

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.28.023

SD 大鼠骨髓间充质干细胞-肝细胞共培养上清液细胞因子分析*

霍大浪, 刘代顺[△], 宁家辉, 张袁媛, 冯成军, 王娜
(遵义医学院第三附属医院感染科, 贵州遵义 563000)

摘要:目的 检测 SD 大鼠骨髓间充质干细胞(BMSC)-肝细胞共培养上清液中的细胞因子, 探讨细胞因子的作用, 为生物人工肝及临床治疗肝功能衰竭提供理论依据。方法 分离 SD 大鼠 BMSC 及原代肝细胞, 将生长良好的第 3 代 BMSC 与肝细胞按 1:10 比例体外共培养(实验组), 以单独肝细胞(对照组)和单独 BMSC(BMSC 组)作为对照。观察不同情况下肝细胞生存时间和形态, 培养 48 h 后用 RayBiotech 抗体芯片检测细胞培养上清液中的细胞因子。结果 实验组的肝细胞生长增殖迅速, 肝细胞可存活 14 d; 对照组的肝细胞生长增殖缓慢, 细胞培养可存活 9 d。实验组上清液中的细胞因子表达谱发生了明显改变: IL-1、IL-6、IL-10 均较对照组及 BMSC 组升高 2 倍以上, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 BMSC-肝细胞共培养, BMSC 可能通过分泌 IL-1、IL-6 和 IL-10 促进肝细胞生长, 延长肝细胞生存时间。

关键词:干细胞; 骨髓; 肝细胞; 共同培养技术; 细胞因子

中图分类号: R651.2

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)28-3766-03

Cell factor analysis of SD rat BMSC-liver cells co-culture supernatant*

Huo Dalang, Liu Daishun[△], Ning Jiahui, Zhang Yuanyuan, Feng Chenjun, Wang Na

(Department of Infection, the Third Hospital Affiliated to Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China)

Abstract: Objective To detect supernatant of SD rat bone marrow mesenchymal stem cells(BMSC) and liver cells, and explore the role of cytokines, and provide a theoretical basis for the biological artificial liver and clinical treatment of liver failure. **Methods** BMSCs and primary hepatocytes of SD rat were isolated. BMSCs with its third generation and liver cells by the ratio of 1:10 were co-cultured. Hepatocytes and BMSC were treated as control group. Observation the cells' survival and morphology and analysis of cytokine after 48 h were made by RayBiotech. **Results** BMSC-hepatocyte in the co-culture group grow and proliferated rapidly, and hepatocyte could survive up to 14 days; while hepatocyte cultured alone, it grow slowly and survived only 9 days. Expression of BMSC-liver cells supernatant changed obviously; interleukin 1, interleukin 6, interleukin 10 were higher than those in the control group, above 2 times, which showed significant difference ($P < 0.01$). **Conclusion** Co-culture of BMSC-liver cell could induce BMSC secrete paracrine and autocrine; IL-1 and IL-6 and IL-10, which could promote the growth of hepatocyte and extend the liver cell survival time. In-vitro BMSC-liver cells could provide biological artificial liver cell sources, as well as provide theory basis for using cytokine treatment for liver failure.

Key words: stem cells; bone marconi; hepatocytes; coculture techniques; cytokines

各种病因所致的肝功能衰竭及终末期肝病预后差, 除肝移植外, 目前尚无特别有效的治疗方法, 这是目前临床治疗的难点。有研究表明将大鼠骨髓干细胞移植入鼠体内能分化成成熟肝细胞, 自体骨髓干细胞移植能改善肝硬化小鼠的肝功能, 提高存活率^[1-2]。以培养肝细胞为材料、生物反应器为核心的生物人工肝及干细胞移植, 为肝功能衰竭及终末期肝病提供了新的治疗手段, 是目前研究的热点。本实验通过体外骨髓间充质干细胞(BMSC)-肝细胞共培养, 观察 BMSC 对肝细胞生长的影响, 通过抗体芯片检测细胞培养上清液中的细胞因子, 探讨细胞因子的作用, 为利用细胞因子治疗肝功能衰竭及制作生物人工肝提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 SPF 级 4 周龄 SD 大鼠 20 只, 雄性, 体质量 80~100 g, 购于第三军医大学动物中心, 实验过程中对动物的处置符合科技部《关于善待实验动物的指导性意见》的规定。主要试剂及仪器: 1640 培养基、DMEM 培养基、新生牛血清、胎牛血清为美国 Corning 公司产品; IX70 倒置相差显微镜为日本 Oiympus 公司产品, N-2700Nuair CO₂ 培养箱为德国 Nuair 公司产品, RayBiotech(AAR-CYT-G2) 芯片为美国 RayBio 公

