

# 骨髓间充质干细胞分泌因子抑制急性肝衰竭肝细胞HMGB1的胞浆移位

雷延昌, 梁青, 罗盼, 肖影群

雷延昌, 梁青, 罗盼, 肖影群, 南昌大学附属感染病医院 江西省南昌市 330006

雷延昌, 主任医师, 主要从事病毒性肝炎肝衰竭免疫发病机制的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81160065

江西省科技支撑基金资助项目, No. 2009JX0096

南昌市科技局重点基金资助项目, No. 洪财政[2012]37号社会发展支撑计划-10

作者贡献分布: 课题设计由雷延昌主持; 研究过程由梁青、罗盼、肖影群及雷延昌实施; 论文写作由雷延昌与罗盼完成。

通讯作者: 雷延昌, 主任医师, 330006, 江西省南昌市洪都中大道167号, 南昌大学附属感染病医院。yclaihust@sina.com  
电话: 0791-88499615

收稿日期: 2013-05-26 修回日期: 2013-06-24

接受日期: 2013-07-03 在线出版日期: 2013-07-28

## Mesenchymal stem cell-derived molecules attenuate cytoplasmic translocation of HMGB1 in hepatocytes in a mouse model of acute liver failure

Yan-Chang Lei, Qing Liang, Pan Luo, Ying-Qun Xiao

Yan-Chang Lei, Qing Liang, Pan Luo, Ying-Qun Xiao, Infectious Diseases Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81160065; the Foundation of Jiangxi Science and Technology Department, No. 2009JX0096; and the Foundation of Nanchang Science and Technology Division, No. 2012-37-10

Correspondence to: Yan-Chang Lei, Chief Physician, Infectious Diseases Hospital, Nanchang University, 167 Hongdu Middle Road, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. yclaihust@sina.com

Received: 2013-05-26 Revised: 2013-06-24

Accepted: 2013-07-03 Published online: 2013-07-28

## Abstract

**AIM:** To explore the influence of mesenchymal stem cell-derived molecules (MSC-CM) on cytoplasmic translocation of HMGB1 in hepatocytes in an animal model of acute liver failure.

**METHODS:** D-galactosamine (D-GalN) and lipopolysaccharide (LPS) were used to induce acute liver failure in Balb/c mice. BMSCs were cultured,

purified and passaged to 2-3 generations, and the medium was replaced with DMEM containing 0.05% fetal bovine serum. After further culture for 24 h, the medium containing MSC-CM was obtained. Thirty-six healthy Balb/c mice were randomly divided into two groups: an acute liver failure group (control group) and a MSC-CM treatment group. The Kaplan-Meier method was used for survival analysis. Serum ALT/AST levels were measured at different time points, and liver tissue pathological examination was performed. Serum levels of HMGB1, interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-6 and IL-10 were detected by ELISA. HMGB1 expression and cytoplasmic translocation in hepatocytes were detected by immunohistochemistry.

**RESULTS:** The survival rate was significantly higher in the MSC-CM treatment group than in the control group (89.9% vs 50%,  $P < 0.05$ ). MSC-CM treatment decreased the peak levels of AST/ALT at 24 h compared to the control group ( $P < 0.01$ ). Serum levels of HMGB1 at 6, 12, and 24 h and TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 at 24 h were also decreased in the MSC-CM treatment group (all  $P < 0.01$ ); however, IL-10 level was increased in MSC-CM treatment group ( $P < 0.01$ ). Inflammation or necrosis in liver tissue and cytoplasm translocation of HMGB1 in hepatocytes were decreased in the MSC-CM treatment group compared to the control group (both  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** MSC-CM treatment decreases cytoplasm translocation of HMGB1 in hepatocytes and attenuates liver inflammation and mortality in acute liver failure.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

**Key Words:** Mesenchymal stem cell-derived molecules; High mobility group box 1; Cytoplasm translocation; Acute liver failure

Lei YC, Liang Q, Luo P, Xiao YQ. Mesenchymal stem cell-derived molecules attenuate cytoplasmic translocation of HMGB1 in hepatocytes in a mouse

## ■背景资料

髓间充质干细胞分泌因子(mesenchymal stem cell-derived molecules, MSC-CM)可以逆转小鼠急性肝功能衰竭, 后期炎症因子高迁移率族蛋白B1(high mobility group box 1, HMGB1)及其肝细胞内移位, 在急性肝衰竭的发生中有重要作用。然而, MSC-CM治疗急性肝衰竭的机制尚不十分清楚。

## ■同行评议者

刘亮明, 副教授, 副主任医师, 上海交通大学附属第一人民医院松江分院肝病科

## ■ 研发前沿

相关研究表明, MSC-CM下调肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、白介素-1 $\beta$ (interleukin, I-L-1 $\beta$ )、IL-6和上调抗炎因子IL-10等抑制过激的炎症反应, MSC-CM是否影响肝细胞HMGB1的胞浆移位, 值得进一步探讨。

model of acute liver failure. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2013; 21(21): 2009-2015 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2009.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i21.2009>

