

uPA基因修饰骨髓源性肝干细胞移植对肝纤维化大鼠TGF- β -Smads信号通路的影响

孙超, 李定国, 陈源文, 陈颖伟, 汪保灿

孙超, 李定国, 陈源文, 陈颖伟, 汪保灿, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科 上海市 200092
孙超, 博士, 主要从事肝纤维化的防治研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30500236
上海市教委科研基金资助项目, No. 05BZ49
上海市科委医学临床研究重点科技攻关基金资助项目, No.064119527
上海市教委优秀青年教师科研专项基金资助项目, No. jdy06040
作者贡献分布: 孙超与陈源文对此文所作贡献均等; 此课题由陈源文、孙超及李定国设计; 研究过程由孙超、汪保灿及陈源文操作完成; 研究所用试剂及分析工具由陈颖伟提供; 数据分析由孙超完成; 本论文写作由孙超完成。
通讯作者: 李定国, 教授, 主任医师, 博士生导师, 200092, 上海市, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科。
dingguo_li@263.net
电话: 021-65790000-7344
收稿日期: 2010-11-06 修回日期: 2010-12-13
接受日期: 2010-12-21 在线出版日期: 2011-03-18

Effect of transplantation of uPA gene-modified bone marrow-derived liver stem cells on the TGF- β /Smad signal pathway in rats with liver fibrosis

Chao Sun, Ding-Guo Li, Yuan-Wen Chen, Ying-Wei Chen, Bao-Can Wang

Chao Sun, Ding-Guo Li, Yuan-Wen Chen, Ying-Wei Chen, Bao-Can Wang, Department of Gastroenterology, Xinhua Hospital, College of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200092, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30500236; the Research Project of Shanghai Municipal Education Commission, No. 05BZ49; the Major Brainstorm Project of Shanghai Science and Technology Commission, No. 064119527; and the Youth Talent Foundation of Shanghai Municipal Education Commission, No. jdy06040
Correspondence to: Professor Ding-Guo Li, Department of Gastroenterology, Xinhua Hospital, College of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200092, China. dingguo_li@263.net
Received: 2010-11-06 Revised: 2010-12-13
Accepted: 2010-12-21 Published online: 2011-03-18

Abstract

AIM: To explore the effect of transplantation of urokinase-type plasminogen activator (uPA) gene-modified bone marrow-derived liver stem cells (BDLSC) on the transforming growth factor- β (TGF- β)/Smad signal pathway in rats

with CCl₄-induced liver fibrosis.

METHODS: Liver fibrosis was induced in rats by subcutaneous injection of CCl₄. The rats were randomly divided into control group, model group, BDLSC group (injected with 2×10^6 BDLSC via the tail vein), and BDLSC-uPA group (injected with 2×10^6 uPA-transfected BDLSC via the tail vein). Liver function and hepatic pathohistological changes were detected, and the expression of TGF- β 1, Smad3 and Smad7 proteins was determined by immunohistochemistry or Western blot.

RESULTS: In the BDLSC-uPA group, the extent of liver fibrosis was much milder, the formation of pseudolobules was less obvious, liver function was better, and the expression of TGF- β 1 protein in the liver (0.1849 ± 0.0456 vs 0.8202 ± 0.0636 , 0.2936 ± 0.0548 , both $P < 0.05$) was significantly lower compared with the control group and BDLSC group. No significant difference was observed in the expression of Smad3 and Smad7 proteins among all the groups.

CONCLUSION: Transplantation of uPA gene-modified BDLSC exerts an anti-fibrosis effect partly by inhibiting the expression of TGF- β 1 protein.

Key Words: Urokinase-type plasminogen activator; Bone marrow-derived liver stem cell; Liver fibrosis; Transforming growth factor- β 1; Smad3; Smad7

Sun C, Li DG, Chen YW, Chen YW, Wang BC. Effect of transplantation of uPA gene-modified bone marrow-derived liver stem cells on the TGF- β /Smad signal pathway in rats with liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(8): 789-793

摘要

目的: 探讨尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)基因修饰骨髓源性肝干细胞(BDLSC)移植对CCl₄诱导的大鼠肝组织转化生长因子- β -Smads(TGF- β -Smads)信号通路的影响。

■背景资料

近年发现骨髓中某些干细胞具有向肝系细胞分化的潜能, 分离骨髓源性肝干细胞(BDLSC), 用于肝病的治疗研究受到广泛重视。尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)在降解纤维、逆转肝纤维化中起重要作用。

