

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.08.012

茵陈四苓颗粒对肝衰竭环境下骨髓间充质干细胞分化及 IDO 蛋白表达的影响 *

彭 琴¹ 赵 丹² 马浩轩¹ 徐山凌¹ 黄子娟¹ 刘 鹏^{1Δ}

(1 西南医科大学附属中医医院肝胆病科 四川 泸州 646000 ; 2 宜宾市第二中医医院内科 四川 宜宾 644000)

摘要 目的:研究肝衰竭体外模型环境下茵陈四苓颗粒对骨髓间充质干细胞的肝向分化及 IDO 蛋白表达的影响。**方法:**通过建立肝衰竭血清、中药干预血清、健康血清分别与骨髓间充质干细胞(BMSCs)共培养体系,检测 BMSCs 中 CK18 免疫荧光表达,Western-blot 法检测甲胎蛋白(AFP)、肝组织白蛋白(ALB)、吲哚胺 2,3-双加氧酶(IDO)蛋白表达。**结果:**1、CK18 免疫荧光结果显示肝衰竭组及中药干预组染色均为弱阳性,但后者染色更强,而健康组无阳性染色;2、AFP、ALB 在健康组、肝衰竭组、中药干预组均有表达,且各组间 ALB 比较均有差异($P<0.05$),三组 AFP 表达水平逐渐增高,各组间差异有统计学意义。IDO 蛋白在健康组无表达,肝衰竭组表达低于中药干预组,且两组间差异具有统计学意义。**结论:**茵陈四苓颗粒能增强 BMSCs 在肝衰竭环境下的肝向分化趋势及免疫调节活性。

关键词:茵陈四苓颗粒;骨髓间充质干细胞;肝衰竭;免疫调节;肝向分化

中图分类号:R575.3; R331.2; R285.5 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2019)08-1455-04

Effect of Yinchen Siling Granule on Differentiation and Expression of IDO Protein of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Hepatic Failure *

PENG Qin¹, ZHAO Dan^{1,2}, MA Hao-xuan¹, XU Shan-ling¹, HUANG Zi-juan¹, LIU Peng^{1Δ}

(1 Department of Hepatobiliary, Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, 646000, China; 2 Department of Internal Medicine, Yibin second Hospital of traditional Chinese Medicine, Yibin, Sichuan, 644000, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect of Yinchen Siling Granule on liver differentiation and IDO protein expression of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) in vitro model of hepatic failure. **Methods:** The co-culture system of hepatic failure serum, traditional Chinese medicine(TCM) serum and healthy serum with bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) was established. The expression of CK18 in BMSCs was detected by immunofluorescence, and the expression of alpha-fetoprotein (AFP), hepatic albumin (ALB) and indoleamine 2-, 3-dioxygenase (IDO) protein were detected by Western-blot. **Results:** 1. The results of CK18 immunofluorescence showed that the staining of hepatic failure group and TCM group were weakly positive, and the latter staining was deeper. The healthy group had no positive staining; 2. The expressions of AFP, ALB were found in the healthy group, hepatic failure group and TCM group. There was significant difference in ALB expression among the three groups ($P<0.05$). The expression level of AFP in the three groups increased gradually, and there was significant difference among the three groups. There was no expression of IDO protein in the healthy group, but the expression in the hepatic failure group was lower than that in the TCM intervention group, and the difference between the two groups was statistically significant. **Conclusion:** Yinchen Siling Granule can enhance the liver differentiation trend and immunomodulatory activity of BMSCs in hepatic failure.

Key words: Yinchen Siling Granules; Bone marrow mesenchymal stem cells; Hepatic failure; Immune regulation; Liver differentiation

Chinese Library Classification(CLC): R575.3; R331.2; R285.5 Document code: A

Article ID:1673-6273(2019)08-1455-04

前言

肝衰竭(hepatic failure, HF)是一种严重的肝脏疾病,目前缺乏有效治疗方案。肝移植被认为是至今为止最有效的方法,但是由于供体肝脏来源短缺及排异反应等问题无法普及^[1,2]。国内外大量研究表明骨髓间充质干细胞(Bone Marrow Mesenchymal

