骨髓间充质干细胞体外调控肝星状细胞死亡受体5的表达*★

杨 文，覃山羽，姜海行，张君红，宁 琳，孟云超

Bone marrow mesenchymal stem cells modulate the expression of death receptor 5 in hepatic stellate cells

Yang Wen, Qin Shan-yu, Jiang Hai-xing, Zhang Jun-hong, Ning Lin, Meng Yun-chao

文章亮点：

首次在共培养体系中探讨骨髓间充质干细胞分泌的肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体通过上调死亡受体5和Caspase-3蛋白的表达，诱导肝星状细胞凋亡的机制。

Abstract

BACKGROUND: Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand can induce the death of hepatic stellate cells by up regulating the protein expression of death receptor 5.

OBJECTIVE: To investigate the effects of bone marrow mesenchymal stem cells on the protein expression of death receptor 5 and Caspase-3 in hepatic stellate cells by co-culture and explore the possible underlying mechanisms.

METHODS: Bone marrow mesenchymal stem cells were isolated, purified and passaged. Passage 3 bone marrow mesenchymal stem cells were used. Primary cultured hepatic stellate cells and fibroblast cells were freeze-thawed for use. Bone marrow mesenchymal stem cells and hepatic stellate cells were co-cultured using a 6-well Transwell membrane. Hepatic stellate cells were seeded in the lower chamber with bone marrow mesenchymal stem cells and fibroblast cells were seeded onto the Transwell membrane of the inner chamber. Four groups were divided randomly: blank control group: hepatic stellate cells and bone marrow mesenchymal stem cells were cultured alone; fibroblast control group: fibroblast cells were co-cultured with hepatic stellate cells; bone marrow mesenchymal stem cells co-culture group: bone marrow mesenchymal stem cells were co-cultured with hepatic stellate cells; experimental group: at 6 hours after 1.5 mg/L TRAIL polyclonal antibody was added, bone marrow mesenchymal stem cells were co-cultured with hepatic stellate cells.

RESULTS AND CONCLUSION: In the bone marrow mesenchymal stem cells group, the proliferation of hepatic stellate cells was significantly decreased, but the apoptosis of hepatic stellate cells was significantly, the protein expression of death receptor 5 and Caspase-3 were significantly increased in a time-dependent manner as compared with the other groups ($P < 0.01$). The protein expression of Caspase-3 and death receptor 5 was significantly lower in the experimental group than in the bone marrow mesenchymal stem cells co-culture group at each time period ($P < 0.01$). Bone marrow mesenchymal stem cells co-cultured with hepatic stellate cells can inhibit the proliferation of hepatic stellate cells and promote the apoptosis of hepatic stellate cells. This occurs possibly because bone marrow mesenchymal stems cells paracrine tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand by upregulating the protein expression of Caspase-3 and death receptor 5.

Yang W, Qin SY, Jiang HX, Zhang JH, Ning L, Meng YC. Bone marrow mesenchymal stem cells modulate the expression of death receptor 5 in hepatic stellate cells.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(27): 4947-4952. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景：肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体可以通过上调死亡受体5蛋白的表达诱导大鼠肝星状细胞凋亡。

目的：观察大鼠骨髓间充质干细胞对肝星状细胞死亡受体5和Caspase-3蛋白表达的影响，探讨骨髓间充质干细胞诱导肝星状细胞凋亡及其机制。

方法：贴壁筛选法培养、纯化SD大鼠骨髓间充质干细胞，传至第3代使用；大鼠原代肝星状细胞和肝纤维原细胞系冻融后传代使用。应用6孔培养板，建立上下双层细胞共培养体系，常规培养。将细胞分为4组：①空白对照组：肝星状细胞和骨髓间充质干细胞分别单独培养。②阴性对照组：肝纤维原细胞与肝星状细胞共培养(模拟星状细胞体内生长环境)。③骨髓间充质干细胞与肝星状细胞共培养组。④实验组：1.5 mg/L TRAIL多克隆抗体与骨髓间充质干细胞作用6 h后，不换液，再与肝星状细胞共培养。

