

消化系统疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001289

外源性联合应用 EPCs 和 SDF-1 α 对大鼠肝移植缺血再灌注的保护作用姜 飞¹, 吴 皓², 王孟皓², 曹 丁², 吴涯昆², 段世刚³

(1. 重庆市九龙坡区人民医院肝胆外科, 重庆 401329; 2. 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科, 重庆 400010;

3. 重庆市第九人民医院肝胆外科, 重庆 400799)

【摘要】目的:探讨外源性注射骨髓来源的血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)或基质细胞源性因子-1 α (stromal derived factor-1 alpha, SDF-1 α)或两者联合, 比较性评估 3 种方法对大鼠肝移植术后缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)的影响。**方法:**LEWIS 大鼠骨髓 EPCs 提取培养, 流式表型鉴定, 激光共聚焦功能鉴定; 建立大鼠原位肝移植模型, 随机分为 5 组: A 组(假手术组), B 组(手术组), C 组(SDF-1 α 组), D 组(EPCs 组), E 组(SDF-1 α +EPCs 组); 再灌注 12 h 后处死各组大鼠, 免疫组化检测肝组织再生以及肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)的表达情况; WB 检测肝组织血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、HGF、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(cysteine specific proteinase-3, Caspase-3)蛋白表达; ELISA 检测 VEGF、HGF、TGF- β 表达。**结果:**LEWIS 大鼠骨髓提取的 EPCs CD34、CD133 的阳性比例分别为 78.32%、70.76%, 同时具有结合 ac-LDL 和 UEA-1 功能的 EPCs, 阳性率达 80% 以上; SDF-1 α 诱导 EPCs 穿过的细胞数[(79.6 $\pm$ 6.3)个]明显高于对照组[(36.2 $\pm$ 2.9)个]($P=0.000$); 各组大鼠肝组织中, C、D 组肝组织 HGF 分泌和再生情况免疫评分明显高于 A、B 组($P=0.000$), E 组免疫评分明显高于 C、D 组($P=0.000$); 各组 VEGF、HGF、TGF- β 、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达结果, C、D 组 VEGF、HGF、TGF- β 、Bcl-2 蛋白表达明显高于 A、B 组($P=0.000$), E 组 VEGF、HGF、TGF- β 蛋白表达明显高于 C、D 组($P=0.000$), 而 C、D、E 组 Bcl-2 蛋白表达比较差异无统计学意义。B、C、D 组 Caspase-3 蛋白表达明显高于 A 组($P=0.000$), 而 E 组 Caspase-3 蛋白明显低于 C、D 组($P=0.000$); ELISA 结果与 Western blot 结果一致。**结论:**外源性联合应用 EPCs 和 SDF-1 α 能有效保护肝移植缺血再灌注的损伤, 诱导肝细胞再生, 减少肝细胞凋亡。

【关键词】内皮祖细胞; 基质细胞源性因子-1 α ; 缺血再灌注损伤; 肝移植**【中图分类号】**R657.3; R392.4**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2016-07-21Exogenous SDF-1 α delivery combined with EPCs transplantation produces a superior protective effect on hepatic ischemia reperfusion injured ratsJiang Fei¹, Wu Hao², Wang Menghao², Cao Ding², Wu Yakun², Duan Shigang³

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, People's Hospital of Jiulongpo District; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Central Laboratory, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University;

3. Department of Hepatobiliary Surgery, The Ninth People's Hospital of Chongqing)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of exogenous SDF-1 α delivery or EPCs transplantation or SDF-1 α combined with EPCs transplantation on hepatic ischemia reperfusion injured rats. **Methods:** EPCs were extracted from bone marrow of LEWIS rats and cultured for days for phenotype identification with flow cytometry and functional identification with confocal laser. The orthotopic liver transplantation models were established in mice, which were divided randomly into five groups: A group, sham group; B group, surgery group; C group, SDF-1 α group; D group, EPCs group; E group, SDF-1 α +EPCs group. The rats were euthanased after 12 h reperfusion, and the liver tissues in each group were assayed with immunohistochemistry for liver regeneration and HGF expression. The protein levels of VEGF, HGF, TGF- β , Bcl-2 and Caspase-3 in each group were assayed with Western blot, and the expression of VEGF, HGF and TGF- β in liver homogenates

