

# 体外共培养大鼠骨髓间充质干细胞对肝星状细胞增殖的影响： Cyclin D1与P27表达调控\*\*\*\*

王东旭, 姜海行, 苏思标, 覃山羽, 梁梓宇

## Influence of bone marrow mesenchymal stem cells on hepatic stellate cells proliferation: Regulation of Cyclin D1 and P27 expression

Wang Dong-xu, Jiang Hai-xing, Su Si-biao, Qin Shan-yu, Liang Zi-yu

Department of Digestion, First Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Wang Dong-xu★, Studying for master's degree, Department of Digestion, First Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China  
wdxlove@126.com

Correspondence to: Jiang Hai-xing, Professor, Doctoral supervisor, Department of Digestion, First Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China  
jihaxi@263.net

Supported by: the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 0640133, 0897008\*\*; the Foundation of Guangxi New Century National Ten, Hundred and Thousand Talent Project, No. 2006206\*\*; the Youth Foundation of Guangxi Health Department, No. Z2009102\*

Received: 2009-09-04  
Accepted: 2010-01-16

### Abstract

**BACKGROUND:** The hepatic stellate cells (HSCs) plays a key role in the development of liver fibrosis. Studies have shown that bone marrow-derived mesenchymal stem cell (BMSCs) transplantation can be used to treat liver fibrosis, but the mechanism for reversal of liver fibrosis remains unknown.

**OBJECTIVE:** To explore the mechanism of bone marrow mesenchymal stem cells to regulate the proliferation of HSCs under co-culture *in vitro*.

**METHODS:** Rat BMSCs and HSCs in the experimental group were cultured in the plastic culture plate (6 holes) to establish the upper and lower double-cell co-culture system. Rat normal fibroblast cell lines were seeded as control group; HSCs were cultured alone as blank group. Cell proliferation was determined by WST8 and cell cycle was determined by flow cytometry. The Cyclin D1 and P27 mRNA expression in HSC was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and the level of Cyclin D1 and P27 protein by Western blot.

**RESULTS AND CONCLUSION:** HSCs co-cultured with BMSCs significantly inhibited HSC proliferation compared with the blank and control groups at 24, 48, and 72 hours ( $P < 0.01$ ); Flow cytometry showed that the percentage of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase cells of co-culture group was increased but the S phase cells reduced ( $P < 0.01$ ) compared with the other groups at 72 hours, and BMSCs blocked HSC to convert from G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> period to S phase. After HSCs co-cultured with BMSCs for 24 hours, the expression of CyclinD1 mRNA and protein was reduced, and significantly less than the blank and control groups at 72 hours ( $P < 0.01$ ); no differences were detected in P27 mRNA expression in each group during the co-culture ( $P > 0.05$ ). After co-culture of 24 hours, the p27 protein expression was significantly increased compared with the blank and control groups ( $P < 0.01$ ). BMSCs inhibited the proliferation of HSCs, possibly through inhibiting CyclinD1 expression, increasing the p27 protein expression to cause cell cycle arresting in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase.

Wang DX, Jiang HX, Su SB, Qin SY, Liang ZY. Influence of bone marrow mesenchymal stem cells on hepatic stellate cells proliferation: Regulation of Cyclin D1 and P27 expression. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(10):1764-1768. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

### 摘要

**背景:** 在肝纤维化发生发展过程中, 肝星状细胞起着关键作用。研究证实骨髓间充质干细胞移植可作为治疗肝纤维化的方法, 但其逆转肝纤维化的机制不明。

**目的:** 探讨体外共培养条件下, 大鼠骨髓间充质干细胞对肝星状细胞增殖的调控机制。

**方法:** 实验组在半透膜上接种大鼠骨髓间充质干细胞, 在 6 孔塑料培养板上接种肝星状细胞, 建立上下双层细胞共培养体系; 对照组将大鼠骨髓间充质干细胞更换为成纤维细胞; 空白组仅行肝星状细胞单独培养。WST-8 法检测肝星状细胞生长抑制率, 流式细胞仪分析细胞周期, RT-PCR 检测肝星状细胞 CyclinD1 和 P27 mRNA 的表达, Western blot 检测肝星状细胞 CyclinD1 和 P27 蛋白的表达。