结果与结论：在共培养组中肝星状细胞的增殖降低，凋亡增加，且肝星状细胞死亡受体5、Caspase-3蛋白的表达均显著升高，并呈时间依赖性，且与其他组比较差异有显著性意义($P < 0.01$)。实验组Caspase-3和死亡受体5蛋白的表达在共培养的各个时间段均低于共培养组，与共培养组比较差异有显著性意义($P < 0.01$)。提示骨髓间充质干细胞与肝星状细胞共培养能抑制肝星状细胞的增殖，促进肝星状细胞的凋亡，其机制可能为骨髓间充质干细胞旁分泌肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体通过上调Caspase-3和死亡受体5蛋白的表达实现的。

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

Yang Wen★, Studying for master's degree, Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
200350323@163.com

Corresponding author: Qin Shan-yu, Associate professor, Master's supervisor, Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
qsyhappy@yahoo.con.cn

Supported by: the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. Guikezi0897008*

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.27.002

Received: 2012-04-10
Accepted: 2012-04-18

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

杨文★，男，1984年生，江苏省徐州市人，汉族，广西医科大学在读硕士，主要从事干细胞及肝损伤机制研究。
200350323@163.com

通讯作者：覃山羽，副教授，硕士研究生导师，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
qsyhappy@yahoo.con.cn

中图分类号:R394.2
文献标识码:A
文章编号: 2095-4344(2012)27-04947-06

收稿日期: 2012-04-10
修回日期: 2012-04-18
(20120301008/YJ·S)

关键词：死亡受体5；骨髓间充质干细胞；肝星状细胞；肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体；Caspase-3；干细胞

缩略语：肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体：tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand，TRAIL

杨文，覃山羽，姜海行，张君红，宁琳，孟云超. 骨髓间充质干细胞体外调控肝星状细胞死亡受体 5 的表达[J].中国组织工程研究，2012，16(27):4947-4952. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

肝纤维化是肝硬化的前期病变，而肝星状细胞的激活、增殖是肝纤维化发生的关键环节[1]。因此，抑制肝星状细胞的活化和促进活化型肝星状细胞的凋亡成为治疗肝纤维化的重要策略[2]。骨髓间充质干细胞具有多分化潜能[3]，研究表明，在体内外其均可有效促进肝星状细胞的凋亡，对保护肝细胞和抗肝纤维化有潜在的应用价值[4-5]。

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand，TRAIL)，是死亡受体家族的一个分支，能够诱导多种肿瘤细胞凋亡。有学者用外源性的TRAIL通过作用于死亡受体家族的死亡受体5，激活和上调Caspase-3蛋白的表达诱导了大鼠肝星状细胞系HSC-T6的凋亡[6]，但是其具体机制仍未完全清楚。在骨髓间充质干细胞和肝星状细胞的共培养体系中，骨髓间充质干细胞是否也通过分泌TRAIL，上调肝星状细胞死亡受体5和Caspase-3蛋白的表达，继而诱导肝星状细胞的凋亡，目前尚未见有相关研究报道。

因此，本实验通过观察骨髓间充质干细胞对肝星状细胞增殖、凋亡及死亡受体5、Caspase-3蛋白表达的影响，探讨骨髓间充质干细胞旁分泌TRAIL在其中的作用机制。

1 材料和方法

设计：细胞学体外观察实验。

时间及地点：于2011-04/11在广西医科大学实验中心完成。

材料：

动物：SPF级健康雄性SD大鼠，鼠龄6~8周龄，体质量100~120 g，由广西医科大学实验动物中心提供(医动字SCXKG桂2009-0002号)，自由饮水和进食。

细胞：肝纤维原细胞系购于中山大学附属肿瘤医院细胞库，大鼠原代肝星状细胞由广西壮族自治区人民医院张国博士赠送。

主要试剂及仪器：

试剂及仪器	来源
DMEM 培养液	美国 Gibco 公司
特级胎牛血清	美国 Hyclone 公司
Annexin-V-FITC/PI 试剂盒	美国 BD 公司
兔抗 Caspase-3 多克隆抗体	美国 Santa Cruz 公司
荧光标记的抗兔 IgG	美国 KPL 公司
MTT 试剂盒	武汉谷歌生物科技有限公司
TRAIL ELISA 试剂盒	武汉华美生物公司
兔抗死亡受体 5 多克隆抗体	英国 abcam 公司
羊抗 TRAIL 多克隆抗体	北京中杉金桥公司
β-actin	美国 EPITMICS 公司
transwell insert 半透膜	美国 Corning Costar 公司
Fast Universal SYBR Green	美国 Roche 公司
酶标仪	美国 Molecular Devices 公司