作者介绍: 姜 飞, Email: 366099430@qq.com,

研究方向: 肝缺血再灌注损伤的机制以及治疗。

通信作者: 段世刚, Email: gongjianping11@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(编号: 81370580); 重庆市卫生计生委医学科研计划资助项目(编号: 2015ZDXM029)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170516.1652.060.html>
(2017-05-16)

with ELISA. **Results:** The CD34 and CD133 positive rates of EPCs extracted from LEWIS rats were 78.32% and 70.76 respectively, and the binding capacity of ac-LDL and UEA-1 in EPCs accounted for over 80%. The number of EPCs (79.6 ± 6.3) induced by SDF-1 α was significant higher than that in control group (36.2 ± 2.9) ($P=0.000$). In liver tissues of each group, the immunohistochemical scores in C and D groups of HGF secretion and liver regeneration were significantly higher than those in A and B groups ($P=0.000$), and the immunohistochemical scores in E group was significant higher than those in C and D groups ($P=0.000$). The results of proteins expression showed that the expressions of VEGF, HGF, TGF- β and Bcl-2 proteins were higher in C and D groups than in A and B groups ($P=0.000$); the expressions of VEGF, HGF and TGF- β proteins were significantly higher in E group than in C and D groups ($P=0.000$), but there was no significant difference in Bcl-2 expression among C, D, E groups. The expressions of Caspase-3 protein were significantly higher in B, C, D groups than in A group ($P=0.000$), but the expression of Caspase-3 was significant lower in E group than in C and D groups ($P=0.000$). The ELISA got the same results. **Conclusion:** Exogenous SDF-1 α delivery combined with EPCs transplantation produces a superior protective effect on hepatic ischemia reperfusion injured rats, which could induce the regeneration of liver and reduce hepatocyte apoptosis.

[Key words] endothelial progenitor cells; stromal derived factor-1 α ; ischemia reperfusion injury; interleukin4; liver transplantation

缺血再灌注损伤 (ischemia reperfusion injury, IRI) 是肝移植术后肝功能障碍、衰竭或移植早期原发性无功能的主要原因之一, 其发生机制复杂, 约 10% 的移植肝脏早期因微血管病变以及 IRI 出现衰竭, 同时导致急性和慢性排斥反应高发^[1]。

血管内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs) 是血管内皮的前体细胞, 主要参与局部新生血管的形成^[2-3]。随着研究的深入, EPCs 在内皮功能受损和缺血性疾病中的治疗备受关注。有研究发现, 移植 EPCs 至大鼠肝硬化模型中, 能显著增强肝再生能力以及促进纤维蛋白的溶解, 提高大鼠生存率^[4]。同时, EPCs 分泌的血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在修复肝移植后微血管损伤中发挥重要作用, 并且后者还可刺激相关细胞分泌肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF), 从而促进肝组织再生^[5]。另外, 基质细胞源性因子-1 α (stromal derived factor-1 alpha, SDF-1 α ; 与 CXCR4 具有高度亲和力) 能够诱导 EPCs 以及肝卵圆细胞向损伤处的归巢, 从而参与肝再生过程^[6-7]。本研究通过外源性注射 EPCs 或 SDF-1 α 或两者联合, 比较性评估 3 种方法对大鼠肝移植缺血再灌注 (hepatic ischemia reperfusion injured, HIRI) 的影响。

1 材料与方法

1.1 动物与材料

实验动物: 供体为健康雄性 LEWIS 大鼠, 受体为健康雄性 BN 大鼠, 鼠龄均为 10~12 周, 体质量为 180~200 g, 各 30 只 (均购自重庆医科大学实验动物中心), 饲养于重庆医科大学实验动物中心 SPF 实验室。给予标准鼠料喂养, 给予 12 h

昼夜节律, 正常饮水。术前 8~12 h 禁食。

主要试剂: EGM-2MV 培养基购自上海普迈生物公司, Histopaque 1083 液购自美国 Sigma 公司, 荧光素标价的抗体 PE-CD34、FITC-CD133、FITC-UEA-1、DiI-ac-LDL 购自美国 eBioscience 公司, 小鼠抗大鼠增生细胞核 (PCNA) 抗体购自上海美旋生物公司, 兔抗大鼠 VEGF、HGF、TGF- β 、Bcl-2、Caspase-3 单克隆抗体均购自美国 Abcam 公司, VEGF、HGF、TGF- β ELISA 试剂盒购自美国 Active motif 公司, 总蛋白提取试剂购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 EPCs 的分离培养

SD 大鼠注射过量戊巴比妥 (100 mg/kg) 致死, 取出四肢长骨, 在 4 °C 含 5% FBS 的 PBS 中剔除肌肉组织, 将骨髓细胞完全冲入培养皿中, 250 目滤网过滤, 将滤液 1 000 r/min 离心 5 min, 获取细胞沉淀; 离心管底部加入 5 mL Histopaque 1083 液, 上层加入 5 mL 骨髓悬液, 2 200 r/min 离心 5 min, 吸取中间交界处单个核细胞, 5% FBS 的 PBS 洗 3 次, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, EGM-2MV 重悬, 接种于纤维粘连蛋白包被的培养皿中, 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养, 4 d 后换液, 以后 3~4 d 换液 1 次。细胞生长至 80%~90% 融合时, 用 0.25% 胰酶消化, 1:2 传代, 每天观察细胞贴壁情况以及生长形态。

