

## 骨髓间充质干细胞与肝星状细胞共培养后凋亡相关基因的改变

胡昆鹏<sup>1</sup>, 刘波<sup>1</sup>, 姚志成<sup>1</sup>, 林继宗<sup>2</sup>, 邓美海<sup>2</sup>, 潘卫东<sup>2</sup>, 林楠<sup>2</sup>, 陈骋<sup>2</sup>, 许瑞云<sup>2</sup> (<sup>1</sup>中山大学附属第三医院岭南医院普通外科, 广东省广州市 510530; <sup>2</sup>中山大学附属第三医院肝胆外科, 广东省广州市 510630)

### 文章亮点:

1 骨髓间充质干细胞是近年治疗肝纤维化的热点方法,但其治疗机制尚未明了。课题组前期工作表明,骨髓间充质干细胞可以在体外调控肝星状细胞凋亡,抑制其增殖,这是骨髓间充质干细胞抗肝纤维化的一个重要方面,但其中骨髓间充质干细胞如何调控肝星状细胞尚未完全明确。  
2 实验创新性地使用基因芯片技术,对凋亡相关基因进行筛选,发现了与肝星状细胞凋亡相关基因,有助于进一步探明骨髓间充质干细胞抗肝纤维化的机制。

### 关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 肝星状细胞; 骨髓间充质干细胞; 凋亡; 肝纤维化; 肝硬化; 基因芯片

### 主题词:

骨髓; 间质干细胞; 肝星形细胞; 细胞凋亡; 芯片分析技术

### 基金资助:

国家教育部博士点基金(20110171120089, 20110171110070)

### 摘要

**背景:** 前期研究证实骨髓间充质干细胞可在体外促进肝星状细胞凋亡、抑制其活性,但其作用机制尚未明确。  
**目的:** 通过基因芯片技术,筛选出骨髓间充质干细胞调控肝星状细胞凋亡过程中可能参与的凋亡相关基因。  
**方法:** 将分离提纯的人骨髓间充质干细胞与肝星状细胞在 6 孔 Transwell 板上建立上下共培养体系,单独培养人骨髓间充质干细胞作为对照组,培养 72 h。基因芯片分析单独培养组与共培养组骨髓间充质干细胞凋亡相关基因的改变情况,找出与调控肝星状细胞密切相关的凋亡基因。  
**结果与结论:** 采用 SABiosciences 第 2 代功能分类基因芯片产品进行凋亡基因筛查发现,共培养后骨髓间充质干细胞中显著上调的凋亡基因有: AKT1, PIK3R2, DAPK1, DHCR24, NOTCH2, BDNF 等。结合前期研究结果,推测 NOTCH 有可能在骨髓间充质干细胞调控肝星状细胞过程中起关键作用。

胡昆鹏, 刘波, 姚志成, 林继宗, 邓美海, 潘卫东, 林楠, 陈骋, 许瑞云. 骨髓间充质干细胞与肝星状细胞共培养后凋亡相关基因的改变[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(28):4444-4449.

## Changes in apoptosis-related genes in bone marrow mesenchymal stem cells after cocultured with hepatic stellate cells

Hu Kun-peng<sup>1</sup>, Liu Bo<sup>1</sup>, Yao Zhi-cheng<sup>1</sup>, Lin Ji-zong<sup>2</sup>, Deng Mei-hai<sup>2</sup>, Pan Wei-dong<sup>2</sup>, Lin Nan<sup>2</sup>, Chen Cheng<sup>2</sup>, Xu Rui-yun<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Department of General Surgery, Lingnan Hospital, Third Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510530, Guangdong Province, China; <sup>2</sup>Department of Hepatobiliary Surgery, Third Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Previous studies have confirmed that bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro* can promote hepatic stellate cell apoptosis and inhibit its activity, in which the mechanism of action remains unknown.  
**OBJECTIVE:** To screen out apoptosis-related genes during hepatic stellate cell apoptosis regulated by bone marrow mesenchymal stem cells using gene chip technology.  
**METHODS:** Purified human bone marrow mesenchymal stem cells were seeded in 6-well Transwell plate and cocultured with hepatic stellate cells. Cultured human bone marrow mesenchymal stem cells alone served as control group, and cultured for 72 hours. The alterations in apoptosis-related genes were analyzed between culture alone group and coculture group using gene chip technology. The genes strongly associated with regulation of hepatic stellate cells were selected.  
**RESULTS AND CONCLUSION:** By the functional classification of second-generation SABiosciences Gene chips, apoptotic gene screening found that after coculture, significantly upregulated genes in bone marrow mesenchymal stem cells contained: AKT1, PIK3R2, DAPK1, DHCR24, NOTCH2 and BDNF. Combined with previous findings, we hypothesized that NOTCH may play a key role in the regulation of hepatic stellate cells by bone marrow mesenchymal stem cells.

