

与肝星状细胞相关的骨髓间充质干细胞 抗肝纤维化机制研究进展

邓延梅, 舒建昌 (广州市红十字会医院 消化内科 510220)

肝硬化是一种严重威胁人类健康的疾病, 是各种慢性肝脏疾病的终末期。每年全球约有140万人死于慢性肝脏疾病^[1]。到目前为止, 原位肝脏移植是治疗终末期肝脏疾病的惟一方法^[2]。然而, 原位肝脏移植受到供肝缺乏、创伤大、费用昂贵、需要长期服用免疫抑制剂等诸多因素的限制, 使其无法在临床广泛开展。目前大量研究表明, 在一定条件下肝纤维化是可以逆转的, 而一旦进展为肝硬化则不能逆转。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有多向分化潜能, 体内外研究显示MSCs具有保护肝细胞和抗肝纤维化的潜在作用, MSCs移植治疗肝纤维化及肝硬化有良好的应用前景^[3]。MSCs抗肝纤维化的机制目前尚未完全明确, 本文旨在探讨与肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)有关的MSCs抗肝纤维化作用机制作一综述。

1 肝纤维化的发生机制

肝纤维化是继发于病毒性肝炎、酒精性肝病、某些代谢性疾病、药物及化学毒物损害、肝寄生虫病等慢性致病因素引起肝脏损伤和炎症后组织修复过程中的代偿反应, 以细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在肝脏内过量沉积为病理特征^[4-5]。HSC的激活与凋亡在肝纤维化的发生与逆转中起关键作用。研究表明, 各种损伤因素作用于肝脏后, 可使HSC激活。HSC被激活后大量增殖, 分泌大量胶原蛋白并表达组织金属

蛋白酶抑制物, 从而抑制金属蛋白酶的活性, 使胶原蛋白等细胞外基质的生成与降解失衡, 生成增多继而降解减少, 导致纤维化发生与发展^[6-7]。

2 MSCs抗纤维化及肝硬化的研究现状

MSCs是骨髓基质中的主要干细胞, 位于骨髓及其他组织(如脂肪)中, 参与基质微环境的组成和造血功能的调控。在特定条件下可诱导分化为脂肪、软骨、骨、肌腱、肝、肾、神经、皮肤、肌肉等10余种成熟细胞。近年来MSCs已成为许多研究的热点, 研究显示^[8-10]MSCs在肝纤维化、肝功能衰竭、肝癌等方面都有巨大的临床应用价值。有研究发现, 应用CCl₄诱导小鼠肝纤维化模型, 通过注射MSCs后, 小鼠肝纤维化程度比对照组轻, 且肝功能优于对照组^[8]。

Gashiyama等^[11]将表达增强型GFP的鼠MSCs移植到CCl₄诱导的鼠肝损伤模型, 于不同时间观察发现大量增强型GFP(+)细胞定位于肝纤维化中心区域, 并且发现其数量随着肝纤维化的修复而减少。Terai等^[12]对9例失代偿期肝硬化患者进行了自体骨髓干细胞移植, 24周后患者总蛋白、白蛋白、Child评分、AFP、增殖细胞核抗原在肝组织中的表达水平均获得显著改善。Salama等^[13]通过对48名终末期肝硬化患者输注自身骨髓间充质干细胞, 发现经过这种治疗后患者肝功能有了很大改善。Nikeghbalian等^[14]也进行了类似的临床试验, 进一步证实了MSCs抗肝纤维化的作用。然而, 在众多研究中也出现了不同的声音, 有研究^[15]称MSCs可以促进肝纤维化的发生与发展。

3 与HSC相关的MSCs抗肝纤维化作用机制

近年来研究表明, MSCs有抗肝纤维化及改善

肝功能的作用,但到目前为止,对于MSCs抗肝纤维化的具体作用机制尚不明确。张国荣等^[16]在体外受损的肝脏条件培养液中成功将MSCs诱导分化为肝细胞,国外也有学者应用不同方法得出类似结果^[17]。Zheng等^[18]将MSCs移植到CCl₄诱导的肝纤维化模型小鼠体内,观察到MSCs可以增强基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)表达,特别是MMP-9,从而降解胶原纤维,这可能是MSCs抗肝纤维化的机制之一。目前还有研究表明,其抗肝纤维化的作用与抑制HSC的活化、增殖,促进HSC的凋亡有关系^[19]。由此看来, MSCs抗肝纤维化的机制是多方面的。

