文章编号:1000-5404(2012)09-0857-05

论著

骨髓间充质干细胞对SD大鼠离体肝切除自体肝移植肝功能的保护作用

徐土炳,张玉君,谭嘉鑫,刘 炜,别 平 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所)

[摘要] **目的** 探讨骨髓间充质干细胞(BMSCs)对大鼠离体肝切除自体肝移植肝功能的保护作用,寻找可能的机制。**方法** 采用生化、TUNEL、Western blot等方法检测离体肝切除自体肝移植术后大鼠不同时间点的血清及肝脏组织标本。取SD大鼠骨髓体外培养BMSCs,纯化后GFP标记,第3代做检测并配置成细胞悬液,建立SD大鼠离体肝切除自体肝移植模型,分为BMSCs注射组(BMSCs悬液门静脉注入)和生理盐水注射组(等量生理盐水门静脉注入)行离体肝切除自体肝移植手术,观察术后大鼠状态,检测大鼠肝功能、肝细胞凋亡,TGF-β1及Bcl-2、bax表达情况。**结果** 成功分离培养BMSCs并鉴定。BMSCs注射组术后大鼠死亡率低于生理盐水注射组,BMSCs注射组术后12、24、48、72 h肝功能明显好于生理盐水注射组,肝细胞凋亡率低于生理盐水注射组。BMSCs注射组TGF-β1、bax水平较生理盐水注射组减少,Bcl-2较生理盐水注射组增高,其中bax下调、Bcl-2上调有显著性差异($P<0.05$),而TGF-β1在24、72 h无显著性差异。**结论** BMSCs能通过直接门静脉注射入肝改善离体肝切除自体肝移植大鼠术后肝功能,其可能通过影响Bcl-2/bax值减少肝细胞凋亡,可能是通过TGF-β1无关的其他途径。

[关键词] 离体肝切除;自体肝移植;骨髓间充质干细胞;肝细胞凋亡
[中图法分类号] R-332; R617; R657.3 [文献标志码] A

BMSCs implantation protects liver function in SD rats after extracorporeal hepatectomy and orthotopic liver autotransplantation

Xu Tubing, Zhang Yujun, Tan Jiaxin, Liu Wei, Bie Ping (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the protective effect of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) implantation in SD rats after extracorporeal hepatectomy and orthotopic liver autotransplantation. **Methods** SD rat BMSCS were isolated, cultivated and purified, and then labeled with green fluorescent protein (GFP) by lentivirus vector pLV. EX2d. P/hygro-EF1A > EmGFP. Then the cells at passage 3 to 5 was adjusted into cell suspension of 2×10^6 cells/ml. A total of 70 SD rats were randomly divided into BMSCs group ($n=30$), normal saline group ($n=30$) and sham operation group ($n=10$). The rats from the former 2 groups received extracorporeal hepatectomy and orthotopic liver autotransplantation (left liver lobe was resected), and then the rats from BMSCs group were given BMSCs transplantation through portal vein, and those from normal saline group were injected with normal saline. The rats wre sacrificed in 12, 24, 48, 72 and 168 h respectively. Serum and liver tissue specimens were collected and tested by the biochemistry, TUNEL and Western blot analysis for liver function, hepatocyte apoptosis and serum levels of TGF-β1, Bcl-2, and bax. **Results** BMSCs were successful cultured and identified. Compared with the normal saline group, BMSCs transplantation resulted in a lower postoperative mortality, significantly better postoperative liver function in 12, 24, and 72 h, and significantly decreased hepatocyte apoptosis. Expression of TGF-β1 at protein level was significantly decreased in 24 h, but not in 24 and 72 h, while that of bax was significantly increased and that of Bcl-2 was significantly increased in all above 3 time points ($P<0.05$). **Conclusion** Portal vein implantation of BMSCs improves postoperative liver function in SD rats after the extracorporeal hepatectomy and orthotopic liver autotransplantation, through influencing Bcl-2/bax ratio to attenuate hepatocyte apoptosis, and possibly through TGF-β 1 noncorrelation pathway.

