DOI:10.16016/j.1000-5404.201602098

人脐带间充质干细胞对类噬血细胞性淋巴组织细胞增多症小鼠模型肝脏损伤的修复作用及机制

刘志娟,安曦洲,肖 莉,孟 岩,崔颖慧,梁绍燕,于 洁 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院血液科,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地,重庆市干细胞治疗工程技术研究中心)

[**摘要**] **目的** 探讨人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells,hUC-MSCs)对类噬血细胞性淋巴组织细胞增多症(hemophagocytic lymphohistocytosis,HLH)小鼠模型肝脏损伤的修复作用及相关机制。**方法** 采用 hUC-MSCs 的体外标记,将成年野生型 C57BL/6 小鼠 54 只,按完全随机方法分为模型损伤组(PBS 组)、干细胞治疗组(MSC 组)、正常对照组(CON 组)。类 HLH 小鼠模型采用 CPG-ODN1826 联合 IFN-γ 诱导产生,MSC 组治疗采用 hUC-MSCs 经尾静脉移植。观察移植后第 1、3、7 天小鼠一般情况,血生化(ALT、AST、ALB、TG),外周血三系(WBC、RBC、PLT、HGB)变化,第 7 天肝质量体质量比,HE 染色观察肝脏组织病理变化,免疫组化法观察第 7 天肝脏中活化巨噬细胞的数量,荧光显微镜观察 MSC 组 CM-Dil 标记的 hUC-MSCs 的肝内定植,免疫荧光法观察第 7 天 MSC 组肝脏中抗人白蛋白抗体阳性细胞的数量。**结果** 与 PBS 组相比,MSC 组小鼠的状态好转,肝质量体质量比显著下降($P<0.05$);ALT、AST、TG 显著降低($P<0.05$),ALB 无明显升高($P>0.05$),WBC、PLT、RBC、HGB 显著升高($P<0.05$);肝脏炎症浸润减少、肝组织损伤恢复;肝脏中活化巨噬细胞数量明显减少($P<0.05$);肝脏中均可发现有 CM-Dil 标记的 hUC-MSCs 的定植,且无人白蛋白的表达。**结论** CM-Dil 标记的 hUC-MSCs 经尾静脉移植可以在类 HLH 小鼠受损的肝脏中定植,并可改善肝功能、修复肝结构、降低活化巨噬细胞的数量,且不是通过 hUC-MSCs 肝样转化实现的。

[**关键词**] 人脐带间充质干细胞;噬血细胞性淋巴组织细胞增多症;肝损伤;治疗
[**中图法分类号**] R392.2; R551.1; R575.05 [**文献标志码**] A

Human umbilical mescenchymal stem cells in treatment of hepatotoxicity in hemophagocytic lymphohistocytosis-like mouse model: effect and possible mechanism

Liu Zhijuan, An Xizhou, Xiao Li, Meng Yan, Cui Yinghui, Liang Shaoyan, Yu Jie (Department of Hematology, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders, Chongqing Engineering Research Center of Stem Cell Therapy, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) in the treatment of hepatotoxicity in hemophagocytic lymphohistocytosis (HLH)-like mouse model and investigate the possible mechanism. **Methods** hUC-MSCs were stained with CM-Dil fluorescent carbocyanite *in vitro*. A total of 54 adult C57BL/6 mice were randomly assigned to the model injury group (PBS group), stem cell transplantation group (MSC group) and normal control group (CON group). The HLH-like mouse model was induced by CPG oligodeoxynucleotide (CPG-ODN 1826) and interferon (IFN)-γ. Then the CM-Dil-labeled hUC-MSCs were transplanted into the mice of the MSC group *via* caudal vein.

[**通信作者**] 于 洁,E-mail:1808106657@qq.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160422.1533.020.html(2016-04-22)

The general conditions were observed in all the mice in 1, 3 and 7 d after transplantation. The blood samples in the above 3 time points were collected to measure the serum contents of aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), albumin (ALB) and triglyceride (TG), counts of platelets (PLT), white blood cells (WBC) and red blood cells (RBC), and level of hemoglobin (HGB). In 7 d after transplantation, liver weight was determined, the pathohistological changes were observed with hematoxylin-eosin staining, and the number of activated macrophages was tested by immunohistochemical assay. Fluorescent microscopy was used to observe the localization of labeled hUC-MSCs in the liver, and immunofluorescence assay was employed to count the cells positive to anti-human albumin antibody. **Results** When compared with the PBS group, the mice in the MSC group showed obviously better general condition, decreased ratio of liver weight to body weight ($P<0.05$), decreased contents of AST, ALT, and TG ($P<0.05$), no obvious change in the ALB content ($P>0.05$), and elevated counts of WBC, PLT, RBC and HGB ($P<0.05$). There were less lymphocytes infiltration in the liver, reduced activated macrophages ($P<0.05$), no expression of human ALB, and attenuated liver damage after hUC-MSCs transplantation. The CM-Dil labeled hUC-MSCs were found in the liver tissue of the MSC group after transplantation. **Conclusion** The CM-Dil labeled hUC-MSCs are implanted into the damaged liver tissue by caudal vein transplantation. The transplantation improves liver function, repairs injured liver tissue, and reduces activated macrophages, which are not through the MSCs-derived hepatocyte-like cells.