Stem cells, BMSCs)具有分化及免疫调节等潜能,其作为肝病再生医学的细胞治疗平台,近年来逐渐成为细胞移植治疗肝衰竭的研究热点^[3,4]。但干细胞移植在治疗肝脏疾病中存在分化因素难以控制,缺乏增强其免疫调节能力的方法,故需有效手段改善其进入体内后分化及免疫调节能力。诸多研究表明,单味或多味中药提取物可影响干细胞的分化、免疫调节功能^[5-8]。肝

* 基金项目:四川省应用基础研究计划项目(14JC0079);泸州市科技计划项目(2013LZLY-J27)

作者简介:彭琴(1990-),硕士研究生,主要研究方向:中西医结合肝胆疾病的防治,E-mail: 649279097@qq.com,电话:18281152270

Δ 通讯作者:刘鹏(1966-),硕士生导师,教授,主要研究方向:中西医结合肝胆疾病的防治,E-mail: 531858298@qq.com,电话:18909080658

(收稿日期:2018-10-25 接受日期:2018-11-20)

衰竭的中医病机多为热毒蕴结,瘀血阻滞,故以清热解毒、凉血化瘀为治疗大法,本实验以四川省名老中医孙同郊经验方茵陈四苓颗粒为代表方,由我院院内自制。本课题组前期临床及动物实验中已证实,茵陈四苓颗粒具有改善肝脏功能、减轻炎症反应及降低血浆内毒素水平,并影响蛋白质的表达的作用^[9-11]。本研究通过建立肝衰竭体外环境下不同血清与 BMSCs 共培养体系,检测各组血清干预后 BMSCs 的 CK18、AFP、ALB、IDO 表达,初步探索茵陈四苓颗粒与骨髓间充质干细胞的协同作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康雄性清洁级 SD 大鼠 4 只(3-4 周龄,100-120 g),用于干细胞提取;健康雄性 SD 大鼠 30 只(6-8 周龄,180-200 g),用于肝衰竭造模。(均由西南医科大学动物实验中心提供,动物生产许可证号(川):SCXY(川)2008-17,使用许可证:SCXY(川)2008-065)。

1.1.2 药物与主要试剂 茵陈四苓颗粒(由茵陈、栀子、大黄、赤芍、茯苓等组成,川药制字 Z20070525)由西南医科大学附属中医医院中药制剂室制备。L-DMEM、胎牛血清(美国 Gemini 公司);CK18 抗体(Exbio 公司);吡哆胺 2,3- 双加氧酶(IDO)抗体(abcam 公司)、白蛋白(ALB)抗体(abcam 公司);甲胎蛋白(AFP)抗体(bioworld 公司);D-氨基半乳糖(sigma 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠 BMSC 分离、培养及传代筛选 提取大鼠股骨与胫骨骨髓间充质干细胞,采用全骨髓贴壁培养法,保持细胞数量约为 1×10^6 个/mL 后体外培养,间隔 2 天更换培养基,去除杂细胞,于细胞生长至皿底面积 80 %-90 %时予以胰蛋白酶消化传代,传至第三代后经流式细胞仪鉴定后用于后续实验。

1.2.2 实验血清的制备 30 只大鼠随机选取 7 只分为健康组,剩余 23 只用于造模,模型组 23 只大鼠均予以 1.3 g/kg 剂量 D-氨基半乳糖一次性腹腔注射制造肝衰竭大鼠模型,健康组予以等剂量生理盐水干预。造模后 48 小时再将剩余存活造模大鼠随机平均分为中药干预组和肝衰竭组。中药干预组给

予茵陈四苓颗粒 1.5 g/kg 灌胃,1 日 2 次,药物剂量参考魏伟主编《药理实验方法学》^[12]及李万平等前期研究中方法剂量,根据人和动物体表面积折算等效剂量比值计算^[13]。另两组予以等剂量生理盐水灌胃。灌胃 3 天后,处死大鼠,收集血清,过滤除菌制备成中药干预血清、肝衰竭血清、健康血清,置于 -20℃ 冰箱保存备用。

