

· 论 著 ·

人脐带间充质干细胞移植对肝硬化大鼠 TGF- $\beta_1$  和 HGF 表达的影响\*金旭鹏<sup>1</sup>, 李晓飞<sup>2</sup>

(1. 辽宁医学院基础学院免疫与微生物学教研室, 辽宁锦州 121000;

2. 辽宁医学院附属第一医院胃肠科, 辽宁锦州 121001)

**摘要:**目的 探讨人脐带间充质干细胞(HUC-MSCs)治疗肝硬化大鼠转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 和肝细胞生长因子(HGF) 的表达及机制。方法 40%CCl<sub>4</sub> 大豆油腹部皮下注射制备肝硬化大鼠模型, 将肝硬化大鼠随机分成模型组、生理盐水组(NS 组)、移植组, 每组 8 只, 另设 8 只作为对照组。移植前、移植后 3 周分别用 Western blot 和 ELISA 法检测大鼠肝组织和血清 TGF- $\beta_1$  和 HGF 水平。同时于光镜下观察肝纤维化程度, 计算肝纤维化组织学半定量计分。结果 模型组较对照组大鼠肝组织和血清 TGF- $\beta_1$  明显升高, HGF 明显降低( $P < 0.05$ ); 移植组较模型组 TGF- $\beta_1$  明显降低, HGF 明显升高( $P < 0.05$ )。光镜下, 模型组肝组织破坏, 假小叶形成; 移植组, 肝纤维化明显改善。模型组大鼠肝纤维化组织学半定量计分较对照组明显增高( $P < 0.05$ ); 移植组较模型组计分明显降低( $P < 0.05$ )。结论 HUC-MSCs 移植后可通过下调 TGF- $\beta_1$  及上调 HGF 的表达, 改善受损的肝组织。

**关键词:**人脐带间充质干细胞; 肝硬化; 转化生长因子  $\beta_1$ ; 肝细胞生长因子

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.03.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)03-0246-03

Effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation on serum TGF- $\beta_1$  and HGF expression in liver cirrhosis rats\*Jin Xupeng<sup>1</sup>, Li Xiaofei<sup>2</sup>

(1 Department of Immunology and Microbiology, Liaoning Medical University, Jinzhou,

Liaoning 121000, China; 2. Department of Gastrointestinal Disease, the First Affiliated Hospital of

Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China)

**Abstract:** Objective To investigate transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) and hepatocyte growth factor (HGF) expression and mechanism in liver cirrhosis rats after human umbilical cord mesenchymal stem cells (HUC-MSCs) transplantation. **Methods** The liver cirrhosis rats were given 40%CCl<sub>4</sub> subcutaneous injection in abdomen to make the liver cirrhosis rats model, and then liver cirrhosis rats were randomly divided into model group, NS group and transplantation group, each group with 8 rats, and 8 rats were as control one. Three weeks before and after transplantation, TGF- $\beta_1$  and HGF levels in the serum and liver tissue were tested by Western blot and ELISA. We tested liver fibrosis degree by microscopy and calculated scores of liver fibrosis. **Results** TGF- $\beta_1$  levels in serum and liver tissue were significantly higher in model group than those in control one, however, HGF level was significantly lower ( $P < 0.05$ ). TGF- $\beta_1$  level in transplantation group was significantly lower than that in model group ( $P < 0.05$ ). But HGF levels were significantly increased ( $P < 0.05$ ). In model group, liver tissues were destruction, false flocculus was formed. Liver fibrosis significantly decreased. Liver fibrosis in model group was significantly higher than that in control group ( $P < 0.05$ ), in transplantation group, which was significantly lower than that of model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The HUC-MSCs transplantation can improve impaired liver tissue by downregulating TGF- $\beta_1$  and upregulating HGF.

**Key words:** human umbilical cord mesenchymal stem cell; liver cirrhosis; transforming growth factor beta1; hepatocyte growth factor

肝纤维化是进展为肝硬化的中间阶段和必经阶段<sup>[1-2]</sup>。而 TGF- $\beta_1$  和 HGF 在肝纤维化的进展中发挥着重要作用。目前, 国内外有大量关于干细胞治疗肝硬化的报道<sup>[3-5]</sup>。本文拟通过对人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUC-MSCs)移植至活体肝硬化模型大鼠体内, 检测转化生长因子  $\beta_1$  (transforming growth factor- $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ ) 和肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 的表达, 并观察其对肝纤维化的改善情况, 从细胞因子的角度进一步探讨干细胞改善肝纤维化的机制, 现报道如下。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 雄性 SD 大鼠 35 只, 体质量 (229.2 ± 13.4)g, 许可证号: SCXK(辽)2003-0007, 由辽宁医学院实验动物中心提供。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 主要试剂: 四氯化碳 (CCl<sub>4</sub>)、HUC-MSCs、兔抗大鼠 TGF- $\beta_1$ 、HGF 单克隆抗体、BCA 蛋白检测试剂盒、Western blot 检测试剂盒和 ELISA 试剂盒。主要仪器: 酶标分析仪、倒置相差显微镜、HPIAS2000 图像分析系统、凝