[**Key words**] human umbilical mesenchymal stem cells; hemophagocytic lymphohistiocytosis; hepatotoxicity; treatment

Corresponding author: Yu Jie, E-mail: 1808106657@qq.com

噬血细胞性淋巴组织细胞增多症(hemophagocytic lymphohistocytosis,HLH)又称为噬血细胞综合征(hemophagocytic syndrome,HPS),常伴有多脏器功能受损,其病情进展迅猛,病死率高[1]。HLH 分基因缺陷所导致的原发性 HLH 及继发于感染、肿瘤、自身免疫性疾病等的继发性 HLH[2],两种类型的 HLH 均伴有肝脏受损[3],而目前的治疗方案并不能及时、有效地解决肝脏受损的情况,爆发性的肝衰甚至会使得患者失去治疗机会。间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)是一类具有低免疫原性及多向分化能力的多能干细胞,其无异体排斥反应、趋化迁移及组织修复的特点使其被广泛应用于各种抗炎症损伤及组织损伤等领域中,如移植物抗宿主病(graft versus host disease,GVHD)[4]。本课题组前期利用 IFN-γ 联合 CPG-ODN1826 成功建立了类 HLH 小鼠模型,小鼠出现了以肝脾为主的多脏器的受损[5]。本实验将模型稍加改良后作为疾病的研究载体评估人脐带间充质干细胞对肝脏损伤的修复作用,并对其相关机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 *动物及材料*

C57BL/6 雄性小鼠 54 只,8~10 周龄,体质量 23~26 g,饲养条件为 SPF 级,由重庆医科大学实验动物中心提供。全硫代化修饰 CPG-ODN1826 由上海英骏生物公司合成,序列为 5′-TCCATGACGTTCCTGACGTT-3′。小鼠 IFN-γ(美国 Peprotech 公司),人脐带间充质干细胞(重庆医科大学附属儿童医院干细胞中心实验室),DMEM/F12 培养基(美国 HyClone 公司),胎牛血清(美国 Gibco 公司),CM-Dil 染料(美国 Invitrogen 公司),F4/80 抗体、兔抗人白蛋白抗体(美国 Abcam 公司),大鼠抗小鼠二步法免疫组化二抗(北京中杉金桥生物有限公司),胰酶、FITC 荧光二抗、DAPI 染料(上海碧云天生物技术有限公司)。本研究所用肝脏标本已获得患者知情同意。

1.2 *方法*

1.2.1 hUC-MSCs 的体外标记 hUC-MSCs 长满 90%左右,细胞状态良好,用 4 mg/L 的 CM-Dil 液重悬细胞,37 ℃孵育 30 min 染色,PBS 液洗 2 遍后以 PBS 液重悬细胞,计数。

1.2.2 类 HLH 小鼠模型建立及 hUC-MSCs 移植 将 54 只小鼠按完全随机方法分为 3 组:CON 组、PBS 组、MSC 组,每组 18 只。PBS 组及 MSC 组分别于 0、2、4、6、8 d 腹腔注射 250 μg/mL 的 CPG-ODN1826 200 μL,同期每日颈部皮下注射 IFN-γ 4 μg/mL 的 100 μL 2 次,间隔 12 h,连续 10 d。CON 组则与相应时间点注

射相应量 PBS 液。建模成功之后第 10 天 MSC 组经尾静脉移植 3×10^6 个/L hUC-MSCs 悬液 200 μL,PBS 组及 CON 组则经尾静脉移植 PBS 缓冲液 200 μL。监测移植治疗后小鼠的精神活动状况及体质量的变化。

1.2.3 血清生化及外周血三系的检测 移植后第 1、3、7 天,各组随机挑选 6 只小鼠,采用眼球摘除法取外周血取全血及 3 500 r/min 离心 10 min 后取血清后送重庆医科大学附属儿童医院临检中心进行谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、甘油三酯(TG)、白蛋白(ALB)及白细胞(WBC)、血小板(PLT)、红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)的检测。

1.2.4 肝质量体质量比及肝脏病理形态学变化 上述时间点小鼠取血后取肝脏称质量,并取 1 cm×1 cm×0.5 cm 大小的组织块,以 4% 多聚甲醛固定 48 h,梯度乙醇脱水后石蜡包埋,制备石蜡切片,苏木精-伊红染色在光学显微镜下观察。

1.2.5 各组肝脏内活化巨噬细胞情况 石蜡切片制作同上,免疫组化染色方法参考说明书。免疫组织化学染色结果判读:每张玻片在高倍镜(×400)下随机选取 5 个视野观察染色强度并计算阳性细胞百分率。染色强度评分:无染色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。阳性细胞百分率评分:<5% 为 0 分,5%~25% 为 1 分,>25%~50% 为 2 分,>50%~75% 为 3 分,>75% 为 4 分。两者分数相加:<2 分为不表达(-),2~3 分为低表达(+),4~5 分为中度表达(++),6~7 分为高表达(+++)。

1.2.6 CM-Dil 标记的 hUC-MSCs 移植后肝脏内示踪 上述时间点小鼠采血后取 MSC 组小鼠肝脏组织,大小约 1 cm×1 cm×0.5 cm,立即进行 OCT 包埋,用冰冻恒温切片机切片,厚度 8 μm,4% 多聚甲醛固定 30 min,0.3% Triton X-100 打孔 20 min,3 μg/mL DAPI 液染核后抗荧光淬灭剂封片,在荧光显微镜下观察。

