

周晓玲,王月明,吴腾,等. 基于 SDF-1/CXCR4 轴观察济生肾气汤对肝硬化大鼠 BMSCs 归巢的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(8): 11-18.

Zhou XL, Wang YM, Wu T, et al. Effects of Jisheng Shenqi decoction on homing of bone marrow mesenchymal stem cells based on the SDF-1/CXCR4 axis in rats with liver cirrhosis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(8): 11-18.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.08.002

基于 SDF-1/CXCR4 轴观察济生肾气汤对肝硬化大鼠 BMSCs 归巢的影响

周晓玲^{1*}, 王月明², 吴 腾¹, 陈 峭¹, 余静芳¹, 李 灿¹, 李泽鹏¹, 陆世银¹,
张 悦¹, 覃凤传¹, 沈新辉²

(1. 柳州市中医医院(柳州市壮医医院), 广西 柳州 545001; 2. 广西中医药大学, 南宁 530200)

【摘要】 目的 探讨济生肾气汤通过基质细胞衍生因子-1(stromal cell derived factor-1, SDF-1)/CXC 族趋化因子受体 4(CXC chemokine receptor 4, CXCR4)轴对骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)归巢效率的影响, 分析其联合 BMSCs 移植治疗肝硬化的机制。**方法** 以 40% 四氯化碳橄榄油溶液腹腔注射联合复合因素建立 SD 大鼠肝硬化模型, 将 30 只造模成功的大鼠随机分为模型组、BMSCs 移植组(BMSCs 组)、BMSCs 移植联合济生肾气汤组(联合组), 每组 10 只, 另以 10 只正常大鼠设为正常组, 共 4 组。BMSCs 组与联合组造模后行尾静脉注射移植荧光标记的 BMSCs, 联合组同时予济生肾气汤灌胃, 正常组及模型组不予处理。用药 4 周后, 观察各组大鼠肝功能指标及肝组织病理改变, 荧光显微镜下观察各组大鼠肝组织内 BMSCs 归巢情况, 并且通过 ELISA 法检测各组大鼠血清干细胞因子(stem cell factor, SCF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, GCSF)及促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)水平变化, 免疫组化法检测 SDF-1、CXCR4 蛋白表达情况。**结果** 光镜下见模型组大鼠肝纤维化明显, 大量炎症细胞浸润, 而 BMSCs 组和联合组纤维化程度及炎症活动度均较模型组不同程度改善。与正常组比较, 模型组血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶、总胆红素、 γ -谷氨酰胺转氨酶均明显升高, 白蛋白明显降低($P < 0.05$), 与模型组比较, BMSCs 组与联合组较模型组均有不同程度改善($P < 0.05$)。BMSCs 归巢情况比较, 同倍数视野下联合组可见归巢 BMSCs 数量多于 BMSCs 组($P < 0.05$)。与模型组比较, BMSCs 组、联合组大鼠血清 SCF、HGF、GCSF 及 EPO 表达均不同程度升高, 联合组表达高于 BMSCs 组($P < 0.05$)。免疫组化结果显示, BMSCs 组与联合组大鼠肝组织 SDF-1、CXCR4 蛋白表达较模型组上调, 联合组表达水平高于 BMSCs 组($P < 0.05$)。**结论** 济生肾气汤可激活 SDF-1/CXCR4 生物轴, 上调相关蛋白及其上游调控因子表达, 促进 BMSCs 向受损肝组织归巢, 改善肝硬化大鼠肝功能及肝硬化程度。

【关键词】 肝硬化; 骨髓间充质干细胞; 济生肾气汤; SDF-1/CXCR4 轴

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 08-0011-08

Effects of Jisheng Shenqi decoction on homing of bone marrow mesenchymal stem cells based on the SDF-1/CXCR4 axis in rats with liver cirrhosis

ZHOU Xiaoling^{1*}, WANG Yueming², WU Teng¹, CHEN Qiao¹, YU Jingfang¹, LI Can¹, LI Zepeng¹, LU Shiyin¹,
ZHANG Yue¹, QIN Fengchuan¹, SHEN Xinhui²

(1. Liuzhou Traditional Chinese Medical Hospital, Liuzhou 545001, China.

2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200)

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81760855); 柳州市科技局科技重大专项(2018AF10503); 2021 年广西硕士研究生教育创新项目(YCSW2021223)。