## 摘要

**目的:** 骨髓间充质干细胞分泌的因子(mesenchymal stem cell-derived molecules, MSC-CM)对急性肝衰竭小鼠高迁移率族蛋白B1(high mobility group box 1, HMGB1)肝细胞胞浆移位和释放的影响。

**方法:** D-氨基半乳糖(D-galactosamine, D-GaIN)和脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)诱导建立Balb/c小鼠急性肝衰竭模型; 贴壁筛选法培养纯化小鼠BMSCs, 传至第2-3代更换0.05%胎牛血清培养液24 h获得MSC-CM。36只健康Balb/c小鼠随机均分为肝衰竭对照组和MSC-CM治疗组。Kaplan-meier法进行生存分析, 生化检测1 wk内不同时间点各实验组丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)/谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST), 24 h取肝脏进行肝脏病理检测。ELISA检测血清HMGB1、白介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、IL-6和IL-10水平, 免疫组织化学分析HMGB1的肝细胞表达和胞浆移位。

**结果:** MSC-CM治疗组1 wk生存率为88.9%, 显著高于对照组的16.7%( $P<0.05$ ), MSC-CM治疗组24 h的ALT/AST峰值显著低于对照组( $P<0.01$ )。MSC-CM治疗组在6、12和24 h HMGB1水平以及24 h的TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6水平显著低于肝衰竭对照组( $P<0.01$ ), 而抗炎因子IL-10显著高于对照组( $P<0.01$ )。MSC-CM治疗组肝脏炎症坏死和肝细胞HMGB1胞浆移位较对照组明显减轻。

**结论:** MSC-CM治疗抑制急性肝衰竭肝细胞HMGB1胞浆移位和释放, 减轻肝脏炎症反应, 降低死亡率。

© 2013年版权归Baishideng所有。

**关键词:** 骨髓间充质干细胞分泌因子; 高迁移率族蛋白B-1; 胞浆移位; 急性肝衰竭

**核心提示:** 本研究发现, 骨髓间充质干细胞分泌因子(mesenchymal stem cell-derived molecules)治疗抑制急性肝衰竭肝细胞高迁移率族蛋白B-1(high mobility group box 1)胞浆移位和释放, 减轻肝脏炎症反应, 降低死亡率。进一步阐明骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem

cells)治疗急性肝衰竭的分子机制, 具有重要的基础和临床应用价值。

雷延昌, 梁青, 罗盼, 肖影群. 骨髓间充质干细胞分泌因子抑制急性肝衰竭肝细胞HMGB1的胞浆移位. 世界华人消化杂志 2013; 21(21): 2009-2015 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2009.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i21.2009>

## 0 引言

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)具有高度自我更新和多向分化潜能, 已经用于多种组织器官损伤的修复。急性肝衰竭是各种诱因导致肝细胞短期大量坏死, 出现肝功能严重受损和多脏器功能衰竭的临床综合症, 病情凶险, 目前的人工肝和抗病毒护肝综合内科治疗有效降低病死率, 其死亡率仍高达60%以上, 严重患者除非实施紧急肝移植无其他特效治疗措施。因肝移植难以普遍开展, BMSCs给急性肝衰竭治疗开辟新的思路。研究显示, BMSCs能在特定环境下分化为类肝细胞样细胞<sup>[1-3]</sup>, 并能够抑制肝脏炎症反应和促进受损肝细胞再生降低肝衰竭动物死亡率<sup>[4,5]</sup>。后来又发现BMSCs分泌的因子(mesenchymal stem cell-derived molecules, MSC-CM)可减轻肝衰竭动物肝细胞坏死, 促进肝细胞再生, 从而提高动物生存率<sup>[6,7]</sup>, 其作用机制目前知之较少。高迁移率族蛋白B-1(high mobility group box 1, HMGB1)是一种非组蛋白核内结构蛋白, 因比其他促炎因子出现相对较晚、持续时间长, 因此被称为晚期炎症介质<sup>[8]</sup>。临床和实验研究表明肝衰竭时HMGB1水平显著升高, 参与急性肝衰竭的炎症反应综合症病理生理过程<sup>[9-11]</sup>。最近的研究发现, 脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)刺激肝细胞HMGB1从胞核转移至胞浆, 发生HMGB1的胞浆内移位, 肝衰竭患者和D-GaIN/LPS动物模型同样发生HMGB1的肝细胞内移位<sup>[12]</sup>。我们前期的研究发现BMSCs移植降低肝衰竭动物模型血清HMGB1水平, 提高生存率<sup>[13]</sup>, 其作用机制尚不明。本研究探讨MSC-CM治疗对急性肝衰竭肝细胞HMGB1胞浆移位的影响, 进一步了解BMSCs对急性肝衰竭HMGB1释放和参与的炎症反应的机制, 为BMSCs对抗肝衰竭炎症反应提供新的理论依据。