1.2.7 免疫荧光法检测肝内定植 hUC-MSCs 取移植后第 7 天 MSC 组(细胞移植组)小鼠肝脏组织,并以人正常肝脏组织作为阳性对照组,按上述方法制作冰冻切片,固定后 0.3% Triton X-100 打孔 20 min,BSA 封闭 30 min,人白蛋白抗体 4 ℃孵育过夜,FITC 荧光二抗(1∶200)常温孵育 1 h,3 μg/mL DAPI 染色剂染核,抗荧光淬灭剂封片,在荧光显微镜下观察。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,方差齐时,采用单因素方差分析;方差不齐时,采用 Kruskal-Wallis 检验。$\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 hUC-MSCs 体外标记

CM-Dil 染色后绿色荧光激发,发现细胞红染,标记率可达 95% 以上(图 1)。

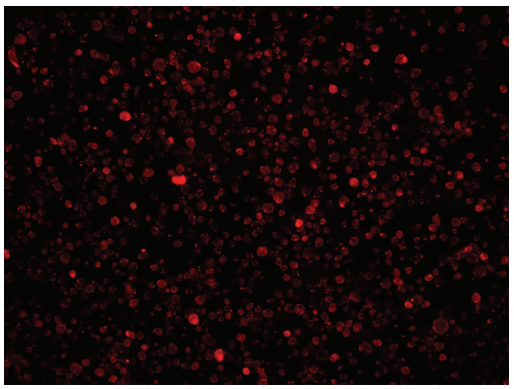


图 1 荧光显微镜下观察 CM-Dil 体外标记的 hUC-MSCs (×100)

2.2 各组小鼠的一般情况及体质量

造模后小鼠状态萎靡,攀爬笼数减少,细胞移植后 MSC 组较 PBS 组小鼠状态好转,活动增加,而各组小鼠体质量并未有较大改变。

2.3 细胞移植后血生化、外周血三系的变化

细胞移植后第 1、3 天,MSC 组及 PBS 组 ALT、AST 均高于 CON 组($P<0.05$);与 PBS 组相比,MSC 组明显降低($P<0.05$);移植后第 7 天,与 CON 组相比,MSC 组 ALT、AST 基本恢复正常($P>0.05$),但 PBS 组尚未恢复正常($P<0.05$,表 1)。细胞移植后第 1 天,MSC 组及 PBS 组 TG 高于 CON 组($P<0.05$),与 PBS 组相比,MSC 组 TG 明显降低($P<0.05$);移植后第 3 天,MSC 组 TG 基本恢复正常($P>0.05$),但 PBS 组尚未恢复正常($P<0.05$);移植后第 7 天,MSC 组及 PBS 组均恢复正常($P>0.05$);细胞移植后第 1、3、7 天,MSC 组及 PBS 组血清中 ALB 均未恢复正常($P>0.05$,表 1)。

细胞移植后第 1 天,MSC 组及 PBS 组 WBC、PLT、RBC、HGB 均低于 CON 组($P<0.05$),且两组之间各指标差异无统计学意义($P>0.05$);细胞移植后第 3 天,与 PBS 组相比,MSC 组三系水平均恢复较快,除 WBC 外,各指标差异均具有统计学意义($P<0.05$);细胞移植后第 7 天,除 PLT 尚未恢复正常外($P<0.05$),MSC 组 WBC、RBC、HGB 均恢复正常($P>0.05$),而 PBS 组各指标均未恢复正常($P<0.05$,表 2)。

表 1 各组小鼠不同时间点血清 ALT、AST、TG、ALB 检测结果($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	ALT(U/L)			AST(U/L)		
	1 d	3 d	7 d	1 d	3 d	7 d
CON 组	47.10 ± 3.85	47.11 ± 3.88	46.60 ± 4.13	135.22 ± 23.10	132.61 ± 15.93	126.50 ± 16.62
MSC 组	332.80 ± 57.63^{ab}	237.65 ± 111.63^{ab}	48.40 ± 6.20^{b}	389.18 ± 169.71^{ab}	223.90 ± 65.11^{ab}	121.45 ± 25.48^{b}
PBS 组	487.16 ± 59.84^{a}	429.42 ± 113.64^{a}	143.46 ± 63.71^{a}	526.65 ± 68.21^{a}	470.25 ± 69.07^{a}	162.12 ± 35.74^{a}
组别	TG(mmol/L)			ALB(g/L)		
	1 d	3 d	7 d	1 d	3 d	7 d
CON 组	0.68 ± 0.12^{b}	0.67 ± 0.08^{b}	0.68 ± 0.14	31.12 ± 1.85^{b}	32.03 ± 2.03^{b}	30.57 ± 1.86^{b}
MSC 组	1.19 ± 0.31^{ab}	0.83 ± 0.27^{b}	0.64 ± 0.08	25.68 ± 2.59^{a}	26.12 ± 1.70^{a}	27.47 ± 2.08^{a}
PBS 组	1.31 ± 0.30^{a}	1.15 ± 0.25^{a}	0.72 ± 0.21	25.58 ± 0.67^{a}	25.63 ± 1.39^{a}	27.52 ± 1.07^{a}