方法：

骨髓间充质干细胞的分离与培养：按照文献[7]的方法分离和培养骨髓间充质干细胞，取第3代细胞(P3)，2.5 g/L胰酶消化，调整细胞浓度$2\times10^5/cm^2$，备用。

原代肝星状细胞的培养和传代：将原代大鼠肝星状细胞于37 ℃、体积分数5%CO_2培养箱中培养，48 h后换为体积分数10%小牛血清的DMEM培养液，每三四天换液1次。取第4代(P4)细胞，调整细胞浓度为$2\times10^5/cm^2$，备用。

肝纤维原细胞的培养和传代：肝纤维原细胞系冻融后传代使用，方法与原代肝星状细胞相同。

细胞共培养：参照文献[8-9]的方法应用6孔培养板，在半透膜上层接种骨髓间充质干细胞或纤维原细胞(2×10^5/孔)，在下层接种肝星状细胞(2×10^5/孔)，常规培养。

实验分组：①空白对照组：肝星状细胞和骨髓间充质干细胞分别单独培养。②阴性对照组：

肝纤维原细胞与肝星状细胞共培养(模拟星状细胞体内生长环境)。③骨髓间充质干细胞与肝星状细胞共培养组。④实验组：根据MTT结果，选择TRAIL多克隆抗体质量浓度为1.5 mg/L与骨髓间充质干细胞作用6 h后，不换液，再与肝星状细胞共培养。

以上体系培养观察24，48，72 h，各时间段于倒置相差显微镜下动态观察肝原代星状细胞和大鼠骨髓间充质干细胞的形态学改变。

MTT法检测肝星状细胞增殖抑制率：TRAIL多克隆抗体分别以质量浓度0.5，1.0，1.5，2.0 mg/L先与骨髓间充质干细胞作用6 h后，再分别与肝星状细胞共培养48 h，用0.25%胰酶消化，将细胞配成浓度为1×10^8 L^{-1}，取96孔板，每孔加入100 μL后再加入100 μL的完全培养基，置于培养箱，48 h后每孔加MTT溶液(5 g/L)20 μL，孵育4 h，弃去培养液，每孔加二甲基亚砜150 μL，避光振荡10 min。选择490 nm波长测定各孔吸光值，以仅加入MTT溶液处理的空白孔为对照，在酶标仪上测定各孔吸光度值(*A*)。

细胞增殖抑制率(%)=(1−实验组*A*值/对照组*A*值)×100%

根据MTT结果，取TRAIL多克隆抗体质量浓度为1.5 mg/L作为实验组浓度进行后续实验。将骨髓间充质干细胞与肝星状细胞分别共培养24，48，72 h后，按照上述方法，检测各组肝星状细胞的生长增殖抑制率。

流式细胞仪检测细胞凋亡：收集各时段肝星状细胞，按照Annexin-V-FITC/P细胞凋亡试剂盒说明操作。

ELISA法检测各组上清液中的TRAIL的水平：按1 000，500，250，125，62.5，31.25，15.6 μg/L浓度依次稀释标准品后，和待测样品100 μL分别加入96孔微孔板中。37 ℃水浴，2 h后每孔加生物素标记二抗100 μL，37 ℃水浴，1 h；洗板3次，加酶标抗体工作液100 μL，37 ℃水浴1 h，洗板5次；加底物工作液90 μL，37 ℃水浴30 min，加终止液50 μL，5 min内在450 nm处酶标仪读数，读2次取平均数；作标准曲线图，根据标本的*A*值在标准曲线上查出其浓度。

