·肝纤维化及肝硬化·

DOI: 10.12449/JCH260110

Numb基因过表达的人脐带间充质干细胞移植对胆汁淤积性肝纤维化的干预作用及其机制

张士豪[1], 赵长青[2], 杨明艳[1], 邢飞飞[1], 刘 伟[1], 陈高峰[1], 陈佳美[1], 刘 平[1], 慕永平[1,2]

1 上海中医药大学附属曙光医院肝病研究所, 上海 201203

2 上海中医药大学附属曙光医院肝病科, 上海 201203

通信作者: 慕永平, ypmu8888@126.com (ORCID: 0000-0002-6808-8243)

摘要: 目的 探讨Numb基因过表达的人脐带间充质干细胞(hUC-MSC)移植对胆汁淤积性肝纤维化(CLF)的干预作用及其机制。**方法** 采用慢病毒转染技术过表达hUC-MSC的Numb基因(hUC-MSC$^{Numb-OE}$),并以空载慢病毒转染的hUC-MSC(hUC-MSC^{OE-EV})为阴性对照。采用胆管结扎(BDL)建立CLF大鼠模型,随机分为BDL组、hUC-MSC组、hUC-MSC^{OE-EV}组和hUC-MSC$^{Numb-OE}$组,同时设有假手术组(Sham组)。各干预组于BDL后经脾脏一次性注射相应细胞,4周末取材。检测血清生化学、肝组织病理、肝组织羟脯氨酸(Hyp)水平、肝星状细胞活化、胆管反应、肝再生及Numb-p53信号轴关键分子的表达水平。计量资料多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验。**结果** 与BDL组比较,hUC-MSC组和hUC-MSC^{OE-EV}组血清生化学指标(天冬氨酸氨基转移酶、γ-谷氨酰转移酶、总胆汁酸、总胆红素和直接胆红素)、肝纤维化相关指标(Hyp、α-平滑肌肌动蛋白、肿瘤坏死因子-α和转化生长因子-β1)、胆管反应指标(细胞角蛋白7、细胞角蛋白19)均显著降低,差异有统计学意义(*P*值均<0.05);且hUC-MSC$^{Numb-OE}$组的上述指标较hUC-MSC^{OE-EV}组进一步改善,差异有统计学意义(*P*值均<0.05)。此外,与hUC-MSC^{OE-EV}组比较,hUC-MSC$^{Numb-OE}$组肝再生相关指标(白蛋白、肝细胞核因子4α)、Numb-p53信号轴相关分子(Numb、pNumb、Mdm2、p53)的表达水平均较hUC-MSC^{OE-EV}组显著改善,差异有统计学意义(*P*值均<0.05)。**结论** 过表达Numb基因可增强hUC-MSC对CLF的干预效果,其机制可能与激活Numb-PTB^{L}-p53-HNF4α轴,促hUC-MSC肝向分化,进而促进肝再生有关。

关键词: 肝纤维化; Numb基因; 脐带间充质干细胞; 胆管反应; Numb-PTB^{L}-p53-HNF4α轴

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82574932,81874390);上海市科委2022年度"科技创新行动计划"生物医药科技支撑专项(22S11901700);上海市自然科学基金项目(21ZR1464100);上海市临床重点专科建设项目(shslczdzk01201)

Effect and mechanism of transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells with overexpression of the Numb gene in treatment of cholestatic liver fibrosis

ZHANG Shihao[1], *ZHAO Changqing*[2], *YANG Mingyan*[1], *XING Feifei*[1], *LIU Wei*[1], *CHEN Gaofeng*[1], *CHEN Jiamei*[1], *LIU Ping*[1], *MU Yongping*[1,2]

1. Institute of Liver Diseases, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Department of Hepatology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Corresponding author: MU Yongping, ypmu8888@126.com (ORCID: 0000-0002-6808-8243)

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cell (hUC-MSC) with overexpression of the Numb gene in the treatment of cholestatic liver fibrosis (CLF). **Methods** The technique of lentiviral transfection was used to induce the overexpression of the Numb gene in hUC-MSC (hUC-MSC$^{Numb-OE}$), and hUC-MSC transfected with empty vector (hUC-MSC^{OE-EV}) was used as negative control. Bile duct ligation (BDL) was performed to establish a

rat model of CLF, and then the rats were randomly divided into BDL group, hUC-MSC group, hUC-MSC^{OE-EV} group, and hUC-MSC$^{Numb-OE}$ group, while a sham-operation group was also established. The rats in the intervention groups were given a single splenic injection of the corresponding cells after BDL, and samples were collected at the end of week 4. Related indicators were measured, including serum biochemistry, liver histopathology, the content of hydroxyproline (Hyp) in the liver, hepatic stellate cell activation, ductular reaction, liver regeneration, and the expression levels of key molecules in the Numb-p53 signaling axis. A one-way analysis of variance was used for comparison of continuous data between multiple groups, and the least significant difference *t*-test was used for further comparison between two groups. **Results** Compared with the BDL group, the hUC-MSC group and the hUC-MSC^{OE-EV} group had significant reductions in the levels of serum biochemical parameters (aspartate aminotransferase, gamma-glutamyl transpeptidase, total bile acid, total bilirubin, and direct bilirubin), liver fibrosis markers (the content of Hyp and the expression levels of alpha-smooth muscle actin, tumor necrosis factor-α, and transforming growth factor-beta 1), and ductular reaction markers (the expression levels of CK7 and CK19) (all P <0.05), and compared with the hUC-MSC^{OE-EV} group, the hUC-MSC$^{Numb-OE}$ group had significantly greater improvements in the above indicators (all P <0.05). In addition, compared with the hUC-MSC^{OE-EV} group, the hUC-MSC$^{Numb-OE}$ group had significant improvements in the expression levels of liver regeneration-related markers (albumin and hepatocyte nuclear factor 4α) and the molecules associated with the Numb-p53 signaling axis (Numb, pNumb, Mdm2, and p53) (all P <0.05). **Conclusion** Overexpression of the Numb gene can enhance the therapeutic effect of hUC-MSC on CLF, possibly by activating the Numb-PTB^{L}-p53-HNF4α axis, promoting the hepatic differentiation of hUC-MSCs and subsequently enhancing liver regeneration.