【作者简介】 周晓玲(1977—), 女, 博士, 主任医师, 研究方向: 中医药防治肝病。E-mail: zxl_lz@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effects of Jisheng Shenqi decoction on homing of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) based on the SDF-1/CXCR4 axis and analyze the mechanism of liver cirrhosis treatment with Jisheng Shenqi decoction combined with BMSCs transplantation. **Methods** A liver cirrhosis model was established by intraperitoneal injection of 40% carbon tetrachloride oil solution and other complex factors in 30 rats that were then randomly divided into the model control group (model group), BMSCs transplantation group (BMSCs group), and BMSCs transplantation combined with Jisheng Shenqi decoction group (combined group). Ten normal rats were used as the normal control group (normal group). The BMSCs and combined groups were injected with fluorescent-labeled BMSCs into the tail vein; the combined group was administered Jisheng Shenqi decoction at the same time; the normal and model groups were not treated. The liver function index and liver pathologic changes were observed at 4 weeks after treatment. The homing of BMSCs in liver tissue in each group was observed under fluorescence microscopy. The serum expressions of stem cell factor, hepatocyte growth factor, granulocyte colony-stimulating factor, and erythropoietin were detected by ELISA. The expressions of SDF-1 and CXCR4 proteins were detected by immunohistochemical staining. **Results** Under light microscopy, the degree of fibrosis and inflammatory activity was significantly improved in the BMSCs and combined groups compared with the model group. Compared with the normal group, the model group had significantly increased serum concentrations of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, total bilirubin, and γ -glutamine tanspeptidase and a decreased albumin concentration ($P < 0.05$); these concentrations were also significantly improved in the BMSCs and combined groups compared with the model group ($P < 0.05$). There were more homing BMSCs observed in the combined group than the BMSCs group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the BMSCs and combined groups had increased expressions of stem cell factor, hepatocyte growth factor, granulocyte colony-stimulating factor, and erythropoietin; furthermore, the expressions of these factors were higher in the combined group than the BMSCs group ($P < 0.05$). Immunohistochemical analyses showed that the expressions of SDF-1 and CXCR4 proteins were upregulated in the BMSCs and combined groups compared with the model group, and were upregulated in the combined group compared with the BMSCs group ($P < 0.05$). **Conclusions** Jisheng Shenqi decoction activates the SDF-1/CXCR4 biological axis, upregulates the expressions of related proteins and upstream regulatory factors, promotes the homing of BMSCs to the injured liver tissue, and significantly improves the liver function and pathological changes in a rat model of liver cirrhosis.

【Keywords】 liver cirrhosis; bone marrow mesenchymal stem cells; Jisheng Shenqi decoction; SDF-1/CXCR4 axis

肝硬化是由各种损伤因素导致的以肝细胞损伤坏死、胶原沉积、窦周纤维化及纤维间隔增宽等为主要病理性改变的疾病^[1]。对于失代偿期的肝硬化,目前最有效的治疗手段为肝移植,但临床上受到多种因素的限制^[2]。而间充质干细胞移植具有可及性强、安全性高、单次治疗费用较低等优势,有望成为缺乏肝移植条件时的替代治疗之一^[3]。但干细胞移植后的迁徙方向、能否存活等问题亟待解决^[4]。目前的研究中多通过促红细胞生成素预处理干细胞、联合使用粒细胞集落刺激因子等方式,提高干细胞归巢效率,从而增强疗效,但这些方式的安全性及有效性未得到临床验证。

SDF-1/CXCR4 轴在干细胞动员、归巢中发挥着关键作用^[5],既往课题组应用中药联合骨髓间充质干细胞(BMSCs)移植治疗肝硬化,发现经典补肾方济生肾气汤可增加 BMSCs 向肝归巢,促进干细胞分化为功能肝细胞,加速肝再生,恢复肝功能^[6],但济生肾气汤对干细胞归巢的影响及具体作用机制尚不明确。因此,本研究旨在探究济生肾气汤对移植 BMSCs 迁徙、定植及增殖的影响,并初步研究其与

SDF-1/CXCR4 轴的关联,为提高干细胞移植对肝硬化的治疗效率提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠,体重 220~250 g,50 只,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供[SCXK(湘)2019-0004],饲养温度(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 50%~60%,予 12 h 光照,自由饮食;无菌手术在广西中医药大学动物实验中心屏障动物实验设施进行[SYXK(桂)2019-0001]。动物实验通过广西中医药大学实验动物福利伦理委员会审核(DW20190105-034),实验涉及动物饲养及实验操作均遵守实验动物管理与保护 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

济生肾气汤颗粒(熟地黄 40 g、山茱萸 20 g、山药 20 g、泽泻 15 g、茯苓 15 g、丹皮 15 g、肉桂 5 g、附子 5 g、车前子 10 g、牛膝 10 g)由培力(南宁)药业有限公司提供,蒸馏水稀释至 8.75 g/2 mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用;胎牛血清(批号:2335473CP)、DMEM 培养基

(批号:8121342)购于 Gibco 公司;CXCR4 兔单克隆抗体(批号:GR3231217-19)购于 abcam 公司;SDF-1 兔单克隆抗体(批号 3503 S)购于 CST 公司;抗 CD44 抗体(批号:746123)购于 BD 公司;CD34 鼠单克隆抗体(批号:9471PABX191031032420-PE)、抗 CD105 抗体(批号:532059040320-PE)购于 Novus 公司;ELISA 试剂盒(批号:202102)购于武汉华联科生物技术有限公司;PKH67 常规细胞膜标记试剂盒(批号:DCM210707)购于北京富百科生物技术有限公司;DAPI 溶液(批号:20210420)、Mayer¹ 苏木精染料(批号:20210419)、伊红染液(批号:20200927)购于索莱宝有限公司。

低温高速离心机购自美国 Beckman coulter 公司;全自动生化分析仪购自日本 Olympus 公司;流式细胞仪购自美国 BD 公司;荧光显微镜购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;酶标仪购自美国 Thermo Scientific 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 分组与干预方法

40 只 SD 大鼠适应性喂养 7 d 后,随机分为正常组、模型组、BMSCs 移植组(BMSCs 组)、BMSCs 移植联合济生肾气汤组(联合组),每组 10 只。采用 40%四氯化碳橄榄油溶液(四氯化碳溶液与橄榄油比例为 4:6)以 0.2 mL/100 g 剂量腹腔注射,每周 3 次,同时予高脂饲料(普通饲料颗粒 90%,猪油 8%,胆固醇 2%)喂养,共诱导 8 周建立肝硬化大鼠模型。与正常组比较,模型组大鼠血清 ALT、AST 及 GGT 水平显著升高,且肝组织病理学观察到假小叶生成及炎症细胞浸润等提示造模成功。造模后,BMSCs 组采用荧光标记的 BMSCs 悬浮液经鼠尾静脉注入大鼠体内,每周 1 次,连续注射 4 周;联合组在此基础上,根据“体表面积折算的等效剂量比率表”给予中药混悬液 8.75 g/(kg·d)灌胃,每日 1 次,连续 4 周;正常组与模型组不予干预。