1.2.3 建立肝衰竭体外环境下 BMSC 培养体系 将第 3 代 BMSCs 分别接种于 24 孔板中(细胞浓度 1×10^3 /孔)及 6 孔板中(细胞浓度 1×10^5 /孔)。分别各设立 3 个实验组,每组各设立 3 个复孔,依次加入含相同剂量的健康血清、肝衰竭血清、中药干预血清的培养基进行培养。

1.2.4 免疫荧光法检测 CK18 表达 细胞在 24 孔板内生长 10 天后,终止培养。予以 4 %多聚甲醛固定后 2.5 %TritonX-100 通透,封闭轻摇 1h 后加入 CK18 抗体,4℃ 过夜后洗涤,加入二抗,室温孵育 1h 后 DAPI 复染核,避光 5min,封片后避光保存,制成免疫荧光爬片,最后在免疫荧光显微镜下进行拍照分析。

1.2.5 Western blot 法检测 BMSC 中 ALB、AFP、IDO 蛋白表达 待细胞终止培养后,按说明书步骤裂解蛋白,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,上样分离蛋白,转膜后封闭 1h,加入抗体孵育,4℃ 过夜,洗膜后加入二抗孵育,洗后显色,在凝胶成像系统上进行信号检测,再进行灰度值分析。

1.3 统计分析

运用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析处理,数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析及 LSD 检验,方差不齐用 Dunnett's 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 的培养

BMSCs 原代培养 48 小时全量换液并观察,大部分已贴壁,4 天后可见细胞形态不一,大多数呈长梭形与类圆形混合生长,如图 1-A。传至第 3 代时,细胞呈长梭形漩涡状聚生长,如图 1-B。

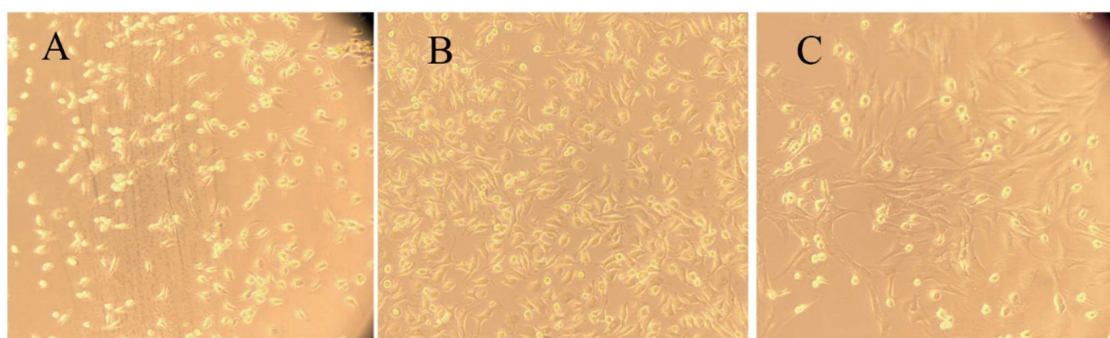


图 1 BMSCs 生长状态

Fig.1 The growth state of BMSCs

注:A:P1 代细胞生长第 4 天;B:P1 代细胞生长第 7 天;C:P3 代细胞

Note: A: P1 generation cell growth day 4; B: P1 generation cell growth day 7; C: P3 generation cells

2.2 CK18 免疫荧光检测结果

肝衰竭组及中药干预组染色均为弱阳性,但中药干预组染色强于肝衰竭组,而健康组无阳性染色,如图 2。

2.3 各组 BMSCs 中 ALB、AFP、IDO 蛋白的表达

ALB 蛋白表达结果显示:健康组、肝衰竭组、中药干预组均有表达,但各组表达量均较低,组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