## 1 材料和方法

1.1 材料 2-3周龄Balb/c小鼠, 体质量10 g $\pm$ 2 g(清

洁级)用于MSCs提取和培养上清MSC-CM获取。6-8周龄♂ Balb/c小鼠, 体重 $20 \pm 2$  g, 用于D-GaIN/LPS诱导急性肝衰竭模型。上述动物由南昌大学医学院动物科学部提供, 动物饲养和处理严格按照美国国立卫生研究院实验动物饲养和使用指南。主要试剂及仪器: 胎牛血清、胰蛋白酶(GIBCO公司, 美国), DMEM低糖培养基(Hyclone公司, 美国), 细菌脂多糖(Sigma公司, 美国), D-氨基半乳糖(Solarbio公司, 中国), HMGB1兔抗鼠单抗(ABGENT公司, 美国), HMGB1和白介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、IL-6和IL-10试剂盒(NEB公司, 美国)。

## 1.2 方法

1.2.1 MSCs提取纯化和MSC-CM获取: 拉颈处死2-3周龄♂ Balb/c小鼠, 放入750 mL/L的乙醇中浸泡, 消毒5-10 min。无菌条件下取双股骨和胫骨, 用生理盐水冲洗, 剔除骨表面的组织, 用手术剪从股骨或胫骨的中间剪断, 暴露骨髓腔, DMEM培养基冲洗骨髓腔和骨髓端。吸管将骨髓组织吹打成细胞悬液, 离心 $1000 \text{ r/min} \times 10 \text{ min}$ , 去上清, 用10%胎牛血清DMEM培养液重悬细胞接种于 $25 \text{ cm}^2$ 塑料培养瓶中。48 h全量更换培养液, 弃去悬浮细胞, 倒置显微镜下观察细胞生长状态。贴壁法培养法获得MSCs, 每2-3 d换液1次, 直至长至80%-90%融合时, 用0.25%胰酶消化1:2传代。取第二或三代MSCs弃去完全培养基, 无血清培养基洗涤3次, 更换为含有0.05%胎牛血清培养液培养24 h, 上清为MSC-CM用于本研究。

1.2.2 小鼠MSCs的鉴定: 细胞盖玻片风干后用4%多聚甲醛固定细胞15 min, 0.01 mol/L PBS液洗3遍, 每次5 min; 风干后滴加1%BSA封闭抗原, 于37℃下孵育30 min; 滴加CD34/CD29抗体(1:200), 37℃下孵育1.5 h后用0.01 mol/L PBS液洗3遍, 每次5 min; 滴加FITC标记的山羊抗兔IgG(1:400), 37℃下避光孵育40 min后用0.01 mol/L PBS液洗3遍, 每次5 min。用50%甘油缓冲液封片, 置于荧光显微镜下观察。

1.2.3 动物模型及分组: 将36只6-8周龄♂ Balb/c小鼠, 体重 $20 \pm 2$  g, 常规喂养2 d, 实验前禁食12 h, 不禁水。将动物随机分为2组: 急性肝衰竭组(对照组,  $n = 18$ )给予600 mg/kg D-氨基半乳糖和40  $\mu\text{g/kg}$ 细菌脂多糖, 0.9%氯化钠稀释至0.2 mL腹腔注射。MSC-CM治疗组( $n = 18$ )在腹腔注射D-GaIN/LPS前后1 h分别尾静脉注射来源于 $1 \times 10^7$ 个细胞的24 h培养上清1 mL, 对照组在相

应时间点尾静脉注射等量生理盐水。

1.2.4 标本收集: 二组分别于腹腔注射D-GaIN/LPS后12、24、48 h至1 wk眼眶采血分离血清置于-80℃保存。24 h处死, 肝组织用40 g/L的甲醛固定, 进行HE染色和免疫组织化学检测。

1.2.5 血清生化和细胞因子检测: 全自动生化分析仪检测丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)。血清HMGB1和细胞因子检测按照生产厂家说明书进行, 根据标准曲线计算结果。

1.2.6 免疫组织化学: 肝组织切片常规脱蜡, 3%过氧化氢室温孵育10 min, 清除内源性过氧化氢酶, PBS洗3次, 3 min/次。10%山羊血清封闭30 min, PBS稀释一抗(HMGB1, 1:100), 甩掉封闭液, 每片滴加100  $\mu\text{L}$ 一抗, 4℃过夜, PBS洗3次, 滴加羊抗兔辣根过氧化物酶标记二抗室温孵育20 min, PBS振洗后滴加DAB显色剂充分显色, 自来水洗终止反应, 苏木素复染细胞核, 再脱水、透明、晾干中性树胶封片。

统计学处理 所有数据用SPSS18.0软件作统计学分析, 数据资料以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, SPSS18.0绘制生存曲线, 生存率比较采用Log-rank检验, 两组样本均数的比较应用 $t$ 检验, 两个样本率的比较采用 $\chi^2$ 检验,  $P < 0.05$ 为统计学显著性差异。