**结果与结论:** 与空白组、对照组比较, 实验组共培养 24, 48, 72 h 肝星状细胞生长抑制率均显著升高( $P < 0.01$ ); 共培养 72 h G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞显著增加( $P < 0.01$ ), S 期细胞显著减少( $P < 0.01$ ), 可阻滞肝星状细胞由 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期向 S 期转换。共培养 24 h, 实验组 CyclinD1 mRNA 及蛋白表达开始下调, 至 72 h 时表达量显著低于对照组、空白组( $P < 0.01$ ); 共培养全过程中各组 p27 mRNA 的表达无明显差异( $P > 0.05$ ), 共培养 24 h 时实验组 p27 蛋白表达较对照组、空白组均显著上调( $P < 0.01$ )。结果证实大鼠骨髓间充质干细胞能够抑制肝星状细胞的增殖, 其机制可能是通过下调 CyclinD1 表达、上调 P27 蛋白表达, 使细胞周期停滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期实现的。

**关键词:** 细胞周期; CyclinD1; P27; 共培养; 肝星状细胞; 骨髓间充质干细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.10.011

王东旭, 姜海行, 苏思标, 覃山羽, 梁梓宇. 体外共培养大鼠骨髓间充质干细胞对肝星状细胞增殖的影响: Cyclin D1 与 P27 表达调控[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(10):1764-1768. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

广西医科大学第一附属医院消化内科, 广西壮族自治区南宁市 530021

王东旭★, 男, 1980年生, 河北省张家口市人, 汉族, 广西医科大学在读硕士, 主要从事干细胞及肝损伤修复机制方面的研究。  
wdxlove@126.com

通讯作者: 姜海行, 教授, 博士生导师, 广西医科大学第一附属医院消化内科, 广西壮族自治区南宁市 530021  
jihaxi@263.net

中图分类号: R394.2  
文献标识码: A  
文章编号: 1673-8225(2010)10-01764-05

收稿日期: 2009-09-04  
修回日期: 2010-01-16  
(200909040077 ZS-A)

## 0 引言

骨髓间充质干细胞是骨髓内的一种非造血干细胞<sup>[1]</sup>, 它既有自我复制和高度增殖的能力<sup>[2-3]</sup>, 又有多向分化的潜能<sup>[4-5]</sup>, 可作为干细胞移植的重要细胞来源。研究表明, 骨髓间充质干细胞对多种原因引起的肝损伤具有显著修复作用, 可抑制细胞外基质沉积, 减轻肝纤维化程度<sup>[6-8]</sup>。肝星状细胞是肝窦周间质细胞, 该细胞在肝受损后被活化成为肌成纤维样细胞, 是产生细胞外基质的主要细胞来源, 并通过产生基质金属蛋白酶抑制因子抑制细胞外基质的降解, 故抑制肝星状细胞活化、增殖是目前抗肝纤维化治疗的重要策略<sup>[9-10]</sup>。

研究发现骨髓间充质干细胞与肝星状细胞共培养能显著抑制肝星状细胞的增殖<sup>[11-13]</sup>, 但其具体机制还不清楚。实验观察骨髓间充质干细胞对肝星状细胞增殖过程中CyclinD1和P27表达的影响, 从细胞周期调控角度探讨骨髓间充质干细胞影响肝星状细胞增殖的机制。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞学体外对照观察。

**时间及地点:** 于2008-03/2009-05在广西医科大学实验中心完成。

**材料:** 4~6周龄健康雄性SD大鼠20只, 体重90~110 g, 由广西医科大学实验动物中心提供, 动物质量合格证号: 桂动许字2000第001号, 实验过程中对动物的处置符合2006年科技部《关于善待实验动物的指导性意见》的规定<sup>[14]</sup>。

