

自体脂肪间充质干细胞对大鼠肝切除术后早期肝再生的促进作用

郑燕¹, 高伟², 孟庆红³, 龙艺尹¹, 韩洪起⁴, 王玉亮¹

(1.天津医科大学第二医院检验科, 天津市泌尿外科研究所, 天津 300211; 2.天津市第一中心医院器官移植中心, 天津 300192; 3.天津市第五中心医院生态城医院检验科, 天津 300467; 4.优赛生命科技发展有限公司, 天津 300000)

摘要 目的: 观察自体脂肪间充质干细胞(ADSCs)对大鼠70%肝部分切除术(PH)后早期残肝再生的促进作用。方法: 健康雄性Wistar大鼠24只随机分为两组, 大鼠70%PH组(模型组, $n=12$)、大鼠70%PH后自体ADSCs移植组(移植组, $n=12$)。比较模型组和移植组术后24、72h血清谷氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST), 获取肝组织, 比较形态学改变及增殖细胞核抗原(PCNA)水平, RT-PCR检测肝细胞生长因子(HGF) mRNA表达水平。结果: 与模型组比较, 移植组术后24h血清ALT水平显著降低, 差异有统计学意义($t=2.925, P<0.05$); 与模型组比较, 移植组术后24、72h血清AST水平显著降低, 差异有统计学意义($t=4.139, 3.323$, 均 $P<0.01$)。光镜下观察移植组术后24、72h肝窦轻度扩张, 肝细胞结构排列紊乱程度较模型组轻。与模型组比较, 移植组术后24、72h PCNA指数显著增高, 差异有统计学意义($t=3.001, 2.825$, 均 $P<0.05$)。与模型组比较, 移植组术后24、72h HGF mRNA表达水平显著升高, 差异有统计学意义($t=2.291, 3.263$, 均 $P<0.05$)。结论: 自体ADSCs移植可促进70%PH后早期残余肝脏再生能力。

关键词 间充质干细胞; 脂肪组织; 大鼠; 肝再生

中图分类号 R392

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2024)02-0152-05

The promotion of autologous adipose derived mesenchymal stem cells on the early liver regeneration following partial hepatectomy in rats

ZHENG Yan¹, GAO Wei², MENG Qinghong³, LONG Yiyin¹, HAN Hongqi⁴, WANG Yuliang¹

(1. Clinical Laboratory, The Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin Institute of Urology, Tianjin 300121, China; 2. Department of Organ Transplantation Center, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China; 3. Department of Clinical Laboratory Medicine, Eco-City Hospital of Tianjin Fifth Central Hospital, Tianjin 300467, China; 4. Unicell Life Science Development Co., Ltd, Tianjin 300000, China)

Abstract Objective: To observe the effect of autologous adipose derived mesenchymal stem cells (ADSCs) on the early liver regeneration after 70% partial hepatectomy (PH) in rats. **Methods:** Twenty-four healthy male Wistar rats were randomly divided into two groups: rat 70% PH (model group, $n=12$) and autologous ADSCs transplantation following rat 70% PH group (transplant group, $n=12$). Serum glutamic aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were compared between model group and transplant group at 24 and 72 h after operation. The morphological changes and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) levels of liver tissues were compared. The mRNA expression levels of hepatocyte growth factor (HGF) were measured by RT-PCR. **Results:** Compared with model group, the serum ALT level in transplant group at 24 h after operation was significantly decreased, and the difference was statistically significant ($t=2.925, P<0.05$). Compared with the model group, the serum AST level in the transplant group was significantly decreased at 24 and 72 h after operation, and the difference was statistically significant ($t=4.139, 3.323$, both $P<0.01$). Under light microscope, the hepatic sinuses in transplant group at 24 and 72 h after operation were slightly dilated, and the disorder of hepatocyte structure was significantly reduced than that in model group. Compared with the model group, PCNA index in the transplant group was significantly increased 24 and 72 h after operation, and the difference was statistically significant ($t=3.001, 2.825$, both $P<0.05$). Compared with the model group, the mRNA expression level of HGF in the transplantation group was significantly increased at 24 and 72 h after operation, and the difference was statistically significant ($t=2.291, 3.263$, both $P<0.01$). **Conclusion:** Autologous ADSCs transplantation can promote early residual liver regeneration after 70% PH.

