

Đánh giá hiệu quả điều trị xơ gan của việc ghép tế bào gốc trung mô tủy xương trên mô hình chuột

Trương Hải Nhung^{1,2*}, Lê Văn Trinh¹, Nguyễn Hải Nam¹, Ngô Quốc Đạt³, Lê Minh Huy³
Huỳnh Nghĩa³, Nguyễn Văn Thanh⁴, Phạm Văn Phúc^{1,2}, Phan Kim Ngọc^{1,2}

¹Phòng thí nghiệm Nghiên cứu và ứng dụng tế bào gốc, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

²Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

³Trường Đại học Y dược TP Hồ Chí Minh

⁴Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 3.11.2015, ngày chuyển phản biện 10.11.2015, ngày nhận phản biện 11.12.2015, ngày chấp nhận đăng 21.12.2015

Trên thế giới, liệu pháp tế bào gốc cho thấy tiềm năng lớn trong các nghiên cứu điều trị bệnh xơ gan. Tuy nhiên, hiện nay vẫn chưa thống nhất phác đồ điều trị về nguồn tế bào, phương pháp tiêm, đồng thời ở nước ta chưa có các công bố về lĩnh vực này. Nhằm mục đích nghiên cứu phát triển liệu pháp mới trong điều trị xơ gan ở nước ta, các tác giả tiến hành gây tạo mô hình chuột xơ gan bằng CCl₄ và thử nghiệm tiêm 10⁶ tế bào gốc trung mô tủy xương để điều trị. Kết quả cho thấy, sau 21 ngày tiêm 10⁶ tế bào vào tĩnh mạch đuôi của chuột bị bệnh xơ gan, nhóm chuột điều trị phục hồi chỉ số Albumin từ 1,753±0,042 lên 2,116±0,120, giảm 9 lần biểu hiện các gen xơ hóa như *TGF*, giảm 13 lần *Procollagen*, giảm 3000 lần *Integrin*, giảm sự biểu hiện của collagen-1, SMAα và giảm diện tích các dải xơ trên hình thái mô học so với nhóm đối chứng.

Từ khóa: bệnh xơ gan, liệu pháp tế bào gốc, mô hình chuột xơ gan, tế bào gốc trung mô, tế bào gốc tủy xương.

Chỉ số phân loại 3.5

Giới thiệu

Xơ gan là tình trạng tổn thương gan mạn tính, dẫn tới hình thành những mô xơ xâm chiếm không gian của tế bào gan. Theo số liệu thống kê của Mokdad và cộng sự [1], chỉ trong năm 2010, xơ gan là nguyên nhân gây tử vong cho hơn một triệu người. Đồng thời, xơ gan còn là yếu tố nguy cơ cao của ung thư gan [2]. Hiện nay, y học vẫn chưa có liệu pháp điều trị khỏi bệnh xơ gan vì: (1) xơ hóa gan là quá trình kéo dài và rất khó phục hồi khi mô gan xuất hiện dải xơ [3]; (2) liệu pháp hóa trị phải duy trì sử dụng lâu dài và không mang lại hiệu quả cao do dùng thuốc giúp ức chế quá trình xơ hóa (anti-TGF, anti-PDGF) thì hoạt động chức năng gan khó hồi phục, dùng thuốc có tác dụng ức chế miễn dịch bảo vệ gan thì khó ngăn chặn sự tiến triển của xơ hóa [4], và dùng cả hai loại thuốc trên vẫn chưa cho thấy hiệu quả [5]; (3) ghép gan vẫn chưa giải quyết được do tình trạng thiếu hụt nguồn mô, nguy cơ thải loại sau ghép cao, chi phí điều trị cao và gây xâm lấn [6].