1.3 EPC 表型鉴定

将细胞浓度调整至 1×10^6 个/mL, 分别向细胞悬液中加入荧光素标价的抗体 (PE-CD34、FITC-CD133), 室温避光孵育 30 min, 再加入 2 mL 含 0.09% 叠氮化钠的 PBS, 震荡混匀后 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, PBS 重悬细胞上流式细胞仪检测。

1.4 EPCs 的功能鉴定

将 EPCs 传代至共聚焦培养皿中, 待细胞生长至 80%~90% 融合时, 弃培养液, PBS 洗 3 次, 加入终浓度 10 μ g/mL FITC 标记的荆豆凝集素 1 (FITC-UEA-1) 抗体, 37 °C、5% CO₂ 避光孵育 1 h, PBS 冲洗后再加入终浓度 10 μ g/mL 吞噬 DiI 标记的低密度脂蛋白 (DiI-ac-LDL) 抗体, 避光孵育 1 h 后立即上激光共聚焦观察。

1.5 Transwell 检测 SDF-1 α 对 EPCs 细胞迁移的影响

EPCs 经胰酶消化后铺 6 孔板,每孔细胞约 1×10^6 个,24 h 待细胞贴壁后备用。实验分为 2 组:SDF-1 α 诱导组和空白对照组。准备细胞小室,实验组下室加入 500 μ L 10% FBS+SDF-1 α (100 ng/mL) 培养基,空白对照组未加 SDF-1 α ,在上室先加入 200 μ L 培养基,重悬各组细胞,调整浓度至 1×10^5 个/mL,上室加 150 μ L 细胞悬液,37 $^{\circ}$ C 孵育 12 h,移去 transwells,孔板中加入 0.1% 结晶紫染液 500 μ L,将小室置于其中,使膜浸没在染液中,25 min 后取出,PBS 清洗 3~5 次。分部取 5 个视野,计数,并且拍典型照片。

1.6 原位肝移植模型建立

采用改良的 Kamada“二袖套管”法建立 LEWIS $\rightarrow$ BN 大鼠配对组合的原位肝移植 (orthotopic liver transplantation, OLT) 急性排斥反应模型。为了防止肝窦内皮细胞机械性损伤,以 2 mL/min 灌注 0~4 $^{\circ}$ C 6 mL 乳酸钠林格氏液 (lactated Ringer's solution, LRS) 灌注供肝。热缺血时间控制在 0 min,冷缺血时间控制在 1 h,无肝期控制在 20 min。实验动物随机分为 5 组:A 组,假手术组,经门静脉注射 1 mL PBS 和 1 mL 生理盐水 (NS);B 组,手术组,经门静脉注射 1 mL PBS 和 1 mL NS;C 组,SDF-1 α 组,经门静脉注射 1 mL PBS 和 SDF-1 α (200 ng/mL) 的 1 mL NS;D 组,EPCs 组,经门静脉注射含 2×10^6 个/mL EPCs 的 1 mL PBS 和 1 mL NS;E 组,SDF-1 α +EPCs 组,经门静脉注射含 2×10^6 个/mL EPCs 的 1 mL PBS 和 SDF-1 α (200 ng/mL) 的 1 mL NS。上述 EPCs 预先用 mRFP (红色荧光蛋白) 标记。荧光显微镜观察 EPCs 的归巢情况。再灌注 12 h 后处死各组大鼠,取下肝组织,并将组织石蜡固定包埋或作冰冻切片。余下组织液氮保存。

1.7 免疫组织化学

石蜡切片,正常山羊血清封闭液,室温 20 min,滴加纯化抗大鼠 HGF 单克隆抗体 (工作浓度为 1:100),湿盒中 4 $^{\circ}$ C 过夜。滴加辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗兔 IgG 二抗 (1:200 稀释),37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。二氨基联苯胺 (DAB) 显色 30 min。苏木素复染,树脂封片,镜下观察,细胞核呈紫蓝色,阳性产物呈棕黄色或黄色颗粒。实验结果经过 Image pro plus 6.0 分析评分。

1.8 Western blot 分析

按照总蛋白提取试剂盒说明提取各组肝组织总蛋白,并进行蛋白浓度测定。蛋白质变性后,40 μ g 加入上样孔进行电泳分离,电转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉 4 $^{\circ}$ C 下封闭 1.5 h,TBST 冲洗 3 次 $\times$ 10 min,一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育,TBST 冲洗 3 次 $\times$ 10 min,二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,TBST 冲洗 3 次 $\times$ 10 min,加 ECL 发光液,X 线曝光、显影、定影,然后用 UVP 凝胶图像处理系统软件分析目的条带的灰度值。

