

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000580

SDF-1/HGF融合蛋白介导的大鼠间充质干细胞对造血干细胞增殖和趋化作用的影响

罗红春¹, 张红宾², 辛小娟¹, 曾爱中¹

(重庆医科大学附属第一医院 1. 感染科; 2. 血液科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)/肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)融合蛋白介导的骨髓间充质干细胞(bone marrow derived stroma cell, BMSCs)对造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)增殖和趋化能力的影响,以期通过联合移植的方式重建肝组织。**方法:**培养鉴定 3~4 周龄 SD 大鼠 BMSCs 及大鼠 HSCs。荧光显微镜下观测重组腺病毒 pAD-SDF-1-(GlySer)3-HGF-IRES-GFP 感染 BMSCs 1、3、7、14 d 后的感染效率,同时 ELISA 检测 SDF-1 和 HGF 的表达。制备 BMSCs 细胞滋养层, HSCs 种植于有滋养层的 24 孔板中,分为 3 组: HSCs 加培养基组(A1 组); HSCs 加 BMSCs 组(B1 组); HSCs 加 SDF/HGF 融合蛋白介导的 BMSCs 组(C1 组),检测共培养 1、3、7、14 d 后 HSCs 的增殖倍数。利用 transwell 培养体系,按实验要求分为 3 组: HSCs 加细胞培养液组(A2 组); HSCs 加 BMSCs 组(B2 组); HSCs 加 SDF/HGF 融合蛋白介导的 BMSCs(C2 组),测定 HSCs 的迁移指数。**结果:**重组腺病毒 pAD-SDF-1-(GlySer)3-HGF-IRES-GFP 感染 BMSCs 1、3、7、14 d 的感染效率分别为(25.28 ± 3.72)%、(82.22 ± 3.58)%、(64.85 ± 4.48)%、(28.35 ± 2.73)%,感染后第 3 天的感染效率最高(与第 1、7、14 天相比较, $F=718.05, P=0.000; F=66.80, P=0.000; F=642.78, P=0.000$)。重组腺病毒 pAD-SDF-1-(GlySer)3-HGF-IRES-GFP 感染 BMSCs 1、3、7、14 d 后, SDF-1 的表达分别为: (1.02 ± 0.15) μg/ml, (4.51 ± 0.52) μg/ml, (2.18 ± 0.19) μg/ml, (1.22 ± 0.21) μg/ml; HGF 的表达分别为: (1.38 ± 0.32) ug/ml, (5.01 ± 0.43) μg/ml, (3.10 ± 0.26) μg/ml, (1.63 ± 0.27) μg/ml。感染后第 3 天 SDF-1 与第 1、7、14 天比较和 HGF 与第 1、7、14 天比较的表达明显增高(P 均=0.000)。BMSCs 和 HSCs 共培养第 3、7、14 天, B1 组、C1 组中 HSCs 的扩增倍数明显高于 A1 组(P 均=0.000)。同时 C1 组中 HSCs 的扩增倍数明显高于 B1 组(P 均=0.000)。transwell 显示 B2、C2 组的迁移指数明显高于 A2 组,同时 C2 组的迁移指数明显高于 B2 组。**结论:**SDF-1/HGF 融合蛋白介导的 BMSCs 可能在促进 HSCs 的增殖及趋化方面起到重要作用。

【关键词】基质细胞衍生因子-1; 肝细胞生长因子; 间充质干细胞; 造血干细胞

【中图分类号】R575

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-08-10

Effect of SDF-1/HGF fusion protein-mediated BMSCs on proliferation and chemotaxis of HSCs

Luo Hongchun¹, Zhang Hongbin², Xin Xiaojuan¹, Zeng Aizhong¹

(1. Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of SDF-1/HGF fusion protein-mediated BMSCs on proliferation and chemotaxis of HSCs, then to rebuild liver tissue by combined transplantation. **Methods:** BMSCs and HSCs derived from SD rat at the age of 3-4 weeks were cultured and identified. After stably serial subcultivation, recombinated adenovirus pAD-SDF-1-(GlySer)3-HGF-IRES-GFP infected BMSCs, and the efficiency of infection was detected after infection for 1, 3, 7, 14 d by fluorescence microscope. Meanwhile, the expressions of SDF-1 and HGF were assayed by ELISA. HSCs were planted in 24 well plates containing BMSCs cytotrophoblast. They were classified as HSCs plus cell culture fluid(group A1), HSCs plus BMSCs(group B1), HSCs plus SDF-1/HGF fusion protein-mediated BMSCs(group C1). The proliferation index of HSCs after coculture for 1, 3, 7, 14 d were investigated. In order

