

文章编号: 1005-6947(2012)07-0821-04

· 基础研究 ·

骨髓 c-Kit⁺Lin⁻ 细胞移植改善肝纤维化的实验研究

张守华¹, 肖菊花², 邓庆强¹, 徐维¹, 胡瞞鑫¹, 谌卫龙¹, 陶强¹

(1. 江西省儿童医院 普通外科, 江西 南昌 330006; 2. 江西省妇幼保健院 超声科, 江西 南昌 330006)

摘要

目的: 探讨骨髓 c-Kit⁺Lin⁻ (CD117) 细胞在体外扩增后移植治疗小鼠肝纤维化的效果。

方法: 采用免疫磁珠分选法分离小鼠骨髓 CD117 细胞, 将细胞在添加了肝细胞生长因子 (HGF), 干细胞因子 (SCF), Flt-3 配基 (FL), 促血小板生成素 (TPO), 白血病抑制因子 (LIF) 的无血清培养基中培养扩增; 制备同种小鼠的酒精性肝纤维化模型, 成模后的小鼠分别尾静脉注射体外扩增的 CD117 细胞 (移植组) 或等体积缓冲液 (模型组), 同时以正常小鼠为对照 (正常组), 30 d 后观察各组小鼠的肝脏病理改变以及肝功能与肝纤维化指标。

结果: 添加上述细胞因子的无血清培养基能有效扩增 CD117 细胞; 正常组小鼠肝脏无病理改变, 模型组呈明显的肝细胞变性和纤维化改变, 移植组较模型组的病变程度明显减轻; 与正常组比较, 模型组和移植组均有不同程度的血清谷丙转氨酶 (ALT), 谷草转氨酶 (AST), 透明质酸 (HA), 层黏连蛋白 (LN) 升高和清蛋白 (ALB) 降低, 但移植组上述指标改变较模型组明显减轻, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

结论: 合适剂量的 HGF+SCF+FL+TPO+LIF 细胞因子组合能有效扩增 CD117 细胞; CD117 细胞移植对小鼠肝纤维化有治疗作用。

关键词

肝硬化; 干细胞移植; CD117; 疾病模型, 动物

中图分类号: R575.2

文献标识码: A

[中国普通外科杂志, 2012, 21(7):821-824]

Bone marrow c-Kit⁺Lin⁻ cells transplantation for hepatic fibrosis: an experimental study

ZHANG Shouhua¹, XIAO Juhua², DENG Qingqiang¹, XU Wei¹, HU Manxin¹, CHEN Weilong¹, TAO Qiang¹

(1. Department of General Surgery, Jiangxi Children's Hospital, Nanchang 330006, China; 2. Department of Ultrasound Diagnostics, Jiangxi Maternal and Child Health Hospital, Nanchang 330006, China)

ABSTRACT

Objective: To investigate the therapeutic effect of in vitro amplified bone marrow c-Kit⁺Lin⁻ (CD117) cells transplantation on hepatic fibrosis in mice.

Methods: The bone marrow c-kit⁺Lin⁻ cells of mice were isolated and purified by using magnetic-activated cell sorting (MACS), and then the cells were cultured and expanded in the serum-free medium supplemented with hepatocyte growth factor (HGF), stem cell factor (SCF), Flt-3 ligand (FL), thrombopoietin (TPO) and leukemia inhibitory factor (LIF). The models of alcohol induced hepatic fibrosis were created in mice of the same strain, and the model mice were treated with CD117 cells (transplantation group) or buffer solution of the same volume (model group) by tail vein injection respectively, and the normal mice were used as control

基金项目: 江西省卫生厅科技计划资助项目 (20113098); 江西省科技支撑计划资助项目 (2010BSA11200)。

收稿日期: 2011-08-23; 修订日期: 2012-05-03。

作者简介: 张守华, 江西省儿童医院主治医师, 主要从事小儿外科以及干细胞方面的研究。

通讯作者: 陶强, Email: taoqiang_2008@126.com

(normal group). Thirty days later, the pathological changes of liver and the parameters concerning liver function and hepatic fibrosis of each group were assessed.