3.1 旁分泌途径 陈国忠等^[20]采用将鼠MSCs与HSC非接触共同培养的方法,证实MSCs可以不通过直接接触而对HSC的激活产生抑制作用,应用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测到MSCs与HSC共同培养的上清液中肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)的浓度上升。研究表明HGF可以抑制HSC活化、增殖并促进其凋亡^[21-22], HGF与靶细胞表面的c-met受体结合后才能发挥作用^[23]。陈国忠等还将c-met多克隆抗体预先封闭HSC表面的c-met受体,再与MSCs共培养,结果显示MSCs失去了对HSC的上述作用,由此看出MSCs抑制HSC的活化、增殖,促进HSC的凋亡可能是通过旁分泌HGF,经HGF/c-met途径发挥作用的^[20]。Hu等通过将MSCs输入到肝纤维化小鼠体内观察到HGF表达升高^[24],进一步证实了MSCs抗肝纤维化的这一机制。还有研究表明, MSCs可以分泌神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)等从而抑制HSCs的活化、增殖并促进其凋亡^[25-26]。

3.2 胱冬肽酶-3和BAX 胱冬肽酶-3是胱冬肽酶家族中最重要的凋亡执行者之一,在细胞凋亡的发生过程中扮演关键角色。研究发现,胱冬肽酶-3是HSC凋亡的重要途径之一^[27]。BAX是BCL-2/BAX家族中的重要凋亡促进因子之一,当BAX含量高于BCL-2时,将诱导细胞凋亡。研究发现在肝纤维化逆转中, BAX表达上调可诱导HSC凋亡^[28]。国

内有学者通过将MSCs和HSC建立非接触共同培养体系,观察到实验组HSC的凋亡率显著高于空白对照组和阴性对照组,并呈时间依赖性,且胱冬肽酶-3和BAX基因的mRNA表达显著高于空白对照组和阴性对照组,并呈时间依赖性^[29]。上调胱冬肽酶-3和BAX的表达可能是MSCs抑制HSC增殖并促进其凋亡的机制之一。

3.3 干扰HSC的细胞周期

3.3.1 王旭东等^[30]在体外建立了MSCs和HSC非接触共培养体系,分别用WST-8、流式细胞仪、RT-PCR等方法检测HSC的抑制率、细胞周期及细胞周期素D1和p27 mRNA的表达,结果发现MSCs可以抑制HSC的增殖,实验组G₀/G₁期细胞显著增加, S期细胞显著减少,细胞周期素D1的表达下降,而p27 mRNA无明显变化。由此可见, MSCs抑制HSC增殖的机制之一可能是MSCs使得HSC的细胞周期素D1表达下降,干扰HSC的细胞周期,使HSC停驻在G₀/G₁期增多, S期减少,从而起到抑制HSC增殖的作用。

3.3.2 国外有学者曾发现Rho激酶(Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase, ROCK)在调节HSC的状态上起着关键作用,其活性与HSC的活性呈正相关,通过抑制Rho激酶的活性可以抑制HSC的活性^[31]。苏思标等通过实验观察到实验组Rho蛋白的表达与空白组及阴性对照组有统计学差异,随着时间的延长呈递减趋势,而p27随着时间的延长呈递增趋势;实验组HSC G₀/G₁期增多, S期减少,与空白对照组及阴性对照组比较差异有统计学意义。由此得出结论: MSCs抑制HSC活性及增殖的机制之一可能是通过RhoA-p27通路调控HSC细胞周期的改变^[32]。

3.4 调节LPS-TLR4通路 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是内毒素的主要成分,其在体内可以直接激活HSC。LPS的主要受体是Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4),其单核苷酸多态性与肝纤维化密切相关。有实验研究证明^[33-34], LPS-TLR4通路在纤维化形成中起重要作用。近来有学者^[35]发现,与MSCs共培养后, LPS导致HSC活化减弱, HSC的TGF- β 、SMA、Col I、MyD88、TLR4表

达下降,以NF- κ B p65胞浆表达为主。证实MSCs可以通过干预LPS-TLR4通路抑制HSC的活化,从而抑制肝纤维化。

4 问题与展望

肝纤维化及肝硬化已经成为全球性难题,近年来国内学者在逆转肝纤维化方面不断做出新的尝试,研究新的方法,希望能找到安全有效的方法以解决这一难题。对MSCs抗肝纤维化的研究和探索为全世界肝病患者带来新的曙光。国外有学者将自体骨髓间充质干细胞输注给肝硬化患者,结果发现接受治疗的患者,均提高了生活质量,无患者出现严重不良反应,血浆白蛋白和血红素都有了提高,患者在移植6个月后,Child分级也有了明显改善^[36]。