[**Key words**] extracorporeal hepatectomy; orthotopic liver autotransplantation; bone mesenchymal stem cells; hepatocyte apoptosis

Supported by the Key Tackling Program of Science and Technology Research of Chongqing (2010XLC08). Corresponding author: Bie Ping, Tel: 86-23-68765314, E-mail: bieping@medmail.com.cn

[基金项目] 重庆市科技攻关重点项目(2010XLC08)
[通信作者] 别 平,电话:(023)68765314,E-mail:bieping@medmail.com.cn

肝脏肿瘤为我国最常见肿瘤之一,主要以外科手术切除、肝移植、放化疗及生物治疗为主[1-2],离体肝切除自体肝移植术是基于肝移植技术、治疗肝脏特殊部位肿瘤的一种手术方式,其优越性主要体现在本身并不巨大,但位置正位于重要的血管、胆管周围的肝脏肿瘤。这类肿瘤常规肝切除难度很大,耗时长,常需多次肝门阻断而致反复缺血再灌注损伤;术中损伤重要血管致难控性大出血;难以切除干净,短期内即出现转移而死亡。若行异体肝移植术则亟需解决肝源匮乏、术后需长期口服抗排斥药物。而采用离体肝切除自体肝移植手术能很好避免上述问题[3],且精准的肿瘤切除能保证肿瘤完整切除,并尽可能地避免正常肝脏组织切除过多,减少术后肝衰竭的发生率。临床研究发现,离体肝切除自体肝移植患者术后1周内出现肝功能衰竭为围手术期内最常见死亡原因。为了减少离体肝移植术后肝功能衰竭,我们建立了大鼠离体肝切除自体肝移植模型,使用该模型模拟临床手术过程,并通过术中门静脉注射骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells,BMSCs)或生理盐水,观察术后不同时间点BMSCs增殖,各组大鼠肝功能,肝细胞凋亡情况及TGF-β1、Bcl-2、bax的表达情况。

1 材料与方法

1.1 实验动物和材料

6周龄健康雄性SD大鼠80只,体质量180~220 g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。TUNEL试剂盒购于Roche公司,BMSCs完全培养基购于Cyagen公司,TGF-β1、Bcl-2、bax抗体均购于Santa cruz公司。

1.2 BMSCs分离、纯化与体外培养

颈椎脱臼处死SD大鼠10只,提取其股骨、胫骨和肱骨骨髓,采用全骨髓培养法获得原代BMSCs[4],24~36 h首次换液,7~10 d传第1代,以后2~3 d传代,经多次换液、传代以实现细胞纯化。构建重组慢病毒表达载体pLV. EX2d. P/hygro-EF1A>EmGFP,通过与辅助质粒共转染293FT包装细胞、通过荧光计数法和潮霉素药物筛选,获得大量含GFP基因的慢病毒液,并直接转染BMSCs,通过筛选纯化得到表达绿色荧光蛋白(GFP)的BMSCs。观察BMSCs的形态、传代及增殖状态,通过流式细胞仪等技术对BMSCs进行表型鉴定。取3~5代BMSCs细胞制成悬液备用(2×10^6/ml)。

1.3 SD大鼠离体肝切除自体肝移植术

70只6周龄的雄性SD大鼠,随机数字表法分成BMSCs注射组($n=30$)、生理盐水注射组($n=30$)、假手术组($n=10$)。离体肝手术:大鼠术前12 h禁食,4 h禁水,乙醚、戊巴比妥复合麻醉,取上腹部正中切口,剑突牵引,自制拉钩牵引双侧肋弓充分暴露腹部,游离肝周韧带、双重结扎离断左膈下静脉、右肾上腺静脉,9-0 prolene线结扎肝固有动脉,显露胆管后内置1支架并固定,充分游离门静脉,显露肝上下腔静脉及肝下下腔静脉,血管夹阻断出入肝血流后(开始计算阻断时间)剪断肝上下腔静脉、门静脉、肝下下腔静脉,迅速移除肝脏至4 ℃乳酸钠林格液,门静脉15 ml/h泵入4 ℃林格液,灌注同时切除肝左叶(约30%体积),灌注8 min,将70%肝脏原位植入腹腔,显微镜下用9-0 prolene线连续缝合肝上下腔静脉、门静脉,完毕后松开两处血管夹结束无肝期(结束阻断时间,平均约26 min),继续吻合肝下下腔静脉,胆管支架套接法重建胆管,检查无活动性出血、肝脏无扭曲后关腹。BMSCs注射组于胆管支架套接完毕于门静脉注入细胞悬液(含BMSCs 2×10^6,生理盐水稀释)1 ml,生理盐水注射组则通过门静脉注入1 ml生理盐水,假手术组则仅仅行开关腹及腹腔探查手术。最后分别于术后12、24、48、72、168 h处死大鼠并留取肝脏、血液标本进行进一步实验。

