

间充质干细胞移植后抑制肝星状细胞活化减轻肝纤维化

施启鹏,郭圆圆,周 晗,蔡 洁,陈 念,李 军,章莉莉*

(南京医科大学第一附属医院感染病科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)移植后对肝纤维化及肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)活化的抑制作用。方法:Ficoll-Hypaque 梯度密度离心法及细胞贴壁培养法分离纯化 4 周龄 SD 大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BM-MS C)。取 18 只 SD 大鼠,通过腹腔小剂量注射四氯化碳(CCl₄)8 周,进行肝纤维化造模,在造模 4 周时,取其中 9 只作为治疗组,每周经尾静脉移植给予该组每只大鼠 6×10⁶ 个 MSC;另外 9 只作为模型对照组,经尾静脉给予不含 MSCs 的等量生理盐水;另取 9 只大鼠,作为正常对照组,仅给予尾静脉等量生理盐水注射,持续 4 周。自实验开始,每周用全自动生化分析仪测定血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBIL)、白蛋白(ALB)水平,至结束共测定 8 次。实验终点时通过免疫组化对 α 平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)、转化生长因子 β1(transforming growth factor β1, TGF-β1)和 I 型胶原蛋白(collagen I, COL I)在肝组织中的定位和表达进行研究;原位灌注和梯度密度离心法分离 HSC,326 nm 紫外光激发和 α-SMA 免疫荧光染色法鉴定 HSC;qRT-PCR 和 Western blot 检测 HSC 中 α-SMA、TGF-β1 基因和蛋白的表达水平。结果:与模型组相比,治疗组经 MSC 移植后,血清 ALT、AST、TBIL 水平,肝组织纤维化和炎症程度,肝组织 α-SMA、TGF-β1 和 COL I 表达水平,HSC 中 α-SMA、TGF-β1 基因和蛋白表达水平均明显降低。结论:肝纤维化 SD 大鼠经 BM-MS C 尾静脉移植治疗后肝功能显著改善,肝纤维化程度减轻,可能与抑制 HSC 活化有关。

[关键词] 骨髓间充质干细胞;肝纤维化;肝星状细胞;α 平滑肌肌动蛋白;转化生长因子 β1;I 型胶原

[中图分类号] R575.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)07-981-07

doi:10.7655/NYDXBNS20150716

Autologous mesenchymal stem cells transplantation protect experimental liver fibrosis rats from inhibition of hepatic stellate cell activation

Shi Qipeng, Guo Yuanyuan, Zhou Han, Cai Jie, Chen Nian, Li Jun, Zhang Lili*

(Department of Infectious Disease, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effects of mesenchymal stem cells (MSC) on hepatic fibrosis and activation degree of hepatic stellate cells (HSC) after transplantation. **Methods:** Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation and adherent culture were performed to separate and purify bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MS Cs) from 4 months old SD rats. Liver fibrosis model of SD rats was induced by long-term intraperitoneal injection of low-dose of CCl₄ for 8 weeks. A total of 18 rats were performed to make model, since 4 weeks after the modeling process, 9 of them were taken out to receive treatment of 6×10⁶ MSCs for 4 weeks by tail vein injection, the remains were injected the same volume of saline without MSCs. The normal control group containing 9 rats were only given the same volume of saline injection for 4 weeks. ALT, AST, TBIL, and ALB levels of serum were determined by automatic biochemical analyzer every week from the start to the end of research in a total of 8. The localization and expression of alpha-smooth muscle actin (α-SMA), transforming growth factor beta 1 (TGF-β1), and collagen type I (COL-I) in liver tissues were analyzed by the immunohistochemical method. Density gradient centrifugation after *situ* perfusion and 326 nm of ultraviolet excitation together with α-SMA immunofluorescence staining were performed to isolate and identify HSC, respectively. The mRNA and protein expression levels of α-SMA and TGF-β1 in HSC were detected by qRT-PCR and Western blot, respectively. All above experiments were done at the end of the experiment at 8 weeks. **Results:** Compared with the model group, ALT, AST, and TBIL levels of serum; fibrosis and inflammation degree; α-SMA, TGF-β1, and COL I expression levels in liver; the mRNA and protein expression levels of α-SMA and TGF-β1 in HSC were significantly reduced in the treatment group after MSCs transplantation. **Conclusion:** Liver fibrosis degree and

[基金项目] 南京市科技局项目(201402003);江苏省医学创新团队与领军人才资助项目(LJ201121)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:lilyzh@njmu.edu.cn

liver function of SD rat were significantly reduced and improved after BM-MSc transplantation, respectively, which may be related to its inhibition of the activation level of HSC.

