

虫草多糖联合骨髓间充质干细胞移植对肝硬化大鼠 MMP-13 和 TIMP-1 表达的影响

杨谕晨¹, 宋雅芳², 张久梅³, 刘江凯⁴, 胡 齐², 胡芳玉² (1. 广州市南沙区中医医院, 广东 广州 511462; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405; 3. 张家口市中医医院, 河北 张家口 075000; 4. 河南中医学院第一附属医院, 河南 郑州 450008)

摘要: **目的** 探讨虫草多糖联合骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)移植对四氯化碳(CCl₄)诱导的肝硬化大鼠 MMP-13 和 TIMP-1 表达的影响。**方法** 取 SD 大鼠随机分成正常对照组、模型组、MSCs 移植组、虫草多糖组及 MSCs 移植 + 虫草多糖组, 除正常对照组外所有大鼠皮下注射 40 % CCl₄ 橄榄油溶液 12 周制备大鼠肝硬化模型, MSCs 移植组与 MSCs 移植 + 虫草多糖组注入绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记的 MSCs; 虫草多糖组、MSCs 移植 + 虫草多糖组在移植后 24 h 给予虫草多糖悬浊液灌胃, 正常对照组、模型组、MSCs 移植组给予等量生理盐水灌胃, 每天 1 次。4 周末处死大鼠, 取肝脏, 行冰冻切片荧光检测、肝组织 Masson 染色、免疫组织化学法检测基质金属蛋白酶 -13 (MMP-13)、基质金属蛋白酶抑制因子 -1 (TIMP-1) 表达。**结果** 各治疗组均能减轻肝硬化组织病理改变, 减少胶原沉积; 与模型组比较, 各治疗组 MMP-13 的表达显著升高($P < 0.05$), TIMP1 表达下降($P < 0.05$); MSCs 移植 + 虫草多糖组与 MSCs 移植组和虫草多糖组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** MSCs 能迁移定植于受损肝脏, 虫草多糖联合 MSCs 移植能降低肝组织 TIMP-1 表达, 进一步增强 MMP-13 表达, 明显促进胶原降解, 减少胶原沉积。

关键词: 虫草多糖; 骨髓间充质干细胞; 肝硬化

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)02-0144-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.02.008

Effects of Cordyceps Polysaccharide Combined with Mesenchymal Stem Cells Transplantation on Expression of MMP-13 and TIMP-1 in Rats with Carbon Tetrachloride induced Liver Cirrhosis

YANG Yuchen¹, SONG Yafang², ZHANG Jiumei³, LIU Jiangkai⁴, HU Qi², HU Fangyu² (1. Traditional Chinese Medicine Hospital of Guangzhou Nansha District, Guangzhou 511462 Guangdong, China; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 3. Traditional Chinese Medicine Hospital of Zhangjiakou City, Zhangjiakou 075000 Hebei, China; 4. The First Affiliated Hospital of Henan College of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008 Henan, China)

Abstract: Objective To observe the effects of Cordyceps polysaccharide combined with mesenchymal stem cells (MSCs) transplantation on the expression of matrix metalloproteinase 13 (MMP-13) and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) in rats with carbon tetrachloride induced liver cirrhosis. **Methods** SD rats were randomly divided into 5 groups, namely normal group, model control group, MSCs transplantation group, Cordyceps polysaccharide group and combination group (treated with MSCs transplantation+Cordyceps polysaccharide). Except for

收稿日期: 2013-11-06

作者简介: 杨谕晨, 女, 硕士, 研究方向: 中医药防治慢性肝病。Email: yyc19841208@163.com。通讯作者: 宋雅芳, 研究员, 研究方向: 中医药治疗消化系统疾病的临床与实验研究。Email: Sallysong yue@163.com。

基金项目: 广东省科技计划项目((2010B030700068))。

the normal group, rats in other groups were given subcutaneous injection of carbon tetrachloride for 12 weeks to induce liver cirrhosis. MSCs transplantation group and the combination group separately were injected MSCs labeled by green fluorescent protein(GFP). Cordyceps polysaccharide group and the combination group were given intragastric infusion of Cordyceps polysaccharide 24 h after MSCs transplantation. Normal group, model control group and MSCs transplantation group were given isodose normal saline once per day. At the end of the 4 th week, all rats were executed and liver tissue were prepared into frozen section. Fluorescence detection, Masson staining, and immunohistochemical detection were carried out for measuring MMP-13 and TIMP-1 expression. **Results** The pathological changes of liver cirrhosis were alleviated and collagen deposition was reduced in each medication group. Compared with the model group, the MMP-13 expression of medication groups was significantly increased ($P < 0.05$), and TIMP-1 expression was significantly decreased ($P < 0.05$). There were significant difference between the combination group and MSCs transplantation group, Cordyceps Polysaccharide group($P < 0.05$). **Conclusion** MSCs can be implanted in rat liver. Cordyceps polysaccharide combined with MSCs transplantation could decrease TIMP-1 expression, enhance MMP-13 expression, significantly promote collagen degradation, and reduce collagen deposition.