**细胞与试剂:**

细胞与试剂	来源
大鼠肝星状细胞系 HSC-T6、大鼠成纤维细胞系	中山大学附属肿瘤医院细胞库
DMEM-LG 培养液	美国 Gibco 公司
特级胎牛血清	美国 Hyclone 公司
Cell Counting Kit-8 试剂盒	碧云天生物技术研究所
凯基细胞周期检测试剂盒	凯基生物
小鼠抗 CyclinD1、p27 单克隆抗体、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG	美国 Santa Cruz 公司
Trizol	美国 Invitrogen 公司
反转录试剂盒	美国 MBI 公司
ECL 发光试剂盒	美国 Thermo 公司
PVDF 膜、半透膜	美国 Millipore 公司

## 实验方法:

**大鼠骨髓间充质干细胞的分离与培养<sup>[15-16]</sup>:** 无菌条件下采集大鼠双侧股骨骨髓, 加入密度为1.073 g/mL Percoll细胞分离液的试管中, 经反复离心、洗涤后, 加入含体积分数为10%胎牛血清的L-DMEM培养基悬浮沉淀细胞, 按 $1 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$ 密度接种于50 mL塑料培养瓶, 于37 °C、体积分数为5%的CO<sub>2</sub>饱和湿度培养箱中原代培养。24 h后首次换液, 以后隔日换液1次。当细胞覆盖瓶底80%时, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化, 按1:2传代, 至第4代备用。

**大鼠肝星状细胞及成纤维细胞的培养:** 细胞复苏后接种于塑料培养瓶中, 于37 °C、体积分数为5%的CO<sub>2</sub>饱和湿度培养箱中常规培养, 培养液为含体积分数为10%胎牛血清的L-DMEM, 每2 d换液1次。

## 分组处理:

### 实验组:

骨髓间充质干细胞与肝星状细胞按1:1共培养。

### 对照组:

成纤维细胞与肝星状细胞按1:1共培养。

### 空白组:

肝星状细胞按 $2 \times 10^5$ 个/孔自培养。

**细胞共培养:** 应用6孔塑料细胞培养盒进行培养, 实验组、对照组在半透膜上层分别接种骨髓间充质干细胞、成纤维细胞 $2 \times 10^5$ 个/孔, 在下层接种肝星状细胞 $2 \times 10^5$ 个/孔, 建立上下双层细胞共培养体系, 常规培养。

**肝星状细胞生长抑制率WST-8法检测:** 细胞共培养24, 48, 72 h后, 用2.5 g/L胰酶消化贴壁细胞, 细胞计数板计数, 调整各时段细胞浓度为 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ , 吹打, 混匀, 取96孔板, 每孔加入100  $\mu\text{L}$  (2 000个细胞), 每时段设3个复孔, 每孔加入10  $\mu\text{L}$  CCK-8溶液。设立空白孔, 加入100  $\mu\text{L}$  无细胞的完全培养基和10  $\mu\text{L}$  CCK-8溶液。在细胞培养箱内孵育1 h, 用酶标仪测各孔波长在450 nm的吸光度值, 并计算细胞生长抑制率。

$$\text{细胞生长抑制率(\%)} = \frac{\text{空白对照组平均吸光度值} - \text{处理组平均吸光度值}}{\text{空白对照组平均吸光度值}} \times 100\%$$

**细胞周期流式细胞仪分析:** 取共培养各时间段的细胞, 胰酶消化贴壁细胞, 磷酸盐缓冲液清洗, 体积分数为70%的预冷乙醇悬浮固定细胞, 4 °C过夜。加入等量PBS再洗2遍, 加100  $\mu\text{L}$  RNase A 37 °C水浴30 min, PI 4 °C避光显色