## 2 结果

2.1 MSC-CM治疗提高D-GaIN/LPS肝衰竭小鼠生存率和降低血清ALT/AST水平 D-GaIN/LPS腹腔注射肝衰竭小鼠1 wk生存率为50%, 死亡集中发生在腹腔注射后12-24 h之间, 而MSC-CM治疗组小鼠1 wk生存率为88.9%。Kaplan-Meier法对小鼠生存率分析, Log-rank检验结果显示, MSC-CM治疗组生存率显著高于肝衰竭对照组( $P < 0.05$ , 图1A)。肝衰竭小鼠血清ALT/AST水平在12 h开始升高, 24 h达高峰, 48 h开始下降, 并逐渐恢复正常, MSC-CM治疗组血清ALT/AST水平在12 h和24 h较对照组降低, 其中24 h水平有显著性差异( $P < 0.01$ , 图1B, C)。

2.2 MSC-CM治疗对肝衰竭小鼠血清HMGB1、炎症因子和抗炎因子水平的影响 近年来发现HMGB1在急性肝衰竭炎症反应中十分重要, 研究者前期发现BMSC移植降低肝衰竭小鼠HMGB1水平, 提高生存率。ELISA检测不同时间点血清HMGB1水平发现, D-GaIN/LPS诱导肝衰竭Balb/c小鼠血清HMGB1在6 h已开始升

### ■ 相关报道

近来发现, MSC-CM与骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)同样可以逆转急性肝衰竭, 作者前期的研究发现BMSCs抑制急性肝衰竭HMGB1水平, 减轻肝脏炎症反应, 其作用机制待进一步研究。



## ■创新盘点

MSC-CM抑制急性肝衰竭炎症反应的机制众多,本文从MSC-CM能抑制HMGB1水平入手,探讨MSC-CM对急性肝衰竭小鼠肝细胞HMGB1胞浆移位的作用进行研究,为BMSCs治疗急性肝衰竭提供新的理论基础。

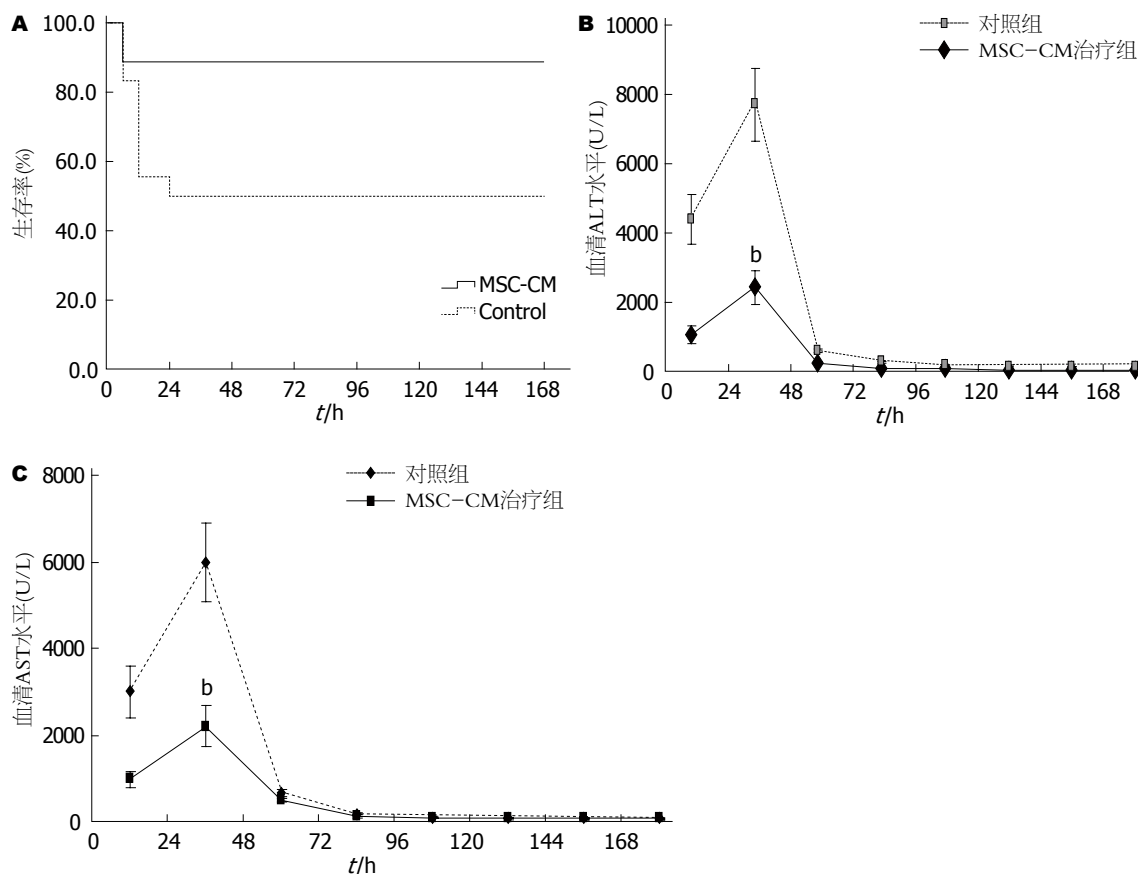


图1 MSC-CM治疗提高D-GalN/LPS肝衰竭小鼠生存率和降低血清ALT/AST水平。A: Kaplan-Meier生存分析小鼠生存率,  $^bP = 0.016$  (Log-rank test,  $F = 5.631$ ); B, C: MSC-CM治疗组和急性肝衰竭对照组血清ALT和AST在12、24、48、73、96、120、144和168 h的水平,  $^bP < 0.01$  vs 对照组。ALT: 丙氨酸转氨酶; AST: 谷草转氨酶; MSC-CM: 骨髓间充质干细胞分泌的因子。

