

## 间充质干细胞培养上清抑制星状细胞活化治疗肝纤维化的研究

郭圆圆,樊圆圆,张永婷,王瑜,王媛慧,蔡洁,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:研究骨髓来源间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)条件培养基(mesenchymal stem cell-conditioned medium, MSC-CM)对肝纤维化是否有治疗作用及其作用机制。方法:6 周龄 SD 大鼠随机分为 3 组( $n=8$ ):模型组,治疗组,正常对照组。建立四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )诱导大鼠肝纤维化模型,腹腔注射  $\text{CCl}_4$ , 1.5 mL/kg, 每周 2 次,持续 8 周。MSC 培养至 3~5 代用于 MSC-CM 的制备,获取的 MSC-CM 并超滤浓缩约 25 倍,过滤除菌。在实验第 5 周起,治疗组经尾静脉注射 2 mg/kg MSC-CM,每天 1 次至第 8 周末,同时模型组和正常组注射相同剂量的 L-DMEM。至实验终点,按照原位灌注和密度梯度离心法提取肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC),并留取肝组织行病理学检查。通过 Masson 染色和免疫组织化学染色法来检测胶原纤维沉积的程度和  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)的表达程度;qRT-PCR 和 Western blot 检测 HSCs 中  $\alpha$ -SMA、转化生长因子  $\beta 1$ (transforming growth factor  $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ )、I 型胶原蛋白(Collagen I)、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinases-2, MMP-2)、组织金属蛋白酶抑制剂-2(tissue inhibitor of metalloproteinases-2, TIMP-2)mRNA 和蛋白的表达水平。结果:MSC-CM 治疗组肝脏炎症程度较模型组减轻,胶原纤维和  $\alpha$ -SMA 表达量均较模型组明显降低( $P<0.05$ ),但未达到正常组水平( $P<0.05$ )。治疗组 HSC 中 TGF- $\beta 1$ 、 $\alpha$ -SMA、Collagen I mRNA 和蛋白表达水平较模型组明显下降( $P<0.05$ ),MMP-2 mRNA 表达水平较模型组升高( $P<0.05$ )。结论:静脉注射 MSC-CM 对  $\text{CCl}_4$  诱导的肝纤维化有一定治疗作用,这一过程可能与 MSC-CM 能降低 TGF- $\beta 1$  的表达、抑制 HSC 活化及促进胶原蛋白降解有关。

**[关键词]** 间充质干细胞条件培养基;肝纤维化;肝星状细胞;转化生长因子  $\beta 1$

**[中图分类号]** R575.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)09-1142-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20170914

## Mesenchymal stem cells-conditioned medium reduces liver fibrosis by regulating hepatic stellate cells

Guo Yuanyuan, Fan Yuanyuan, Zhang Yongting, Wang Yu, Wang Yuanhui, Cai Jie, Li Jun, Zhang Lili\*

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

**[Abstract]** **Objective:** To investigate whether the MSC-conditioned medium (MSC-CM) can protect injured liver and reduce liver fibrosis and its potential mechanisms. **Methods:** Six-week-old SD rats were allocated into three groups(each group  $n=8$ ) as follows: model group; treatment group; normal group. The liver fibrosis model was established by intraperitoneal injection of low dose of  $\text{CCl}_4$  (1.5 mL/kg) twice a week for eight weeks. MSCs were grown for 3~5 generation for the preparation of MSC-CM, which was concentrated 25-fold using ultrafiltration. From weeks 5 to 8, MSC-CM was injected every day with a dose of 2 mg/kg by tail vein in the treatment group; at the same time, the other two groups were injected with the same dose of L-DMEM. At the end of the experiment, hepatic stellate cells (HSCs) were isolated by in situ perfusion and density gradient centrifugation, and liver tissue was collected for pathologic analysis. The collagenous fiber was detected by Masson staining, while the expression of alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) in liver tissues was measured by immunohistochemical staining. To evaluate liver fibrosis, the gene and protein expression of  $\alpha$ -SMA, transforming growth factor beta 1(TGF- $\beta 1$ ), collagen I, matrix metalloproteinases-2 (MMP-2), tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) in HSCs were evaluated by quantitative real-time PCR and Western blot. **Results:** In liver tissues, histological improvement was observed in hepatic fibrosis after MSC-CM treatment( $P<0.01$ ); the expression of  $\alpha$ -SMA and collagenous fiber was significantly lower in the treatment group compared to the model group( $P<0.05$ ), but not equal to the normal group. In HSC study, the mRNA expressions of TGF- $\beta 1$ ,  $\alpha$ -SMA, collagen I in the treatment group were significantly decreased than those in the model group