Ghép tế bào gốc là liệu pháp mới đang được nghiên cứu trong điều trị bệnh xơ gan. Liệu pháp tế bào gốc

có thể thay thế các phương pháp điều trị xơ gan truyền thống như trên vì: (1) tế bào gốc có thể thu nhận từ nhiều nguồn như mô mỡ, tủy xương, máu dây rốn [7]; (2) ghép tế bào gốc tự thân giảm nguy cơ thải loại miễn dịch; (3) tế bào gốc khi ghép giúp ức chế quá trình xơ hóa nhờ tiết các cytokine, cải thiện hoạt động chức năng gan vì tế bào gốc đã được chứng minh khả năng biệt hóa thành tế bào chức năng giống tế bào gan, kích thích sự phân chia của tế bào gan trưởng thành [8-12]. Do đó, tế bào gốc đang được sử dụng nhiều trong các nghiên cứu lâm sàng điều trị bệnh xơ gan và mang lại hiệu quả tích cực [4, 13]. Tế bào gốc trung mô từ tủy xương (BM-MSC) đang được sử dụng nhiều trên lâm sàng (26/31 nghiên cứu sử dụng tế bào gốc) để điều trị xơ gan [14]. Kết quả ghi nhận, ghép BM-MSC giúp bệnh nhân cải thiện chức năng gan và chỉ số MELD [14, 15]. Đồng thời, BM-MSC dễ thu nhận và có thể cấy ghép tự thân. Do đó, BM-MSC là một nguồn tế bào tiềm năng lớn trong điều trị bệnh xơ gan.

Việt Nam là vùng có tỷ lệ bệnh gan rất cao [16]. Nhằm góp phần nghiên cứu tìm ra liệu pháp hiệu quả cho điều trị bệnh xơ gan, cung cấp cơ sở cận lâm sàng cho các nghiên cứu xa hơn trên lâm sàng, chúng tôi

*Tác giả liên hệ: Email: thnhung@hcmus.edu.vn

Effectiveness of the treatment of liver cirrhosis by using bone marrow mesenchymal stem cell in a mouse model

Summary

In the world, stem cell therapy has shown a potential in liver cirrhosis treatment. Up to now, we have not found out the best regimen of cell types, injection methods, while Vietnam has not yet published any result in this field. For that reason, this research aims to developing a new therapy for liver cirrhosis treatment in Vietnam. The authors conducted experiments using bone marrow mesenchymal stem cell for treatment in the mouse model with liver cirrhosis by CCl_4 . The result showed that 21 days after injected 10^6 stem cells into tail vein, the treatment group was improved with the Albumin index from 1.753 ± 0.042 to 2.116 ± 0.120 ; the expression of genes related to fibrosis was decreased such as *TGF* (by 9 times), *Procollagen* (by 13 times), *Integrin* (by 3000 times); and the result also showed the reduction in the presence of collagen-1, SMA- α and the smaller fibrotic areas in histology compared with the control group.

Keywords: bone marrow derived stem cells, liver cirrhosis, mouse model of liver cirrhosis, mesenchymal stem cells, stem cell therapy.

Classification numbers 3.5

tiến hành thử nghiệm điều trị bệnh xơ gan bằng BM-*MSC* trên mô hình chuột bị xơ gan bởi CCl_4 .

Vật liệu và phương pháp

Mô hình chuột xơ gan: thực hiện theo quy trình của Trương Hải Nhung và cộng sự [17], chuột được uống CCl_4 bằng cách pha với dầu olive (3:7 v/v), thông qua đường thực quản, liều lượng 1 ml CCl_4 /kg, 3 lần/tuần trong 11 tuần. Đánh giá các chỉ tiêu thực hiện mô hình gồm men (AST, ALT, Albumin, Bilirubin), biểu hiện gen (*Fibronectin*, *Integrin*, *TGF*, *Procollagen*, *Nt5e*), mô học nhuộm H&E và Trichrome, biểu hiện collagen-1 và SMA- α .

Chuẩn bị BM-*MSC*: chuột nhắt trắng (*Mus*

musculus var. albino) đực, 4 tuần tuổi, cân nặng khoảng 5 g, khỏe mạnh được mua từ Viện Pasteur TP Hồ Chí Minh. Tiến hành thu đuôi chuột, loại bỏ phần cơ đuôi, thu tủy từ xương đuôi và xương cẳng chân chuột, nuôi cấy tăng sinh và chọn lọc BM-*MSC* trong môi trường DMEM/F12 (Gibco) bổ sung 10% FBS (Sigma) và 1% Antibiotic (Gibco), trong điều kiện 37°C , 5% CO_2 .