Key words hepatectomy; adipose tissue; mesenchymal stem cell; liver regeneration

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81470982)

作者简介 郑燕(1999-), 女, 硕士在读, 研究方向: 医学技术; 通信作者: 王玉亮, E-mail: wang_yu_l@163.com。

肝脏是人体中一个复杂的实质性器官,在肝组织/细胞损伤后具有快速而强大的再生能力,以保证其质量、结构及肝脏功能的稳定性^[1]。肝脏再生是肝部分切除术(PH)或活体肝移植(LDLT)成功的关键因素^[2]。相反,残余肝脏再生失败意味着术后肝功能衰竭,这对患者的生命有很大的风险。因此,需要一种新的治疗策略来预防肝功能障碍和增强肝再生能力。研究已证实多潜能脂肪间充质干细胞(ADSCs)具有自我更新及分化能力,是组织器官再生及修复的理想“种子细胞”^[3]。近来研究发现,ADSCs通过抗纤维化及促进肝细胞分化/再生作用成为肝病的一种潜在的治疗策略^[4]。本研究旨在观察自体ADSCs移植对大鼠70% PH后早期残余肝脏再生的促进作用。

1 材料与方法

1.1 材料 无特定病原体级(SPF)、体重200~240 g、雄性Wistar大鼠24只(由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供),大鼠饲养于SPF级动物饲养室,自由饮水。开始实验前至少适应环境1周。严格遵守实验动物的使用和管理原则。杜尔贝科改良伊格尔培养基(DMEM)/F12培养基、胎牛血清(Gibco公司,美国);胰蛋白酶(Sigma公司,美国);细胞标记抗体(BD公司,美国);成骨及成脂细胞诱导试剂(Sigma公司,美国);成软骨细胞诱导试剂(广州赛业生物科技有限公司);兔抗大鼠增殖细胞核抗原(PCNA)抗体(Genetex公司,美国);TRIzol LS RNA提取试剂(Invitrogen公司,美国);引物(Applied Biosystems公司,美国);倒置显微镜(Olympus公司,日本);CO₂培养箱(Thermo公司,美国);超净工作台(上海力康生物医疗科技控股有限公司);全自动生化分析仪(日立株式会社,日本);FACS Calibur流式细胞仪(Becton Dickinson公司,美国);PCR扩增仪(ABI公司,美国)。

1.2 实验分组及模型建立 将24只大鼠随机分为两组:模型组12只,移植组12只。参照文献所述的技术,构建70% PH模型:经吸入异氟烷麻醉后,无菌条件下切除每只大鼠肝左叶及肝中叶,保留肝右叶及尾状叶^[5]。术后大鼠单独饲养并给予10%葡萄糖溶液。

1.3 大鼠ADSCs分离扩增 将移植组Wistar大鼠在严格的无菌操作程序下,取单侧腹股沟脂肪组织,去除肌肉、血管和筋膜后,切碎并加入I型胶原酶消化至乳糜状,离心去除上层乳糜层并加PBS洗涤,加入含10%胎牛血清的DMEM培养基重悬细胞并置于37℃、5% CO₂饱和湿度的CO₂培养箱中扩增传代。大鼠腹股沟缝合后1周伤口愈合,可用作