Key words: Hepatic Fibrosis; Numb Gene; Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell; Ductular Reaction; Numb-PTB^{L}-p53-HNF4α axis

Research funding: General Project of National Natural Science Foundation of China (82574932, 81874390); Special Project for Biomedical Science and Technology Support of the "Science and Technology Innovation Action Plan" of Shanghai Science and Technology Commission in 2022 (22S11901700); Shanghai Natural Science Foundation (21ZR1464100); Shanghai Key Specialty of Traditional Chinese Clinical Medicine (shslczdzk01201)

胆汁淤积性肝纤维化(cholestatic liver fibrosis，CLF)是由遗传缺陷、免疫反应失调[如原发性胆汁性胆管炎(primary biliary cholangitis，PBC)或原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis，PSC)]和胆管机械损伤等因素引起的胆汁生成、分泌或排泄障碍，导致肝组织损伤、炎症反应和纤维组织异常增生，最终可发展为肝硬化、肝衰竭甚至死亡[1]。慢性胆汁淤积可触发三大关键病理过程：胆管反应、肝星状细胞(hepatic stellate cell，HSC)活化和肝细胞再生障碍[2]。尽管熊去氧胆酸可延缓PBC肝纤维化进展并改善患者生存质量，但对疾病晚期或应答不佳者的疗效有限[3]。

近年来，间充质干细胞(mesenchymal stem cell，MSC)移植已成为肝硬化治疗研究的新热点[4]。研究已证实MSC移植后不仅可直接向肝细胞分化[5]，还可通过旁分泌作用改善微环境，参与肝损伤的修复[6]。然而，也有研究发现，MSC移植后可能分化为胆管上皮细胞和肌成纤维细胞，严重影响其治疗效能[7]。因此，如何精准调控MSC的分化方向，以提高其治疗肝硬化的效果，成为当前研究的关键问题。

Numb是一种重要的干细胞命运决定因子，对Notch信号通路具有负向调节作用，通过不对称有丝分裂拮抗Notch家族的膜受体，进而调控细胞的命运[8]。Numb调控干细胞分化的另一机制为竞争性结合E3泛素连接酶Mdm2，阻断其对p53的泛素化降解，从而维持p53蛋白稳定性，并调控干细胞分化与凋亡之间的平衡[9-10]。Numb的磷酸化是影响干细胞命运的关键调控事件[11]，这种修饰不仅破坏了Numb-p53轴的稳定性[10]，并且损害了Numb对Notch信号的抑制能力，导致干细胞的异常分裂和增殖[12]。此外，Numb磷酸化诱导的p53下调还可间接激活Notch信号传导[13]。本课题组前期研究发现，在PBC相关肝硬化患者的肝活检组织中，Numb蛋白水平约为健康人群的25%，这一现象在CLF动物模型中也得到证实[14-15]。进一步研究显示，在Numb敲除小鼠CLF模型中，门静脉周围肝祖细胞增殖及胆管反应增强，伴随肝纤维化程度加重[16]，提示Numb缺失是CLF进展的关键驱动因素。此外，本课题组前期研究表明，过表达Numb可阻断骨髓MSC向胆管细胞分化，并促进其向肝细胞分化，从而提高其抗肝纤维化的能力[14]。与

骨髓MSC相比，人脐带MSC（human umbilical cord mesenchymal stem cell，hUC-MSC）具有易获取、易扩增、强大的自我更新和分化能力，以及免疫原性低等优点[17]，提示其在治疗终末期肝病方面可能比骨髓MSC更具优势。然而，过表达Numb的hUC-MSC（hUC-MSC$^{Numb-OE}$）对CLF的干预作用及其机制尚不明确。因此，本研究旨在探讨hUC-MSC$^{Numb-OE}$移植对胆管结扎（bile duct ligation，BDL）诱导大鼠CLF进展的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料 临床级原代hUC-MSC由上海爱萨尔生物科技有限公司惠赠。慢病毒产品购自上海吉凯基因科技有限公司。实验所用抗体如下：肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）（ab307164）、转化生长因子-β1（transforming growth factor-β1，TGF-β1）（ab215715）、α-平滑肌肌动蛋白（smooth muscle actin α，α-SMA）（ab124964）、肝细胞核因子4α（hepatocyte nuclear factor 4α，HNF4α）（ab201460）、Numb（ab220362）购自英国abcam公司；pNumb（Ser276，4140S）、p53（1C12，2524T）购自美国CST公司；白蛋白（albumin，Alb）（sc271605）购自美国Stancruz公司；Mdm2（66511-1-Ig）、细胞角蛋白7（cytokeratin，CK7）（155391-1-AP）、CK19（10712-1-AP）和甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）（60004-1-Ig）购自美国Proteintech公司。

1.2 细胞慢病毒转染与鉴定 参照慢病毒产品说明书转染hUC-MSC，对转染后的细胞进行成骨、成脂诱导分化。简言之，将细胞接种于含15%胎牛血清的DMEM-L培养基的培养皿中。为诱导脂肪生成，待细胞完全融合后，更换为脂肪生成诱导溶液A。培养3 d后，更换为脂肪生成诱导溶液B，24 h后再换回诱导溶液A，如此交替循环。分化培养3周后，对细胞进行固定和封片，并通过油红O染色法观察脂滴形成情况，以评估脂肪分化效果。在成骨诱导实验中，当细胞达到约60%汇合度时，加入成骨诱导溶液，之后每3 d更换1次诱导液。分化4周后，固定细胞并进行封片，采用茜素红染色检测钙沉积情况，以评价成骨分化水平。最后采用流式细胞术鉴定表型。

1.3 实验动物 SPF级雄性SD大鼠30只（140~160 g），购自北京维通利华实验动物技术有限公司[实验动物生产许可证号：SCXK（京）2016-0006]。所有动物均在上海中医药大学实验动物中心饲养、造模和观察[实验动物使用许可证号：SYXK（沪）2014-0008]。

1.4 模型制备与分组干预 大鼠以3%戊巴比妥钠60 mg/kg腹腔注射麻醉，沿腹正中线开腹，结扎左、右肝管及胆总管。各细胞移植组于胆管结扎后立即抽取200 μL细胞悬液注射至脾脏，注射细胞数量为1×10^7/只。随机分为BDL组、hUC-MSC组、过表达hUC-MSC Numb基因的hUC-MSC$^{Numb-OE}$组、hUC-MSC阴性对照组（hUC-MSC^{OE-EV}组）。仅分离胆总管及左、右肝管后关腹的假手术组（Sham组）。4周末取材，留取血清及肝组织样本。

1.5 血清生化学检测 血清丙氨酸氨基转移酶（alanine aminotransferase，ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（aspartate aminotransferase，AST）、碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）和γ-谷氨酰转移酶（gamma glutamyltransferase，GGT）活性，以及总胆红素（total bilirubin，TBil）、直接胆红素（direct bilirubin，DBil）、间接胆红素（indirect bilirubin，IBil）、Alb和总胆汁酸（total bile acids，TBA）水平检测由上海中医药大学附属曙光医院临床医学检验中心完成。

1.6 肝组织病理染色 肝组织样本经石蜡包埋、切片后，经苏木精-伊红（hematoxylin and eosin，HE）及天狼星红胶原染色，观察肝组织学变化。

1.7 肝组织羟脯氨酸（hydroxyproline，Hyp）水平测定 按照试剂盒说明书，采用碱水解法测定肝组织Hyp水平。

1.8 免疫组化染色 组织切片脱蜡至水后，进行抗原修复，用3% H_2O_2室温避光孵育15 min，10%山羊血清室温封闭30 min，滴加一抗：α-SMA（1∶3 000）、CK7（1∶1 000）、CK19（1∶1 000）、Alb（1∶50）和HNF-4α（1∶1 000），于4 ℃孵育过夜。二抗室温孵育30 min，3，3'-二氨基联苯胺显色，苏木素对比染色，中性树胶封片，最后使用数字病理信息扫描仪进行扫描分析。

1.9 实时荧光定量聚合酶链式反应（real-time fluorescence quantitative PCR，RT-PCR） 采用Trizol法提取肝组织总RNA，引物由湖南艾克瑞生物工程有限公司合成。SYBR一步法RT-PCR反应条件如下：42 ℃ 15 min、95 ℃ 2 min、95 ℃变性15 s，40个循环，60 ℃延伸退火1 min。