高, 12 h达高峰, 24 h开始下降, 48 h接近正常水平。为了解MSC-CM治疗对肝衰竭HMGB1的影响, 比较6、12和24 h血清HMGB1水平, 结果显示MSC-CM治疗组在上述3个时间点HMGB1水平显著低于肝衰竭对照组( $P < 0.01$ ) (图2A)。为了解MSC-CM治疗对急性肝衰竭炎症因子的影响, ELISA检测血清不同时间点炎症性细胞因子和抗炎因子水平的结果显示, MSC-CM治疗组TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6水平显著低于肝衰竭对照组( $P < 0.01$ ) (图2B), 而抗炎因子IL-10显著高于对照组( $P < 0.01$ ) (图2B)。

**2.3 MSC-CM治疗减轻肝衰竭小鼠肝组织炎症坏死和肝细胞HMGB1胞浆移位** 肝衰竭对照组有大量肝细胞片状坏死, 肝索断裂, 坏死区域大量炎细胞浸润, HMGB1不仅在胞核表达, 大量肝细胞胞浆有明显表达(图3A, C)。MSC-CM治疗组肝小叶结构基本完整, 局灶性炎细胞浸润, HMGB1胞浆表达肝细胞较少(图3B, D)。图像分析对照组HMGB1肝细胞移位率显著高于MSC-CM治疗组( $P < 0.01$ , 图3E)。

## 3 讨论

本研究应用♂ Balb/c小鼠腹腔注射D-GalN/LPS建立急性肝衰竭模型, 小鼠1 wk生存率为50%, 动物死亡发生在给药后12-24 h, 与作者之前的研究一致<sup>[13]</sup>。MSC-CM治疗组小鼠1 wk生存率为88.9%显著高于肝衰竭对照组。检测外周血ALT/AST水平可反映肝脏损伤程度, 肝衰竭小鼠血清ALT/AST水平在12 h开始升高, 24 h达高峰, 48 h开始下降并逐渐恢复正常。与国外的研究一致<sup>[6,7]</sup>, MSC-CM治疗组血清ALT/AST水平24 h峰值较对照组显著降低, 表明MSC-CM治疗减轻肝细胞损伤, 对肝衰竭保护作用与BMSCs相似。

肝衰竭大面积肝组织损伤引起局部甚至全身炎症反应综合征, 最终导致多器官功能衰竭。近年来发现HMGB1在急性肝衰竭炎症反应中十分重要, 研究者前期发现BMSC移植降低肝衰竭小鼠HMGB1水平, 提高生存率。肝衰竭小鼠血清HMGB1在6 h已开始升高, 12 h达高峰, 24 h开始下降, MSC-CM治疗组在6、12和24 h 3个时间点HMGB1水平显著低于对照组。与之相一致, MSC-CM治疗组血清TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6水平显著低于肝衰竭对照组, 而抗炎因子IL-10显著

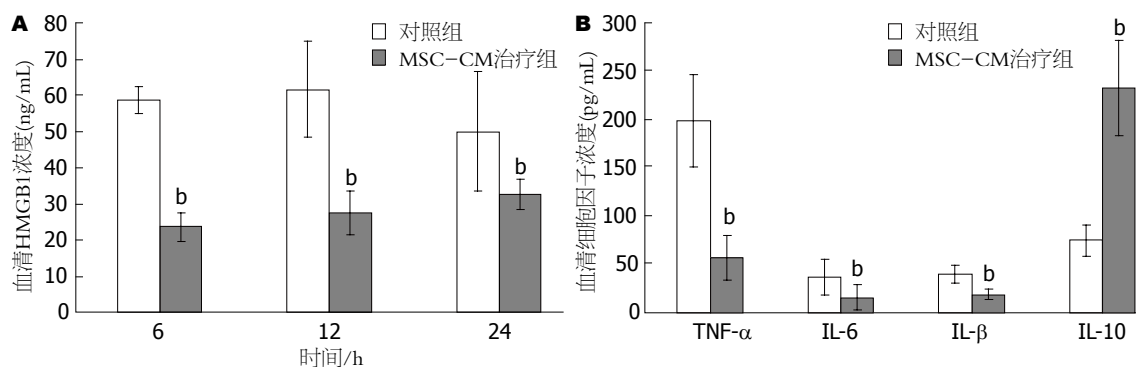


图2 MSC-CM治疗对肝衰竭小鼠血清炎症因子水平的影响( $n=18$ ). A: MSC-CM治疗组和对照组血清6、12和24 h血清HMGB1水平有显著性差异,  $^bP<0.01$  vs 对照组; B: MSC-CM治疗组和对照组血清24 h TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6和IL-10水平有显著性差异,  $^bP<0.01$  vs 对照组. IL: 白介素; TNF: 肿瘤坏死因子; MSC-CM: 骨髓间充质干细胞分泌的因子; HMGB1: 高迁移率族蛋白B-1.