a: $P<0.05$,与 CON 组比较;b: $P<0.05$,与 PBS 组比较

表 2 各组小鼠不同时间点外周血 WBC、PLT、RBC、HGB 检测结果($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	WBC($\times 10^9$/L)			PLT($\times 10^9$/L)		
	1 d	3 d	7 d	1 d	3 d	7 d
CON 组	8.44 ± 1.08^{b}	8.55 ± 1.10^{b}	8.73 ± 1.12^{b}	1 250.67 ± 119.74^{b}	1 247.00 ± 137.08^{b}	1 260.67 ± 251.54^{b}
MSC 组	4.50 ± 1.14^{a}	5.87 ± 1.69^{a}	6.97 ± 1.85	598.00 ± 85.99^{a}	785.17 ± 164.16^{ab}	962.50 ± 168.89^{ab}
PBS 组	4.46 ± 0.56^{a}	4.74 ± 0.10^{a}	5.47 ± 1.65^{a}	546.33 ± 85.48^{a}	606.50 ± 89.11^{a}	749.17 ± 147.60^{a}
组别	RBC($\times 10^{12}$/L)			HGB(g/L)		
	1 d	3 d	7 d	1 d	3 d	7 d
CON 组	9.95 ± 0.44^{b}	9.93 ± 0.48^{b}	9.85 ± 0.49^{b}	144.50 ± 7.29^{b}	144.00 ± 8.60^{b}	144.33 ± 9.79^{b}
MSC 组	7.70 ± 1.15^{a}	8.61 ± 0.75^{ab}	9.28 ± 0.76	106.83 ± 17.50^{a}	124.00 ± 11.66^{ab}	137.50 ± 5.79
PBS 组	7.45 ± 0.43^{a}	7.76 ± 0.62^{a}	9.02 ± 0.71^{a}	101.17 ± 8.42^{a}	110.67 ± 5.85^{a}	127.50 ± 7.15^{a}

a: $P<0.05$,与 CON 组比较;b: $P<0.05$,与 PBS 组比较

2.4 细胞移植后各组小鼠肝脏大小及病理学改变

细胞移植后第 7 天,与 CON 组的(4.92 ± 0.37)%相比,MSC 组(5.77 ± 0.28)%及 PBS 组(6.39 ± 0.46)%小鼠肝质量体质量比均显著升高($P<0.05$);与 PBS 组相比,MSC 组肝质量体质量比明显降低($P<0.05$),说明 hUC-MSCs 可以明显改善类 HLH 小鼠的肝脏肿大。

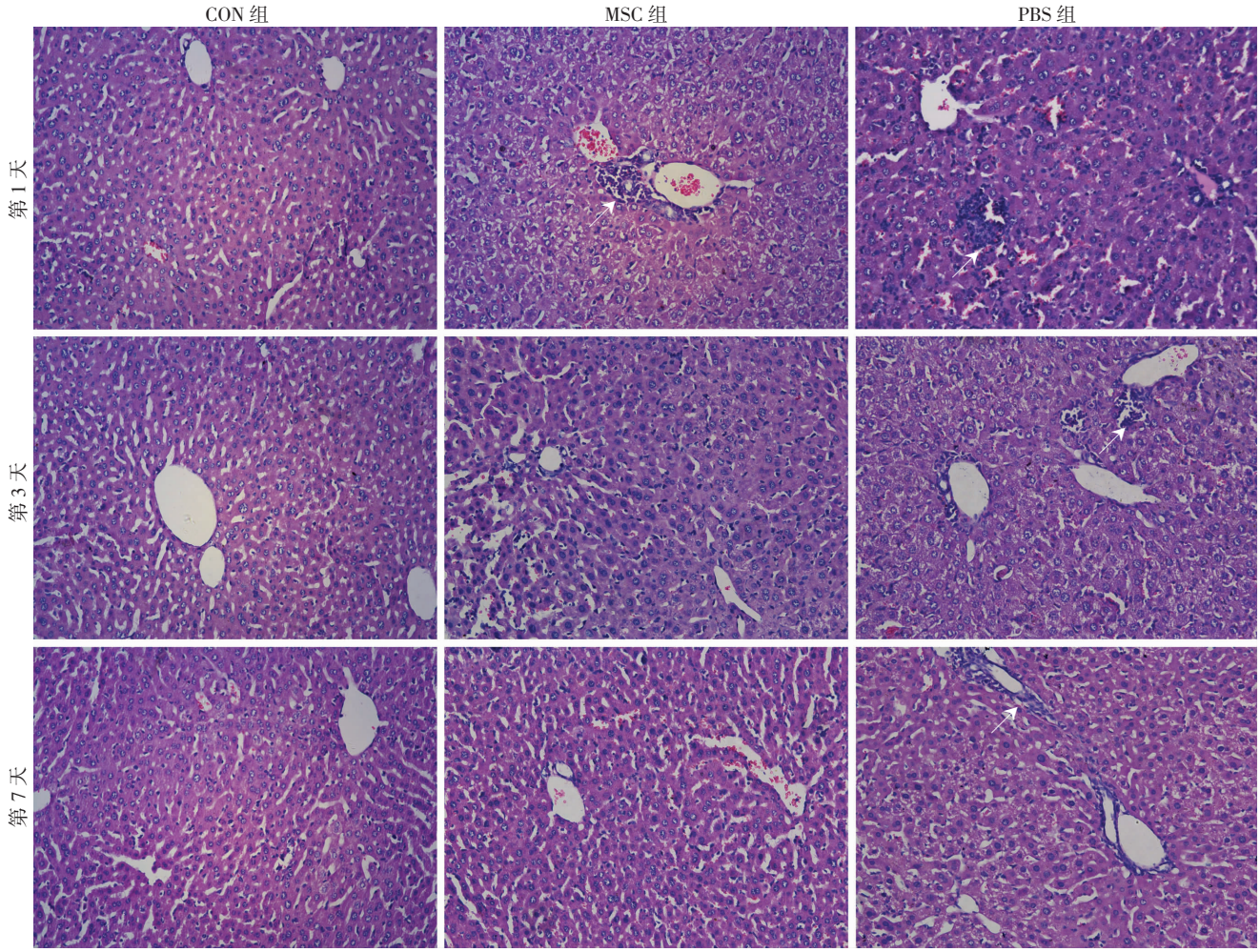
HE 染色结果显示各时间点 CON 组小鼠肝小叶结构正常,细胞染色清晰,肝细胞组成的肝板呈放射状,未见肝细胞变性坏死。细胞移植后第 1 天,PBS 组小鼠肝组织中可见肝细胞浊肿,胞浆疏松,部分肝窦扩张充血,散在淋巴细胞浸润,可见炎症细胞聚集灶,而 MSC 组小鼠肝脏组织的上述病变均有所改善;移植后第 3 天 PBS 组小鼠肝脏较第 1 天均已好转,但仍见炎症细胞浸润,胞浆疏松等改变,而 MSC 组小鼠肝脏组织结构大致恢复正常,散在炎症细胞浸润。移植后第 7 天 PBS 组尚可见血管周围炎症浸润,说明尾静脉移植 hUC-MSCs 可以减少肝脏中的炎症反应,修复肝脏结构损伤(图 2)。