1.10 蛋白质免疫印迹 使用RIPA缓冲液裂解肝组织总蛋白，4 ℃ 17 000×g离心10 min，测定上清液蛋白浓度，10%凝胶电泳，转移至PVDF膜，5%牛血清白蛋白封闭1 h，一抗4 ℃孵育过夜：TNF-α（1∶1 000），TGF-β1（1∶1 000），α-SMA（1∶3 000），HNF4α（1∶1 000），CK7（1∶500），CK19（1∶2 000），Alb（1∶500）、Numb（1∶1 000）、pNumb（1∶1 000）、Mdm2（1∶200）、p53（1∶1 000）和

GAPDH(1∶5 000)。二抗(1∶1 000)室温下孵育1 h，ECL法显影，使用Image J分析计算灰度值积分。

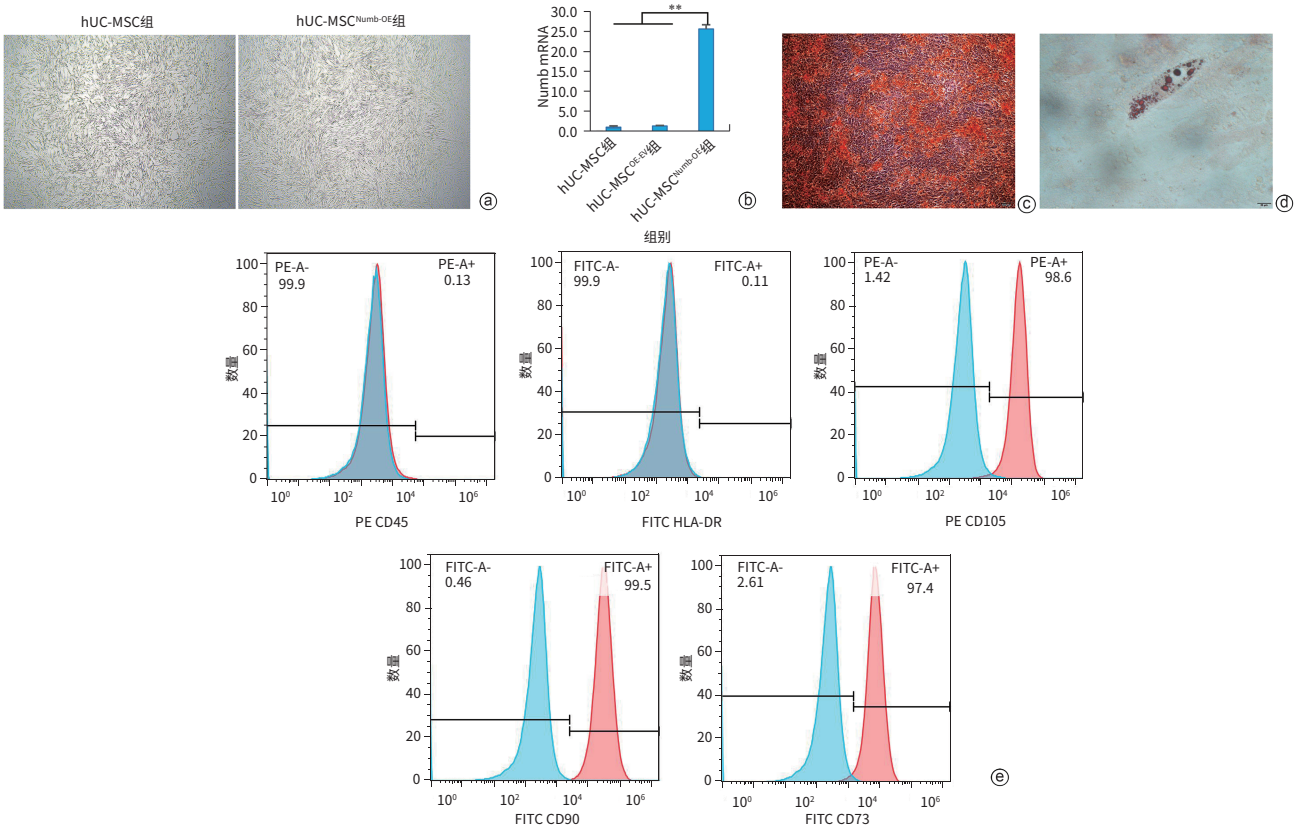
1.11 统计学方法 采用SPSS 25.0统计软件进行数据分析。计量资料用$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验，P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$的表型和分化潜能检测 光镜下观察显示，常规培养的hUC-MSC贴壁生长，单个细胞呈纺锤形；过表达Numb的hUC-MSC形态未有明显改变(图1a)。与hUC-MSC和hUC-MSC$^{OE\text{-}EV}$组比较，hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$组Numb的mRNA表达显著升高(P值均<0.01)(图1b)。成骨诱导可见hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$周围出现茜素红染色的钙结节样沉淀(图1c)，成脂诱导显示hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$出现空泡样脂滴，油红O染色后呈鲜红色(图1d)。流式细胞检测结果显示，hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$表面抗原CD45(-)、人类白细胞抗原(human leucocyte antigen，HLA)-DR(-)、CD105(+)、CD90(+)和CD73(+)(图1e)。

2.2 Numb过表达可提高hUC-MSC的抗肝纤维化效应 HE染色结果显示，BDL组大鼠肝脏可见大量胆管增生，肝小叶结构紊乱，汇管区见大量炎性细胞浸润并伴有纤维间隔形成；与BDL组比较，hUC-MSC、hUC-MSC$^{OE\text{-}EV}$组胆管细胞增生减少，炎性细胞浸程度明显减轻，且以上病理改变在hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$组进一步减轻(图2a)。血清生化检测结果显示，与Sham组比较，BDL组血清ALT、AST、ALP、GGT、TBA、TBil、DBil和IBil水平均显著升高(P值均<0.01)；与BDL组比较，hUC-MSC和hUC-MSC$^{OE\text{-}EV}$组的血清AST、ALP、GGT、TBA、TBil和DBil水平均显著降低(P值均<0.05)，且hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$组的血清ALT、AST、ALP、GGT、TBA、TBil、DBil和IBil水平均显著低于hUC-MSC$^{OE\text{-}EV}$组(P值均<0.05)(图2c)。

天狼星红胶原染色结果显示，BDL组大鼠肝脏以汇管区为中心出现大量胶原纤维沉积，部分形成完整的假小叶结构。与BDL组比较，hUC-MSC、hUC-MSC$^{OE\text{-}EV}$组胶原沉积明显减轻，且hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$组进一步减轻(图2b)。与组织病理相吻合，BDL组肝组织Hyp水平较



注：a，hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$镜下形态学观察(×50)；b，Numb的mRNA表达水平，**P<0.01；c，hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$成骨诱导(茜素红染色，×40)；d，hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$成脂诱导(油红O染色，×400)；e，hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$流式细胞鉴定。

图1 hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$细胞表型和分化潜能检测

Figure 1 Phenotype and differentiation potential detection of hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$