Ghép tế bào: chuột mô hình bệnh xơ gan được chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm: nhóm đối chứng ($n=5$) tiêm 0,15 ml PBS, nhóm thí nghiệm ($n=5$) tiêm 10^6 huyền phù tế bào đơn trong 0,15 ml PBS/con qua tĩnh mạch đuôi, chuột bình thường được sử dụng làm đối chứng dương. Sau 21 ngày ghép, hiệu quả điều trị bệnh sẽ được đánh giá dựa trên các chỉ tiêu:

Men gan: thu 0,2 ml huyết tương, đo các chỉ tiêu như AST/ALT bằng KIT GOT(ASAT)/GPT(ALT) IFCC Mod.liquiUV test (GERMANY), Albumin và Billirubin bằng Kit QuantiChrom BCG Albumin/Bilirubin Assay (Bioassay Systems, CA, USA) theo quy trình của nhà sản xuất.

Đánh giá mức độ biểu hiện các gen xơ hóa bằng qRT-PCR: sinh thiết mô gan chuột, tách mRNA tổng từ mô gan bằng bộ Kit Easy-BLUE Total RNA Extraction (iNtON Biotechnology, Korea). Đánh giá mức độ biểu hiện gen bằng qRT-PCR (qRT-PCR Master Mix Kit, 1-Step Agilent, CA, USA), gồm các gen:

Bảng trình tự các mồi sử dụng trong phản ứng qRT-PCR của nghiên cứu

Tên mồi	Trình tự
<i>Fibronectin</i>	3'-TGAAGAGGGGCACATGCTGA-5' 5'-GTGGGAGTTGGGCTGACTCG-3'
<i>Procollagen</i>	3'-CCTGGACGCCATCAAGGTCTAC-5' 5'-CAAGTTCCGGTGTGACTCG-3'
<i>Integrin</i>	3'-GCCAGGGCTGGTTATACAGA-5' 5'-TCACAATGGCACACAGGTTT-3'
<i>Nt5e</i>	3'-TTTGGAAGGTGGATTTCCTG-5' 5'-CCTCTCAAATCCAGGGACAA3'-
TGF- β	3'-CTTCAGCTCCACAGAGAAGAAGTGC-5' 5'-CACAATCATGTTGGACAAGTGTCTCC-3'
<i>GAPDH</i> (chứng nội)	3'-AAGTTGTCATGGATGACC-5' 5'-ATCACCATCTCCAGGAGC-3'

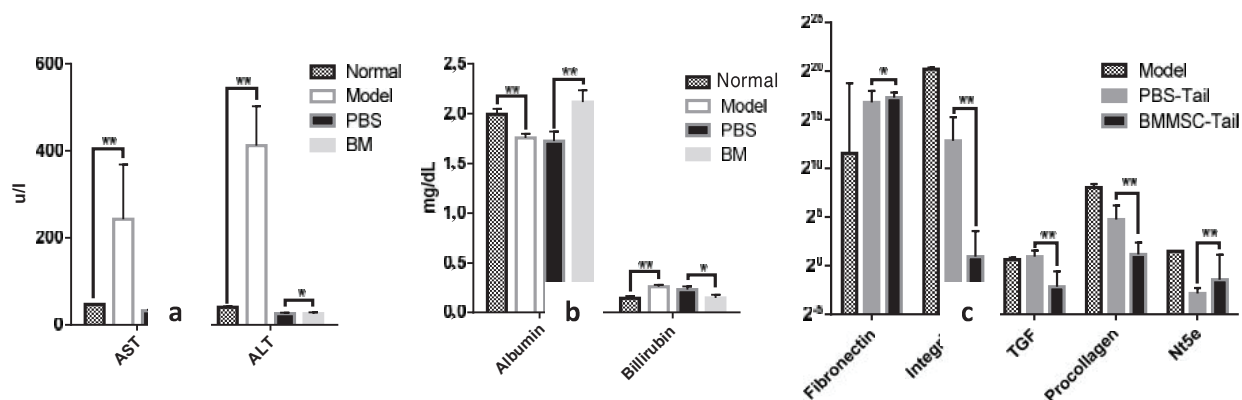
Đánh giá mô học: cố định mô gan trong Paraformaldehyde 4% (Merck Millipore, Germany), nhuộm H&E và Trichrome theo quy trình của Bệnh viện Chợ Rẫy (TP Hồ Chí Minh).