■同行评议者

单云峰, 副主任医师, 温州医学院附属第一医院肝胆外科

■研发前沿

基因治疗与细胞治疗的结合是目前研究的热点。

方法: 采用皮下注射CCl₄建立大鼠肝纤维化模型。将纯系Fisher大鼠随机分为正常组、模型组、BDLSC组(尾静脉注入 2×10^6 BDLSC)和BDLSC-uPA组(尾静脉注入 2×10^6 AduPA转染的BDLSC), 每组9只。观察各组大鼠肝功能和病理组织学变化; 采用免疫组织化学法或Western blot法分别检测大鼠肝组织TGF- β 1、Smad3及Smad7蛋白表达变化。

结果: 与模型组和BDLSC组相比, BDLSC-uPA组大鼠肝脏结缔组织增生程度减轻, 假小叶形成不明显, 肝功能明显改善; 肝组织TGF- β 1蛋白表达明显低于模型组和BDLSC组(0.1849 ± 0.0456 vs 0.8202 ± 0.0636 , 0.2936 ± 0.0548 , 均 $P < 0.05$), 而Smad3和Smad7蛋白表达无明显变化。

结论: uPA基因修饰BDLSC移植可能部分通过抑制TGF- β 1蛋白表达, 从而发挥抗肝纤维化的作用。

关键词: 尿激酶型纤溶酶原激活物; 骨髓源性肝干细胞; 肝纤维化; 转化生长因子- β 1; Smad3; Smad7

孙超, 李定国, 陈源文, 陈颖伟, 汪保灿. uPA基因修饰骨髓源性肝干细胞移植对肝纤维化大鼠TGF- β -Smads信号通路的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(8): 789-793

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/789.asp>

0 引言

骨髓源性肝干细胞(bone marrow-derived liver stem cell, BDLSC)来源充足, 增殖能力强, 具有很强的向肝系细胞分化的能力, 成为基因治疗肝脏疾病理想的靶细胞^[1,2]。尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase type plasminogen activator, uPA)在降解纤维、逆转肝纤维化中具有重要作用^[3,4]。我们设想肝干细胞与uPA基因治疗联合应用时, uPA参与清除坏死组织及降解纤维间隔, 促进BDLSC种植、增殖和分化、重建正常的肝组织结构, 将有利于肝组织形态和功能恢复。转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)是公认的最重要的促肝纤维化细胞因子之一, Smad3和Smad7蛋白为TGF- β 1受体后下游的信号转导因子。本研究将携带人uPA基因的腺病毒(adenoviral vector expressing human uPA, AduPA)体外转染BDLSC, 移植入肝纤维化大鼠体内, 评价转基因BDLSC对肝纤维化大鼠疗效和TGF- β -Smads信号通路的影响。

■相关报道

Zhao等研究推测骨髓干细胞可能分泌一些细胞因子, 如神经生长因子, 诱导HSC的凋亡, 下调TGF- β 1的表达。

1 材料和方法

1.1 材料 纯系Fisher 344 δ 大鼠10只, ϕ 大鼠36只, 体质量150-180 g, 购自中科院上海斯莱克实验动物有限责任公司。其中 δ 大鼠仅用于提取骨髓干细胞, 是供体大鼠, 而 ϕ 大鼠是受体大鼠。TRIzol购自美国Invitrogen公司, M-MLV逆转录酶购自美国Promega公司。Taq DNA聚合酶购自大连TaKaRa宝生物有限公司。TGF- β 1、Smad7兔多克隆抗体和Smad3羊多克隆抗体均购自美国Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 重组复制缺陷型腺病毒AduPA的包装及扩增: 人pAduPA重组腺病毒质粒由第二军医大学附属长征医院林勇博士惠赠。利用脂质体转染法在293细胞中包装和扩增, 用氯化铯梯度离心纯化, AduPA最终病毒滴度可达 3×10^{12} μ fu/L。