司产品。

1.2 方 法

1.2.1 BMSC、肝细胞的分离与共培养 采用全骨髓贴壁筛选法分离 SD 大鼠 BMSC, 按 1:3 比例传代培养至第 3 代备用(BMSC 组)。体外胶原酶两步灌注法分离肝细胞(对照组), 台盼蓝染色测定细胞总数和细胞活力。将第 3 代 BMSC 及肝细胞分别按 3×10^5 /mL 密度, BMSC 与肝细胞 1:10 比例共培养接种于 24 孔板。每组设 3 个复孔, 加体积分数 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养液置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。

1.2.2 抗体芯片检测 共培养 48 h 后收集各组培养上清液, 予以 500 ×g 离心 5 min, 100 μL 滤网过滤除去坏死细胞及杂质。严格按照 RayBio 公司 AAR-CYT-G2-4 试剂盒说明书操作步骤进行封闭、孵育、荧光检测。采用芯片分析软件提取数据, AAR-CYT-G2 的数据分析软件来进行数据分析。

1.2.3 标准化和比较 将含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养液 100 μL 做空白对照, 将信号值大于 200, 与空白对照组比值大于 1.5 的细胞因子选中进行分析。

1.3 主要观察指标 观察 BMSC、肝细胞单独培养及共培养

* 基金项目: 遵义市科技局联合基金[遵市科合社字(2011)14 号]。
[△] 通讯作者, E-mail ldsdoc@126.com。

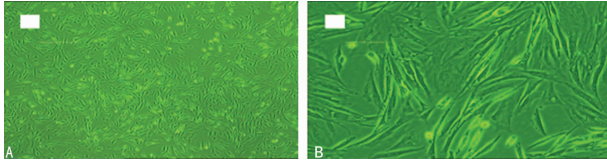
作者简介: 霍大浪(1977-), 主治医师, 本科, 主要从事感染性疾病研

的形态学变化。抗体芯片检测各组培养上清液细胞因子。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件对实验数据进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$, 组间比较进行方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSC 组细胞生长形态观察 刚接种的原代 BMSC 呈球形悬浮于培养液中, 接种 24 h 后少量贴壁, 48 h 后贴壁细胞明显增多, 部分细胞铺展, 呈梭形, 簇状生长。3 d 后形成多个增殖集落, 14 d 细胞逐渐汇集成片, 铺满瓶底约 90% 时传代。传代后 BMSC 生长速度加快, 形态较均一, 呈长梭形, 见图 1。

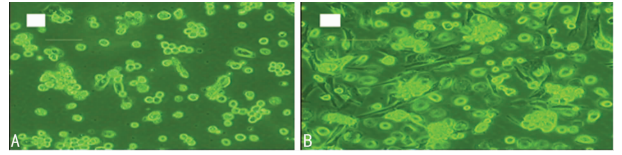


A: $\times 100$; B: $\times 200$ 。

图 1 P3 代第 3 天大鼠 BMSC 细胞形态图

2.2 对照组及实验组细胞生长形态观察 肝细胞从 5~6 h 开始贴壁, 至 24 h 活细胞均贴壁, 死细胞漂浮于培养液上清中。对照组细胞贴壁, 铺展生长良好, 细胞形态不规则, 可见多核, 分布不均匀, 呈簇状生长(图 2A); 肝细胞培养 5 d 时见少量细胞悬浮, 细胞生长增殖缓慢, 7 d 时见漂浮细胞逐渐增多,

