

自体骨髓干细胞移植与归元方联用 治疗急慢性肝损伤实验研究

吴理茂¹, 李连达², 刘红², 宁可永², 李贻奎²

(1. 浙江大学药学院, 杭州 310031; 2. 中国中医研究院西苑医院, 北京 100091)

[摘要] 研究中药归元方与自体骨髓干细胞移植对急慢性肝损伤的治疗作用。研究方法: 用肝脏局部注射乙醇的方法复制急性局限性肝损伤模型, 复合因素(CCl₄、乙醇、高脂、低蛋白)刺激复制大鼠肝纤维化模型, 通过定量组织学、肝功能检查、免疫组化、肝组织羟脯氨酸含量、损伤或纤维区骨髓干细胞观察等综合评价中药、自体骨髓干细胞移植及两者合用的疗效。结果: 归元方与自体骨髓干细胞移植可减小肝损伤区域, 改善肝功能, 使纤维肝组织表达 μ PA增强, 降低血清ALT, AST, PCⅢ, HA和肝组织羟脯氨酸的含量, 改善肝组织肝纤维化评分, 骨髓干细胞能在肝损伤、肝纤维化形成环境中存活、增殖, 并向肝细胞分化, 表达肝脏特异的角蛋白CK18。结论: 归元方与自体骨髓干细胞移植对急慢性肝损伤有明确的治疗作用, 两者合用可优势互补, 协同增效。临床上有良好的应用前景。

[关键词] 归元方; 骨髓干细胞; 自体移植; 肝损伤; 肝纤维化

[中图分类号] R28; R457.7; R512.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1009-1742(2004)07-0034-09

肝损伤和肝纤维化是大多数肝病的主要特征, 肝损伤是肝纤维化的直接诱因, 肝纤维化既是大多数慢性肝病的主要特征, 也是慢性肝病向肝硬化、肝癌和肝功能衰竭发展的必经过程。防治肝细胞损伤和肝纤维化, 是预防和治疗急慢性肝病的重要内容。近年来中医药抗肝损伤和肝纤维化的研究较多, 已发现许多中药治疗肝病作用确切, 如丹参、当归等^[1, 2]。

肝细胞移植作为一种新技术有很多优点, 如损伤小、技术简单, 移植失败或产生排斥反应对受体影响不大, 且一个供体可供给多个受体等。但由于细胞来源、免疫排斥、移植细胞增殖缓慢等问题限制了肝细胞移植技术的应用, 因此探索来源广泛、增殖能力强的成体干细胞, 提高移植细胞的数量是促进临床应用的关键因素, 目前研究表明, 骨髓干细胞经诱导可向肝细胞分化, 是很好的种子细胞。

利用兔肝局部注射乙醇诱发的急性、局限性肝

损伤模型和复合因素复制的肝纤维化模型, 研究了中药归元方与自体骨髓干细胞移植对急慢性肝损伤的治疗作用, 考察骨髓干细胞能否在肝损伤和肝纤维化形成环境中存活、增殖, 并向肝细胞分化, 中药与自体骨髓干细胞移植是否有协同增效作用。

1 实验材料

1.1 实验动物

日本大耳白兔, 雄性, 体重1.5~1.8 kg, 购自北京市海淀区学院路通利试验动物养殖场(动物许可证编号第024号总069号)。SD大鼠, 雌雄各半, 体重180~220 g, 购自北京通利华实验动物技术有限公司(动物许可证编号: SCXK(京)2002-0003)。

1.2 实验药品

联苯双酯滴丸: 北京协和制药厂, 批准文号: 国药准字H11020980, 批号: 020112。伽玛注射用

[收稿日期] 2004-03-05; **[修回日期]** 2004-04-15

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30271663)

[作者简介] 吴理茂(1972-), 男, 湖南洞口县人, 浙江大学药学院博士, 主要研究方向为中药药理与干细胞研究; 李连达(1934-), 男, 辽宁沈阳市人, 中国工程院院士, 中国中医研究院首席研究员, 博士生导师

重组人干扰素 γ : 上海克隆生物高技术有限公司, 98卫药准字(沪克隆)S-01号, 批号: 20011247。当归、玄参等药材: 购自北京同仁堂饮片厂, 经北京中医药大学药学院李家实教授鉴定为正品药材。

1.3 试剂与仪器

Percoll: Pharmacia, 法国, 批号: 17-0891-01。 α -MEM: Gibco BRL公司, 美国, 批号: 1112422。胎牛血清: Defined, Hyclone, 美国, 批号: AMC15819。鼠EGF: Nature culture, BD Biosciences, 美国, 批号: 007762。Matrigel: BD Biosciences, 美国, 批号: 008092。5-溴脱氧尿嘧啶: Boehringer公司, 德国, 批号: 280879。小鼠抗5-溴脱氧尿嘧啶一抗(Sigma, 生产日期: 2003-04)、兔抗 μ PA一抗(生产日期: 2003-10)、小鼠抗CK-18一抗(生产日期: 2003-04)、即用型SABC免疫组化试剂盒(生产日期: 2003-04)、DAB显色试剂盒(生产日期: 2003-04): 均购自武汉博士德生物工程有限公司。丙氨酸氨基转移酶ALT试剂盒、天门冬氨酸氨基转移酶AST试剂盒、总蛋白液体试剂盒(TP, 双缩脲法)、白蛋白液体试剂盒(ALB, 溴甲酚绿法): 购自北京中生生物工程高技术公司。谷胱甘肽-S-转移酶测试盒(GST): 南京建成生物工程有限公司, 批号: 20031013。透明质酸放射免疫分析测定试剂盒(批号: 20030201)、Ⅲ型前胶原放射免疫分析测定试剂盒(批号: 20030201): 均购自上海海军医学研究所生物技术中心。肝组织羟脯氨酸测定试剂盒(批号: 20031013)、考马斯亮兰蛋白测定试剂盒(批号: 20030127): 南京建成生物工程有限公司。