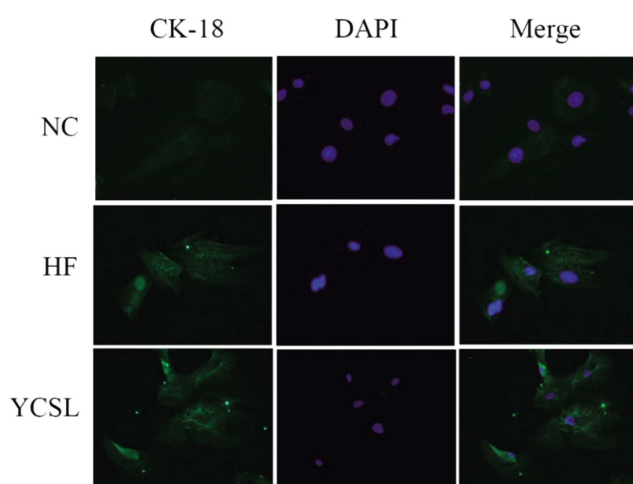


图2 各组 CK18 免疫荧光染色结果

Fig.2 Immunofluorescence staining results of CK18 in each group

Note: NC: Health group; HF: Hepatic failure group;

YCSL: Traditional Chinese medicine intervention group.

AFP 蛋白表达结果显示:健康组、肝衰竭组、中药干预组表达强度依次增强,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

IDO 蛋白表达结果显示:健康组 IDO 蛋白无表达,中药干预组 IDO 表达强于肝衰竭组($P<0.05$),如图3、表1。

3 讨论

肝衰竭是由于多种原因导致肝细胞大量凋亡坏死、炎症介质及免疫系统共同参与的失控性炎症反应,进而出现一系列临床表现的危重症^[14]。肝衰竭发病机制目前尚未完善,许多研究表明其主要机制为直接损伤以及免疫介导的损伤^[15],直接损伤是各种致病因素直接导致大量肝细胞凋亡坏死,而免疫介导的损伤是指机体免疫系统活化,促进 T 细胞等免疫细胞增殖,进而导致大量细胞因子释放,引起间接性损伤,免疫细胞的增殖活化为免疫损伤的关键环节,故肝衰竭治疗可从促进肝细胞再生及免疫调节方面寻找有效方法。目前肝衰竭西医综合治疗方案疗效差,肝移植为根治的唯一办法,但由于肝源供体缺乏、术后免疫排斥反应等限制其在临床上普及^[1,2]。国内外大量研究表明多能干细胞尤其是骨髓间充质干细胞具有多向分化潜能、免疫调节、易于体外培养等优点,故其成为再生医学、细胞修复等领域的研究热点^[16-19]。目前肝衰竭缺乏有效治疗手段,因 BMSCs 具有上述优点,已有诸多研究者将其应用于肝衰竭的研究^[20-23]。