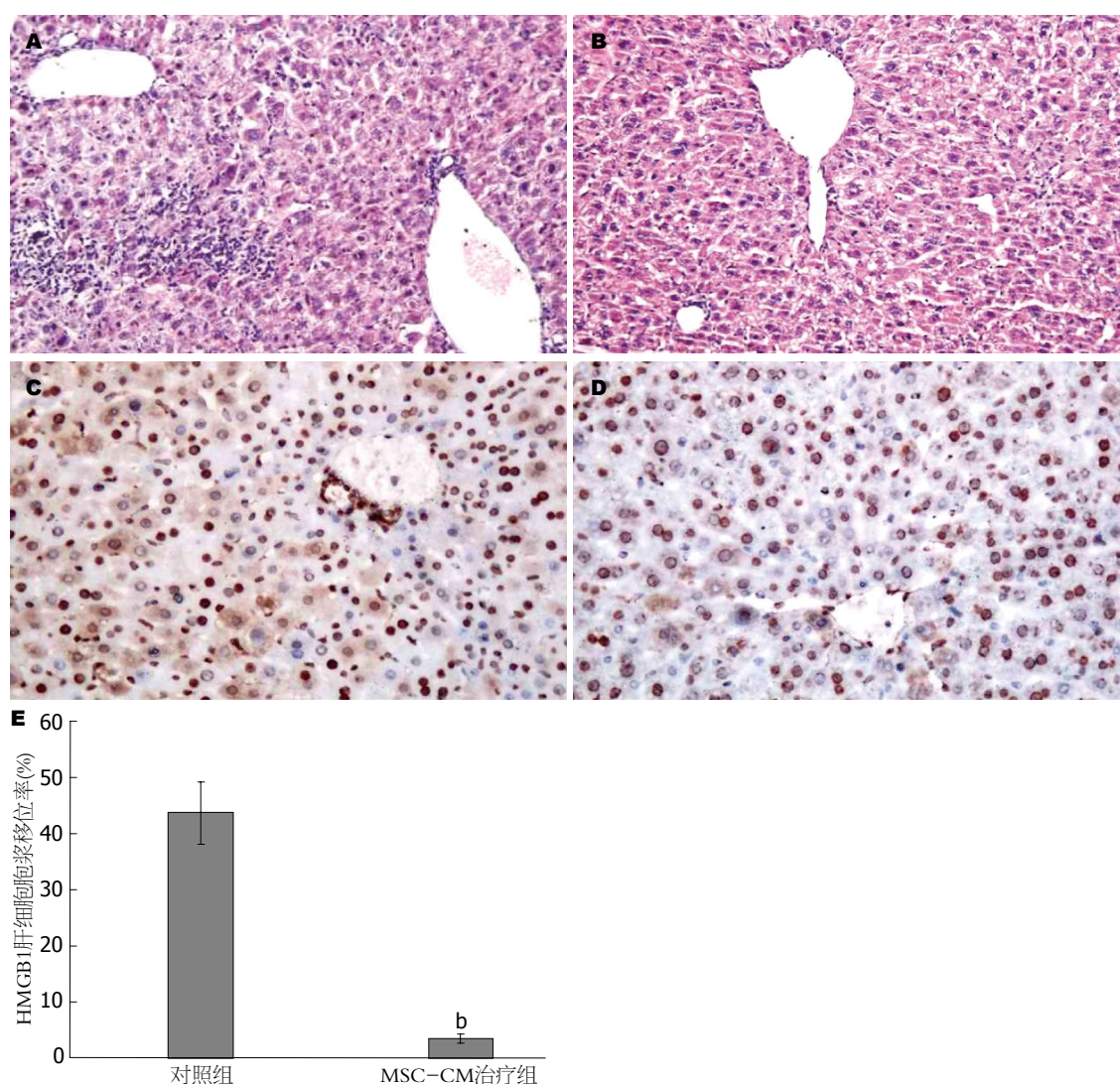


图3 MSC-CM减轻肝衰竭小鼠肝组织炎症坏死和肝细胞HMGB1胞浆移位. A: 肝衰竭对照组小鼠肝细胞片状坏死, 肝索断裂, 坏死区大量炎细胞浸润( $\times 100$ ); B: MSC-CM治疗组肝小叶结构基本完整, 局灶性炎细胞浸润( $\times 100$ ); C: 肝衰竭对照组 HMGB1不仅在胞核表达, 大量肝细胞胞浆有明显表达( $\times 100$ ); D: MSC-CM治疗组HMGB1胞浆表达的肝细胞较少( $\times 100$ ); E: MSC-CM治疗组和对照组HMGB1肝细胞移位率的比较,  $\chi^2=12.81$ ,  $^bP<0.01$ . MSC-CM: 骨髓间充质干细胞分泌的因子; HMGB1: 高迁移率族蛋白B-1.