作者介绍: 罗红春, Email: usamake@163.com,

研究方向: 慢性肝炎, 肝衰竭的发病机制及治疗。

通信作者: 张红宾, Email: wdlz1299@163.com。

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目(编号: cstc2012jjA10100);

重庆市自然科学基金资助项目(编号: cstc2013jcyjA10078);

重庆市卫生局医学科研发资助项目(编号: 2012-02-22)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150403.0903.001.html>
(2015-04-03)

to exam the immigration index of HSCs influenced by SDF-1/HGF fusion protein-mediated BMSCs, three experimental groups including HSCs plus cell culture fluid(group A2), HSCs plus BMSCs(group B2), HSCs plus SDF-1/HGF fusion protein-mediated BMSCs(group C2) through transwell system were set. **Results:** After BMSCs being infected by recombinated adenovirus pAD-SDF-1-(GlySer)3-HGF-IRES-GFP for 1, 3, 7, 14 d, the efficiencies of infection were (25.28 ± 3.72)%, 82.22 ±

3.58)%, (64.85 ± 4.48)%, (28.35 ± 2.73)%, respectively. And the efficiency of infection was the highest after infection for 3 d (compared with infection for 1, 7, 14 d, $F=718.05, P=0.000; F=66.80, P=0.000; F=642.78, P=0.000$). At the same time, after infection for 1, 3, 7, 14 d, the expressions of SDF-1 were (1.02 ± 0.15) $\mu\text{g/ml}$, (4.51 ± 0.52) $\mu\text{g/ml}$, (2.13 ± 0.19) $\mu\text{g/ml}$, (1.22 ± 0.21) $\mu\text{g/ml}$, and the expressions of HGF were (1.38 ± 0.32) $\mu\text{g/ml}$, (5.01 ± 0.43) $\mu\text{g/ml}$, (3.10 ± 0.26) $\mu\text{g/ml}$, (1.62 ± 0.27) $\mu\text{g/ml}$. According to our data, after infection for 3 d, the expressions of SDF-1 and HGF were significantly increased compared with those after infection for 1, 7, 14 d ($P=0.000$). After coculture for 3, 7, 14 d, the proliferation of HSCs were significantly increased in group B1 and group C1 ($P=0.000$) compared with those of group A1. And the amplification of HSCs was obviously stronger in group C1 than in group B1 ($P=0.000$). In transwell test, the immigration indexes of HSCs were prominently increased in group B2 and group C2 than in group A2. Meanwhile, the immigration index of HSCs in group C2 was remarkably higher than that in group B2. **Conclusion:** SDF-1/HGF fusion protein-mediated BMSCs might have an key role in promoting proliferation and chemotaxis of HSCs.

【Key words】stromal cell-derived factor-1; hepatocyte growth factor; bone marrow derived stroma cell; hematopoietic stem cells

近年来,多项研究结果显示,应用肝干细胞移植技术将有望重建肝组织,恢复肝功能^[1-4]。作为非肝源性肝干细胞的骨髓间充质干细胞(bone marrow derived stroma cell, BMSC)、造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSC),由于来源方便,保存简单,可塑性和扩增能力强,成为组织工程理想的种子细胞。目前已有多项证据证明 BMSCs 在体内外均可分化为肝细胞^[5-6]。同时, BMSCs 通过诱导归巢受体,分泌基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1),促使 HSCs 到达损伤部位发挥组织修复作用^[7-8]。肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是目前公认最强的肝脏再生剂,通过多种途径发挥对肝脏的保护作用^[9]。已有体外实验证实 HGF 是干细胞向肝细胞分化的最关键细胞因子^[5]。此外, HGF 通过增加人祖细胞的活力并协同干细胞因子(stem cell factor, SCF)促进 SDF-1 诱导的定向迁移。目前,课题组已构建出重组腺病毒 pAD-SDF-1-(GlySer)3-HGF-IRES-GFP。本实验中,将重组腺病毒 pAD-SDF-1-(GlySer)3-HGF-IRES-GFP 感染 BMSCs,检测其对 HSCs 增殖和趋化能力的影响,为后续进行的联合移植重建肝组织打下基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物及试剂