虽然MSCs在抗肝纤维化方面取得了一定的成果,但仍存在一些疑问。首先, MSCs抗肝纤维化的具体机制是什么?有研究发现, MSCs在受损的肝脏条件培养液诱导下可以分化为肝细胞^[16]。但也有研究发现, MSCs可以分化为肌成纤维细胞,在肝纤维化形成过程中起促肝纤维化的作用^[37]。由此可见, MSCs抗肝纤维化的机制尚存在很多盲点。其次,将自身的骨髓间充质干细胞输注患者体内后,骨髓间充质干细胞的具体生物学行为有哪些?对其他的器官和组织有无影响?最后,怎样才能合理确定不同患者治疗的时机、时间、途径以及输注的细胞数量?这些问题均有待进一步研究。

MSCs治疗肝纤维化及肝硬化有着明显的优势,如便于获得、移植操作简单、无同种异体移植排异反应等。MSCs治疗肝纤维化及肝硬化方面有着非常广阔的应用前景。

综上所述, MSCs可以通过多种途径抑制HSC活化、增殖,促进其凋亡,从而发挥抗肝纤维化的作用, MSCs在治疗肝纤维化及肝硬化方面有较好的应用前景,但MSCs抗肝纤维化的具体机制尚待进一步研究。

参考文献

[1] Parveen N, Aleem AK, Habeeb MA, et al. An update on hepatic stem cells: bench to bedside[J]. Curr Pharm

Biotechnol,2011,12:226-230.
 [2] Salama H, Zekri AR, Zern M, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in 48 patients with end-stage chronic liver diseases[J]. Cell Transplant,2010,19:1475-1486.
 [3] am Esch JS II, Knoefel WT, Klein M, et al. Portal application of autologous CD133+ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration[J]. Stem Cells,2005,23:463-470.
 [4] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis[J]. Science in medicine,2005,115:209-218.
 [5] Safadi R, Friedman SL. Hepatic fibrosis-role of hepatic stellate cell activation[J]. Med Gen Med,2002,4:27.
 [6] Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis[J]. Gastroenterology,2008,134:1655-1669.
 [7] Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver[J]. Physiol Rev,2008,88:125-172.
 [8] Cho KA, Lim GW, Joo SY, et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice[J]. Liver Int,2011,31:932-939.
 [9] Kuo TK, Hung SP, Chuang CH, et al. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Gastroenterology,2008,134:2111-2121.
 [10] Mueller LP, Luetzkendorf J, Mueller T, et al. Presence of mesenchymal stem cells in human bone marrow after exposure to chemotherapy: evidence of resistance to apoptosis induction[J]. Stem Cells,2006,24:2753-2765.
 [11] Higashiyama R, Inagaki Y, Hong YY, et al. Bone marrow derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice[J]. Hepatology,2007,45:213-222.
 [12] Terai S, Ishikawa T, Omori K, et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy[J]. Stem Cells,2006,24:2292-2298.
 [13] Salama H, Zekri AR, Zern M, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in 48 patients with end-stage chronic liver diseases[J]. Cell Transplant,2010,19:1475-1486.
 [14] Nikeghbalian S, Pournasr B, Aghdami N, et al. Autologous transplantation of bone marrow-derived mononuclear and CD133+ cells in patients with decompensated cirrhosis[J]. Arch Iran Med,2011,14:12-17.
 [15] Russo FP, Alison MR, Bigger BW, et al. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis[J]. Gastroenterology,2006,130:1807-1821.
 [16] 张国荣,董学君,陈烨,等. 损伤肝脏条件培养液体外诱导小鼠骨髓间充质干细胞分化为肝细胞[J]. 中华肝脏病杂志,2007,15:597-600.
 [17] Jang YY, Collector MI, Baylin SB, et al. Hematopoietic stem cells convert into liver cells without fusion[J]. Nat Cell Biol,2004,6:532-539.
 [18] Zheng WD, Zhang LJ, Shi MN, et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hepatic stellate cells during rat hepatic fibrosis and its intervention by IL-10[J]. World J Gastroenterol,2005,11:1753-1758.
 [19] Parekkadan B, van Poll D, Megeed Z, et al. Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells[J].