30 min, 流式细胞仪检测, MCYCLE软件分析细胞周期。

肝星状细胞CyclinD1和P27 mRNA表达RT-PCR检测: 收集各时段肝星状细胞, 计数, 每 $5 \times 10^6$ 个细胞加1 mL Trizol, 振荡混匀。Trizol一步抽提法提取总RNA。按反转录试剂盒说明进行反转录, 并根据以下条件进行目的基因的扩增: 95 °C 预变性5 min进入循环, 95 °C 变性45 s, 54 °C 退火45 s, 72 °C 1 min, 共30个循环, 72 °C 延伸5 min, 以GAPDH为内参基因。扩增引物由上海生工生物工程公司合成, 引物序列见表1。

表1 引物序列  
Table 1 Primer sequence

Primer	Primer sequence	Annealing temperature	Fragment length
CyclinD1	Upstream: 5-TGT TCG TGG CCT CTA AGA TG-3	54 °C	449 bp
	Downstream: 5-ACT CCA GAA GGG CTT CAA TC-3		
P27	Upstream: 5-GCC GAG ATA TGG AAG AAG CGA-3	56 °C	335 bp
	Downstream: 5-AAG AAT CTT CTG CCG CAG GTC T-3		
GAPDH	Upstream: 5-GCC AGT AGA CTC CAC GAC AT-3	54 °C	140 bp
	Downstream: 5-GCA AGT TCA ACG GCA CAG-3		

取 6  $\mu$ L PCR产物及6  $\mu$ L DNA Marker行1.7%琼脂糖凝胶电泳, 采用凝胶图像分析仪进行吸光度扫描, 观察条带的灰度强弱, 以目的基因/GAPDH的灰度比值表示相对目的基因 mRNA水平。

肝星状细胞CyclinD1和P27蛋白表达Western blot检测: 用细胞裂解液提取各时段肝星状细胞总蛋白, 考马斯亮蓝比色法测定蛋白含量, 上样量为80  $\mu$ g, 蛋白行15% SDS-PAGE凝胶电泳, PVDF转膜, 非特异性封闭。加入一抗小鼠抗CyclinD1、p27单克隆抗体(1 : 500稀释), 4 °C过夜, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗进行杂交。ECL发光剂1~5 min, 曝光、显影、定影。数码成像分析系统软件对结果进行分析, 以目的蛋白/GAPDH的灰度比值表示相对目的蛋白水平。

主要观察指标: ①骨髓间充质干细胞抑制肝星状细胞的增殖。②肝星状细胞周期的变化。③肝星状细胞CyclinD1和P27 mRNA的表达。④肝星状细胞CyclinD1和P27蛋白的表达。

设计、实施、评估者: 设计为第一、二、三作者, 实施和评估为全部作者, 均经过系统培训, 未使用盲法评估。

统计学分析: 由第一作者应用SPSS 13.0软件进行统计处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

2.1 骨髓间充质干细胞抑制肝星状细胞的增殖 实验组共培养24 h, 骨髓间充质干细胞轻度抑制肝星状细胞的增殖; 共培养72 h, 骨髓间充质干细胞明显抑制肝星状细胞的增殖, 抑制率达48.37%, 并呈时间依赖性。各时间点与空白组、对照组比较, 实验组肝星状细胞生长抑制率均显著升高( $P < 0.01$ ), 见表2。

表2 共培养后各组肝星状细胞生长抑制率的比较  
Table 2 Proliferation inhibition rate of hepatic stellate cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ , %)

Group	24 h	48 h	72 h
Blank	2.96 $\pm$ 0.96 <sup>a</sup>	3.66 $\pm$ 1.18 <sup>a</sup>	3.85 $\pm$ 1.18 <sup>a</sup>
Control	3.04 $\pm$ 0.93 <sup>a</sup>	3.80 $\pm$ 1.15 <sup>a</sup>	3.96 $\pm$ 1.06 <sup>a</sup>
Experimental	8.36 $\pm$ 1.30	19.77 $\pm$ 1.56	48.37 $\pm$ 1.31