SPF 级 SD 大鼠,由重庆医科大学实验动物中心提供。DMEM 培养基(上海佳和科技生物有限公司);CD29、CD90、CD166、CD45、CD34 抗体(SantaCruz 公司);MACS 磁性分离试剂盒(Miltenyi Biotec);HGF ELISA 试剂盒(上海科兴商贸有限公司);SDF-1 ELISA 试剂盒(厦门慧嘉生物科技有限公司);transwell 板(北京乐博生物科技有限公司)

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠骨髓间充质干细胞的体外培养及鉴定 大鼠骨

髓间充质干细胞的分离培养:3~4 周龄雄性 SD 大鼠,腹腔注射肝素 5000 U,15 min 后断颈处死,放入 75%的酒精中浸泡约 1 min。无菌条件下,收集双侧胫骨和股骨,减去骨两端。将针头插入骨髓腔,用注射器冲洗,冲洗液为不含血清的 DMEM 培养基,直至骨髓变白。将全骨髓细胞悬液收集用 400 目不锈钢筛网过滤制成全骨髓单细胞悬液,1 000 r/min,离心 5 min,弃上清。按 $1 \times 10^6/\text{L}$ 接种于 75 cm^2 培养瓶,24 h 后换液,去除未贴壁的细胞。以后 3~4 d 完全换液 1 次,8~12 d 后细胞密度融合达 80%~90%,用 2.5 g/L 的胰酶消化后 1:3 传代,记为 P1 代 MSC(P1-MS)。随后按上述方法传代培养选择生长良好的 P3 代进行后续实验。细胞培养条件:含 10%的 FBS 以及 100 U/ml 青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素和 DMEM 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$,50 ml/L CO_2 饱和湿度。传代后大鼠 BMSCs 的鉴定:胰酶消化 P3 代细胞,PBS 洗涤 3 次,加入 PE 标记抗体:CD29、CD90、CD166、CD45,室温避光孵化。以鼠源 IgG1 作为阴性对照,应用流式细胞仪检测 BMSCs 的表面标记。BMSCs 以每孔 1×10^5 接种于 6 孔板中:成骨分化实验组加入 DMEM/F12 诱导液(完全培养基+1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松+0.5 $\mu\text{mol/L}$ 维生素 C+10 $\mu\text{mol/L}$ β -磷酸甘油钠),培养 3 周,PBS 冲洗后 4%多聚甲醛固定细胞,进行 Von Kossa 染色,显微镜下观察细胞外基质的钙沉积。成脂分化实验组加入 DMEM/F12 诱导液(完全培养基+1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松+10 $\mu\text{g/ml}$ 胰岛素+0.5 mmol/L IB-MX),培养 4 d,PBS 冲洗后 4%多聚甲醛固定细胞,进行油红 O 染色,显微镜下观察细胞中脂滴。

1.2.2 大鼠造血干细胞的体外培养及鉴定 颈椎脱臼处死雄性幼鼠,无菌条件下分离股骨和胫骨;用不含血清 DMEM 培养基反复吹打至骨碎片变白,将全骨髓细胞悬液收集用 400 目不锈钢筛网过滤制成全骨髓单细胞悬液,加入大鼠干细胞分离液面上,在 20 $^{\circ}\text{C}$ 下以 1 500 r/min 离心,15 min 后,取出离心管,可见由上至下细胞分 4 层,吸出第 2 层乳白色干细胞层。放入装有 Hank's 液的离心管中,充分混匀,1 500 r/min,离心 10 min。吸上清液,加入 PBS,充分混匀,以 1 500 r/min 再离心 10 min。沉淀经 PBS 反复冲洗 2 遍备用。进行 CD34+ 细胞纯化。纯化后的细胞悬液取样计数,PE 标记的大鼠 CD34 单克隆抗体标记细胞,流式细胞术测定 HSCs 纯度。