2.5 细胞移植后各组小鼠肝组织中巨噬细胞活化水平

细胞移植后第 7 天,根据 1.2.5 的评分标准,免疫组化染色观察结果显示,CON 组为不表达(-),MSC 组为低表达(+),PBS 组为中度表达(++)。染色强度评分及阳性细胞百分率评分综合统计结果显示 MSC 组(2.47 ± 0.27)分,PBS 组(4.43 ± 0.53)分,均高于 CON 组(1.43 ± 0.29)分($P<0.05$);与 PBS 组相比,MSC 组活化巨噬细胞的数量及染色程度明显降低($P<0.05$,图 3)。

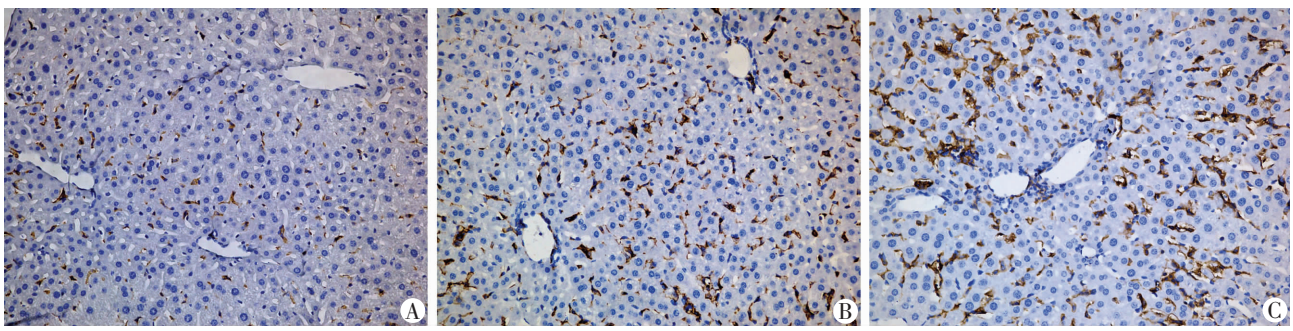
2.6 hUC-MSCs 在肝组织的定植及表达人白蛋白情况

细胞移植后第 1、3、7 天,取各组小鼠肝脏组织行冰冻切片,荧光显微镜下可发现第 1 天 CM-Dil 的 hUC-MSCs 主要在肝脏大血管周围定植,第 3 天受损的肝小叶中均可看到 CM-Dil 标记的 hUC-MSCs 定植,第 7 天肝小叶中仍可见 CM-Dil 标记的 hUC-MSCs 定植,但荧光信号较前减少,而 CON 组及 PBS 组均未发现 CM-Dil 的 hUC-MSCs 定植(图 4)。免疫荧光结果显示细胞移植后第 7 天肝脏中定植的 hUC-MSCs 未见人白蛋白的表达(图 5)。