**Subject headings:** bone marrow; mesenchymal stem cells; hepatic stellate cells; apoptosis; microchip analytical

胡昆鹏, 男, 1982 年生, 江西省丰城市人, 汉族, 2010 年中山大学毕业, 博士, 主治医师, 主要从事肝硬化、肝癌的基础与临床研究。

通讯作者: 许瑞云, 博士生导师, 中山大学附属第三医院肝胆外科, 广东省广州市 510630

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.28.003  
[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)28-04444-06

稿件接受: 2014-05-20

Hu Kun-peng, M.D., Attending physician, Department of General Surgery, Lingnan Hospital, Third Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510530, Guangdong Province, China

Corresponding author: Xu Rui-yun, Doctoral supervisor, Department of Hepatobiliary Surgery, Third Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

Accepted: 2014-05-20

procedures

**Funding:** the Doctoral Fund of Ministry of Education of China, No. 20110171120089, 20110171110070

Hu KP, Liu B, Yao ZC, Lin JZ, Deng MH, Pan WD, Lin N, Chen C, Xu RY. Changes in apoptosis-related genes in bone marrow mesenchymal stem cells after cocultured with hepatic stellate cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(28):4444-4449.

## 0 引言 Introduction

肝纤维化是各种慢性肝病的共同病理过程, 是一种严重危害人类身心健康的世界性疾病, 至今没有公认有效的药物治疗方法<sup>[1]</sup>。因此, 探索切实可行的治疗方法, 其意义非常重大。既往的治疗多集中在抑制肝脏炎症反应和免疫反应上, 现今已逐渐转向采取以肝星状细胞为靶标的治疗策略。肝星状细胞的异常激活并最终导致细胞外基质在肝内过量积聚, 是肝纤维化发生的中心环节。抑制肝星状细胞增殖或促进其凋亡、抑制其分泌细胞外基质或促进细胞外基质降解, 是治愈肝纤维化的关键。肝星状细胞凋亡的发生与一系列复杂而又相互关联的生物信号传导和调控有关, 主要凋亡信号来自于细胞膜受体, 如死亡受体、神经生长因子受体和外周型苯甲二氮卓受体, 以及胞浆蛋白, 如Bcl-2家族蛋白和细胞周期蛋白等。近几年来, 国内外学者进行了许多尝试, 诱导肝星状细胞凋亡和抑制其活化, 但都没有取得确切的疗效。

骨髓间质干细胞是近几年用于治疗肝纤维化的热点。目前国内外有不少研究都表明骨髓间质干细胞移植后均能不同程度减轻实验动物的肝纤维化, 改善肝功能, 提高存活率, 或者改善肝硬化患者的肝功能。课题组同期进行的类似研究(包括实验研究和临床试验)也证实了上述结论<sup>[2-5]</sup>。但问题是, 骨髓间质干细胞是如何发挥抗肝纤维化作用的呢? 早期的研究曾认为骨髓间质干细胞治疗肝纤维化的机制主要是通过分化为肝细胞修复肝损伤, 但更多的研究结果并不支持这一观点, 多数实验并未能找到骨髓间质干细胞分化为肝细胞的证据。而前期实验中发现, 植入的骨髓间质干细胞最初是非选择性地分布在机体各组织中, 随后选择性地分布在肝组织中聚集并长期存活。而且, 骨髓间质干细胞的分布部位多集中在纤维组织附近, 而非肝实质细胞位置。由于肝星状细胞主要聚集于肝纤维组织中, 那么定居下来的骨髓间质干细胞是否通过旁分泌作用来调控肝星状细胞(如抑制肝星状细胞的增殖, 促进肝星状细胞凋亡, 或调节肝星状细胞从激活态转变为静止态等), 从而发挥抗肝纤维化作用?

为了回答这个问题, 课题组建立“骨髓间质干细胞与肝星状细胞体外共培养体系”, 体外模拟骨髓间质干细胞治疗肝纤维化的状态, 前期实验已经通过流式细胞术、免疫印迹等证实, 骨髓间质干细胞可以促进肝星状细胞凋亡, 抑制肝星状细胞活化标志 $\alpha$ -肌动蛋白的表达, 表明骨髓间质干细胞可以通过非直接接触来抑制肝星状细胞活化, 促进肝星状细胞凋亡<sup>[2]</sup>。但具体何种细胞因子参与作用, 目前尚不清楚。因此, 找出明显改变的凋亡相关基因及其产物, 是研究的关键所在。本实验拟通过基因芯片技术,

筛选出骨髓间质干细胞调控肝星状细胞凋亡过程中可能参与其中的凋亡相关基因。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 细胞学体外观察。

**时间及地点:** 于2010年9月至2011年12月在中山大学附属第三医院中心实验室完成。

**材料:**

**骨髓:** 青年健康志愿者的髌骨骨髓, 参与者均已签署临床试验知情同意书。

**细胞系:** 人肝星状细胞及人正常肝细胞系L-02均购自中山大学实验动物中心, 取处于对数生长期的细胞用于实验。

骨髓间充质干细胞与肝星状细胞共培养后凋亡相关基因检测主要实验试剂:

试剂	来源
RNA保存液RNAlater	Amibion
TRIzol <sup>®</sup> Reagent、焦碳酸二乙酯(DEPC)、SYBR Green Mix	Invitrogen
RNase-free DNase I、NA纯化试剂盒、AMV Reverse Transcriptase Kit	Promega
Bulge-Loop <sup>™</sup> miRNA qRT-PCR kits	Ribobio
细胞凋亡PCR芯片384HT	上海康成生物

**实验方法:**

**人骨髓间质干细胞的分离培养:** 抽取健康志愿者髌骨骨髓, 按实验室前期建立的方法及相关文献进行分离培养<sup>[3-5]</sup>。选取第3-6代人骨髓间质干细胞, 培养液为含体积分数为10%胎牛血清的L-DMEM, 每两三天换液1次。

**人肝星状细胞的培养:** 人肝星状细胞复苏后接种于塑料培养瓶中, 37℃、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3 d换液1次。

**细胞共培养体系的建立:** 以Transwell insert作为培养体系上层, 按 $2 \times 10^4$ /孔接种人骨髓间质干细胞; 培养板为培养体系下层, 按 $2 \times 10^4$ /孔接种第7代肝星状细胞。另设人骨髓间质干细胞单纯培养组。各组均于37℃、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, 相同条件下重复培养1次。培养72 h后, 倒置相差显微镜下观察活体细胞形态学改变。

**样品的RNA提取:** 共培养3 d后, 取单独培养组和共培养组骨髓间质干细胞。分别进行贴壁细胞匀浆、悬浮细胞匀浆, 两相分离, RNA沉淀, RNA清洗, 重新溶解RNA沉淀, 提取RNA。再用DNase I消化RNA样品, 去除其中可

能含有的基因组DNA。

**RNA纯化:** 用无RNA酶的水将经过DNase I消化的RNA样品(RNA $\leq$ 45  $\mu$ g)的体积调整为200  $\mu$ L。随后加700  $\mu$ L Buffer RLT, 充分混匀。如果是RNA沉淀, 则先加试剂盒提供的无RNA酶水溶解RNA后, 再加Buffer RLT。加500  $\mu$ L无水乙醇, 用移液器轻轻吸打数次混匀后, 取700  $\mu$ L得到的溶液过柱(RNeasy MinElute Spin Column), 轻轻盖上管盖, 室温10 000 r/min离心15 s, 去除收集管中的液体。将柱子转移到新的2 mL收集管后, 加500  $\mu$ L Buffer RPE洗柱子, 轻轻盖上管盖, 室温10 000 r/min离心15 s, 去除收集管中的液体, 将柱子放回收集管中。加500  $\mu$ L体积分数为80%乙醇到柱子中, 轻轻盖上管盖, 室温10 000 r/min离心2 min, 将收集管及液体丢弃。将柱子转移到一新的2 mL收集管, 打开柱子的盖子, 最大转速离心5 min, 将收集管及液体丢弃。将柱子转移到一新的1.5 mL收集管, 取14  $\mu$ L无RNA酶的水悬空加到柱子的膜中央, 轻轻盖上盖子, 最大转速离心1 min洗脱RNA。

**RNA质量检测:** 使用NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000测定RNA浓度和纯度。纯度检测: RNA溶液的 $A_{260}/A_{280}$ 的比值是一种RNA纯度检测方法, 比值范围1.8-2.1。即使比值超出这个范围, RNA样品也一样可以用于一些普通实验中如Northern杂交, RT-PCR和RNA酶保护实验。

**合成cDNA:** 配制混合物: GE(5倍gDNA Elimination Buffer)2  $\mu$ L, 总RNA1.0  $\mu$ g灭菌水配制成总液量10  $\mu$ L; 42  $^{\circ}$ C水浴5 min后, 冰上放置至少1 min。短暂离心后, 在离心管中依次加入: BC3(5倍RT Buffer)4  $\mu$ L, P2(Primer & External Control Mix) 1  $\mu$ L, RE3(RT Enzyme Mix 3)2  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O和RNase free各3  $\mu$ L, 移液枪轻轻吸打几次混合均匀, 42  $^{\circ}$ C温育15 min, 95  $^{\circ}$ C温育5 min使酶失活, 每20  $\mu$ L cDNA加91  $\mu$ L灭菌水混匀, 置冰浴待用或-20  $^{\circ}$ C保存。

**实时定量PCR:** ①样品准备: 在5 mL管或多通道槽配制混合液, 2X SuperArray PCR master mix 2 000  $\mu$ L, 已稀释的cDNA102  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 1 898  $\mu$ L, 总体积4 000  $\mu$ L。②加样: 小心打开PCR Array上的膜, 加25  $\mu$ L混合液到PCR Array对应的每个孔中, 小心盖上盖子密封PCR Array, 在设置PCR程序前将准备好的PCR Array放在冰上, 实时定量PCR程序设置完后, 将PCR Array置于实时定量PCR仪进行PCR反应。