[Key words] MSC;liver fibrosis;HSC; α -SMA;TGF- β 1;COL I

[Acta Univ Med Nanjing,2015,35(07):981-987]

肝纤维化是慢性肝损伤引起的肝实质内细胞外基质成分的过度沉积,病毒感染、免疫失调、胆汁淤积、毒性物质和代谢紊乱等因素均可引起肝脏炎症导致肝损伤,长期肝纤维化最终进展为不可逆转的肝硬化^[1]。逆转肝纤维化或防止肝纤维化向肝硬化转变成为疾病治疗的关键,至目前为止,临床上尚未发现有效抗纤维化药物,间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)因具备靶向抗炎、主动适应并改造微环境等生物学特性,使其在治疗肝纤维化上具有巨大潜能^[2]。

为明确骨髓间充质干细胞(BM-MSc)移植治疗对肝纤维化的抑制作用及是否与肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)活化受抑制有关,本实验以同种异体 BM-MSc 经尾静脉植入四氯化碳(CCl₄)诱导的肝纤维化大鼠体内,通过肝脏组织学分析及 HSC 活化相关指标测定等方法阐明 BM-MSc 移植治疗后抑制肝纤维化形成与 HSC 活化受抑制相关,

本研究将为临床开展 BM-MSc 移植抑制肝星状细胞活化及治疗肝纤维化提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

健康雄性 4 周龄和 6 周龄 SD 大鼠(南京医科大学动物实验中心)。蛋白酶 E、胶原蛋白酶 IV、脱氧核糖核酸酶、Percoll、异硫氰酸荧光素连接的 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体(Sigma 公司,美国),RNA 提取试剂盒、RNA 反转录试剂盒、SYBR Green I 荧光染料(TaKaRa 公司,大连),蛋白提取试剂盒(凯基公司,南京),一抗: α -SMA、GAPDH 抗体(SAB 公司,南京),转化生长因子 β 1(TGF- β 1)、I 型胶原蛋白(COL I)抗体(Abcam 公司,美国),二抗:辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 抗体(SAB 公司,南京),辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG 抗体(Jackson 公司,美国),引物由上海英俊公司合成(表 1)。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primers sequences of quantitative RT-PCR

引物名称	引物序列(5'→3')	退火温度(°C)	产物大小(bp)
β -actin	上游:ACTGGAACGGTGAAGGTGAC	69	169
	下游:AGAGAAGTGGGGTGGCTTTT		
TGF- β 1	上游:AGAAGTCACCCGCGTGCTA	69	69
	下游:TGTGTGATGTCTTTGGTTTTGTCA		
α -SMA	上游:TCCTGACCCTGAAGTATCCGATA	71	72
	下游:GGTGCCAGATCTTTCCATGTC		

1.2 方法

1.2.1 BM-MSc 的分离培养

参考文献[3]提取健康 4 周龄 SD 大鼠 BM-MSc,经 L-DMEM 完全培养液培养后传代扩增,收获 3~5 代 BM-MSc,用生理盐水重悬制成密度为 6×10^6 个/mL 的 MSC 治疗液用于后续移植实验。

1.2.2 肝纤维化模型制备及分组

取 6 周龄 SD 大鼠 18 只,CCl₄ 与橄榄油等体积混合后按 1.5 mL/kg 行腹腔注射,2 次/周,持续 8 周,经组织学鉴定,肝纤维化模型制备成功。造模第 4 周开始治疗组 9 只 SD 大鼠侧面尾静脉注射移植 MSC,剂量为 1 mL/次,数量为 6×10^6 个,1 次/周,至第 8 周结束共 4 次。注射等量生理盐水的肝纤维化大鼠为模型组($n=9$);另设正常对照组,仅给予等量生

理盐水尾静脉注射($n=9$)。整个实验过程中因肝功能衰竭、麻醉耐受减低等因素,模型组大鼠死亡 4 只,治疗组死亡 3 只,正常对照组没有大鼠死亡。

1.2.3 肝功能检测

各组 SD 大鼠自实验第 1 周起,每周尾静脉取血 3 mL,至第 8 周结束。所采新鲜血液置离心机中 3 000 r/min 离心 10 min 后取血清,自动生化检测仪检测血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBIL)、白蛋白(ALB)的含量。

1.2.4 肝脏组织学染色

HE、Masson 染色:实验终点时处死各组大鼠,取肝脏制备石蜡切片进行 HE、Masson 染色,显微镜下观察。 α -SMA、TGF- β 1、COL I 免疫组织化学染色:

石蜡切片脱蜡至水,0.3% H_2O_2 甲醇处理 10~20 min,漂洗后行抗原修复,封闭,孵育特异性一抗 α -SMA (1:2 000 稀释)、TGF- β 1 (1:800 稀释)、COL I (1:500 稀释),PBS 清洗,二抗孵育,经 DAB 显色,苏木素复染,水洗,分化,蓝化,脱水,透明,显微镜下观察。

1.2.5 HSC 分离及鉴定

实验终点时处死各组大鼠,取部分肝脏参照文献 [4]用二次原位灌注、密度梯度离心法分离 HSC,以 4×10^5 个/mL 密度接种于 24 孔板,300 μ L/孔,稍待片刻置于荧光显微镜下,326 nm 紫外光激发,观察荧光。

经 H-DMEM 完全培养液培养 7 d 后,HSC 充分活化,经 FITC 标记的 α -SMA 抗体室温孵育 1 h,0.5 μ g/mL DAPI (PBS 配制)复染核后,荧光显微镜下观察 α -SMA、DAPI 免疫荧光双染色结果。

1.2.6 HSC 中 α -SMA、TGF- β 1 mRNA 检测

采用 SYBR Green 荧光探针实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR,qRT-PCR)检测。HSC 提取后立即抽提细胞总 RNA, $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ 测定 RNA 浓度,以 800 ng RNA 逆转录合成 cDNA。以 1 μ L cDNA 为模板行 qRT-PCR,以确定 α -SMA、TGF- β 1 基因的 mRNA 表达水平。总反应体系 10 μ L,PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 30 s;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。以 β -actin 作为内参基因,2 $^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析基因相对表达量,每对引物均做 3 个复孔取平均值,每组 4 只大鼠。

1.2.7 HSC 中 α -SMA、TGF- β 1 蛋白检测

采用 Western blot 检测。取等量已变性处理的 HSC 总蛋白经凝胶电泳后,电移至 PVDF 膜。用 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h,一抗 (α -SMA 1:500, TGF- β 1 1:500,GAPDH 1:2 000)4 $^{\circ}$ C 孵育,过夜;辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,ECL 化学发光法显影。

1.3 统计学方法

结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,服从正态分布且方差齐的 3 组间比较用统计学软件 SPSS22.0 进行方差分析,两组间比较用方差分析后的多重检验,不服从正态分布或方差不齐的组间比较用 Kruskal Wallis 秩和检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SD 大鼠 BM-MSC 的分离、培养与鉴定

骨髓中淋巴系祖细胞及内皮系祖细胞与 MSC 在细胞贴壁速度上存在差异,用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离得到的单个核细胞经贴壁培养、反复换液、传代可得到纯化的 BM-MSc。

细胞第 3 天开始出现形变,分布稀疏;第 7 天形成 MSC 簇,并向周边增殖扩大。BM-MSc 呈纺锤形、梭状细胞,涡旋状生长,细胞排列紧密,形态均一。

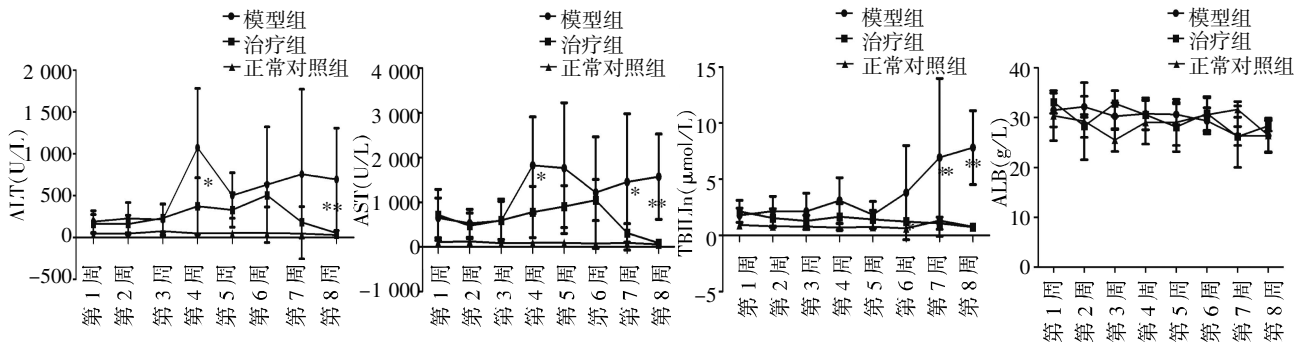
2.2 SD 大鼠肝功能指标测定结果

自动生化检测仪检测结果显示:自第 4 周起治疗后,治疗组 ALT、AST、TBIL 显著低于模型组,经统计学分析,治疗组与模型组 ALT 在第 4、8 周有统计学差异 ($P < 0.05, P < 0.01$);AST 在第 4、7、8 周有统计学差异 ($P < 0.05, P < 0.05, P < 0.01$);TBIL 在第 6、7、8 周有统计学差异 ($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.01$)。各组 ALB 在统计学上无明显差异(图 1)。