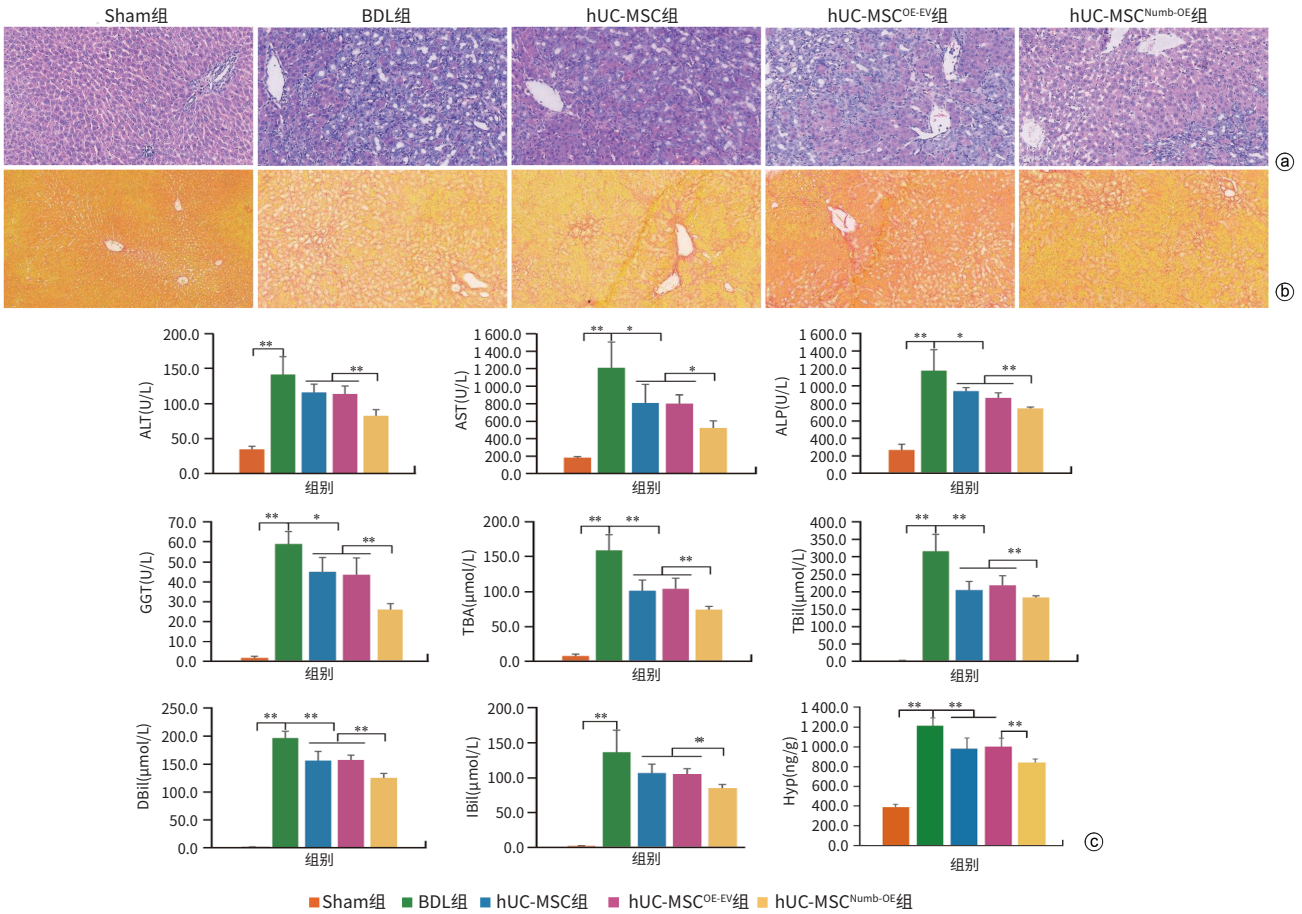
Sham组显著升高（P<0.01）；与BDL组比较，hUC-MSC、hUC-MSC$^{OE\text{-}EV}$组Hyp水平均显著降低（P值均<0.01）；且与hUC-MSC$^{OE\text{-}EV}$组比较，hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$组Hyp水平显著降低（P<0.01）（图2c）。提示Numb基因过表达可提高hUC-MSC移植对肝纤维化的干预效应。

2.3　Numb过表达可提高hUC-MSC移植对HSC活化的抑制效应　免疫组化染色显示，BDL组肝组织可见大量α-SMA阳性表达；与BDL组比较，hUC-MSC、hUC-MSC$^{OE\text{-}EV}$组α-SMA阳性表达均明显减少；且与hUC-MSC$^{OE\text{-}EV}$组比较，hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$组α-SMA阳性表达进一步减少（图3a）。与免疫组化染色结果相吻合，hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$组α-SMA的mRNA和蛋白水平均显著低于hUC-MSC$^{OE\text{-}EV}$组（P值均<0.01）（图3b~d）。

与Sham组比较，BDL组肝组织中TNF-α和TGF-β1的mRNA及蛋白表达水平显著升高（P值均<0.01）；与BDL组比较，hUC-MSC和hUC-MSC$^{OE\text{-}EV}$组上述指标表达水平均显著降低（P值均<0.05）；且与hUC-MSC$^{OE\text{-}EV}$组比较，hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$组的上述指标表达水平显著降低（P值均<0.05）（图3b~d）。提示Numb过表达可提高hUC-MSC对HSC活化的抑制作用。

2.4　Numb过表达可提高hUC-MSC移植对胆管反应的抑制效应　免疫组化染色显示，BDL组CK7和CK19阳性表达明显增加；与BDL组比较，hUC-MSC、hUC-MSC$^{OE\text{-}EV}$组CK7和CK19阳性表达明显减少，且此抑制效应在hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$组最为显著（图4a、b）。