1.9 ELISA 分析

根据 ELISA 检测试剂盒说明书检测小鼠肝组织匀浆 VEGF、HGF、TGF- β 表达水平。每组实验重复 3 次。

1.10 统计分析

应用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间差异用方差分析,多组间均数比较

经方差齐性检验后用单因素方差分析,两组间均数比较采用 LSD- t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞形态学和表型分析

刚分离得到的细胞呈小圆形,细胞折光性强,3 d 后细胞贴壁较为完全,细胞多为长梭形 (图 1A)。第 4 天换液后,贴壁细胞生长迅速,并有梭形贴壁细胞从其边缘不断生长。7~8 d 细胞形态由长梭形变成多角形并融合成片,呈典型的“铺路石”样外观 (图 1B)。流式细胞检测结果显示,CD34、CD133 的阳性比例分别为 78.32%、70.76%,阳性细胞的百分比非常高 (图 1C),表明获得的细胞主要是高纯度的 EPCs。

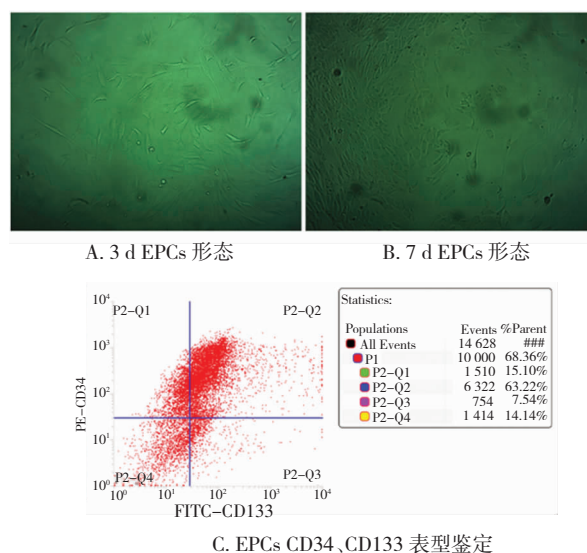


图 1 EPCs 形态观察以及表型鉴定 (200 $\times$)

Fig.1 Morphologic observation and phenotypic identification of EPCs (200 $\times$)

2.2 细胞功能鉴定

通过激光共聚焦对分离后培养的 EPCs 功能进行鉴定:EPCs 摄取 ac-LDL 显示红色荧光;EPCs 结合 UEA-1 显示绿色荧光;EPCs 双阳性细胞显示黄色荧光,表示同时具有结合 ac-LDL 和 UEA-1 功能的 EPCs,阳性率达到 80% 以上 (图 2)。

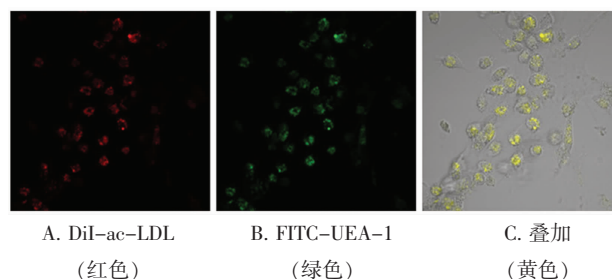
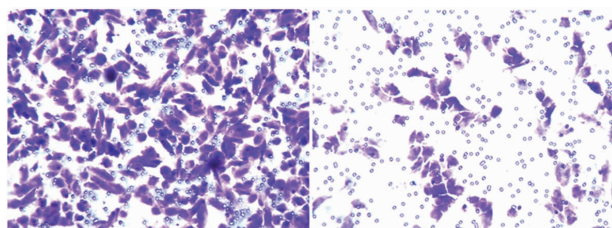


图 2 激光共聚焦观察 EPCs 经 FITC-UEA-1/Dil-ac-LDL 双染结果 (200 $\times$)

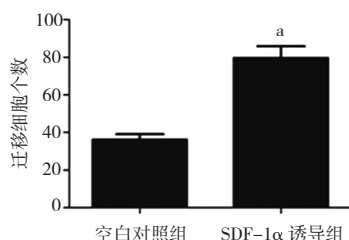
Fig.2 FITC-UEA-1/Dil-ac-LDL fluorescent staining of EPCs observed by laser confocal microscopy (200 $\times$)