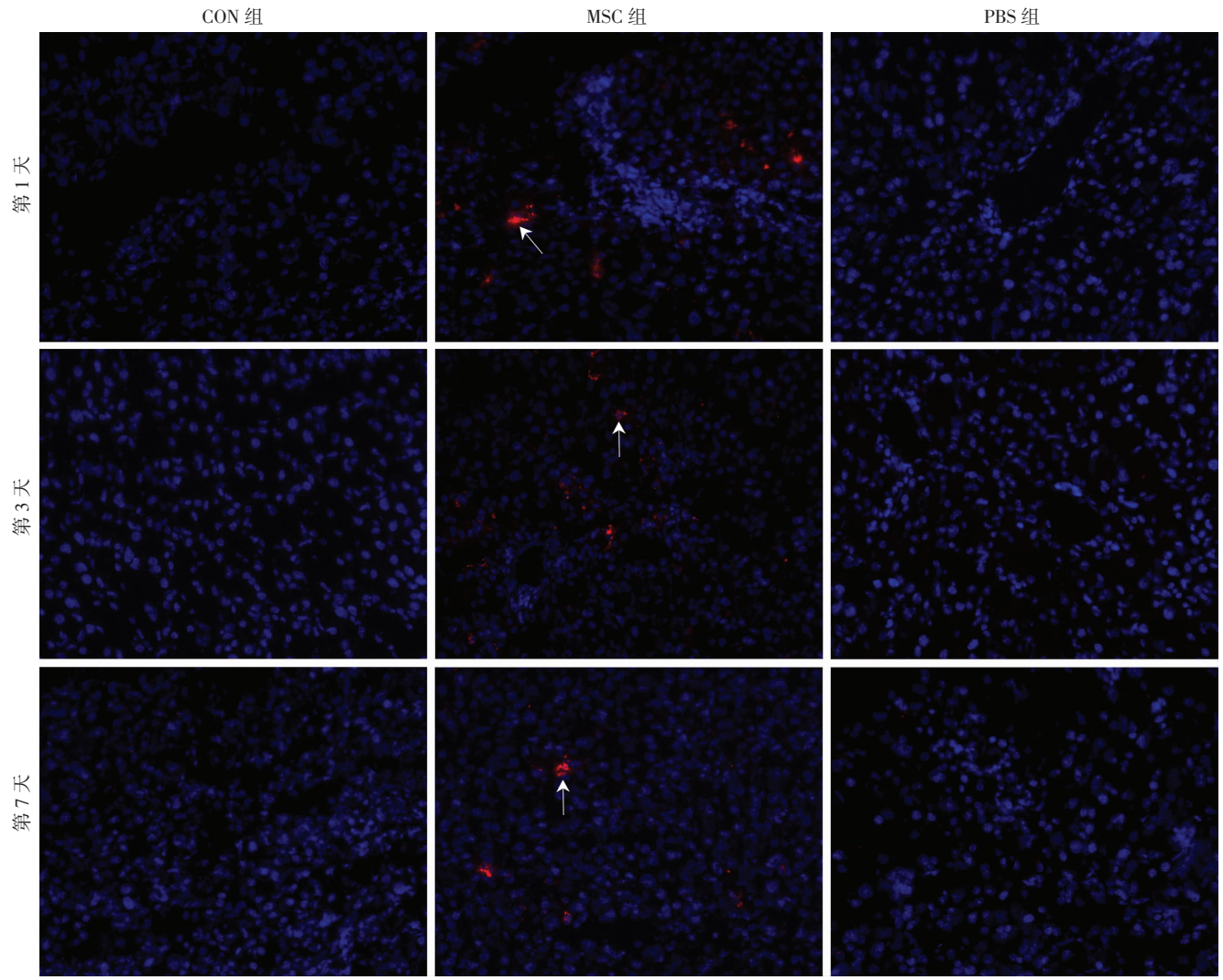
↑：示肝脏内炎症浸润灶

图 2　各组小鼠细胞移植后肝脏组织病理形态变化　（HE　×200）



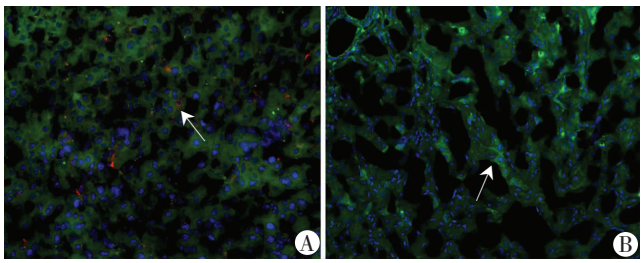
A：CON 组；B：MSC 组；C：PBS 组

图 3　各组小鼠细胞移植后第 7 天肝脏中 F4/80 阳性细胞的表达情况　（二步法　×200）



↑:示肝脏内定植的 hUC-MSCs

图 4 荧光显微镜下观察 CM-Dil 标记的 hUC-MSCs 移植后肝脏组织内的定植情况 (×200)



A:细胞移植组;B:阳性对照组 ↑:示人白蛋白

图 5 免疫荧光观察细胞移植后第 7 天肝脏中定植 hUC-MSCs 人白蛋白的表达情况 (×200)

