

# 人脐带间充质干细胞来源外泌体抑制肝星状细胞活化发挥抗肝纤维化作用的实验研究

李雪铭<sup>1</sup> 伊诺<sup>2</sup> 卢智豪<sup>1</sup> 冯婧<sup>1</sup> 董健藤<sup>1</sup> 李健<sup>1</sup>

**【摘要】 目的** 探讨人脐带间充质干细胞外泌体(hucMSC-Exo)在体内、外抑制肝星状细胞(HSCs)活化及改善肝纤维化的效应。**方法** 外泌体提取和纯化采用高速离心法,用透射电镜、纳米颗粒跟踪分析仪、Western blot法对外泌体进行表征。在体实验选用雄性C57BL/6J小鼠为实验对象,分为4组:正常对照组、模型组、hucMSC-Exo干预组和秋水仙碱干预组,每组10只。肝纤维化小鼠模型制备采用CCl<sub>4</sub>-橄榄油(1:3)混合液灌胃法,2次/周,共8周。治疗组于4周末在造模基础上实施外泌体尾静脉注射(300 μg/100 g 体质量)和秋水仙碱灌胃(0.01 mg/100 g 体质量)干预。8周末取材,生化分析法检测血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST),酶联免疫法检测IV型胶原(Collagen-IV)、层粘连蛋白(LN)、III型前胶原(PC-III)及透明质酸(HAase)水平,HE和Masson法检测肝组织病理变化,免疫组化法检测α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)和I型胶原(Collagen-I)表达。离体实验选用人肝星形细胞系LX-2细胞为实验对象,分3组:空白对照组、转化生长因子-β<sub>1</sub>(TGF-β<sub>1</sub>)诱导组和TGF-β<sub>1</sub>诱导+hucMSC-Exo干预组,采用免疫荧光法检测各组细胞α-SMA的表达,Western blot检测各组细胞内α-SMA和Collagen-I蛋白水平。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。**结果** 小鼠血清生化分析结果表明,与正常对照组比较,模型组ALT、AST、Collagen-IV、LN和HAase水平均升高(*P*均<0.01)。与模型组比较,hucMSC-Exo干预组ALT[(3.17±0.70)比(6.34±0.37)U/L],AST[(2.91±0.60)比(7.11±0.41)U/L],Collagen-IV[(116.38±4.96)比(143.79±6.71)μg/L],LN[(762.96±120.45)比(950.86±29.77)μg/L],PC-III[(14.88±0.83)比(18.39±2.57)μg/L],HAase[(109.92±11.32)比(187.58±10.42)ng/L]均降低,差异具有统计学意义(*P*均<0.01)。肝组织免疫组化结果显示:与正常对照组比较,模型组α-SMA和Collagen-I表达水平均增高(*P*均<0.01)。与模型组比较,hucMSC-Exo干预组肝组织中α-SMA(337.05±39.13比2681.83±312.63)及Collagen-I(479.32±86.25比1022.57±102.13)表达水平均降低,差异有统计学意义(*P*均<0.01);LX-2细胞裂解液Western blot检测结果提示:与模型组比较,hucMSC-Exo干预组α-SMA蛋白(0.87±0.09比1.01±0.34)及Collagen-I(0.46±0.07比0.75±0.22)蛋白表达均下降,差异具有统计学意义(*P*均<0.05)。**结论** 早期移植hucMSC-Exo能抑制CCl<sub>4</sub>诱导小鼠肝纤维化病理进程,其初步作用机制与hucMSC-Exo抑制肝星状细胞的活化和胶原蛋白的合成、分泌相关。

**【关键词】** 脐带间充质干细胞; 外泌体; 肝星状细胞; 肝纤维化

**The anti-hepatic fibrosis effects of human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes by inhibiting hepatic stellate cells activation** Li Xueming<sup>1</sup>, Yi Nuo<sup>2</sup>, Lu Zhihao<sup>1</sup>, Feng Jing<sup>1</sup>, Dong Jianteng<sup>1</sup>, Li Jian<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Department of Histology and Embryology, School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; <sup>2</sup>Gynecology Department of Beijing Geriatric Hospital, Beijing 100095, China  
Corresponding author: Li Jian, Email: lijian@bucm.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To evaluate the therapeutic effects of human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes (hucMSC-Exo) in inhibiting the activation of hepatic

DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2025.03.003

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82374181)

作者单位: 102000 北京中医药大学中医学院组织胚胎学教研室<sup>1</sup>; 100095 北京老年医院妇科<sup>2</sup>

通信作者: 李健, Email: lijian@bucm.edu.cn

stellate cells (HSCs) and improving liver fibrosis *in vivo* and *in vitro*. **Methods** The exosomes were isolated and purified by ultracentrifugation and characterized by transmission electron microscopy (TEM), nanoparticle size analysis, and Western blot. For *in vivo* experiments, 40 male C57BL/6J mice were divided into 4 groups: normal control group, model group, exosome treatment group, and colchicine treatment group ( $n = 10$ ). The hepatic fibrosis model was built by intragastric administration of  $\text{CCl}_4$ -olive oil (1:3), 2 times/week for 8 weeks. After 4 weeks of modeling, intervention treatments were carried out: exosomes were proceeded by intravenous injection administration (300  $\mu\text{g}/100$  g body weight), and colchicine was given by intragastric administration (0.01 mg/100 g body weight). At the end of 8 weeks, levels of ALT, AST, IV-C, LN, PC-III, and HAase in serum were measured using biochemical assays and ELISA methods. Liver histopathological changes were assessed with H&E and Masson staining, and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and Collagen- I expression in liver tissue were detected using immunohistochemistry. For *in vitro* experiments, the human HSC cell line LX-2 was treated with TGF- $\beta_1$  and hucMSC-Exo, and named blank control, TGF- $\beta_1$  induction group, TGF- $\beta_1$  induction+hucMSC-Exo group. Immunofluorescence was used to analyze the expression of  $\alpha$ -SMA, and Western blot was performed to detect the expression levels of  $\alpha$ -SMA and Collagen- I proteins. One-way analysis of variance was used for comparison between multiple groups, and LSD-*t* test was used for pairwise comparison between groups. **Results** Compared to the normal control group, the levels of ALT, AST, Collagen-IV, LN, PC- III, and HAase were increased (all  $P < 0.01$ ). Compared to the model group, the levels of ALT [ $(3.17 \pm 0.70)$  vs  $(6.34 \pm 0.37)$  U/L], AST [ $(2.91 \pm 0.60)$  vs  $(7.11 \pm 0.41)$  U/L], Collagen- IV [ $(116.38 \pm 4.96)$  vs  $(143.79 \pm 6.71)$   $\mu\text{g}/\text{L}$ ], LN [ $(762.96 \pm 120.45)$  vs  $(950.86 \pm 29.77)$   $\mu\text{g}/\text{L}$ ], PC- III [ $(14.88 \pm 0.83)$  vs  $(18.39 \pm 2.57)$   $\mu\text{g}/\text{L}$ ] and HAase [ $(109.92 \pm 11.32)$  vs  $(187.58 \pm 10.42)$  ng/L] were decreased significantly in the hucMSC-Exo treatment group (all  $P < 0.01$ ). Immunohistochemical results of liver tissues showed that the level of the expression of  $\alpha$ -SMA and Collagen- I was increased (all  $P < 0.01$ ). Compared to the model group, the expression of  $\alpha$ -SMA ( $337.05 \pm 39.13$  vs  $2681.83 \pm 312.63$ ), and Collagen- I expression ( $479.32 \pm 86.25$  vs  $1022.57 \pm 102.13$ ) were decreased in liver tissues in hucMSC-Exo intervention group (all  $P < 0.01$ ). The Western blot data of LX-2 cell lysate indicated that hucMSC-Exo inhibited the expression of  $\alpha$ -SMA and Collagen- I in LX-2 cells compared to the model group [ $(0.87 \pm 0.09)$  vs  $(1.01 \pm 0.34)$  and  $(0.46 \pm 0.07)$  vs  $(0.75 \pm 0.22)$ ] (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Early stage transplantation of hucMSC-Exo ameliorates hepatic fibrosis induced by  $\text{CCl}_4$  in rats, which may be induced by suppressing HSCs activation and the synthesis and secretion of collagen.