**[基金项目]**南京市科技发展计划项目(201402003)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail:dr.zhanglili@aliyun.com

( $P < 0.05$ ); and their protein expressions were also lower in the treatment group( $P < 0.05$ ), and the mRNA expression of MMP-2 increased compared to the model group. **Conclusion:** Our results showed that MSC-CM has a therapeutic effect on CCL<sub>4</sub>-induced liver fibrosis. And this process may be related to down-regulating expression of TGF- $\beta$ 1, inhibiting HSCs activation and promoting collagen degradation.

[**Key words**] mesenchymal stem cell-conditioned medium; liver fibrosis; hepatic stellate cell; transforming growth factor beta 1

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(09): 1142-1147]

肝纤维化是多种慢性肝病共有的病理表现,主要表现为细胞外基质过度产生和不规则沉积,并且导致肝组织结构变形以及肝功能异常,长期肝纤维化会发展为不可逆转的肝硬化。肝移植被认为是逆转肝硬化最好的治疗方法,但是由于器官供体资源短缺以及手术的复杂性使其应用有一定局限性。近来,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)移植被认为是治疗肝纤维化的好方法<sup>[1-2]</sup>。本研究团队已证明经尾静脉注射进行 MSC 移植可以改善四氯化碳(CCL<sub>4</sub>)诱导的肝纤维化<sup>[3]</sup>,但是进一步研究发现通过尾静脉定植到肝脏的细胞数量很少,分化为肝细胞的更少<sup>[4-5]</sup>,因此认为 MSC 的旁分泌机制发挥了重要作用,在体外试验中发现 MSC 的旁分泌物质可以诱导肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC) Lx-2 凋亡<sup>[6]</sup>。

MSC 可分泌多种细胞因子,包括生长因子、抗炎因子及抗凋亡因子等<sup>[7]</sup>。有研究已经证明 MSC-CM 在肺动脉高压<sup>[8]</sup>、肾损伤<sup>[9]</sup>、心肌梗死<sup>[10]</sup>、皮肤缺损<sup>[11]</sup>等疾病中具有治疗作用。为进一步研究 MSC-CM 对肝纤维化的作用,本研究建立了 CCL<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化动物模型,经尾静脉注射 MSC 条件培养上清(MSC-conditioned medium, MSC-CM),通过观察组织学变化评估其治疗效果;分离肝组织中 HSC,检测 HSC 活化指标,评估 MSC-CM 对 HSC 的作用以进一步探讨其治疗机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

购买清洁级雄性 SD 大鼠(南京医科大学实验动物中心),4 周龄和 6 周龄,体重 50~200 g,所有动物实验操作都遵循南京医科大学实验动物伦理规章制度。胎牛血清(FBS, Corning 公司,美国),超滤离心管、0.22  $\mu$ m 滤器(Millipore 公司,美国),蛋白酶 E、胶原蛋白酶 IV、DNA 酶 I (Sigma 公司,美国),蛋白提取试剂盒(凯基公司,南京),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)。一抗: $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白

( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、转化生长因子  $\beta$ 1 (transforming growth factor  $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)、GAPDH 抗体(SAB 公司,南京)、I 型胶原蛋白(Collagen I)抗体(Santa Cruz 公司,美国)。二抗:辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG 抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 抗体(联科生物公司,杭州)。引物由上海锐真公司合成(表 1)。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of quantitative RT-PCR

引物名称	引物序列(5'→3')	退火温度(°C)	产物(bp)
$\beta$ -actin	上游:ACTGGAACGGTGAAGGTGAC	69	169
	下游:AGAGAAGTGGGGTGGCTTTT		
$\alpha$ -SMA	上游:TCCTGACCCTGAAGTATCCGATA	71	72
	下游:GGTGCCAGATCTTTCCATGTC		
TGF- $\beta$ 1	上游:AGAAGTCACCCGCGTGCTA	69	69
	下游:TGTGTGATGTCTTTGTTTTGTCA		
Collagen I	上游:GACTGTCCCAACCCCAAAA	60	102
	下游:CTTGGGTCCCTCGACTCCTA		
MMP-2	上游:GGTGGCAATGGAGATGGACA	60	129
	下游:CCGGTCATAATCCTCGGTGG		
TIMP-2	上游:AGATCACACGCTGCCTATG	60	182
	下游:AAGAAACTCCTGCTTCGGGG		