显微镜(Olympus, 日本), 扫描仪(S2W5100U, Acer公司), 多媒体彩色病理图像分析系统(MPIAS-500型, 北京), 紫外可见分光光度计(岛津UV-120-02, 日本), 二氧化碳孵养箱(Sanyo, 日本)。

2 实验方法

2.1 归元方浸膏的制备

按处方比例称取药材, 根茎类药材粉碎成粗颗粒, 草类药材剪成小段, 混匀, 加入8倍量水, 浸泡3h, 武火煮沸, 小火加热30min, 80目铁丝网滤过, 药渣再煮一次滤过, 合并两次滤液, 2000

r/min离心10min, 弃沉淀, 滤液在70℃减压蒸发至浓稠时, 置真空干燥箱70℃干燥48h, 得归元方干浸膏(4g生药/g浸膏), 研成细粉, 干燥箱中保存备用。

2.2 移植骨髓干细胞的准备

造模前15d, 将分在干细胞移植组和移植加归元方组的兔或鼠, 抽取骨髓, 用含10%胎牛血清和EGF的 α -MEM完全培养基充分稀释, 反复吹打均匀, 依次通过8号、6号和4号注射针头, 使之成单个细胞悬液, 缓慢加到60%Percoll梯度分离液上, 2000r/min, 4℃离心20min, 收取单个核细胞的界面层, PBS洗涤, 反复2次, 细胞计数, 接种于培养瓶(Matrigel包被), 每个培养瓶与相应动物一一对应编号。24h后除去不贴壁细胞, 连续培养, 当长至50%融合时, 用0.25%胰酶消化传代扩增, 直至细胞移植前24h, 加入BrdU标记, 1d后胰酶消化, 用无血清 α -MEM制成单个细胞悬液, 计数, 用于细胞移植。

2.3 急性局限性肝损伤模型复制、分组和治疗

3%戊巴比妥钠1ml/kg, 耳缘静脉麻醉, 兔备皮消毒, 腹正中剑突下开腹, 暴露肝右大叶, 用1ml无菌注射器(B-D公司产品), 吸取1ml无水乙醇, 在肝右大叶正中, 针头以45度角, 刺入0.5cm, 缓慢注入乙醇(2min内完成)。当肝脏表面出现的白色区基本稳定。关闭腹腔, 缝合皮肤, 局部应用8万单位青霉素以预防感染。联苯双酯组5只, 肝损伤后, 每天给联苯双酯滴丸200mg/kg。归元方高剂量组5只, 每天给归元方浸膏2.4g/kg。归元方中剂量组5只, 每天给归元方浸膏1.2g/kg。归元方低剂量组5只, 每天给归元方浸膏0.6g/kg。干细胞移植加归元方组5只, 肝损伤细胞移植后, 每天给归元方浸膏1.2g/kg。干细胞移植组5只, 在坏死区稳定后1h, 在坏死区边缘多点注射骨髓干细胞单个细胞悬液, 1×10^7 个细胞/兔, 然后正常关闭腹腔, 缝合, 每天给等量生理盐水。模型组5只, 只造成肝损伤, 每天给等量生理盐水。共治疗14d。

2.4 肝纤维化动物模型的复制、分组和治疗

除正常组外, 所有动物均于实验第一天皮下注射四氯化碳0.5ml/100g(体重), 以后每隔3d皮下注射40%四氯化碳橄榄油溶液0.3ml/100g(体重), 正常组皮下注射同等剂量生理盐水, 持续6周, 每次给予四氯化碳均称体重, 根据动物体重增

减情况调整剂量。除正常组外,于实验第一天用玉米粉拌入0.5%胆固醇、20%猪油作饲料,用10%二锅头白酒作为饮水。正常组给予普通饲料,饮自来水,共6周至造模结束,随机取4只大鼠采血检测ALT和AST,取肝脏,病理切片HE染色观察,确认造模成功,得66只,按体重、性别分层,随机分为Ⅱ~Ⅷ组,Ⅰ组为正常对照组($n=10$),Ⅱ组为模型组($n=10$),Ⅲ组为归元方高剂量组($n=10$),4.5 g干浸膏/kg(动物)(相当于临床等效剂量的2倍),Ⅳ组为归元方中剂量组($n=10$),2.25 g干浸膏/kg(动物)(相当于临床等效剂量的1/2),Ⅴ组为归元方低剂量组($n=10$),1.2 g干浸膏/kg(动物)(相当于临床等效剂量的1/2),Ⅵ阳性对照药干扰素组($n=10$),20万单位/kg(动物),肌肉注射,Ⅶ组骨髓干细胞移植组($n=8$),Ⅷ组骨髓移植加归元方组($n=8$),Ⅶ和Ⅷ组大鼠腹正中开口,肝右大叶3点移植100 μ L骨髓干细胞悬液(含 10^6 个细胞),给药组灌胃给药一日1次,治疗5周。治疗开始后,各组均饮自来水,饲普通饲料。治疗结束时,所有动物禁食,不禁水,24 h后,3.5%的水合氯醛麻醉,称体重,腹主动脉取血,2500 r/min离心15 min,分离血清,-70 $^{\circ}$ C保存备用。迅速取肝左叶,用铝箔包裹,液氮速冻,然后置-70 $^{\circ}$ C冰箱保存。从肝脏右叶取一小块组织用10%福尔马林固定,石蜡包埋,连续切片,用于HE染色, Van Gieson染色,另取一小块肝组织用多聚甲醛固定用于免疫组化。Ⅶ和Ⅷ组大鼠经4%的多聚甲醛灌注固定,取细胞移植区肝组织固定用免疫组化检测移植细胞在移植区域的存活生长。