2.3 SDF-1 α 促进 EPCs 的迁移

Transwell 实验检测 SDF-1 α 诱导组和空白对照组 EPCs 的迁移能力,结果显示:SDF-1 α 诱导组穿过的细胞数[(79.6 $\pm$ 6.3)个]明显高于空白对照组[(36.2 $\pm$ 2.9)个]($t=-14.007, P=0.000$),表明 SDF-1 α 可诱导 EPCs 的迁移(图 3)。

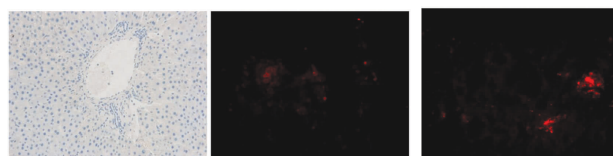
A. SDF-1 α 诱导组

B. 空白对照组

a: 与空白对照组比较, $P=0.000$ C. SDF-1 α 诱导组和空白对照组 EPCs 细胞迁移比较图 3 SDF-1 α 对 EPCs 细胞迁移作用比较(400 $\times$)Fig.3 Numbers of EPCs migration effected by SDF-1 α (400 $\times$)

2.4 EPCs 在肝脏中的归巢情况

通过注射红色荧光标记的 EPCs 发现,再灌注 30 min 时,肝组织中有少量 EPCs 荧光表达,再灌注 1 h 时,EPCs 的归巢明显增多,说明成功将 EPCs 注入肝组织中发挥作用(图 4)。



A. 白光下观察

肝组织

B. 再灌注 30min 下

观察 EPCs 的归巢

C. 再灌注 1h 下观察

EPCs 的归巢

图 4 荧光显微镜观察 EPCs 的归巢(红色荧光代表 EPCs, 400 $\times$)

Fig.4 Homing of EPCs observed by fluorescence microscope

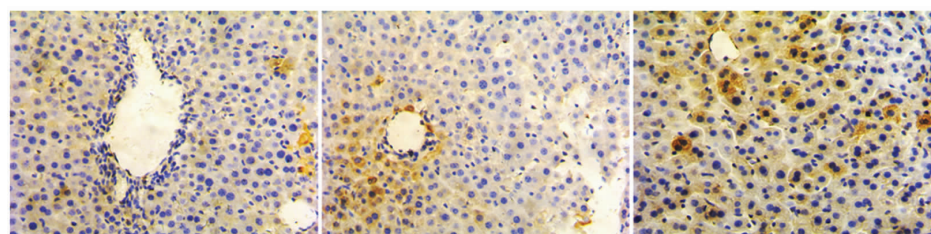
(red fluorescence refer to EPCs, 400 $\times$)

2.5 SDF-1 α 联合 EPCs 促进 HGF 分泌

HGF 是目前已知最强的肝再生促进剂,HGF 可抑制肝细胞凋亡,促进肝细胞再生,恢复肝细胞功能。方差分析 5 组 HGF 免疫评分的差异具有统计学意义($F=289.042, P=0.000$)。两两比较结果显示:C、D 组免疫评分分别为(3.26 $\pm$ 0.31)分、(3.86 $\pm$ 0.21)分,明显高于 A、B 组的(0.74 $\pm$ 0.11)分、(2.04 $\pm$ 0.18)分($P=0.000$)。与 C、D 组比较,E 组免疫评分[(5.32 $\pm$ 0.28)分]明显升高,差异具有统计学意义($P=0.000$),如图 5 所示。

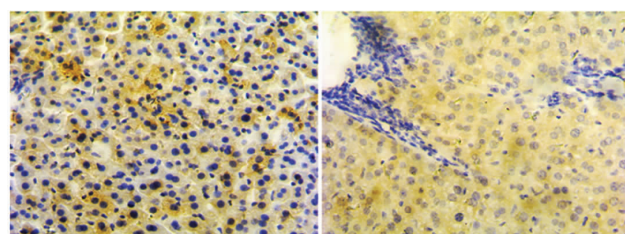
2.6 SDF-1 α 联合 EPCs 促进肝细胞再生

通过检测各组增殖细胞核抗原的免疫组化,方差分析 5 组 PCNA 免疫评分的差异具有统计学意义($F=344.800, P=0.000$)。两两比较结果显示:C、D 组免疫评分分别为(2.92 $\pm$ 0.24)分、(3.20 $\pm$ 0.29)分,明显高于 A、B 组的(0.24 $\pm$ 0.05)分、(0.96 $\pm$ 0.15)分($P=0.000$)。与 C、D 组比较,E 组免疫评分[(4.88 $\pm$ 0.29)分]明显较高,差异具有统计学意义($P=0.000$),如图 6 所示。