Western blot检测肝星状细胞中Caspase-3和死亡受体5的表达：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 μg，蛋白进行15%SDS-PAGE凝胶电泳；PVDF转膜；封闭1 h；兔抗Caspase-3多克隆抗体(1∶250)和兔抗死亡受体5多克隆抗体(1∶500)，4 ℃过夜；荧光二抗进行杂交1 h。用红外双色激光成像系统进行扫描分析，将所得图像转换成黑白图像，以目的蛋白/β-actin的灰度比值表示相对目的蛋白水平。

主要观察指标：①骨髓间充质干细胞和肝星状细胞的形态学观察。②骨髓间充质干细胞表面标志物$CD29^+$，$CD34^-$，$CD44^+$，$CD45^-$的表达。③免疫组化法对肝星状细胞进行鉴定。④MTT法检测肝星状细胞增殖抑制率。⑤流式细胞仪检测肝星状细胞的凋亡率。⑥ELISA法检测各组上清液中的TRAIL的水平。⑦Western blot检测肝星状细胞中Caspase-3和死亡受体5蛋白的表达。

统计学分析：数据资料以$\bar{x}\pm s$表示，应用统计软件SPSS 13.0进行分析，多组间均数比较采用多因素方差分析，以$P < 0.05$为差异有显著性意义，$P < 0.01$为差异有非常显著性意义。

2 结果

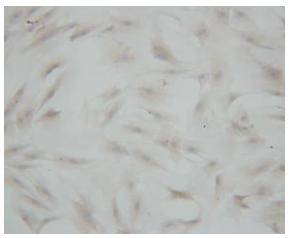
2.1 *骨髓间充质干细胞的形态特点* 用全骨髓贴壁法培养的骨髓间充质干细胞24 h首次换液，此时可见少量呈类圆形的细胞贴壁生长。

培养第3天，细胞呈短梭形，并成集落贴壁生长。传至第3代，细胞类似成纤维细胞，折光性好，呈旋涡状生长。

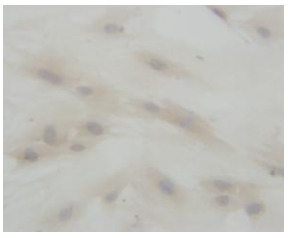
2.2 *骨髓间充质干细胞表面标记物的鉴定* 流式细胞仪检测细胞表面标志物的表达率分别为$CD29^+$(99.45%)，$CD34^-$(97.91%)、$CD44^+$(99.52%)、$CD45^-$(98.42%)。

说明全骨髓贴壁法培养的骨髓间充质干细胞可以获得较高纯度的骨髓间充质干细胞。

2.3 *第4代肝星状细胞的活性鉴定* 免疫组织化学染色显示，第4代的肝星状细胞表达α−平滑肌动蛋白，见图1。



a: ×200



b: ×400

Figure 1 Alpha smooth muscle actin expression in passage 4 hepatic stellate cells (immunocytochemisty)

图 1 第 4 代肝星状细胞中表达 α−平滑肌动蛋白(免疫组化染色)

2.4 骨髓间充质干细胞抑制肝星状细胞的增殖 用MTT法检测0.5，1.0，1.5，2.0 mg/L不同TRAIL抗体浓度对共培养48 h后肝星状细胞增殖抑制率分别为(20.38±1.44)%，(12.33±2.25)%，(7.38±1.28)%，(7.55±1.23)%，取TRAIL多克隆抗体质量浓度为1.5 mg/L作为实验组浓度进行后续实验。

共培养24，48，72 h后，共培养组中肝星状细胞的增殖抑制率分别为(10.55±2.45)%，(35.39±3.38)%，(45.43±5.75)%。骨髓间充质干细胞在72 h明显抑制大鼠肝星状细胞的增殖，并呈时间依赖性，与其他组比较差异有显著性意义($P < 0.01$)，而空白组与阴性对照组肝星状细胞增殖抑制率接近($P > 0.05$)，见表1。

表1 各组肝星状细胞的增殖抑制率
Table 1 The inhibition rate of hepatic stellate cell proliferation in each group ($\bar{x}\pm s$, n=4, %)