1.3.2 BMSCs 提取、培养及鉴定

取 4 周龄 SD 大鼠,处死后置于 75%乙醇中浸泡 10 min,超净工作台上分离股骨与胫骨,PBS 液冲洗骨髓腔,收集冲洗液,常温下 1500 r/min 离心 10 min,弃去上清液,以含 10%胎牛血清 DMEM/F₁₂ 培养液重悬制备成单细胞悬浮液,接种于 25 cm² 培养瓶中,置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中,72 h 后首次换液,之后每 2 d 换液 1 次,3~4 d 按 1:2 进行传代。

第 3 代 BMSCs 生长融合达 90%时,用 0.25%胰蛋白酶消化,1000 r/min 离心 5 min 并以 PBS 洗涤 2

遍,洗涤完后加入 PBS 重悬细胞。血细胞计数板计数过滤后的细胞数量,每管取 10⁶ 个细胞重新悬于 200 μL PBS 中,加入 CD34、CD44、CD105 抗体,进行流式细胞仪分析。

1.3.3 BMSCs 荧光标记、移植、追踪

0.25%胰蛋白酶消化并收集生长状态良好的第 3 代 BMSCs。稀释适量 PKH67 染色工作液用于重悬细胞,重悬后浓度约每毫升 10⁶ 个。4℃ 孵育 30 min,加入胎牛血清终止反应,离心后去除上清,沉淀用 PBS 洗涤 2 遍后加入完全培养液重悬,转移至 25 cm² 培养瓶中,24 h 后荧光显微镜下观察细胞染色情况。

将荧光标记的第 3 代 BMSCs 用生理盐水稀释配置成细胞悬浮液 1.5 mL(约含细胞数量 2×10⁶ 个)经大鼠尾静脉缓慢注入体内,每周 1 次,从第 9 周起,连续注射 4 周,至 12 周末取肝组织制作冰冻切片。DAPI 染液常温下复染 10 min,流水冲去染液,加入抗荧光淬灭剂封片,置于荧光显微镜下观察归巢情况。

1.3.4 肝功能检测

肝功能检测禁食 24 h,不禁水,将大鼠麻醉后,取腹主动脉血,静置 30 min 后离心分离血清,全自动生化仪检测 ALT、AST、ALB、γ-GGT 及 TBIL 等指标。

1.3.5 HE 染色

取大鼠肝组织,4%多聚甲醛固定、脱水、透明、石蜡包埋切片,进行 HE 染色,置于光学显微镜下观察肝组织病理学形态,参照《肝纤维化中西医结合诊疗指南(2019 年版)》^[7] 对肝组织炎症活动度及纤维化分期进行评分。

1.3.6 ELISA 实验

取大鼠腹主动脉血,离心,分离血清用于 ELISA 检测 GCSF、EPO、HGF 及 SCF,检测过程依照 ELISA 试剂盒说明进行,经自动计数程序得出浓度。

1.3.7 免疫组化分析实验

大鼠肝组织石蜡切片经常规脱蜡处理后,高压抗原修复,依次滴加过氧化物酶阻断液 37℃ 封闭、10%非免疫血清 37℃ 孵育、加入一抗工作液 4℃ 过夜,生物素标记二抗工作液 37℃ 孵育及链酶亲和素-生物素-辣根过氧化物酶工作液 37℃ 孵育,DAB 显色,苏木素复染,脱水透明,中性树胶封片。显微镜下观察并拍照,用 Image pro plus 软件计算 IOD 值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。计量资料

以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两样本均数间的比较采用 t 检验;多个样本间的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 BMSCs 表面抗原鉴定

流式细胞仪检测全骨髓贴壁法培养的第 3 代 BMSCs 表面抗原 CD34(-), CD44(+), CD105(+), 见图 1。以上检测结果证明提取的细胞符合骨髓间充质干细胞特征。

2.2 BMSCs 的形态特征

镜下见第三代细胞生长旺盛,形态均一,呈现旋涡样结构排列。见图 2。

2.3 各组大鼠肝功能情况

与正常组比较,其余各组大鼠血清 ALT、AST、 γ -GGT 及 TBIL 水平均增高,血清 ALB 水平下降;与模型组比较, BMSCs 组与联合组大鼠 ALT、AST、 γ -GGT 及 TBIL 不同程度下降, ALB 不同程度升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);与 BMSCs 组比较,联合组大鼠血清 ALT、AST、 γ -GGT、TBIL 水平降低, ALB 水平升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 3。

2.4 大鼠肝组织病理学观察

正常组大鼠肝小叶的结构、形态正常,无明显的炎症及纤维化病理表现。模型组大鼠肝索排列紊乱,肝小叶结构破坏,中央静脉偏离或消失,部分组织呈炎性细胞浸润像,纤维结缔组织增生,形成许多大小不等的假小叶且假小叶结构紊乱。BMSCs 组大鼠肝组织纤维化程度减轻,仍可见炎症细胞浸润。联合组肝小叶结构修复,假小叶的数量有明显的减少,肝索排列的整齐度改善,见少量的炎性细