**主要观察指标:** 比较单独培养组与共培养组骨髓间充质干细胞中370个凋亡相关基因的表达情况。数据分析采用 $\Delta\Delta$ Ct方法。①计算每个处理组中的每个通路相关基因的 $\Delta$ Ct。 $\Delta$ Ct (group 1) = average Ct - average of HK genes' Ct for group 1 array。 $\Delta$ Ct (group 2) = average Ct - average of HK genes' Ct for group 2 array。②计算2个PCR Array(或两组)中每个基因的 $\Delta\Delta$ Ct。 $\Delta\Delta$ Ct =  $\Delta$ Ct (组2) -  $\Delta$ Ct (组1)。组1是单独培养组, 组2是共培养组。③通过 $2^{-\Delta\Delta$ Ct}计算共培养组与单独培养组对应基因的表达差异。

## 2 结果 Results

**2.1 单独培养组及共培养组骨髓间充质干细胞的扩增曲线** 单独培养骨髓间充质干细胞及共培养骨髓间充质干细胞行Apoptosis PCR Array384HT检测扩增曲线图, 见图1, 2。

**2.2 共培养后骨髓间充质干细胞中表达量上调的凋亡基因列表** 分别对两次共培养及单独培养的骨髓间充质干细胞行4张基因芯片检测, 分别对比培养前后Ct值并进行比较, 见表1, 2, 图3, 4。

表1 第1次共培养骨髓间充质干细胞对比单独培养上调基因及上调倍数列表

Table 1 Up-regulated genes and up-regulated multiple of co-cultured bone marrow mesenchymal stem cells for the first time versus alone culture

位点	基因	上调倍数	产品目录
A03	ACVR1B	4.119 5	PPH01955A
A04	ADORA1	4.765 1	PPH00062E
A08	AKT1	4.772 7	PPH00088A
A09	ALOX12	15.605 8	PPH05791B
A14	API5	5.589 4	PPH01050A
B14	BDNF	6.182 1	PPH00569E
C06	BOK	4.457 7	PPH00903A
D16	CEBPB	11.052 6	PPH00991A
D17	CEBPG	4.102 6	PPH02012A
E04	CRYAB	10.342 3	PPH00123A
E14	DAPK1	14.172 2	PPH00273E
E21	DDIT3	6.963	PPH00310A
F01	DHCR24	7.076 2	PPH02278E
F13	ERN1	9.528 7	PPH12383B
G02	FOXO3	4.293 8	PPH00807A
G13	HIP1	4.932 4	PPH21229A
G19	HSPA1B	5.228 1	PPH01216A
H23	LRDD	5.407 2	PPH02157A
I13	MKL1	8.169 7	PPH01263A
J05	NLRC4	9.830 4	PPH06124A
J06	NLRP1	4.314	PPH06155E
J13	NOD2	4.715 2	PPH06126E
J15	NOTCH2	4.555 2	PPH06330B
J21	NUPR1	5.709 6	PPH19840E
K04	PEA15	4.574 1	PPH02372B
K06	PIK3R2	7.006 4	PPH00709A
K10	PLEKHF1	5.260 1	PPH09596A
L04	PRODH	8.542	PPH00877A
L07	PRUNE2	6.802 2	PPH17589A
M05	SERPINB9	5.027 1	PPH10965A
M07	SFRP1	4.627 5	PPH00344A
M09	SIPA1	5.279 8	PPH07466A
M23	STAT5A	5.131 4	PPH00759A
M24	STAT5B	9.063	PPH01972E
N01	STK17A	4.132 3	PPH07669E
N10	TIAF1	5.782 7	PPH17687A
N22	TNFRSF1A	13.079 1	PPH00346B

**2.3 共培养后骨髓间充质干细胞中表达量显著上调的凋亡基因列表** 综合分析两次基因芯片结果, 找出两次均表达上调的基因, 得出共培养的骨髓间充质干细胞与单独培养的骨髓间充质干细胞相比, 有以下凋亡相关基因显著上调, 见表3。

表2 第2次共培养骨髓间充质干细胞与单独培养对比上调基因及上调倍数列表

Table 2 Up-regulated genes and up-regulated multiple of co-cultured bone marrow mesenchymal stem cells for the second time versus alone culture