2.3 SD 大鼠肝组织切片染色

2.3.1 HE 染色

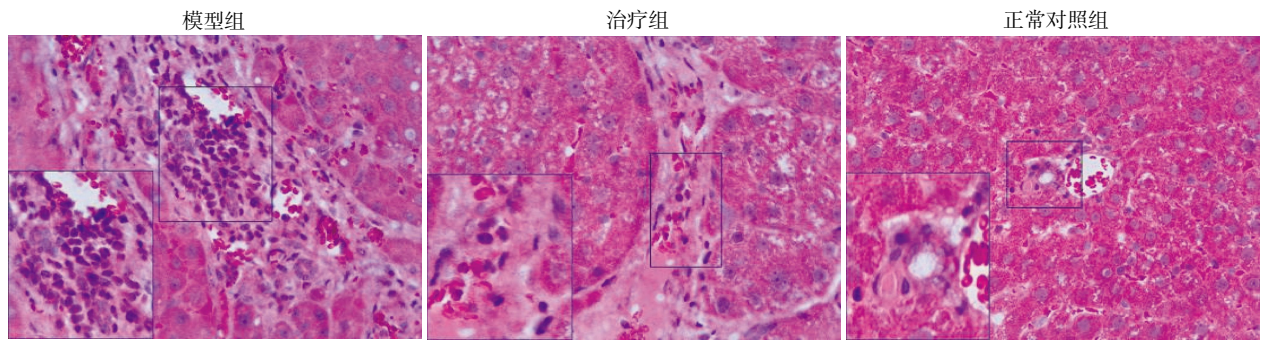
模型组大鼠肝脏切片镜下显示正常肝小叶结构被破坏,假小叶形成明显,增生的纤维组织外周可见慢性炎性细胞浸润。治疗组纤维组织增生程度明显减低,尚未形成假小叶,无明显炎症细胞浸润。正常对照组肝小叶结构正常,呈有序的放射条索状排列(图 2)。



第 4 周起治疗组开始尾静脉注射 MSC,模型组第 1~4 周 ($n=8$),第 5~6 周 ($n=7$),第 7 周 ($n=6$),第 8 周 ($n=5$);治疗组第 1~2 周 ($n=9$),第 3 周 ($n=7$),第 4~8 周 ($n=6$);正常对照组第 1~8 周 ($n=4$)。与治疗组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 1 SD 大鼠血清肝功能相关指标测定

Figure 1 Determination of serum liver function related indicators in SD rats



左下角图为炎症浸润区域放大图($\times 400$)。

图2 SD大鼠肝脏切片HE染色

Figure 2 Liver slices HE staining in SD rats

2.3.2 Masson 染色

Masson 染色统计学分析用 Image-Pro plus 软件进行,结果显示治疗组总胶原含量明显低于模型组,说明治疗组纤维化程度较模型组轻(图3)。

2.3.2 α -SMA、COL I、TGF- β 1 免疫组织化学染色

模型组大鼠肝脏切片镜下显示肝细胞排列紊乱,假小叶形成明显,假小叶间纤维增生组织高表达 COL I,纤维组织内侧高表达 TGF- β 1,窦周高表达 α -SMA。治疗组肝索结构趋于正常,纤维组织增生不明显,纤维增生组织 COL I 表达较模型组明显减低,纤维组织内侧 TGF- β 1 表达极少,较模型组明显减低,窦周表达 α -SMA 较模型组明显减少。正常对照组肝索结构正常,呈放射状排列,小叶结构正常,小叶间无明显纤维隔形成,无明显 COL I 表达,纤维组织内侧基本无 TGF- β 1 表达,窦周基本不表达 α -SMA (图3)。

2.4 SD大鼠HSC提取及鉴定

分离得到的HSC接种后立即置于326 nm紫外光下受激发,细胞自发出极易淬灭的荧光;培养约7 d后HSC活化, α -SMA免疫荧光染色呈阳性,经上述两种方法可鉴定提取的细胞为HSC(图4)。