Đánh giá biểu hiện collagen-1 và SMA- α bằng nhuộm hóa mô miễn dịch: mô gan được cố định trong

4% paraformaldehyde (Merck Millipore, Đức). Lát cắt (slide) paraffin được khử paraffin và tái hydrate hóa bằng sodium citrate (10mM, pH 6) ở 95-100°C trong 20 phút. Các slide được làm lạnh xuống khoảng 20-30 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, các slide được block trong 30 phút ở nhiệt độ phòng với blocking buffer (2% huyết thanh dê, 1% BSA, 0,1% Triton X100, 0,05% Tween 20, 0,01M PBS pH 7,2-7,4, 0,05% sodium azide). Slides được nhuộm kháng thể kháng collagen I (Santa Cruz Biotechnology, Inc) hoặc anti-sma-Anfa (Santa Cruz Biotechnology, Inc) với nồng độ pha loãng 1:100 trong TBS 1% BSA qua đêm ở 4°C. Peroxidase nội sinh được block bằng peroxidase blocking buffer (3% H₂O₂ trong PBS) trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Horseradish peroxidase-conjugated secondary goat-anti-rabbit antibody trong TBS 1% BSA được nhuộm trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Kết quả nhuộm kháng thể được kiểm tra bằng cách sử dụng ACE kit (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) theo hướng dẫn. Nhân tế bào được nhuộm bằng hematoxylin-Gill

sự giảm nồng độ Albumin huyết tương so với chuột thường ($p < 0,05$). So sánh các chỉ tiêu sinh hóa nhóm chuột xơ gan được điều trị bằng tế bào và nhóm đối chứng (tiêm PBS): chuột xơ gan giảm tình trạng tổn thương gan thông qua các chỉ số AST, ALT, Bilirubin giảm về mức bình thường. Tuy nhiên, chức năng sản xuất Albumin trên nhóm được điều trị bằng BM-MSC được phục hồi về mức bình thường và cao hơn nhóm đối chứng ($p < 0,05$).

Kết quả chỉ tiêu mức độ biểu hiện gen gây xơ hóa (hình 1c): chuột mô hình tăng biểu hiện mạnh các gen xơ hóa (mức độ biểu hiện các gen của chuột thường là 2⁰), dẫn tới hình thành mô xơ ở chuột mô hình. Sau khi được thử nghiệm điều trị bằng BM-MSC chuột tăng biểu hiện *Fibronectin* (kết quả tương tự ở nhóm đối chứng), giảm biểu hiện mạnh các gen *Integrin*, *TFG*, *Procollagen* và *Nt5e* khi so với chuột mô hình và chuột đối chứng ($p < 0,05$). Do đó, ghép tế bào làm giảm sự sản xuất mô xơ ở chuột xơ gan.



Hình 1: biểu đồ so sánh chỉ tiêu sinh hóa và biểu hiện gen trên các nhóm chuột
(a) Biểu đồ so sánh giá trị AST và ALT; (b) Biểu đồ so sánh giá trị Albumin và Bilirubin; (c) Biểu đồ so sánh mức biểu hiện gen
model: nhóm mô hình xơ gan, PBS-tail: nhóm tiêm giả được PBS, BMMSC tail: nhóm ghép tế bào