70% PH后自体ADSCs移植^[6]。

1.4 大鼠ADSCs的鉴定 取融合达90%的第3代ADSCs用胰蛋白酶消化后,制备细胞悬液,4℃条件下以1 000 r/min离心5 min弃上清,PBS重悬细胞。重悬细胞后加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记小鼠抗大鼠CD73、CD90、CD105、CD34及CD45单克隆抗体,于室温下孵育30 min,PBS洗涤细胞后用PBS重悬,应用FACS Calibur流式细胞仪对细胞表面标志物(CD73、CD90和CD105)、造血干细胞表面标志CD34及白细胞共同抗原CD45进行鉴定。Sigma公司脂肪诱导培养基培养ADSCs 2周后,利用油红O染色光镜下观察脂肪细胞球形脂滴形成,鉴定ADSCs体外诱导脂肪细胞分化;Sigma公司成骨诱导培养基培养ADSCs 3周后,利用茜素红染色光镜下观察成骨细胞内矿物质沉积,鉴定ADSCs体外诱导成骨细胞分化。广州赛业公司成软骨诱导培养基培养ADSCs 4周后,利用阿尔新蓝染色光镜下观察成软骨细胞内酸性黏多糖蓝色染色,鉴定ADSCs体外诱导成软骨细胞分化^[6]。

1.5 细胞移植 行70% PH后,模型组经门静脉注射1 mL生理盐水,移植组经门静脉注射剂量为 2×10^6 的自体ADSCs。

1.6 肝功能检测、肝组织形态学及PCNA表达 术后24、72 h每组分别取6只大鼠,采集外周血后,应用全自动生化分析仪检测大鼠血清谷氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平变化以评价肝功能。同时通过深度麻醉处死大鼠采集尾状叶肝组织,行常规病理组织苏木素-伊红(HE)染色光镜下观察肝组织形态学变化。免疫组织化学染色检测PCNA阳性细胞:将组织切片使用兔抗大鼠PCNA抗体(1:1 000稀释)于4℃孵育过夜,之后切片用生物素化二抗(1:2 000稀释)于室温孵育30 min,以细胞核呈界限清楚的棕色反应为PCNA阳性,光镜200倍下计数PCNA阳性细胞数并计算PCNA阳性细胞指数。

1.7 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)分析肝组织中肝细胞生长因子(HGF)mRNA的表达水平 肝组织标本加入Trizol试剂研磨并提取总RNA,逆转录为cDNA。HGF上游引物序列:5'-ACAGCTTTTTCGCTTCGAGCTA-3',下游:5'-CATCAAAGCCCTTGT-CGGGATA-3'; β -actin上游引物序列:5'-GCGCTC-GTCGTCGACAACGG-3',下游:5'-GTGTGCTGCCA-AATCTTCTCC-3'。PCR扩增条件为:95℃预变性15 min,然后95℃变性20 s,60℃退火60 s,共40个循环。记录Ct值,以 $2^{-\Delta Ct}$ 表示目的基因的相对表达水平,其中 $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\beta\text{-actin}}$ 。

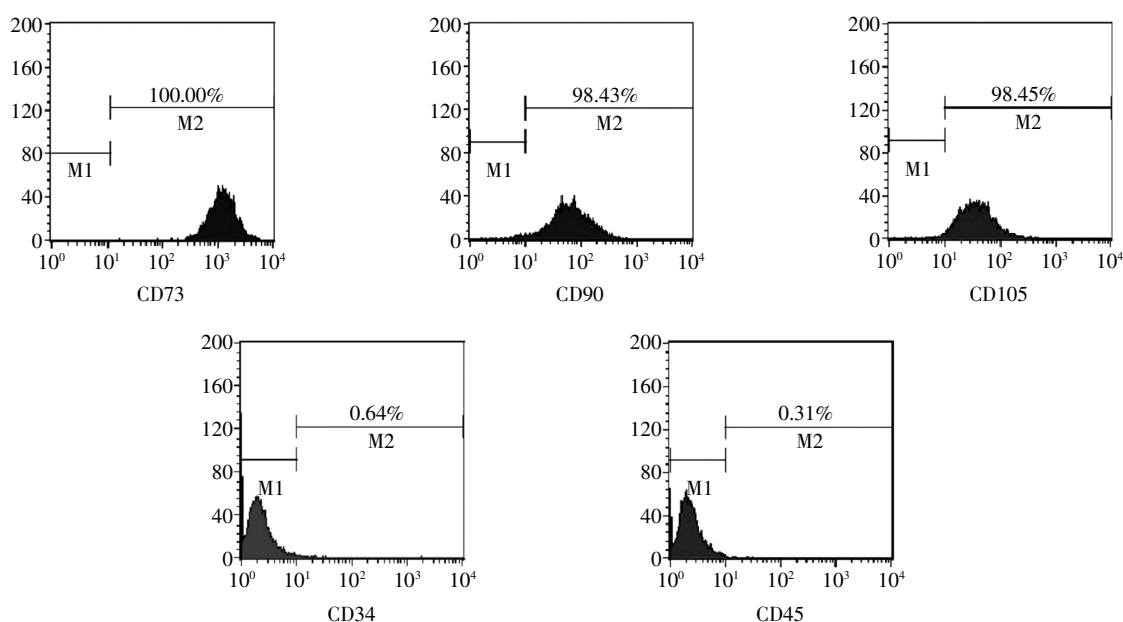
1.8 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件对数据进行统计处理。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ADSCs 鉴定 贴壁培养 ADSCs 呈纺锤形和成纤维细胞样形态。强表达 ADSCs 表面标志 CD73、

