核椭圆。

流式细胞仪结果显示 :90%细胞表达 CD29、84%表达 CD166、CD44 呈强阳性表达 96%。CD34 阴性表达。证明得到纯度较高的 BMSCs。

2.3 肝功能、AFP 指标

表 1 移植 3 周肝功能、AFP 指标
Table 1 Liver function, AFP index after transplanted for 3 weeks

	实验组 Experimental group	对照组 Control group	P
ALT	105.23± 3.56	327.25± 6.68	<0.05*
ALB	35.47± 24.83	22.36± 1.78	<0.05*
TBIL	6.46± 0.52	18.53± 1.44	<0.05*
AST	146.32± 35.74	139.16± 26.41	>0.05
AFP	3.97± 1.26	2.83± 0.87	<0.05*

* 为有显著差异(* for significant differences)
注 3 周后 ,实验组大鼠丙氨酸转氨酶(ALT)、总胆红素(TBIL)明显低于对照组 ,白蛋白(ALB)、甲胎蛋白(AFP)明显高于对照组。P<0.05,差距有统计学意义。谷草转氨酶(AST)稍高于对照组 ,P>0.05 差距无显著意义
Note: Three weeks later ,experimental rats alanine shift enzyme (ALT), total bilirubin (TBIL) obviously lower than the control group, albumin (ALB), a fetal protein (AFP) obviously higher than those in the control group. P < 0.05), and the gap is of a statistical significance. Aspartate aminotransferase (AST) slightly higher than those in the control group, P > 0.05 gap is of no significance

3 讨论

通常情况下 ,肝病患者受损的肝脏组织主要是通过残留的肝细胞来修复再生 ,肝脏受损严重时抑或剩余的肝脏增生功能收到抑制时 ,体内的特定微环境能诱导干细胞启动来修复肝脏的功能。干细胞移植是治疗肝功能衰竭的一个新的研究方向 ,它有广泛的干细胞来源 ,常见的有外周血干细胞^[4]、胚胎干细胞^[5]、

骨髓间充质干细胞^[6]。目前为止研究表明这些细胞均可在特定环境下诱导为肝样细胞 ,移植入体内能行使正常肝细胞的功能。骨髓干细胞分为两种 :间充质干细胞和造血干细胞。特定微环境下这两种细胞均可向肝细胞转化 ,具有强大的增值扩增能力 ,取材方便、便于移植 ,排异反应少。Schwartz 等^[7]通过诱导大鼠骨髓原始多潜能成体祖细胞 (multi-potent adult progenitor cells, MAPCs)分化为肝细胞实验 ,证实肝干细胞可以由骨髓分

化而来。2005 年 Sato^[8]等研究表明,BMSCs 是肝脏病变干细胞移植方面是最理想的种子细胞,对肝脏疾病的治疗有广阔的前景。骨髓干细胞移植治疗肝硬化是目前国际前沿治疗肝病新技术。它的应用临床标志着肝病治疗进入新时代,它可以阻滞肝硬化的进程,消除肝病患者生命之垂危。

BMSCs 作为种子细胞治疗肝脏疾病的移植途径有肝脏注射法、脾脏注射法、门静脉注射法、外周静脉注射法^[9]。本实验选择门静脉注射,发现 BMSCs 有效到达肝脏发挥功能,有研究指出 BMSCs 经门静脉具有选择性分布作用,具体机制还有待研究。BMSCs 移植治疗肝硬化具有很多优势 (1)BMSCs 取自骨髓,可自身取材,无伦理异议 (2)BMSCs 体外分离培养方便,并可通过扩增获取大量移植所需细胞,体外培养后具有稳定性及可遗传性 (3)BMSCs 免疫原性低,能够有效减少移植后引起的免疫反应。

本实验中注入术后 3 周,组织病理检查可见新生干细胞及肝小叶。肝功能检查实验组大鼠丙氨酸转氨酶 (ALT)、总胆红素 (TBIL)明显低于对照组,白蛋白 (ALB)、甲胎蛋白 (AFP)明显高于对照组。P<0.05,差距有统计学意义。表明 BMSCs 对受损肝脏组织有修复作用。谷草转氨酶 (AST) 稍高于对照组, P>0.05 差距无显著意义。甲胎蛋白是一种胞浆蛋白,由新生的幼稚肝细胞分泌,在肝细胞成熟后不分泌甲胎蛋白。这表明实验组中大鼠肝脏正处于新生状态, BMSCs 能分化为前体肝细胞,并成熟为正常肝细胞,从血清检测能得到很好的反映。