Keywords: Cordyceps polysaccharide; Mesenchymal stem cells; Liver cirrhosis

目前研究表明,骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)在一定条件下能分泌多种细胞因子,促进肝细胞增殖及肝脏血管再生^[1]。虫草多糖可保护肝细胞,抗脂质过氧化,从而抑制胶原合成,减轻肝脏胶原沉积,具有良好的抗肝纤维化作用。前期研究我们发现^[2],虫草多糖可体外诱导大鼠 MSCs 分化为肝样细胞。本研究通过建立四氯化碳(CCl_4)肝硬化大鼠模型,将绿色荧光蛋白(GFP)标记的骨髓 MSCs 从尾静脉移植入体内,并联合虫草多糖治疗,观察 MSCs 在肝内的定植情况、肝组织 MMP-13 及 TIMP-1 的变化,探讨 MSCs 移植联合中药干预治疗肝硬化的机制,为中医药与细胞移植相结合治疗肝硬化提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 药物及细胞 虫草多糖,40 %纯度,惠州市东方植物保健科技有限公司; GFP 转染的 SD 大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs):赛业(广州)生物科技有限公司,批号: RASM-X-01101。

1.2 动物 SD 大鼠 49 只,雌性,SPF 级,体质量 180~220 g,广州中医药大学实验动物中心,合格证号: SCXK(粤)2008-0020。

1.3 试剂 四氯化碳(CCl_4),分析纯,浓度 99.5 %,天津市大茂化学试剂厂; DMEM/F12 培养基、胎牛血清(FBS)、PBS 缓冲液,美国 Gibco 公司; 25 %胰蛋

白酶(含 0.02 % EDTA),杭州吉诺生物医药技术公司; 二甲基亚砜(DMSO),美国 Sigma 公司; 青/链霉素双抗,广州翔博生物科技有限公司; 基质金属蛋白酶-13(MMP-13)、基质金属蛋白酶抑制因子-1(TIMP-1)免疫组化试剂盒,武汉博士德生物工程有限公司。

1.4 仪器 医用超净工作台,苏州净化设备有限公司; PM-20 倒置式系统显微镜,日本 OLYMPUS 公司; SC-15 型 CO_2 培养箱,美国力高公司; TDL-5 离心机,上海安亭科学仪器厂; SC-15 数控超级恒温箱,上海天平仪器厂; AEU-210 电子分析天平,日本 SHIMADZU 公司; $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 超低温冰箱,美国 Forma Scientific 公司。

1.5 方法

1.5.1 动物模型复制及给药^[3] 常规方法复苏 GFP 转染的 SD 大鼠 MSCs,用含 10 %FBS 的 DMEM/F12 进行常规培养,采用胰酶消化状态良好的 MSCs,制成单细胞悬液,按 1 : 3 的比例进行传代、扩增、纯化,冻存待用。大鼠适应性喂养 1 周后随机分为 2 组,选择 7 只为正常对照组,其余 42 只以 40 % CCl_4 橄榄油溶液皮下注射制备大鼠肝硬化模型,首次剂量 $3\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,以后剂量 $2\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,每周 2 次,共 12 周。自第 8 周开始每周随机抽取模型组大鼠 2 只,病理组织学观察模型复制的情况。大鼠按体质量随

机分为正常对照组、模型组、虫草多糖组、MSCs 移植组及 MSCs 移植 + 虫草多糖组, 每组 7 只。MSCs 移植组、MSCs 移植 + 虫草多糖组大鼠经尾静脉注入 GFP 标记的 MSCs 1 mL (共计 2×10^6 个); 模型组、虫草多糖组大鼠经尾静脉注入 1 mL 生理盐水, 正常对照组大鼠相同条件下穿刺尾静脉, 未注入任何物质。移植 24 h 后, 正常对照组、模型组、MSCs 移植组大鼠按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给予生理盐水灌胃; 虫草多糖组、MSCs 移植 + 虫草多糖组大鼠按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药体积给予虫草多糖悬浊液灌胃 (1 mL 虫草多糖悬浊液含 40 % 虫草多糖 40 mg); 剂量为 $160 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每天 1 次, 共 4 周。4 周后, 处死全部大鼠, 取材制作肝组织冰冻切片, 荧光显微镜下检测 GFP 标记的移植细胞。