胞浸润。见图 4。

肝病理学评分:与正常组比较,模型组大鼠肝组织炎症及纤维化情况明显;与模型组比较, BMSCs 组、联合组炎症活动度及纤维化情况均有不同程度改善,差异有统计学意义($P<0.05$),与 BMSCs 组比较,联合中组改善情况明显,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

2.5 荧光显微镜观察 BMSCs 标记及归巢情况

荧光显微镜下见 BMSCs 呈长梭形、三角形,胞膜发绿色荧光,细胞标记率为 99.5%。阴性对照组仅见肝组织细胞着色的 DAPI 蓝色荧光。BMSCs 组与联合组切片上可见组织细胞非特异着色的 DAPI 呈蓝色荧光,及散在分布点状绿色荧光。其中联合组较 BMSCs 移植组同倍数视野下绿色荧光光点增多。见图 5。

2.6 血清 GCSF、EPO、HGF 及 SCF 表达情况

比较各组间大鼠血清 GCSF、EPO、HGF、SCF,与正常组比较,模型组表达下调,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与模型组大鼠比较, BMSCs 组及联合组均有上调($P<0.05$);与 BMSCs 组比较,联合组血清 GCSF、EPO、HGF、SCF 表达水平更高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图 6。

2.7 SDF-1、CXCR4 蛋白在肝组织中定位表达

SDF-1 蛋白在肝组织中阳性表达为细胞膜呈棕黄色颗粒状染色; CXCR4 蛋白在肝中阳性表达为胞浆或者浆膜呈棕黄色颗粒状染色。见图 7、图 8。

平均光密度值分析结果:与正常组比较,模型组肝 SDF-1、CXCR4 蛋白表达均有所下调,差异具有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较, BMSCs 组与联合组 SDF-1、CXCR4 蛋白均有所上调,联合组表达高于 BMSCs 组差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