位点	基因	上调倍数	产品目录
B14	BDNF	5.204 1	PPH00569E
E14	DAPK1	32.232 8	PPH00273E
F01	DHCR24	5.194 5	PPH02278E
F11	ERCC2	4.462 6	PPH01550B
H08	IKBKG	97.108 6	PPH00660A
I13	MKL1	4.261 4	PPH01263A
J02	NFKB1	7.916 2	PPH00204E
K17	PPP1R13B	7.827 2	PPH00638E
K24	PRKCE	10.730 5	PPH01467E
L04	PRODH	6.924 5	PPH00877A
L07	PRUNE2	4.536 6	PPH17589A
M04	SERPINB2	7.529 8	PPH00793B
M15	SON	5.448 2	PPH20053A
O01	TNFRSF25	7.482 4	PPH00349A
O11	TP53BP2	4.960 6	PPH00394E
O12	TP53I3	6.916 8	PPH00383A
O15	TPD52L1	21.996 3	PPH08107A

表3 共培养后骨髓间充质干细胞显著上调基因列表

Table 3 Significantly up-regulated genes of co-cultured bone marrow mesenchymal stem cells

位点	上调基因	上调倍数
A08	AKT1	4.772 7
B14	BDNF	5.204 1
E14	DAPK1	32.232 8
F01	DHCR24	5.194 5
K06	PIK3R2	7.006 4
J15	NOTCH2	4.555 2

### 3 讨论 Discussion

肝纤维化发生发展的过程中, 肝星状细胞起到至关重要的作用<sup>[1]</sup>, 因此, 通过诱导活化态肝星状细胞凋亡, 进而减少细胞外基质分泌, 是治愈肝纤维化的重要途径<sup>[6-10]</sup>。肝星状细胞是近年来抗肝纤维化治疗的重要靶点, 而前期研究发现骨髓间充质干细胞具有促进肝星状细胞凋亡抑制其活化的作用<sup>[2]</sup>, 并且论证神经生长因子在其中发挥作用<sup>[11]</sup>。但两个细胞相互作用机制复杂, 不可能只有单一一个因子起作用。

国内其他学者发现, 骨髓间充质干细胞可能通过分泌肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体上调死亡受体5和Caspase-3蛋白的表达, 诱导肝星状细胞凋亡<sup>[12]</sup>。除此之外, 骨髓间充质干细胞很可能还通过分泌其他细胞因子、激活相关通路促使肝星状细胞发生细胞凋亡, 并抑制肝星状细胞活化, 从而发挥抗肝纤维化的作用。但具体何种细胞因子参与作用呢? 作者在本实验中采用了基因芯片技术对此进行分析。

基因芯片是近年发展起来的一种新型实用的高生物技术, 已成为目前国际上生命科学研究的热点之一。其突出特点是具有高度的并行性、多样性、微型性和自动化, 已成为高效、快速、大规模获取相关生物信息的重要手段。利用该技术可在数分钟至几小时内完成传统分子生物学方法要数月甚至数年才能完成的几万次至几十万次的基因分析实验。在这一部分中, 采用SABiosciences第2代功能分类基因芯片产品——Apoptosis PCR Array384HT(它可以同时测定370个与细胞凋亡、程序性死亡相关的关键基因的表达谱)进行凋亡基因筛查发现, 两次共培养后, 在370个基因中, 骨髓间充质干细胞中有多个凋亡相关基因上调, 对比分析两次上调基因, 去除单独培养的上调结果, 得出骨髓间充质干细胞中两次均显著上调的凋亡基因有: AKT1, PIK3R2, DAPK1, DHCR24, NOTCH2, BDNF等。

磷脂酰肌醇-3激酶-蛋白激酶(PI3K-Akt)信号途径是一种细胞内蛋白激酶途径, 它是人类肿瘤中最为活跃的细胞途径之一, 对调控细胞周期进程、细胞分化、细胞存活、细胞浸润和转移等具有重要作用, 能够促进细胞增殖和避免凋亡<sup>[13-16]</sup>。死亡相关蛋白激酶(DAPK1)是凋亡的正性调节因子之一, 在肿瘤的发生发展中具有重要抑制作用<sup>[17-20]</sup>。24-脱氢胆固醇还原酶(DHCR24)是定位于内质网的多功能酶, 具有催化胆固醇合成和抗细胞凋亡的作用<sup>[21-24]</sup>。脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)是属为神经生长因子家族成员, 由神经元的靶细胞分泌, 逆向营养神经元, 脑源性神经营养因子对神经细胞的生长发育及保护修复有重要作用。目前脑源性神经营养因子被认为是抗凋亡剂、抗氧化剂和钙通道阻滞剂<sup>[25-28]</sup>。因脑源性神经营养因子与神经生长因子高度同源, 且均归属神经生长因子家族。而神经生长因子与其低亲和力受体P75结合是调控肝星状细胞凋亡的众多通路中非常重要的一条。P75受体激活后, 再通过其下游的应激激酶(JNK)和核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B), 来实现对肝星状细胞凋亡的调控。这一点课题组前期文章已经报道, 骨髓间充质干细胞在体外状态下, 可以分泌神经生长因子, 作用于肝星状细胞表面的P75受体, 从而实现促凋亡作用<sup>[11]</sup>。Notch信号通路是一条影响细胞命运的、保守而重要的信号转导通路, 几乎涉及所有细胞的增殖和分化活动, 在调节细胞分化, 增殖和凋亡, 及一系列生理、病理过程中都起重要作用<sup>[29-32]</sup>。Notch信号由两个细胞的Notch受体与配体相互作用而激活。受体与配体的结合导致受体构象发生改变, 从而暴露受体胞外域的TACE金属蛋白酶切割位点, 随后在 $\gamma$ 分泌酶的介导下发生蛋白水解作用, 释放出Notch的胞内段(Notch intracellular domain, NICD), NICD转移至细胞核内, 与转录抑制因子RBP2Jk(也称为CSL/CBF1)结合; RBP2Jk与NICD结合并招募共活化物如MAML和组蛋白乙酰基转移酶P300/CBP等后, 即成为转录活化因子, 活化hes等分化