2.5 检测指标

2.5.1 血清生化指标 实验结束,禁食24 h,兔耳中动脉采血5 ml,大鼠腹主动脉采血5 ml,2500 r/min离心10 min,分离血清,-70 $^{\circ}$ C冷冻保存,用于检测GST,ALT,AST,TP,ALB。大鼠放射免疫法检测血清透明质酸(HA)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ)。

2.5.2 肝脏指数 兔采血后,耳缘静脉注射空气处死,称体重,立即剖腹,取肝脏,称重,计算肝脏指数=(肝脏重量/体重) $\times 100$ 。

2.5.3 大鼠肝组织羟脯氨酸测定 冰浴上迅速取200 mg肝组织,在4 $^{\circ}$ C下用预冷生理盐水制成10%的匀浆,移液器取1 ml匀浆,加入12 M/L HCl

1 ml,100 $^{\circ}$ C水解10 h,冷却后用10 M/L NaOH将pH调至6.0,补充蒸馏水至5 ml,然后按文献测定羟脯氨酸的含量^[3,4]。每克湿肝组织羟脯氨酸

$$\text{含量} = \frac{\text{样品管吸光度}}{\text{标准管吸光度}} \times 2 \times 4.5 \times 50 (\mu\text{g})。$$

2.5.4 兔急性肝损伤模型坏死区域的测量 观察肝脏外观变化,拍照。切下坏死部分(含正常区、炎症区和坏死区),用做图直尺测量坏死区的长径和短径,从短径平行等厚切成4片,将每片肝组织两切面分别用扫描仪扫描,用多媒体彩色图像分析系统计算梗塞区面积,计算坏死体积,每片体积= $\frac{1}{3}$ (上切面面积+下切面面积+ $\sqrt{\text{上切面面积} \times \text{下切面面积}}$) \times 短径/4。然后将4片的体积相加,开立方即为坏死区域大小。

免疫组化:取固定好的肝组织,按文献[5]和试剂盒说明书操作。检测纤维化肝组织 μ PA的表达、标记BrdU的移植骨髓干细胞、共表达BrdU和CK-18的细胞。

2.5.5 胶原染色 甲醛固定的肝纤维化组织,参照文献进行Van Gieson染色。参照王宝恩和Knodell HAI系统的分级标准进行评分^[6-8]。0级:肝组织正常,无胶原纤维增生。Ⅰ级:胶原纤维从汇管区或中央静脉周围轻度向外延伸。Ⅱ级:胶原纤维延伸明显,但尚未相互联结包绕整个肝小叶。Ⅲ级:胶原纤维延伸明显,相互联结包绕整个肝小叶。Ⅳ级:胶原纤维包绕分割肝小叶,以致正常肝小叶结构破坏,假小叶形成,但以大方形假小叶为主。Ⅴ级:假小叶结构完全破坏,假小叶形成,大方形假小叶和小圆形假小叶各占50%。Ⅵ级:肝内布满小圆形假小叶,假小叶内有粗大增生的胶原纤维。

2.6 统计处理

计量实验数据用均数 \pm 标准差($\bar{X} \pm SD$)表示,各组数据符合正态分布且方差齐时用one-way ANOVA比较多组间均值差异性显著性,两因素交互作用评价用两因素析因设计方差分析。等级资料用ridit检验。所有统计处理均用SAS6.12统计专用软件完成。

3 结果

3.1 自体骨髓干细胞移植与归元方对损伤兔肝功能的影响

如表1所示,模型组兔血清ALT,AST含量略高于正常值,移植加归元方组可降低ALT,有

统计意义 ($P < 0.05$), 其他各治疗组有降低 ALT, AST 的趋势, 但与模型组相比无统计意义。各治疗组对 TP, ALB 的影响与模型组没有明显差别。

与模型组比较, GST 的差别显著 ($P < 0.05$), 各治疗组均有不同程度降低, 归元方高、中、低剂量组之间无明显差别。

表 1 自体骨髓干细胞移植与归元方联用对兔肝损伤模型生化指标的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

Table 1 The effect of autologous bone marrow stem cells transplantation and Guiyuan Fang on liver function of acute localized injury model ($\bar{X} \pm SD$)

组别	N	ALT/U·ml ⁻¹	AST/U·ml ⁻¹	TP/g·L ⁻¹	ALB/g·L ⁻¹	GST/U·ml ⁻¹
模型组	5	50.4±8.6	45.4±10.2	71.2±6.5	33.9±2.0	34.4±3.7
联苯双酯组	5	32.8±9.4	44.8±19.4	61.7±6.7	33.3±3.6	20.5±3.4*
归元方高剂量组	5	38.8±10.6	61.8±17.8	66.4±3.7	31.64±3.6	19.5±4.5*
归元方中剂量组	5	36.2±10.3	33.4±16.2	65.7±5.2	33.94±2.7	21.1±4.6*
归元方低剂量组	5	49.4±11.3	42.4±11.4	65.4±4.0	32.6±2.2	19.4±2.8*
干细胞移植组	5	45±15.0	28.4±8.8	63.8±7.1	33.34±3.2	25.0±4.6
移植加归元方组	5	29.4±8.3*	37.2±12.3	62.3±7.4	32.38±3.1	22.3±6.7*