3 讨论

HLH 是一种由多种病因引起的单核巨噬细胞系统过度反应性疾病,其主要特点为自身免疫功能紊乱,T 细胞与巨噬细胞过度活化,最终引起多脏器功能受损。前期本课题组肖莉等[6]分析 217 例 HLH 患儿临床及实验室检查特点时,发现患儿肝脏受损尤为突出,严重的肝功能损害甚至会导致患儿死亡。现阶段 HLH 的治疗主要采用化学、免疫抑制治疗及造血干细胞移植治疗[7],但是化疗方案中采用的依托泊苷及环孢素均具有肝脏毒性,使得肝脏受到二次打击,而造血干细胞移植在一些暴发型肝脏受损的患者中并不能及时发挥作用,以急性肝衰为首要表现的 HLH 患儿由于免疫系统的亢进使得肝脏移植成为禁忌[8-9]。因此寻求新的治疗方法成为必要。近年来,国内外学者陆续报道了关于 MSCs 在肝脏疾病中的应用,证实了其在改善肝纤维化、脂肪肝、急性肝损伤等非免疫性肝病及自身免疫性肝病中的积极作用。目前人脐带间充质干细胞治疗 HLH 中肝脏损伤的研究尚少见报道。

本研究发现细胞移植后第 1 天便可观察到 ALT、

AST 及 TG 的显著缓解。郑盛等[10]采用 hUC-MSCs 治疗 CCl_4 导致的急性肝衰后也发现细胞移植后第 1 天肝酶明显下降,提示 hUC-MSCs 具有快速的肝脏损伤修复作用,可能与其免疫调节有关。本研究发现血清中 ALB 恢复较慢,提示其合成功能的恢复尚需时间,与临床治疗经验相符。虽然本研究在前期造模的基础上,增加了 IFN-γ 的给药次数,使得模型更加稳定以及减少给药不规范对治疗评估效果的影响,但是本模型与经典的穿孔素基因敲除的小鼠模型及患者相比,模拟的是高细胞因子血症等造成的各系统损伤,其表现温和,无致死性,且随着给药的停止,小鼠的临床表现随时间推移可恢复正常,故在一定程度上也有助于肝脏相关指标的恢复。下一步,可采用经典的 HLH 小鼠模型作为载体更好、更全面地评估 hUC-MSCs 的调节、修复作用。

既往已经在肝脏损伤的动物模型中证实了 MSCs 的免疫调节功能[11],其可逆转 Th1 与 Th2 类细胞的失衡,调控 DC 细胞、NK 细胞的细胞因子分泌谱,引起抗炎症细胞因子增多,进而减少炎症性细胞因子对组织的损害。本研究 MSC 组小鼠肝脏内炎症浸润灶的消失及肝脏结构的恢复也证实了这一点。同时研究表明 hUC-MSCs 可调控肝脏内活化的巨噬细胞即 Kupffer 细胞向抗炎型 M2 型细胞转化[12],IL-10、IL-4 等细胞因子增多,并降低其活化程度,阻止肝内的炎症级联反应继续发展。Higashimoto 等[13]采用脂肪来源的 MSCs 治疗 Con-A 诱导的肝炎小鼠后发现,肝脏中增多的 F4/80 阳性细胞数明显下降,与本研究结果一致,证实了巨噬细胞的激活状态在肝脏损伤与修复中具有重要作用。这推测 hUC-MSCs 在本研究中肝脏恢复作用主要通过调控体内 T 细胞的转化,减少 $CD8^+$ T 细胞的数量,降低 IFN-γ、TNF-α 等细胞因子的产生,进而降低巨噬细胞的活化程度,最终保护肝脏及其他脏器的进一步损害。

本实验采用细胞染色剂 CM-Dil 标记 hUC-MSCs 进行体内示踪,结果显示细胞移植后第 1、3、7 天,在受损的肝脏中均可发现 CM-Dil 标记的 hUC-MSCs 定植,与陈浩等[14]研究结果一致,说明 hUC-MSCs 对炎症或受损部位具有强的归巢能力。肝脏损伤时局部释放多种生长因子、趋化粘附因子诱导 hUC-MSCs 向受损肝脏迁移定植,发挥肝脏修复作用。但随着时间的推移,肝脏组织中定植的 hUC-MSCs 数量有所减少,可能与细胞分裂增殖后单个细胞荧光减弱以及移植细胞随着肝组织逐渐恢复而迁移出肝脏等因素有关。研究表明植入到受损肝脏中的 hUC-MSCs 在局部损伤微环境下可以分化为肝样细胞发挥肝脏修复作用,维持肝脏功能[15],而本实验结果显示移植后第 7 天定植于肝脏中的 hUC-MSCs 未表达人白蛋白,即 hUC-MSCs 在移植后第 7 天并未发生肝样的转化,证实了肝脏损伤的修复作用并非完全依赖于 hUC-MSCs 的肝样转化。Tsai 等[16]发现移植入 CCl_4 导致的小鼠模型中肝脏的 hUC-MSCs 并未发生肝样转化而是调控细胞因子发挥作用,另有研究采用 MSCs 的培养液(MSC-CM)治疗 D-半乳糖导致的肝衰时,发现 MSC-CM 可以显著减少细胞死亡、增加肝细胞的再生[17],证实了 MSCs 旁分泌在肝脏损伤修复中的作用。另有研究表明只有 1% ~3% 的宿主肝脏接受外来细胞的植入[18],而即便有肝样转化的细胞,其是否具有成熟肝细胞的功能尚需要证实。近年来旁分泌理论的提出,为间充质干细胞治疗肝脏疾病的机制提供新的方向[19]。