Results: The CD117 cells were effectively expanded in the serum-free medium supplemented with the above mentioned factors. No pathological alteration was noted in the liver of normal mice, while the liver of model group presented remarkable hepatocyte degeneration and fibrotic changes, and these alterations were obviously alleviated in transplantation group compared with model group. In both model and transplantation groups, the serum levels of alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), hyaluronic acid (HA) and laminin (LN) increased, and albumin (ALB) decreased with varying degrees compared with normal group, but the alterations of the above parameters in transplantation group were all milder than those in model group, and all differences had statistical significances (all $P < 0.05$).

Conclusion: CD117 cells can be effectively expanded in vitro by the proper combination of cytokins (HGF, SCF, FL, TPO and LIF). CD117 cells transplantation has therapeutic effect on hepatic fibrosis in mice.

KEY WORDS Liver Cirrhosis; Stem Cell Transplantation; CD117; Disease Models, Animal

CLC number: R575.2

Document code: A

[Chinese Journal of General Surgery, 2012, 21(7): 821-824]

骨髓中肝干细胞分化为肝细胞的事实已无可争议。本课题组总结以往的研究成果,并结合自己的系列研究,发现在骨髓干细胞群中 c-kit⁺Lin⁻ (CD117) 干细胞群具有很强的向肝细胞分化的能力^[1-3]。与其他干细胞类似,CD117 细胞的数量有限,有必要寻找一条扩增的相关因子及途径,以满足临床和科研的需要。笔者采用无血清培养基中添加肝细胞生长因子(HGF),干细胞因子(SCF), Flt-3 配基(FL),促血小板生成素(TPO),白血病抑制因子(LIF)的方法扩增骨髓 CD117 细胞,探讨扩增后的 CD117 细胞改善肝纤维化的效果。

1 材料与方法

1.1 免疫磁珠法分离骨髓 c-kit⁺Lin⁻ 细胞

取 5 只 Balb/c 小鼠,无特殊病原体(SPF)级,5~6 周龄,体质量 15~18 g,购自中山大学实验动物中心。小鼠颈椎脱臼处死,置 75% 的乙醇浸泡 15 min;无菌取出解剖双侧股骨,离断两端骨髓,DMEM 培养基液反复冲洗骨髓腔;细胞悬液吹打后加入红细胞裂解液 6 mL,30 μ m 400 目尼龙膜过滤,获取细胞悬液。利用德国 Miltenyi Biotec 公司 Lin⁻ 细胞单抗分离系统(MACS)分离先富集 Lin⁻ 细胞;在此基础上再阳性分选出 CD117 细胞,最后富集得到 CD117 细胞。分离方法按试剂盒(由 Miltenyi Biotec 公司提供)说明书进行。利用流式细胞仪(BD 公司)检测分选的 CD117 细胞,其纯度为 $(85.19 \pm 6.55)\%$,台盼蓝染色细胞活力超过 95%。

1.2 CD117 细胞短期培养

SCF, LIF, FL 和 TPO 购自美国 Peprotech 公司;HGF 购自 eBioscience 公司,培养体系为 STEMPRO-34 SFM 无血清培养基(GIBCO 公司)。其中 CD117 细胞浓度为 $5 \times 10^4/\mu\text{L}$,并加入以上细胞因子,其中 SCF, LIF, FL 和 TPO 终浓度为 50 ng/mL, HGF 终浓度为 10 ng/mL。将以上体系接种于 24 孔培养板中,每孔 1 mL,复种 3 孔,在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , 饱和湿度条件下培养 7 d。培养第 3 天半量换液。第 7 天检测细胞总数,CD117 细胞数。