高于对照组. 此外, MSC-CM治疗组肝脏炎症坏死程度较对照组明显减轻. 提示MSC-CM治疗

增加抗炎因子IL-10水平, 降低HMGB1和多种炎症因子水平减轻肝脏炎症坏死.

## ■同行评价

本文具有一定的基础和临床应用价值。

目前认为,内毒素血症和巨噬细胞活化释放的HMGB1和TNF- $\alpha$ 等炎症因子在急性肝衰竭发病中具有重要作用。急性肝衰竭枯否细胞对内毒素灭活能力降低,内毒素血症发生率可高达90%-100%。研究显示,急性肝衰竭Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)在各种免疫细胞表达增加<sup>[14]</sup>。内毒素,主要是革兰氏阴性菌的LPS,与TLR4结合,通过活化核转录因子NF- $\kappa$ B,刺激大量炎症因子释放,导致继发性全身性炎症反应综合症,导致肝衰竭发生发展<sup>[15,16]</sup>。HMGB1被证明为是一个炎症因子<sup>[17,18]</sup>,既可以通过活化的单核细胞/巨噬细胞,中心粒细胞和内皮细胞主动释放,也可以通过坏死的细胞被动释放<sup>[19,20]</sup>。HMGB1可以直接促进炎症因子的释放(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6和IL-8等)和外周血单核细胞释放趋化因子<sup>[20-22]</sup>,募集更多炎症细胞放大炎症反应,加重肝组织损伤。动物模型和临床研究显示, HMGB1与急性肝衰竭发生和疾病的严重程度密切相关<sup>[23,24]</sup>。在本研究中, MSC-CM治疗降低HMGB1和炎症因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6)水平,有效抑制炎症反应和肝组织损伤,表现为血清ALT/AST水平下降、肝脏炎症坏死减轻和生存率提高。

研究证明, MSCs治疗下调肾脏和肺缺血再灌注损伤局部炎症因子和上调抗炎因子IL-10水平对抗组织炎症坏死<sup>[25,26]</sup>。最近的结果显示, MSCs分泌的因子上调IL-10水平逆转急性肾损伤<sup>[27]</sup>。表明, MSC-CM有可能通过上调IL-10水平对抗急性肝衰竭肝脏炎症反应,发挥治疗效应。本研究显示, MSC-CM同时具有上调抗炎因子IL-10水平和下调包括HMGB1在内的促炎因子水平,可能是MSC-CM治疗急性肝衰竭的机制之一。

最近研究显示<sup>[12]</sup>, LPS刺激肝细胞HMGB1从胞核转移至胞浆,发生HMGB1的细胞内移位并主动释放HMGB1,但与肝细胞坏死被动释放有显著差别,该过程并不依赖肝细胞坏死。与之相一致,肝衰竭患者和D-GaIN/LPS急性肝衰竭模型都存在HMGB1的肝细胞胞浆移位。我们前期的研究发现BMSCs移植降低肝衰竭动物模型血清HMGB1水平,提高生存率<sup>[13]</sup>。本研究发现, MSC-CM治疗减轻急性肝衰竭肝组织炎症坏死,同时伴有HMGB1的胞浆移位减少,从而降低肝细胞释放HMGB1。在正常情况下,虽然肝细胞不是释放HMGB1的主要细胞,但由于肝细胞数量巨大,在急性肝损伤情况下, LPS等刺激肝细

胞HMGB1移位和主动释放,进一步加重肝损伤。MSC-CM治疗降低肝细胞HMGB1胞浆移位可达到及早对抗急性肝衰竭炎症反应和疾病进展。

总之, MSC-CM治疗与BMSCs移植同样可以降低急性肝衰竭HMGB1和TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6等炎症因子水平,减轻肝脏炎症坏死,提高生存率。抑制急性肝衰竭肝细胞HMGB1的胞浆移位减少HMGB1释放,可能是MSC-CM治疗急性肝衰竭的机制之一。上述结果为BMSCs抗肝衰竭炎症反应治疗提供了新的理论基础,具有重要的理论和应用价值。

## 4 参考文献

- 1 Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-1302 [PMID: 12021244]
- 2 Mohamadnejad M, Namiri M, Bagheri M, Hashemi SM, Ghanaati H, Zare Mehrjardi N, Kazemi Ashtiani S, Malekzadeh R, Baharvand H. Phase 1 human trial of autologous bone marrow-hematopoietic stem cell transplantation in patients with decompensated cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3359-3363 [PMID: 17659676]
- 3 Anzalone R, Lo Iacono M, Corrao S, Magno F, Loria T, Cappello F, Zummo G, Farina F, La Rocca G. New emerging potentials for human Wharton's jelly mesenchymal stem cells: immunological features and hepatocyte-like differentiative capacity. *Stem Cells Dev* 2010; 19: 423-438 [PMID: 19958166 DOI: 10.1089/scd.2009.0299]
- 4 Kuo TK, Hung SP, Chuang CH, Chen CT, Shih YR, Fang SC, Yang VW, Lee OK. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells. *Gastroenterology* 2008; 134: 2111-2121, 2111-2121 [PMID: 18455168]
- 5 Campard D, Lysy PA, Najimi M, Sokal EM. Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells. *Gastroenterology* 2008; 134: 833-848 [PMID: 18243183 DOI: 10.1053/j.gastro.2007.12.024]
- 6 van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, Berthiaume F, Nahmias Y, Tilles AW, Yarmush ML. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology* 2008; 47: 1634-1643 [PMID: 18395843 DOI: 10.1002/hep.22236]
- 7 Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW, Yarmush ML. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One* 2007; 2: e941 [PMID: 17895982 DOI: 10.1371/journal.pone.0000941]
- 8 Erlandsson Harris H, Andersson U. Mini-review: The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator. *Eur J Immunol* 2004; 34: 1503-1512 [PMID: 15162419 DOI: 10.1002/eji.200424916]
- 9 Zhou RR, Liu HB, Peng JP, Huang Y, Li N, Xiao MF, Wang H, Fan XG. High mobility group box chromosomal protein 1 in acute-on-chronic liver