**【Key words】** Human umbilical cord mesenchymal stem; Exosomes; Hepatic stellate cell; Hepatic fibrosis

目前,全球约有 8.41 亿慢性肝病患者,成为世界各国的巨大的社会和经济负担。若得不到及时有效的治疗,大部分慢性肝病可能进展为肝纤维化,甚至肝硬化<sup>[1]</sup>。肝纤维化是由各种损伤因素,如肝炎病毒、酒精、肝毒性药物等诱发的肝细胞外基质过度沉积、肝组织结构破坏和功能受损的一种病理过程<sup>[2]</sup>。肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)在肝纤维化启动和进展中起到核心作用,其激活并分泌大量胶原蛋白是这一病理过程的关键环节,抑制 HSCs 激活或促进其转分化是研发抗肝纤维化药物的关键<sup>[3]</sup>。当前,肝纤维化的治疗仍是以病因治疗为基础,结合生活方式干预及保肝类药物,其核心目的是延缓肝纤维化进程。随着研究的深入,人们开始重视慢性疾病早筛查和早干预,倡导疾病防

治的关口前移。据此,聚焦肝纤维化始动因素,阻断其早期病理环节意义重大<sup>[4]</sup>。

近年来,干细胞来源外泌体(exosomes, Exo)在肝纤维化治疗中的潜力受到广泛关注<sup>[5-6]</sup>。外泌体是一种直径为 30~150 nm 的细胞外囊泡,具有脂质双层膜结构,内部携带蛋白质、脂质、核酸(miRNA、mRNA、DNA)等生物活性分子,能在细胞间传递信息,参与多种生理和病理过程,被形象比喻为“细胞间快递员”<sup>[7-8]</sup>。研究表明,间充质干细胞来源外泌体富含免疫调节相关蛋白和抗炎、抗纤维化作用的非编码 RNA,具有抗炎、抗氧化、抗纤维化和促进组织修复能力,在肝纤维化治疗中具有广阔的应用前景<sup>[9]</sup>。本文报道人脐带间充质干细胞来源-Exo(human umbilical cord mesenchymal stem

cell-derived exosomes, hucMSC-Exo) 在早期阶段使用,对  $\text{CCl}_4$  诱导小鼠有防治肝纤维化的作用,并通过体内、体外实验初步探讨其对 HSCs 活化的影响,以期 hucMSC-Exo 防治肝纤维化的开发和应用提供基础研究资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

hucMSCs 由北京老年医院妇科馈赠(第2代脐带间充质干细胞)。人肝星状细胞系 LX-2 (CCTCC00664) 购自国家生物医学实验细胞资源库。实验小鼠选用5周龄雄性 C57BL/6J 小鼠[体质量( $20 \pm 2$ )g],购自北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证号: SCXK(京)2021-0006]。间充质干细胞无血清培养基(NC0103)及添加剂 I(NC0103)、添加剂 II(NC0105)购自上海逍鹏生物公司。干细胞标志物流式细胞抗体 CD90 (cat.328107)、CD73 (cat.344005)、CD105 (cat.323207)、CD45 (cat.368531)、CD34 (cat.343515)、HLA-DR (cat.327005) 购自美国 Biolegend 公司及外泌体生物标志物 CD9 (bs-2489R)、CD81 (bs-6934R) 购自兰博利德生物公司。 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)一抗(ab124964)、I型胶原(collagen type I, Collagen-I)一抗(ab316222)、山羊抗兔 IgG 荧光二抗(Alexa 488, ab150077) 购自北京索莱宝生物公司、Lamin B 一抗(ab229025) 购自英国 Abcam 公司。小鼠血清天冬氨酸氨基转移酶(aspartate transaminase, AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)检测试剂盒、层粘连蛋白(laminin, LN)(KT30877-A)、透明质酸(hyaluronic acid, HAase)(KT30890-A)、IV型胶原(collagen type IV, Collagen-IV)(KT2297-A)、III型前胶原(procollagen type III, PC-III)(KT31017-A)酶联免疫法检测试剂盒购自江苏科特生物科技有限公司。转化生长因子- $\beta_1$ (transforming growth factor- $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ )、DMEM、细胞培养瓶、细胞培养板、细胞核荧光标记 Dapi、ECL 化学发光试剂盒等常规试剂和耗材购自北京拜耳迪生物技术有限公司。所有操作均经北京中医药大学实验动物伦理委员会批准(2023032901-1143)。

透射电镜(JEM-ACE200F, 日本 JEOL 公司), 纳米颗粒跟踪分析仪(NanoFCM, 厦门福流生物), 流式细胞仪(Attune NXT, 美国 Thermo Fisher