2.5 HSC中 α -SMA、TGF- β 1 mRNA和蛋白表达

qRT-PCR检测数据显示:治疗组 α -SMA、TGF- β 1、COL I mRNA的表达量明显低于模型组($P < 0.01$);Western blot结果显示:治疗组HSC细胞中 α -SMA、TGF- β 1的蛋白表达量明显低于模型组($P < 0.01$,图5)。提示治疗组经尾静脉MSC移植后,HSC中 α -SMA、TGF- β 1 mRNA和蛋白的表达较模型组明显减低,HSC活化程度受抑制。

3 讨论

MSC作为基质干细胞的一种拥有自我复制和多分化的潜能,具有免疫调节、抗炎症反应和外分

泌营养功能^[5-7]。MSC通过定向分化、分泌细胞因子、调节微环境、激活原位祖细胞等途径修复受损组织,这使得MSC在治疗临床疾病中广泛运用^[8]。抗纤维化是MSC的诸多临床运用之一,MSC分泌的细胞因子和微泡通过免疫抑制、降低氧化应激水平、细胞外基质调节等途径作用于心脏、肾、肺、胰腺、腹膜、皮肤等纤维化组织和器官,阻断其纤维化进程并修复受损的实质细胞。与单一作用机制且不良反应大的抗纤维药物相比,MSC多途径综合作用优势明显,其通过表达不同生物学性状主动适应病变微环境并重塑微环境为其他任何抗纤维化药物不可比拟^[2]。本实验自造模后4周起用同种异体MSC经尾静脉移植治疗CCl₄诱导的肝纤维化大鼠,通过测定大鼠肝功能指标、肝纤维化程度及HSC活化水平,进一步观察MSC阻断肝纤维化进展的作用以及作用机制。

实验中发现经MSC移植治疗后的肝纤维化大鼠血清ALT、AST、TBIL水平下降明显,表明MSC移植治疗后肝功能明显改善。对于MSC移植治疗后能否改善肝脏合成ALB能力,研究者观点不一,有研究者认为MSC移植治疗后肝脏合成ALB能力的提高与MSC向肝细胞样细胞分化有关^[9],但也有研究者对此持否定态度^[10],在本实验中,MSC移植治疗后4周内,未观察到肝脏ALB合成能力明显改善。本实验还发现治疗组肝脏炎症程度较模型组明显减低,可能与MSC通过免疫调节抑制炎症细胞渗出、降低促炎因子和增加抗炎因子释放等抗炎机制相关。MSC可诱导T细胞由促炎状态Th1向抗炎状态Th2转化^[11],影响树突状细胞分化和成熟并诱导其免疫耐受形成^[12],抑制NK细胞释放炎症因子及对HLA-1表达阴性细胞的细胞毒作用^[13],抑制促炎因子TNF- α 、IFN- γ 、IL-6释放^[14-15],增加抗炎因子IL-4、IL-10的释放^[16]。肝纤维化是由慢性肝损伤引起的