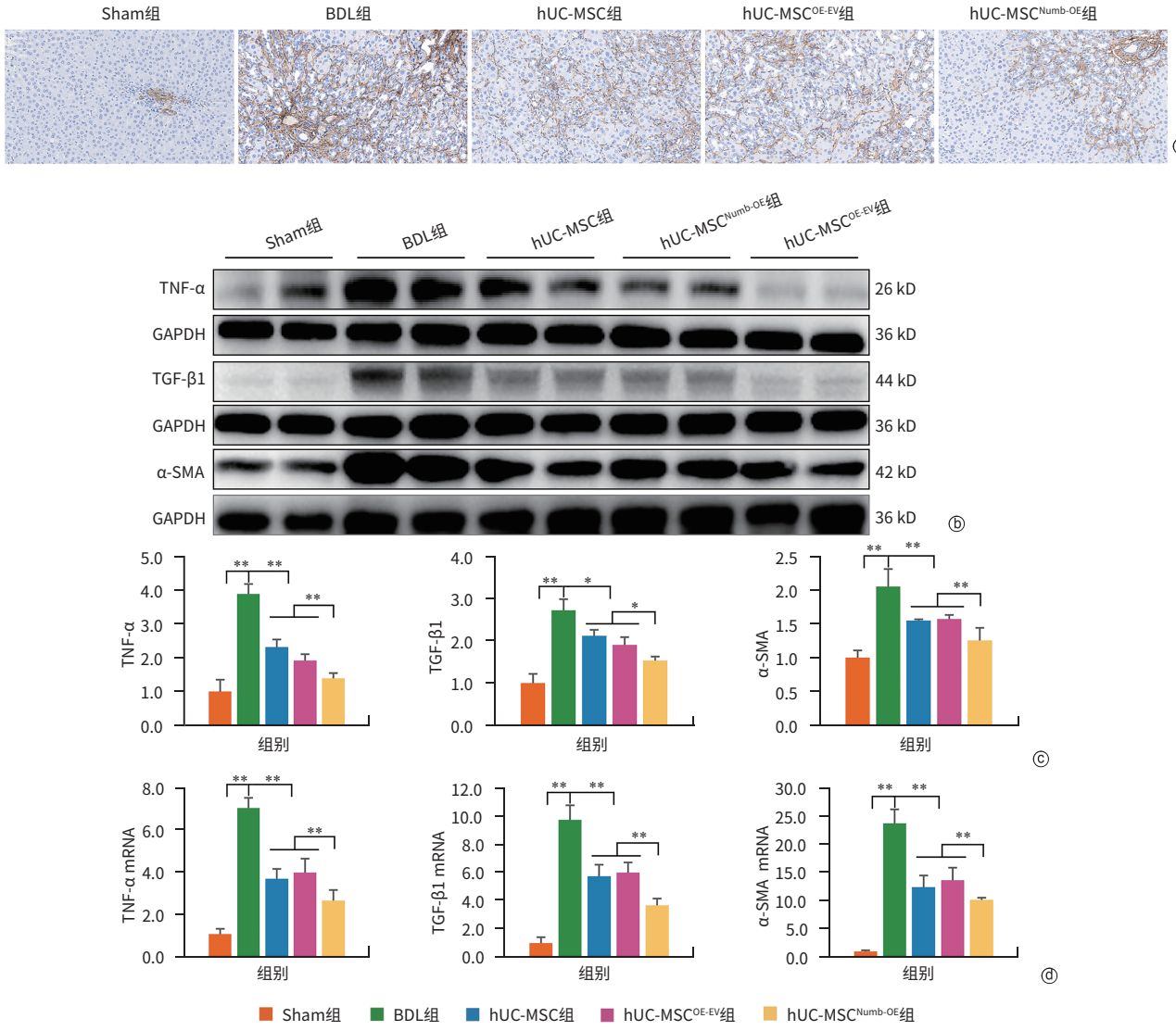
与Sham组比较，BDL组肝组织CK7、CK19蛋白和mRNA表达水平显著升高（P值均<0.01）；与BDL组比较，hUC-MSC、hUC-MSC$^{OE\text{-}EV}$组上述指标表达水平显著降低（P值均<0.05）；且与hUC-MSC$^{OE\text{-}EV}$组比较，hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$组上述指标表达水平显著降低（P值均<0.01）



注：a，苏木素-伊红染色（×100）；b，天狼星红胶原染色（×100）；c，血清生化指标和肝组织Hyp水平。ALT，丙氨酸氨基转移酶；AST，天冬氨酸氨基转移酶；ALP，碱性磷酸酶；GGT，γ-谷氨酰转移酶；TBA，总胆汁酸；TBil，总胆红素；DBil，直接胆红素；IBil，间接胆红素；Hyp，羟脯氨酸。*P<0.05，**P<0.01。

图2　hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$移植对肝脏炎症反应及肝纤维化的影响

Figure 2　Effect of hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$ transplantation on hepatic inflammation and fibrosis



注：a，α-SMA免疫组化染色（×200）；b，肝组织TNF-α、TGF-β1和α-SMA免疫印迹条带；c，TNF-α、TGF-β1和α-SMA免疫印迹条带灰度积分；d，TNF-α、TGF-β1和α-SMA的mRNA表达水平。TNF-α，肿瘤坏死因子-α；TGF-β1，转化生长因子-β1；α-SMA，α-平滑肌肌动蛋白；GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶。*P<0.05，**P<0.01。

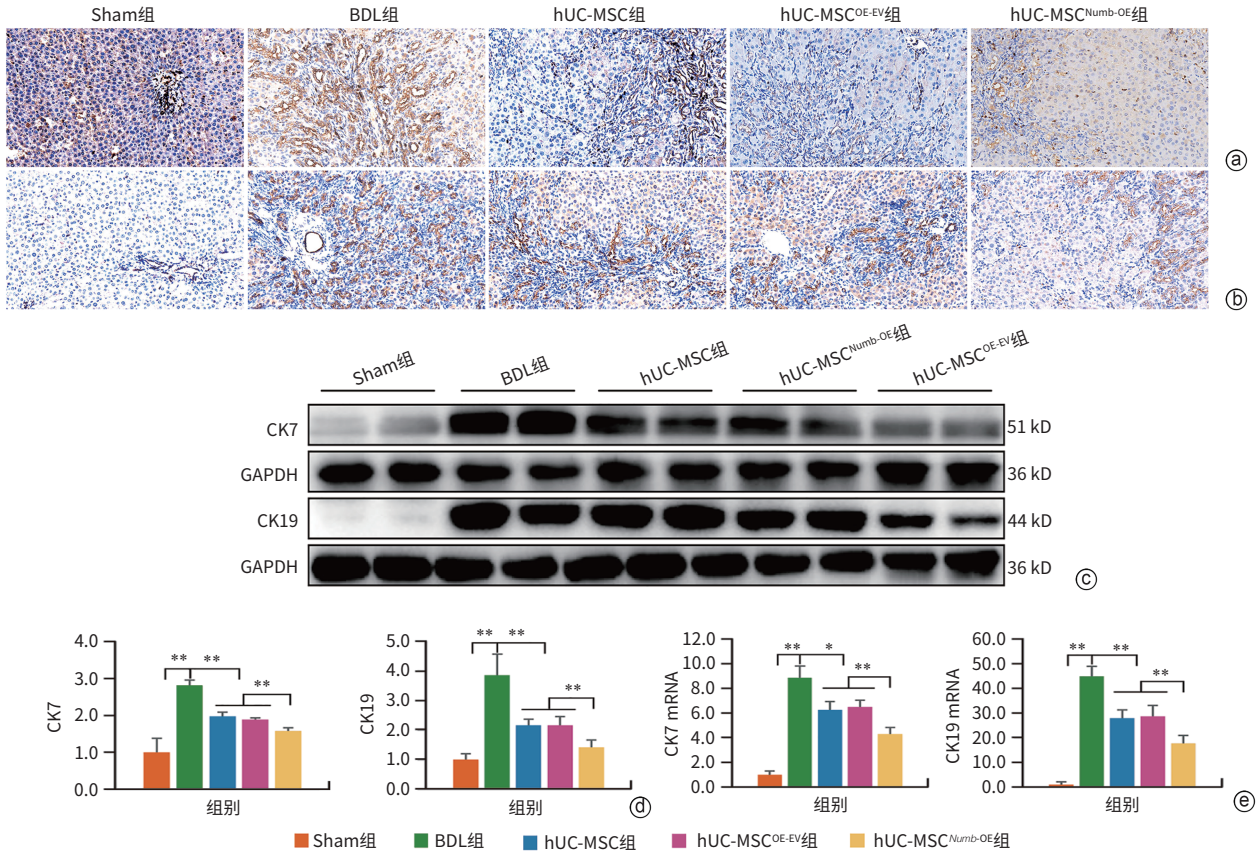
图3　hUC-MSC$^{Numb-OE}$移植对HSC活化的影响

Figure 3　Effect of hUC-MSC$^{Numb-OE}$ transplantation on hepatic stellate cell activation