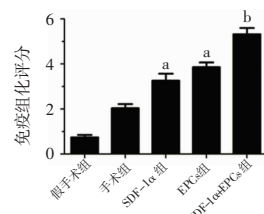


A. 假手术组 (A 组)

B. 手术组 (B 组)

C. SDF-1 α 组 (C 组)

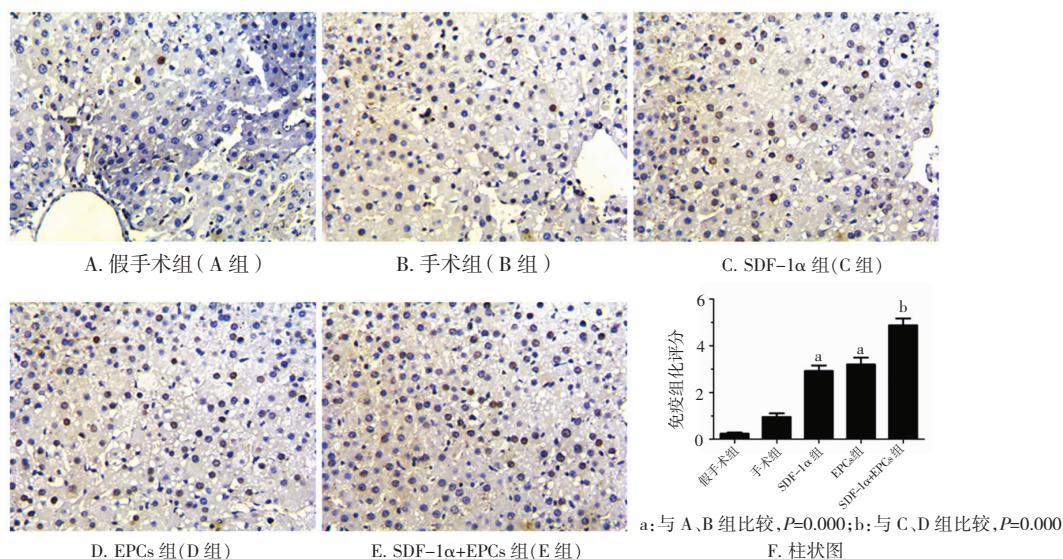
D. EPCs 组 (D 组)

E. SDF-1 α +EPCs 组 (E 组)a: 与 A、B 组比较, $P=0.000$; b: 与 C、D 组比较, $P=0.000$

F. 柱状图

镜下观察细胞核为蓝色,黄色或棕黄色颗粒为阳性表达,阴性对照无黄色或是棕黄色颗粒

图 5 各组 HGF 免疫组化比较(400 $\times$)Fig.5 HGF protein expression detected by immunohistochemistry in each group(400 $\times$)



镜下观察细胞核为蓝色,黄色或棕黄色颗粒为阳性表达,阴性对照无黄色或是棕黄色颗粒

图 6 各组 PCNA 免疫组化比较(400 ×)

Fig.6 PCNA detected by immunohistochemistry in each group(400 ×)

2.7 各组相关蛋白表达

方差分析各组 VEGF($F=67.419, P=0.000$)、HGF($F=32.245, P=0.000$)、TGF- β ($F=24.062, P=0.000$)、Bcl-2($F=44.028, P=0.000$)、Caspase-3($F=56.008, P=0.000$)蛋白表达差异具有统计学意义。两两比较结果显示:C、D 组 VEGF、HGF、TGF- β 、Bcl-2 蛋白表达明显高于 A、B 组,差异具有统计学意义($P=0.000$),E 组 VEGF、HGF、TGF- β 蛋白表达明显高于 C、D 组($P=0.000$),而 C、D、E 组 Bcl-2 蛋白表达差异无统计学意义。B、C、D 组 Caspase-3 蛋白表达明显高于 A 组,差异具有统计学意义($P=0.000$),而 E 组 Caspase-3 蛋白明显低于 C、D 组,差异具有统计学意义($P=0.000$),如图 7 所示。说明 SDF-1 α 联合 EPCs 明显增强肝移植后肝细胞再生,减少肝细胞凋亡。