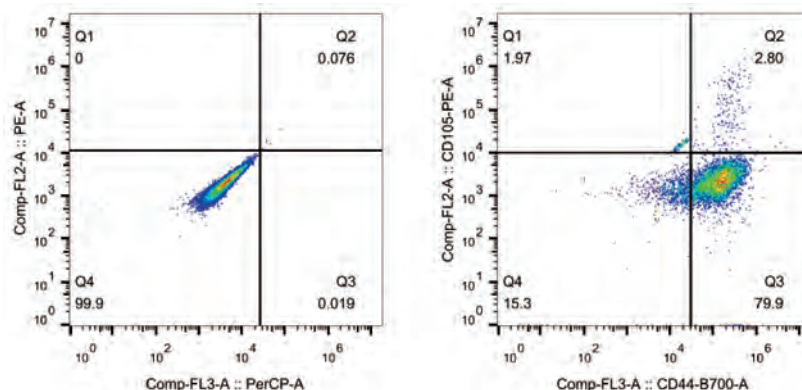


图 1 细胞表面抗原检测结果

Figure 1 Cell surface antigen results

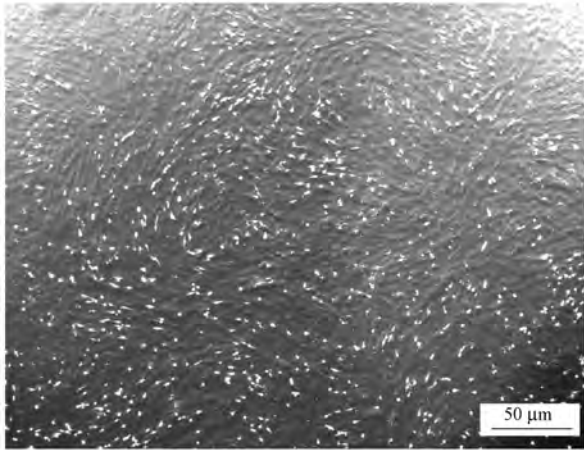


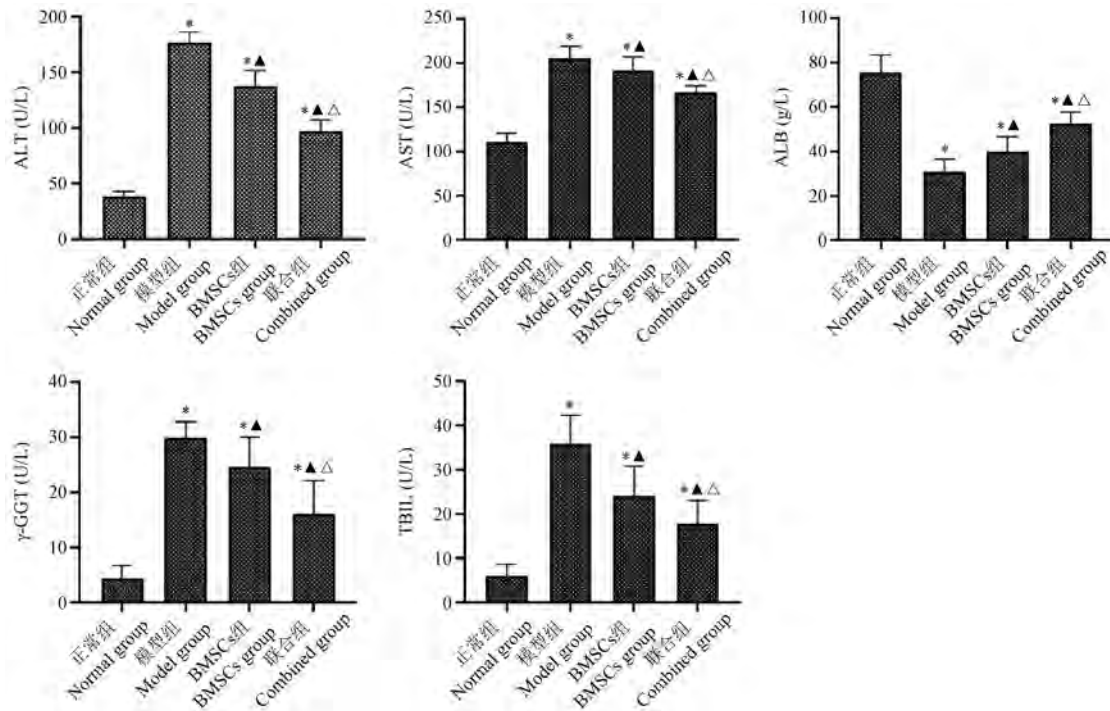
图 2 倒置显微镜下观察 BMSCs 形态特征

Figure 2 Morphological characteristic of BMSCs under the inverted microscope

表 1 各组大鼠肝组织炎症活动度及纤维化分期评分($n=10$)

Table 1 Liver inflammatory degree and fibrosis staging scores of rats

组别 Groups	炎症程度 Inflammatory degree				纤维化程度 Fibrosis degree				
	无 None	轻度 Mild	中度 Moderate	重度 Severe	F0	F1	F2	F3	F4
正常组 Normal group	10	0	0	0	10	0	0	0	0
模型组 Model group	0	0	2	8	0	0	0	0	10
BMSCs 组 BMSCs group	0	1	2	7	0	0	2	3	5
联合组 Combined group	2	2	4	2	0	2	3	3	2



注:与正常组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, ^ $P<0.05$;与 BMSCs 组比较, Δ $P<0.05$ 。

图 3 各组大鼠血清 ALT、AST、ALB、γ-GGT 及 TBIL 比较

Note. Compared with normal group, * $P<0.05$. Compared with model group, ^ $P<0.05$. Compared with BMSCs group, Δ $P<0.05$.

