龟板促骨髓间充质干细胞肝脏归巢的作用研究

韩克强,李 靖,梁 平,郑 璐,黄小兵 (第三军医大学新桥医院肝胆外科,重庆 400037)

[摘 要] **目的** 探讨龟板饲养对移植骨髓间充质干细胞(MSCs)肝脏归巢的作用。**方法** 密度梯度离心法分离、培养大鼠MSCs,带绿色荧光蛋白腺病毒转染标记移植 MSCs,激光共聚焦检测肝脏组织 MSCs 分布,Western blot 检测肝脏肝细胞生长因子(HGF)蛋白及 MSCs c-met 蛋白表达,携带 siRNA 腺病毒转染下调 c-met 表达。**结果** 龟板饲养较普通饮食明显增加移植 MSCs 肝脏归巢($P<0.05$);同时,龟板饲养增加大鼠肝脏 HGF 蛋白表达,阻断 HGF/c-met 可部分逆转龟板促 MSCs 归巢的作用。**结论** 龟板饲养可能通过 HGF/c-met 轴促 MSCs 向肝脏组织归巢。

[关键词] 龟板;骨髓间充质干细胞;归巢;肝;大鼠
[中图分类号] R329.28;R285.6 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2013)03-0262-02

Effects of plastrum testudinis on mesenchymal stem cells homing to liver

HAN Ke-qiang, LI Jing, LIANG Ping, ZHENG Lu, HUANG Xiao-bing (Department of Hepatobiliary Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of plastrum testudinis on mesenchymal stem cells (MSCs) homing to liver. **Methods** MSCs of rats were separatedby density gradient centrifugation and cultured. The green fluorescent protein adenovirus transfection was used to mark MSCs transplantation, and laser confocal was used to detecte liver tissue MSCs distribution. Liver hepatocyte growth factor (HGF) protein and MSCs c-met protein expression were test by Western blot, and some MSCs were transfected with adenovirus carrying c-met siRNA. **Results** plastrum testudinis breeding increased transplantated MSCs liver homing ($P<0.05$). Meanwhile the plastrum testudinis breeding promoted rat liver HGF protein expression. The effects of plastrum testudinis promoting MSCs homing to liver were partly weakened by blocking HGF/c-met axis. **Conclusion** Plastrum testudinis feeding may promote MSCs liver tissue homing through HGF/c-met axis.

Keywords: plastrum testudinis; mesenchymal stem cells; homing; liver; rat

既往研究提示,骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)是肝脏损伤时参与调控肝修复重建的关键因素之一,在肝脏部分切除术后再生,肝纤维化后修复等病理生理过程中发挥重要作用[1]。而龟板是中医治疗肝损伤的各种方剂重要组成部分,中医临床实践已经证实其对促进肝脏再生、修复均有较好的疗效,但是对于其治疗机制一直不够清楚[2]。本研究通过动物在体研究了龟板饲养对 MSCs 肝脏归巢的影响,旨在为促进肝脏部分切除术后再生、急慢性肝损伤修复的研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 骨髓间充质干细胞(MSCs)培养、标记及移植

按张刚庆等[3]方法,脱颈法处死雄性 SD 大鼠,取双后肢股骨,DHanks液吹吸骨髓,DMEM-L培养基稀释。密度梯度离心法收集单个核细胞,PBS 洗 2 次后接种于 24 孔板内,以 DMEM-L(含 10% FBS)培养基,在 5% CO_2,37 ℃饱和湿度下培养,待细胞生长至瓶底 90% 融合时,2.5 g/L 胰蛋白酶消化,按 1×10^4 cm^{-3} 传代培养,收集第 3 ~ 4 代 MSCs 用于后续实验。分别以携带大鼠 c-met siRNA 的腺病毒 Ad-si/c-met 及空腺病毒载体 vector(均由江苏省分子医学生物技术重点实验室惠赠)转染 MSCs,腺病毒均携带绿色荧光蛋白 GFP,扩增培养后消化、收集,生理盐水重悬后制成单细胞悬液。按移植细胞不同,分为 Ad-si/c-met MSCs 移植组、空病毒对照移植组及假手术组,Ad-si/c-met MSCs 移植组取转染了 Ad-si/c-met 的 MSCs 悬液 1 mL(含细胞数约 1.0×10^6),经大鼠尾静脉注射移植,以同样方式注入等量转染了 vector 的 MSCs 作为空病毒对照移植组,以同样方式注入生理盐水作为假手术对照。单纯移植 MSCs 时,均以携带 GFP 蛋白的腺病毒转染作为移植细胞标记。移植 MSCs 均 2 d 注射 1 次,1 周后处死动物观察相关指标。