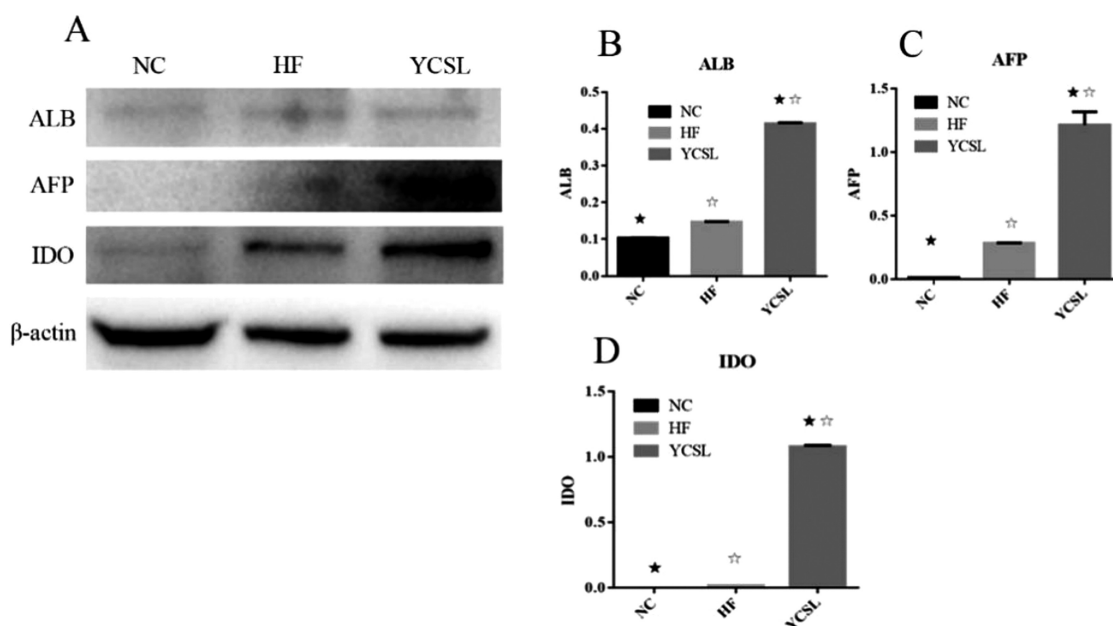


图3 BMSCs 培养 10 天后, Western blot 法检测各组 BMSCs 关于 ALB、AFP、IDO 的表达

Fig.3 After 10 days of BMSCs culture, expressions of ALB, AFP and IDO of BMSCs were detected by Western blot

Note: NC: Health group; HF: Hepatic failure group; YCSL: Traditional Chinese medicine intervention group.

表1 培养 10 天后 BMSCs 中 ALB、AFP 和 IDO 蛋白表达水平($\bar{x}\pm s$)

Table 1 The expression levels of ALB, AFP and IDO in BMSCs after 10 days of culture

Group	n	Variable		
		ALB	AFP	IDO
NC	3	0.1028± 0.0015*	0.0128± 0.0002*	0.0000± 0.0000*
HF	3	0.1469± 0.0013*	0.2837± 0.0029*	0.0194± 0.0003*
YCSL	3	0.4139± 0.0030* *	1.2142± 0.1049* *	1.0780± 0.0120* *

Note: * Compare to the healthy group, $P<0.05$; * Compare to the liver failure group, $P<0.05$. β -actin is the internal reference protein.

肝衰竭在中医领域可对应“黄疸”、“鼓胀”范畴,病机特点为湿热疫毒致热瘀内搏^[24],以“湿”、“热”、“瘀”、“毒”为病理产物,多属实证,故以清热解毒、凉血化瘀为治疗大法。本课题组以茵陈四苓颗粒为代表方,是根据四川省名中医孙同郊教授的经验方拟定,属我院自主开发的院内制剂,主要由茵陈、栀子、大黄、茯苓、赤芍、泽泻等药物组成,方中重用茵陈为君药,取其清热利湿退黄之功,栀子清热解毒,大黄、赤芍凉血化瘀共为臣药,佐以茯苓、泽泻健脾除湿。主要应用于急性、亚急性肝衰竭、慢性活动性肝炎以及肝硬化并发内毒素血症等临床疾病,效果良好。在前期治疗重型肝炎的临床试验中,发现茵陈四苓颗粒具有改善肝功能、血浆内毒素水平的作用。本课题组以中药联合干细胞治疗急性肝衰竭大鼠做了实验性研究,初步表明中药联合干细胞可有效改善急性肝衰竭大鼠肝脏炎症、促进肝再生^[25]。

本实验采用体外干细胞培养技术结合中药血清药理学方法,研究中药含药血清对干细胞的分化及 IDO 表达的影响。AFP、ALB、CK18 是肝细胞的特异性标志,AFP 由肝前体细胞分泌,是不成熟肝细胞的标志,ALB 由肝细胞分泌,是肝细胞成熟标记物,CK18 是肝细胞相对特异性的一种角蛋白,在幼稚的肝前体细胞不表达,当肝细胞趋于成熟或已成熟时表达,故肝细胞在发育早期表达高 AFP,在肝细胞发育中晚期表达高 CK18 及 ALB。本实验采用健康血清、肝衰竭血清、中药干预血清培养 BMSCs,结果提示健康组血清培养 BMSCs 中 ALB 及 AFP 均有表达,但表达量弱,结果证实 BMSCs 自身确实具有肝向分化能力,但其能力较弱,需要寻找有效手段增强这一作用。而在肝衰竭组 ALB、AFP 蛋白相比健康组表达量增加($P<0.05$),同样 CK18 在肝衰竭组免疫荧光染色表达为阳性(健康组为阴性染色),中药干预组 ALB、AFP 蛋白表达相比肝衰竭组更明显($P<0.05$),且 CK18 荧光染色更强。表明在肝衰竭环境下 BMSCs 的肝向分化能力提高,茵陈四苓颗粒可增强这一作用,但其具体作用机制不明确。