1.2.3 重组腺病毒 pAD-SDF-1-(GlySer)3-HGF-IRES-GFP 对传代稳定的 BMSCs 的感染效率测定 分别用感染指数 (moi) 为 25、50、100、200 的重组腺病毒感染 NIH3T3 细胞。NIH3T3 细胞接种于 24 孔板, 密度为 2×10^6 个/ml, 以 DMEM 培养液作为阴性对照。1 h 后吸弃病毒液, 加入培养液。此后每 12 h 在荧光显微镜下观察细胞 GFP 的表达情况。为后续实验选择最佳的 moi。BMSCs 传代培养后, 调整密度为 2×10^5 个/ml, 加入 24 孔板中, 培养 24 h 后, 选择最佳 moi 的重组腺病毒感染入 BMSCs。荧光显微镜下观察感染后 1、3、7、14 d 的感染效率。ELISA 方法检测重组腺病毒 pAD-SDF-1-(GlySer)3-HGF-IRES-GFP 感染 BMSCs 后 SDF-1 和 HGF 的表达, 每个时间点设 6 个标本。

1.2.4 检测含重组腺病毒 pAD-SDF-1-(GlySer)3-HGF-IRES-GFP 的 BMSCs 对大鼠造血干细胞的扩增作用 制备 BMSCs 细胞滋养层 ($^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射, 照射剂量率为 100 cGy/分, 照射剂量 15Gy); 调整大鼠造血干细胞的密度为 2×10^4 个/ml。HSCs 种植于有滋养层的 24 孔板中, 移至 5%CO₂ 培养箱内, 37 °C, 饱和湿度下培养 12 d, 隔日半量换液 1 次; 按实验要求分为 3 组: HSC 加培养基组 (A1 组), HSC 加 BMSCs 组 (B1 组); HSC 加 SDF/HGF 融合蛋白介导的 BMSCs 组 (C1 组)。每组共设 24 个标本, 每个时间点 6 个标本。培养第 1、3、7、14 天, 收集细胞计数, 计算细胞增殖倍数, 检测 BMSCs 对 HSCs 总数的扩增效果。

1.2.5 检测含重组腺病毒 pAD-SDF-1-(GlySer)3-HGF-IRES-GFP 的 BMSCs 对大鼠造血干细胞的趋化作用 利用 transwell 共培养体系, 观测重组腺病毒转染的 BMSCs 对 HSCs 的趋化作用。用培养液将 HSCs 的密度调整为 2.5×10^5 个/ml。按实验要求分为 3 组: transwell 上室加 HSCs, 下室加细胞培养液 (A2 组); 上室加 HSCs, 下室加 BMSCs (B2 组); 上室加 HSCs, 下室加 SDF/HGF 融合蛋白介导的 BMSCs (C2 组)。

培养 24 h 后检测 HSCs 的穿膜细胞数。在 100 倍光镜下, 随机挑选 5 个视野, 计算穿膜细胞数并取其平均值。

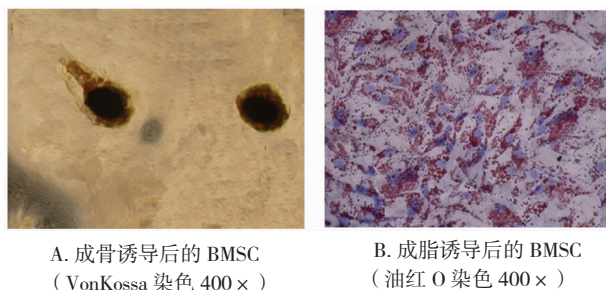
1.3 统计学方法

采用 SAS 9.2 进行数据整理与分析, 所有的计量资料均采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 进行统计描述, 运用重复测量的方差分析和完全随机设计的方差分析进行统计推断, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 大鼠骨髓间充质干细胞的培养及鉴定

分离培养的原代 BMSCs 接种 24 h 后开始贴壁, 细胞呈梭型, 排列紧密, 呈集落状生长。细胞生长较快, 集落增大, 培养第 10 天后几乎铺满瓶底, 呈漩涡状排列。流式细胞仪检测培养的 P3 代的 BMSCs 表面标记物 CD29 阳性率为 99.87%、CD90 阳性率为 99.31%、CD166 阳性率为 98.67%、CD45 阳性率为 0.26%。成骨诱导 3 周后, BMSCs 形成明显的卵圆形钙化结节, Von Kossa 染色有黑色磷酸盐胞外基质沉积 (图 1A) 提示 BMSCs 分化为成骨细胞。成脂诱导 6 d 后, BMSCs 油红 O 染色可见红色脂滴 (图 1B), 提示 BMSCs 可分化为脂肪细胞。



