龟板促 MSCs 肝脏归巢在大鼠肝损伤后修复中的作用研究

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** 探讨龟板促 MSCs 肝脏归巢在大鼠肝损伤后修复中的作用。**方法** 原代培养大鼠 MSCs,腺病毒(携带绿色荧光蛋白)转染标记 MSCs,激光共聚焦检测归巢至肝脏组织的 MSCs 含量,Western blot 检测肝脏肝细胞生长因子(HGF)水平,天狼星红染色法检测肝脏Ⅰ型胶原面积,胃酶酸解法检测肝组织羟脯氨酸(Hyp),全自动生化分析仪检测血清白蛋白、谷丙转氨酶(ALT)水平。**结果** 肝损伤后肝脏 HGF 含量增加,向肝脏定植的 MSCs 增加,同时龟板饲养可进一步促进损伤肝组织表达 HFG,促进移植的 MSCs 向肝脏定植。另外,龟板饲养可降低肝损伤模型大鼠肝脏Ⅰ型胶原面积和 Hyp 及血清 ALT 水平,增高血清白蛋白含量。**结论** 龟板饲养可能通过促 MSCs 向肝脏组织归巢加速肝损伤修复。

[关键词] 龟板;骨髓间充质干细胞;肝脏;损伤;修复
[中图分类号] R575;R285.6 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2013)02-0151-03

Effects of mesenchymal stem cells homing to liver promoted by plastrum testudinis on repairing of rat liver injury

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 mesenchymal stem cells homing to liver promoted by plastrum testudinis on repair of rat liver injury. **Methods** Primary MSCs were cultured. The green fluorescent protein adenovirus transfection was used to mark the transplantation of MSCs, and laser confocal was used to detect the distribution of MSCs in liver tissue. Liver HGF protein expression was test by western blot. The area of liver type Ⅰ collagen was detected by sirius red staining and Hyp was estalished by gastric enzymes assay method in hepatic tissue. Automatic biochemical analyzer was used to test serum albumin and ALT. **Results** The level of HGF protein and MSCs transplantation homing to liver were increased after liver injury. In addition, the plastrum testudinis breeding promoted the expression of HGF protein in rat liver and MSCs liver homing. Furthemore, the plastrum testudinis breeding decreased area of type I collagen, levels of Hyp and serum ALT, while increased serum albumin. **Conclusion** Plastrum testudinis feeding may promote injuried liver repairing through increasing MSCs liver tissue homing.

Keywords: plastrum testudinis; mesenchymal stem cells; liver; injury; repairing

在中医临床中,龟板对促进肝脏再生、修复均有明显的治疗效果,同时在多种治疗肝病的中药方剂中龟板也均是重要的组成部分。但龟板对肝损伤后的抗纤维化和肝功能修复是否有益处,目前尚不清楚。既往研究提示,骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)在损伤肝脏结构和功能修复中均发挥重要作用,参与肝脏损伤后的抗纤维化和解毒功能修复等过程[1]。我们前期的研究发现,龟板饲养可促进 MSCs 向肝脏定植。因此,本研究拟通过 CCl_4 肝损伤模型研究龟板饲养对大鼠肝脏功能修复和抗纤维化的作用,旨在为肝损伤修复的研究提供新的实验依据。

DOI:10.11659/jjssx.1672-5042.201302011
[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] 2012-12-28 [修回日期] 2013-01-18

1 材料与方法

1.1 骨髓间充质干细胞培养、标记及移植

按文献[2]方法培养原代 MSCs。颈椎脱臼法处死大鼠,取股骨,PBS 吹吸骨髓,DMEM-L 培养基稀释。2 500 r/min 密度梯度离心后收集单个核细胞,PBS 洗涤去除分离液后接种于 24 孔板内。培养条件:DMEM-L(含 10% FBS)培养基,在 5% CO_2,37 ℃饱和湿度。细胞贴壁生长,待 90% 融合时,2.5 g/L 胰蛋白酶消化,DMEM-L 重悬,按 1×10^4 cm^{-3} 传代培养,收集第 3~4 代 MSCs 备用。腺病毒(携带绿色荧光蛋白)转染 MSCs,扩增培养后消化、收集,PBS 重悬后制成单细胞悬液,取 MSCs 悬液 1 mL(含细胞数约 1×10^6),经大鼠尾静脉注射移植,移植 MSCs 均每 2 d 注射 1 次。

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(均购自第三军医大学实验动物中心)。选择常见的 CCl_4 肝损伤动物模型为细胞移植受体。2% CCl_4 按照 2.5 mL/kg 灌胃,每日 1 次,连续 3 d,正常对照组相同剂量的生理盐水灌胃。肝损伤模型建

立后,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,分上午和下午 2 次灌胃 1 周;普食组则给予等体积蒸馏水灌胃。其中龟板口服液采用水煎法制备。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,合 4 g/kg,灌前稀释成 4 mL。