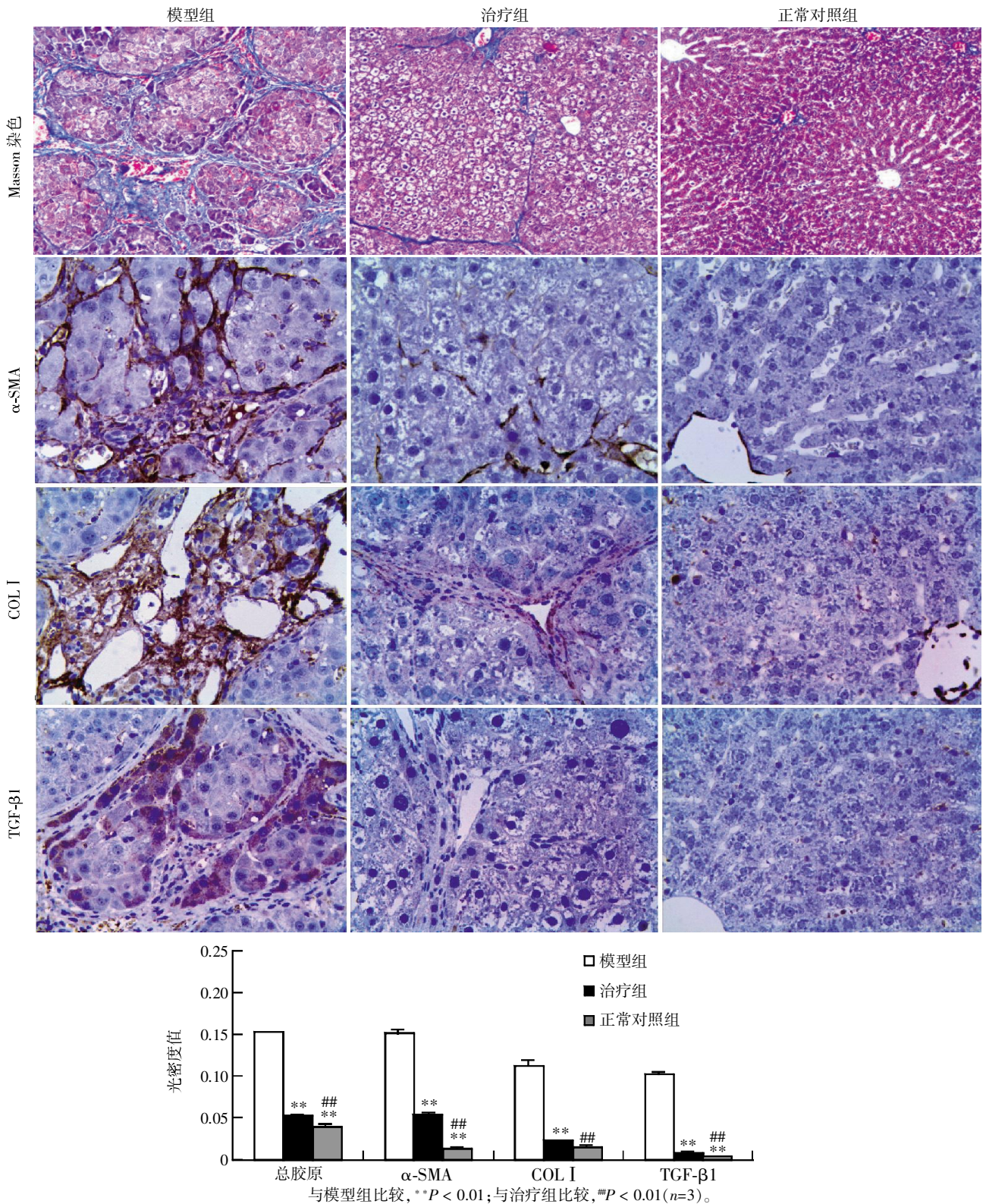
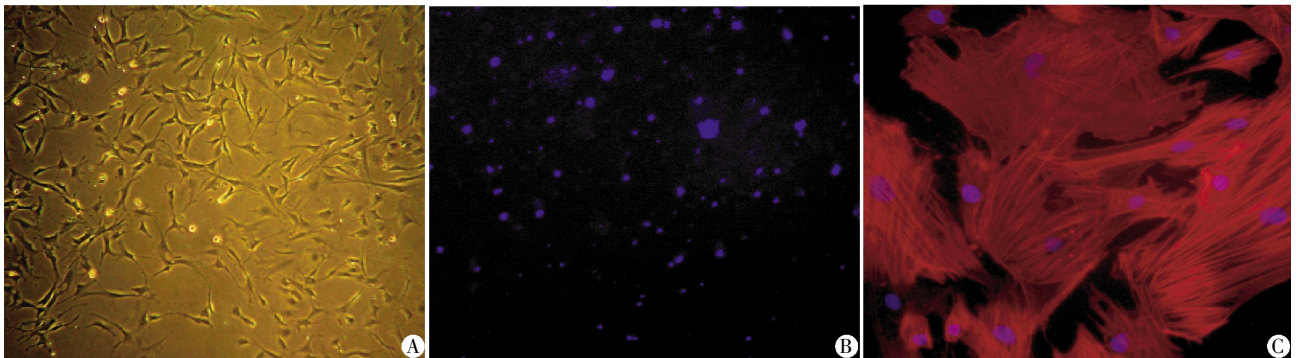


图 3 SD 大鼠肝脏切片 Masson($\times 100$)和 α -SMA、COL I、TGF- β 1 免疫组织化学($\times 400$)染色

Figure 3 Masson($\times 100$) and immunohistochemical($\times 400$) staining of α -SMA, COL I, TGF- β 1 in SD rats

肝实质内细胞外基质过度沉积导致,细胞外基质主要由 Disse 间隙的 HSC 产生,肝脏受损后,HSC 通过旁分泌和自分泌途径激活并向肌成纤维细胞分化,活化的 HSC 增殖和细胞外基质分泌速率均增