Scientific 公司), 荧光显微镜(Leica DM2000, 德国徕卡公司), 光学显微镜(Olympus BX53, 日本奥林巴斯公司), 酶联免疫(Biotek 800TS, 美国博腾公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 脐带间充质干细胞及其外泌体制备与鉴定

hucMSCs 通过流式细胞术分析对其进行表征。当细胞培养至第4代(P4)时收集细胞并用荧光标记抗体(包括 CD90、CD73、CD105、CD45、CD34 和 HLA-DR)孵育,依照常规流程进行流式细胞术检测。

从第4代 hucMSCs 细胞中分离获得外泌体并命名为 hucMSC-Exo。当细胞融合度达到 70 % 时,弃掉培养基并用 PBS 清洗细胞 3 次,随后加入无外泌体完全培养基持续培养 48 h,培养结束后收集培养基用于外泌体提取。

外泌体提取步骤如下:收集细胞培养液并用 0.22  $\mu\text{m}$  过滤器过滤培养基,去除细胞碎片和大颗粒;用差速离心法去除培养液内杂质( $300 \times g$ , 离心 10 min  $\rightarrow 2\,000 \times g$ , 离心 20 min  $\rightarrow 10\,000 \times g$ , 离心 30 min);上清液转移至新离心管并采用超速离心分离外泌体( $100\,000 \times g$ , 离心 70 min,  $4^\circ\text{C}$ ),用 PBS 缓冲液重悬沉淀、清洗,进行第2轮超速离心( $100\,000 \times g$ , 离心 70 min,  $4^\circ\text{C}$ ),获取纯化外泌体。所得外泌体通过 Western blot 实验、纳米颗粒追踪分析以及透射电子显微镜进行鉴定。

#### 1.2.2 肝纤维化小鼠模型制备

将 30 只 C57BL/6J 小鼠,体质量( $20 \pm 2$ )g,依照本课题组常规方法行“ $\text{CCl}_4$ -橄榄油”混合液灌胃法制备肝纤维化模型<sup>[9]</sup>。 $\text{CCl}_4$  与橄榄油按 1:3 比例混匀(现用现配),灌胃量 4 mL/kg,每周 2 次,持续 8 周。另有 10 只小鼠作为空白对照组,灌胃相同条件的橄榄油(每周 2 次,持续 8 周)。造模期间,小鼠饲喂普通饲料,自由饮食、饮水。

#### 1.2.3 分组及干预方案

小鼠分为 4 组:正常对照组、模型组、hucMSC-Exo 干预组和秋水仙碱干预组(阳性对照组),每组 10 只。干预方案简述如下:从造模第 4 周起开始干预,在造模的同时,阳性药对照组小鼠灌胃 2.5 % 秋水仙碱水溶液(灌胃量 0.5 mL/只,给药量 0.01 mg/100 g 体质量),每日 1 次,共干预 4 周;hucMSC-Exo 干预组尾静脉注射外泌体( $300\,\mu\text{g}/100\,\text{g}$  体质量<sup>[10]</sup>),每周 1 次,共干预 4 周。肝纤维化模型组小鼠持续灌胃  $\text{CCl}_4$ -橄榄油混合液。

空白对照组小鼠持续灌胃橄榄油并给与生理盐水模拟干预实验(0.5 mL/只,给药方式同治疗组)。实验流程如图1所示。

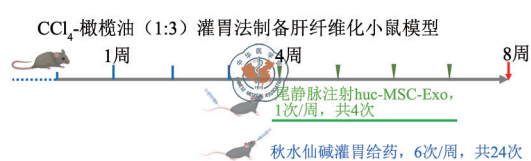


图1 hucMSC-Exo 干预  $\text{CCl}_4$  诱导的肝纤维化实验流程

#### 1.2.4 小鼠血清生化分析

各组小鼠麻醉后,经眼内眦采血、分离血清。采用生化试剂盒检测小鼠 AST、ALT 含量,评价小鼠肝功能。采用 ELISA 试剂盒检测血清中肝纤维化相关指标 LN、HAase、Collagen-IV 及 PC-III 的含量,用酶标仪在 450 nm 波长处测定各样品的 OD 值,根据不同浓度标准品对应的 OD 值绘制标准曲线并拟合直线回归方程,将样品 OD 值代入直线方程,计算出各样品加样浓度。综合模型组动物死亡、部分样本检测数据偏差大等因素,每组选取 6 个样本数进行数据分析。

#### 1.2.5 肝组织病理学检测

各组小鼠肝组织经 10% 福尔马林固定、梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、石蜡切片,常规 HE 染色和 Masson 染色,普通光镜观察并摄片,应用 ImageJ 图像分析软件圈选并计算图片上的蓝染区的积分光密度值。

#### 1.2.6 肝组织 $\alpha$ -SMA 及 Collagen-I 蛋白表达免疫组化检测

肝组织石蜡切片采用常规“二步法”免疫组化染色、DAB 显色,标记肝组织中  $\alpha$ -SMA 及 Collagen-I 的表达和分布,光镜观察、摄片,应用 ImageJ 图像分析软件圈选并计算图片上的棕色区(DAB 阳性显色),求其积分光密度值。

#### 1.2.7 外泌体抑制人肝星形细胞 LX-2 活化的离体实验

体外培养人肝星状细胞系 LX-2,接种于 24 孔板内( $2 \times 10^6$  个/孔),分为 3 个处理组:空白对照组、TGF- $\beta_1$  诱导 LX-2 活化组和 TGF- $\beta_1$  诱导+hucMSC-Exo 干预组(450  $\mu\text{L}$  无血清培养基中添加 50  $\mu\text{L}$  hucMSC-Exo),每个处理设置 3 个复孔,用于 Western blot 实验;同时,每个处理另设置 2 个复孔用于细胞爬片、免疫荧光检测。

免疫荧光检测: TGF- $\beta_1$  孵育浓度为 5 ng/mL,

孵育时间为 48 h。干预结束,细胞爬片用 4% 多聚甲醛固定 15 min,0.5% TritonX-100 孵育 10 min,5% BSA 封闭 1 h,  $\alpha$ -SMA 一抗孵育过夜(4 $^{\circ}\text{C}$ ),荧光二抗避光孵育 2 h, DAPI 染细胞核,封片,荧光显微镜观察、摄片。

Western blot 实验: LX-2 细胞裂解液用  $1500 \times g$ , 10 min 离心(4 $^{\circ}\text{C}$ )离心获取上清液,经 BCA 法蛋白定量、变性、SDS-PAGE、转膜、 $\alpha$ -SMA、Collagen-I 一抗及二抗孵育、ECL 法显色,蛋白条带经 ImageJ 图像分析、计算不同处理组  $\alpha$ -SMA 和 Collagen-I 蛋白 Western blot 条带的灰度值、计算其与内参 Lamin B 的比值。