<sup>a</sup>  $P < 0.01$ , vs. experimental group

2.2 肝星状细胞周期的变化 流式细胞仪检测结果显示, 与空白组、对照组比较, 共培养72 h实验组G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞显著增加( $P < 0.01$ ), S期细胞显著减少( $P < 0.01$ ), 见表3。

表3 共培养72 h 各组肝星状细胞周期的变化  
Table 3 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> cell cycle and S cell cycle of hepatic stellate cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ , %)

Group	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S
Blank	45.94 $\pm$ 1.07 <sup>a</sup>	45.96 $\pm$ 1.08 <sup>a</sup>
Control	46.08 $\pm$ 0.89 <sup>a</sup>	45.53 $\pm$ 1.01 <sup>a</sup>
Experimental	58.60 $\pm$ 1.11	33.40 $\pm$ 0.86

<sup>a</sup>  $P < 0.01$ , vs. experimental group

2.3 肝星状细胞CyclinD1和P27 mRNA的表达 共培养24 h, 实验组CyclinD1 mRNA表达开始下调, 共培养72 h时表达量显著低于对照组、空白组( $P < 0.01$ ), 见表4。

表4 共培养后各组肝星状细胞 CyclinD1 mRNA 表达的比较  
Table 4 CyclinD1 mRNA expression of hepatic stellate cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ , A)

Group	24 h	48 h	72 h
Blank	0.70 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.70 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.72 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
Control	0.72 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.71 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.70 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
Experimental	0.57 $\pm$ 0.03	0.40 $\pm$ 0.01	0.28 $\pm$ 0.02

<sup>a</sup>  $P < 0.01$ , vs. experimental group

共培养全过程中, 各组p27 mRNA的表达差异无显著性意义( $P > 0.05$ ), 见表5。

表5 共培养后各组肝星状细胞 p27 mRNA 表达的比较  
Table 5 p27 mRNA expression of hepatic stellate cells  
( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ , A)

Group	24 h	48 h	72 h
Blank	0.81±0.12	0.80±0.08	0.83±0.09
Control	0.83±0.10	0.83±0.13	0.81±0.12
Experimental	0.84±0.11	0.84±0.11	0.83±0.10

$P > 0.05$

2.4 肝星状细胞CyclinD1和P27蛋白的表达 共培养24 h, 实验组CyclinD1蛋白表达开始下调, 共培养72 h时表达量显著低于对照组、空白组( $P < 0.01$ ), 见表6。

表6 共培养后各组肝星状细胞 CyclinD1 蛋白表达的比较  
Table 6 CyclinD1 protein expression of hepatic stellate cells  
( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ , A)

Group	24 h	48 h	72 h
Blank	0.87±0.10 <sup>a</sup>	0.85±0.07 <sup>a</sup>	0.84±0.09 <sup>a</sup>
Control	0.87±0.10 <sup>a</sup>	0.92±0.13 <sup>a</sup>	0.84±0.12 <sup>a</sup>
Experimental	0.65±0.09	0.43±0.09	0.11±0.06

<sup>a</sup> $P < 0.01$ , vs. experimental group

共培养24 h, 实验组p27蛋白表达较对照组、空白组均显著上调( $P < 0.01$ ), 此后持续高表达状态, 见表7。

表7 共培养后各组肝星状细胞 p27 蛋白表达的比较  
Table 7 p27 protein expression of hepatic stellate cells  
( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ , A)

Group	24 h	48 h	72 h
Blank	0.15±0.04 <sup>a</sup>	0.17±0.04 <sup>a</sup>	0.16±0.03 <sup>a</sup>
Control	0.19±0.02 <sup>a</sup>	0.18±0.02 <sup>a</sup>	0.18±0.03 <sup>a</sup>
Experimental	0.82±0.07	1.03±0.02	0.96±0.06

<sup>a</sup> $P < 0.01$ , vs. experimental group

### 3 讨论

肝星状细胞具有两种表现型, 即静止型和活化型。在正常肝脏中, 肝星状细胞处于静止态, 胞浆富含维生素A和三酰甘油脂滴。肝脏慢性损伤时, 肝星状细胞受到多种细胞因子, 如转换生长因子 $\beta 1$ 等刺激由静止态转变为激活态, 增殖加速, 胞浆内维生素A丢失, 特征性