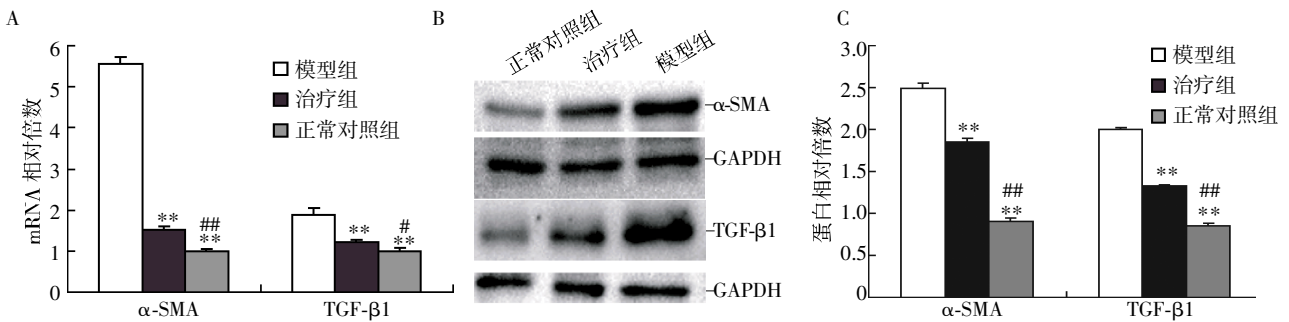
加,并受炎症因子的趋化作用靶向定植于损伤最严重区域进行修复,其释放的细胞外基质在受损区域病理性沉积最终形成肝纤维化; α -SMA、TGF- β 1 皆为 HSC 活化过程中的关键细胞因子,活化的 HSC



A:HSC 培养 7 d($\times 100$);B:HSC 接种后 326 nm 紫外光激发($\times 100$);C:HSC 活化后高表达 α -SMA($\times 400$)。

图 4 SD 大鼠 HSC 培养及鉴定

Figure 4 Identification and morphology of HSC cultured *in vitro*



A:HSC 中 α -SMA、TGF β 1 mRNA 相对表达水平(8周)。与模型组比较, ** $P < 0.01$; 与治疗组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ ($n=4$); B:HSC 中 α -SMA、TGF- β 1 的蛋白表达量,GAPDH 作为内参(8周); C:用 ImageJ 软件对 Western blot 结果作灰度量化分析,每指标重复 3 次取均值。与模型组比较, ** $P < 0.01$; 与治疗组比较, ## $P < 0.01$ ($n=3$)。

图 5 SD 大鼠 HSC 中 α -SMA、TGF- β 1 mRNA 和蛋白表达水平的变化

Figure 5 α -SMA、TGF- β 1 mRNA and protein expression changes of HSC in SD rats

高表达 α -SMA 与其自身获得收缩能力有关^[17]。TGF- β 1 被认为是加速肝纤维化形成的主要细胞因子,在正常肝脏中表达较低,HSC 在肝纤维化过程中被激活后开始大量表达 TGF- β 1 并通过 TGF- β /Smad 信号通路反作用于自身,促其胶原基因表达、加速胶原的分泌和沉积^[18]。在本实验组织病理研究中发现治疗组肝组织纤维化程度及 α -SMA、TGF- β 1、COL I 表达水平均明显降低,与 Tanimoto 等^[19]用人 MSC 培养后治疗免疫缺陷小鼠肝纤维化研究结果类似。因此,推测此结果可能与 MSC 移植后 HSC 活化程度减低有关。接下来我们直接提取 HSC 进行 RNA 和蛋白表达分析,实验结果提示治疗组 HSC 中 α -SMA、TGF- β 1 mRNA 和蛋白的表达水平皆低于模型组,表明 HSC 活化程度在 MSC 移植后受到抑制,证实了上述推测。本课题组前期研究认为 BM-MSC 与已活化的肝星状细胞系(LX2)体外共培养可促进 LX2 凋亡^[20]。Parekkadan 等^[21]用 BM-MSC 与鼠源性 HSC 建立共培养体系,发现 BM-MSC 分泌的 IL-10 和 TNF 可协同抑制 HSC 增殖及

胶原的合成,分泌的肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor,HGF)可促使已活化的 HSC 凋亡。Kim 等^[22]用 MSC 与搭载 HGF 的腺病毒基因重组后移植治疗肝纤维化大鼠,经治大鼠的肝组织切片免疫组织化学染色显示其 desmin 和 α -SMA 表达水平减低,推测 MSC 高表达的 HGF 能够抑制 HSC 活化,同期 Fiore 等^[23]用转染后高表达 IGF-I 的 MSC 移植治疗肝纤维化小鼠也得出类似结论。Wang 等^[24]研究认为 MSC 分泌的 HGF 通过抑制 LX2 中 TLR4/NF- κ B 信号通路抑制 LX2 增殖和活化。Chen 等^[25]认为 MSC 可通过近距离旁分泌的方式经 Notch 信号通路抑制 HSC 活化。本实验对肝脏病理研究得出的推测进行了更为精确的验证,直接提取肝脏中的 HSC 进行 RNA 和蛋白特定分析,与其他实验研究相比得出了更具有说服力的结果。