1.5.2 肝组织病理组织学检测 常规制备肝脏石蜡切片, Masson 染色, 光镜下观察肝脏纤维的增生程度。

1.5.3 免疫组化法测定 MMP-13、TIMP-1 表达 末次灌胃后禁食 12 h, 用 10 % 水合氯醛 ($3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) 腹腔注射麻醉后, 迅速取出肝右叶组织, 采用免疫组织化学法检测 MMP-13 及 TIMP-1 表达。参照文献资料^[4], 在高倍镜下 ($\times 400$), 每张切片随机观察 5 个高倍视野, 每个视野计数至少 200 个细胞, 染色结果结合阳性细胞比例及着色深浅进行半定量分析。以细胞膜或胞浆染成黄色至棕褐色为阳性细胞, 无着色为阴性细胞。并根据每张切片阳性细胞比例及着色深浅计分: 阳性细胞 $< 5\%$ 为 0 分; $5\% \sim 10\%$ 为 1 分; $11\% \sim 50\%$ 为 2 分; $> 50\%$ 以上为 3 分。着色程度: 无着色为 0 分 (阴性), 浅黄色为 1 分 (弱阳性), 棕黄色为 2 分 (阳性), 棕褐色为 3 分 (强阳性)。然后根据二者乘积的积分进行统计分析: 0 分阴性; 1 分与 2 分计为 +; 3 分与 4 分计为 ++; 6 分与 9 分计为 +++。

1.6 统计学处理方法 采用 SPSS17.0 统计软件处理, 多个样本比较采用 Kruskal-Wallis 秩和检验, 两样本成组比较采用 Wilcoxon 秩和检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MSCs 的扩增培养 见图 1。刚接种的复苏细胞为悬浮的圆形细胞, 形态均一, 24 h 后观察到部分细胞贴壁, 形态变为不规则。72 h 后, 全部细胞贴壁, 并分裂增殖, 呈集落式生长。培养 5 d, 细胞数

量明显增加, 细胞变为长梭形, 生长活跃, 胞核及核仁清晰, 集落逐渐汇合成片, 培养 7 d 时细胞间相互融合基本铺满瓶底呈旋涡状排列。

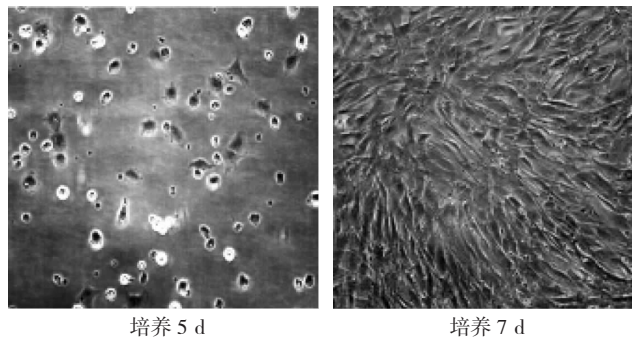


图 1 MSCs 的扩增培养 (绿色滤镜 $\times 10$)

Figure 1 The amplification culture of MSCs (green filter, $\times 10$)

2.2 MSCs 在肝脏中标记结果 见图 2。荧光显微镜下观察呈单个清晰圆形或类圆形绿色光点, 肝组织冰冻切片标记良好, 细胞密度、大小与光镜下所见基本一致。

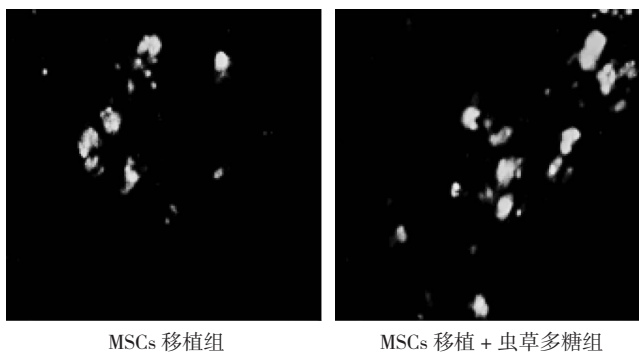


图 2 MSCs 在肝脏中标记结果 (荧光显微镜, $\times 400$)