表达 $\alpha$ -SMA, 大量合成细胞外基质, 导致肝内细胞外基质过量积聚。所以肝星状细胞的激活和增殖在肝纤维化的发生中起重要作用, 治疗肝硬化的手段也主要以肝星状细胞作为靶细胞<sup>[10, 17]</sup>。

为探讨骨髓间充质干细胞是否能够调控肝星状细胞增殖及调控肝星状细胞增殖的机制, 实验用活化的肝星状细胞系模拟体内肝纤维化的状态。利用孔径0.4  $\mu\text{m}$ 的Transwell仅透过培养液而不能通过细胞的特点, 建立骨髓间充质干细胞与肝星状细胞非直接接触的共培养体系。结果显示, 实验组肝星状细胞的增殖较对照组共培养体系明显减少, 流式细胞仪结果示与对照组相比, 实验组进入 $G_0/G_1$ 期的细胞明显增多, S期细胞明显减少, 表明骨髓间充质干细胞可以通过非直接接触抑制肝星状细胞增殖, 与以往报道结果一致<sup>[12-13, 18]</sup>。

细胞增殖是通过细胞周期的运行实现的, 细胞周期调控是指各种调控因子通过自身的激活和灭活, 使细胞启动和完成细胞周期重要事件, 并保障这些事件按次序正常进行。其分子基础包括细胞周期蛋白、细胞周期蛋白依赖蛋白激酶和细胞周期蛋白依赖蛋白激酶抑制剂<sup>[19-21]</sup>。 $G_0/G_1$ 期~S期的调控点是细胞内外信号经传递、整合、汇集到细胞核, 对细胞增殖进行调控的关键点, 由 $G_1$ 期周期蛋白cyclinD1等调控<sup>[22-24]</sup>。细胞能否通过限制点从 $G_1$ 期进入S期很大程度取决于 $G_1$ 期内CyclinD1的积累。CyclinD1可与CDK结合形成复合物, 在CDK激酶的介导下发生磷酸化, 从而促进某些基因的表达, 这些基因的表达产物可促使细胞通过 $G_1$ 期~S期调控点, 使细胞进入自主分裂程序<sup>[23-25]</sup>。相反, 阻滞Cyclin D1的表达, 可使细胞不能从 $G_1$ 期进入S期。最近研究表明, 肿瘤细胞中的Cyclin D1高表达, 是肿瘤细胞异常增殖的重要原因<sup>[26-27]</sup>。

P27是CKI家族的一员, 主要与cyclin结合而发挥对cyclinCDK的抑制作用。p27对CDK的抑制作用有两方面, 一方面能抑制已结合到cyclin并被激活的CDK活性, 另一方面也可以抑制CDK的激活过程, 最终抑制细胞周期 $G_1 \rightarrow S$ 的转变<sup>[28-29]</sup>。实验结果显示, 骨髓间充质干细胞与肝星状细胞共培养24 h后, 处于S期的细胞比例较对照组明显下降, 增殖受到显著抑制。同时可见CyclinD1 mRNA和蛋白质表达减少, P27蛋白明显增加, 与对照组相比差异有显著性意义, 说明骨髓间充质干细胞对肝星状细胞增殖的抑制的机制之一可能是通过下调细胞周期素CyclinD1、上调P27蛋白的表达, 使细胞周期停滞于 $G_0/G_1$ 期, 从而发挥抑制肝星状细胞增殖的作用。此外还发现在共培养全过程中, p27 mRNA表达没有明显变化, 但P27蛋白随着共培养时间的延长表达明显增加, 说明P27水平不受转录调控, 而是由蛋白翻译和降解来调控, 与以往报道结果一致<sup>[30-31]</sup>。可见骨髓间充质干细胞可以通过降低肝星状细胞CyclinD1