1.2 实验动物准备及分组

6 ~ 8 周龄雄性 SD 大鼠(体质量 200 ~ 250 g)购自第三军医大学实验动物中心。采用水煎法制备含龟板生药量 1 kg/L 的水煎液,根据成人日服药量10倍折算成大鼠灌胃剂量,4g/kg,灌前稀释成 4 mL。根据是否服用龟板水煎液分为龟板组和普食组,2 组均常规饲养,龟板组每天给予龟板口服液 4 mL,分上午、下午 2 次灌胃 1 周;普食组则给予等体积蒸馏水灌胃。

DOI:10.11659/jjssx.1672-5042.201303011
[基金项目] 全军中医药科研专项课题(2010ZYZ233);重庆市卫生局中医药课题(2009-2-75)
[通讯作者] 黄小兵,电话:(023)68774606,E-mail:huangxiaobingcq@163.com
[收稿日期] 2013-02-20 [修回日期] 2013-03-16

1.3 Western blot 检测 HGF、c-met 蛋白

组织总蛋白提取:脱颈处死动物,取各组肝脏组织 100 mg。加入 1 mL 冰预冷的蛋白提取液和 10 μl PMSF,然后在冰浴上用玻璃匀浆器匀浆。将样品转入 1.5 mL EP 管中,4 ℃,20 000 r/min 离心 15 min,收集上清。细胞总蛋白提取:4 ℃预冷的 PBS 洗细胞 3 次,加入预制的含 PMSF 裂解液,冰上裂解 30 min,裂解后,用干净的刮棒将细胞碎片和裂解液移至离心管中。4 ℃,16 000 r/min 离心 20 min,收集上清。取其中少量测蛋白浓度(BCA 法),其余分装冻存。取等量预处理的蛋白样品上样,恒压 60 V 进行 SDS-PAGE 电泳,电转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉-PBST 室温封闭 1 h 后,加入羊抗大鼠 HGF 抗体(1∶1 000)、羊抗大鼠 c-met 抗体(1∶1 500)、羊抗大鼠 GAPDH(1∶1 000)、4 ℃孵育过夜,再与 HRP 标记的兔抗羊 IgG 37 ℃孵育 1 h,按 ECL 发光试剂盒说明书操作,凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)曝光、照相。目的蛋白量以 GAPDH 相对量表示。

1.4 激光共聚焦检测肝脏 MSCs 含量

取肝脏组织,做冰冻切片,4% 多聚甲醛固定后 PBS 洗涤 3 次,封片。移植 MSCs 中均表达 GFP,直接激光共聚焦显微镜下观察 MSCs 分布(绿色荧光细胞)情况,每张切片随机选 10 个视野,计数 MSCs 的数量。

1.5 统计学方法

使用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,定量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)进行描述。2 组间比较使用 t 检验,3 组间比较使用单因素方差分析。

2 结果

2.1 龟板水煎液饲养对移植 MSCs 肝脏归巢的影响

激光共聚焦法检测定植于肝脏组织 MSCs 数量。根据是否使用龟板水煎液饲养及是否移植 MSCs,分为龟板移植组,普食移植组,龟板假手术组,普食假手术组。每个视野下 MSCs 平均数:龟板移植组(22.62 ± 2.03)较普食移植组(15.34 ± 1.87)明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。龟板假手术组及普食假手术组均未检测到移植 MSCs。

2.2 龟板水煎液饲养对大鼠肝脏 HGF 蛋白表达的影响

Western blot 检测龟板移植组、普食移植组、龟板假手术组、普食假手术组肝脏组织 HGF 蛋白水平,分别为:龟板移植组(0.64 ± 0.04),普食移植组(0.41 ± 0.03),龟板假手术组(0.60 ± 0.05),普食假手术组(0.36 ± 0.02)。在正常大鼠及受体大鼠中,龟板水煎液饲养均明显增加肝脏HGF蛋白水平(图 1)。

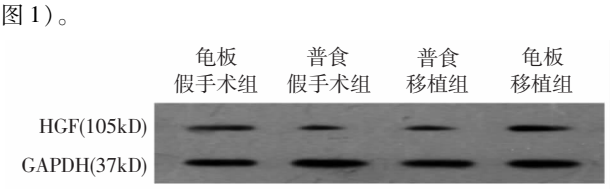


图 1 Western blot 检测肝脏组织 HGF 蛋白水平

2.3 阻断 HGF/c-met 对 MSCs 肝脏归巢的影响

使用 HGF 受体 c-met 的 siRNA 腺病毒转染移植 MSCs,Ad-si/c-met 转染组 c-met 蛋白水平(0.12 ± 0.01)明显低于空病毒转染组(0.52 ± 0.04)及未转染组(0.54 ± 0.05),差异有统计学意义($P < 0.05$)。同时,各组肝脏组织每个视野下 MSCs 平均数:龟板 Ad-si/c-met 转染组(14.84 ± 1.84),龟板空病毒转染组(21.89 ± 1.95),龟板未转染组(22.51 ± 2.67)。提示 Ad-si/c-met 转染 MSCs 可明显减少龟板水煎液饲养诱导的移植 MSCs 肝脏归巢。