1.3 Western blot 检测 HGF 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 4 ℃的 EP 管中,20 000 × g 离心 15 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 对其进行 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 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 中均转染表达 GFP 的腺病毒,因此,激光共聚焦显微镜下计数发绿色荧光细胞即为移植 MSCs。计数方法:每张切片随机选 10 个视野,计数各个视野 MSCs 个数后取平均值。

1.5 肝脏纤维化及功能指标检测

取肝脏组织,10% 福尔马林溶液固定过夜,石蜡包埋后按 5 μm厚连续切片。切片脱蜡至水,取 0.1 g 天狼星红(美国 santa 公司)溶于 100 mL 苦味酸饱和液中,苦味酸天狼星红染液浸染 1 h,PBS 冲洗,苏木素染核。封片后在偏振光显微镜下随机观察 10 个视野,以 Photoshop 软件的 Histogram 功能分析各组织内Ⅰ型胶原所占面积的百分数。肝组织 Hyp 是由胶原和弹性蛋白水解所得的一种氨基酸,约占胶原重量的 14% ,其他蛋白质中罕见,Hyp 含量随着肝纤维化加重而增多。采用胃酶酸解法检测肝组织 Hyp[3],根据测得的 A560 和标准曲线计算出每克肝组织的 Hyp 的含量。腹主动脉取血,分离血清,全自动生化分析仪检测血清白蛋白、谷丙转氨酶(ALT)水平。

1.6 统计学方法

使用 SPSS 13.0 软件进行数据的统计分析,以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)描述定量资料。2 组间比较采用 t 检验,3 组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 龟板对肝损伤大鼠肝脏修复的影响

大鼠肝损伤模型建立后,分别观察普食及龟板饲养 0 d、7 d、14 d 及 28 d 的肝脏Ⅰ型胶原面积百分比、Hyp 含量,及血清白蛋白、ALT 水平(图 1)。肝损伤模型建立后(0 d),2 组肝脏Ⅰ型胶原面积百分比、Hyp含量,及血清白蛋白、ALT水平均无统计学差异。14 d 及 28 d 时,与普食组相比,龟板组肝脏Ⅰ型胶原面积百分比、Hyp 含量及 ALT 水平明显降低,血清白蛋白水平明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$)。

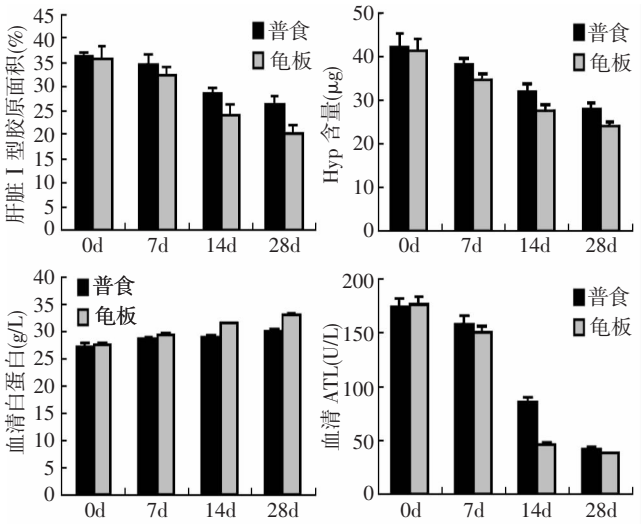


图 1 2 组 CCl_4 肝损伤后肝纤维化及修复相关指标比较($n=6$)

2.2 龟板对肝损伤大鼠肝脏 HGF 蛋白表达的影响

Western blot 检测正常及 CCl_4 损伤大鼠肝脏组织 HGF 蛋白。正常组普食喂养(0.35 ± 0.03),正常组龟板喂养(0.58 ± 0.04),损伤组普食喂养(0.62 ± 0.04),损伤组龟板喂养(0.76 ± 0.03),与正常组相比,无论普食或龟板喂养,肝损伤大鼠肝脏 HGF 蛋白表达明显增加;与普食喂养组相比,无论正常或肝损伤大鼠,龟板喂养明显增高肝脏 HGF 蛋白表达,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 龟板对移植 MSCs 向肝损伤大鼠肝脏定植的影响

激光共聚焦法检测定植于肝脏组织 MSCs 数量。每个视野下 MSCs 平均数:正常组普食喂养(14.22 ± 1.85),正常组龟板喂养(21.45 ± 1.94),损伤组普食喂养(18.68 ± 2.34),损伤组龟板喂养(27.06 ± 1.45)。与正常组相比,无论普食或龟板喂养,肝损伤后移植 MSCs 肝脏定植增加;与普食喂养组相比,无论正常或肝损伤大鼠,龟板喂养明显增高移植 MSCs 的肝脏定植,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

通过对大鼠 CCl_4 肝损伤模型的研究,我们发现龟板饲养可以明显减少肝纤维化程度相关指标,如Ⅰ型胶原面积百分比、Hyp 含量,并可降低肝功能损伤指标 ALT 水平,同时增加肝脏活性指标血清白蛋白水平,为中药龟板促进急性肝损伤的修复提供了实验依据。我们前期研究发现龟板可促进移植 MSCs 向肝脏归巢。因此,本研究中是以 MSCs 移植做为背景研究龟板对损伤肝的修复作用。那么,龟板促损伤肝修复的作用是否与 MSCs 有关呢? 近来的研究发现,给予龟板口服液后能促进循环中 MSCs 向受损的脊髓组织归巢,