#### 1.3 统计学分析方法

采用 SPSS22.0 软件进行统计学分析,血清生化指标、肝组织和 LX-2 中的  $\alpha$ -SMA 和 Collagen-I 蛋白表达水平、肝组织中细胞外基质水平等以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- $t$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 hucMSCs 和 hucMSC-Exo 表征

倒置显微镜下可见,扩增后的 hucMSCs 生长状态良好,细胞形态呈长梭形,漩涡状生长(图 2a);流式细胞术检测结果显示:体外培养的干细胞 CD90、CD73 和 CD105 均呈强阳性表达,白细胞标记 CD45、原始造血祖细胞/内皮细胞标记 CD34、干细胞非激活标记 HLA-DR 呈阴性(图 2b),表明体外培养的 hucMSCs 具有 MSCs 的典型特征和分子标记。

经透射电镜观察、粒径分析及表面标志物检测,从 hucMSCs 培养液中提取的外泌体,膜结构完整,形态呈“杯托”状(图 3a);外泌体平均粒径为 142 nm,浓度为  $5.5 \times 10^{11}$  个/mL(图 3b)。Western blot 结果显示,外泌体标志蛋白 CD9 和 CD81 呈高表达(图 3c),表明提取、制备的外泌体质量达标,可用于后续的实验研究。

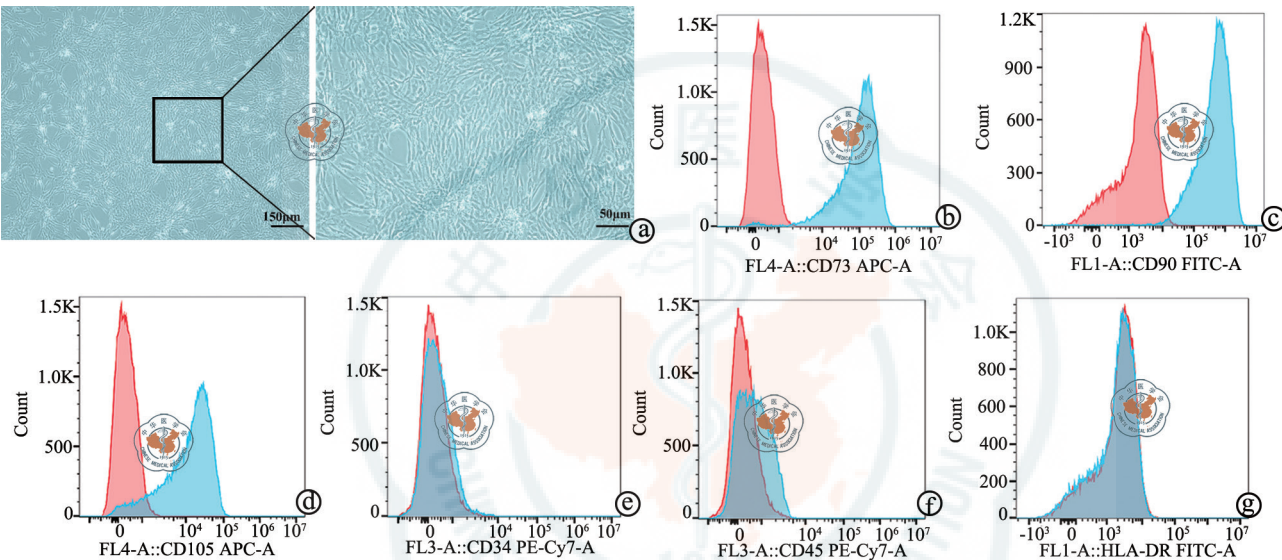
### 2.2 肝功能和肝纤维化标志物血清生化检测结果

与正常对照组比较,肝纤维化模型组小鼠血清 AST、ALT 水平均增高( $P$  均  $< 0.01$ );与模型组比较,秋水仙碱干预组和 hucMSC-Exo 干预组小鼠血清 AST、ALT 水平均呈下降趋势( $P$  均  $< 0.01$ )。肝纤维化标志物检测结果显示,与正常对照组比较,肝纤维化模型组小鼠血清 LN、Collagen-IV、PC-III 及

HAase 水平均升高 ( $P$  均  $< 0.01$ ); 与模型组比较, hucMSC-Exo 干预组小鼠血清 LN、Collagen- IV、PC- III 及 HAase 水平均呈下降趋势 ( $P$  均  $< 0.01$ ); 秋水仙碱干预组除 Collagen- IV 水平下降外, 其余 3 项指标 (LN、PC- III、HAase) 差异均无统计学意义 ( $P$  均  $> 0.05$ )。(表 1)

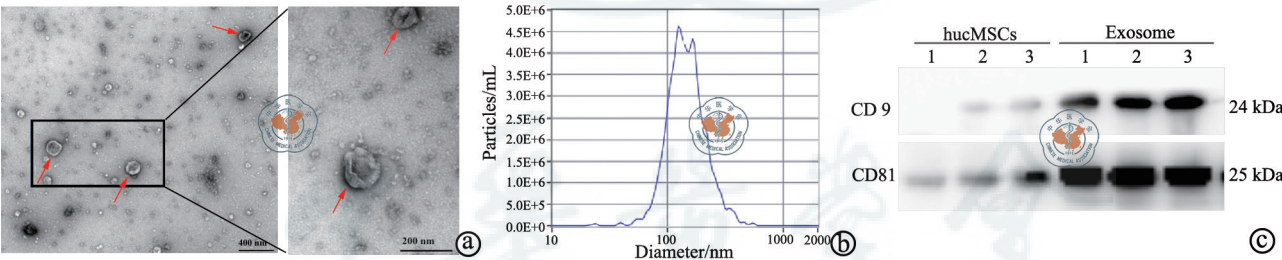
2.3 肝组织病理学检测结果

肝组织 HE 染色结果显示: 正常对照组肝细胞形状规则, 细胞核结构清晰, 大小一致, 沿中央静脉成放射状紧密排列, 汇管区结构清晰, 无炎性细胞浸润。模型组肝细胞排列紊乱、细胞核出现变形, 中央静脉及汇管区周围有明显的炎性细胞浸润, 正常肝