吲哚胺 2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase,IDO)是色氨酸-犬尿氨酸途径的限速酶。现代研究表明,IDO 不仅可以介导色氨酸代谢,还具有免疫调控作用。IDO 在正常情况下,呈低水平表达或不表达,当机体处于炎症或感染时,产生 INF- γ 、INF- α 等细胞因子,激活 IDO 表达,从而抑制 T 细胞的增殖,促进其凋亡,减轻过激的炎症反应,参与细胞免疫调节^[26,27]。有研究证明 IDO 是间充质干细胞发挥免疫调节作用的重要机制之一,MSCs 通过 IDO 介导的色氨酸降解抑制异体 T 细胞反应,抑制 T 细胞应答促进免疫耐受,由于 IDO 介导的 T 细胞抑制依赖于 MSCs 的激活,调控 IDO 活性可能会改变 MSCs 在不同治疗应用中的免疫抑制特性^[28]。提高 IDO 表达水平可以增强 BMSCs 对 T 淋巴细胞增殖的抑制作用,增强其在体内免疫调节作用^[29,30]。本实验结果提示健康组 IDO 蛋白无表达,中药干预组 IDO 表达强于肝衰竭组,说明在正常情况下 IDO 不表达或低表达,在肝衰竭环境下可增加 IDO 的表达,促进 BMSCs 的免疫调节活性,增加 IDO 的表达,茵陈四苓颗粒干预的肝衰竭环境中干细胞免疫活性明显增强,其主要机理有两种可能:(1)茵陈四苓颗粒调节肝衰竭内环境,使体内炎症及感染因子表达的改变,刺激 BMSCs,提高 IDO 表达,间接促进

BMSCs 免疫调节作用。(2)茵陈四苓颗粒经机体代谢产生某种中产物,直接作用于干细胞,刺激 IDO 的表达,调节干细胞的免疫活性。肝脏是代谢色氨酸的主要器官,当肝衰竭发生时,肝功能急剧下降,使得色氨酸的代谢异常,而肝性脑病与色氨酸的堆积及代谢异常有密切关系,IDO 是色氨酸的限速酶,茵陈四苓颗粒可以促进 BMSCs 高表达 IDO,促进色氨酸的代谢。故茵陈四苓颗粒联合 BMSCs 可为治疗肝衰竭提供有效的辅助方法,也能成为肝衰竭治疗的思路。

本实验从蛋白表达层面初步探讨茵陈四苓颗粒对干细胞在肝衰竭环境中的影响,进一步研究需深入到分子及基因水平进行多通路分析。本实验不足之处,采取含药血清方式培养 BMSCs,与真正的肝衰竭环境有一定的差距,如能建立干细胞+淋巴细胞+干细胞+肝衰竭血清共培养体系,则能形成与肝衰竭机体更相符合的环境,通过共培养体系对各细胞间的联系进行研究分析,更有利于对相关机制的研究。同时,需进一步完善茵陈四苓颗粒在实践应用中的辩证体系及选方用药。

参考文献(References)