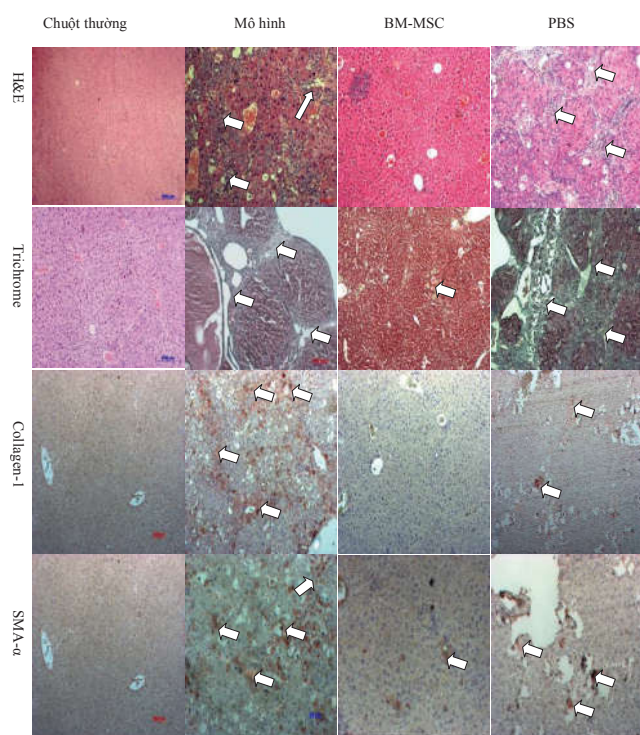
III (Merck Millipore, Đức). Slides được rửa sạch bằng Tween 20 TBS (2-3 lần) giữa mỗi bước.

Phương pháp xử lý thống kê: kiểm định thống kê student t-test, phân tích kết quả bằng Microsoft Excel 2010 và Prism 6.

Kết quả

Kết quả chỉ tiêu sinh hóa (hình 1a, 1b) của các nhóm chuột sau thời gian gây mô hình thể hiện tình trạng gan bị tổn thương nặng bởi sự gia tăng mạnh các chỉ số như AST (tăng 5 lần), ALT (tăng 10 lần) và Bilirubin (2 lần) trong huyết tương so với chuột thường. Đồng thời, hoạt động chức năng gan suy giảm thể hiện qua

Kết quả chỉ tiêu hình thái mô học: đánh giá sự khác biệt về tình trạng bệnh giữa các nhóm chuột ở cấp độ mô học (hình 2): chuột mô hình dưới tác động của CCl₄, mô gan biểu hiện tình trạng tổn thương mạnh như viêm, cấu trúc mô thay đổi, nhiều tế bào gan chết hoặc nhiễm mỡ (nhuộm H&E) so với nhóm đối chứng. Xuất hiện các dải xơ, thành phần chính là collagen bao quanh mạch, khu vực cửa và xơ bắc cầu (nối liền hai khu vực cửa) khi nhuộm Trichrome. Trong cấu trúc mô xơ collagen type-1 chiếm một lượng lớn [18], thể hiện trên hình thái mô học khi nhuộm với kháng thể kháng collagen type-1. Ngoài ra, chuột mô hình còn cho thấy



Hình 2: kết quả nhuộm mô gan với H&E, Trichrome, collagen-1, SMA- α (X100)
Mũi tên chỉ các vị trí viêm, xơ và dương tính kháng thể

số lượng lớn SMA- α là dấu hiệu trên bề mặt tế bào nguyên bào sợi cơ [19].

Sau thời gian được điều trị với BM-MSc, cấu trúc mô gan chuột mô hình được hồi phục nhanh hơn nhóm đối chứng thể hiện qua các đặc điểm: cấu trúc mô học ổn định (nhuộm H&E, Trichrome), giảm tế bào chết và nhiễm mỡ, giảm sự bắt màu với thuốc nhuộm Trichrome, đồng nghĩa với việc các dải xơ trên mô học đã tiêu biến dần, tương đồng với hình ảnh nhuộm hóa mô miễn dịch collagen type 1 và SMA- α .

Thảo luận

Chuột được gây mô hình bệnh xơ gan bằng CCl_4 biểu hiện tình trạng tổn thương gan cấp tính thể hiện qua các chỉ số sinh hóa, tăng biểu hiện mạnh các gen gây xơ hóa, xuất hiện các dải xơ trên cấu trúc mô. Trong thời gian điều trị bằng cấy ghép tế bào, chuột không bị gây độc bởi CCl_4 , nên chuột có thể tự cải thiện tình trạng bệnh như: phục hồi chỉ số AST, ALT, Bilirubin, giảm biểu hiện các gen xơ hóa *Integrin*, *TFG*, *Procollagen* và *Nt5e*. Kết quả này ghi nhận tương đồng với Kuo và cộng sự, Carvalho và cộng sự [8, 20]. Tuy nhiên, mức độ phục hồi là khác biệt giữa hai nhóm được điều trị tế bào và nhóm chứng.