BMSCs 移植后取得良好的效果我们推测可能的修复机制是 (1)BMSCs 在大鼠肝脏中分化成正常的肝脏细胞,补充大鼠肝细胞数量,行使正常肝的功能。(2)BMSCs 注入后可分泌多种生长因子如 HGF、TGF- β 、ILs。HGF 诱导 BMSCs 分化为肝细胞,同时抑制 TGF- β 1 的产生,阻止纤维化^[10]。(3)降解肝内过量的 ECM,降低肝硬化进程。Sakaida 等^[11]实验证明 BMSCs 高表达 MMPs 可以降解胶原纤维,逆转肝脏组织纤维化,提高生存率。(4)BMSCs 可与大鼠体内肝细胞发生融合,促进细胞增殖分裂增强肝脏功能^[12]。(5)激活肝硬化模型中受损的细胞。Yannaki 等^[13]发现 BMSCs 能激发高效的肝细胞内源性增生,有效增加肝细胞的数量。BMSCs 应用于大鼠肝硬化模型方面具有积极疗效,在安全应用于临床还需要进一步研究,在肝脏组织再生方面有广泛前景。

参考文献 (References)

- [1] Vannanen HK. Mesenchymal stem cells [J]. Ann Med, 2005, 37 (7): 469-479
- [2] 叶春华, 刘浔阳. 四氯化碳综合法制备大鼠肝硬化模型 [J]. J Clin Res, 2005, 22(5): 619-622
- Ye Chun-hua, Liu Xun-yang. Study on Method of Inducing Hepatic

Cirrhosis Model in Rats by Carbon Tetrachloride[J]. Journal of Clinical Research, 2005, 22(5): 619-622

- [3] 金峰, 张捷, 张志坚等. 四氯化碳诱导肝硬化模型方法的改进[J]. 福州总医院学报, 2001, 9(8): 160-161
- Jin Feng, Zhang Jie, Zhang Zhijian, et al. Improvement of method of inducing cirrhotic model by carbon tetrachloride [J]. Journal of Fuzhou General Hospital, 2001, 9(8): 160-161
- [4] Huiling X, Inagaki M, Arikura J, et al. Hepatocytes derived from peripheral blood cells of granulocyte-colony stimulating factor treated F344 rats in an ALB uminemic rat livers[J]. J Surg Res, 2004, 122(1): 75-82
- [5] Allain JE, Dagher I, Mahieu-Daputo D, et al. Weber a. Immortalization of a primate bipotent epithelial liver stem cell[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(6): 3639-3644
- [6] Dahlke MH, Popp FC, Bahlmann FH, et al. Liver regeneration in a retrorsine/CCl4-induced acute liver failure model: do bone marrow derived cells contribute?[J]. Hepatol, 2003, 39(3): 365-373
- [7] Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, et al. Multi-potent adult progenitor cells from bone marrow differentiated into functional hepatocyte-like cells[J]. J Clin Invest, 2002, 109(10): 1291
- [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[J]. Blood, 2005, 106(2): 756-763
- [9] 王满仓, 商中华, 张孝良, 贾辰乐. 不同途径移植大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)对大鼠肝硬化的治疗作用[J]. China Modern Doctor, 2010, 48(2): 2-8
- Wang Mancang, Shang Zhonghua, Zhang Xiaoliang, Jia Chenle. Different ways of bone marrow transplant rats ask BMSCs) senchymal stem cells (to the therapeutic effect of rat liver cirrhosis [J]. China Modern Doctor, 2010, 48(2): 2-8
- [10] Oe H, Kaido T, Mori A, Onodera H, Imamura M. Hepatocyte growth factor as well as vascular endothelial growth factor gene induction effectively promotes liver regeneration after hepatectomy in Solt-Farber rats[J]. Hepatogastroenterology, 2005, 52: 1393-1397
- [11] Sakaida I, Terai S, Nishina H, Okita K. Development of cell therapy using autologous bone marrow cell infusion therapy [J]. Stem cells, 2006, 24: 2292-2298
- [12] Terada N, Hamazaki T, Oka M, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by cell fusion [J]. Nature, 2002, 416 (6880): 542-545
- [13] Yannaki E, Athanasiou E, Xagorari A, et al. G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF perse accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs[J]. Exp Hematol, 2005, 33(1): 108-109