胶成像分析系统。

1.2 方法

1.2.1 肝硬化大鼠动物模型的建立和分组 35 只 SD 雄性大鼠适应性喂养 1 周,随机选择 8 只作为对照组,生理盐水(NS) 3 mL/kg 腹部皮下注射;余 27 只给予 40% CCl<sub>4</sub> 大豆油溶液 3 mL/kg腹部皮下注射 7 周制备肝硬化模型,之后随机选择 8 只大鼠作为模型组,处死,行肝组织病理切片,证实造模成功,将余下 16 只(造模过程中死亡 3 只)随机分为两组:NS 组(经尾静脉注射 NS 1 mL);移植组(经尾静脉注射细胞密度为 1×10<sup>7</sup>/mL 的干细胞悬液 1 mL)。移植后继续皮下注射 NS 或 40% CCl<sub>4</sub>大豆油溶液 1.5 mL/kg ,3 周后处死大鼠。

1.2.2 血清 TGF-β<sub>1</sub> 和 HGF 的 ELISA 检测 处死各组大鼠,收集 2 mL 动脉血,应用酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒,定量检测各组血清中 TGF-β<sub>1</sub> 和 HGF 的水平。

1.2.3 肝组织 TGF-β<sub>1</sub> 和 HGF 蛋白质的 Western blot 检测 取肝组织,加裂解液后匀浆,离心,取上清液,测定蛋白质水平。加上样液于 10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,电转移蛋白质至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉封闭,4 ℃过夜,PBST(含 0.1% 吐温的 PBS)洗膜,加兔抗鼠 TGF-β<sub>1</sub> 或 HGF 一抗孵育,4 ℃过夜,PBST 洗膜,加辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG 孵育,37℃ 1 h,PBST 洗膜,DAB 显色法显示结果。用 AlphaImager2200 软件测定印迹区带的灰度值。以 β-actin 为内参照。蛋白质表达强度=样品中目的蛋白灰度值/相应 β-actin 的灰度值。

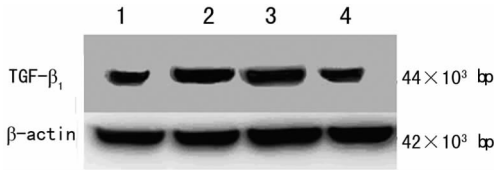
1.2.4 组织学观察 分别将各组大鼠处死后,取肝门区组织 10%甲醛固定,经石蜡包埋,行石蜡切片,分别进行 HE 染色观察肝脏的组织形态学改变。并根据肝纤维化组织学半定量计分系统进行评分。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学处理。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析(One-Way ANOVA 检验),SNK 法多重比较;以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

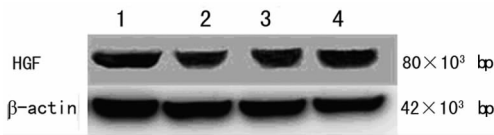
2.1 TGF-β<sub>1</sub> 和 HGF 的 Western blot 检测 肝硬化各组大鼠肝组织中 TGF-β<sub>1</sub> 水平均明显升高( $P < 0.05$ )。移植组肝组织中 TGF-β<sub>1</sub> 水平明显降低( $P < 0.05$ )。模型组大鼠与 NS 组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。NS 组大鼠肝组织中 HGF 水平明显降低( $P < 0.05$ )。移植组大鼠肝组织中 HGF 水平明显升高( $P < 0.05$ ),与对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。而模型组与 NS 组、移植组、对照组之间比较,差

异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图 1~2,表 1。



1:对照组;2:模型组;3:NS 组;4:移植组。

图 1 各组 TGF-β<sub>1</sub> 蛋白质的表达



1:对照组;2:模型组;3:NS 组;4:移植组。

图 2 各组 HGF 蛋白质的表达

2.2 大鼠血清 TGF-β<sub>1</sub> 和 HGF 的定量检测 模型组和 NS 组大鼠血清中的 TGF-β<sub>1</sub> 水平较对照组明显升高( $P < 0.05$ );移植组 TGF-β<sub>1</sub> 水平较模型组和 NS 组明显减少( $P < 0.05$ )。模型组和 NS 组 HGF 水平较对照组明显减少( $P < 0.05$ ),而移植组 HGF 水平较模型组和 NS 组明显增高( $P < 0.05$ ),与对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 2。