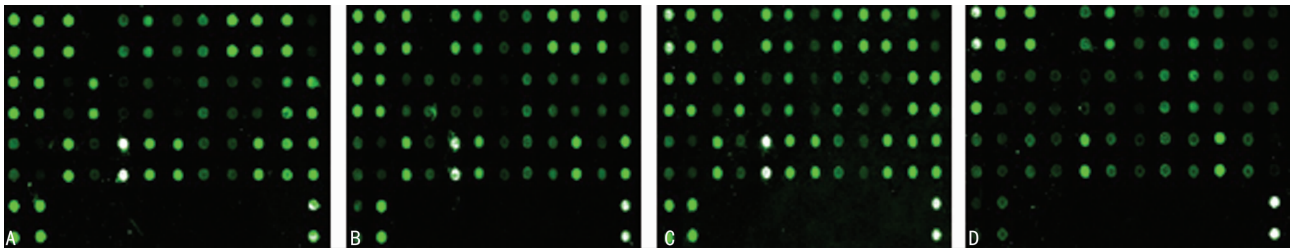
8~9 d 时肝细胞全部死亡。实验组中肝细胞与梭形的 BMSC 相互交织、铺展, 贴壁生长良好, 呈岛屿状或条索状(图 2B), 肝细胞的生长、增殖较对照组快。9~10 d 时见上清液中出现悬浮细胞, BMSC 无明显改变, 10 d 后上清液中悬浮细胞逐渐增多, 至 14 d 时肝细胞全部死亡。



A: 对照组; B: 实验组。

图 2 第 3 代第 3 天大鼠肝细胞、BMSC-肝细胞共培养细胞形态图($\times 100$)

2.3 细胞因子检测结果 RayBio 公司 AAR-CYT-G2-4 试剂 1 次可检测 34 个细胞因子, 抗体芯片检测图像结果见图 3。符合标准的细胞因子有 21 种, 见表 1, 实验组上清液中细胞因子表达谱发生了明显改变; IL-1、IL-6、IL-10、激活素 A(Activin A)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、巨噬细胞炎症蛋白-3 α (macrophage inflammatory protein-3 α , MIP-3 α) 6 种细胞因子表达水平上升。实验组上清液中 IL-1、IL-6、IL-10 较对照组及 BMSC 组均升高 2 倍以上, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 实验组与对照组, BMSC 组细胞因子信号比值见图 4。



A: 对照组; B: BMSC 组; C: 实验组; D: 空白对照。

图 3 细胞上清液 RayBiotech(AAR-CYT-G2)检测图像

表 1 3 组细胞上清细胞因子信号比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

项目	对照组	BMSC 组	实验组
Activin A	678.6 \pm 20.8	1 842.0 \pm 65.0	3 261.6 \pm 67.9 ^a
B7-2/CD86	423.6 \pm 12.6	280.0 \pm 21.0	296.3 \pm 5.5
β -NGF	839.3 \pm 15.8	667.6 \pm 14.2	1 272.0 \pm 72.0
CINC-1	11 273.6 \pm 138.1	14 584.0 \pm 137.5	13 141.3 \pm 106.5
CINC-2 α	14 266.6 \pm 61.2	16 947.3 \pm 67.6	17 399.0 \pm 115.8
CINC-3	7 834.0 \pm 37.1	5 351.3 \pm 123.7	8 727.6 \pm 61.1
CNTF	156.3 \pm 9.2	201.6 \pm 12	226.3 \pm 8.5
Fas Ligand	3 302.6 \pm 39.0	2 915.6 \pm 17.6	3 178.3 \pm 77.6
Fractalkine	4 048.0 \pm 62.9	2 156.6 \pm 48.0	2 635.6 \pm 38.2
GM-CSF	158.0 \pm 12.5	308.6 \pm 12.5	279.3 \pm 12.8
ICAM-1	2123.3 \pm 63.2	461.6 \pm 8.5	2734.3 \pm 48.1 ^b
IFN- γ	144.0 \pm 6.5	230.6 \pm 18.8	283.0 \pm 13.6
IL-1 α	382.0 \pm 8.1	290.0 \pm 10.5	1 188.0 \pm 43 ^{ab}
IL-6	1 308.3 \pm 44.4	414.6 \pm 15.1	10 145.0 \pm 41.6 ^{ab}
IL-10	3 278.0 \pm 68.5	357.3 \pm 12	9 832.3 \pm 38 ^{ab}
LIX	16 258.0 \pm 54	16 132.6 \pm 77.6	8 228.0 \pm 63.9
L-Selectin	262.3 \pm 8	457.6 \pm 26.15	335.3 \pm 24.0
MCP-1	65 370.0 \pm 606.4	58 607.0 \pm 524.4	55 258.0 \pm 437.0