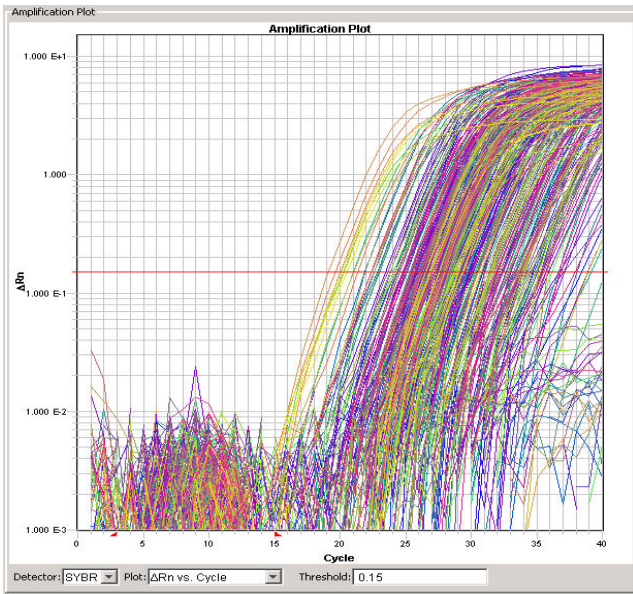


图1 单独培养骨髓间质干细胞行 Apoptosis PCR Array384HT 检测扩增曲线图

Figure 1 Amplification curves of bone marrow mesenchymal stem cells cultured alone as detected by Apoptosis PCR Array384HT

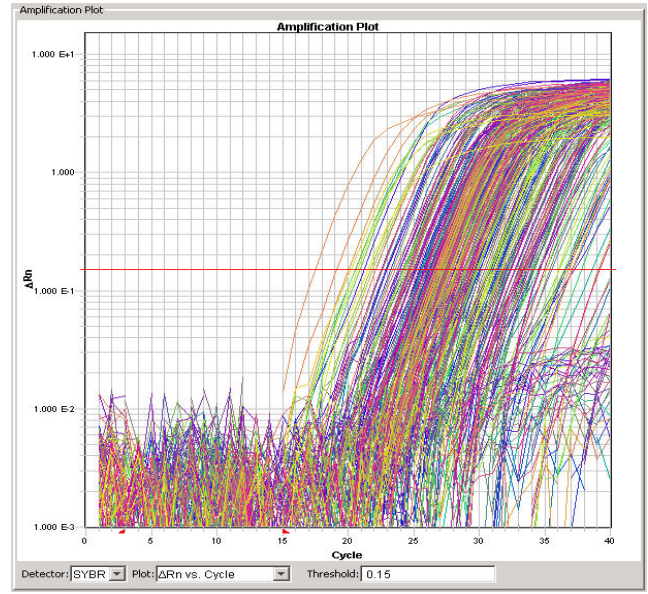


图2 共培养骨髓间质干细胞行 Apoptosis PCR Array384HT 检测扩增曲线图

Figure 2 Amplification curves of cocultured bone marrow mesenchymal stem cells as detected by Apoptosis PCR Array384HT

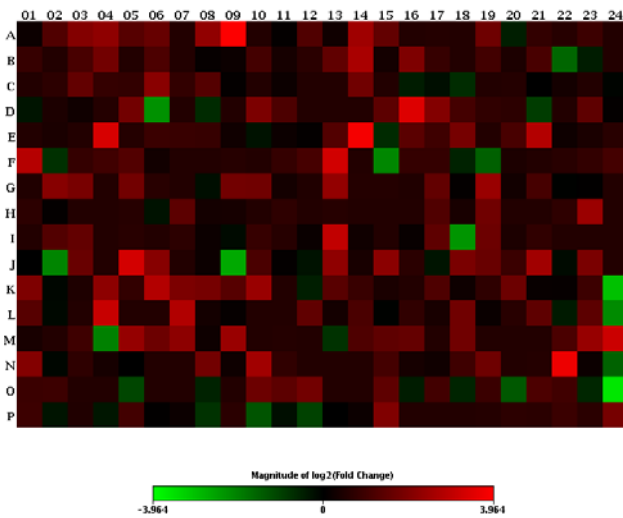


图3 第1次共培养骨髓间质干细胞对比单独培养上调基因及上调倍数热点图

Figure 3 Hot figure of up-regulated genes and up-regulated multiple of co-cultured bone marrow mesenchymal stem cells for the first time *versus* alone culture