- failure patients and mice with ConA-induced acute liver injury. *Exp Mol Pathol* 2012; 93: 213-219 [PMID: 22609241 DOI: 10.1016/j.yexmp.2012.05.006]
- 10 刘洪波, 范学工, 黄建军, 李宁, 彭建萍, 李沙陵. 乙型肝炎患者血清高迁移率族蛋白1含量的检测及临床意义. *中华肝脏病杂志* 2007; 11: 812-815
- 11 刘婷, 贺永文. 高迁移率族蛋白B1在急性肝功能衰竭小鼠中的表达变化. *中华传染病杂志* 2010; 28: 209-213
- 12 Zhou RR, Zhao SS, Zou MX, Zhang P, Zhang BX, Dai XH, Li N, Liu HB, Wang H, Fan XG. HMGB1 cytoplasmic translocation in patients with acute liver failure. *BMC Gastroenterol* 2011; 11: 21 [PMID: 21406085 DOI: 10.1186/1471-230X-11-21]
- 13 易珍, 孙水林, 刘翠云, 雷延昌. 同种异体骨髓间充质干细胞对急性肝衰竭HMGB1的影响. *世界华人消化杂志* 2012; 20: 1396-1401
- 14 陈煜, 时红波, 张帆, 丁美, 赵军, 刘旭华, 段钟平. TLR2、TLR4和TLR9在慢性重型肝炎患者及肝衰竭大鼠中的表达. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1320-1325
- 15 段美丽, 王彦军, 韩德五. 急性肝功能衰竭时肠黏膜屏障损伤的研究. *中国病理生理杂志* 1999; 15: 906-908
- 16 Rolando N, Wade J, Davalos M, Wendon J, Philpott-Howard J, Williams R. The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. *Hepatology* 2000; 32: 734-739 [PMID: 11003617 DOI: 10.1053/jhep.2000.17687]
- 17 Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, Yang H, Li J, Tracey KJ, Geller DA, Billiar TR. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Med* 2005; 201: 1135-1143 [PMID: 15795240 DOI: 10.1084/jem.20042614]
- 18 Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999; 285: 248-251 [PMID: 10398600 DOI: 10.1126/science.285.5425.248]
- 19 Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002; 418: 191-195 [PMID: 12110890 DOI: 10.1038/nature00858]
- 20 Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, Porto A, Bachi A, Rubartelli A, Agresti A, Bianchi ME. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J* 2003; 22: 5551-5560 [PMID: 14532127 DOI: 10.1093/emboj/cdg516]
- 21 Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, Janson A, Kokkola R, Zhang M, Yang H, Tracey KJ. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med* 2000; 192: 565-570 [PMID: 10952726 DOI: 10.1084/jem.192.4.565]
- 22 Raucci A, Palumbo R, Bianchi ME. HMGB1: a signal of necrosis. *Autoimmunity* 2007; 40: 285-289 [PMID: 17516211 DOI: 10.1080/08916930701356978]
- 23 赵中夫, 韩德五, 张芸, 王锋, 刘明社. 高迁移率族蛋白-1在实验性急性肝衰竭中的作用. *中华肝脏病杂志* 2006; 14: 388-389
- 24 彭建平, 范学工, 刘洪波. 慢性乙型肝炎患者高迁移率族蛋白-1 mRNA的表达及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 167-172
- 25 Tögel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C, Westenfelder C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: F31-F42 [PMID: 15713913 DOI: 10.1152/ajprenal.00007.2005]
- 26 Ortiz LA, Dutreil M, Fattman C, Pandey AC, Torres G, Go K, Phinney DG. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 11002-11007 [PMID: 17569781 DOI: 10.1073/pnas.0704421104]
- 27 Milwid JM, Ichimura T, Li M, Jiao Y, Lee J, Yarmush JS, Parekkadan B, Tilles AW, Bonventre JV, Yarmush ML. Secreted factors from bone marrow stromal cells upregulate IL-10 and reverse acute kidney injury. *Stem Cells Int* 2012; 2012: 392050 [PMID: 23319959]

编辑 田滢 电编 鲁亚静