1.2.2 BDLSC筛选、扩增和鉴定: 采用淋巴分离液进行密度梯度离心法分离胆总管结扎后10 d大鼠骨髓单个核细胞, 使用含5%的大鼠胎血清的病理条件培养液筛选培养BDLSC。应用RT-PCR方法检测肝干细胞标志表达^[5]。

1.2.3 造模与分组: 将 ϕ 大鼠随机分为4组, 每组9只。(1)正常组: 皮下注射等量橄榄油; (2)模型组: 予40% CCl₄(CCl₄: 橄榄油 = 2:3, 3 mL/kg)皮下注射, 3 d注射1次, 首剂加倍, 共注射18次, 并经尾静脉注射等量生理盐水; (3)BDLSC组: 造模方法与模型组相同, 于实验第4周经尾静脉输入 2×10^6 BDLSC; (4)BDLSC-uPA组: 造模方法与模型组相同。AduPA以感染复数(multiplicity of infection, MOI)500转染BDLSC, 72 h后收集BDLSC溶于生理盐水, 于实验第4周经尾静脉输入 2×10^6 转基因BDLSC。细胞移植后应用免疫抑制剂他克莫司灌胃, 0.1 mg/(kg·d)。各组大鼠于第8周处死, 留取血清及肝组织。

1.2.4 病理组织学检测: 以甲醛固定矢状肝组织切片, 常规石蜡包埋。制备5 μ m厚肝组织切片用于HE染色。

1.2.5 血清学检测: 取各组大鼠血清1.5 mL, 使用自动生化分析仪检测肝功能指标丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)和白蛋白(albumin, ALB)。

1.2.6 Western blot分析: 提取各组肝组织总蛋白分别标准定量后, 各取20 μ g于10% SDS-PAGE电泳分离蛋白, 转蛋白至PVDF膜。使用5%

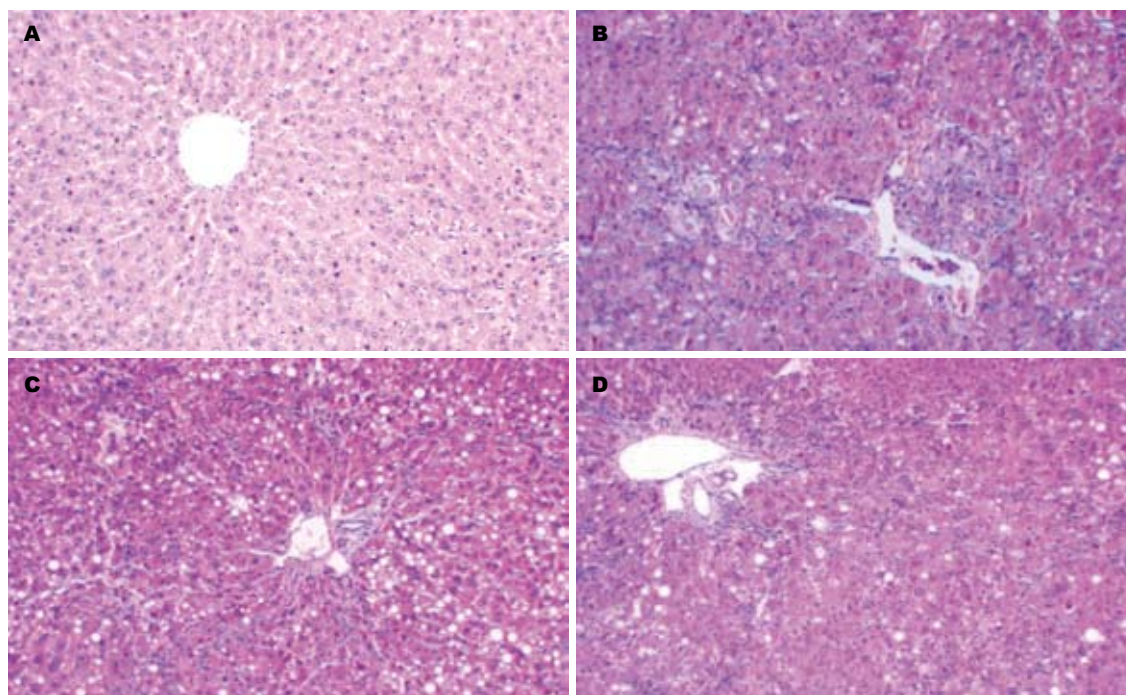


图1 各组大鼠肝组织HE染色($\times 100$)。A: 正常组; B: 模型组; C: BDLSC组; D: BDLSC-uPA组。

■创新盘点

本研究发现BDLSC-uPA组大鼠肝脏结缔组织增生程度减轻, 肝功能明显改善; 肝组织TGF- β 1蛋白表达明显低于模型组和BDLSC组, 而Smad3和Smad7蛋白表达无明显变化。

BSA/TBST封闭1 h, 加入一抗(TGF- β 1 1:200、Smad3 1:200、Smad7 1:1 000、 β -actin 1:1 000稀释), 于4℃中孵育过夜。次日用TBST洗涤后, 与辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000稀释)在室温下孵育2 h, TBST洗涤。用SuperSignal[®] west Pic化学发光试剂检测, 胶片曝光, 经显影、定影后结果扫描入计算机。