总之,在以 CPG-ODN1826 联合 IFN-γ 诱导的类 HLH 小鼠模型为载体的情况下,尾静脉移植 CM-Dil 标记的 hUC-MSCs 可在受损肝脏中定植,发挥肝脏修复作用,推测其可能与其免疫调控、旁分泌作用等有关,为临床解决 HLH 肝脏受损特别是为造血干细胞移植前的爆发性肝脏损伤如何快速解决提供新思路。但 MSCs 发挥修复作用的具体机制需要进一步研究。

参考文献:

[1] Janka G E, Lehmberg K. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: pathogenesis and treatment[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2013, 2013: 605 - 611. DOI: 10.1182/asheducation-2013.1.605

[2] Janka G E. Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. Annu Rev Med, 2012, 63: 233 - 246. DOI: 10.1146/annurev-med-041610-134208

[3] Jordan M B, Allen C E, Weitzman S, *et al*. How I treat hemophagocytic lymphohistiocytosis [J]. Blood, 2011, 118(15): 4041 - 4052. DOI: 10.1182/blood-2011-03-278127

[4] Lu L L, Liu Y J, Yang S G, *et al*. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials [J]. Haematologica, 2006, 91(8): 1017 - 1026.

[5] 张妮, 郑启城, 肖莉, 等. CPG-ODN 和 IFN-γ 联合诱导建立类噬血淋巴组织细胞增生症小鼠模型[J]. 中华血液学杂志, 2014, 35(9): 835 - 839. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2014.09.011

[6] 肖莉, 管贤敏, 孟岩, 等. 217 例噬血细胞性淋巴组织细胞增生症患儿的临床及实验室检查特点分析[J]. 中华血液学杂志, 2014, 35(7): 628 - 632. DOI: 10.3760/cma.j.issn. 0253-2727.2014.07.013

[7] Henter J I, Horne A, Arico M, *et al*. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. Pediatr Blood Cancer, 2007, 48(2): 124 – 131. DOI: 10.1002/pbc.21039

[8] Soyama A, Eguchi S, Takatsuki M, *et al*. Hemophagocytic syndrome after liver transplantation: report of two cases[J]. Surg Today, 2011, 41(11): 1524 – 1530. DOI: 10.1007/s00595-010-4512-9

[9] Taniai N, Akimaru K, Kawano Y, *et al*. Hemophagocytic syndrome after living-donor liver transplantation for fulminant liver failure: a case report[J]. Hepatogastroenterology, 2005, 52(63): 923 – 926.

[10] 郑盛, 殷芳, 肖琼怡, 等. 脐带间充质干细胞移植对急性肝功能衰竭的修复及移植途径的优化[J]. 肝脏, 2014, 19(12): 918 – 923. DOI: 10.3969/j.issn.1008-1704.2014.12.006

[11] Fiore E J, Mazzolini G, Aquino J B. Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Liver Fibrosis: Recent Findings, Old/New Caveats and Future Perspectives[J]. Stem Cell Rev, 2015, 11(4): 586 – 597. DOI: 10.1007/s12015-015-9585-9

[12] Ylostalo J H, Bartosh T J, Coble K, *et al*. Human mesenchymal stem/stromal cells cultured as spheroids are self-activated to produce prostaglandin E2 that directs stimulated macrophages into an anti-inflammatory phenotype[J]. Stem Cells, 2012, 30(10): 2283 – 2296. DOI: 10.1002/stem.1191

[13] Higashimoto M, Sakai Y, Takamura M, *et al*. Adipose tissue derived stromal stem cell therapy in murine ConA-derived hepatitis is dependent on myeloid-lineage and $CD4^+$ T-cell suppression[J]. Eur J Immunol, 2013, 43(11): 2956 – 2968. DOI: 10.1002/eji.201343531

[14] 陈浩, 尹飞, 孟春阳, 等. 骨髓间充质干细胞移植对严重烧伤大鼠肝损伤的修复作用及其机制[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2014, 40(2): 219 – 223. DOI: 10.13481/j.1671-587x.20140201

[15] Nonome K, Li X K, Takahara T, *et al*. Human umbilical cord blood-derived cells differentiate into hepatocyte-like cells in the Fas-mediated liver injury model[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005, 289(6): G1091 – G1099. DOI: 10.1152/ajpgi.00049.2005

[16] Tsai P C, Fu T W, Chen Y M, *et al*. The therapeutic potential of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in the treatment of rat liver fibrosis[J]. Liver Transpl, 2009, 15(5): 484 – 495. DOI: 10.1002/lt.21715

[17] van-Poll D, Parekkadan B, Cho C H, *et al*. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration *in vitro* and *in vivo*[J]. Hepatology, 2008, 47(5): 1634 – 1643. DOI: 10.1002/hep.22236

[18] Dhawan A, Puppi J, Hughes R D, *et al*. Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2010, 7(5): 288 – 298. DOI: 10.1038/nrgastro.2010.44

[19] 崔丽娜, 韩英. 多能干细胞在肝脏损伤和修复过程中的免疫调节作用[J]. 临床肝胆病杂志, 2014, 30(9): 855 – 859. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2014.09.005

(**收稿**:2016-02-26;**修回**:2016-04-01)

(编辑 王 红)