Figure 2 The marked results of MSCs in liver (fluorescence microscope, $\times 400$)

2.3 肝组织 Masson 染色观察胶原形成情况 见图 3。正常对照组大鼠肝小叶结构完整, 肝索排列整齐; 模型组汇管区胶原大量沉积, 大量胶原纤维自中央静脉及汇管区向周围延伸, 形成假小叶; MSCs 移植组和虫草多糖组有较多胶原沉积, 部分纤维间隔形成, 少量假小叶形成, 而 MSCs 移植 + 虫草多糖组相对于 MSCs 移植组和虫草多糖组, 肝索排列尚整齐, 仅见中央静脉、汇管区少量胶原沉积, 无明显纤维间隔形成, 无假小叶形成。

2.4 MMP-13 免疫组织化学染色结果 见表 1 及图 4。正常对照组大鼠肝组织仅在汇管区血管壁和胆管壁周围的少量间质细胞、肝细胞有 MMP-13 阳性表达; 模型组中 MMP-13 表达增强, 主要见于中央静

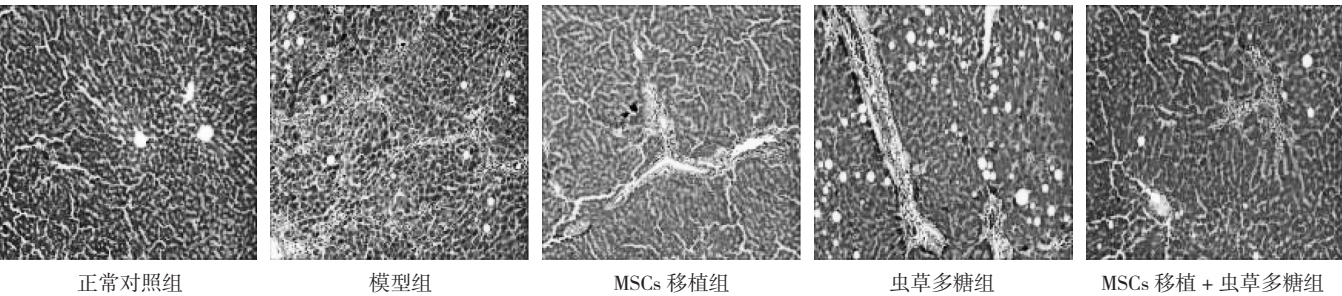


图 3 各组大鼠肝组织 Masson 染色(× 100)

Figure 3 The Masson staining of liver tissue among different groups of rats(× 100)

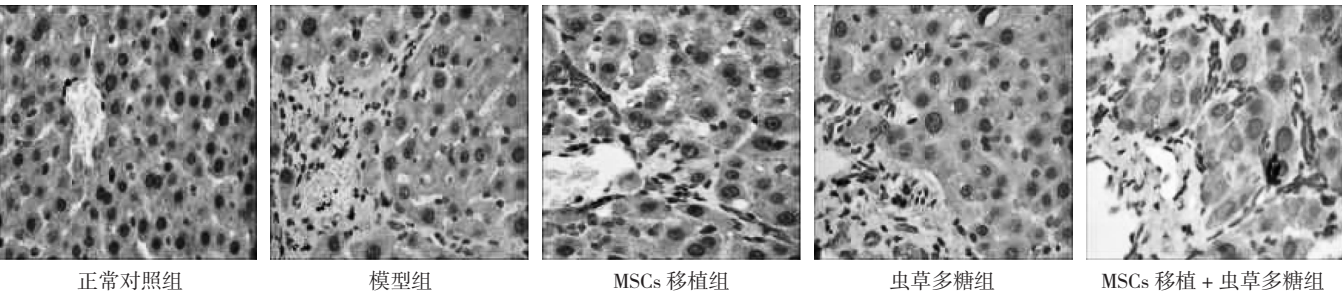


图 4 各组大鼠肝组织 MMP-13 免疫组织化学染色(× 400)

Figure 4 The immunohistochemistry of MMP-13 in liver tissue among different groups of rats(× 400)