（图4c~e）。提示Numb过表达可提高hUC-MSC移植对胆管反应的抑制作用。

2.5　Numb过表达激活hUC-MSC的Numb-PTB^{L}（Numb1/2）-p53-HNF4α轴，促进肝细胞增殖　免疫组化染色显示，Sham组大鼠肝组织中可见Alb和HNF4α广泛表达。与Sham组比较，BDL组Alb、HNF4α阳性表达明显减少；与BDL和hUC-MSC^{OE-EV}组比较，hUC-MSC$^{Numb-OE}$组Alb、HNF4α阳性表达明显增加（图5a、b）。

与Sham组比较，BDL组肝组织Alb、HNF4α蛋白和mRNA表达水平均显著降低（P值均<0.01）；与BDL组比较，hUC-MSC和hUC-MSC^{OE-EV}组Alb、HNF4α表达有升高趋势；但与hUC-MSC^{OE-EV}组比较，hUC-MSC$^{Numb-OE}$组Alb、HNF4α的表达水平以及血清Alb水平均显著增加（P值均<0.01）（图5c~e、i）。与Sham组比较，BDL组肝组织Numb1/2和p53蛋白表达均显著降低，Numb和p53的mRNA表达呈现相同趋势（P值均<0.01）；而pNumb蛋白、Mdm2蛋白及mRNA表达均显著升高（P值均<0.01）；与BDL组比较，hUC-MSC和hUC-MSC^{OE-EV}移植均可改善以上指标，且hUC-MSC$^{Numb-OE}$组显著优于hUC-MSC^{OE-EV}组（P值均<0.01）（图5f~h）。提示Numb过表达后可能通过激活Numb-PTB^{L}（Numb1/2）-p53-HNF4α轴，促hUC-MSC向肝细胞分化，进而促进肝再生。



注：a，CK7免疫组化染色（×200）；b，CK19免疫组化染色；c，CK7和CK19免疫印迹条带；d，CK7和CK19免疫印迹条带灰度积分；e，CK7和CK19的mRNA表达水平。CK7，细胞角蛋白7；CK19，细胞角蛋白19；GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶。*P<0.05，**P<0.01。

图4　hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$移植对胆管反应的影响

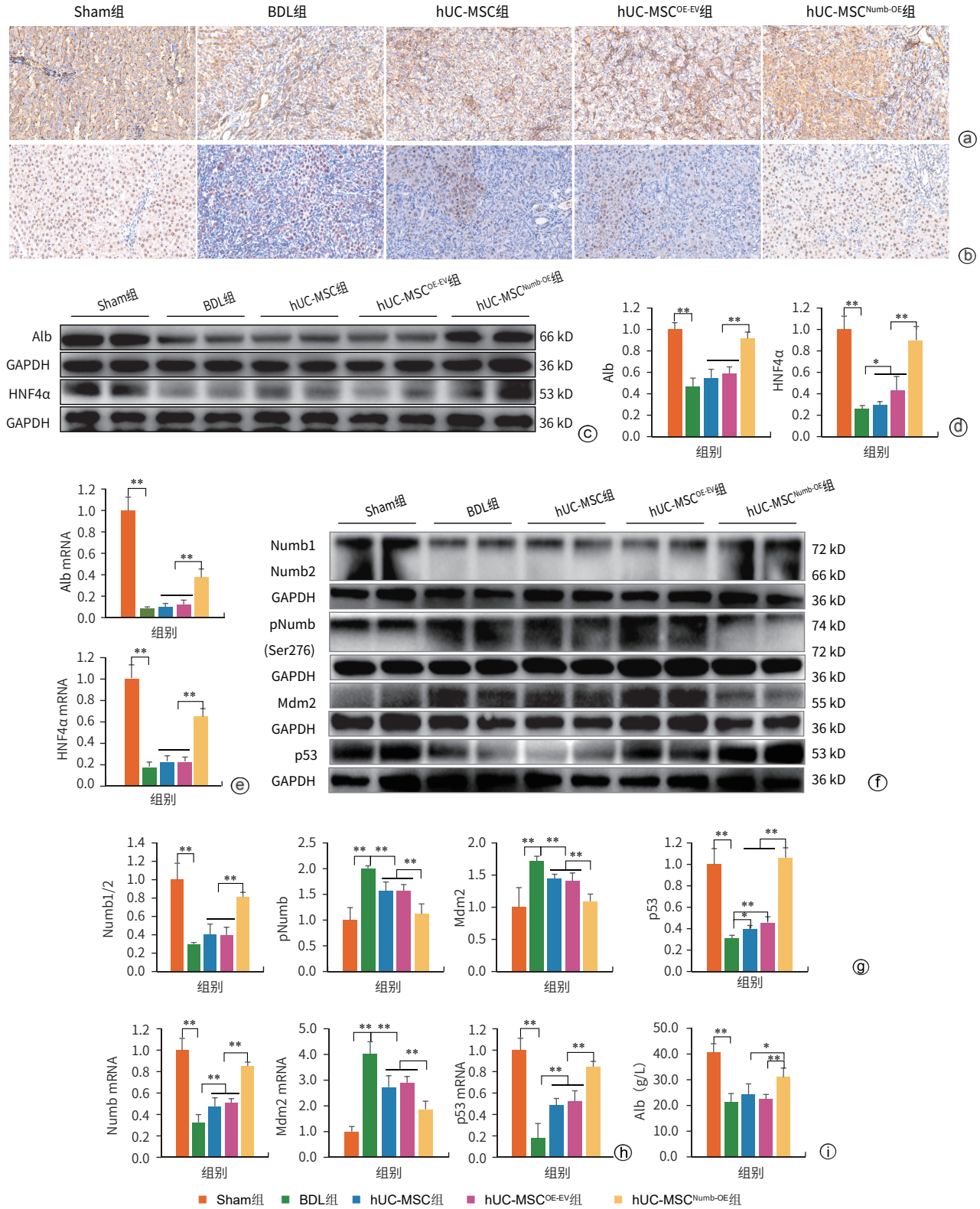
Figure 4　Effect of hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$ transplantation on ductular reaction

3　讨论

目前，多数研究已证实MSC移植治疗肝硬化的安全性和有效性，例如其可显著改善失代偿期肝硬化患者的Child-Pugh评分及生存率[18-19]。然而，亦有部分研究认为其对肝功能、肝脏胶原和Child-Pugh评分等指标无显著影响[20-21]。这一争议提示，MSC尚处在早期临床试验阶段，实现规范化应用仍有许多问题需要解决，包括归巢能力低下、存活周期短、向肝细胞分化能力不足以及潜在的致瘤风险等[22]。本研究将hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$移植至BDL诱导的CLF大鼠肝脏，结果显示过表达Numb可显著提高hUC-MSC的抗肝纤维化效应。