- Biochem Biophys Res Commun, 2007, 363: 247-252.
- [20] 陈国忠, 姜海行, 陆正峰, 等. 骨髓间充质干细胞共培养对肝星状细胞增殖、凋亡和RohA表达的调控[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18: 1643-1649.
- [21] Wang J, Bian C, Liao L, et al. Inhibition of hepatic stellate cells proliferation by mesenchymal stem cells and the possible mechanisms[J]. Hepatol Res, 2009, 39: 1219-1228.
- [22] Suzumura K, Hirano T, Son G, et al. Adeno-associated virus vector-mediated production of hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis in mice[J]. Hepatol Int, 2008, 2: 80-88.
- [23] Huh CG, Factor VM, Sánchez A, et al. Hepatocyte growth factor c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 4477-4482.
- [24] Hu JJ, Sun C, Lan L, et al. Therapeutic effect of transplanting beta(2)m(-)/Thy1(+) bone marrow-derived hepatocyte stem cells transduced with lentiviral-mediated HGF gene into CCl(4)-injured rats[J]. J Gene Med, 2010, 12: 244-254.
- [25] Schinkothe T, Bloch W, Schmidt A. In vitro secreting profile of human mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells Dev, 2008, 17: 199-206.
- [26] Fang B, Shi M, Liao L, et al. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice[J]. Transplantation, 2004, 78: 83-88.
- [27] Jameel NM, Thirunavukkarasu C, Wu T, et al. p38-MAPK- and caspase-3-mediated superoxide induced apoptosis of rat hepatic stellate cells: reversal by retinoic acid[J]. J Cell Physiol, 2009, 218: 157-166.
- [28] Elsharkawy AM, Oakley F, Mann DA, et al. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis[J]. Apoptosis, 2005, 10: 927-939.
- [29] 梁梓宇, 姜海行, 覃山羽, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞体外诱导肝星状细胞系凋亡[J]. 基础医学与临床, 2010, 30: 836-842.
- [30] 王东旭, 姜海行, 苏思标, 等. 体外共培养大鼠骨髓间充质干细胞对肝星状细胞增殖的影响: Cyclin D1与P27表达调控[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14: 1764-1786.
- [31] Mizunuma K, Ohdan H, Fudaba Y, et al. ROCK inhibitor, Y-27632, inhibits anoxia-reoxygenation-induced contraction of hepatic stellate cells[J]. Transplant Proc, 2003, 35: 111-113.
- [32] 苏思标, 姜海行, 王东旭, 等. 骨髓间充质干细胞调控肝星状细胞RhoA、P27的表达[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17: 3283-3291.
- [33] Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, et al. TLR4 enhances TGF- β signaling and hepatic fibrosis[J]. Nat Med, 2007, 13: 1324-1332.
- [34] Naugler WE, Sakurai T, Kim S, et al. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production[J]. Science, 2007, 31: 121-124.
- [35] 谢婵, 彭亮, 叶一农, 等. 骨髓间充质干细胞通过调节LPS-TLR4通路抑制肝星形细胞活化的作用机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2011, 27: 521-523.
- [36] Kim JK, Park YN, Kim JS, et al. Autologous bone marrow infusion activates the progenitor cell compartment in patients with advanced liver cirrhosis[J]. Cell Transplant, 2010, 19: 1237-1246.
- [37] 何瑶, 熊理守, 黄文生, 等. 间充质干细胞在肝纤维化形成中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26: 1593-1598.

收稿日期: 2011-10-17

• 消息 •

医学科技论文中“渗透浓度”和“渗透压”的正确表述

半透膜隔开的有浓度差别的溶液, 其溶剂通过半透膜由低浓度溶液向高浓度溶液扩散的现象称为渗透(osmose); 为维持溶液与纯溶剂之间的渗透平衡而需要的超额压力称为渗透压(osmotic pressure), 其量的符号为 π 。国际纯粹化学和应用化学联合会(IUPAC)临床化学部和国际临床化学联合会推荐, 在临床化学中使用渗透质量摩尔浓度和渗透体积摩尔浓度两个量, 单位分别是mol/kg和mol/L。过去常用的单位(mOsm/L、mOsm/kg、mOsm/kg H₂O等)尽管沿用已久, 影响深远, 但均属于非法定单位, 应予以废除。法定单位与习用单位之间换算系数均为1, 即1 mOsm/L = 1 mol/L; 1 mOsm/kg = 1 mmol/L; 1 mOsm/kg H₂O = 1 mmol/L。

渗透压是一种特殊形式的压强, 所以其国际单位(SI)与压强相同——“帕斯卡”(pascal), 国际符号为Pa, 中文符号为“帕”, 实用单位为“千帕”(kPa)、“兆帕”(MPa)。渗透压的本质是压强, 而渗透浓度的本质是浓度。根据范特荷甫公式溶液的渗透压不仅和溶液和渗透浓度相关, 还和溶液和温度有关。虽然临床上渗透压和渗透浓度呈正比, 用渗透浓度来表示渗透压有很强的直观性和实用性, 且为临床医生所熟悉。但是按照国际标准规定: 人体体液的渗透压只能用“Pa”或“kPa”为单位, 不能用mol/L、mmol/L, 也不能用Osmol/L为单位。

本刊编辑部