表 1 MMP-13 在各组大鼠阳性表达的结果						
Table 1 The expression of MMP-13 among different groups of rats						
组别	n	阳性程度				平均秩次
		-	+	++	+++	
正常对照组	7	5	2	0	0	6.21
模型组	7	1	5	1	1	9.29*
MSCs 移植组	7	0	0	3	3	23.79 ^{△#}
虫草多糖组	7	0	0	3	3	23.69 ^{△#}
MSCs 移植 + 虫草多糖组	7	0	0	1	1	26.93 [△]

注：与正常对照组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，[△] $P < 0.05$ ；与 MSCs 移植 + 虫草多糖组比较，[#] $P < 0.05$ 。

表 2 TIMP-1 在各组大鼠阳性表达的结果(只)						
Table 2 The expression of TIMP-1 among different groups of rats						
组别	n	阳性程度				平均秩次
		-	+	++	+++	
正常对照组	7	5	2	0	0	5.00
模型组	7	0	0	1	6	28.00*
MSCs 移植组	7	0	1	4	2	25.00 ^{△#}
虫草多糖组	7	0	0	3	4	20.71 ^{△#}
MSCs 移植 + 虫草多糖组	7	0	6	1	0	11.29 [△]

注：与正常对照组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，[△] $P < 0.05$ ；与 MSCs 移植 + 虫草多糖组比较，[#] $P < 0.05$ 。

脉周围、汇管区、纤维间隔周围间质细胞胞浆中；与模型组比较，各治疗组 MMP-13 的表达显著升高，差异有统计学意义($P < 0.05$)；MSCs 移植组及虫草多糖组与 MSCs 移植 + 虫草多糖组比较，差异也有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 TIMP-1 免疫组织化学染色结果 见表 2 及图 5。TIMP-1 在正常对照组汇管区的血管壁和胆管壁周围的间质细胞有少量阳性染色。模型组 TIMP-1 阳性染色表达部位和 MMP-13 一致，与正常对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。各治疗组仅见汇管区和

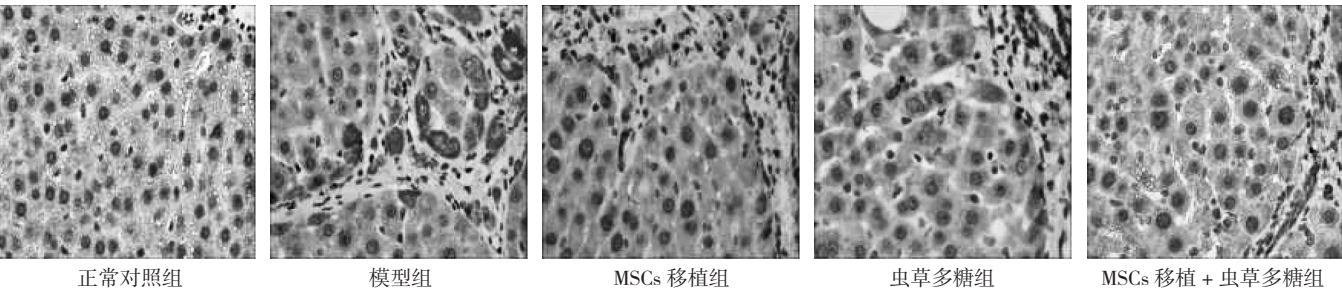


图 5 各组大鼠肝组织 TIMP-1 免疫组织化学染色(× 400)

Figure 5 The immunohistochemistry of TIMP-1 in liver tissue among different groups of rats(× 400)

纤维间隔中有少量较淡的阳性染色,与模型组比较表达明显下降($P < 0.05$),MSCs 移植组和虫草多糖组与 MSCs 移植 + 虫草多糖组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

肝纤维化、肝硬化的实质是大量细胞外基质(ECM)在肝内异常沉积,主要为 I、III 型胶原的沉积,而特异性降解 I、III 型胶原的间质胶原酶在纤维化进展期活性下降是肝纤维化进展、肝硬化形成的主要原因^[5]。基质金属蛋白水解酶(MMPs)是一族参与降解 ECM 主要的蛋白水解酶,包括明胶酶、间质胶原酶、基质溶解素和膜性基质金属蛋白酶 4 类。MMP-13 是大鼠主要的间质性胶原酶,是除中性粒细胞胶原酶外,唯一特异性分解肝脏 I、III 型胶原的 MMPs,与肝纤维化发生发展紧密相关^[6]。组织金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)是 MMPs 的主要特异性抑制物,目前已发现 4 个成员,肝内主要存在 TIMP-1 和 TIMP-2,均主要来源于热休克蛋白(HSC)。它们不但与 MMPs 酶原以 1:1 形式相结合抑制它的活化,而且能灭活活性酶,从而使 MMPs 失去降解功能。通常情况下,组织中 MMPs 和 TIMPs 之间保持着相对平衡状态,但在病理状态下(如肿瘤或肝纤维化时)两者之间的平衡被打破,TIMP-1 及 TIMP-2 的表达逐渐增强,其中 TIMP-1 更为显著,而肝纤维化大鼠 MMP-13 的活性也主要受 TIMP-1 抑制^[7]。