表 1 各组大鼠肝组织中 TGF-β<sub>1</sub> 和 HGF 蛋白质的表达( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

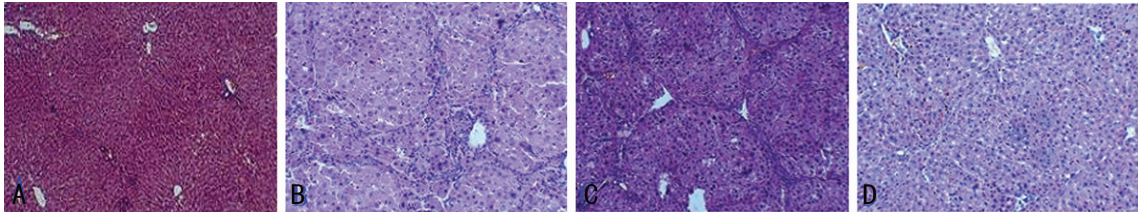
组别	TGF-β <sub>1</sub>	HGF
对照组	1.05±0.08	1.38±0.13
模型组	1.57±0.06▲△	0.73±0.05▲△
NS 组	1.49±0.07▲△	0.81±0.09▲△
移植组	1.17±0.11▲	1.51±0.17

▲:  $P < 0.05$ ,与对照组比较;△:  $P < 0.05$ ,与移植组比较。

表 2 各组大鼠血清中 TGF-β<sub>1</sub> 和 HGF 水平( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	TGF-β <sub>1</sub>	HGF
对照组	53.63±8.56	69.37±9.89
模型组	113.61±15.73▲△	41.09±6.33▲△
NS 组	117.25±17.18▲△	46.17±7.85▲△
移植组	71.82±10.74	75.98±10.28

▲:  $P < 0.05$ ,与对照组比较;△:  $P < 0.05$ ,与移植组比较。



A:对照组(×100);B:模型组(×500);C:NS 组(×300);D:移植组(×200)。

图 3 各组大鼠肝组织结构显微镜图(HE 染色)

2.3 大鼠肝脏的组织学观察 对照组大鼠肝组织结构清晰,肝细胞大小均匀,肝小叶结构清晰,肝细胞索排列较整齐。模

型组大鼠肝组织的正常结构被破坏,肝索排列紊乱,纤维组织增生明显,小叶结构消失,汇管区及中央静脉周围可见大量炎

性细胞浸润(图 3A)。NS 组与模型组相比改善不明显(图 3B、C)。移植组大鼠肝组织中可见一定程度的细胞变性及小叶结构改变,肝组织破坏程度较轻,汇管区结缔组织增生不明显,总体状况较模型组有明显好转(图 3D)。

**2.4 大鼠肝纤维化组织学半定量计分** 与对照组比较,肝硬化各组大鼠肝纤维化组织学半定量计分均增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );移植组大鼠的计分( $7.14 \pm 2.45$ )明显低于模型组( $12.78 \pm 2.11$ )及 NS 组( $11.96 \pm 2.31$ )( $P < 0.05$ );NS 组大鼠的计分与模型组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 3 讨 论

肝纤维化的发生是复杂的过程,纤维化的发生主要是细胞外基质(ECM)成分在肝内的异常沉积<sup>[6]</sup>。HSC 被激活而转变成肌纤维样细胞和成纤维细胞是肝纤维化发生的中心环节。TGF- $\beta_1$  是关键的前纤维化因子,是细胞外基质沉积促进剂。TGF- $\beta_1$  是激活 HSC 的主要因子,可促进活化后肌纤维母细胞过表达 ECM,并抑制其降解,也有间接促 ECM 增殖作用<sup>[7-8]</sup>。TGF- $\beta_1$  能够提高纤维化作用和组织的重建,其机制是增加 I、III、VI、VII 型胶原的表达,潜在提高它们对 ECM 的黏附,通过抑制蛋白水解酶活性和增加蛋白酶抑制剂活性,从而减少纤溶酶原向纤溶酶的转变<sup>[9]</sup>。由此可见,TGF- $\beta_1$  能增加 ECM 合成而减少降解,具有诱导纤维化的作用。

HGF 作为一种强效的促有丝分裂剂,对肝脏的再生起重要作用,它不仅能促进肝功能的恢复,而且也可以改善肝纤维化。有研究证明<sup>[10-11]</sup>,HGF 是肝细胞生长和 DNA 合成最强的刺激剂,在肝切除和各种肝病后患者的血循环中 HGF 明显升高,并在肝组织中可见 HGF mRNA 的表达。彭彦辉等<sup>[12]</sup>在 CCl<sub>4</sub> 中毒性大鼠肝纤维模型中研究发现,初期 HGF mRNA 显著升高,表明在 CCl<sub>4</sub> 造成肝细胞损伤的同时,肝脏高表达 HGF,从而促进肝脏再生与修复,而后表达减少。基于上述作用,HGF 在肝纤维化的发生、发展中具有相当重要意义。