注: a 图为倒置显微镜观察体外培养活体状态人脐带间充质干细胞形态特征, 标尺为 150  $\mu\text{m}$ ; b ~ g 图为流式细胞术检测 CD73、CD90、CD105 及 CD34、CD45、HLA-DR 的表达水平

图 2 脐带间充质干细胞表征结果



注: a 图为透射电镜观察人脐带间充质干细胞来源外泌体(杯托样结构)代表性照片, 标尺 400 nm; b 图为粒径检测(平均 142 nm)代表性结果; c 图为 Western blot 检测膜标志蛋白 CD9 和 CD81 蛋白表达(1、2、3 为三个批次纯化样品)

图 3 人脐带间充质干细胞来源外泌体表征结果

表 1 小鼠血清生化检测结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| 分组             | ALT (U/L)                    | AST (U/L)                    | Collagen- IV ( $\mu\text{g/L}$ ) | PC- III ( $\mu\text{g/L}$ )   | HAase (ng/L)                    | LN ( $\mu\text{g/L}$ )           |
|----------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| 正常对照组          | 1.97 $\pm$ 0.46              | 1.80 $\pm$ 0.62              | 101.41 $\pm$ 9.97                | 13.89 $\pm$ 0.62              | 102.51 $\pm$ 4.37               | 728.01 $\pm$ 141.24              |
| 模型组            | 6.34 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup> | 7.11 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup> | 143.79 $\pm$ 6.71 <sup>a</sup>   | 18.39 $\pm$ 2.57 <sup>a</sup> | 187.58 $\pm$ 10.42 <sup>a</sup> | 950.86 $\pm$ 29.77 <sup>a</sup>  |
| hucMSC-Exo 干预组 | 3.17 $\pm$ 0.70 <sup>b</sup> | 2.91 $\pm$ 0.60 <sup>b</sup> | 116.38 $\pm$ 4.96 <sup>b</sup>   | 14.88 $\pm$ 0.83 <sup>b</sup> | 109.92 $\pm$ 11.32 <sup>b</sup> | 762.96 $\pm$ 120.45 <sup>b</sup> |
| 秋水仙碱干预组        | 2.99 $\pm$ 0.81 <sup>b</sup> | 2.19 $\pm$ 0.60 <sup>b</sup> | 123.00 $\pm$ 2.51 <sup>b</sup>   | 16.28 $\pm$ 0.92              | 166.61 $\pm$ 7.91               | 764.84 $\pm$ 95.24               |
| F 值            | 57.081                       | 112.102                      | 42.370                           | 10.721                        | 132.480                         | 5.501                            |
| P 值            | < 0.001                      | < 0.001                      | < 0.001                          | < 0.001                       | < 0.001                         | 0.010                            |

注: 与正常对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; ALT 为谷丙转氨酶, AST 为谷草转氨酶, HAase 为透明质酸酶, LN 为层粘连蛋白, Collagen- IV 为 IV 型胶原, Pc III 为 III 型胶原前体;  $n$  为动物数

小叶出现结构破坏,且肝板排列呈紊乱状态,纤维组织增生严重。与模型组比较,hucMSC-Exo和秋水仙碱干预组小鼠肝组织中炎性浸润细胞逐渐减少,肝小叶结构正常。Masson染色结果显示:正常对照组小鼠仅血管周围有部分蓝色淡染;模型组小鼠肝细胞间质出现明显纤维增生形成,肝小叶正常结构被破坏,形成假小叶;hucMSC-Exo和秋水仙碱干预组小鼠肝组织中纤维增生程度较模型组减轻,胶原纤维沉积减少。图像分析结果显示,与正常对照组比较,模型组小鼠肝组织中胶原纤维( $1\,133.69 \pm 429.13$ 比 $85.88 \pm 29.08$ )增多,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组比较,hucMSC-Exo干预组小鼠肝组织内胶原水平( $532.34 \pm 69.21$ 比 $1\,133.69 \pm 429.13$ )降低,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。(图4~5)

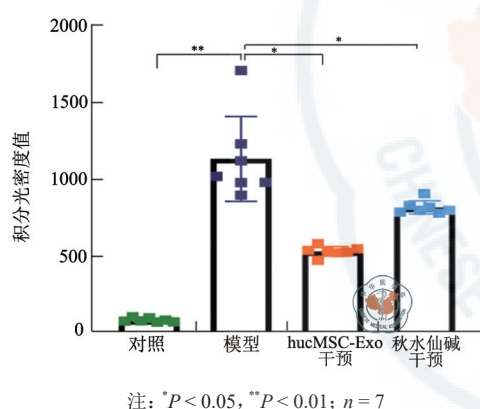


图4 Masson染色图像分析结果( $\times 200$ )