1.2.7 免疫组织化学分析: 将石蜡切片脱蜡至水, 微波抗原修复10 min, 加3% H₂O₂后于室温下孵育20 min; 加正常封闭羊血清, 室温下孵育20 min; 弃去羊血清, 加入一抗(TGF- β 1: 1:200), 于4℃中过夜; 次日加对应二抗, 37℃中孵育45 min; DAB显色, 显微镜下观察适时终止反应, 苏木素复染, 脱水封片。每个动物随机选取3张石蜡切片重复实验, 每张切片随机选取10个视野, 应用Image-Pro plus 5.1图像分析软件计算每个视野的阳性染色百分比进行统计。

统计学处理 计量资料以mean \pm SD表示, 采用SPSS12.0统计软件包进行单因素ANOVA或Kruskal-Wallis检验分析。 $P<0.05$ 为显著性界值。

2 结果

2.1 肝组织HE染色 各组大鼠肝组织切片HE染色结果显示: 模型组肝组织呈广泛而严重的肝细胞脂肪变性坏死, 门脉及中央静脉周围炎症细胞浸润, 汇管区扩大, 大量纤维组织增生, 假小叶形成, 而BDLSC-uPA组肝细胞变性坏死、炎症

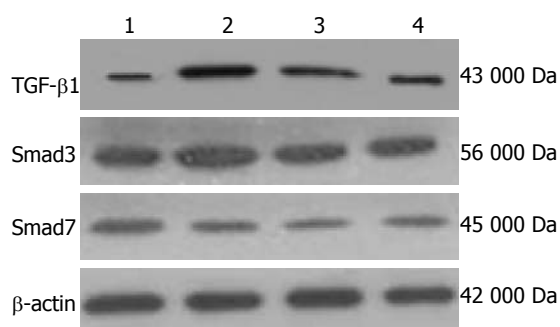


图2 各组大鼠肝组织TGF- β 1和Smad3、Smad7蛋白表达(Western blot)。1: 正常组; 2: 模型组; 3: BDLSC组; 4: BDLSC-uPA组。

细胞浸润及纤维组织增生明显减轻(图1)。

2.2 血清学检测 大鼠血清肝功能检测结果显示: 与正常组相比, 肝纤维化模型组血清ALT、AST和TBIL水平均显著升高, ALB水平显著下降($P<0.05$); 与模型组相比, BDLSC-uPA组大鼠血清ALT、AST和TBIL水平均有不同程度的降低, ALB水平升高($P<0.05$, 表1)。

2.3 转基因BDLSC移植对大鼠肝组织TGF- β -Smads信号通路的影响 Western blot结果经计算机灰度扫描并与内参照(β -actin)比较分析显示: 与模型组(0.8202 ± 0.0636)和BDLSC组(0.2936 ± 0.0548)相比, BDLSC-uPA组的肝组织TGF- β 1蛋白表达量(0.1849 ± 0.0456)均明显减低($P<0.05$, 图2)。免疫组织化学分析显示TGF- β 1蛋白表达与Western blot结果一致, BDLSC-uPA

■应用要点

本研究发现转基因BDLSC可抑制肝纤维化的发展, 且其抗肝纤维化机制也可能部分与BDLSC抑制TGF- β 1的表达有关. 此研究为其临床应用治疗肝纤维化提供理论依据.