- [1] Londono MC, Rimola A, O'Grady J, et al. Immunosuppression minimization vs. complete drug withdrawal in liver transplantation[J]. J Hepatol, 2013, 59: 872-879
- [2] Volarevic V, Nurkovic J, Arsenijevic N, et al. Concise Review: Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Acute Liver Failure and Cirrhosis [J]. Stem Cells, 2015, 32(11): 2818-2823
- [3] Wang Y H, Wu D B, Chen B, et al. Progress in mesenchymal stem cell based therapy for acute liver failure [J]. Stem Cell Research & Therapy, 2018, 9(1): 227
- [4] Shiota Goshi, Itaba Noriko, Progress in stem cell-based therapy for liver disease[J]. Hepatol. Res., 2017, 47: 127-141
- [5] 陈艳,邹文静,王盛丰,等.姜黄素诱导骨髓间充质干细胞分化成肝细胞[J].中成药,2014(06): 1124-1128
- [6] 平键,陈红云,周扬,等.一贯煎诱导骨髓间充质干细胞分化为肝细胞样细胞的实验研究[J].中国中西医结合杂志,2014(03): 348-354
- [7] 黄伟,钱海鑫,苗宗宁,等.红景天苷联合 HGF 对脐血间充质干细胞向肝样细胞分化的诱导作用观察[J].山东医药,2012(34): 8-10
- [8] 王凤玲,金茜,于盈,等.姜黄素联合骨髓间充质干细胞治疗大鼠急性肝衰竭[J].中国现代医生,2016(14): 23-26
- [9] 武斌,魏娟.肝毒清颗粒治疗慢性重型肝炎合并内毒素血症的临床疗效评价[J].广东医学,2010,31(18): 2451-2453
- [10] 刘鹏,张因因,杨华秀,等.中药凉血解毒化瘀多渠道给药治疗慢性重型肝炎 42 例临床研究[J].江苏中医药,2009,41(07): 28-30
- [11] 刘鹏,文海花,王开正,等.应用 SELDI-TOF-MS 技术分析清热解毒凉血化瘀对内毒素肝损伤大鼠蛋白质表达的影响[J].时珍国医国药,2011,22(7): 1686-1687
- [12] 魏伟.药理实验方法学.第 3 卷 [M].4 版.北京:人民卫生出版社.2002: 234-240
- [13] 李万平,肖顺汉,陈美娟,等.肝毒清颗粒对大鼠急性肝损伤保护作用研究[J].中成药,2005,27(7): 806-808
- [14] Singanayagam A, Bernal W. Update on acute liver failure [J]. Curr Opin Crit Care, 2015, 21(2): 134-141
- [15] Wang X. Immune mediated liver failure[J]. EXCLI journal, 2014, 13: 1131-1144

- [18] Morelli A, Del S L, Pesenti A, et al. Extracorporeal carbon dioxide removal (ECCO2R) in patients with acute respiratory failure [J]. *Intensive Care Medicine*, 2017, 43(4): 1-12
- [19] Wang M T, Tsai C L, Lin C W, et al. Association Between Antipsychotic Agents and Risk of Acute Respiratory Failure in Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease [J]. *Jama Psychiatry*, 2017, 74(3): 252
- [20] Wang T, Zhang L, Luo K, et al. Noninvasive versus invasive mechanical ventilation for immunocompromised patients with acute respiratory failure: a systematic review and meta-analysis [J]. *Bmc Pulmonary Medicine*, 2016, 16(1): 129
- [21] Schwaiberger D, Karcz M, Menk M, et al. Respiratory Failure and Mechanical Ventilation in the Pregnant Patient [J]. *Critical Care Clinics*, 2016, 32(1): 85
- [22] Bhatia P, Biyani G, Mohammed S, et al. Acute respiratory failure and mechanical ventilation in pregnant patient: A narrative review of literature[J]. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 2016, 32(4): 431-439
- [23] Wallia A, M.D, Parikh N D, et al. Glycemic control by a glucose management service and infection rates folloeing liver transplantation [J]. *Endocrine Practice Official Journal of the American College of Endocrinology & the American Association of Clinical Endocrinologists*, 2016, 17(4): 546
- [24] Tamopolsky M, Katzberg H, Petrof B J, et al. Pompe Disease: Diagnosis and Management. Evidence-Based Guidelines from a Canadian Expert Panel[J]. *Canadian Journal of Neurological Sciences Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 2016, 43(4): 1
- [25] Zafar S F, Postma E N, Biswal S, et al. Electronic Health Data Predict Outcomes after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage [J]. *Neurocritical Care*, 2017(21): 1-10
- [26] Unlu M, Ozturk C, Demirkol S, et al. Thrombolytic therapy in a patient with inferolateral myocardial infarction after carbon monoxide poisoning [J]. *Human & Experimental Toxicology*, 2016, 35 (1): 101-105
- [27] Aruğ aslan E, Karaca M, Özcan KS, et al. Neurologic outcome in patients with cardiac arrest complicating ST elevation myocardial infarction treated by mild therapeutic hypothermia: The experience of a tertiary institution [J]. *Türk Kardioloji Derne ğ i ar ř ivi: Türk Kardioloji Derne ğ inin yayın organıdır*, 2016, 44(2): 100
- [28] Mogensen K M, Andrew B Y, Corona J C, et al. Validation of the Society of Critical Care Medicine and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition Recommendations for Caloric Provision to Critically Ill Obese Patients: A Pilot Study[J]. *Journal of Parenteral & Enteral Nutrition*, 2016, 40(5)
- [29] Badiger S, Vishok M. Study of Serum Amylase and Serum Cholinesterase in Organophosphorus Poisoning[J]. *Journal of Krishna Institute of Medical Sciences University*, 2016, 5(2): 49-56
- [30] Keenswijk W, Walle J V. A 2-year-old boy with circulatory failure owing to streptococcal toxic shock syndrome: case report[J]. *Paediatr Int Child Health*, 2017, 20(4): 1-4