TGF- $\beta_1$  能使肝星状细胞转化为肌成纤维细胞,从而延缓 ECM 降解,促进肝纤维化发生,相反,HGF 刺激或诱导参与 ECM 降解蛋白酶的合成;TGF- $\beta_1$  抑制肝细胞 DNA 合成和肝再生,而 HGF 则促进肝细胞增殖和肝再生。HGF 能下调 TGF- $\beta_1$  表达和拮抗 TGF- $\beta_1$  生物学作用<sup>[13-14]</sup>,TGF- $\beta_1$  和 HGF 之间存在互逆平衡关系<sup>[15]</sup>。在以 HGF 表达为主的纤维化早期阶段,TGF- $\beta_1$  表达受到抑制,其胶原酶活性很高,组织代偿性生长而不发生严重纤维化;而在以 TGF- $\beta_1$  表达为主的纤维化晚期阶段,局部 HGF 水平很低,其胶原水平很高,组织器官表现为纤维化变化,而且拮抗 HGF 作用后可降低胶原酶活性,而外源性输注 HGF 可恢复其活性。

本研究结果显示:TGF- $\beta_1$  是各种纤维化疾病中纤维生成的关键性细胞因子,因此,拮抗它的生物学作用具有重要意义。通过干细胞的移植,本研究发现 HUC-MSCs 能够抑制 TGF- $\beta_1$  的表达,而促进 HGF 的表达,从而改善肝脏组织的纤维化。

### 参考文献:

[1] Gluud C. Mortality from cirrhosis: lack of progress over the last 35 years[J]. Gut, 2005, 54(11): 1523-1526.

- [2] 张卫光,俞敏俊,田珑,等. 人间充质干细胞移植改善四氯化碳诱导性肝硬化大鼠的肝纤维化[J]. 解剖学报, 2006, 37(2): 158-162.
- [3] 谭国胜,向贤宏. 脂肪间充质干细胞移植对大鼠肝硬化模型的治疗作用[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(11): 1074-1078.
- [4] 张丽欣,邢利和,张丽丽,等. 脐血干细胞移植治疗失代偿期肝硬化的临床效果研究[J]. 中国全科医学, 2010, 13(24): 2680-2682.
- [5] 陈静,杜贞芳,唐进先. 肝硬化患者血清中 CA125 水平的改变及临床意义[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(8): 1500, 1507.
- [6] 陆浩,周建生. 转化生长因子与肝硬化[J]. 医学综述, 2005, 11(7): 584-586.
- [7] Khimji AK, Shao R, Rockey DC. Divergent transforming growth factor-beta signaling in hepatic stellate cells after live injury: functional effects on ECE-1 regulation[J]. Am J Pathol, 2008, 173(3): 716-727.
- [8] Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets[J]. J Cell Mol Med, 2006, 10(1): 76-99.
- [9] Arendt E, Ueberham U, Bittner R, et al. Enhanced matrix degradation after withdrawal of TGF-beta1 triggers hepatocytes from apoptosis to proliferation and regeneration[J]. Cell Prolif, 2005, 38(5): 287-299.
- [10] 姜良文. 自动分析仪使用免疫比浊法测定血清中 IV 型胶原蛋白的评价[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(7): 726-727.
- [11] Mitsue S, Hamanoue M, Tanabe G, et al. Expression of HGF and TGF- $\beta_1$  mRNA After Partial Hepatectomy in Rats with Liver Cirrhosis[J]. Jpn J Surg, 1995, 25(3): 237-243.
- [12] 彭彦辉,刘殿武,高博,等. 中药对 CCl<sub>4</sub> 中毒性大鼠肝纤维化 HGF mRNA 表达量的影响[J]. 疾病控制杂志, 2007, 6(2): 108-111.
- [13] Sato M, Kakubari M, Kawamura M, et al. The decrease in total collagen fibers in the liver by hepatocyte growth factor after formation of cirrhosis induced by thioacetation[J]. Biochem Pharmacol, 2007, 59(6): 681-690.
- [14] Mizuno S, Matsumoto K, Kurosaawa T, et al. Reciprocal balance of hepatocyte growth factor and transforming growth factor- $\beta_1$  in renal fibrosis in mice[J]. Kidney Int, 2008, 57(3): 937-948.
- [15] 高远征,贾素华,刘玉英,等. 异基因脐血干细胞移植治疗失代偿期肝硬化的疗效观察[J]. 临床肝胆病杂志, 2010, 26(6): 613-614, 617.