MMP-2: 基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2); TIMP-2: 组织金属蛋白酶抑制剂-2(tissue inhibitor of metalloproteinase-2)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 MSC 的分离培养与鉴定

取 4 周龄 SD 大鼠,体重 50~100 g,按照文献<sup>[12]</sup>用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法提取 MSC。将提取的 MSC 按照  $1 \times 10^6$  个接种到 10 cm 培养皿中。24 h 后用含有 10% FBS 的 L-DMEM 完全培养液进行首次全量换液;此后每 2~3 d 换液,待细胞密度长至 80%~90% 时,用含 0.25% EDTA 的胰酶消化后传代。培养至 3~6 代用于实验。用荧光标记的抗 CD34、CD45、CD29、CD90 抗体进行 MSC 鉴定。

### 1.2.2 MSC-CM 的制备

待3~6代MSC细胞融合度达80%~90%时,更换无FBS和青链霉素的L-DMEM,培养24h,收集培养上清,离心去除死细胞。将获得的培养液用超滤离心管(3kDa)进行超滤浓缩约25倍,0.22 $\mu$ m过滤除菌,BCA蛋白测定浓度,-80 $^{\circ}$ C冰箱保存待用。

### 1.2.3 肝纤维化模型的建立与治疗

取6周龄(体重150~200g)SD大鼠24只,随机分为3组:模型组(CCL<sub>4</sub>),治疗组(CCL<sub>4</sub>+MSC-CM),对照组(生理盐水)。CCL<sub>4</sub>与橄榄油1:1等体积混合后,以1.5mL/kg的剂量进行腹腔注射,2次/周,共8周。治疗组于第5周开始尾静脉注射MSC-CM进行治疗,2mg/kg,1次/d,共4周;同时模型组和对照组尾静脉注射同等剂量的L-DMEM,1次/d,共4周。

### 1.2.4 肝脏组织学染色

实验终点处死各组大鼠,取肝脏组织制作石蜡切片,进行HE、Masson染色,显微镜下观察。 $\alpha$ -SMA免疫组织化学染色,观察HSC活化情况:石蜡切片常规脱蜡,梯度乙醇脱水,抗原修复液中进行抗原修复,3% $H_2O_2$ 处理15min,孵育 $\alpha$ -SMA特异性一抗(即用型),PBS清洗,孵育二抗,DAB显色,苏木精复染,脱水,透明,显微镜下观察。

### 1.2.5 HSC 的分离与鉴定

在实验终点时,参照文献[13]采用二次原位灌注、密度梯度离心法分离HSC,接种至含有10%FBS的H-DMEM完全培养基中,片刻后置于荧光显微镜下,360nm紫外光激发,观察荧光。培养至第7天,采用抗 $\alpha$ -SMA抗体免疫细胞化学方法进行鉴定。具体鉴定方法与结果参见既往文献[3]。

### 1.2.6 qRT-PCR 检测 HSC 中 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 、Collagen I、MMP-2、TIMP-2 的 mRNA 表达

HSC分离后,按照试剂盒方法立即进行细胞总RNA抽提,测定RNA浓度,以800ngRNA逆转录合成cDNA。采用SYBR Green I荧光探针实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR)检测。以1 $\mu$ L cDNA为模板行qRT-PCR检测 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 、Collagen I、MMP-2、TIMP-2基因的mRNA表达水平。总反应体系10 $\mu$ L,PCR反应条件为:95 $^{\circ}$ C 30s;95 $^{\circ}$ C 5s,60 $^{\circ}$ C 30s,40个循环。以 $\beta$ -actin作为内参基因,用2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup>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3只大鼠。引物序列见表1。