1.4 术后BMSCs在肝组织表达情况、肝功能、肝细胞凋亡检测及TGF-β1、Bcl-2、bax Western blot检测

取BMSCs注射组大鼠术后12、24、48、72、168 h肝组织做冰冻切片,置于荧光显微镜下观察BMSCs在肝组织表达情况,生理盐水组168 h作为对照。由西南医院检验科自动生化仪进行肝功能检测(TBIL、ALT、AST、Alb)。按ROCHE TUENL试剂盒说明书,对术后12、24、48、72、168 h大鼠肝组织进行TUNEL染色检测凋亡,阳性结果为细胞核棕黄色或棕褐色,背景呈紫蓝色,每个样品随机计数4个视野,按公式计算凋亡指数(AI):AI=凋亡细胞数/(凋亡细胞数+正常细胞数)。TGF-β1、Bcl-2、bax的表达采用Western blot法:按细胞总蛋白提取方法提取出总蛋白,10 μl蛋白进行SDS-PAGE电泳分离,电转至NC膜,TBST中清洗1 min后封闭过夜,加入1∶300稀释的一抗温育1.5 h,TBST洗3次,加入1∶5 000稀释的二抗温育1.5 h,TBST洗4次,化学发光及显影、定影。对胶片进行扫描,然后用UVP凝胶图像处理系统Labworks4.6软件分析目的条带的灰度值。

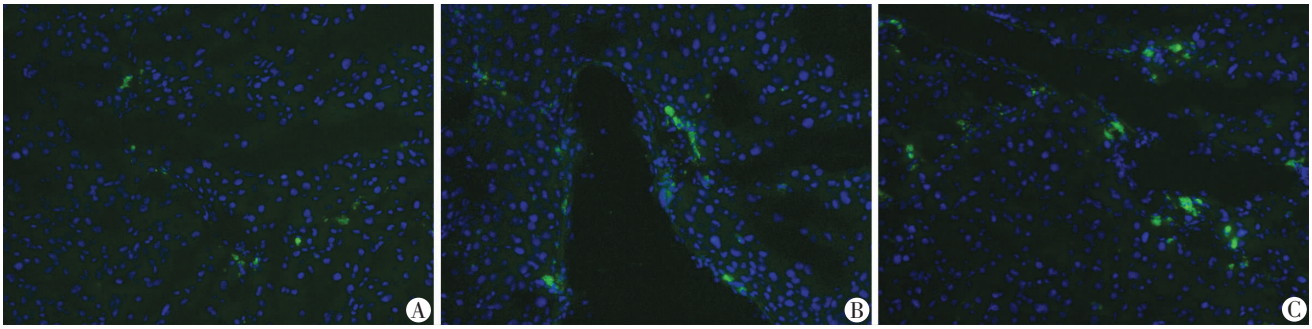
1.5 统计学分析

采用SPSS 18.0统计软件,术后各时间点组间肝功能比较采用方差分析,并用SNK法做两两比较;凋亡率、Western blot灰度分析均采用方差分析及SNK检验。

2 结果

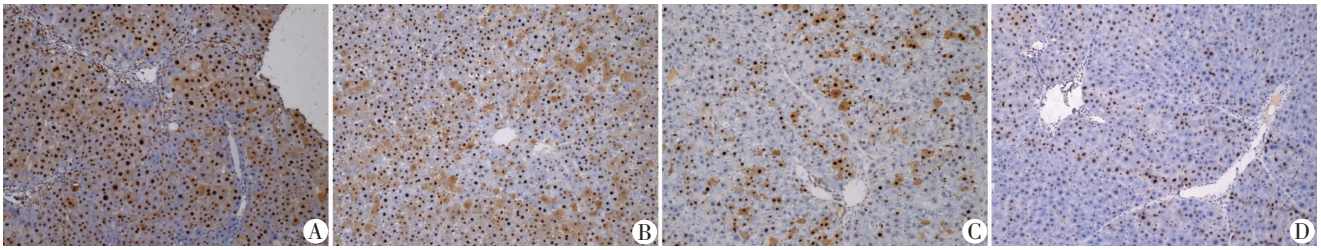
2.1 BMSCs体外培养及鉴定

GFP阳性的BMSCs经培养大部分呈长梭型,体积较小,核浆比大,表达增殖能力强,平均倍增时间为48 h,随传代次数的增加细胞的增殖能力有所下降。第1、3、5代细胞接种12 h后贴壁率在90%以上。流式检测BMSCs表达CD44 99.83%,表达CD29 99.88%,不表达CD34。



A: 24 h;B: 72 h;C: 168 h

图 1 BMSCs 注射入 SD 大鼠门静脉后不同时间点观察 (荧光显微镜×100)