A. 成骨诱导后的 BMSC (VonKossa 染色 400 ×) B. 成脂诱导后的 BMSC (油红 O 染色 400 ×)

图 1 成骨及成脂诱导后的 BMSC

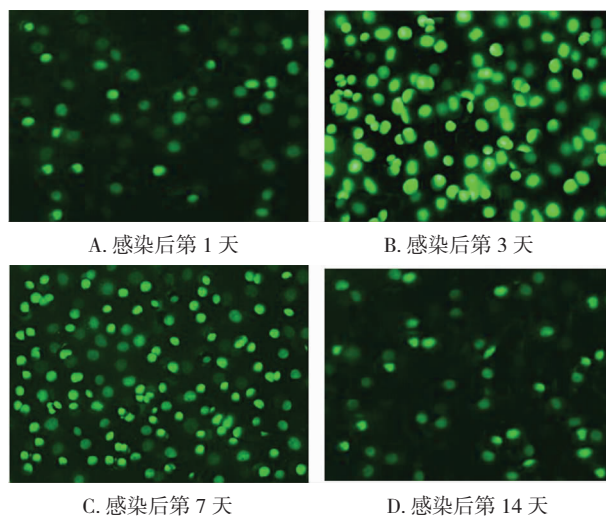
Fig.1 BMSC after osteogenic and adipogenic induction

2.2 大鼠造血干细胞的体外培养及鉴定

经 2 次过分选柱, 每个标本收集 CD34⁺ 细胞数范围为 $(2.5\sim 5.1) \times 10^6$, 0.4% 台盼蓝染色计数活细胞率均 >95%。流式细胞仪检测 2 次分选后 CD34⁺ 细胞纯度在 97.33% 以上。

2.3 重组腺病毒 pAD-SDF-1-(GlySer)3-HGF-IRES-GFP 感染 BMSCs 的效率及 SDF-1 和 HGF 的表达情况

当 moi 为 50 pfu/细胞时, 重组腺病毒的感染效率最高。重组腺病毒感染 BMSCs 后 1、3、7、14 d 的感染效率分别为 $(25.28 \pm 3.72)\%$ 、 $(82.22 \pm 3.58)\%$ 、 $(64.85 \pm 4.48)\%$ 、 $(28.35 \pm 2.73)\%$ 。感染后第 3 天的感染效率最高 (分别与第 1、7、14 天相比较, $F=718.05, P=0.000$; $F=66.80, P=0.000$; $F=642.78, P=0.000$) (图 2)。ELISA 方法检测出重组腺病毒感染 BMSCs 后第 3 天 SDF-1 ($F=393.88, P=0.000$; $F=175.82, P=0.000$; $F=349.35, P=0.000$; 时间效应 $F=165.55, P=0.000$) 和 HGF ($F=369.23, P=0.000$; $F=101.40, P=0.000$; $F=319.69, P=0.000$; 时间效应 $F=156.12, P=0.000$) 的表达明显高于感染后第 1、7、14 天 (表 1)。



A. 感染后第 1 天 B. 感染后第 3 天 C. 感染后第 7 天 D. 感染后第 14 天

图 2 重组腺病毒感染 BMSCs 后 GFP 的表达

Fig.2 Expression of GFP in BMSCs infected by recombinated adenovirus

2.4 感染重组腺病毒的 BMSCs 对造血干细胞的增殖作用

按照本实验的方案分组后, 共培养第 1 天, 与 A1 组相比, B1 ($F=16.73, P=0.000$)、C1 ($F=18.85, P=0.000$) 组中 HSCs

表 1 重组腺病毒感染 BMSCs 后 SDF-1 和 HGF 的表达 ($x \pm s, n = 6$)Tab.1 Expression of SDF-1 and HGF in BMSCs infected by recombinated adenovirus ($x \pm s, n = 6$)