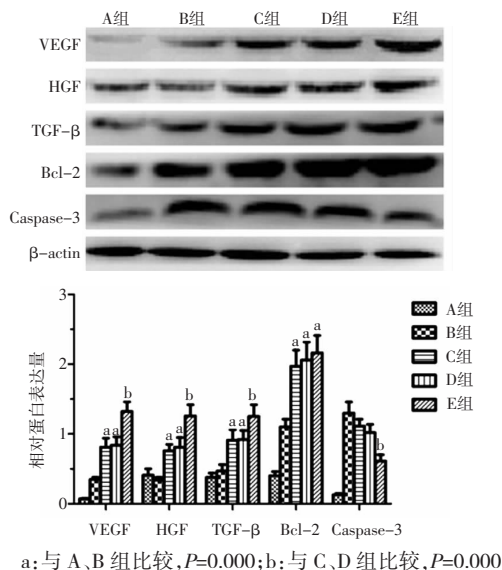


Fig.7 Expression of relative proteins in each group

2.8 各组相关因子表达

ELISA 检测 VEGF、HGF 以及 TGF- β 结果显示:与 A、B 组比较,C、D、E 组肝组织分泌 VEGF、HGF 以及 TGF- β 水平明显较高,且差异具有统计学意义($P=0.000$);E 组上述因子分泌水平明显高于 C、D 组,差异具有统计学意义($P=0.000$),见表 1。

表 1 各组 VEGF、HGF 以及 TGF- β 比较($n=3, \bar{x} \pm s, \text{ng/mL}$)

Tab.1 Comparison of cytokines in each group($n=3, \bar{x} \pm s, \text{ng/mL}$)

细胞因子	VEGF	HGF	TGF- β
A 组	0.423 ± 0.064	1.267 ± 0.232	1.478 ± 0.264
B 组	0.401 ± 0.057	1.489 ± 0.295	1.531 ± 0.314
C 组	3.698 ± 0.516^a	3.742 ± 0.568^a	4.021 ± 0.632^a
D 组	3.921 ± 0.574^a	4.034 ± 0.593^a	4.397 ± 0.604^a
E 组	6.258 ± 0.851^{ab}	7.325 ± 0.980^{ab}	6.741 ± 0.967^{ab}
F 值	71.559	50.646	39.066
P 值	0.000	0.000	0.000

注:a,与 A、B 组比较, $P=0.000$; b:与 C、D 组比较, $P=0.000$

3 讨论

EPCs 又称血管母细胞,存在于外周血、骨髓、脐血、胎肝、脾等组织中。骨髓中含有大量干细胞和祖细胞,相对于外周血和脐带血,内皮祖细胞的含量更为丰富,且增殖能力更强^[2-3]。在某种病理状态下,骨髓中的 EPCs 可经动员进入外周血中,参与缺血性疾病、血管创伤等修复过程^[8]。内皮祖细胞与成熟内皮祖细胞都有一些相同的表面标志物,包括 CD34、

KDR、VE-钙联素等,所以不能用这些标志物区分这 2 种细胞。CD133 是一个新发现的造血干细胞表面标志物,在成熟的内皮细胞不表达。有研究发现,急性心肌梗死时,循环中 EPCs 的数量暂时性升高,且外周血 EPCs 的增长水平与血浆中的 VEGF 水平呈正相关,表明 VEGF 有动员 EPCs 从骨髓进入外周血的作用。与此同时,成熟内皮细胞也可分泌 VEGF,从而参与血管的新生过程^[9]。另外,SDF-1 α /CXCR4 作用参与造血干细胞、骨髓间充质干细胞及内皮祖细胞的动员、归巢、粘附、增殖和抗凋亡,几乎所有 EPCs 均表达 CXCR4^[6-7]。SDF-1 α 可通过与 EPCs 表面的 CXCR4 结合,促进 EPCs 归巢到缺血部位,从而促进缺血组织的血管新生。SDF-1 α 介导的趋化、细胞增殖等需要 PI3K/Akt 信号通路的活化^[7,10]。还有研究报道,NF- κ B 和 PKC 通路同样在 SDF-1 α 介导的细胞生长、迁移中起作用,并且这些通路在某种条件下可以调节细胞凋亡^[11]。

本研究中,通过分离大鼠骨髓 EPCs,流氏检测 CD34 以及 CD133 阳性细胞,得到纯度较高的 EPCs (>70%)。Transwell 实验检测 SDF-1 α 对 EPCs 的迁移能力发现,SDF-1 α 诱导组穿过的细胞数显著高于对照组,表明 SDF-1 α 可显著诱导 EPCs 的迁移。接着,外源性注射 EPCs 或 SDF-1 α 或两者联合,比较性评估 3 种方法对大鼠肝移植术后 IRI 的影响发现,注射 EPCs 或 SDF-1 α 或两者联合可促进肝组织 VEGF、HGF 和 TGF- β 表达,增强损伤肝组织肝细胞再生能力,并且 EPCs 和 SDF-1 α 两者联合运用对改善 IRI 明显优于单独运用 EPCs 或 SDF-1 α 。有证据显示,VEGF 可通过作用于 EPCs 表面的 VEGFR1 诱导 HGF 的表达,从而刺激肝细胞再生^[12]。VEGF 首先与 EPCs 结合,刺激肝星状细胞释放 HGF,HGF 结合与肝细胞 Met 受体结合,激活 PI3K/AKT 信号通路,引起 TGF- β 的释放以及下游信号通路(AP1, JNK,pERKs,IGFBP 等)的激活。这些因子可通过提高细胞周期蛋白 D、E 的表达以及通过激活 mTOR 通路减少 p27 水平从而使静止期细胞进入细胞周期循环^[13]。Kamo 等^[14]研究大鼠 HIRI 中,发现肝细胞的凋亡主要是通过诱导凋亡相关斑点样蛋白所包含的 Caspase 结合域(ASC)调控。敲除大鼠 ASC,可明显减少 Caspase-3 的表达以及提高 Bcl-2 的表达。本实验发现外源性注射 EPCs 或 SDF-1 α 或两者联合可明显增高 HIRI 抗凋亡相关蛋白 Bcl-2 的表达,并且 EPCs+SDF-1 α 凋亡相关蛋白 Caspase-3 的表达要明显低于 EPCs 组以及 SDF-1 α 组,说明 EPCs+SDF-1 α 可明显减少 IRI 所导致的肝细胞凋亡。