Group	Co-culture time (h)		
	24	48	72
HSCs control	4.97±1.38	5.22±1.28	5.35±1.12
Fibroblast control	4.88±1.27	5.23±1.25	5.33±1.17
BMSCs co-culture	10.55±2.45[a]	35.39±3.38[a]	45.43±5.75[a]
Experimental	6.78±1.36[b]	7.42±1.26[b]	8.89±2.37[b]

[a]$P < 0.01$, *vs*. HSCs control group and fibroblast control group; [b]$P < 0.01$, *vs*. BMSCs co-culture group. HSCs: Hepatic stem cells; BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells

2.5 流式细胞仪检测肝星状细胞的凋亡 骨髓间充质干细胞和肝星状细胞共培养24，48，72 h后，肝星状细胞的凋亡率呈时间依赖性增高，与其他组比较差异有显著性意义($P < 0.01$)，而空白组与阴性对照组肝星状细胞的凋亡率接近($P > 0.05$)，见表2。

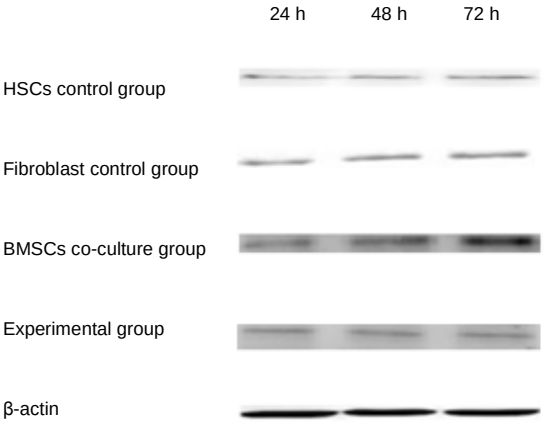
表2 各组肝星状细胞凋亡率
Table 2 Apoptosis rate of hepatic stellate cells ($\bar{x}\pm s$, n=4, %)

Group	Co-culture time (h)		
	24	48	72
HSCs control	12.28±0.25	19.54±0.14	20.33±0.47
Fibroblast control	12.55±0.25	19.24±0.24	20.18±0.48
BMSCs co-culture	29.95±0.72[a]	37.33±2.12[a]	57.35±1.18[a]
Experimental	23.18±0.33[b]	26.78±1.45[b]	34.88±1.25[b]

[a]$P < 0.01$, *vs*. HSCs control group and fibroblast control group; [b]$P < 0.01$, *vs*. BMSCs co-culture group. HSCs: Hepatic stem cells; BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells

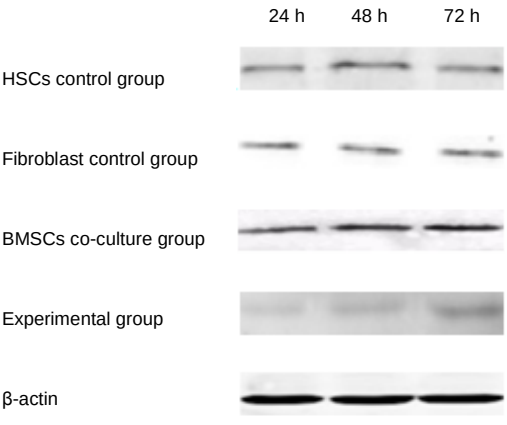
2.6 各组肝星状细胞的死亡受体5和Caspase-3蛋白表达 Western Blot检测结果发现，骨髓间充质干细胞和肝星状细胞共培养后，死亡受体5和Caspase-3的表达增加，且呈时间依赖性增加，与其他组比较差异有显著性意义($P < 0.01$)。

而空白组和阴性对照组肝星状细胞中死亡受体5和Caspase-3的表达水平接近($P > 0.05$)。与共培养组比较，实验组死亡受体5和Caspase-3蛋白的表达水平较低($P < 0.01$)，见图2，3。



HSCs: Hepatic stem cells; BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells

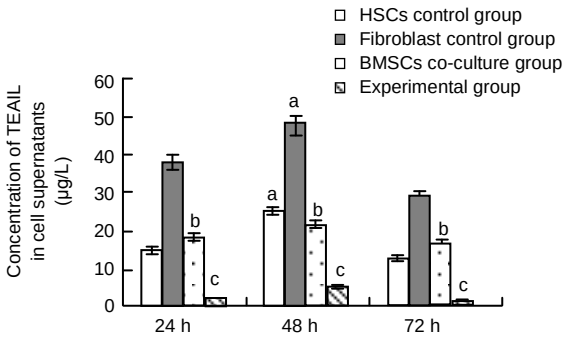
Figure 2 Expression of death receptor 5 protein expression in hepatic stellate cells in each group
图2 各组肝星状细胞中死亡受体5蛋白的表达



HSCs: Hepatic stem cells; BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells

Figure 3 Caspase-3 protein expression in HSCs in each group
图3 各组肝星状细胞中Caspase-3蛋白的表达

2.7 各组细胞上清液中的TRAIL的表达水平 应用ELISA法检测各组上清液中的TRAIL，肝星状细胞单独培养组和骨髓间充质干细胞单组培养组在48 h时，TRAIL的分泌到达生理的增殖期高峰，72 h后有所下降；共培养组的TRAIL低于骨髓间充质干细胞单独培养组，实验组中的TRAIL最低，见图4。



[a]*P* < 0.01, *vs*. 24 h and 72 h; [b]*P* < 0.01, *vs*. fibroblast control group; [c]*P* < 0.01, *vs*. BMSCs co-culture group; HSCs: Hepatic stem cells; BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells

Figure 4 Expression level of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in cell supernatants in each group

图 4 各组细胞上清液中肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体的表达水平

3 讨论

肝星状细胞活化后，通过增生和分泌大量胶原纤维参与肝纤维化的形成[10]，并在其中起到关键作用[11]。目前研究认为肝纤维化是可以逆转的[12]。骨髓间充质干细胞被广泛用于临床，用于治疗多种疾病[13]，并在一定条件诱导下，可以分化成肝细胞[14]。研究表明，骨髓间充质干细胞能有效逆转肝纤维化，对肝组织的损伤和修复有显著作用[15]。Rabani等[16]将骨髓间充质干细胞回输到有肝纤维化的小鼠体内，发现肝纤维化不仅得到了减轻，而且小鼠的生存时间还有所延长。骨髓间充质干细胞可以分泌TRAIL，研究表明，TRAIL作用十分广泛，可以诱导多种肿瘤细胞和病毒感染的细胞凋亡[17]，干细胞分泌的TRAIL可以用来治疗肺癌[18]，此外，在自然杀伤细胞、激活的T细胞及树突状细胞中也发现了TRAIL的表达，这说明TRAIL参与机体免疫调节[19]。Tang等[20]研究发现，TRAIL在星状细胞的凋亡中起到重要作用。而死亡受体5为TRAIL最重要的死亡受体[21]。大量国内外研究证实，TRAIL和死亡受体5结合后，通过激活其下游的同源酶，进而激活其效应物Caspase-3，从而导致细胞凋亡。

本研究通过Transwell半透膜建立起来的骨髓间充质干细胞和肝星状细胞的共培养体系，观察骨髓间充质干细胞对肝星状细胞的增殖和凋亡的影响。研究发现，骨髓间充质干细胞和肝星状细胞共培养后，随着时间的延长，肝星状细胞细胞的贴壁减弱，细胞数减少；在共培养组中，肝星状细胞的增殖抑制率和凋亡率显著上升，骨髓间充质干细胞对肝星状细胞的增殖抑制和促凋亡的作用在共培养24 h后更明显。在蛋白水平上，共培养24 h后，肝星状细胞的死亡受体5和Caspase-3蛋白明显增多，呈时间依赖性增加。与共培养组相比，实验组肝星状细胞的增殖抑制率和凋亡率显著下降，死亡受体5和Caspase-3蛋白表达减少。然而，本研还发现，共培养组中，TRAIL的质量浓度低于骨髓间充质干细胞单独培养组，可能与共培养体系中细胞因子间相互作用被消耗掉有关。另外，在倒置相差显微镜下于24，48，72 h各时间段动态观察单独培养组的肝星状细胞发现，其凋亡并不明显，说明单独培养组中的肝星状细胞自分泌的TRAIL在培养的24，48，72 h时间段内，并未明显促进其本身的凋亡，这可能与肝星状细胞在单独培养的72 h内低水平的表达死亡受体5蛋白有关。有文献表明，单独培养的大鼠肝星状细胞株HSCs-T6在培养的第8天时，死亡受体5 mRNA的表达才明显增加[6]。同样，在倒置相差显微镜下于24，48，72 h各时间段动态观察共培养组中骨髓间充质干细胞发现，骨髓间充质干细胞的凋亡也不明显，说明共培养体系中的TRAIL并未促进骨髓间充质干细胞的凋亡，这可能与骨髓间充质干细胞上死亡受体5的反应不活跃和骨髓间充质干细胞低水平的表达pro-caspase-8，pro-caspase-9有关[22]。还值得关注的是，在本研究中应用几乎完全封闭TRAIL对死亡受体5作用的抗体剂量时，实验组肝星状细胞的凋亡率仍高于肝星状细胞单独培养组。提示在共培养体系中，死亡受体通路并不是骨髓间充质干细胞对肝星状细胞作用的惟一通路，还存在其他受体通路及相关的细胞因子在相互作用，并相互影响。