注: * 与模型组相比, $P < 0.05$

3.2 对兔肝坏死区域大小的影响

坏死区外观图 1 (见封 3), 坏死区大小见表 2。坏死区肝组织呈灰白色, 边界不规则。模型组坏死区域达 13.1 ± 1.8 , 联苯双酯组、归元方高、中、低剂量组、移植加归元方组坏死区域明显小于模型组, 经统计学检验有极显著差异 ($P < 0.01$)。并且移植加归元方组优于移植组和归元方中剂量组, 经两因素两水平析因方差分析, 移植和归元方有交互作用, 有统计学意义 ($P < 0.05$)。肝脏指数在各组之间没有明显差别。

表 2 自体骨髓干细胞移植与归元方联用对兔肝损伤模型坏死区域的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

Table 2 The effect of autologous bone marrow stem cells transplantation and Guiyuan Fang on necrotic region of acute localized injury model

组别	N	肝脏指数 /100g (体重)	坏死区域/mm
模型组	5	2.94±0.52	13.1±1.8
联苯双酯组	5	2.93±0.49	6.6±2.6**
归元方高剂量组	5	2.86±0.41	5.4±1.6**
归元方中剂量组	5	2.41±0.56	6.3±2.0**
归元方低剂量组	5	2.66±0.25	9.5±1.8*
干细胞移植组	5	2.45±0.23	6.4±0.8**
移植加归元方组	5	2.65±0.44	5.7±1.8**

注: * 与模型组相比, $P < 0.05$; ** 与模型组相比, $P < 0.01$

3.3 归元方对移植细胞在肝组织中存活增殖的影响

BrdU 标记的移植细胞核被染成棕黄色, 炎症区可见许多小克隆阳性细胞团, 也有单个散在分布, 许多已经具备肝细胞的形态, 部分向胆管细胞分化。见图 2 (封 3)。

3.4 自体骨髓干细胞移植与归元方联用对纤维化大鼠肝功能的影响

模型组 ALT, AST 均显著高于正常组和各治疗组, 有显著性差别 ($P < 0.01$), 各治疗组之间无显著性差异, 以归元方中剂量组最接近正常组。正常组和各治疗组 TP, ALB, A/G 均明显高于模型组, 有显著性差别 ($P < 0.01$ 或 0.05)。表明自体骨髓干细胞移植、归元方单用或联用均有保护肝功能、恢复肝细胞酶系统稳定的作用。结果见表 3。

3.5 自体骨髓干细胞移植与归元方联用对血清纤维化指标的影响

模型组大鼠血清 PCⅢ, HA 水平与正常组、各治疗组比较差异非常显著 ($P < 0.01$)。各治疗组与正常组比较, 差异不显著。结果见表 4。

3.6 自体骨髓干细胞移植与归元方联用对肝组织羟脯氨酸的影响

与正常组大鼠比较, 模型组大鼠肝组织羟脯氨酸的含量增加 10 倍左右, 各治疗组大鼠肝组织羟脯氨酸的含量下降一半左右, 与模型组有非常显著的差异 ($P < 0.01$), 治疗组与正常组比, 差异仍

有显著性。结果见表5。

表3 自体骨髓干细胞移植与归元方联用对肝纤维化大鼠血清 ALT, AST, TP, ALB 的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

Table 3 The effect of autologous bone marrow stem cells and Guiyuan Fang on ALT, AST, TP, ALB, and A/G ($\bar{X} \pm SD$)

组别	N	ALT/U·ml ⁻¹	AST/U·ml ⁻¹	TP/g·L ⁻¹	ALB/g·L ⁻¹	A/G
正常组	10	38.3 ± 5.1**	127.9 ± 16.3**	62.6 ± 5.9	28.8 ± 3.5**	0.85 ± 0.06**
模型组	10	325.9 ± 101.7	697.5 ± 215.8	53.2 ± 10.5	21.6 ± 3.0	0.70 ± 0.09
归元方高剂量组	10	44.4 ± 15.2**	123.8 ± 35.9**	59.3 ± 6.5	27.0 ± 2.7**	0.84 ± 0.05**
归元方中剂量组	10	56.8 ± 11.5**	149.5 ± 31.7**	64.0 ± 7.0	28.3 ± 2.6**	0.80 ± 0.07**
归元方低剂量组	10	44.1 ± 6.2**	144.8 ± 29.6**	68.1 ± 5.0	30.3 ± 1.6**	0.81 ± 0.06**
对照药干扰素组	10	42.7 ± 12.6**	134.4 ± 41.6**	65.9 ± 10.2	28.9 ± 3.9**	0.79 ± 0.02*
干细胞移植组	8	67.3 ± 22.0**	133.3 ± 33.8**	60.6 ± 8.8	26.1 ± 2.2*	0.75 ± 0.03*
移植加归元方组	8	40.4 ± 9.5**	123.1 ± 27.9**	57.7 ± 5.1	26.9 ± 4.2**	0.83 ± 0.02**

注: * 与模型组相比, $P < 0.05$; ** 与模型组相比, $P < 0.01$

表4 自体骨髓干细胞移植与归元方联用对血清 HA、PCⅢ 的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

Table 4 The effect of autologous bone marrow stem cells transplantation and Guiyuan Fang on serum HA, PC III ($\bar{X} \pm SD$)