的表达、上调P27蛋白的表达进而发挥抑制肝星状细胞增殖的作用。

#### 4 参考文献

- [1] Miura Y, Gao Z, Miura M, et al. Mesenchymal stem cell-organized bone marrow elements: an alternative hematopoietic progenitor resource. *Stem Cells*.2006;24(11): 2428-2436.
- [2] Chamberlain G, Fox J, Ashton B, et al. Concise Review: Mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features and potential for homing. *Stem Cells*.2007; 25(11): 2739-2749.
- [3] Bever Nardi N, da Silva Meirelles. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol*.2006;7(174): 249-282.
- [4] Wang X, Hisha H, Taketani S, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from mouse fetal bone marrow. *Stem Cells*.2006;24(3): 482-493.
- [5] Lysy PA., Campard D, Smets F, et al. Persistence of a chimerical phenotype after hepatocyte differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Prolif*. 2008;41(1): 36-58.
- [6] Yao P,Hu DR,Wang S,et al.Shiyong Yixue Zazhi. 2005;23(19): 2143-2145.  
姚鹏, 胡大荣, 王帅, 等. 自体骨髓干细胞移植治疗慢性重症肝病 60例[J].实用医学杂志, 2005, 23(19): 2143-2145.
- [7] Ishikawa T , Terai S , Urata Y , et al. Fibroblast growth factor2 facilitates the differentiation of transplanted bone marrow cells into hepatocytes. *Cell Tissue Res*.2006 ;323(2): 221-231.
- [8] Russo FP , Alison MR , Bigger BW, et al. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gast roenterology*.2006; 130(6): 1807-1821.
- [9] Chen YX,Xie WF.Zhongguo Shiyong Neike Zazhi. 2002;22(11): 641-642.  
陈岳祥, 谢渭芬.肝纤维化治疗现状与对策[J].中国实用内科杂志, 2002, 22(11): 641-642.
- [10] Li JT,Wang H,Liao CX,et al.Wuhan Daxue Xuebao. 2007;28(2): 256-261.  
李婧婷, 汪晖, 廖长秀, 等. 肝星状细胞激活的分子机制与抗肝纤维化治疗[J].武汉大学学报, 2007, 28(2): 256-261.
- [11] Shi LJ, Li GZ, Wang JH, et al. Bone Marrow Stromal Cells Control the Growth of Hepatic Stellate Cells In Vitro. *Dig Dis Sci*.2008;53(11): 2969-2974.
- [12] Parekkadan BJ, van Poll D, Megeed Z, et al. Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.2007; 363(2): 247-352.
- [13] Zhao DC,Chen R,Yu WH,et al.Zhongguo Bingli Shengli Zazhi. 2005;21(6): 1139-1142.  
赵东长,陈蕊,余伟华,等.骨髓间质干细胞抑制肝星状细胞增殖与活化的体外研究[J].中国病理生理杂志, 2005, 21(6): 1139-1142.
- [14] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.  
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [15] Schwarz EJ , Alexander GM, Prockop DJ,et al.Multipotential marrow stromal cells transduced to produce L2DOPA: engraftment in a rat model of Parkinson disease. *Hum Gene Ther* .1999 ;10(15): 2539-2546.
- [16] Li JF, Ma Y, Wei W, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2008;12(8): 1493-1496.  
李俊峰, 马勇, 魏伟, 等. 体外诱导大鼠骨髓干细胞向肝干细胞分化的特征[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(8): 1493-1496.
- [17] Yang C. Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology*.2003;124(1): 147-159.
- [18] Lin N, Hu K, Chen S, et al. Nerve growth factor-mediated paracrine regulation of hepatic stellate cells by multipotent mesenchymal stromal cells. *Life Sciences*. 2009;85(7-8): 291-295.
- [19] Resnitzky D ,Gossen M ,Bujard H ,et al. Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol* .1994 ;14(3): 1669-1679.
- [20] Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*.2003;36(3): 131-149.
- [21] Bellacosa A, Almadori G, Cavallo S, et al. CyclinD1 gene amplification in human laryngeal squamous cell carcinomas: prognostic significance and clinical implications. *Clin cancer Res*.1996; 2(1): 175-180.
- [22] Cattam P, Hohauss S, BellacosaA, et al. Association between Cyclin DI (CCND1) Gene Amplification and Human Papillomavirus Infection in Human Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Clin cancer Res*.1998; 4(11): 2585-2589.
- [23] Chen YW,Wu JX,Li DG.Guowai Yixue:Xiaohuaxi Jibing Fence. 2005;25(1): 11-14.  
陈源文, 吴建新, 李定国. 肝星状细胞活化与细胞周期调控[J]. 国外医学: 消化系疾病分册, 2005, 25(1): 11-14.
- [24] Calbo J, ParrenoM, Sotillo E, et al. G1 cyclin / cyclin - dependent kinase - coordinated phosphorylation of endogenous pocket p proteins differentially regulates their interactions with E2F4 and E2F1 and gene expression. *Biol Chem*.2002; 277(52): 50-63.
- [25] Lents NH, Keenan SM, Bellone C, et al. Stimulation of the Raf /MEK/ERK cascade is necessary and sufficient for activation and Thr -160 phosphorylation of a nuclear - targeted CDK2. *Biol Chem*. 2002; 277(49): 47-69.
- [26] Hao L, ElShamy WM. BRCA1-IRIS activates cyclin D1 expression in breast cancer cells by downregulating the JNK phosphatase DUSP3/VHR. *Int J Cancer*. 2007;121(1): 39-46.
- [27] Nakuci E, Mahner S, Drenzo J, et al. BRCA1-IRIS regulates cyclin D1 expression in breast cancer cells. *Exp Cell Res*. 2006; 312(16): 3120-3131.
- [28] Kuo MY,Hsu HY,Kok SH , et al . Prognostic role of p27 ( Kip1) expression in oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *Oral Oncol*. 2002 ;38(2): 172-178.
- [29] Gardner LB, Li Q, Park MS , et al . Hypoxia inhibits G1/S transition through regulation of p27 expression. *J Biol Chem* .2001;276(11): 7919-7926.
- [30] Hengst L, Read SI. Translational control of p27kip1 Accumulation during the cell cycle. *Science*.1996; 271(5257): 1861-1864.
- [31] Huang SX,Lin JH,Zhang YY,et al.Zhongguo Guzhongliu Gubing. 2008;7(1): 19-22.  
黄守行, 林建华, 张怡元, 等. p27Kip1 基因及蛋白在骨肉瘤中的表达及其意义[J]. 中国骨肿瘤骨病, 2008, 7(1): 19-22.