并在其内增殖,从而减轻神经损伤和病理改变,并增强神经干细胞增殖[4-5]。同时,龟板也可以增强移植 MSCs 归巢后向神经元细胞分化。对脑缺血的大鼠进行 MSCs 移植治疗时,给予龟板口服液和对照组大鼠相比,可明显增强移植 MSCs 在缺血脑纹状体内的归巢和增殖[6]。这些发现均证实,龟板可通过影响干细胞的增殖分化从而参与器官的损伤和修复。但是否对肝脏组织中的 MSCs 也有类似作用,目前尚无直接的实验证据。

另外,在本研究中还发现肝损伤后 HGF 表达明显增加,而龟板饲养可进一步促进 CCl_4 肝损伤大鼠肝脏的 HGF 表达。一般认为,损伤局部的微环境和干细胞之间的相互作用促使干细胞向损伤部位定向优势分布。近来研究发现,肝细胞生长因子能介导干细胞优势分布。HGF 是一种间质源性生长因子,最初是从大鼠血浆和血小板中分离得到,是一种分泌型肝素亲和糖蛋白,具有重要的抗纤维化作用[7]。其配体 c-met,已经证实 MSCs 表达 c-met。在本研究中,可以观察到肝损伤后 HGF 水平明显增高,这与 Kanemura 等[8]的研究相符,在肝脏发生损伤后,肝脏间质细胞分泌肝细胞生长因子并激活原癌基因 c-met 的表达,因此血清 HGF/c-met 水平高于正常水平,而我们的结论是基于肝组织 HGF 水平测定所得,有更直接的证据意义。Kucia 等[9]在对缺血性脑损伤小鼠模型的研究中发现,HGF 可诱导 MSCs 向损伤的神经组织归巢并促进神经组织的再生,但用抗 c-met 抗体预处理 MSCs 后,即封闭 HGF 的受体后,MSCs 向损伤神经组织的归巢明显减少。该研究提示 HGF/c-met 轴在介导 MSCs 向损伤组织归巢中发挥重要作用。同样,Trapp 等[10]也发现 HGF/c-met 轴能介导 MSCs 向损伤组织的优势归巢。因此,我们推测 MSCs 在 HGF/c-met 轴介导下,能够优势归巢于肝脏损伤部位,也就是说,如果损伤部位的肝组织 HGF 含量增加,可以促进 MSCs 进入肝脏损伤部位。我们发现龟板饲养可进一步增加损伤肝脏的 HGF 水平,同时促进移植的 MSCs 向肝脏定植,这与上述理论推测相符,也为龟板促肝脏损伤修复的机制研究提供了新的线索。

综上所述,我们的研究提示龟板治疗可能通过 HGF/c-met 轴上调 MSCs 优势分布于肝脏组织,从而促进损伤肝修复。但上述可能机制只是相关性研究,还需要基因功能表达或抑制的研究进一步明确 HGF/c-met 轴是否在上述过程中发挥了关键作用。

[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] 张刚庆,方驰华,池达智. 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.

[3] Reif S, Aeed H, Shilo Y, et al. Treatment of thioacetamide-induced liver cirrhosis by the Ras antagonist, farnesylthiosalicylic acid[J]. J Hepatol, 2004, 41(2): 235 - 241.

[4] 李玉美,余资江. 骨髓间充质干细胞移植治疗脊髓损伤的研究进展[J]. 局解手术学杂志, 2010, 19(1): 27 - 29.

[5] 阮 智,黄 慧,孙建华,等. 异体骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(36): 102 - 105.

[6] 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.

[7] 刘金霞,孙殿兴,曹治宸. HGF/c-Met 系统在大鼠肝纤维化转归中作用及其机制[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(6): 656 - 659.

[8] 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.

[9] 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.

[10] Trapp T, K ögler 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:杨 颖)

欢迎使用《局解手术学杂志》稿件远程处理系统

为了提高编辑、出版工作效率,缩短论文发表周期,加强作者、读者、编者及审稿专家的联系,《局解手术学杂志》开通了互联网在线投稿、审稿、查询系统,本系统包括作者在线投稿查稿、专家在线审稿、编辑在线办公三部分。作者可通过网站投稿并查询稿件处理情况,审稿专家可实现网上审稿。网址为 http://www.jraos.com.cn。本刊编辑部欢迎广大作者、读者访问本刊网站并使用该系统。如果您在投稿中遇到什么问题,或者对本系统及网站有好的意见和建议,请及时联系我们,谢谢您的大力支持!

电话:(023)68752649,68752251; QQ 群:78472559; E-mail:jjssxzz@yahoo.com.cn

《局解手术学杂志》编辑部