HSC活化是肝纤维化发生发展的关键细胞学基础，TNF-α和TGF-β1参与HSC活化及肝纤维化进展[23-24]。胆管反应是在胆管细胞受到持续的慢性炎症刺激时产生的胆管异常增生，CK7和CK19是其公认的标志物[25]。研究已证实，新生的胆管上皮细胞可分泌TNF-α、TGF-β1等多种促纤维化细胞因子，促进HSC活化为肌成纤维细胞，导致肝纤维化的发生与发展[26]。本研究表明，hUC-MSC、hUC-MSC$^{OE\text{-}EV}$和hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$移植后均可显著抑制肝组织CK7、CK19、α-SMA、TNF-α和TGF-β1的表达水平，尤以hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$组最为显著，提示Numb过表达可提高hUC-MSC对胆管反应及HSC活化的抑制效应。

值得关注的是，hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$移植后，可进一步提升其促进肝再生的生物学效应：血清Alb水平及肝组织Alb、HNF4α表达均显著上调，而hUC-MSC和hUC-MSC$^{OE\text{-}EV}$则无此作用。Alb作为肝细胞特异性分泌蛋白，其表达水平直接反映肝细胞功能状态；而HNF4α作为一种核转录因子，不仅是成熟肝细胞的标记，更在肝再生中发挥重要作用，其升高标志着肝再生程序的激活[27]。Xu等[28]的研究显示，HNF4α可通过调控p53通路有效抑制肝脏脂肪变性向脂肪性肝炎的转变，而这一作用在p53敲除模型中完全消失。目前，关于p53和



注：a，Alb免疫组化染色（×200）；b，HNF4α免疫组化染色（×200）；c，Alb、HNF4α免疫印迹条带；d，Alb、HNF4α免疫印迹条带灰度积分；e，Alb、HNF4α mRNA表达水平；f，Numb1/2、pNumb、Mdm2和p53免疫印迹条带；g，Numb1/2、pNumb、Mdm2和p53免疫印迹条带灰度积分；h，Numb、Mdm2和p53的mRNA表达水平；i，血清Alb水平。Alb，白蛋白；HNF4α，肝细胞核因子4α；GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶。*P<0.05，**P<0.01。

图5　hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$移植对肝细胞增殖及Numb1/2-p53轴的影响

Figure 5　hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$ transplantation on liver cell proliferation and Numb1/2-p53 axis

HNF4α在MSC分化中的作用机制尚未阐明。

本研究发现，hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$移植后，肝组织中p53蛋白表达水平较hUC-MSC$^{OE\text{-}EV}$组增加了约2倍，HNF4α蛋白表达亦同步增加了约2倍，提示Numb可能通过稳定p53蛋白激活HNF4α依赖性的肝再生程序。哺乳动物的Numb基因通过外显子3（Exon3，Ex3）和Ex9的选择性剪接产生4个Numb蛋白亚型（Numb1~4），Ex3编码位于Numb蛋白N端的11个氨基酸，剪接后产生2个不同的PTB（磷酸酪氨酸结合）结构域：一般将含Ex3编码区的Numb蛋白称之为长亚型（Numb-PTB^{L}，包括Numb1/2），不含Ex3编码区者称为短亚型（Numb-PTB^{S}，包括Numb3/4）。值得注意的是，Numb稳定p53与Ex3密切相关，其关键机制在于Numb-PTB结构域中的Ex3编码区与Mdm2直接结合，进而抑制Mdm2对p53的泛素化[10,29]。反之，Numb磷酸化会导致Numb-PTB^{L}（Numb1/2）功能下降，破坏p53的稳定性，使干细胞自我更新失控，分化为肿瘤细胞[30]。本研究结果显示，hUC-MSC$^{Numb\text{-}OE}$移植可显著提高肝脏Numb-PTB^{L}（Numb1/2）及p53的蛋白表达，显著降低pNumb及Mdm2的蛋白表达，在改善肝脏炎症反应及胆汁淤积、抑制胆管反应及HSC活化、促进肝再生等方面均显著优于野生型hUC-MSC。提示Numb过表达可提高hUC-MSC抗CLF效应的机制，可能与激活Numb-PTB^{L}-p53-HNF4α轴，促hUC-MSC肝向分化，进而促进肝再生有关。

综上所述，Numb过表达可提高hUC-MSC的抗CLF效应，其机制不仅与抑制HSC活化及胆管反应有关，且可能通过激活Numb-PTB^{L}-p53-HNF4α轴，促hUC-MSC向肝细胞分化，进而促进肝再生，相关机制有待深入研究。

伦理学声明：本研究方案于2023年10月20日经由上海中医药大学动物研究委员会批准，批号：PZSHUTCM2310200001，符合实验室动物管理与使用准则。

利益冲突声明：本文不存在任何利益冲突。

作者贡献声明：慕永平、赵长青、张士豪负责设计论文框架，起草论文；张士豪、杨明艳、邢飞飞、陈高峰负责实验操作，研究过程的实施；张士豪、赵长青负责数据收集，统计学分析，图表绘制；慕永平、张士豪负责论文修改；慕永平、刘平、刘伟、陈佳美负责拟定写作思路，指导撰写文章；慕永平负责最后定稿。张士豪和赵长青对本文贡献相同，同为第一作者。

参考文献：

[1] KISSELEVA T, BRENNER D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(3): 151-166. DOI: 10.1038/s41575-020-00372-7.

[2] FABRIS L, FIOROTTO R, SPIRLI C, et al. Pathobiology of inherited biliary diseases: A roadmap to understand acquired liver diseases [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(8): 497-511. DOI: 10.1038/s41575-019-0156-4.

[3] CORPECHOT C, CARRAT F, BONNAND AM, et al. The effect of ursodeoxycholic acid therapy on liver fibrosis progression in primary biliary cirrhosis[J]. Hepatology, 2000, 32(6): 1196-1199. DOI: 10.1053/jhep.2000.20240.

[4] LIANG J, ZHANG HY, ZHAO C, et al. Effects of allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in the treatment of liver cirrhosis caused by autoimmune diseases[J]. Int J Rheum Dis, 2017, 20 (9): 1219-1226. DOI: 10.1111/1756-185X.13015.

[5] CHEN Z, KUANG QT, LAO XJ, et al. Differentiation of UC-MSCs into hepatocyte-like cells in partially hepatectomized model rats[J]. Exp Ther Med, 2016, 12(3): 1775-1779. DOI: 10.3892/etm.2016.3543.

[6] DRISCOLL J, PATEL T. The mesenchymal stem cell secretome as an acellular regenerative therapy for liver disease[J]. J Gastroenterol, 2019, 54(9): 763-773. DOI: 10.1007/s00535-019-01599-1.

[7] LIU PY, MAO YC, XIE Y, et al. Stem cells for treatment of liver fibrosis/cirrhosis: Clinical progress and therapeutic potential[J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 356. DOI: 10.1186/s13287-022-03041-5.

[8] COUTURIER L, VODOVAR N, SCHWEISGUTH F. Endocytosis by Numb breaks Notch symmetry at cytokinesis[J]. Nat Cell Biol, 2012, 14(2): 131-139. DOI: 10.1038/ncb2419.