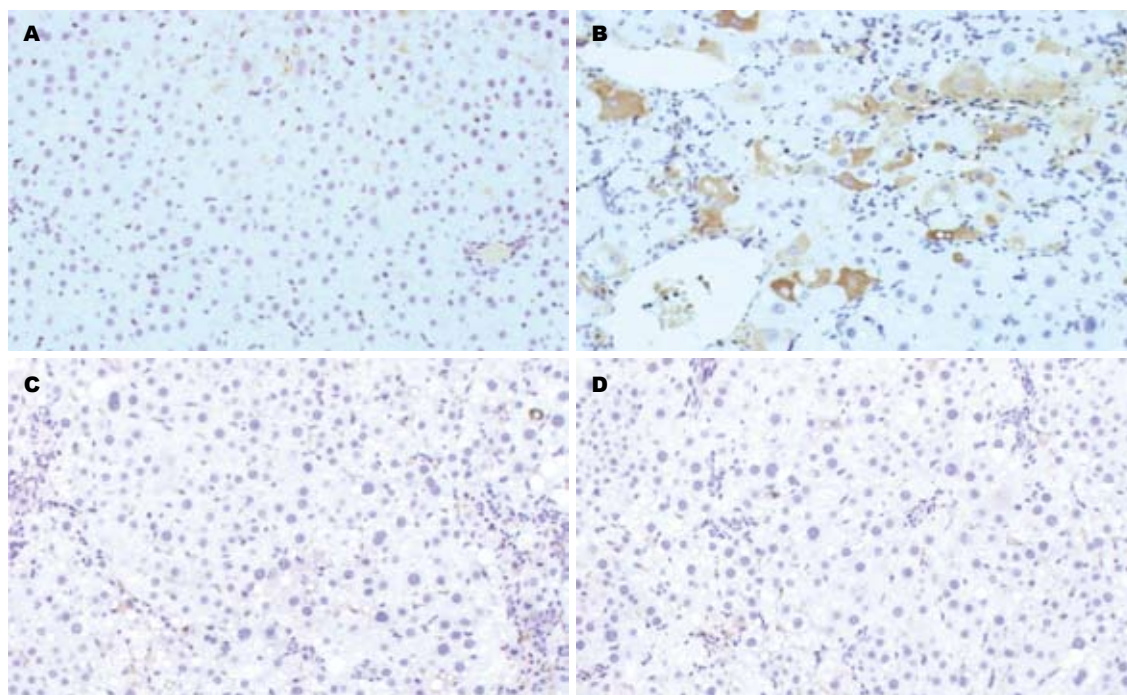


图3 各组大鼠肝组织TGF- β 1蛋白表达(DAB \times 200). A: 正常组; B: 模型组; C: BDLSC组; D: BDLSC-uPA组.

表1 各组大鼠肝功能指标比较 (mean \pm SD, $n = 8$)

分组	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	TBIL(μ mol/L)	ALB(g/L)
正常组	43.6 \pm 6.7	64.9 \pm 9.1 ^a	10.3 \pm 1.8 ^a	28.4 \pm 4.4 ^a
模型组	187.1 \pm 14.8	261.1 \pm 23.8	26.3 \pm 3.7	18.1 \pm 3.7
BDLSC组	113.5 \pm 15.7 ^a	195.5 \pm 18.8 ^a	17.9 \pm 2.8 ^a	25.5 \pm 2.7 ^a
BDLSC-uPA组	86.5 \pm 9.7 ^{ac}	148.3 \pm 17.0 ^{ac}	11.5 \pm 2.1 ^{ac}	26.4 \pm 3.4 ^a

^a $P < 0.05$ vs 模型组; ^c $P < 0.05$ vs BDLSC组.

组的TGF- β 1染色阳性细胞数量(9% \pm 3%)较模型组(51% \pm 6%)和BDLSC组(19% \pm 5%)明显减少($P < 0.05$, 图3). 而大鼠肝组织Smad3、7蛋白表达量在各实验组均无明显差异($P > 0.05$, 图2). 结果表明转基因移植BDLSC能明显抑制CCl₄诱导的大鼠肝TGF- β 1基因表达升高, 但对Smad3、Smad7蛋白表达无明显影响.

3 讨论

肝纤维化是肝脏对慢性损伤的一种修复反应, 以细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在肝内过多沉积为主要特征. 由uPA、纤溶酶及基质金属蛋白酶(matrix metallo proteinases, MMPs)构成的级联激活反应是调节ECM沉积的主要途径^[4]. 我们将肝干细胞与uPA基因治疗联合应用时, uPA参与清除坏死组织及降解纤维间隔, 促进BDLSC种植、重建正常的肝组织结构. 同时

BDLSC作为uPA的载体细胞, 避免了单纯uPA基因治疗的免疫原性和毒性. 本研究中, 我们采用CCl₄建立大鼠肝纤维化模型, 一方面由于CCl₄诱导的肝纤维化在病理上与人相似^[6], 另一方面, CCl₄造成一定程度的肝损伤和肝纤维化, 有利于BDLSC在肝脏的种植. Terai等^[7]将绿色荧光蛋白转基因小鼠的骨髓细胞经尾静脉导入CCl₄肝纤维化小鼠模型中, 4 wk后发现受体肝脏中有26%供体来源细胞, 种植率远高于其他肝损伤动物模型.