Figure 3 Comparison of ALT, AST, ALB, γ-GGT and TBIL in serum of rats

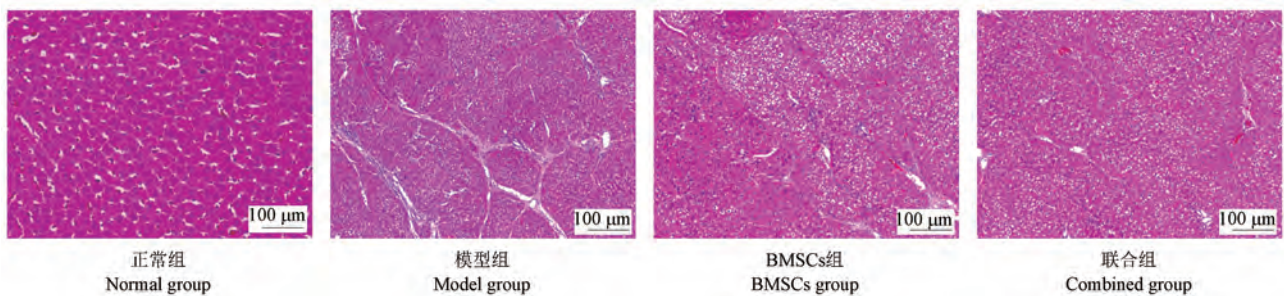


图 4 各组大鼠肝组织病理学情况

Figure 4 Liver pathology of rats in each group

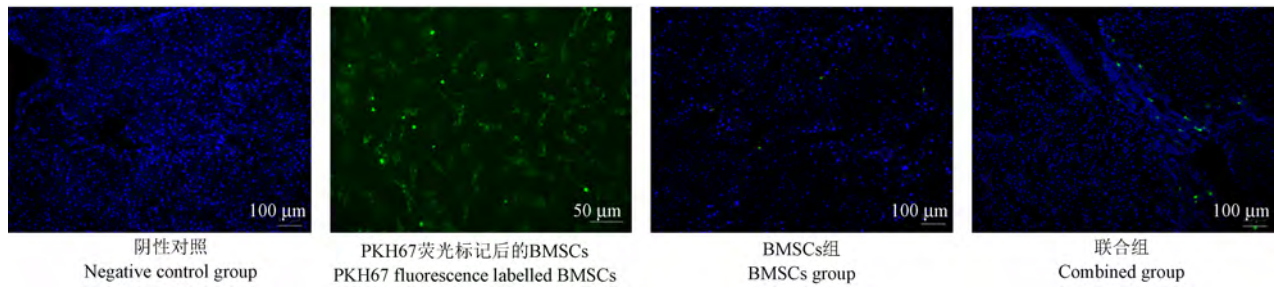
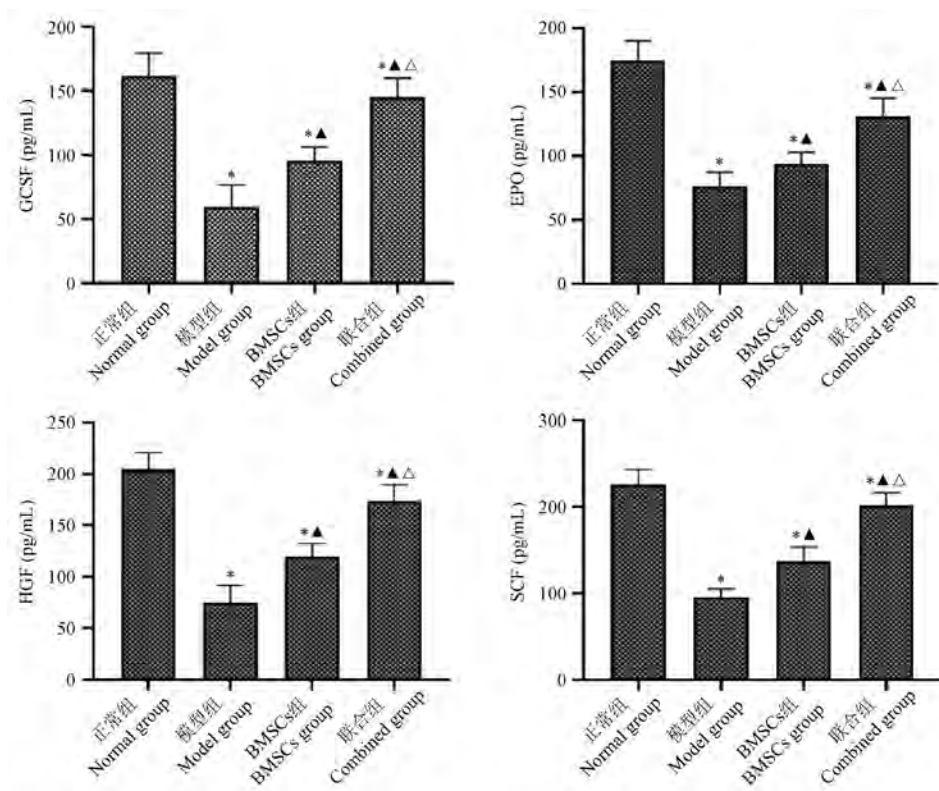


图 5 BMSCs 移植后在肝中的分布情况

Figure 5 Distribution of BMSCs in liver after transplantation



注:与正常组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, ▲ $P < 0.05$;与 BMSCs 组比较, △ $P < 0.05$ 。

图 6 各组大鼠血清 G-CSF、EPO、HGF 及 SCF 表达情况比较

Note. Compared with normal group, * $P < 0.05$. Compared with model group, ▲ $P < 0.05$. Compared with BMSCs group, △ $P < 0.05$.

Figure 6 Comparison of G-CSF, EPO, HGF and SCF expressions in serum of rats in each group

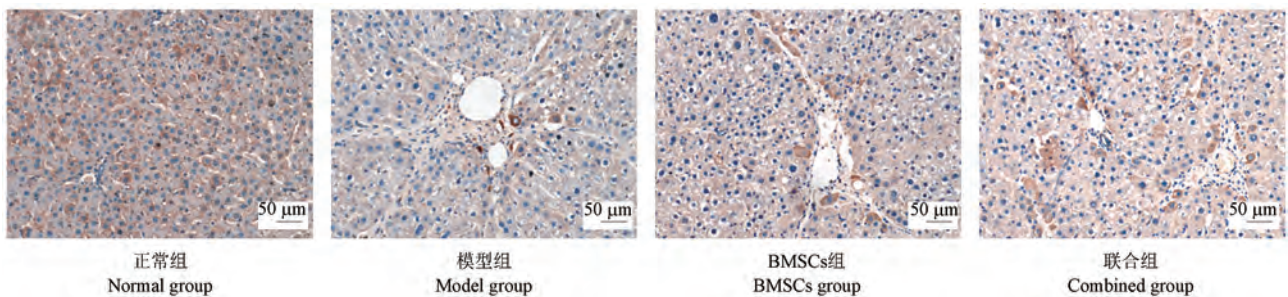


图 7 各组大鼠肝组织 SDF-1 表达

Figure 7 Comparison of SDF-1 expression in liver of rats in each group

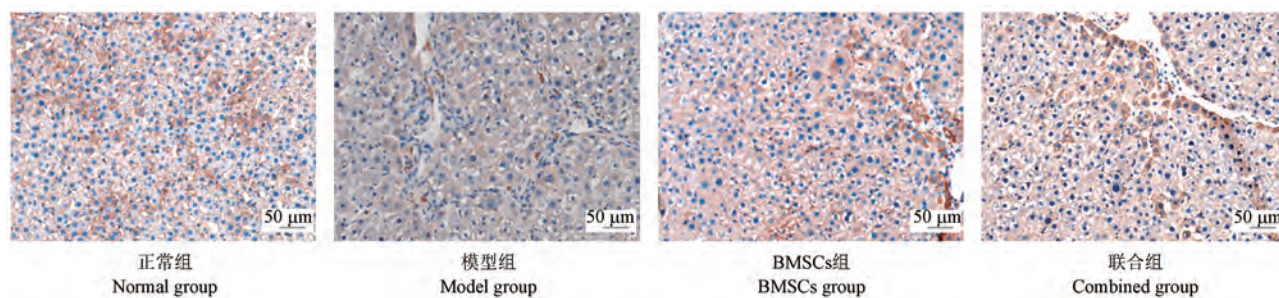


图 8 各组大鼠肝组织 CXCR4 表达

Figure 8 Comparison of CXCR4 expression in liver of rats in each group

表 2 各组大鼠肝组织 SDF-1、CXCR4 蛋白表达情况比较

Table 2 Comparison of SDF-1 and CXCR4 protein expression in liver of rats in each group