### 1.2.7 Western blot 检测 HSC 中 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 、Collagen I 的蛋白表达

实验终点提取HSC,按照试剂盒方法提取细胞

总蛋白。取等量变性处理的各组总蛋白,进行SDS-PAGE电泳后电转至PVDF膜。用5%脱脂奶粉溶液室温封闭2h,加入适量稀释比例的一抗 $\alpha$ -SMA(1:500)、TGF- $\beta$ 1(1:500)、Collagen I(1:500)、GAPDH(1:2000),4 $^{\circ}$ C过夜;辣根过氧化物酶标记的二抗(1:10000)室温孵育1h,ECL化学发光法显影。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS22.0统计软件进行数据分析,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组间比较用方差分析,两两比较采用LSD检验;不服从正态分布或者方差不齐的3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 MSC 的分离、培养与鉴定

经分离得到的单个核细胞贴壁生长,在第3代时大部分细胞呈长梭形,涡旋状生长,细胞排列紧密,大小一致,形态均匀。流式细胞仪检测MSC细胞表面标记物。结果发现CD34阳性细胞数为0.10%,CD45阳性细胞数为0.03%,CD29阳性细胞数为93.27%,CD90阳性细胞数为98.23%(图1)。

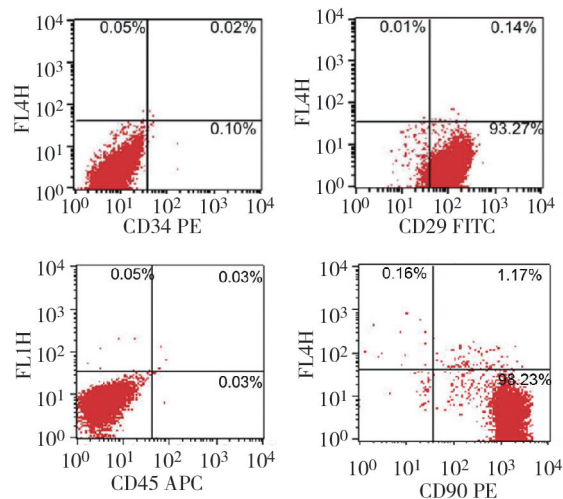


图1 流式细胞术分析MSC表面标记物

Figure 1 Flow cytometry analysis of surface markers of MSC

### 2.2 SD 大鼠肝组织切片

HE染色:模型组SD大鼠肝脏切片镜下显示肝脏正常肝小叶结构被破坏,形成明显的假小叶,假小叶内肝细胞索排列紊乱,增生的纤维组织外周可见明显的炎性细胞浸润。治疗组纤维组织增生程度明显较低,假小叶形成不明显,炎症浸润程度较模型组轻。正常组肝小叶结构正常,肝细胞索排列正常,呈放射状(图2)。

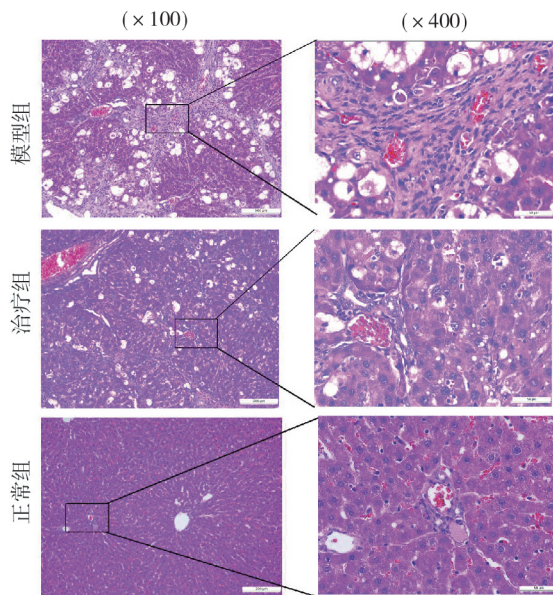
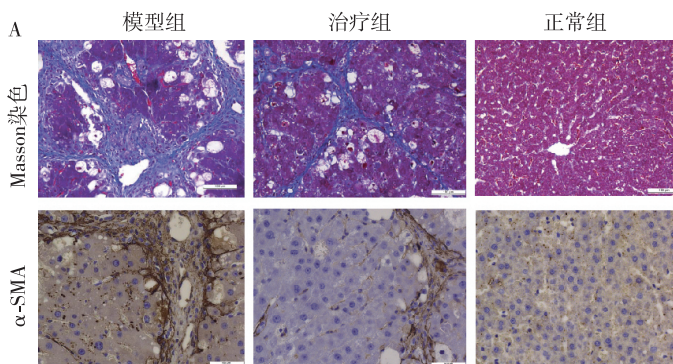