(上接第 1458 页)

- [16] Liu WH, Song FQ, Ren LN, et al. The multiple functional roles of mesenchymal stem cells in participating in treating liver diseases[J]. *J Cell Mol Med* 2015, 19: 511-520
- [17] De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Blázquez-Martí nez A, et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications[J]. *Curr Mol Med* 2012, 12: 574-591
- [18] Zheng K, Chen Y, Huang W, et al. Chemically Functionalized Silk for Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Proliferation and Differentiation [J]. *ACS applied materials & interfaces*, 2016, 8(23): 14406-14413
- [19] Shi D, Zhang J, Zhou Q, et al. Quantitative evaluation of human bone mesenchymal stem cells rescuing fulminant hepatic failure in pigs[J]. *Gut*, 2017, 66(5)
- [20] Ma H C, Shi X L, Ren H Z, et al. Targeted migration of mesenchymal stem cells modified with CXCR4 to acute failing liver improves liver regeneration [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2014, 20(40): 14884-14894
- [21] Dongliang L, Jingjing F, Xiuhua H, et al. Therapeutic effect comparison of hepatocyte-like cells and bone marrow mesenchymal stem cells in acute liver failure of rats[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(1): 11-24
- [22] Cai Y, Zou Z, Liu L, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibits hepatocyte apoptosis after acute liver injury [J]. *International Journal of Clinical & Experimental Pathology*, 2015, 8 (1): 107-116
- [23] Huang B, Cheng X, Wang H, et al. Mesenchymal stem cells and their secreted molecules predominantly ameliorate fulminant hepatic failure and chronic liver fibrosis in mice respectively [J]. *Journal of Translational Medicine*, 2016, 14(1): 45
- [24] 陈卫平, 刘涛, 王灿晖, 等. 热瘀相搏是重型肝炎病理变化的关键探析[J]. *中医药理学*, 2003, 21(8): 1240-1241
- [25] 徐山凌. 清热解毒凉血化瘀法联合骨髓间充质干细胞移植治疗急性肝衰竭模型大鼠及其机制的初步研究[D]. 四川医科大学, 2015
- [26] Curran TA, Jalili RB, Farrokhi A, et al. IDO expressing fibroblasts promote the expansion of antigen specific regulatory T cells [J]. *Immunobiology*, 2014, 219(1): 17-24
- [27] Milosavljevic N, Gazdic M, Simovic Markovic B, et al. Mesenchymal stem cells attenuate acute liver injury by altering ratio between interleukin 17 producing and regulatory natural killer T cells[J]. *Liver Transpl*, 2017, 23: 1040-1050
- [28] Meisel R, Zibert A, Laryea M, et al. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2, 3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation[J]. *Blood* 2004, 103: 4619-4621
- [29] 韩夫, 王耀军, 王耘川, 等. 吲哚胺 2, 3- 双加氧酶基因修饰 BMSCs 在大鼠同种异体复合组织移植免疫排斥反应中的作用研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2014, 28(06): 745-751
- [30] 何跃. 吲哚胺 2,3- 双加氧酶转染骨髓间充质干细胞诱导移植免疫耐受的实验研究[D]. 第三军医大学, 2015