1.3 肝纤维化动物模型的制备

造模组给予 54 $^{\circ}\text{C}$ 白酒每天灌胃 2 次,共 16 周,同时以 10% (V/V) 白酒为惟一饮料。采用逐步递增灌胃量法:第 1~3 周灌胃量为每次 8 mL/kg,第 4~7 周灌胃量为每次 10 mL/kg,第 8~16 周灌胃量为每次 12 mL/kg。16 周后常规组织病理学检查证实肝纤维化形成,同时检测血清谷丙转氨酶(ALT),谷草转氨酶(AST),清蛋白(ALB),层黏连蛋白(LN),透明质酸(HA)含量。

1.4 小鼠骨髓 CD117 细胞移植和分组

随机选取 6 只肝纤维化小鼠为移植组,均经尾静脉注入扩增的 CD117 细胞悬液 100 μL , 2×10^5 /只。选取 6 只肝纤维化小鼠为模型对照组,经尾静脉注入等体积的缓冲液。另外选取 6 只同种健康小鼠为正常对照组。

1.5 移植后的观察

移植后 30 d,取各组肝组织行常规组织病理学检查苏木素-伊红(HE)染色以及胶原纤维

(VG) 染色, 同时检测小鼠血清 ALT, AST, ALB, LN 以 HA 等指标。

1.6 统计学处理

应用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析。所有数据以均数 ± 标准差表示。各组间数据的比较采用完全随机设计资料的多个样本均数比较。用多组秩和检验法 (Kruskal-Wallis) 检验。P<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞总数和 CD117 细胞数扩增情况

在 7 d 的培养过程中, 细胞总数有明显增加, 显微镜下细胞总数扩增约 45.43 倍, 经流式细胞仪检测, 其中 CD117 细胞数扩增约 8 倍。

2.2 组织病理学变化

正常组小鼠肝脏肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列, 肝小叶轮廓清晰, 肝索排列整齐, VG 染色见中央静脉区有少许粉红色胶原纤维分布 (图 1A-B)。经 16 周乙醇 (白酒) 灌胃的模型组小鼠肝脏肝细胞索紊乱, 胞浆肿大疏松化, 其内细胞核固缩, 肝细胞广泛性的空泡样变性, 并可见点状及灶状坏死, 汇管区有明显红色胶原纤维增生, 并向周围肝小叶内延伸, 并可见假小叶形成, VG 染色可见肝小叶中央静脉壁及汇管区血管壁增厚, 汇管区及肝窦内较多的粉红色胶原纤维 (图 1C-D)。移植 CD117 细胞 30 d 后, 可见移植组小鼠肝细胞形态结构有所恢复, 汇管区胶原纤维以及炎性细胞明显减少 (图 1E-F)。