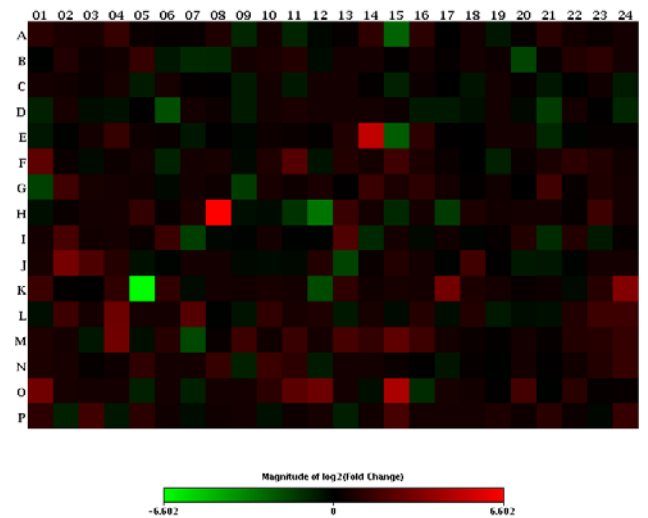


图4 第2次共培养骨髓间质干细胞对比单独培养上调基因及上调倍数热点图

Figure 4 Hot figure of up-regulated genes and up-regulated multiple of co-cultured bone marrow mesenchymal stem cells for the second time *versus* alone culture

拮抗基因的转录, 表达产物与相应的分化效应基因的启动子特异性结合, 并募集Groucho/TLE等转录共抑制因子, 阻碍细胞特异性分化效应基因的表达, 最终影响细胞的分化、增殖和凋亡。

AKT1, PIK3R2, DAPK1, DHCR24等的基因表达产物均为细胞内蛋白, 不能通过旁分泌影响到肝星状细胞的状态。NOTCH配体为膜蛋白, 需要通过配体和受体直接接触才能发挥作用, 在非接触共培养中可能没起关键作用。结合前期研究结果, 作者推测, 除了神经生长因子在骨髓

间质干细胞旁分泌调控肝星状细胞过程中起作用, NOTCH通路也有可能骨髓间充质干细胞直接调控肝星状细胞过程中起关键作用。

本文通过对比共培养的骨髓间质干细胞与单独培养的骨髓间质干细胞凋亡基因表达的变化情况, 分析筛选出在骨髓间质干细胞促肝星状细胞凋亡过程中可能起关键作用的若干基因, 为进一步阐明骨髓间质干细胞促肝星状细胞凋亡的分子机制, 为骨髓间质干细胞治疗肝纤维化建立理论基础。

**作者贡献:** 此课题由胡昆鹏、许瑞云、林楠设计; 研究过程由胡昆鹏、姚志成、陈骋操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由林继宗、潘卫东提供; 数据分析由刘波、邓美海完成; 论文写作由胡昆鹏完成。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 实验已获得中山大学附属第三医院伦理委员会批准。

**学术术语:** 基因芯片-其工作原理与经典的核酸分子杂交方法(southern、northern)是一致的, 都是应用已知核酸序列作为探针与互补的靶核苷酸序列杂交, 通过随后的信号检测进行定性定量分析, 基因芯片在一微小的基片(硅片、玻片、塑料片等)表面集成了大量的分子识别探针, 能够在同一时间内平行分析大量的基因, 进行大信息量的筛选与检测分析。