图 2 肝组织 HE 染色  
Figure 2 HE staining of liver tissues



A:SD 大鼠肝组织 Masson 染色( $\times 200$ )和  $\alpha$ -SMA 免疫组织化学染色( $\times 400$ );B:Image Pro Plus 软件进行光密度分析。与正常组相比, $^*P < 0.05$ , $^{**}P < 0.01$ ;与模型组相比, $^{\#}P < 0.05$ , $^{\#\#}P < 0.01$ ( $n=3$ )。

图 3 大鼠肝组织 Masson 染色和  $\alpha$ -SMA 免疫组织化学染色

Figure 3 Masson staining and immunohistochemistry staining of  $\alpha$ -SMA in liver tissue of SD rat

在 mRNA 和蛋白水平上的表达量都明显高于正常组, MSC-CM 治疗后相对于模型组  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1 和 Collagen I 在 mRNA 和蛋白水平有所下降 ( $P < 0.05$ ), 但是与正常组相比, 未降至正常水平。这些结果提示, MSC-CM 可以在一定程度上降低 HSC 的活化。qRT-PCR 还显示 MSC-CM 可以升高 MMP-2 mRNA 的表达水平, 但对 TIMP-2 mRNA 的表达没有影响(图 4)。

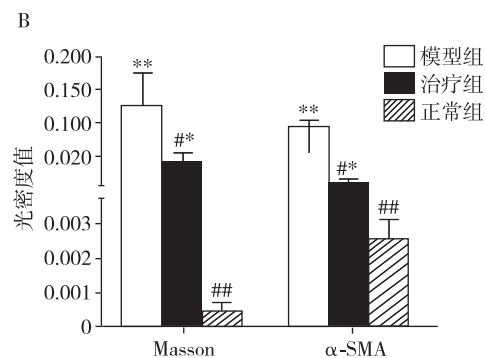
### 3 讨论

MSC 是一类具有自我复制能力和多向分化潜能的干细胞, 可以促进损伤组织进行修复。有研究证明 MSC 的治疗作用与其分泌的细胞因子有关<sup>[14-15]</sup>, MSC-CM 中含有 MSC 分泌的大多数细胞因子, 体外试验中发现 MSC-CM 可以诱导活化的 HSC 凋亡。

Masson 染色结果显示正常对照组汇管区及小叶间隔仅见少量纤维沉积, 中央静脉管壁纤维组织染色。模型组肝组织切片中可见中央静脉以及汇管区周围胶原纤维沉积增多, 提示肝纤维化造模成功。与模型组相比, MSC-CM 治疗组胶原纤维沉积明显减少(图 3A)。免疫组化结果显示: 正常组肝组织没有假小叶形成, 窦周没有  $\alpha$ -SMA 的表达, 而模型组肝组织窦周高表达  $\alpha$ -SMA; 经 MSC-CM 干预治疗后, 窦周  $\alpha$ -SMA 的表达明显降低(图 3A)。使用 Image-Pro plus 软件进行统计学分析, Masson 染色与免疫组化结果显示: 与模型组比较, MSC-CM 对 CCL<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化有一定治疗作用; 但与正常组比较, 治疗组的纤维化缓解程度还未达到正常水平 ( $P < 0.05$ , 图 3B)。