Mức độ phục hồi ở lô chuột được điều trị bằng BM-MSc là tốt hơn so với nhóm đối chứng vì: khác biệt về chỉ số Albumin nhóm điều trị cao hơn so với nhóm đối chứng cho thấy hoạt động chức năng gan ở lô đối chứng vẫn chưa hồi phục, ghi nhận tương đồng về cải thiện chỉ số Albumin ở bệnh nhân sau ghép BM-MSc trong báo cáo của Terai và cộng sự [21]. Các gen xơ hóa như *TGF*, *Procollagen*, *Integrin* giảm mạnh ở nhóm điều trị so với đối chứng, dẫn tới kết quả giảm mạnh biểu hiện mô xơ trên cấu trúc mô học nhuộm Trichrome, collagen type 1 ở nhóm điều trị so với nhóm đối chứng. Kết quả nhuộm SMA- α cho thấy nhóm điều trị giảm mạnh chỉ số này. SMA- α biểu hiện đặc trưng trên nguyên bào sợi cơ. Trong xơ gan, nguyên bào sợi cơ đóng vai trò chính trong việc sản xuất mô xơ [18, 22]. Do đó, nhóm chuột được điều trị bằng BM-MSc không còn biểu hiện nguyên bào sợi cơ, dẫn tới giảm biểu hiện các gen xơ hóa và giảm hình thành mô xơ trên hình thái mô học. Ngoài ra, các nghiên cứu khác như Jang và cộng sự [23] tiến hành ghép BM-MSc trên mô hình chuột Rat xơ gan cũng ghi nhận nhóm điều trị giảm biểu hiện *TGF*, collagen-1 và SMA α so với đối chứng.

So sánh với các cơ chế đã được chứng minh về hiệu quả của BM-MSc trong việc điều trị bệnh xơ gan như: tế bào gốc góp phần ức chế sự phát triển của tế bào hình sao, là nguồn tế bào chính chuyển dạng thành nguyên bào sợi cơ [24], làm giảm sản xuất yếu tố gây xơ của Krizhanovsky và cộng sự [25], cải thiện chức năng gan và giảm xơ thông qua sự tăng hoạt động của enzyme phân giải chất nền ngoại bào hóa [26, 27], dung hợp với tế bào gan trưởng thành giúp tế bào gan phân chia trong báo cáo của Wang và cộng sự [28], ức chế phosphoryl hóa Smad2/3, giảm sản xuất yếu tố xơ hóa ở nguyên bào sợi cơ của Jang và cộng sự [23]. Kết quả của nghiên cứu này ủng hộ giả thiết BM-MSc góp phần ức chế tế bào hình sao và ức chế quá trình sinh xơ bởi vì các kết quả ghi nhận tương đồng với các nghiên cứu khác về sự giảm số lượng HSC trong gan, giảm biểu hiện các gen gây xơ hóa và dải xơ trên hình thái mô học.

Kết luận

Tiêm 10^6 tế bào BM-MSc thông qua tĩnh mạch đuôi lên mô hình chuột bị xơ gan do CCl_4 cho thấy: BM-MSc góp phần phục hồi chức năng gan thể hiện ở chỉ số Albumin, tăng cường quá trình phục hồi mô gan tổn thương thông qua sự giảm biểu hiện nguyên bào

sợi cơ, giảm quá trình xơ hóa gan.

Lời cảm ơn

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn sự tài trợ kinh phí từ Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, trong khuôn khổ đề tài mã số B2012-18-07/TĐ/08.