组别	N	HA/ng·ml ⁻¹	PCⅢ/ng·ml ⁻¹
正常组	10	54.61 ± 17.04**	23.35 ± 2.70**
模型组	10	91.73 ± 22.77	34.32 ± 5.21
归元方高剂量组	10	47.14 ± 13.10**	23.34 ± 6.14**
归元方中剂量组	10	47.18 ± 10.97**	22.48 ± 5.46**
归元方低剂量组	10	48.71 ± 14.07**	26.59 ± 2.45**
对照药干扰素组	10	49.58 ± 10.13**	16.38 ± 6.44**
干细胞移植组	8	48.96 ± 14.79**	26.90 ± 3.35**
移植加归元方组	8	38.24 ± 10.34**	20.15 ± 4.04**

注: * 与模型组相比, $P < 0.05$; ** 与模型组相比, $P < 0.01$

3.7 自体骨髓干细胞移植与归元方联用对肝组织病理学的影响

正常组大鼠肝脏颜色红褐, 有光泽, 质软, 表面光滑, 常规 HE 染色可见肝小叶结构清晰, 肝细胞多为单核, 肝板呈条索状, 围绕中央静脉呈放射状排列, VG 染色显示小叶间和汇管区基本无胶原分布, 仅在中央静脉及肝窦内有轻微的胶原分布。模型组大鼠肝脏明显增大, 色变黄, 触之似泥块并有油腻感, 表面有灰白色细小颗粒, 大小均匀, 质硬, 切面呈花斑状, 表面呈淡黄白色, 少光泽, 肝脏与其他脏器粘连, 不宜剥离, HE 染色可见大量

表5 自体骨髓干细胞移植与归元方联用对肝组织羟脯氨酸的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

Table 5 The effect of autologous bone marrow stem cells transplantation and Guiyuan Fang on hydroxyproline of liver tissue ($\bar{X} \pm SD$)

组别	N	羟脯氨酸/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (湿肝组织)
正常组	10	210.4 ± 54.5**
模型组	10	2123.1 ± 218.9
归元方高剂量组	10	1046.1 ± 127.7**
归元方中剂量组	10	1227.2 ± 43.1**
归元方低剂量组	10	1531.9 ± 206.8**
对照药干扰素组	10	1127.6 ± 155.1**
干细胞移植组	8	1390.8 ± 156.3**
移植加归元方组	8	1048.4 ± 86.2**

注: * 与模型组相比, $P < 0.05$; ** 与模型组相比, $P < 0.01$

肝细胞脂肪变性存在, 呈空泡状, 另有水样变性甚至气球样变, 近 90% 标本可见散在的不同程度的坏死肝细胞, 正常肝小叶结构遭到破坏, VG 染色下可见广泛的纤维组织增生, 汇管区和小叶间有大量粗大增生的胶原纤维, 将肝小叶分割包裹成大小不等, 形状不一的肝细胞团, 形成假小叶。归元方各剂量组大鼠肝脏呈暗褐色, 质韧, 表面灰白色结节颗粒明显减少, 肝细胞炎症不显著, 但肝组织内见不同程度的炎症细胞浸润, 变性坏死以脂肪变性为主, 可见少量脂肪变性空泡, VG 染色下肝组织胶原纤维增生不明显, 一般仅局限于汇管区, 其中以中剂量组肝组织形态较为接近正常。干细胞移植

组汇管区纤维组织增生，呈星芒状向肝小叶内穿插，偶有假小叶形成，肝细胞脂肪变性有减轻趋势，可见增生肝细胞。移植加归元方组汇管区和中央静脉周围仍然有胶原纤维增生，但肝组织结构已基本正常。VG染色各组大鼠肝组织纤维化变性程度积分情况见表6。统计结果见表7。病理照片如图3所示（见封4）其中，A：模型组胶原纤维沉积明显，纤维间隔粗大，成网状分割包绕肝小叶，肝组织正常结构破坏；B：正常组，肝索清晰，成放射状排列；C：归元方低剂量组，纤维间隔较细，仍分割包绕肝小叶；D：归元方中剂量组，胶原纤维沉积减少；E：归元方高剂量组，仅有少量胶原沉积，极少有粗纤维间隔，部分肝小叶已逐渐正常；F：干扰素对照组，纤维沉积较少，但切片中有较多空泡；G：干细胞移植组，胶原纤维少；H：移植加归元方组，胶原纤维沉积少，部分肝组

织结构已恢复正常。

表 6 自体骨髓干细胞移植与归元方联用对肝纤维化大鼠纤维增生程度的影响

Table 6 The effect of autologous bone marrow stem cells transplantation and Guiyuan Fang on hepatic fibrosis

组别	N	纤维组织增生程度						
		0级	I级	II级	III级	IV级	V级	VI级
正常组	10	8	2	0	0	0	0	0
模型组	10	0	0	0	0	1	3	6
归元方高剂量组	10	0	1	3	4	1	1	0
归元方中剂量组	10	0	2	3	4	1	0	0
归元方低剂量组	10	0	1	1	3	4	1	0
对照药干扰素组	10	0	4	4	2	0	0	0
干细胞移植组	8	0	1	3	2	1	1	0
移植加归元方组	8	0	1	4	2	1	0	0

表 7 自体骨髓干细胞移植与归元方联用对纤维增生影响程度的统计结果

Table 7 Statistical results of the effect of autologous bone marrow stem cells transplantation and Guiyuan Fang on hepatic fibrosis