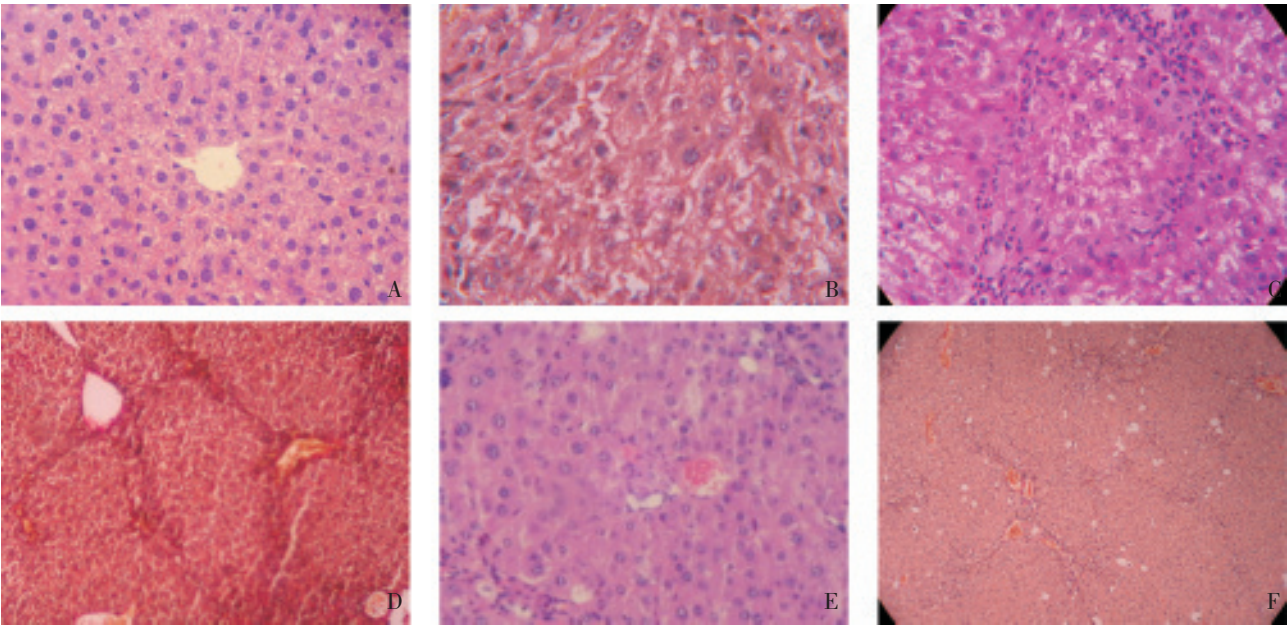


图 1 各组小鼠肝脏病理学改变 A: 正常组肝组织 (HE×400); B: 正常组肝组织 (VG×400); C: 模型组肝组织 (HE×400); D: 模型组肝组织 (VG×100); E: 移植组肝组织 (HE×400); F: 移植组肝组织 (VG×100)
Figure 1 The pathological changes of liver of each group A: Liver tissue of normal group (HE×400); B: Liver tissue of normal group (VG×400); C: Liver tissue of model group (HE×400); D: Liver tissue of model group (VG×100); E: Liver tissue of transplantation group (HE×400); F: Liver tissue of transplantation group (VG×100)

2.3 肝功能变化

移植 30 d 后, 移植组与模型组比较, 肝功能均有明显改善 (均 P<0.05), LN, AST, ALB 已基本接近正常组 (P>0.05) (表 1)

表 1 肝功能及肝纤维化指标的变化 (n=6)					
Table1 The alterations of the parameters of liver function and fibrosis (n=6)					
组别	HA (μg/L)	LN (μg/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALB (g/L)
正常组	71.61 ± 9.96	55.83 ± 12.30	143.69 ± 12.21	43.35 ± 5.61	38.92 ± 4.27
模型组	134.11 ± 34.39 ¹⁾	123.35 ± 29.50 ¹⁾	275.25 ± 33.45 ¹⁾	144.09 ± 12.18 ¹⁾	28.43 ± 2.76 ¹⁾
移植组	83.09 ± 20.19 ^{1), 2)}	59.54 ± 18.07 ²⁾	176.15 ± 21.17 ²⁾	70.63 ± 17.27 ^{1), 2)}	33.95 ± 5.34 ²⁾

注: 1) 与正常组比较, P<0.05; 2) 与模型组比较, P<0.05
1) P<0.05 vs. normal group; 2) P<0.05 vs. model group

3 讨 论

慢性肝炎、肝硬化、门静脉高压症、遗传性及代谢性肝脏疾病等诸多难治性肝病是目前国内外临床的棘手问题。我国约有 1.2 亿人为乙型肝炎病毒携带者, 1 200 万为慢性肝炎、肝硬化患者, 每年死于肝脏疾病的病例有 30 万人。因此, 如何使这类患者获得有效的治疗是一个非常值得重视的问题。肝纤维化是多数终末期肝病发展的共同阶段; 这一阶段若得不到有效治疗, 最终会发展为肝硬化、肝衰竭而导致死亡, 因而逆转或改善肝纤维化过程是肝病治疗的一个重要环节。最近新兴的干细胞技术以及干细胞本身所具备的多向分化能力为治疗肝纤维化提供了新的思路^[4]。