Tài liệu tham khảo

- [1] Mokdad A, et al (2014), “Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis”, *BMC Medicine*, **12**(1), pp.1-24.
- [2] Schuppan D, Afdhal N.H (2008), “Liver cirrhosis”, *The Lancet*, **371**(9615), pp.838-851.
- [3] Ellis E.L, Mann D.A (2012), “Clinical evidence for the regression of liver fibrosis”, *J Hepatol*, **56**(5), pp.1171-1180.
- [4] Schuppan D, Kim Y.O (2013), “Evolving therapies for liver fibrosis”, *J Clin Invest*, **123**(5), pp.1887-1901.
- [5] Wu J, Zern M.A (2000), “Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis”, *J Gastroenterol*, **35**(9), pp.665-672.
- [6] Saidi R.F, et al (2015), “Competition in liver transplantation: Helpful or harmful?”, *Liver Transplantation*, **21**(2), pp.145-150.
- [7] Da Silva Meirelles L, Caplan A.I, Nardi N.B (2008), “In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells”, *Stem Cells*, **26**(9), pp.2287-2299.
- [8] Kuo T.K, et al (2008), “Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells”, *Gastroenterology*, **134**(7), pp.21-2111, p.2121.
- [9] Vassilopoulos G, Wang P.R, Russell D.W (2003), “Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion”, *Nature*, **422**(6934), pp.901-904.
- [10] Dan Y (2012), “Clinical Uses of Liver Stem Cells”, *Liver Stem Cells*, T Ochiya Editor, Springer New York, pp.11-23.
- [11] Ong S.Y, Dai H, Leong K.W (2006), “Hepatic differentiation potential of commercially available human mesenchymal stem cells”, *Tissue Eng*, **12**(12), pp.85-3477.
- [12] Zhang Z, et al (2013), “Generation, characterization and potential therapeutic applications of mature and functional hepatocytes from stem cells”, *J Cell Physiol*, **228**(2), pp.298-305.
- [13] Qi X, Guo X, Su C (2015), “Clinical Outcomes of the Transplantation of Stem Cells from Various Human Tissue Sources in the Management of Liver Cirrhosis: A Systematic Review and Meta-Analysis”, *Current Stem Cell Research & Therapy*, **10**(2), pp.166-180.
- [14] Chen G, et al (2015), “Adipose derived stem cell-based treatment for acute liver failure”, *Stem Cell Research & Therapy*, **6**(1), p.40.
- [15] Terai S, et al (2014), “Status and prospects of liver cirrhosis treatment by using bone marrow-derived cells and mesenchymal cells”, *Tissue Eng Part B Rev*, **20**(3), pp.206-210.
- [16] Toan N.L, et al (2006), “Impact of the hepatitis B virus genotype and genotype mixtures on the course of liver disease in Vietnam”, *Hepatology*, **43**(6), pp.1375-1384.
- [17] Truong H.N, et al (2014), “Establishment of a standardized mouse model of hepatic fibrosis for biomedical research”, *Biomedical Research and Therapy*, **1**(2), pp.1-7.
- [18] Friedman S (2000), “Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury”, *J Biol Chem*, **275**, pp.2247-2250.
- [19] Hinz B (2007), “Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair”, *J Invest Dermatol*, **127**(3), pp.526-537.
- [20] Carvalho A.B, et al (2008), “Bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells do not reduce fibrosis or improve function in a rat model of severe chronic liver injury”, *Stem Cells*, **26**(5), pp.1307-1314.
- [21] Terai S, et al (2006), “Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy”, *Stem Cells*, **24**(10), pp.8-2292.
- [22] Aziz-Seible R.S, Casey C.A (2011), “Fibronectin: functional character and role in alcoholic liver disease”, *World J Gastroenterol*, **17**(20), pp.2482-2499.
- [23] Jang Y, et al (2014), “Effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic fibrosis in a thioacetamide-induced cirrhotic rat model”, *BMC Gastroenterol*, **14**(1), p.198.
- [24] Mederacke I, et al (2013), “Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology”, *Nat Commun*, **4**, p.2823.
- [25] Krizhanovsky V, et al (2008), “Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis”, *Cell*, **134**(4), pp.657-667.
- [26] Iwamoto T, et al (2013), “Bone-marrow-derived cells cultured in serum-free medium reduce liver fibrosis and improve liver function in carbon-tetrachloride-treated cirrhotic mice”, *Cell Tissue Res*, **351**(3), pp.95-487.
- [27] Sakaida I, et al (2004), “Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice”, *Hepatology*, **40**(6), pp.1304-1311.
- [28] Wang X, et al (2003), “Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes”, *Nature*, **422**(6934), pp.897-901.