组别 Groups	SDF-1	CXCR4
正常组 Normal group	26.32±2.80 ²⁾	24.04±3.74 ²⁾
模型组 Model group	9.42±2.15 ¹⁾	11.87±2.78 ¹⁾
BMSCs 组 BMSCs group	17.23±2.31 ¹⁾²⁾	17.58±2.08 ¹⁾²⁾
联合组 Combined group	22.00±2.91 ²⁾³⁾	20.16±2.20 ¹⁾²⁾³⁾

注:与正常组比较,¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较,²⁾ $P<0.05$;与 BMSCs 组比较,³⁾ $P<0.05$ 。

Note. Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.05$. Compared with model group, ²⁾ $P<0.01$. Compared with BMSCs group, ³⁾ $P<0.05$.

3 讨论

肝硬化是常见的临床综合征,流行病学调查发现,全球范围内肝硬化患者高达 1.12 亿^[8],每年 4%~12% 患者进展为失代偿期肝硬化^[9],5 年内死亡率可升高至 88%^[10]。对于对症支持治疗无法改善的失代偿期肝硬化、肝衰竭,肝移植是目前最有效的治疗方式但存在许多限制临床应用的问题如:供体紧缺、器官分配、免疫排斥等。间充质干细胞移植作为可及性较强的移植治疗方法,可重复、单次费用低、安全性高,被视为肝移植的有效替代手段,但如何促进干细胞归巢的问题亟待解决^[11]。有学者提出中药具有促进干细胞归巢的作用,如鳖甲煎丸、软肝化纤方等中药组方促进干细胞向肝迁徙定植的作用已得到证实^[12-13]。

中医并无“肝硬化”病名,但在肝硬化治疗领域有一定的文献记录,从“臌胀”、“黄疸”、“胁痛”等疾病的诊疗中可见一斑。中医在肝病的治疗中格外重视肝肾关系,如藏象理论中的“肾藏精”学说认为,肾精聚而为髓,精髓化生血液充养肝,以供其维

持生理功能,而肾精亏虚则是慢性肝病进展的关键环节之一,因此中医在慢性肝病的治疗强调“补益肾精”^[14]。骨髓间充质干细胞是一类具有多分化潜能的细胞,可分化为各种功能细胞和组织器官,符合中医理论中“肾精”和“髓”的范畴^[15]。干细胞移植通过外源性增加干细胞来源治疗肝硬化的方式,与中医“补肾生髓生肝”理论吻合。本次研究运用的济生肾气汤,源自《济生方》,此方补泻兼施,水火既济,诸药合用共同达到补肾益髓,温化输布精气的功效。临床应用中,济生肾气汤治疗肝硬化已取得明显疗效^[16-17],并且在实验研究也有一定研究成果^[18-19]。本次实验联合济生肾气汤与 BMSCs 移植,发现模型大鼠肝功能指标下降,病理检查见肝硬化改善明显,肝组织炎症及纤维化评分显著下降,说明 BMSCs 移植联合济生肾气汤确有治疗肝硬化疗效;在肝组织冰冻切片中观察到联合组的干细胞数量多于 BMSCs 移植组,初步验证了济生肾气汤可促进 BMSCs 迁移至肝内定植和存活。

BMSCs 移植的疗效取决于归巢与长期定植的能力,但 BMSCs 从骨髓向靶组织迁徙受到微环境中的多种因素复合影响。SDF-1/CXCR4 轴是调节干细胞迁徙所需内外环境的关键环节,SDF-1 是高度表达于炎症损伤的组织或器官中的一种炎症趋化因子,CXCR4 是其特异性受体^[20]。肝组织炎症损伤形成了 SDF-1 α 浓度梯度,CXCR4 阳性的干细胞沿着此浓度梯度由外周血向损伤肝组织迁徙则为干细胞归巢过程^[21]。研究发现,细胞因子 GCSF、EPO 参与调控 SDF-1/CXCR4 轴活性^[22-23],进而诱导 SCF、HGF 等因子的表达,促进干细胞生长、迁徙并向肝细胞分化^[24-25]。本次研究检测了各组大鼠血清中 GCSF、EPO、SCF 及 HGF 的水平,结果发现 BMSCs 移植联合济生肾气汤组大鼠血清水平较模型组明显升高,说明济生肾气汤具有调控干细胞增

殖、迁徙相关因子,激活 SDF-1/CXCR4 轴促进 BMSCs 归巢的潜能。再通过检测各组大鼠肝中干细胞归巢相关蛋白 SDF-1、CXCR4 的表达及定位,发现联合济生肾气汤干预后可显著提高肝内两种蛋白的表达量,说明其在 BMSCs 在植入体内向损失部位迁徙并定植的过程中,对 SDF-1/CXCR4 轴起了调节作用。因此我们推测济生肾气汤联合 BMSCs 移植治疗肝硬化的机制为,济生肾气汤通过促进植入的 BMSCs 在肝中定植并增殖,以及与其他细胞发生融合或直接分化为肝细胞以代替修复损失的肝组织,增强肝再生能力,恢复肝细胞功能。