指标	1 d	3 d	7 d	14 d	F 值	P 值
SDF-1($\mu\text{g/ml}$)	1.02 \pm 0.15	4.51 \pm 0.52 ^a	2.18 \pm 0.19	1.22 \pm 0.21	165.55	0.000
HGF($\mu\text{g/ml}$)	1.38 \pm 0.32	5.01 \pm 0.43 ^a	3.10 \pm 0.26	1.63 \pm 0.27	156.12	0.000

注:时间效应的 F 值和 P 值;a 表示重组腺病毒感染后第 3 天 SDF-1(与 1、7、14 天比较, $F=393.88, P=0.000; F=175.82; P=0.000; F=349.35, P=0.000$)和 HGF(与 1、7、14 天比较, $F=369.23, P=0.000; F=101.40, P=0.000; F=319.69, P=0.000$)表达量明显高于其余时间点

表 2 与感染重组腺病毒的 BMSCs 共培养后 HSCs 的扩增倍数 ($\bar{x} \pm s, n = 24$)Tab.2 Proliferation of HSCs coincubated with BMSCs infected by recombinated adenovirus ($\bar{x} \pm s, n = 24$)

指标	1 d	3 d	7 d	14 d	F 值	P 值
A1	1.933 2 \pm 0.167 1	3.286 2 \pm 0.390 0	5.972 3 \pm 0.292 6	8.863 8 \pm 0.374 9	6549.87 ^a	0.0000 ^a
B1	2.744 3 \pm 0.233 4 ^d	6.874 7 \pm 0.309 9 ^d	12.171 7 \pm 0.399 1 ^d	16.878 8 \pm 0.254 5 ^d	4807.19 ^b	0.0000 ^b
C1	2.794 2 \pm 0.349 3 ^e	9.918 5 \pm 0.377 7 ^f	19.789 7 \pm 0.522 1 ^f	26.435 7 \pm 0.313 2 ^f	711.74 ^c	0.0000 ^c

注:a 表示时间效应的 F 值和 P 值;b 表示组别效应的 F 值和 P 值;c 表示交互效应的 F 值和 P 值;d 表示培养第 1、3、7、24 天, B1($F=16.73, P=0.000$)组和 C1($F=18.85, P=0.000$)组中 HSCs 的扩增倍数明显高于 A1 组;e 表示培养第 1 天, B1 组和 C1 组中 HSCs 的扩增倍数无明显差异($F=0.06, P=0.802 5$);f 表示培养第 3、7、14 天, C1 组($F=235.53, P=0.000; F=1 475.34, P=0.000; F=2321.88, P=0.000$)中 HSCs 的扩增倍数明显高于 B1 组

的扩增倍数明显增加;但 B1 组和 C1 组比较, HSCs 的扩增倍数无明显差异($F=0.06, P=0.803$);培养第 3、7、14 天, 与 A1 组相比, B1(第 3 天 $F=327.37, P=0.000$;第 7 天 $F=977.01, P=0.000$;第 14 天 $F=1 633.12, P=0.000$)、C1(第 3 天 $F=1 118.26, P=0.000$;第 7 天 $F=4 853.55, P=0.000$;第 14 天 $F=7 849.56, P=0.000$)组中 HSCs 的扩增倍数明显增加,同时 C1 组中 HSCs 的扩增倍数明显高于 B1 组(第 3 天 $F=235.53, P=0.000$;第 7 天 $F=1475.34, P=0.000$;第 14 天 $F=2 321.88, P=0.000$)。具体见表 2。

2.5 感染重组腺病毒的 BMSCs 对 HSCs 的趋化作用

按照本实验的方案分组共培养 24 h 后, transwell 小室中 HSCs 的迁移指数分别是: A2 组 (323.83 ± 6.01), B2 组 (511.17 ± 11.13), C2 组 (701.83 ± 9.83)。B2 和 C2 组的迁移指数明显高于 A2 组,同时 C2 组的迁移指数明显高于 B2 组(组间 $F=2 506.80, P=0.000$, 再行 Dunnett's *t* 检验, 两两比较 P 均 < 0.05)。