总之,本实验阐明了外源性联合注射 EPCs+SDF-1 α 能有效保护 HIRI,诱导肝细胞再生,减少肝细胞凋亡,为治疗 HIRI 以及减少移植排斥反应提供了新思路。但尚需进一步对其相关调控通路进行研究。

参 考 文 献

- [1] Theodoraki K,Karmanioliou I,Tympa A,et al. Beyond preconditioning:postconditioning as an alternative technique in the prevention of liver ischemia-reperfusion injury[J]. *Oxid Med Cell Longev*,2016,2016:8235921.
- [2] Chong MS,Ng WK,Chan JK. Concise review:endothelial progenitor cells in regenerative medicine:applications and challenges[J]. *Stem Cells Transl Med*,2016,5(4):530-538.
- [3] Roncalli JG,Tongers J,Renault MA,et al. Endothelial progenitor cells in regenerative medicine and cancer:a decade of research[J]. *Trends Biotechnol*,2008,26(5):276-283.
- [4] Sakamoto M,Nakamura T,Torimura T,et al. Transplantation of endothelial progenitor cells ameliorates vascular dysfunction and portal hypertension in carbon tetrachloride-induced rat liver cirrhotic model[J]. *J Gastroenterol Hepatol*,2013,28(1):168-178.
- [5] Bai Y,Wang X,Shen L,et al.Mechanical stress regulates endothelial progenitor cell angiogenesis through VEGF receptor endocytosis[J]. *Int Heart J*,2016,57(3):356-362.
- [6] Zheng H,Dai T,Zhou B,et al. SDF-1 alpha/CXCR4 decreases endothelial progenitor cells apoptosis under serum deprivation by PI3K/Akt/eNOS pathway[J]. *Atherosclerosis*,2008,201(1):36-42.
- [7] Hatch HM,Zheng D,Jorgensen ML,et al. SDF-1 α /CXCR4:a mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats[J]. *Cloning Stem Cells*,2002,4(4):339-351.
- [8] Wang X,Yu Y,Li M,et al. EPCs enhance angiogenesis in renal regeneration[J]. *Oncotarget*,2016,7(29):44941-44949.
- [9] Regueiro A,Cuadrado-Godia E,Bueno-Bet $\acute{e}$ C,et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in acute cardiovascular events in the PROCCELL study:time course after acute myocardial infarction and stroke[J]. *J Mol Cell Cardiol*,2015,80:146-155.
- [10] Yu P,Zhang Z,Li S,et al. Progesterone modulates endothelial progenitor cell(EPC) viability through the CXCL12/CXCR4/PI3K/Akt signalling pathway[J]. *Cell Prolif*,2016,49(1):48-57.
- [11] Schober A,Karshovska E,Zernecke A,et al. SDF-1 alpha-mediated tissue repair by stem cells:a promising tool in cardiovascular medicine[J]. *Trends Cardiovasc Med*,2006,16(4):103-108.
- [12] DeLeve LD. Liver sinusoidal endothelial cells and liver regeneration[J]. *J Clin Invest*,2013,123(5):1861-1866.
- [13] Hashmi SK,Baranov E,Gonzalez A,et al. Genomics of liver transplant injury and regeneration[J]. *Transplant Rev(Orlando)*,2015,29(1):23-32.
- [14] Kamo N,Ke B,Ghaffari AA,et al. ASC/caspase-1/IL-1 β signalling triggers inflammatory responses by promoting HMGB1 induction in liver ischemia/reperfusion injury[J]. *Hepatology*,2013,58(1):351-362.

(责任编辑:张辉洁)