#### 来自本文课题的更多信息--

**基金资助:** 广西自然科学基金资助项目(0640133); 广西自然科学基金资助项目(0897008); 广西“新世纪十百千人才工程”专项资金资助项目(2006206); 广西卫生厅青年基金(桂卫 Z2009102)。

**利益冲突:** 无利益冲突。

**课题的创新点:** 在国内外首次从细胞周期蛋白调控的角度阐述了骨髓间充质干细胞抑制肝星状细胞增殖的机制。

**课题评估的“金标准”:** 实验评价的主要对象是肝星状细胞周期的变化, 目前国内外文献都以流式细胞术作为主要检测手段, 文章中已采用。

**课题的偏倚与不足:** 实验观察的是体外单纯的两种细胞之间的作用, 而生物体是一个复杂体系, 骨髓间充质干细胞移植到大鼠体内后, 在体内各种细胞之间的相互作用及具体机制仍需进一步分析。

**提供临床借鉴的价值:** 实验结果证实骨髓间充质干细胞抑制肝星状细胞的增殖, 其机制可能是通过抑制 CyclinD1 的表达, 上调 P27 蛋白的表达, 使细胞周期停滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期, 从而发挥抑制肝星状细胞增殖的作用, 为骨髓移植治疗肝损伤提供应用理论基础。