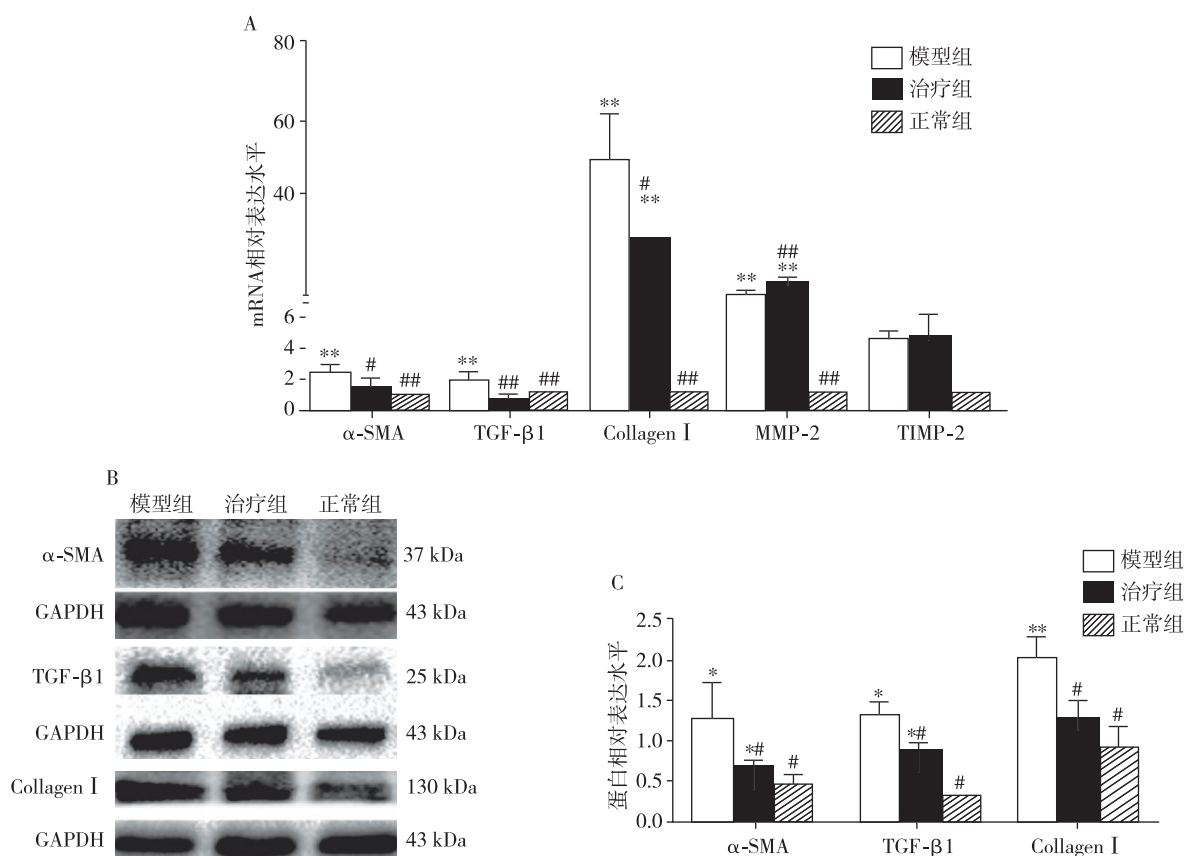
### 2.3 HSC 中 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1、Collagen I 的 mRNA 和蛋白表达以及 MMP-2、TIMP-2 mRNA 表达

模型组 HSC 中  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1 和 Collagen I



为进一步研究 MSC-CM 对肝纤维化的治疗作用, 本研究采用 CCL<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化大鼠模型作为研究对象, 经尾静脉注射 MSC-CM, 观察 MSC-CM 的治疗效果, 结果发现, 治疗组大鼠肝脏炎症程度及纤维化程度均较模型组明显减轻。

炎症反应在肝纤维化的形成和发展过程中有重要作用。在肝纤维化的早期阶段, 损伤的肝细胞和内皮细胞释放趋化因子募集巨噬细胞, 巨噬细胞通过产生各种炎性细胞因子如 TGF- $\beta$ 1<sup>[16]</sup>和血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)<sup>[17]</sup>等来刺激 HSC 活化。本研究肝组织病理学显示, 治疗组肝脏炎症浸润程度较模型组明显降低, 胶原纤维沉积量为模型组的 1/3, 提示 MSC-CM 具有抗炎作用。



A: HSC 中  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1、Collagen I、MMP-2、TIMP-2 mRNA 的相对表达水平; B: HSC 中  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1、Collagen I 的蛋白表达量, GAPDH 作为内参; C: 使用 Image J 软件对 Western blot 结果进行灰度分析。与正常组相比, \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01; 与模型组相比, # $P$ <0.05, ## $P$ <0.01 ( $n$ =3)。