综上所述,MSC 移植治疗后能显著改善肝纤维化大鼠的肝功能,抑制肝纤维化的形成,其机制可能与 MSC 外分泌物质抑制 HSC 活化有关,我们将

在后续试验中继续研究其具体作用机制。

[参考文献]

- [1] Friedman SL. Liver fibrosis-from bench to bedside[J]. *J Hepatol*, 2003, 38(suppl 1):38-53
- [2] Usunier B, Benderitter M, Tamarat R, et al. Management of Fibrosis: The Mesenchymal Stromal Cells Breakthrough [J]. *Stem Cells Int*, 2014, 2014:340257
- [3] Gnechi M, Melo LG. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 482:281-294
- [4] Yata Y, Enosawa S, Suzuki S, et al. An improved method for the purification of stellate cells from rat liver with dichloromethylene diphosphate (CL2MDP) [J]. *Methods Cell Sci*, 1999, 21(1):19-24
- [5] Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells [J]. *Blood*, 2007, 110(10):3499-3506
- [6] Oh JY, Kim MK, Shin MS, et al. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(4):1047-1055
- [7] Ankrum J, Karp JM. Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back [J]. *Trends Mol Med*, 2010, 16(5):203-209
- [8] Si YL, Zhao YL, Hao HJ, et al. MSCs: biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns [J]. *Ageing Res Rev*, 2011, 10(1):93-103
- [9] Yin L, Zhu Y, Yang J, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiated into hepatocyte-like cells in vivo and in vitro [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(3):1722-1732
- [10] Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Bagheri M, et al. Randomized placebo-controlled trial of mesenchymal stem cell transplantation in decompensated cirrhosis [J]. *Liver International*, 2013, 33(10):1490-1496
- [11] Keating A. How do mesenchymal stromal cells suppress T cells? [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(2):106-108
- [12] Bifari F, Lisi V, Mimiola E, et al. Immune modulation by mesenchymal stem cells [J]. *Transfus Med Hemother*, 2008, 35(3):194-204
- [13] Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, et al. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(1):74-85
- [14] Moodley Y, Aienza D, Manuelpillai U, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce fibrosis of bleomycin-induced lung injury [J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(1):303-313
- [15] Lee SH, Jang AS, Kim YE, et al. Modulation of cytokine and nitric oxide by mesenchymal stem cell transfer in lung injury/fibrosis [J]. *Respir Res*, 2010, 11(1):1-14
- [16] Semedo P, Correa-Costa M, Antonio Cenedeze M, et al. Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(12):3063-3073
- [17] Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver [J]. *Physiol Rev*, 2008, 88(1):125-172
- [18] Inagaki Y, Okazaki I. Emerging insights into transforming growth factor β Smad signal in hepatic fibrogenesis [J]. *Gut*, 2007, 56(2):284-292
- [19] Tanimoto H, Terai S, Taro T, et al. Improvement of liver fibrosis by infusion of cultured cells derived from human bone marrow [J]. *Cell Tissue Res*, 2013, 354(3):717-728
- [20] 徐 晓, 施启鹏, 周 晗, 等. 间充质干细胞旁分泌物质诱导肝星状细胞凋亡的体外研究 [J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2014, 34(8):1040-1045
- [21] Parekkadan B, van Poll D, Megeed Z, et al. Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 363(2):247-252
- [22] Kim MD, Kim SS, Cha HY, et al. Therapeutic effect of hepatocyte growth factor-secreting mesenchymal stem cells in a rat model of liver fibrosis [J]. *Exp Mol Med*, 2014, 46(8):e110
- [23] Fiore EJ, Bayo JM, Garcia MG, et al. Mesenchymal stromal cells engineered to produce IGF- I by recombinant adenovirus ameliorate liver fibrosis in mice [J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(6):791-801
- [24] Wang P, Xie D, Liang XJ, et al. HGF and direct mesenchymal stem cells contact synergize to inhibit hepatic stellate cells activation through TLR4/NF- κ B pathway [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8):e43408
- [25] Chen S, Xu L, Lin N, et al. Activation of Notch1 signaling by marrow-derived mesenchymal stem cells through cell-cell contact inhibits proliferation of hepatic stellate cells [J]. *Life Sci*, 2011, 89(25-26):975-981

[收稿日期] 2015-03-12