总之，骨髓间充质干细胞在共培养体系中抑制了肝星状细胞的增殖，促进了肝星状细胞的凋亡，其机制可能与骨髓间充质干细胞旁分泌的TRAIL，通过上调死亡受体5和Caspase-3蛋白的表达有关。然而共培养体系的微环境比较复杂，深入研究各种信号通路和细胞因子的作用，对于阐明骨髓间充质干细胞对肝星状细胞的作用和抗肝纤维化的机制有着深远的影响。

致谢：感谢广西医科大学第一附属医院消化内科覃山羽、姜海行教授给予的大力支持以及课题组其他成员的艰辛付出，感谢广西壮族自治区科学技术厅给予的资金支持，同时感谢广西壮族自治区人民医院张国博士惠赠大鼠肝原代星状细胞。

4 参考文献

[1] Bansal R, Prakash J, de Ruijter M, et al. Peptide-modified albumin carrier explored as a novel strategy for a cell-specific delivery of interferon gamma to treat liver fibrosis. Mol Pharm. 2011;8(5):1899-1909.

[2] Elsharkawy AM, Oakley F, Mann DA. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. Apoptosis. 2005;10(5):927-939.
[3] Kestendjieva S, Kyurkchiev D, Tsvetkova G, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. Cell Biol Int. 2008;32(7):724-732.
[4] Hu KP, Lin N, Li JZ, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(27):5257-5260.
胡昆鹏,林楠,林继宗,等.人骨髓间质干细胞对肝星状细胞的体外调控[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(27):5257- 5260.
[5] Wang D, Guo XZ, Liu F, et al. Xiandai Xiaohua ji Jieru Zhenliao. 2008;13(4):258-261.
王迪,郭晓钟,刘峰,等.经肝动脉自体骨髓干细胞移植治疗失代偿期肝硬化40例[J].现代消化及介入诊疗,2008,13(4):258-261.
[6] Gao J, Zhao YH, Kang P, et al. Linchuang Gandanbing Zazhi. 2010;26(3):300-303.
高杰,赵勇华,康鹏,等.TRAIL诱导大鼠肝星状细胞系HSC-T6凋亡及机制研究[J].临床肝胆病杂志,2010,26(3):300-303.
[7] Mu LY, Han MZ, Qi JF. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi. 2007; 14(14):1408-1411.
穆丽雅,韩明子,祁金锋.门静脉和尾静脉注入小鼠骨髓干细胞向肝脏迁移的比较[J].世界华人消化杂志,2007,14(14):1408-1411.
[8] Parekkadan B, van Poll D, Megeed Z, et al. Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2007;363(2):247-252.
[9] Shi L, Li G, Wang J, et al. Bone marrow stromal cells control the growth of hepatic stellate cells in vitro. Dig Dis Sci. 2008; 53(11):2969-2974.
[10] Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. J Biol Chem. 2000;275(4):2247-2250.
[11] Bansal R, Prakash J, de Ruijter M, et al. Peptide-modified albumin carrier explored as a novel strategy for a cell-specific delivery of interferon gamma to treat liver fibrosis. Mol Pharm. 2011;8(5):1899-1909.
[12] Ramachandran P, Iredale JP. Reversibility of liver fibrosis. Ann Hepatol. 2009;8(4):283-291.
[13] Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, et al. Bone marrow mesenchymal cells: how do they contribute to tissue repair and are they really stem cells? Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2011;59(5):369-378.