CD90 和 CD105, 造血干细胞表面标志 CD34、白细胞共同抗原 CD45 表达均为阴性(图 1)。ADSCs 能够诱导分化为脂肪细胞、成骨细胞及成软骨细胞, 油红 O、茜素红及阿尔新蓝染色鉴定结果见图 2。

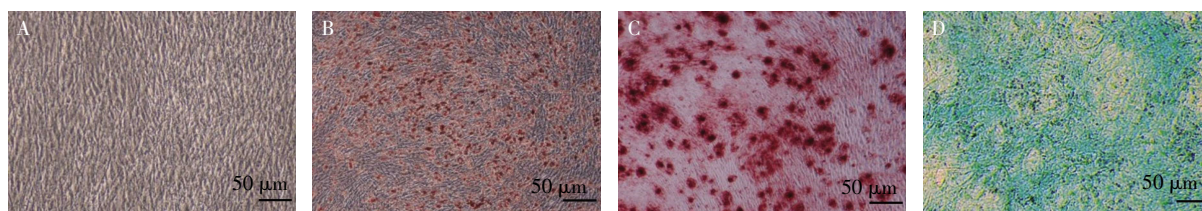
2.2 术后各组肝功能变化 与模型组比较, 移植组术后 24 h 血清 ALT 水平显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组比较, 移植组术后 24、72 h



注: ADSCs: 脂肪间充质干细胞

图 1 流式细胞术检测 ADSCs 表面标志

Fig.1 Detection of ADSCs surface markers by flow cytometry



注: A: ADSCs; B: 脂肪细胞; C: 成骨细胞; D: 成软骨细胞; ADSCs: 脂肪间充质干细胞; 标尺为 50 μm

图 2 ADSCs 多向分化(100 \times)

Fig.2 The multi-lineage differentiation of ADSCs(100 \times)

血清 AST 水平显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 见表 1。

2.3 肝组织形态学变化 模型组术后 24、72 h 肝窦扩张明显, 肝细胞结构排列紊乱, 可见大量空泡形成; 移植组术后 24、72 h 肝窦轻度扩张, 肝细胞结构排列紊乱程度较模型组轻(图 3)。

2.4 术后各组肝细胞 PCNA 变化 与模型组比较, 移植组术后 24、72 h PCNA 指数显著增高, 差异有统计学意义($t=3.001, 2.825$, 均 $P < 0.05$), 见图 4、5。

2.5 肝组织 HGF mRNA 表达水平 与模型组比较, 移植组术后 24、72 h HGF mRNA 表达水平显著

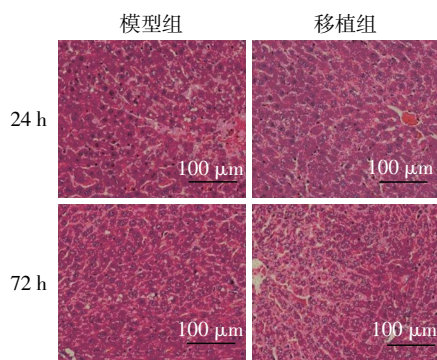
表 1 两组术后 24、72 h 血清 ALT 和 AST 水平比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of serum ALT and AST levels in two groups at 24 and 72 h after operation($\bar{x} \pm s$)