本实验用无血清培养基中添加细胞因子培养扩增 CD117 细胞, 并移植入肝纤维化小鼠体内, 观察肝纤维化改善情况。SCF, FL, TPO 和 LIF 是常用的体外扩增干细胞的因子组合^[5], 应用广泛。SCF 能诱导干/祖细胞由静止期进入增殖期, 通常与其他因子合用。HGF 是骨髓微环境细胞分泌的生长因子之一, 可以刺激细胞增殖, 且在促进细胞运动、管腔形成、形态发生及抗凋亡中都发挥重要作用^[6]。分选出的 CD117 细胞经过一定剂量的 SCF+FL+TPO+LIF+HGF 培养扩增后, 细胞总数有显著增加, 扩增约 45.43 倍; 经流式细胞仪检测, 其中 CD117 细胞数扩增约 8 倍。由此可以看出, 在培养过程中已有一定数量的 CD117 细胞分化, 但因 HGF 因子的存在, 它可诱导干细胞向肝细胞方向分化^[7], 而 LIF 能维持其未分化状态和多向分化潜能^[8], 笔者推测 CD117 细胞可能分化为肝脏前体细胞, 但这还需要进一步证实。本研究已将肝干细胞的数量进行了扩增, 可能在一定程度上解决了临床要求肝干细胞数量不足的问题。

本研究将经过培养的 CD117 细胞移植入肝纤维化小鼠体内, 移植的细胞数量为 2×10^5 /只, 30 d 后发现其肝脏汇管区胶原纤维以及炎性细胞明显减少, 肝细胞形态恢复良好。血清生化及肝纤维化指标方面, 移植组小鼠血清 ALT, AST, LN 以及 HA 下降, ALB 升高。血清转氨酶是肝细胞损伤的敏感指标, 而 HA, LN 的含量变化被

认为是肝纤维化的特征性血清学改变之一, 其浓度增加水平与肝纤维化程度呈正相关。本实验综合分析所得结果, 移植的干细胞可分化成肝细胞, 可以替代受损的肝细胞的解毒、合成及分泌清蛋白等功能, 并且逆转了肝纤维化的进展。笔者推测, 移植的干细胞在分化过程中所分泌的细胞因子可修复肝损伤, 并且抑制细胞凋亡、刺激肝脏细胞增殖。

综上所述, 合适剂量的 HGF+SCF+FL+TPO+LIF 细胞因子组合能显著扩增 CD117 细胞, 此结果为临床应用奠定一定的基础, 因其移植后可改善肝功能及肝纤维化, 而并未失去干细胞增殖、分化和修复肝损伤的能力。随着技术的不断进步, 自体骨髓肝干细胞移植可能会成为治疗末期肝病的主要的方法之一。

参考文献

- [1] 唐浩, 廖彩仙, 周杰, 等. 小鼠 c-Kit⁺lin⁻骨髓细胞移植生成肝细胞的实验研究 [J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(5):567-569.
- [2] 黄勇平, 廖彩仙, 廖欣鑫, 等. 肝内趋化因子 CCL21 和 CCL25 在不同肝组织中的表达变化 [J]. 肝胆外科杂志, 2010, 18(1):54-56.
- [3] 张守华, 廖彩仙. 骨髓衍生肝干细胞的可塑性及应用前景 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(11):2152-2155.
- [4] 蔡云峰, 闵军, 何劲松, 等. 骨髓源性肝干细胞的确认及定向分化的实验研究 [J]. 中国普通外科杂志, 2003, 12(4):287-290.
- [5] 刘强, 郑瑾, 赵星成, 等. Flk3 配体胞外域的原核表达纯化及对脐血 CD34⁺ 细胞的扩增作用 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(19):3476-3480.
- [6] Pedersen M, Löfstedt T, Sun J, et al. Stem cell factor induces HIF-1 α at normoxia in hematopoietic cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 377(1):98-103.
- [7] Ghaedi M, Tuleuova N, Zern MA, et al. Bottom-up signaling from HGF-containing surfaces promotes hepatic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 407(2):295-300.
- [8] Hirai H, Karian P, Kikyo N. Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor[J]. Biochem J, 2011, 438(1):11-23.

(本文编辑 宋涛)