续表 1 3 组细胞上清细胞因子信号比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

项目	对照组	BMSC 组	实验组
MIP-3 α	2 808.0 \pm 56.9	1 723.6 \pm 68.2	3 476.0 \pm 57.4 ^b
Prolactin R	367.6 \pm 16.6	543.3 \pm 43.0	215.6 \pm 13.0
RAGE	2 537.3 \pm 103.7	2 690.3 \pm 72.8	2 528.6 \pm 34.0

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 BMSC 组比较。

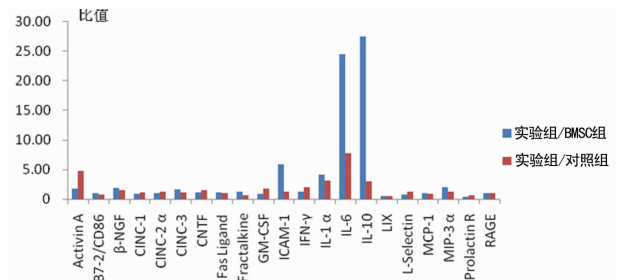


图 4 BMSC-肝细胞共培养与肝细胞、BMSC 细胞因子信号比值

3 讨论

原位肝移植是目前治疗肝功能衰竭及各种终末期肝病最有效的治疗手段, 但面临供体紧缺, 费用高昂, 手术创伤大及长期应用免疫药物等特点^[3-4] 而受到限制。利用细胞移植及生物