[14] Ju X, Li D, Gao N, et al. Hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells using microfluidic chips. Biotechnol J. 2008;3(3):383-391.
[15] Baertschiger RM, Serre-Beinier V, Morel P, et al. Fibrogenic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells in injured liver. PLoS One. 2009;4(8):e6657.
[16] Rabani V, Shahsavani M, Gharavi M, et al. Mesenchymal stem cell infusion therapy in a carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model affects matrix metalloproteinase expression. Cell Biol Int. 2010;34(6):601-605.
[17] Hague A, Hicks DJ, Hasan F, et al. Increased sensitivity to TRAIL-induced apoptosis occurs during the adenoma to carcinoma transition of colorectal carcinogenesis. Br J Cancer. 2005;92(4):736-742.
[18] Loebinger MR, Eddaoudi A, Davies D, et al. Mesenchymal stem cell delivery of TRAIL can eliminate metastatic cancer. Cancer Res. 2009;69(10):4134-4142.
[19] Fan K, Luo L, Liu HH. Chongqin Ligong Daxue Xuebao: Riran Kexue. 2011;25(2):47-52.
范开,罗岚,刘洪洪.肿瘤坏死因子诱导凋亡配体TRAIL研究进展[J].重庆理工大学学报:自然科学,2011,25(2):47-52.
[20] Tang X, Yang J, Li J. Accelerative effect of leflunomide on recovery from hepatic fibrosis involves TRAIL-mediated hepatic stellate cell apoptosis. Life Sci. 2009;84(15-16):552-557.
[21] Taimr P, Higuchi H, Kocova E, et al. Activated stellate cells express the TRAIL receptor-2/death receptor-5 and undergo TRAIL-mediated apoptosis. Hepatology. 2003;37(1):87-95.
[22] Szegezdi E,O'Reilly A,Davy Y,et al.Stem cells are resistant to TRAIL receptor-mediated apoptosis.J Cell Mol Med.2009; 13(11-12): 4409-4414.

来自本文课题的更多信息--

基金声明：广西自然科学基金资助项目：桂科自(0897008)。

作者贡献：此课题由杨文、覃山羽及姜海行设计；研究过程由杨文、张君红、宁琳及孟云超操作完成；研究所用新试剂及分析工具由姜海行提供；数据分析由杨文完成；本论文写作由杨文完成。

利益冲突：课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求：实验过程中对动物处置符合2006年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

文章概要：

文章要点：①观察骨髓间充质干细胞分泌TRAIL作用于肝星状细胞后，发现肝星状细胞凋亡增多，增殖降低，并且死亡受体5和Caspase-3蛋白的表达增多。②选用了TRAIL多克隆抗体对骨髓间充质干细胞分泌的TRAIL进行干预，进一步验证和明确骨髓间充质干细胞对肝星状细胞的促凋亡的作用是否是骨髓间充质干细胞所分泌的TRAIL通过上调死亡受体5和Caspase-3蛋白的表达实现的。

关键信息：①活化的肝星状细胞是肝纤维化发生、发展的关键环节。②骨髓间充质干细胞能促进活化的肝星状细胞凋亡，抑制其增殖。③骨髓间充质干细胞促进肝星状细胞凋亡的机制和骨髓间充质干细胞分泌的TRAIL通过上调死亡受体5和Caspase-3蛋白的表达有关。

研究创新点与不足之处：①创新点是首次在共培养体系中探讨骨髓间充质干细胞分泌的TRAIL通过上调死亡受体5和Caspase-3蛋白的表达，诱导肝星状细胞凋亡的机制。②不足之处是选用的是TRAIL多克隆抗体对骨髓间充质干细胞进行干预，如能选用基因沉默技术对骨髓间充质干细胞进行干预，那么对结果的可信度将增加。