[9] SIDDIQUE HR, FELDMAN DE, CHEN CL, et al. NUMB phosphorylation destabilizes p53 and promotes self-renewal of tumor-initiating cells by a NANOG-dependent mechanism in liver cancer[J]. Hepatology, 2015, 62(5): 1466-1479. DOI: 10.1002/hep.27987.

[10] COLALUCA IN, TOSONI D, NUCIFORO P, et al. NUMB controls p53 tumour suppressor activity[J]. Nature, 2008, 451(7174): 76-80. DOI: 10.1038/nature06412.

[11] FILIPPONE MG, FREDDI S, ZECCHINI S, et al. Aberrant phosphorylation inactivates Numb in breast cancer causing expansion of the stem cell pool[J]. J Cell Biol, 2022, 221(12): e202112001. DOI: 10.1083/jcb.202112001.

[12] BALOGHOVA N, LIDAK T, CERMAK L. Ubiquitin ligases involved in the regulation of Wnt, TGF-β, and notch signaling pathways and their roles in mouse development and homeostasis[J]. Genes (Basel), 2019,10(10): 815. DOI:10.3390/genes10100815.

[13] ESPANOLA SG, SONG H, RYU E, et al. Haematopoietic stem cell-dependent Notch transcription is mediated by p53 through the Histone chaperone Supt16h[J]. Nat Cell Biol, 2020, 22(12): 1411-1422. DOI: 10.1038/s41556-020-00604-7.

[14] XU YN, XU W, ZHANG X, et al. BM-MSCs overexpressing the Numb enhance the therapeutic effect on cholestatic liver fibrosis by inhibiting the ductular reaction[J]. Stem Cell Res Ther, 2023, 14(1): 45. DOI: 10.1186/s13287-023-03276-w.

[15] ZHANG X, DU GL, XU Y, et al. Inhibition of Notch signaling pathway prevents cholestatic liver fibrosis by decreasing the differentiation of hepatic progenitor cells into cholangiocytes[J]. Lab Invest, 2016, 96(3): 350-360. DOI: 10.1038/labinvest.2015.149.

[16] SHU YK, XU Q, XU YH, et al. Loss of Numb promotes hepatic progenitor expansion and intrahepatic cholangiocarcinoma by enhancing Notch signaling[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(11): 966. DOI: 10.1038/s41419-021-04263-w.

[17] YU YB, SONG Y, CHEN Y, et al. Differentiation of umbilical cord mesenchymal stem cells into hepatocytes in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Mol Med Rep, 2018, 18(2): 2009-2016. DOI: 10.3892/mmr.2018.9181.

[18] SUK KT, YOON JH, KIM MY, et al. Transplantation with autologous

bone marrow-derived mesenchymal stem cells for alcoholic cirrhosis: Phase 2 trial[J]. Hepatology, 2016, 64(6): 2185-2197. DOI: 10.1002/hep.28693.
[19] SHI M, LI YY, XU RN, et al. Mesenchymal stem cell therapy in decompensated liver cirrhosis: A long-term follow-up analysis of the randomized controlled clinical trial[J]. Hepatol Int, 2021, 15(6): 1431-1441. DOI: 10.1007/s12072-021-10199-2.
[20] MOHAMADNEJAD M, ALIMOGHADDAM K, BAGHERI M, et al. Randomized placebo-controlled trial of mesenchymal stem cell transplantation in decompensated cirrhosis[J]. Liver Int, 2013, 33(10): 1490-1496. DOI: 10.1111/liv.12228.
[21] LANTHIER N, LIN-MARQ N, RUBBIA-BRANDT L, et al. Autologous bone marrow-derived cell transplantation in decompensated alcoholic liver disease: What is the impact on liver histology and gene expression patterns [J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1): 88. DOI: 10.1186/s13287-017-0541-2.
[22] WEI HY, LI FF, XUE TT, et al. microRNA-122-functionalized DNA tetrahedron stimulate hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells for acute liver failure therapy[J]. Bioact Mater, 2023, 28: 50-60. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2023.04.024.
[23] XU T, NI MM, XING-LI, et al. NLRC5 regulates TGF-β1-induced proliferation and activation of hepatic stellate cells during hepatic fibrosis[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2016, 70: 92-104. DOI: 10.1016/j.biocel.2015.11.010.
[24] ZHANG K, ZHANG MX, MENG XX, et al. Targeting GPR65 alleviates hepatic inflammation and fibrosis by suppressing the JNK and NF-κB pathways[J]. Mil Med Res, 2023, 10(1): 56. DOI: 10.1186/s40779-023-00494-4.
[25] CHOI SS, DIEHL AM. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver[J]. Hepatology, 2009, 50(6): 2007-2013. DOI: 10.1002/hep.23196.
[26] NOVO E, di BONZO LV, CANNITO S, et al. Hepatic myofibroblasts: A heterogeneous population of multifunctional cells in liver fibrogenesis[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(11): 2089-2093. DOI: 10.1016/j.biocel.2009.03.010.
[27] GUNEWARDENA S, HUCK I, WALESKY C, et al. Progressive loss of hepatocyte nuclear factor 4 alpha activity in chronic liver diseases in humans[J]. Hepatology, 2022, 76(2): 372-386. DOI: 10.1002/hep.32326.
[28] XU YY, ZHU YD, HU SW, et al. Hepatocyte nuclear factor 4α prevents the steatosis-to-NASH progression by regulating p53 and bile acid signaling (in mice)[J]. Hepatology, 2021, 73(6): 2251-2265. DOI: 10.1002/hep.31604.
[29] COLALUCA IN, BASILE A, FREIBURGER L, et al. A Numb-Mdm2 fuzzy complex reveals an isoform-specific involvement of Numb in breast cancer[J]. J Cell Biol, 2018, 217(2): 745-762. DOI: 10.1083/jcb.201709092.
[30] SU DX, LI YX, ZHANG WJ, et al. SPTAN1/NUMB axis senses cell density to restrain cell growth and oncogenesis through Hippo signaling[J]. J Clin Invest, 2023, 133(20): e168888. DOI: 10.1172/JCI168888.

收稿日期：2025-07-18；**录用日期**：2025-10-31
本文编辑：王莹

引证本文：ZHANG SH, ZHAO CQ, YANG MY, et al. Effect and mechanism of transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells with overexpression of the Numb gene in treatment of cholestatic liver fibrosis[J]. J Clin Hepatol, 2026, 42(1): 80-89.
张士豪, 赵长青, 杨明艳, 等. Numb基因过表达的人脐带间充质干细胞移植对胆汁淤积性肝纤维化的干预作用及其机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2026, 42(1): 80-89.

读者·作者·编者

《临床肝胆病杂志》常见异形词

异形词指的是:普通话书面语中并存并用的同音(本规范中指声、韵、调完全相同)、同义(本规范中指理性意义、色彩意义和语法意义完全相同)而书写形式不同的词语。现将本刊常见异形词整理如下(前者为推荐词形):

标志—标识	笔画—笔划	报道—报导	编者按—编者案
成分—成份	订阅—定阅	当作—当做	分量—份量
关联—关连	干预—干与	给予—给与	痼疾—固疾、锢疾
寄予—寄与	简练—简炼	精华—菁华	看作—看做
连接—联接	黏性—粘性	黏液—粘液	录像—录象、录相
图像—图象	影像—影象	缘故—原故	缘由—原由