本实验结果表明,MMP-13 及 TIMP-1 在正常对照大鼠肝组织少量表达,模型组 MMP-13 表达虽有增强,但 TIMP-1 表达增强更为显著,二者平衡被破坏。大量 TIMP-1 的出现使 MMP-13 失去活性,致使 ECM 成分降解减少,沉积增多,促进了肝纤维化的发展,形成肝硬化,其结果与文献报道相吻合^[8-10]。MSCs 能通过内皮细胞基底膜并向损伤的靶器官迁移定植^[11]。Neuss 等^[12]研究显示, MSCs 分泌的纤溶酶(组织纤溶酶原激活物、尿激酶型纤溶酶原激活物、尿激酶型纤溶酶原激活物受体、纤溶酶原激活物抑制因子)促使 MSCs 进入纤溶蛋白凝块并将其降解,从而使 MSCs 进入损伤组织并参与组织修复重建。本实验结果表明, MSCs 能够迁移定植于受损肝脏,对肝组织 MMP-13 和 TIMP-1 进行调节,降低 TIMP-1

的表达,同时进一步增强 MMP-13 的表达,上调 MMP-13/TIMP-1,使 ECM 加速分解,进而发挥抗肝硬化作用,而联用虫草多糖则进一步加强这种作用。

参考文献:

- [1] Saulnier N, Lattanzi W, Puglisi MA, et al. Mesenchymal stromal cells multipotency and plasticity: induction toward the hepatic lineage [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2009, 13(1): 71-78.
- [2] 刘江凯, 宋雅芳, 刘友章, 等. 虫草多糖体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为类肝细胞样细胞[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(49): 9221-9225.
- [3] Gandhi CR, Nemoto EM, Watkins SC, et al. An endothelin receptor antagonist TAK-044 ameliorates carbon tetrachloride-induced acute liver injury and portal hypertension in rats[J]. Liver, 1998, 18(1): 39-48.
- [4] Nagel H, Laskawi R, Wahlers A, et al. Expression of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and their tissue inhibitors TIMP-1, -2, and -3 in benign and malignant tumours of the salivary gland [J]. Histopathology, 2004, 44(3): 222-231.
- [5] Watanabe T. Gene expression interstitial collagenase in both progressive and recovery phase of rat liver fibrosis induced by carbon tetrachloride [J]. Journal of Hepatology, 2000, 33: 224-235.
- [6] Endo H, Niioka M, Sugioka Y, et al. Matrix metalloproteinase-13 promotes recovery from experimental liver cirrhosis in rats [J]. Pathobiology. 2011, 78(5): 239-252.
- [7] 朱跃科, 王宝恩, 申凤俊, 等. 肝纤维化过程中胶原、基质金属蛋白酶及其抑制因子表达的动态变化及相互关系[J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(10): 612-615.
- [8] 孙妩弋, 桂双英, 吴丽, 等. 苕芪多苷对肝纤维化大鼠肝脏星状细胞基质金属蛋白酶 13 及组织金属蛋白酶抑制因子 1 表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(11): 1447-1451.
- [9] 李伟, 梁跃东, 曾经章, 等. 谷胱甘肽复方注射液对免疫性肝纤维化大鼠肝组织 MMP-13 及 TIMP-1 表达的影响[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(8): 730-735.
- [10] Vahideh Rabani, Mansoureh Shahsavani, Marzieh Gharavit, et al. Mesenchymal stem cell infusion therapy in a carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model affects matrix metalloproteinase expression[J]. Cell Biology International, 2010, 34: 601-605.
- [11] Ries C, Egea V, Karow M, et al. MMP-2, MT1-MMP and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines[J]. Blood, 2007, 109 (9): 4055-4063.
- [12] Neuss S, Schneider RK, Tietze L, et al. Secretion of fibrinolytic enzymes Facilitates human mesenchymal stem cell invasion into fibrin clots[J]. Cells Tissues Organs, 2010, 191(1): 36-46.

(编辑: 邓响潮)