组别	N	Ridit		ridit 值		组别	N	Ridit		ridit 值	
		平均值	95%可信区间	95%可信区间	99%可信区间			平均值	95%可信区间	95%可信区间	99%可信区间
正常组	10	0.0789	0.0982~0.2561*	0.1539~0.3118**		归元方低剂量组	10	0.6414	0.4643~0.8186	0.4086~0.8743	
模型组	10	0.9191	0.7419~1.0963	0.6862~1.152		对照药干扰素组	10	0.3487	0.1715~0.5259*	0.1158~0.5816**	
归元方高剂量组	10	0.5441	0.3669~0.7213*	0.3112~0.777		干细胞移植组	8	0.5217	0.329~0.7252*	0.2668~0.7875	
归元方中剂量组	10	0.4743	0.2972~0.6515*	0.2415~0.7072		移植加归元方组	8	0.4646	0.2665~0.6627*	0.2043~0.725	

注：Adjusted $X^2 = 48.9466$, $P < 0.01$, * 与模型组相比, $P < 0.05$; ** 与模型组相比, $P < 0.01$

3.8 自体骨髓干细胞移植与归元方联用对肝组织中 μ PA 表达的影响

正常大鼠肝组织没有 μ PA 表达，模型组仅有少量表达，以汇管区血管壁细胞和间质细胞表达为主，干扰素对照组 μ PA 表达也非常微弱，归元方各剂量组呈强阳性表达，许多肝细胞也显强阳性，归元方低剂量组表达相对较弱。而在干细胞移植组有大量的肝细胞呈阳性表达，移植加归元方组 μ PA 表达呈弥散性，以肝细胞为主。免疫组化照片图4（见封4），其中，A：模型组， μ PA 表达微弱。B 正常组没有 μ PA 的表达；C：归元方低剂量组，纤维间隔上 HSC 细胞少量表达；D：归元方中剂量组， μ PA 表达明显，主要定位在肝细胞细胞膜和细胞浆上。E 归元方高剂量组， μ PA 在肝细胞上呈强阳性表达；F：干扰素对照组， μ PA 表达极少；G：干细胞移植组， μ PA 在肝组织呈弥漫性

表达；H：移植加归元方组， μ PA 大量肝脏细胞表达，主要集中在肝细胞的一个侧一面。

3.9 移植细胞存活、增殖、分化状况

移植细胞在肝细胞增殖照片见图5（封4），其中，A：部分移植细胞已经迁移到肝实质深处，表现肝细胞形态，阳性细胞核染成棕黄色（DAB显色，干细胞移植组，200 \times ）；B：移植细胞主要分布在汇管区，细胞呈现肝细胞形态，阳性细胞核染成棕黄色（DAB显色，细胞移植加归元方组，200 \times ）；C：移植细胞主要分布在汇管处，大部分移植细胞表现肝细胞形态，有些移植细胞表现血管内皮细胞形态，阳性细胞核染成棕黄色（DAB显色，细胞移植加归元方组，400 \times ）；D：免疫组化双标法显示移植细胞在肝脏中的表型。BrdU 标记的移植细胞细胞核显深蓝色（BCIP/NBT显色），肝细胞标志蛋白 CK-18 主要在细胞膜和细胞浆表

达, 显红色 (AEC 显色), BrdU 标记细胞表达 CK-18 (细胞移植加归元方组, 400 \times)。肝组织中骨髓干细胞来源的肝细胞胞核棕黄, 在汇管区聚集较多, 有些以单个细胞散在形式存在, 有些以小克隆形式存在, 部分已经迁移到肝实质深处, 大部分表现肝细胞的形态, 少部分表现血管内皮的形态, 免疫组化双标技术显示骨髓来源的干细胞表达肝细胞特有的角蛋白 CK18。

表 8 自体骨髓干细胞移植与归元方对肝功能的交互影响

Table 8 The interaction of autologous bone marrow stem cells transplantation and Guiyuan Fang on liver function ($\bar{X} \pm SD$)

	ALT		AST		A/G	
	不用归元方	用归元方	不用归元方	用归元方	不用归元方	用归元方
不移植	325.9 \pm 101.7	56.8 \pm 11.5	697.5 \pm 215.8	149.5 \pm 31.7	0.70 \pm 0.09	0.80 \pm 0.07
干细胞移植	67.3 \pm 22.0	40.4 \pm 9.5* #	133.3 \pm 33.8	123.1 \pm 27.9* #	0.75 \pm 0.03	0.83 \pm 0.02* #

注: * 与单用归元方组比较, $P < 0.05$, # 与单用移植组比较, $P < 0.05$

表 9 自体骨髓干细胞移植与归元方对纤维化指标的交互影响

Table 9 The interaction of autologous bone marrow stem cells transplantation and Guiyuan Fang on hepatic fibrosis ($\bar{X} \pm SD$)

	HA		PCIII		Hyp	
	不用归元方	用归元方	不用归元方	用归元方	不用归元方	用归元方
不移植	91.73 \pm 22.77	47.18 \pm 10.97	34.32 \pm 5.21	22.48 \pm 5.46	2123.1 \pm 218.9	1227.2 \pm 43.1
移植	48.96 \pm 14.79	38.24 \pm 10.34* #	26.90 \pm 3.35	20.15 \pm 4.04* #	1390.8 \pm 156.3	1048.4 \pm 86.2* #

注: * 与单用归元方组比较, $P < 0.05$, # 与单用移植组比较, $P < 0.05$

4 讨论

近年来认为肝损伤、肝纤维化是多因素多步骤的结果, 因此, 对肝损伤、肝纤维化的干预措施应包括多环节、多种治疗方法, 联合对肝细胞有保护作用的中药与自体骨髓干细胞移植两种治疗手段, 是多环节治疗肝病的探索。研究表明, 归元方与自体骨髓干细胞移植联用 2 周治疗肝损伤有较好的效果, 经 5 周治疗慢性肝损伤, 呈现明确的治疗效果。