3 讨论

本研究发现,龟板水煎液饲养与普通饮食相比,可促进静脉移植的 MSCs 向肝脏定植,即增加 MSCs 的肝脏归巢。龟板是龟科动物乌龟的腹甲,既往研究发现龟板的醋酸乙酯部位分离出来的成分含有地塞米松类似的甾类成分,甾类化合物主要是甾醇脂和甾酮类。具有促进干细胞增殖、迁移等多种作用。近来的研究发现,给予龟板口服液后能促进循环中的 MSCs 在损伤脊髓内存活和增殖,减轻脊髓损伤和脑缺血后神经损伤和病理改变,并增强神经干细胞增殖。龟板亦能增强 MSCs 移植后分化为神经元。在脑缺血的大鼠给予移植 MSCs 并给予龟板口服液,和没有给予龟板口服液的大鼠比较能明显促进 MSCs 在缺血脑纹状体内存活和增殖,且能增强 MSC 移植后分化为神经元[4]。这些发现均证实,龟板可以影响干细胞的增殖分化并进而参与器官的损伤和修复。除增殖分化能力外,组织特异性的归巢是影响干细胞移植治疗效果的另一重要因素,本研究的发现为寻找促进 MSCs 肝脏归巢提供了新的思路。

龟板的化学成分复杂,同时 MSCs 趋化、迁移的影响因素众多,因此阐明龟板促 MSCs 肝脏归巢的机制相对复杂[5-6]。但近来研究发现,肝细胞生长因子及其唯一受体 c-met 在介导干细胞优势分布中扮演重要角色[7]。本研究通过检测肝脏组织局部 HGF 水平发现,龟板饲养可增加肝脏组织的 HGF 含量,推测 HGF 表达增高可能与 MSCs 肝脏归巢增多关系密切。通过基因沉默技术低表达移植 MSCs 的 c-met,部分阻断 HGF/c-met 轴后,发现 c-met 低表达可明显减弱龟板饲养诱导的 MSCs 肝脏归巢。HGF 是间质细胞衍生的一种促进细胞有丝分裂多功能因子,具有较强的抗凋亡、抗纤维化,促进血管再生,调节细胞生长和运动,促进多种细胞组织形态的发生的作用,在组织形成、损伤修复中起着重要的作用。HGF 配体为 c-met,已经证实 MSCs 表达 c-met[8]。HGF 和 c-met 二者结合后有三条主要的信号途径,分别是 PI3K/Akt、P38MAPK 和

(下转第 266 页)

安全、操作简单、微创化治疗方法，值得推广。

目前手术内固定治疗适应证为：①多发肋骨骨折伴骨折明显移位、剧烈胸痛；②连枷胸；③有明显血气胸需行剖胸探查者；④胸廓明显畸形需纠正者。既往认为单根单处肋骨骨折如无严重错位或并发症不主张手术治疗，但这些患者疼痛难忍，严重影响生活质量，患者往往强烈要求手术治疗。如我科 6 例单根单处肋骨骨折因疼痛强烈要求手术治疗，手术切口只有 3 cm，手术均未进胸腔，手术创伤小，术后当天疼痛明显缓解，第 2 天即可下地活动，一周后顺利出院，无任何并发症。故肋骨骨折切开复位的适应证有扩大趋势[11]。

总之，肋骨骨折的发生率高，大部分患者经保守治疗可治愈，但均存在不同程度的肺容量的减小和胸廓塌陷畸形，而临床试验表明使用形状记忆环抱接骨板内固定治疗肋骨骨折具有创伤小、固定可靠、能达到骨折解剖复位、并发症少、疼痛缓解迅速等优点，是临床治疗肋骨骨折的发展方向和趋势。

[参考文献]

[1] 孙玉鄂. 胸外科手术学[M]. 北京：人民出版社，2004：509 - 510.

[2] 费 军，余洪俊，黄显凯，等. 连枷胸手术内固定的选择和意义[J]. 创伤外科杂志，2003，5(4)：310.

[3] 黎介寿，吴孟超. 手术学全集(胸外科卷)[M]. 北京：人民军医出版社，1995：130.

[4] Yamamoto L, Schroeder C, Morley D, et al. Thoracic trauma: the deadly dozen[J]. Crit Care Nurs Q, 2005, 28(1): 22 - 40.