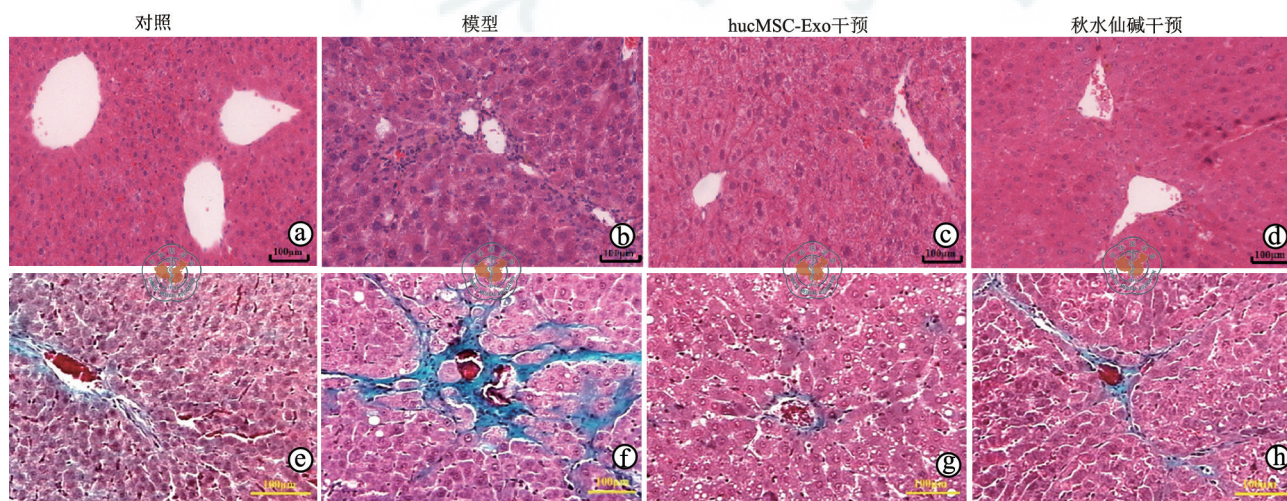
## 2.4 hucMSCs-Exo对星状细胞活化的影响

整体动物实验结果表明,正常对照组小鼠肝组织中 $\alpha$ -SMA呈弱阳性(图6a);肝纤维化模型小鼠

肝组织中 $\alpha$ -SMA的阳性反应较强,多分布在中央静脉周围(图6b);hucMSC-Exo和秋水仙碱干预组小鼠肝组织中 $\alpha$ -SMA的阳性反应降低(图6c~d)。图像分析结果显示(图6e),与正常对照组比较,模型组小鼠肝组织 $\alpha$ -SMA阳性反应的积分光密度( $2\,681.83 \pm 312.63$ 比 $359.60 \pm 49.18$ )增高;与模型组比较,hucMSC-Exo干预组 $\alpha$ -SMA积分光密度( $337.05 \pm 39.13$ 比 $2\,681.83 \pm 312.63$ )降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

应用免疫组化的方法检测小鼠肝组织中Collagen-I的表达结果:与正常对照组比较,肝纤维化模型小鼠肝组织中Collagen-I的阳性反应增强,且多分布于中央静脉周围、门管区周围(图7b);hucMSC-Exo和秋水仙碱干预组小鼠肝组织中Collagen-I的阳性反应降低(图7c~d)。图像分析结果(图7e),与正常对照组比较,模型组小鼠肝组织中Collagen-I积分光密度( $1\,022.57 \pm 102.13$ 比 $287.96 \pm 43.24$ )增高;与模型组比较,hucMSC-Exo干预组Collagen-I积分光密度( $479.24 \pm 86.25$ 比 $1\,022.57 \pm 102.13$ )降低,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。

离体细胞实验结果表明,5 ng/mL浓度的TGF- $\beta_1$ 可诱导LX-2中 $\alpha$ -SMA表达水平升高,提示其被激活并分化为肌成纤维细胞;而hucMSC-Exo干预可下调 $\alpha$ -SMA的表达,提示LX-2的分化作用被抑制。Western blot检测结果提示,与模型组比较,hucMSC-Exo干预可下调LX-2细胞中 $\alpha$ -SMA蛋白水平( $0.87 \pm 0.09$ 比 $1.01 \pm 0.34$ )和Collagen-I蛋白水平( $0.46 \pm 0.07$ 比 $0.75 \pm 0.22$ ),差异有统计学意义( $P$ 均 $< 0.05$ )。(图8~9)



注: a~d图为肝组织石蜡切片HE染色,标尺为100  $\mu$ m; e~h图为肝组织石蜡切片Masson染色,标尺为100  $\mu$ m

图5 光学显微镜下观察小鼠肝组织病理变化( $\times 200$ )

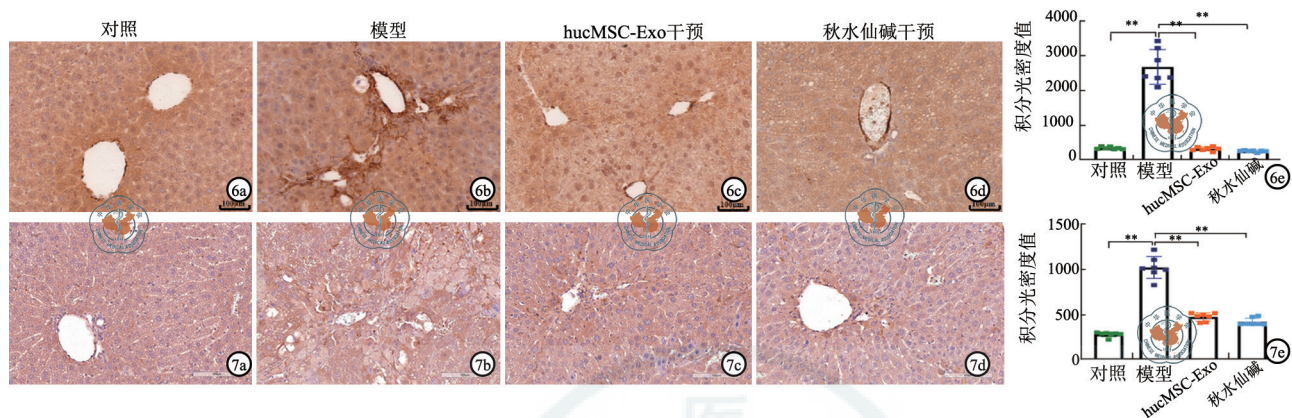
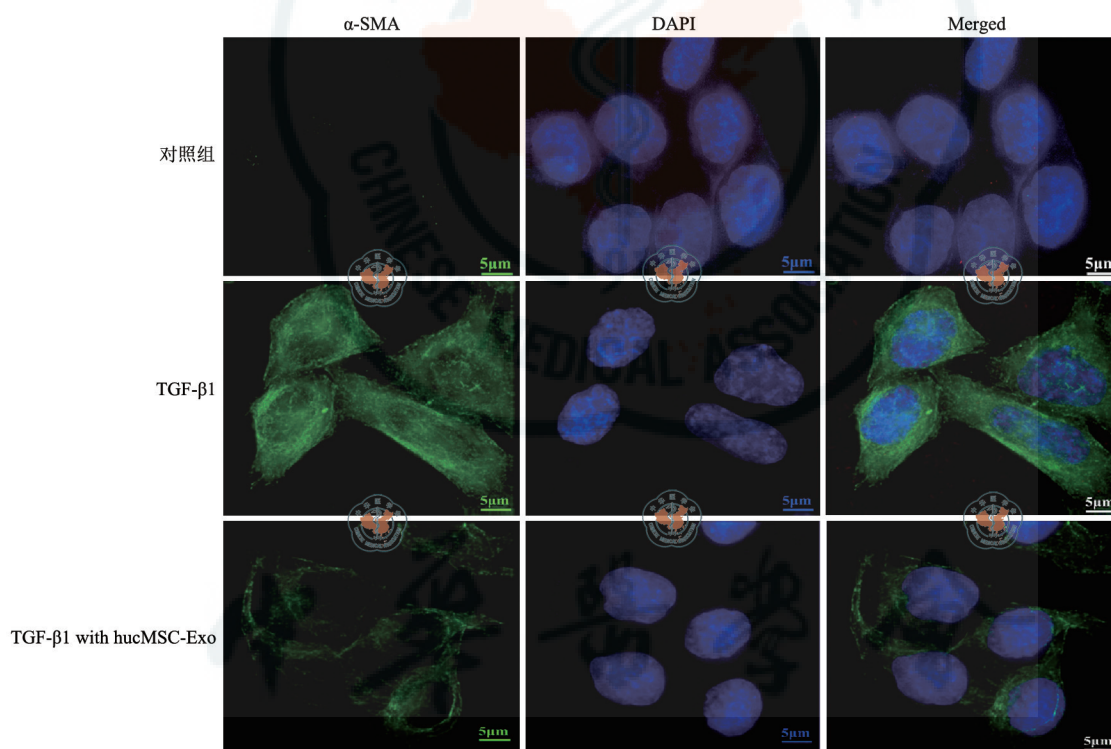