4.1 中药复方归元方的治疗作用

归元方是在临床经验方的基础上, 在中医理论指导下, 经大量对比精选研究而来, 主要由当归、玄参等组成, 具有活血祛瘀, 养血益阴柔肝, 清热祛湿的功效, 主治“肝积”(包括“胁痛”、“瘀血”“症积痞块”)等症, 适用于肝损伤、肝纤维化以及早期肝硬化。归元方中重用当归活血化瘀止痛, 养血柔肝为君药, 玄参养阴益水滋肝木助当归养血活

3.10 自体骨髓干细胞移植与归元方的交互作用

两因素两水平析因分析表明, 自体骨髓干细胞移植与归元方联用在改善纤维化大鼠的肝功能方面具有协同作用, 二者之间的交互作用明显, 方差分析对 ALT, AST 的影响, $P < 0.01$, 对 A/G 的影响, $P < 0.05$ 。详见表 8。自体骨髓干细胞移植与归元方对纤维化指标影响的结果见表 9, 对 HA, PCIII, Hyp 的交互作用经方差分析, $P < 0.01$ 。

血柔肝以为臣诸药配合, 共奏养血柔肝、活血通络作用, 则瘀滞得解, 络脉得通。

现代研究表明, 当归对肝细胞具有保护作用, 可防止肝脏的免疫性损伤, 促进肝细胞合成 DNA、RNA, 改善肝内微循环, 防止肝糖原减少, 抗脂质过氧化, 当归对慢性肝损伤的肝脏超微结构有明显保护作用, 抑制成纤维细胞增生, 抑制肝内胶原合成, 可显著减轻肝纤维化程度, 当归有效成分阿魏酸钠和当归多糖可阻断多种肝损伤和肝纤维化的分子通路。其他药物也是许多抗肝损伤和肝纤维化复方的主要药物。

归元方的作用机制可能是多途径的:

1) 拮抗 CCl_4 、乙醇的毒性作用, CCl_4 、乙醇引起的肝损伤、肝纤维化中, 自由基及其引发的脂质过氧化是其损伤的主要机制。活性氧、超氧阴离子在体内产生的自由基通过脂质过氧化作用损伤破坏肝细胞, 产生脂质过氧化物 MDA 等能促进肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 合成胶原, 并

通过激活库普弗细胞释放 TGF- β 1 等细胞因子, 刺激 HSC 转化、增殖和合成细胞外基质 (extracellular matrix, ECM), 同时抑制 ECM 降解。归元方有利于减轻肝损伤和肝纤维化。

2) 抑制炎症的发生, 炎症反应和肝细胞的损伤是肝纤维化的启动因素, 阻断其发生及发展必然可阻止肝纤维化的进展。研究结果显示, 归元方各剂量组较模型组, 反映炎症程度的血清 PC III 及 ALT 水平显著降低。说明归元方确实可减轻肝脏的炎症反应, 从而保护肝细胞。

3) 抑制胶原合成, 通过检测血清肝纤维化标志物 HA, PC III 和肝组织 Hyp, 定性观察肝组织纤维增生程度, 结果表明归元方可明显抑制蛋白多糖及胶原的合成。

4) 肝细胞表达 μ PA 增强。 μ PA 是丝氨酸蛋白水解酶的一种, 通过裂解纤溶酶原, 产生纤溶酶这个广谱蛋白水解酶, 可直接降解 ECM, 在细胞迁移和组织重构上发挥重要作用, 也可激活 MMPs 间接增加胶原和 ECM 的降解, 还可增强中性粒细胞和吞噬细胞清除细胞碎片和损伤细胞的能力, 也可通过激活其它细胞因子, 促进肝细胞增生。免疫组化检测表明, μ PA 在肝组织中表达随归元方剂量增加而增加。通过增强 μ PA 的活性, 而增强纤维化组织胶原降解可能是归元方抗纤维化的途径之一。以上都说明归元方含多种有效成分, 可通过多层次、多靶点、多途径、多环节逆转肝纤维化。

4.2 骨髓干细胞移植对肝纤维化的治疗作用

除常规的药物治肝疾病外, 近 30 年又兴起了肝细胞移植的新技术。初步实验结果表明, 肝细胞移植在急慢性肝衰竭和遗传代谢性肝病方面具有很好的应用前景。但由于肝细胞来源少、成熟肝细胞体外扩增和体内增殖不理想、免疫排斥等许多问题限制了肝细胞移植技术的发展。最近国外有多篇文献报道, 骨髓干细胞在体内外均可分化为功能完备的肝细胞^[9], 骨髓干细胞有可能成为肝细胞移植新的种子细胞。目前对骨髓干细胞在肝脏中的作用认识仍然较少, 笔者应用 BrdU 标记技术初步证明骨髓干细胞能在肝损伤、肝纤维化形成环境中存活、增殖, 并向肝细胞分化, 表达肝脏特异的角蛋白 CK18。同时移植细胞通过分泌细胞因子, 刺激受体肝细胞再生, 间接影响某些促胶原降解因子的表达如 μ PA, 促进胶原和 ECM 的降解, 逆转肝纤维化, 促进肝小叶结构的恢复。归元方与自体骨

髓干细胞移植有协同作用, 移植加归元方组的大鼠血清纤维化指标 HA, PC III, 肝组织 Hyp 含量和病理学纤维化评分低于单用移植组和归元方组。中药与骨髓干细胞移植联合应用, 中西结合, 优势互补, 可从多途径、多靶点、多层次阻止肝纤维化进展。中药与自体骨髓干细胞移植联合应用有优势互补, 既可提高细胞移植的成功率, 也可增加促肝再生营养因子的水平, 中和肝损伤因子, 在抗肝损伤、肝纤维化方面有协同增效作用。