**作者声明:** 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr Physiol*. 2013;3(4):1473-1492.
- [2] 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.
- [3] 曹葆强, 林继宗, 钟跃思, 等. 自体骨髓细胞经门静脉移植治疗肝硬化与肝功能不全的临床研究[J]. *中华普通外科杂志*, 2007, 22(5): 386-389.
- [4] Lin N, Tang Z, Deng M, et al. Hedgehog-mediated paracrine interaction between hepatic stellate cells and marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;372(1):260-265.
- [5] 钟跃思, 林楠, 潘楚芝, 等. 氯甲基苯甲酰氨荧光染料标记大鼠骨髓间质干细胞的体内示踪[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(51):10090-10094.
- [6] Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*. 2008;88(1):125-172.
- [7] Roderfeld M, Weiskirchen R, Wagner S, et al. Inhibition of hepatic fibrogenesis by matrix metalloproteinase-9 mutants in mice. *FASEB J*. 2006;20(3):444-454.
- [8] Baba S, Fujii H, Hirose T, et al. Commitment of bone marrow cells to hepatic stellate cells in mouse. *J Hepatol*. 2004;40(2): 255-260.
- [9] Russo FP, Alison MR, Bigger BW, et al. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2006;130(6):1807-1821.
- [10] De Minicis S, Seki E, Uchinami H, et al. Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo. *Gastroenterology*. 2007;132(5):1937-1946.
- [11] Lin N, Hu K, Chen S, et al. Nerve growth factor-mediated paracrine regulation of hepatic stellate cells by multipotent mesenchymal stromal cells. *Life Sci*. 2009;85(7-8):291-295.
- [12] 杨文, 覃山羽, 姜海行, 等. 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.
- [13] Sasore T, Reynolds AL, Kennedy BN. Targeting the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Ocular Neovascularization. *Adv Exp Med Biol*. 2014;801:805-811.
- [14] Magi S, Saeki Y, Kasamatsu M, et al. Chemical genomic-based pathway analyses for epidermal growth factor-mediated signaling in migrating cancer cells. *PLoS One*. 2014;9(5): e96776.
- [15] Jung KH, Yan HH, Fang Z, et al. HS-104, a PI3K inhibitor, enhances the anticancer efficacy of gemcitabine in pancreatic cancer. *Int J Oncol*. 2014;45(1):311-321.
- [16] Martelli AM, Lonetti A, Buontempo F, et al. Targeting Signaling Pathways in T-cell acute lymphoblastic leukemia initiating cells. *Adv Biol Regul*. 2014. [Epub ahead of print]
- [17] Nair S, Hagberg H, Krishnamurthy R, et al. Death associated protein kinases: molecular structure and brain injury. *Int J Mol Sci*. 2013;14(7):13858-13872.
- [18] Puustinen P, Rytter A, Mortensen M, et al. CIP2A oncoprotein controls cell growth and autophagy through mTORC1 activation. *J Cell Biol*. 2014;204(5):713-727.
- [19] Fallet V, Cadranet J, Doubre H, et al. Prospective screening for ALK: clinical features and outcome according to ALK status. *Eur J Cancer*. 2014;50(7):1239-1246.
- [20] Rafiq K, Kolpakov MA, Seqqat R, et al. c-Cbl Inhibition Improves Cardiac function and Survival in Response to Myocardial Ischemia. *Circulation*. 2014. [Epub ahead of print]
- [21] Zerenturk EJ, Sharpe LJ, Ikonen E, et al. Desmosterol and DHCR24: unexpected new directions for a terminal step in cholesterol synthesis. *Prog Lipid Res*. 2013;52(4):666-680.
- [22] Fehér A, Juhász A, Pákási M, et al. Gender dependent effect of DHCR24 polymorphism on the risk for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2012;526(1):20-23.
- [23] Zerenturk EJ, Sharpe LJ, Brown AJ. Sterols regulate  $\beta$ -hydroxysterol  $\Delta$ 24-reductase (DHCR24) via dual sterol regulatory elements: cooperative induction of key enzymes in lipid synthesis by Sterol Regulatory Element Binding Proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1821(10):1350-1360.
- [24] Sarajärvi T, Lipsanen A, Mäkinen P, et al. Bepridil decreases A $\beta$  and calcium levels in the thalamus after middle cerebral artery occlusion in rats. *J Cell Mol Med*. 2012;16(11):2754-2767.
- [25] Halepoto DM, Bashir S, A L-Ayadhi L. Possible role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in autism spectrum disorder: current status. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2014; 24(4):274-278.
- [26] Keleshian VL, Kellom M, Kim HW, et al. Neuropathological Responses to Chronic NMDA in Rats Are Worsened by Dietary n-3 PUFA Deprivation but Are Not Ameliorated by Fish Oil Supplementation. *PLoS One*. 2014;9(5):e95318.
- [27] Pla P, Orvoen S, Saudou F, et al. Mood disorders in Huntington's disease: from behavior to cellular and molecular mechanisms. *Front Behav Neurosci*. 2014;8:135.
- [28] Takei N, Nawa H. mTOR signaling and its roles in normal and abnormal brain development. *Front Mol Neurosci*. 2014;7:28.
- [29] Azizidoost S, Shanaki Bavarsad M, Shanaki Bavarsad M, et al. The role of notch signaling in bone marrow niche. *Hematology*. 2014. [Epub ahead of print]
- [30] Suila H, Hirvonen T, Ritamo I, et al. Extracellular o-linked N-acetylglucosamine is enriched in stem cells derived from human umbilical cord blood. *Biores Open Access*. 2014; 3(2):39-44.
- [31] Kececi Y, Sir E. Prediction of resection weight in reduction mammoplasty based on anthropometric measurements. *Breast Care (Basel)*. 2014;9(1):41-45.
- [32] Li X, Martinez-Fernandez A, Hartjes KA, et al. Transcriptional Atlas of Cardiogenesis Maps Congenital Heart Disease Interactome. *Physiol Genomics*. 2014. [Epub ahead of print]