3 讨论

近年来, 肝干细胞移植成为国内外研究热点。根据多项研究结果显示, 应用肝干细胞移植技术将有望重建肝组织, 恢复肝功能。根据起源不同, 肝干细胞可分为肝源性和非肝源性肝干细胞, 包括肝源性的卵圆细胞及非肝源性的胚胎干细胞、BMSCs、HGF 及胰腺上皮细胞等。由于 BMSCs、HGF 超强的可塑性和扩增能力, 成为干细胞移植治疗的理想的细胞来源。如何利用二者的关系, 使其定向趋化于损伤肝脏? 如何使二者向有利于肝组织重建方向分化, 都是目前研究的热点和难点。

BMSCs 属骨髓中的非造血细胞, 所占比例很小^[10], 但是 BMSCs 在分化为肝细胞方面有着独特的一面^[11]。Schwarz 等^[9]发现从人体, 老鼠, 兔子骨髓中分离的 BMSCs, 与 HGF, FGF-4 共培养后, 可分化为肝细胞样细胞。这些细胞表达肝性标志物, 如肝细胞核因子-3、转录因子 GATA4、细胞角蛋白-19、甲胎蛋白、白蛋白等, 同时也具有肝细胞的功能特征, 例如可分泌尿素, 白蛋白。此外, 也有学者报道, 在肝脏纤维化动物模型中, 间充质干细胞具有抗纤维化作用^[12-16]。其机制被认为是与旁分泌调节因子、白介素-10、肿瘤坏死因子- α 、HGF 有关, 但也有不一致的报道^[17-22]。HSCs 在“干细胞龛(stem cell Niche)中生长、发育, 占据了骨髓干细胞的绝大部分。HSCs 要发挥组织修复作用, 首先需要到达损伤部位。BMSCs 可诱导归巢受体、分泌基质细胞衍生因子, 如 SDF-1, 促使 HSCs 归巢。SDF-1 唯一的特异性受体是 CXCR4, 表达 CXCR4 的 HSCs 能够沿着 SDF-1 的浓度梯度而定向迁移^[23]。此外, 作为最强肝脏再生剂的 HGF, 也是干细胞向肝细胞分化的最关键的细胞因子, 并能促进 SDF-1 诱导的 HSCs 定向迁移。

因此, 本实验将 SDF-1/HGF 融合蛋白基因引入 BMSCs, 以期 SDF-1/HGF 融合蛋白能在 BMSCs 中有效表达。在荧光显微镜下观测到重组腺病毒 pAD-SDF-1-(GlySer)3-HGF-IRES-GFP 能有效感染 BMSCs, 并于感染后第 3 天感染效率最高, 可达 (83.67 ± 9.05)%; 同时, ELISA 方法检测出重组腺病毒感染 BMSCs 后第 3 天 SDF-1 和 HGF 的表达也

是最高。该结果说明重组腺病毒 pAD-SDF-1-(Gl-ySer)3-HGF-IRES-GFP 感染 BMSCs 后,能有效表达目的基因,为课题组后续实验建立了良好的细胞模型。将感染了重组腺病毒的 BMSCs 制备细胞滋养层, HSCs 种植于有滋养层的 24 孔板,发现 SDF-1/HGF 融合蛋白介导的 BMSCs 对 HSCs 有明显的扩增作用。另外, transwell 显示, SDF-1/HGF 融合蛋白介导的 BMSCs 对 HSCs 有明显趋化作用,其迁移指数明显高于加 BMSCs 组及加培养基组。该实验结果提示, SDF-1/HGF 融合蛋白基因引入 BMSCs 后,不仅能够有效表达目的基因,而且能较好的保持目的基因 SDF-1 和 HGF 促 HSCs 迁移及增殖的功能,同时对 BMSCs 的功能起协同作用。但 SDF-1/HGF 融合蛋白基因在 BMSCs 的表达于感染第 3 天达高峰后,随后逐渐降低,且促 HSCs 迁移及增殖的功能也逐渐减弱。实验结果提示, SDF-1/HGF 融合蛋白基因在 BMSCs 的表达不是稳定不变的,在后续进行的联合移植中,需注意 SDF-1/HGF 融合蛋白介导的 BMSCs 植入的时间间隔,以便更好的发挥其促干细胞增殖,迁移及分化的作用。这一结果为进一步研究联合移植 SDF-1/HGF 融合蛋白介导的 BMSCs 和 HSCs 在重建肝组织中的作用奠定了细胞实验基础。