**图 4 HSC 中  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1、Collagen I mRNA 和蛋白表达水平变化以及 MMP-2、TIMP-2 mRNA 的表达水平变化**  
**Figure 4 The changes of  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$ 1, collagen I in HSC at mRNA and protein level, and MMP-2, TIMP-2 mRNA expression in HSC**

HSC 是肝纤维化发生的主要相关细胞, HSC 的活化是肝纤维化的中心环节。本研究发现治疗组 HSC 中 TGF- $\beta$ 1、 $\alpha$ -SMA、Collagen I 的表达量明显低于模型组, 同时促进胶原降解的 MMP-2 表达量高于模型组。说明 MSC-CM 可抑制 HSC 的活化, 促进胶原降解, 对肝纤维化有一定治疗作用。

$\alpha$ -SMA 是肌纤维母细胞的表面标志性蛋白, 正常情况下主要分布在血管平滑肌细胞、肌上皮细胞、肌纤维母细胞等<sup>[18]</sup>, 活化的 HSC 可以高表达  $\alpha$ -SMA<sup>[19]</sup>。本研究免疫组化结果显示, 治疗组表达  $\alpha$ -SMA 的 HSC 细胞数仅为模型组的 1/10 ( $P$ <0.05)。qPCR 和 Western blot 结果也显示治疗组 HSC 中  $\alpha$ -SMA 表达明显下降 ( $P$ <0.05)。提示经 MSC-CM 治疗后, 活化的 HSC 细胞数明显低于模型组。

在肝损伤期间, 坏死的肝细胞释放 TGF- $\beta$ 1 是激活相邻 HSC 的信号之一, 导致 HSC 分化为肌成纤维细胞。同时 TGF- $\beta$ 1 信号也可以抑制 HSC 细胞凋亡, 并诱导 HSC 合成过量的基质蛋白, 如 Collagen、纤连蛋白等<sup>[20]</sup>。因此 TGF- $\beta$ /Smad 是 HSC 活化

的主要信号通路和肝纤维化形成的核心途径<sup>[21]</sup>。活化的 HSC 可调节 TGF- $\beta$ /Smad 信号促进 TGF- $\beta$ 1 的产生, 而产生的 TGF $\beta$ 1 可以促进 HSC 活化, 形成循环促进胶原不断产生。本研究发现在 MSC-CM 治疗后, HSC 中 TGF- $\beta$ 1 的表达量在 mRNA 和蛋白水平上相对模型组明显降低 ( $P$ <0.05), 说明 MSC-CM 可通过降低 TGF- $\beta$ 1 的表达抑制 HSC 活化, 发挥抗纤维化的作用。

肝纤维化发生时, 活化的 HSC 可分泌 MMP 促进细胞外基质降解, 还可以分泌 TIMP 抑制 MMP 的作用<sup>[22]</sup>。因此调节 MMP 和 TIMP 的平衡可促进细胞外基质的降解, 抑制纤维化发展。Collagen I 是细胞外基质的主要组成成分, 有研究提出 MMP-2 的增加是抑制 HSC 合成 Collagen I 的重要原因<sup>[23]</sup>。本研究结果显示经 MSC-CM 干预后, HSC 中 MMP-2 mRNA 的表达量高于模型组, Collagen I 的表达量也较模型组明显降低。提示 MSC-CM 可以通过提高 MMP-2 的表达来降低 Collagen I 的沉积, 对肝纤维化起到治疗作用。