5 结论

对中药归元方与自体骨髓干细胞移植联合应用治疗肝损伤、肝纤维化得出如下结论:

1) 中药归元方能维护肝细胞膜系统的稳定性, 减少细胞内物质漏出, 保护、增强、恢复损伤的肝细胞, 加强肝细胞蛋白质生物合成, 缩小局部坏死区域, 抑制胶原合成, 促进 ECM 的降解, 有明确的抗肝损伤和肝纤维化作用。

2) 自体骨髓干细胞移植, 肝脏功能改善, 免疫组化检测, 可见移植区有许多移植细胞存活、增殖, 表达肝细胞特有蛋白, 部分移植细胞表现肝内其他细胞形态。证实自体骨髓干细胞移植到肝损伤或肝纤维化形成环境中, 可以存活、增殖。

3) 首次证实中药与自体骨髓干细胞移植联合应用, 两者可协同增效, 优势互补, 既可提高细胞移植的成功率, 又可明显改善肝功能, 抗肝损伤, 逆转肝纤维化, 为以后推广到临床应用奠定良好的基础。

参考文献

- [1] 李颖, 彭仁. 阿魏酸钠和当归醇沉物对免疫性肝损伤的干预作用[J]. 中草药, 2000, 31(4): 274~276
- [2] 姚希贤, 李校天, 李迎武, 等. 丹参等活血化瘀中药对门脉高压动力学影响的临床与实验研究[J]. 中华消化杂志, 1998, 18(1): 24~27
- [3] Jamall I S, Finelli V N, Que Hee S S. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues [J]. Analytical Biochemistry, 1981, 112(1): 70~75
- [4] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 631~632
- [5] Magaud J P, Sargent I, Jane Clarke P, et al. Double Immunocytochemical labeling of cell and tissue samples with monoclonal anti bromodeoxyuridine [J]. J Histochem Cytochem, 1989, 37(10): 1517~1527

- [6] Brunt E M. Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: The Knodell histology activity index and beyond[J]. *Hepatology*, 2000, 31(1):241~246
- [7] 曾民德, 王泰龄, 王宝恩. 肝纤维化诊断及疗效评估共识[J]. *肝脏*, 2002, 7(2): 附3~4
- [8] 王宝恩, 王惠吉, 朱家璇, 等. 复方丹参不同剂型治疗肝纤维化实验研究与临床观察[J]. *中华肝病杂志*, 1993, 1: 69~72
- [9] Jiang Y, Jahagirdar B N, Reinhardt R L, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. *Nature*, 2002, 418(6893): 41~49

Studies of the Guiyuan Fang and Autologous Bone Marrow Stem Cells Transplantation on Hepatic Injury and Fibrosis

Wu Limao¹, Li Lianda², Liu Hong², Ning Keyong², Li Yikui²

(1. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China;
2. China Academy of Traditional Chinese Medicine, Xiyuan Hospital, Beijing 100091, China)

[Abstract] **Objective** To study the anti-fibrotic and anti-injurious activities of TCM and autologous bone marrow stem cells transplantation. **Methods** Acute localized liver injury model was induced in rabbits by injecting ethanol locally, and the liver fibrosis models were reproduced by complex factors (high lipid, low protein, alcohol, CCl₄). Liver function was assessed by measurement ALT, AST, TP, ALB, and GST. The necrotic areas were measured by pathological analytic system, and the concentrations of serum of PC III, HA in serum were measured by radioimmunoassay. Histopathological changes and degrees of fibrosis, hydroxyproline content in the hepatic tissues were assessed also. μ PA, CK-18, and BrdU-labeled transplanted cells were determined by immunohistochemical staining. **Results** In the acute liver injury experiment, the reduction of serum GST levels was remarkable in all treated groups, compared with the model group ($P < 0.05$). The necrotic regions of the treated groups decrease significantly, compared to model group ($P < 0.01$). In the inflammatory regions of transplanted rabbits many BrdU-labeled cells were easily observed, most transplanted cells were predominantly in clusters of 1~3 cells each. Part of the cells exhibit the morphology of hepatocyte or bile duct epithelial cells. During liver fibrous experiment, the serum ALT and AST values were reduced significantly in the treated rats ($P < 0.01$), serum TP, ALB, A/G levels were increased in all animals receiving treatment ($P < 0.01$ or 0.05), the serum PC III, HA levels were also reduced remarkably ($P < 0.01$). Determination of tissue hydroxyproline content confirmed the histological studies, showing a net reduction in total collagen levels. The normal liver tissues showed very weak μ PA expression, and Guiyuan Fang caused a marked increase of μ PA expression in the livers in a dose-dependent manner. The μ PA expression in the autologous BMSCs transplantation group and Guiyuan Fang plus autologous BMSCs transplantation group were the strongest. Double immunohistochemical staining showed the BrdU-labeled cells were fully integrated in the liver parenchyma, along with expression of cytokeratin-18, the liver epithelial specific marker. Some BMSCs have differentiated into hepatocytes or endothelial cells. **Conclusion** The bone marrow stem cells survive, proliferate, and differentiate in the fibrotic and injurious environment. TCM synergize with bone marrow stem cells to improve liver function, to protect hepatocytes from toxicant, to promote protein synthesis, and to provide a good environment for hepatocyte function. These findings establish the basis for further analysis of BMSCs transplantation in acute and chronic liver diseases.

[Key words] bone marrow stem cells; autologous transplantation; liver injury; liver fibrosis; guiyuan fang