参 考 文 献

- [1] Mark AL, Sun Z, Warren DS, et al. Stem cell mobilization is life saving in an animal model of acute liver failure[J]. *Ann Surg*, 2010, 252(4): 591-596.
- [2] Lam SP, Luk JM, Man K, et al. Activation of interleukin-6-induced glycoprotein 130/signal transducer and activator of transcription 3 pathway in mesenchymal stem cells enhances hepatic differentiation, proliferation, and liver regeneration[J]. *Liver Transpl*, 2010, 16(10): 1195-1206.
- [3] McClelland R, Wauthier E, Tallheden T, et al. In situ labeling and magnetic resonance imaging of transplanted human hepatic stem cells[J]. *Mol Imaging Biol*, 2011, 13(5): 911-922.
- [4] Lee MJ, Jung J, Na KH, et al. Anti-fibrotic effect of chorionic plate-derived mesenchymal stem cells isolated from human placenta in a rat model of CCl(4)-injured liver: Potential application to the treatment of hepatic diseases[J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111(6): 1453-1463.
- [5] Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(10): 1291-1302.
- [6] Chamberlain J, Ymamgami T, Colletti E, et al. Efficient generation of human hepatocytes by the intrahepatic delivery of clonal human mesenchymal stem cells in fetal sheep[J]. *Hepatology*, 2007, 46(6): 1935-1945.
- [7] Kucia M, Wojakowski W, Reza R, et al. The migration of bone marrow-derived non-hematopoietic tissue-committed stem cells is regulated in an SDF-1-, HGF-, and LIF-dependent manner[J]. *Arch Immunol Ther Exp*, 2006, 54(2): 121-135.
- [8] Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S, et al. AMD3100 and CD26 modulate mobilization, engraftment, and survival of hematopoietic stem and progenitor cells mediated by the SDF-1/CXCL12-CXCR4 axis[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2007(1106): 1-19.
- [9] Tashiro H, Fudaba Y, Itoh H, et al. Hepatocyte growth factor prevents chronic allograft dysfunction in liver transplanted rats[J]. *Transplantation*, 2003, 76(5): 761-765.
- [10] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147.
- [11] Sato Y, Araki H, Kato J, et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat are differentiated into human hepatocytes without fusion[J]. *Blood*, 2005, 106(2): 756-763.
- [12] Stock P, Bruckner S, Ebensing S, et al. The generation of hepatocytes from mesenchymal stem cells and engraftment into murine liver[J]. *Nat Protoc*, 2010, 5(4): 365-368.
- [13] Fang B, Sh M, Liao L, et al. Systemic infusion of FLK1+ mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice[J]. *Transplant*, 2004, 78(1): 83-88.
- [14] Zhao DC, Le JX, Chen R, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rat[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(22): 3431-3440.
- [15] Chen X, Li Y, Wang L, et al. Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production[J]. *Neuropathol*, 2002, 22(4): 275-279.
- [16] Parekkadan B, Vanpoll D, Suganuma K, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure[J]. *PLoS One*, 2007, 2(9): e941.
- [17] Kanazawa Y, Verma IM. Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003(100): 11850-11853.
- [18] Forbes SJ, Russo FP, Rey V, et al. A significant proportion of myofibroblast are of bone marrow origin in human liver fibrosis[J]. *Gastroenterology*, 2004, 126(4): 955-963.
- [19] Baba S, Fujii H, Hirose T, et al. Commitment of bone marrow to hepatic stellate cells in mouse[J]. *J Hepatol*, 2004, 40(2): 255-260.
- [20] Russo FP, Alison MR, Bigger BW, et al. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis[J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(6): 1807-1821.
- [21] Carvalho AB, Quintanilha LF, Dias JV, et al. Bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells do not reduce fibrosis or improve function in a rat model of severe chronic liver injury[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(5): 1307-1314.
- [22] Bonzo LV, Ferrero I, Cravanzola C, et al. Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential[J]. *Gut*, 2008, 57(2): 223-231.
- [23] Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S, et al. AMD3100 and CD26 modulate mobilization, engraftment, and survival of hematopoietic stem and progenitor cells mediated by the SDF-1/CXCL12-CXCR4 axis[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2007(1106): 1-19.