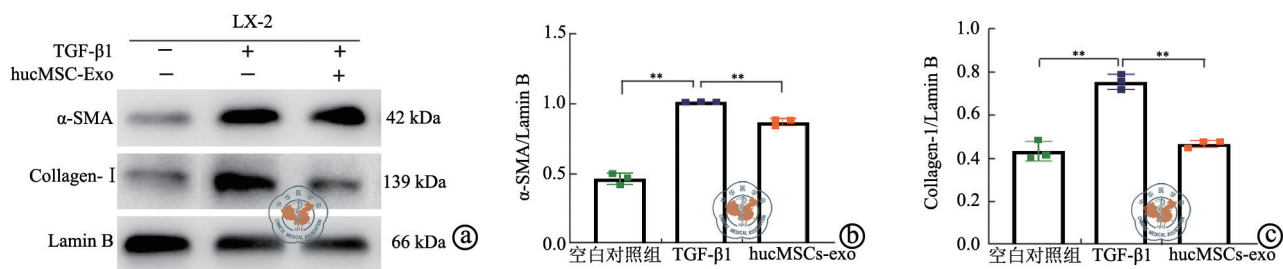
图6 光学显微镜下观察小鼠肝组织石蜡切片  $\alpha$ -SMA 免疫组化、DAB 显色结果 ( $\times 200$ )。 \*\* $P < 0.01$ ,  $n = 6$ , 标尺为  $100 \mu\text{m}$

图7 光学显微镜下观察小鼠肝组织石蜡切片 Collagen- I 免疫组化、DAB 显色结果 ( $\times 200$ )。 \*\* $P < 0.01$ ,  $n = 6$ , 标尺为  $100 \mu\text{m}$



注: 标尺为  $5 \mu\text{m}$

图8 荧光显微镜下观察 LX-2 细胞  $\alpha$ -SMA 表达 ( $\times 200$ )



注: \*\* $P < 0.01$ ,  $n = 3$

图9 hucMSC-Exo 体外抑制 LX-2 细胞活化的检测结果

### 3 讨论

目前, HSCs 活化被公认为肝纤维化的始动因素。活化后的 HSCs 可通过旁分泌 TGF- $\beta_1$  维持自身活化状态, 并且大量合成、分泌胶原蛋白 (Collagen-I, III, IV 等) 和  $\alpha$ -SMA, 最终广泛沉积在中央静脉周围、窦周隙、门管区周围及受损、坏死的肝组织区域, 发展成为肝纤维化<sup>[11-12]</sup>。为此, 活化后的 HSCs 被看作肝纤维化治疗的关键细胞靶标。越来越多的研究者报道了 hucMSC-Exo 治疗实验性肝纤维化的疗效及抑制 HSCs 活化的机制, 提示 hucMSC-Exo 治疗肝纤维化具有很好的开发前景<sup>[3-4,8-11]</sup>。与已有报道不同, 本研究聚焦肝纤维发生的早期阶段, 探究 hucMSC-Exo 对肝纤维化启动环节的干预效应。实验结果表明, hucMSC-Exo 治疗有效阻断 CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠肝纤维化, 抑制肝组织及体外培养的 HSCs 的活化, 下调其胶原合成和分泌。本研究为间充质干细胞外泌体预防或阻断肝纤维化早期病理进程提供新的实证资料, 也为进一步开展 hucMSC-Exo 防治肝纤维化作用机制的研究建立标准化实验条件和流程。

现有的基础和临床研究均证实, 间充质干细胞本身即可通过抑制 HSCs 活化、分化和增殖发挥抗肝纤维化的作用<sup>[13-14]</sup>, 然而受安全性、异质性和伦理等问题的影响, 推广应用受一定限制<sup>[15]</sup>。hucMSC-Exo 因其安全性高、生物活性高、免疫原性低和易获取等特性, 广泛用于抗肝纤维化的基础和临床研究。hucMSC-Exo 不仅携带有母本细胞的关键遗传信息, 还通过双层脂膜包装了非编码 RNA、细胞因子、信号分子等“货物”, 在细胞间通讯和功能调节中发挥广泛作用, 对肝缺血再灌注损伤、肝纤维化等均有改善作用<sup>[16]</sup>。如今, 行业内普遍认为, hucMSC-Exo 抗肝纤维化的机制可能与抗炎, 抑制免疫反应, 调节肝组织中各类细胞代谢重编程, 调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的生物学功能<sup>[17-18]</sup>, 改善肝损伤区域炎症和氧化应激过程<sup>[19]</sup>, 调节肝实质细胞及 HSCs 等非实质细胞的自噬水平<sup>[20]</sup>, 下调 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路、抑制肝组织内上皮间质转分化、干扰基质金属蛋白酶及抑制剂活性等有关<sup>[21]</sup>。此外, 研究者也希望用外泌体作为药物、非编码 RNA 及生物活性物质的递送载体, 尝试开发工程化外泌体用于肝脏疾病的治疗<sup>[22]</sup>。

然而, 外泌体相关研究也面临诸多挑战, 如大批量分离纯化技术不成熟、外泌体质控标准及标准化研究方法未建立、成药性和临床转化难度大等, 尚

需投入更多的基础研究, 积累更多实证资料。目前, 分离外泌体常用的技术主要有超速离心法、聚合沉淀法和尺寸排阻色谱法。尽管包括本文在内的大量文章均使用外泌体一词, 但是通过超速离心法分离获取的囊泡也混有其它非外泌体性质囊泡, 如蛋白质聚集体、脂蛋白颗粒、核酸-蛋白复合物、微泡体、凋亡小体等<sup>[23]</sup>。在后续研究中, 期望通过进一步限定细胞培养条件、优化分离制备流程、引入创新技术等最大限度提高外泌体产量和质量。