人工肝治疗肝功能衰竭及终末期肝病是目前研究的热点,但肝细胞来源是生物人工肝应用的瓶颈问题^[5];细胞移植又存在免疫排斥反应及移植后细胞不易存活等因素的影响。BMSC 在特定的条件下具有向肝细胞分化的潜能,且肝脏干细胞亦可能来源于骨髓干细胞^[6-7]。顾劲扬等^[8]发现猪 BMSC-肝细胞共培养能够促进肝细胞生长,因此体外共培养 BMSC-肝细胞有可能为生物人工肝的细胞来源提供新的途径。Yannak 等^[9]应用静脉注射 BMSC 培养基明显提高急性肝衰竭大鼠存活率,证实细胞培养基能有效治疗急性肝功能衰竭,提示干细胞分泌功能是治疗急性肝衰竭的重要机制,且旁分泌产生的各种细胞因子可能发挥了关键作用,利用细胞因子治疗有望为肝功能衰竭提供新的治疗途径。本实验通过 SD 大鼠 BMSC-肝细胞共培养,证实 BMSC 能够明显促进肝细胞增殖和延长肝细胞的生存时间,为解决生物人工肝细胞来源提供了新的实验依据。BMSC 除了可少量分化为相应组织细胞如肝细胞外,尚可合成 IL-6、IL-7、IL-8、IL-10 及粒细胞集落刺激因子 G(G-CSF)等多种细胞因子^[10-11]。董巧凤等^[12]证实 BMSC 在体外可以促进 Th2 细胞分泌 IL-10。本实验通过抗体芯片检测共培养上清液中的细胞因子,发现除 IL-10 升高外,IL-1、IL-6 亦明显升高,间接证实 IL 在治疗肝功能衰竭时发挥了重要作用,其机制可能与 IL-6、IL-10 促进多种细胞增殖,刺激细胞生长,促进细胞分化及 IL-10 发挥免疫抑制功能,间接抑制自然杀伤细胞(NK)活性有关。综上所述,BMSC-肝细胞共培养,BMSC 可能通过分泌 IL-1、IL-6 和 IL-10 促进肝细胞生长,延长肝细胞生存时间。通过体外共培养 BMSC-肝细胞有望为生物人工肝提供细胞来源,亦为利用细胞因子治疗肝功能衰竭提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Avital I, Inderbitzin D, Aoki T, et al. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 288(1):156-164.
- [2] Sakaida I, Terai S, Nishina H, et al. Development of cell therapy using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis [J]. *Med Mol Morphol*, 2005, 38(4):197-202.
- [3] Seglen PO, Brinchmann MF. Purification of autophagosomes from rat hepatocytes [J]. *Autophagy*, 2010, 6(4):542-547.
- [4] Ponticelli C, Aroldi A. Osteoporosis after organ transplantation [J]. *Lancet*, 2001, 357 (9268):1623.
- [5] 王英杰. 人工肝在肝衰竭中的应用与评价 [J]. *实用肝脏病杂志*, 2013, 16(1):20-21.
- [6] Bishi DK, Mathapati S, Cherian KM, et al. In vitro hepatic trans-differentiation of human mesenchymal stem cells using sera from congestive/ischemic liver during cardiac failure [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3):e92397.
- [7] Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells [J]. *Science*, 1999, 284(5417):1168-1170.
- [8] 顾劲扬, 施晓雷, 张悦, 等. 骨髓间充质干细胞维持猪肝细胞形态与功能的实验研究 [J]. *中华肝胆外科杂志*, 2010, 16(2):130-133.
- [9] Yannaki E, Athanasiou E, Xagorari A, et al. G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs [J]. *Exp Hematol*, 2005, 33(1):108-119.
- [10] Rafii S, Meeus S, Dias S, et al. Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2002, 13(1):61-67.
- [11] Haynesworth SE, Baber M, Caplan A. Cytokine expression by human marrow derived mesenchymal progenitor cells in vitro; effects of dexamethasone and IL-1 alpha [J]. *J Cell Physiol*, 1996, 166(3):585-592.
- [12] 董巧凤, 贺韦东, 尹哲, 等. 骨髓间充质干细胞的体外扩增及其对 T 淋巴细胞产生 IFN- γ 和 IL-10 的影响 [J]. *现代免疫学*, 2007, 27(2):140-144.

(收稿日期:2014-05-08 修回日期:2014-06-12)

(上接第 3765 页)

- [1] 是否启动药物干预及怎样早期干预 [J]. *医学争鸣*, 2013, 35(3):23-26.
- [3] Baumann M, Janssen BJ, Hermans JJ, et al. Transient AT1 receptor-inhibition in prehypertensive spontaneously hypertensive rats results in maintained cardiac protection until advanced age [J]. *J Hypertens*, 2007, 25(1):207-215.
- [4] Baumann M, Megens R, Bartholome R, et al. Prehypertensive renin-angiotensin-aldosterone system blockade in spontaneously hypertensive rats ameliorates the loss of long-term vascular function [J]. *Hypertens Res*, 2007, 30(9):853-861.
- [5] Baumann M, Sollinger D, Roos M, et al. Prehypertensive preconditioning improves adult antihypertensive and cardioprotective treatment [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 332(3):1121-1126.
- [6] Ishiguro K, Sasamura H, Sakamaki Y, et al. Developmental activity of the renin-angiotensin system during the "critical period" modulates later L-NAME-induced hypertension and renal injury [J]. *Hypertens Res*, 2007, 30(1):63-75.
- [7] Sasamura H, Hayashi K, Ishiguro K, et al. Prevention and regression of hypertension: role of renal microvascular protection [J]. *Hypertens Res*, 2009, 32(8):658-664.
- [8] 杨宝峰. *药理学* [M]. 8 版. 北京:人民卫生出版社, 2013:201-208.
- [9] 夏碧桦, 冉群钗. 高血压前期患者血管功能损害的预警指标 [J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(4):681-683.
- [10] 吴寿岭, 钟吉文, 王丽晔, 等. 高血压前期人群中心脑血管事件发生情况及影响因素 [J]. *中华高血压杂志*, 2012, 20(3):247-251.

(收稿日期:2014-05-08 修回日期:2014-06-22)