我们组织学染色发现, 模型组大鼠肝组织中可见大量肝细胞变性坏死, 炎症细胞浸润, 汇管区扩大; BDLSC-uPA组的大鼠肝组织结缔组织增生程度减轻, 纤维间隔变细, 假小叶形成不明显. 同时, BDLSC-uPA组大鼠的血清ALT、AST和TBIL水平均有不同程度的降低, ALB水平升高, 上述结果均提示转基因BDLSC移植能

明显减轻大鼠肝纤维化的程度,在一定程度上改善了纤维化大鼠肝功能,抑制了肝纤维化的发生发展.某些学者发现,输入体内的干细胞发挥上述作用并非通过直接地替代受损细胞,而是启动了内源性的肝再生,从而修复肝组织^[8,9].

TGF- β 1是最重要的促肝纤维化因子之一.他促进肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)活化和ECM合成,抑制肝细胞再生,并以自分泌和旁分泌的方式上调TGF- β 1表达,加速肝纤维化的发展^[10].TGF- β 1对HSC的作用信号主要通过其受体和下游信号分子Smads蛋白转导.Smads是TGF- β 生长因子超家族细胞内信号通路的基本组成成分,成员有Smad1-Smad8.TGF β 与受体结合后诱导Smad2和Smad3磷酸化,并与Smad4形成异寡聚体复合物,转运到细胞核而调节转录反应.Smad7能通过阻断Smad2、Smad3和Smad4的结合,对Smad的信号转导通路发挥负调控作用^[11].基于此,我们检测了各组大鼠肝组织中TGF- β 1和Smad3、Smad7基因表达.Western blot检测和免疫组织化学分析均显示,BDLSC-uPA组的TGF- β 1基因表达较模型组明显降低,但对Smad3、Smad7表达的影响却不明显.这与国内外研究结果相似^[8,9].Zhao等^[9]研究推测骨髓干细胞可能分泌一些细胞因子,如神经生长因子,诱导HSC的凋亡,下调TGF- β 1的表达.我们的结果提示转基因BDLSC抗肝纤维化机制也可能部分与BDLSC抑制TGF- β 1的表达有关.

总之,我们的研究证实uPA基因修饰BDLSC移植可能部分通过抑制TGF- β 1蛋白表达,从而发挥抗肝纤维化的作用.

4 参考文献

- 1 Lan L, Chen Y, Sun C, Sun Q, Hu J, Li D. Transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells transduced with adenovirus-mediated IL-10 gene reverses liver fibrosis in rats. *Transpl Int* 2008; 21: 581-592
- 2 Dai LJ, Li HY, Guan LX, Ritchie G, Zhou JX. The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis. *Stem Cell Res* 2009; 2: 16-25
- 3 Martínez-Rizo A, Bueno-Topete M, González-Cuevas J, Armendáriz-Borunda J. Plasmin plays a key role in the regulation of profibrogenic molecules in hepatic stellate cells. *Liver Int* 2010; 30: 298-310
- 4 González-Cuevas J, Bueno-Topete M, Armendariz-Borunda J. Urokinase plasminogen activator stimulates function of active forms of stromelysin and gelatinases (MMP-2 and MMP-9) in cirrhotic tissue. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1544-1554
- 5 孙超, 李定国, 陈源文, 陈颖伟, 孙巧玲, 汪保灿. 腺病毒介导的人uPA体外转染大鼠骨髓源性肝干细胞的研究. *胃肠病学和肝病杂志* 2006; 15: 46-49
- 6 Sindhu ER, Firdous AP, Preethi KC, Kuttan R. Carotenoid lutein protects rats from paracetamol-, carbon tetrachloride- and ethanol-induced hepatic damage. *J Pharm Pharmacol* 2010; 62: 1054-1060
- 7 Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, Omori K, Watanabe T, Ohata S, Katada T, Miyamoto K, Shinoda K, Nishina H, Okita K. An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem* 2003; 134: 551-558
- 8 Fang B, Shi M, Liao L, Yang S, Liu Y, Zhao RC. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation* 2004; 78: 83-88
- 9 Zhao DC, Lei JX, Chen R, Yu WH, Zhang XM, Li SN, Xiang P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3431-3440
- 10 Kisseleva T, Brenner DA. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S73-S78
- 11 Breitkopf K, Godoy P, Ciucian L, Singer MV, Doolley S. TGF-beta/Smad signaling in the injured liver. *Z Gastroenterol* 2006; 44: 57-66

■同行评价

本文深入研究了尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)修饰BDLSC移植抑制大鼠肝纤维化的机制,为临床应用提供更多的理论依据.

编辑 李薇 电编 李薇