组别	n	术后 24 h		术后 72 h	
		ALT(IU/L)	AST(IU/L)	ALT(IU/L)	AST(IU/L)
模型组	6	434.8 \pm 90.3	691.2 \pm 80.7	166.7 \pm 38.5	386.5 \pm 86.6
移植组	6	297.5 \pm 71.2	484.5 \pm 91.9	139.7 \pm 41.9	240.3 \pm 64.1
t		2.925	4.139	1.162	3.323
P		<0.05	<0.01	>0.05	<0.01

注: ALT: 谷氨酸转氨酶; AST: 天冬氨酸转氨酶

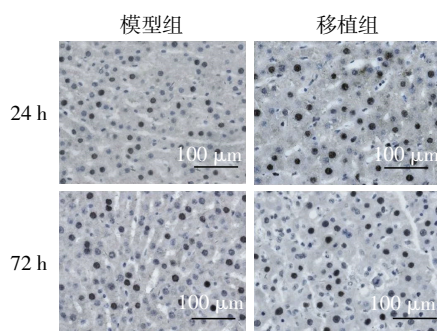
升高, 差异有统计学意义($t=2.291, P < 0.05, t=3.263, P < 0.01$), 见图 6。



注:标尺为 100 μm

图3 大鼠肝部分切除术后 24、72 h 肝脏病理改变(200 \times)

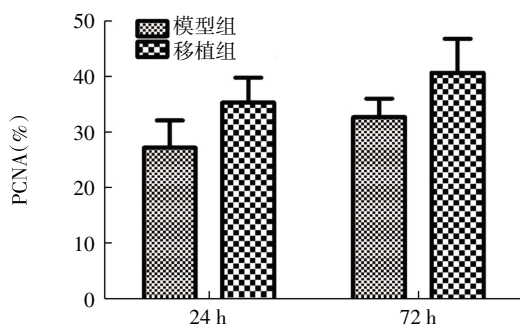
Fig.3 Histopathological changes in the liver at 24 and 72 h after rat PH(200 \times)



注:PCNA:增殖细胞核抗原;标尺为 100 μm

图4 大鼠肝部分切除后 24、72 h 肝脏 PCNA 染色(200 \times)

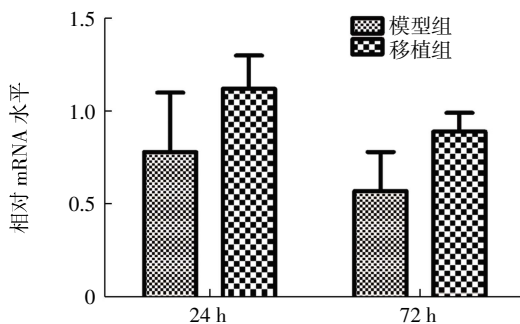
Fig.4 PCNA staining in the liver at 24 and 72 h after rat PH(200 \times)



注:PCNA:增殖细胞核抗原

图5 大鼠肝部分切除术后 24、72 h 肝脏 PCNA 指数水平比较

Fig.5 Comparison of PCNA index levels in the liver at 24 and 72 h after rat PH



注:HGF:肝细胞生长因子

图6 大鼠肝部分切除术后 24、72 h 肝脏 HGF mRNA 表达水平

Fig.6 HGF mRNA levels in the liver at 24 and 72 h after rat PH

3 讨论

近年来,间充质干细胞(MSCs)应用于肝损伤后肝再生的研究报道逐年增多^[7],目前有数百项涉及各种组织来源 MSCs 治疗肝脏疾病的临床试验(www.ClinicalTrials.gov),均已证实细胞治疗的安全性及有效性。MSCs 可以迁移到损伤组织区域,参与免疫调节并通过多种旁分泌/自分泌免疫活性因子刺激组织再生。近十年来,ADSCs 在各种再生医学领域应用受到越来越多的关注。由于其高可及性、含量丰富、多能性、活跃的旁分泌活性以及自体细胞治疗的微创性与安全性,ADSCs 已成为组织工程和再生医学治疗中最具吸引力的 MSCs 类型之一^[8]。此外 Jin 等^[9]研究显示,ADSCs 对体外肝细胞样细胞分化及体内改善肝功能障碍和肝脏再生有显著治疗效果。