综上所述, MSC-CM 经尾静脉注射可以治疗 CCL<sub>4</sub> 诱导的大鼠肝纤维化。其可能机制为降低 TGF- $\beta$ 1 的表达,抑制 HSC 活化减少胶原纤维产生;同时可升高 HSC 中 MMP-2 的表达促进 Collagen I 的降解,减轻肝纤维化。MSC-CM 治疗肝纤维化不失为干细胞临床应用的新策略,其中的有效成分、剂量及配比值得进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Volarevic V, Nurkovic J, Arsenijevic N, et al. Concise review: Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for the treatment of acute liver failure and cirrhosis[J]. *Stem Cells*, 2014, 32(11): 2818-2823
- [2] Kadyk LC, Collins LR, Littman NJ, et al. Proceedings: moving toward cell-based therapies for liver disease[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2015, 4(3): 207-210
- [3] 施启鹏, 郭圆圆, 周 晗, 等. 间充质干细胞移植后抑制肝星状细胞活化减轻肝纤维化[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(7): 981-987
- [4] 陈 念, 俞 悦, 李 军, 等. 骨髓间充质干细胞移植在急性肝损伤大鼠肝脏内定植能力的实验研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2007, 27(7): 684-688
- [5] Lee KC, Lin HC, Huang YH, et al. Allo-transplantation of mesenchymal stem cells attenuates hepatic injury through IL1Ra dependent macrophage switch in a mouse model of liver disease[J]. *J Hepatol*, 2015, 63(6): 1405-1412
- [6] 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
- [7] Khubutiya MS, Vagabov AV, Temnov AA, et al. Paracrine mechanisms of proliferative, anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of mesenchymal stromal cells in models of acute organ injury[J]. *Cytotherapy*, 2014, 16(5):579-585
- [8] Lee JC, Cha CI, Kim DS, et al. Therapeutic effects of umbilical cord blood derived mesenchymal stem cell-conditioned medium on pulmonary arterial hypertension in rats [J]. *J Pathol Transl Med*, 2015, 49(6): 472-480
- [9] Moghadasali R, Mutsaers HA, Azarnia M, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates regeneration of human renal proximal tubule epithelial cells after gentamicin toxicity[J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2013, 65(5): 595-600
- [10] Timmers L, Lim SK, Hoefler IE, et al. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction[J]. *Stem Cell Res*, 2011, 6(3): 206-214
- [11] Li M, Luan F, Zhao Y, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates wound healing with fewer scars[J]. *Int Wound J*, 2017, 14(1):64-73
- [12] Li D, Fan J, He X, et al. Therapeutic effect comparison of hepatocyte-like cells and bone marrow mesenchymal stem cells in acute liver failure of rats[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(1): 11-24
- [13] 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
- [14] Hwang B, Liles WC, Waworuntu R, et al. Pretreatment with bone marrow-derived mesenchymal stromal cell-conditioned media confers pulmonary ischemic tolerance[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2016, 151(3):841-846
- [15] Qin ZH, Xu JF, Qu JM, et al. Intrapleural delivery of MSCs attenuates acute lung injury by paracrine/endocrine mechanism[J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16(11): 2745-2753
- [16] Steven D, Peterterten D. TGF- $\beta$  in progression of liver disease[J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 347(1): 245-256
- [17] Canbay A, Feldstein AE, Higuchi H, et al. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression[J]. *Hepatology*, 2003, 38(5): 1188-1198
- [18] Yuan SM.  $\alpha$ -Smooth muscle actin and ACTA2 gene expressions in vasculopathies[J]. *Braz J Cardiovasc Surg*, 2015, 30(6):644-649
- [19] Li D, He L, Guo H, et al. Targeting activated hepatic stellate cells (aHSCs) for liver fibrosis imaging[J]. *EJNMMI Res*, 2015, 5(1): 71
- [20] Xu FY, Liu CW, Zhou DD, et al. TGF- $\beta$ /SMAD pathway and its regulation in hepatic fibrosis[J]. *J Histochem Cytochem*, 2016, 64(3): 157-167
- [21] Wallace MC, Friedman SL, Mann DA. Emerging and disease-specific mechanisms of hepatic stellate cell activation[J]. *Semin Liver Dis*, 2015, 35(2): 107-118
- [22] Robert S, Gicquel T, Bodin A, et al. Characterization of the MMP/TIMP imbalance and collagen production induced by IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  release from human hepatic stellate cells[J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0153118
- [23] Radbill BD, Gupta R, Ramirez MC, et al. Loss of matrix metalloproteinase-2 amplifies murine toxin-induced liver fibrosis by upregulating collagen I expression[J]. *Dig Dis Sci*, 2011, 56(2): 406-416
- [24] An SY, Jang YJ, Lim HJ, et al. Milk fat globule-EGF factor 8, secreted by mesenchymal stem cells, protects against liver fibrosis in mice[J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(5):1174-1186
- [25] Boomsma RA, Geenen DL. Mesenchymal stem cells secrete multiple cytokines that promote angiogenesis and have contrasting effects on chemotaxis and apoptosis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4):e35685

[收稿日期] 2017-02-27