综上所述,本研究再次验证了 SDF-1/CXCR4 信号生物轴与干细胞迁徙并定植密切相关,证明了济生肾气汤可以促进 GCSF、EPO、SCF、HGF 等干细胞动员因子分泌,激活 SDF-1/CXCR4 轴,提高受损肝组织募集干细胞的水平,修复受损肝,从而在肝硬化大鼠治疗中发挥作用。

参考文献:

- [1] Barnett R. Liver cirrhosis [J]. Lancet, 2018, 392 (10144): 275.
- [2] Meirelles Júnior RF, Salvalaggio P, Rezende MB, et al. Liver transplantation: history, outcomes and perspectives [J]. Einstein (Sao Paulo), 2015, 13(1): 149-152.
- [3] Cao Y, Zhang B, Lin R, et al. Mesenchymal stem cell transplantation for liver cell failure: a new direction and option [J]. Gastroenterol Res Pract, 2018, 2018: 9231710.
- [4] 李梦诗,王越,徐莎,等. 干细胞基础研究和临床研究的现状分析 [J]. 第二军医大学学报, 2021, 42(8): 949-956.
- [5] 王庆国,严福华,徐鹏举,等. 四氯化碳诱导的小鼠肝纤维化模型中 SDF-1/αCXCR4 的表达及其意义 [J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(5): 384-387, 404.
- [6] Zhou X, Yang J, Liu Y, et al. Observation of the effect of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation by different interventions on cirrhotic rats [J]. Braz J Med Biol Res, 2019, 52(3): e7879.
- [7] 徐列明,刘平,沈锡中,等. 肝纤维化中西医结合诊疗指南 (2019 年版) [J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(11): 1286-1295.
- [8] GBD 2017 Cirrhosis Collaborators. The global, regional, and national burden of cirrhosis by cause in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global burden of disease Study 2017 [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2020, 5(3): 245-266.
- [9] 韩英,郭长存,时永全. 干细胞移植规范化治疗肝硬化失代偿的专家共识 (2021) [J]. 中华细胞与干细胞杂志 (电子版), 2021, 11(2): 65-74.
- [10] D'amico G, Morabito A, D'amico M, et al. Clinical states of cirrhosis and competing risks [J]. J Hepatol, 2018, 68(3): 563-576.
- [11] 李裕珍,冯丽娟,潘益巧,等. 骨髓间充质干细胞诱导分化为肝细胞的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 130-135.
- [12] 黄晶晶,黄鸿娜,王振常,等. 鳖甲煎丸干预 SDF-1/CXCR4 信号通路对骨髓间充质干细胞移植治疗肝纤维化的影响研究 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(7): 1565-1567.
- [13] 吕艳杭,吴姗姗,王振常,等. 柔肝化纤颗粒联合骨髓间充质干细胞移植术治疗肝硬化失代偿期的临床疗效及其对血清炎症因子水平和免疫功能及氧化应激反应的影响 [J]. 中国全科医学, 2021, 24(3): 355-362.
- [14] 施明阳,施卫兵,许文彬,等. 中医补肾法治疗肝硬化疗效及安全性 Meta 分析 [J]. 中医临床研究, 2021, 13(31): 131-135.
- [15] 陈立,王小琴. 骨髓间充质干细胞为中医肾藏精理论作用的重要物质基础 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(11): 2599-2601.
- [16] 周晓玲,谢胜,陈峭,等. 脐血干细胞移植结合补益肾气利湿法治疗 ChildA、B 级肝硬化的疗效及机制探讨 [J]. 实用临床医药杂志, 2014, 18(17): 25-28.
- [17] 周晓玲,谢胜,李灿,等. 济生肾气汤联合 α-2b 干扰素治疗脾肾阳虚型 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎疗效观察 [J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(34): 3772-3773, 3776.
- [18] 刘莹,周晓玲,谢胜,等. 不同干预手段骨髓间充质干细胞移植方案对肝硬化大鼠模型的疗效观察 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(8): 26-30.
- [19] 刘莹,周晓玲,谢胜,等. 济生肾气汤对干细胞移植后肝硬化大鼠干细胞归巢能力的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23(07): 1104-1109.
- [20] Jiang Q, Huang K, Lu F, et al. Modifying strategies for SDF-1/CXCR4 interaction during mesenchymal stem cell transplantation [J]. Gen Thorac Cardiovasc Surg, 2021, 70(1): 1-10.
- [21] Xiu G, Li X, Yin Y, et al. SDF-1/CXCR4 augments the therapeutic effect of bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of lipopolysaccharide-induced liver injury by promoting their migration through PI3K/Akt signaling pathway [J]. Cell transplantation, 2020, 29: 963689720929992.
- [22] Liang SD, Ma LQ, Gao ZY, et al. Granulocyte colony-stimulating factor improves neurological function and angiogenesis in intracerebral hemorrhage rats [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(7): 2005-2014.
- [23] Li J, Huang Z, Li B, et al. Mobilization of transplanted bone marrow mesenchymal stem cells by erythropoietin facilitates the reconstruction of segmental bone defect [J]. Stem Cells Int, 2019, 2019(1): 5750967.
- [24] Vazquez-Mellado MJ, Monjaras-Embriz V, Rocha-Zavaleta L. Erythropoietin, stem cell factor, and cancer cell migration [J]. Vitam Horm, 2017, 2017(105): 273-296.
- [25] Liu W, Wang Y, Sun Y, et al. Clonal expansion of hepatic progenitor cells and differentiation into hepatocyte-like cells [J]. Dev Growth Differ, 2019, 61(3): 203-211.

[收稿日期] 2021-11-29