综上, 本研究的结果提示: 在肝纤维化发生的早期阶段实施 hucMSC-Exo 治疗, 可抑制/阻断肝纤维化的进程, 其初步机制与抑制 HSCs 活化、下调胶原合成和分泌有关。

本研究的不足: 本文仅报导 hucMSC-Exo 干预肝纤维化早期阶段的效应, 尚未深入揭示其抑制 HSCs 活化及胶原合成、分泌的分子机制, 也没能通过更多实验材料对 hucMSC-Exo 干预肝纤维化早期病理过程进行确证。未来需要通过外泌体示踪实验更明确其在体内的作用靶点, 以期将 hucMSC-Exo 开发成临床防治肝纤维化的新方式。

### 参 考 文 献

- 1 Marcellin P, Kutala BK. Liver diseases: A major, neglected global public health problem requiring urgent actions and large-scale screening[J]. *Liver Int*, 2018, 38 Suppl 1:2-6.
- 2 Altamirano-Barrera A, Barranco-Fragoso B, Méndez-Sánchez N. Management strategies for liver fibrosis[J]. *Ann Hepatol*, 2017, 16(1):48-56.
- 3 Akkız H, Gieseler RK, Canbay A. Liver fibrosis: from basic science towards clinical progress, focusing on the central role of hepatic stellate cells[J]. *Int J Mol Sci*. 2024, 25(14):7873. doi: 10.3390/ijms25147873.
- 4 Hou J, Wong VW, Qian Y, et al. Detecting early-stage liver fibrosis using macromolecular proton fraction mapping based on Spin-Lock MRI: preliminary observations[J]. *J Magn Reson Imaging*, 2023, 57(2):485-492.
- 5 Chen L, Brenner DA, Kisseleva T. Combatting fibrosis: exosome-based therapies in the regression of liver fibrosis[J]. *Hepatol Commun*, 2018, 3(2):180-192.
- 6 Yuan M, Yao L, Chen P, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells inhibit liver fibrosis via the microRNA-148a-5p/SLIT3 axis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 125(Pt A):111134. doi: 10.1016/j.intimp.2023.111134.
- 7 Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication[J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(1):9-17.
- 8 邓瑞锋, 程璐, 周宇林, 等. TGF- $\beta_1$  诱导骨髓间充质干细胞外泌体分泌 miR-424-3p 促进前列腺癌细胞增殖及转移 [J]. *中华腔镜泌尿外科杂志(电子版)*, 2024, 18(1):82-89.
- 9 周晓磊, 徐岩, 金煜, 等. 间充质干细胞外泌体抗肝纤维化的机制及其优化策略 [J]. *中国生物工程杂志*, 2024, 44(6):41-52.

- 10 Zong R, Zheng Y, Yan Y, et al. Mesenchymal stem cells-derived exosomes alleviate liver fibrosis by targeting Hedgehog/SMO signaling[J]. *Hepatology International*, 2024, 18(6):1781-1791.
- 11 Zhu D, Sun Z, Wei J, et al. BMP7-loaded human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles ameliorate liver fibrosis by targeting activated hepatic stellate cells[J]. *Int J Nanomedicine*, 2024, 19:3475-3495.
- 12 Hermansyah D, Putra A, Muhar AM, et al. Mesenchymal stem cells suppress TGF- $\beta$  release to decrease  $\alpha$ -SMA expression in ameliorating CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis[J]. *Med Arch*, 2021, 75(1):16-22.
- 13 Du QH, Zhang CJ, Li WH, et al. Gan Shen Fu Fang ameliorates liver fibrosis *in vitro* and *in vivo* by inhibiting the inflammatory response and extracellular signal-regulated kinase phosphorylation[J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(21):2810-2820.
- 14 Yang X, Li Q, Liu W, et al. Mesenchymal stromal cells in hepatic fibrosis/cirrhosis: from pathogenesis to treatment[J]. *Cell Mol Immunol*, 2023, 20(6):583-599.
- 15 孙慧聪, 张国尊, 郭金波, 等. 脐带源间充质干细胞移植治疗肝纤维化及肝硬化的相关机制 [J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(41):6638-6645.
- 16 Qin L, Liu N, Bao CL Mesenchymal stem cells in fibrotic diseases-the two sides of the same coin[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2023, 44(2):268-287.
- 17 冯啸, 陈良, 张琪, 等. 人脐带间充质干细胞来源的外泌体减轻肝脏缺血再灌注损伤及机制的初步研究 [J/CD]. *中华细胞与干细胞杂志 (电子版)*, 2017, 7(4):224-231.
- 18 Zhang Z, Shang J, Yang Q, et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells ameliorate hepatic fibrosis by inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway and remodeling choline metabolism[J]. *J Nanobiotechnology*, 2023, 21(1):29. doi:10.1186/s12951-023-01788-4.
- 19 Jiang W, Tan Y, Cai M, et al. Human umbilical cord MSC-derived exosomes suppress the development of CCl<sub>4</sub>-induced liver injury through antioxidant effect[J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018:6079642. doi: 10.1155/2018/6079642
- 20 Qu Y, Zhang Q, Cai X, et al. Exosomes derived from miR-181-5p-modified adipose-derived mesenchymal stem cells prevent liver fibrosis via autophagy activation[J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(10):2491-2502.
- 21 Hermansyah D, Putra A, Muhar AM, et al. Mesenchymal stem cells suppress TGF- $\beta$  release to decrease  $\alpha$ -SMA expression in ameliorating CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis[J]. *Med Arch*, 2021, 75(1):16-22.
- 22 Xu Y, Zhou X, Wang X, et al. Progress of mesenchymal stem cells (MSCs) & MSC-Exosomes combined with drugs intervention in liver fibrosis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 176:116848. doi: 10.1016/j.biopha.2024.116848.
- 23 Huang B, Cheng X, Wang H, et al. Mesenchymal stem cells and their secreted molecules predominantly ameliorate fulminant hepatic failure and chronic liver fibrosis in mice respectively[J]. *J Transl Med*, 2016, 14:45. doi: 10.1186/s12967-016-0792-1.

(收稿日期: 2024-12-16)

(本文编辑: 李少婷)

李雪铭, 伊诺, 卢智豪, 等. 人脐带间充质干细胞来源外泌体抑制肝星状细胞活化发挥抗肝纤维化作用的实验研究 [J/OL]. *中华细胞与干细胞杂志(电子版)*, 2025, 15 (3) :148-156.