[5] 孙 博，李 冀，陈长河. 肋骨骨折治疗进展[J]. 华北煤炭医学院学报，2010，12(6)：806.

[6] 王 磊，李元明，木沙由夫. 记忆合金环抱式接骨板治疗多发性肋骨骨折临床应用[J]. 重庆医科大学学报，2011，36(5)：617 - 618.

[7] 肖接承，华 菲，朱 江，等. 镍钛合金环抱器肋骨内固定在合并连枷胸的多发伤救治中的应用价值[J]. 中国急救医学，2007，27(9)：806.

[8] 范学辉，周重宝，朱卫杰，等. TINI 形状记忆合金治疗各类骨折初步报告[J]. 中华创伤外科杂志，2002，4(1)：72.

[9] 李向东，周灵飞，鲜渝斌. 连枷胸的手术与保守治疗的回顾性分析[J]. 重庆医学，2011，40(23)：2330 - 2331.

[10] 王向东，郝福军，吴明君，等. 镍钛记忆合金环抱器手术治疗多发性肋骨骨折 72 例疗效观察[J]. 浙江创伤外科，2012，17(1)：108 - 109.

[11] 李智勇，蔡昌宏，王 锐，等. 多根多处肋骨骨折的内固定治疗[J]. 陕西医学杂志，2009，38(2)：195.

(编辑：左艳芳)

(上接第 263 页)

ERK，且在干细胞内均可表达和活化[9]。Kucia 等[10]发现，在缺血性脑损伤的小鼠模型中，HGF 诱导骨髓干细胞向损伤的神经组织分布并促进神经组织再生，将骨髓干细胞用抗 c-met 抗体预处理后，可减少骨髓干细胞向损伤的神经组织分布。Trapp 等[11]研究也同样发现，HGF/c-met 能够介导扩增的骨髓间充质干细胞向损伤组织的优势分布。提示 HGF/c-met 轴能够介导干细胞的靶向分布。

综上所述，我们的研究提示龟板治疗可能通过 HGF/c-met 轴介导 MSCs 优势分布于肝脏组织。但龟板水煎液成分复杂，对其有效成分的探讨，及其在细胞模型中的作用还有待下一步细胞实验研究。

[参考文献]

[1] Hwang S, Hong HN, Kim HS, et al. Hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a rat model of thioacetamide-induced liver cirrhosis[J]. Cell Biol Int, 2012, 36(3): 279 - 288.

[2] Chen DF, Zeng HP, Du SH, et al. Extracts from Plastrum testudinis promote proliferation of rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. Cell Prolif, 2007 40(2): 196 - 212.

[3] 张刚庆，方驰华，池达智，等. 共同培养诱导骨髓基质干细胞向肝细胞分化的研究[J]. 中华肝脏病杂志，2005，13(9)：648 - 651.

[4] 杜少辉，陈东风，李伊为，等. 龟板对脑缺血大鼠骨髓间充质干细胞移植后转分化为神经元的影响[J]. 中华医学杂志，2005，85(3)：205 - 207.

[5] 李熙灿，谢学明，黄春花，等. 龟板醇提物对大鼠骨髓间充质干细胞氧化损伤的修复及其抗脂质过氧化作用[J]. 中草药，2007，38(7)：1043 - 1046.

[6] 朱志立，米 娜，李 靖，等. 趋化因子受体 CXCR4 在骨髓间充质干细胞中的表达[J]. 局解手术学杂志，2010，19(6)：462 - 464.

[7] Kanemura H, Iimuro Y, Takeuchi M, et al. Hepatocyte growth factor gene transfer with naked plasmid DNA ameliorates dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats[J]. Hepatol Res, 2008, 38(9): 930 - 939.

[8] Liu X, Shen W, Yang Y, et al. Therapeutic implications of mesenchymal stem cells transfected with hepatocyte growth factor transplanted in rat kidney with unilateral ureteral obstruction[J]. J Pediatr Surg, 2011, 46(3): 537 - 545.

[9] Hua ZY, Song J, Cheng F, et al. The effect of hepatocyte growth factor on the initiation phase of liver regeneration after cold ischemia in a rat model of small-for-size liver transplantation [J]. Hepatogastroenterology, 2012, 59(117): 1548 - 1552.

[10] Kucia M, Zhang YP, Reca R, et al. Cells enriched in markers of neural tissue-committed stem cells reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood following stroke[J]. Leukemia, 2006, 20(1): 18 - 28.

[11] Trapp T, Kogler G, El-Khattouti A, et al. Hepatocyte growth factor/c-MET axis-mediated tropism of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells for neuronal injury[J]. J Biol Chem, 2008, 283(47): 32244 - 32253.

(编辑：左艳芳)