PH 后肝脏再生是一个从肝细胞增殖开始到肝组织结构恢复的连续复杂而精密的过程。众所周知 ALT 及 AST 水平是判断肝细胞膜完整性的重要指标,外周血 ALT 及 AST 水平升高是肝细胞受损的敏感生物标志物^[10]。本研究显示,移植组经门静脉给予 ADSCs 治疗后,血清 ALT 及 AST 水平显著低于模型组大鼠,反映出肝细胞损伤得以改善及肝脏功能逐步恢复。PCNA 作为 DNA 聚合酶辅助蛋白,是一种进化上保守的同源三聚体,对 DNA 聚合酶的加工至关重要,参与细胞周期控制与修复,是反映细胞增殖情况的良好指标^[11]。本研究结果显示,ADSCs 治疗显著升高 70% PH 大鼠 PCNA 阳性细胞,表明 ADSCs 移植改善肝功能的原因是通过促进肝细胞增殖及肝组织再生。这与组织病理学结果相一致,模型组大鼠在术后 24 h 出现肝窦扩张明显、肝细胞结构排列紊乱及大量空泡形成。移植组则肝窦扩张、肝细胞结构排列紊乱程度较模型组轻,进一步表明 ADSCs 移植在一定程度上可减轻术后肝脏损伤、促进早期残余肝细胞再生,恢复其组织结构及功能。

HGF 是一种旁分泌多功能细胞生长因子,是最有效的肝细胞生长及 DNA 合成刺激剂,调控细胞有丝分裂并通过抑制转化生长因子(TGF)- β 表达发挥抗纤维化作用,是肝切除或肝损伤后血管生成和肝脏再生的关键因子之一^[12]。最近的报道显示, MSCs 过表达 HGF 可预防大鼠肝功能衰竭和降低死亡率^[13],而 HGF 敲除的 MSCs 对乙酰氨基酚诱导肝功能衰竭小鼠的保护作用显著降低,进一步证实了 HGF 在 MSCs 治疗作用中的重要作用^[14]。本研究结果显示移植组术后 24、72 h HGF mRNA 水平较模

型组显著升高,提示 HGF 在肝再生的启动及增殖阶段发挥作用。经门静脉输注 ADSCs 通过旁分泌作用在早期促进了 HGF 的分泌,支持该方法作为肝再生的有效治疗策略^[15-16]。

总之,本研究的结果表明,自体 ADSCs 移植减轻肝组织病理学损伤并促进了肝脏再生,特别是在 70% PH 后最初 24 h,ADSCs 通过旁分泌机制为组织再生和器官修复提供适宜的微环境,对于治疗与 PH 相关的肝脏肿瘤和肝移植具有重要意义。

参考文献:

- [1] KIMURA M, MOTTEKI H, OGIHARA M. Role of hepatocyte growth regulators in liver regeneration[J]. *Cells*, 2023, 12(2):208.
- [2] YAGI S, HIRATA M, MIYACHI Y, et al. Liver regeneration after hepatectomy and partial liver transplantation[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21):8414.
- [3] QIN Y, GE G, YANG P, et al. An update on adipose-derived stem cells for regenerative medicine: where challenge meets opportunity [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10(20):e2207334.
- [4] NEVENS F, VAN DER MERWE S. Mesenchymal stem cell transplantation in liver diseases[J]. *Semin Liver Dis*, 2022, 42(3):283-292.
- [5] SAITO S, TOGO S, MORIOKA D, et al. A rat model of a repeat 70% major hepatectomy[J]. *J Surg Res*, 2006, 134(2):322-326.
- [6] 师帅南, 李光, 莫春柏, 等. 自体脂肪间充质干细胞对大鼠肾冷缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(9):1616-1618.
- [7] SATILMIS B, CICEK G S, CICEK E, et al. Adipose-derived stem cells in the treatment of hepatobiliary diseases and sepsis[J]. *World J Clin Cases*, 2022, 10(14):4348-4356.
- [8] 杜鹏, 王峰, 陈晓波, 等. 年龄对人脂肪来源间充质干细胞生物学特性的影响[J]. *天津医药*, 2021, 49(10):1009-1013.
- [9] JIN Y P, SHI R F, QI T K, et al. Adipose-derived stem cells show hepatic differentiation potential and therapeutic effect in rats with acute liver failure[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2023, 55(4):601-612.
- [10] LALA V, ZUBAIR M, MINTER D A. Liver function tests[M]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482489/>
- [11] GONZÁLEZ-MAGAÑA A, BLANCO F J. Human PCNA structure, function and interactions[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(4):570.
- [12] PATEL A, ASLAM R, JAMIL M, et al. The effects of growth factors and cytokines on hepatic regeneration: a systematic review[J]. *Cureus*, 2022, 14(4):e24539.
- [13] MENG H F, JIN J D, WANG H, et al. Recent advances in the therapeutic efficacy of hepatocyte growth factor gene-modified mesenchymal stem cells in multiple disease settings[J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(18):4745-4755.
- [14] WANG P, CUI Y, WANG J, et al. Mesenchymal stem cells protect against acetaminophen hepatotoxicity by secreting regenerative cytokine hepatocyte growth factor[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1):94.
- [15] CHOI J S, RYU H A, CHEON S H, et al. Human adipose derived stem cells exhibit enhanced liver regeneration in acute liver injury by controlled releasing hepatocyte growth factor[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2019, 52(4):935-950.
- [16] HU C X, WU Z W, LI L J. Mesenchymal stromal cells promote liver regeneration through regulation of immune cells[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(5):893-903.

(2023-09-08 收稿)

(上接第 137 页)

- [21] CHEN M, ZHANG H, SHI Z, et al. The MST4-MOB4 complex disrupts the MST1-MOB1 complex in the Hippo-YAP pathway and plays a pro-oncogenic role in pancreatic cancer[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(37):14455-14469.
- [22] GRIMM D, BAUER J, WISE P, et al. The role of SOX family members in solid tumours and metastasis[J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 67(Pt 1):122-153.
- [23] ZHANG S, XIONG X, SUN Y. Functional characterization of SOX2 as an anticancer target[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1):135.
- [24] HERREROS-VILLANUEVA M, ZHANG J S, KOENIG A, et al. SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells[J]. *Oncogenesis*, 2013, 2(8):e61.
- [25] ZHANG L, WANG D, LI Y, et al. CCL21/CCR7 Axis contributed to CD133+ pancreatic cancer stem-like cell metastasis via EMT and ERK/NF-kappaB pathway[J]. *PLoS One*, 2016, 11(8):e0158529.
- [26] VAN DUJNEVELDT G, GRIFFIN MDW, PUTOCZKI T L. Emerging roles for the IL-6 family of cytokines in pancreatic cancer[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2020, 134(16):2091-2115.
- [27] BIASCI D, SMORAGIEWICZ M, CONNELL C M, et al. CXCR4 inhibition in human pancreatic and colorectal cancers induces an integrated immune response[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(46):28960-28970.
- [28] ZHAO L, LIU H, LUO S, et al. Associations between genetic variants of KIF5B, FMN1, and MGAT3 in the cadherin pathway and pancreatic cancer risk[J]. *Cancer Med*, 2020, 9(24):9620-9631.
- [29] ZHANG X, WU D, ALDAROUISH M, et al. ETS-1: a potential target of glycolysis for metabolic therapy by regulating glucose metabolism in pancreatic cancer[J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(1):232-240.

(2023-09-22 收稿)