A:生理盐水注射后 12 h;B:BMSCs 注射后 12 h;C:BMSCs 注射后 72 h;D:生理盐水注射后 72 h

图 2 TUNEL 法检测 2 组大鼠术后不同时间点肝细胞凋亡情况 (光学显微镜×40)

2.2 术后不同时间点 BMSCs 在肝脏中表达情况及肝功能检测

各组大鼠均按计划完成手术,术后大鼠存活率 BMSCs 注射组(28/30)高于生理盐水注射组(24/30)。分别于术后 12、24、48、72、168 h 处死大鼠,留取组织及血清,取部分组织做冰冻切片在荧光显微镜下观察(图 1),BMSCs 注射组术后 12、72 h 可见 GFP 阳性细胞,且数目随着时间变化有所增加,术后 168 h GFP 阳性细胞增殖明显,成团状散在分部于肝组织中。术后行离体肝切除。自体肝移植大鼠 ALT、AST 均明显上升,术后 12、24、48、72 h,BMSCs 注射组均明显低于生理盐水注射组($P<0.05$)。术后 48、72 h BMSCs 注射组均与假手术组无显著性差异,提示 BMSCs 组大鼠肝功能恢复能力较快。术后 TBIL、Alb 在 BMSCs 注射组与生理盐水注射组无显著性差异($P>0.05$)。见表 1~4。

表 1 各组大鼠不同时间点谷丙转氨酶水平比较(IU/L, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	12 h	24 h	48 h	72 h	168 h
BMSCs 注射组	220.0±26.8	149.5±35.1	45.8±11.4	28.5±3.1	10.3±6.3
生理盐水注射组	324.8±25.3[a]	183.7±24.6[a]	103.0±26.7[a]	40.7±7.6[a]	33.0±5.1
假手术组	29.5±3.5[a]	29.0±2.8[a]	29.0±1.4	26.5±2.1	28.5±2.1

a:$P<0.05$,与 BMSCs 注射组比较

表 2 各组大鼠不同时间点谷草转氨酶水平比较(IU/L, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	12 h	24 h	48 h	72 h	168 h
BMSCs 注射组	524.5±84.7	432.2±50.3	161.5±23.0	70.8±13.9	58.2±11.7
生理盐水注射组	728.0±139.1[a]	528.8±50.2[a]	275.2±51.9[a]	97.8±14.7[a]	73.0±8.6
假手术组	188.5±14.9[a]	139.5±0.7[a]	135.0±19.8	103.5±5.0	65.5±14.9

a:$P<0.05$,与 BMSCs 注射组比较

表 3 各组大鼠不同时间点总胆红素水平比较(μmol/L, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	12 h	24 h	48 h	72 h	168 h
BMSCs 注射组	3.1±0.7	2.8±0.6	2.8±0.7	2.5±0.9	2.6±0.8
生理盐水注射组	3.1±0.9	3.3±0.8	3.2±0.6	2.8±0.3	3.0±0.5
假手术组	2.6±0.2	3.0±0.3	3.2±1.1	3.4±1.0	3.8±0.1

表 4 各组大鼠不同时间点白蛋白(Alb)水平比较(g/L, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	12 h	24 h	48 h	72 h	168 h
BMSCs 注射组	22.0±1.5	18.5±0.5	22.5±1.3	24.7±0.5	24.6±1.3
生理盐水注射组	19.4±2.8	18.6±2.4	21.6±1.7	23.1±1.1	23.8±0.5
假手术组	24.1±0.1	24.6±0.1[a]	27.6±4.4[a]	24.5±0.3	24.6±0.1

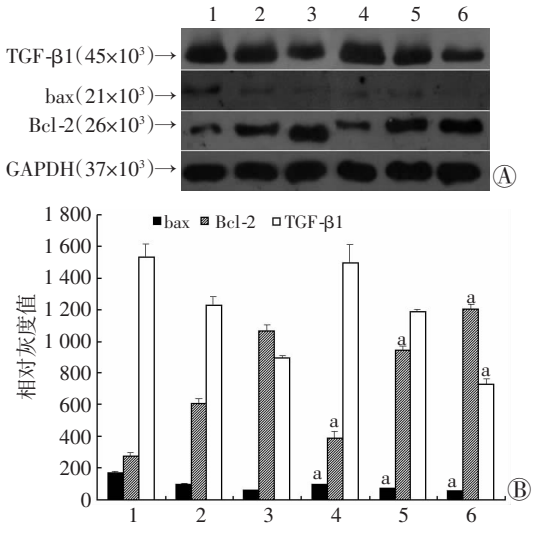
a:$P<0.05$,与 BMSCs 注射组比较

2.3 术后肝细胞凋亡情况

BMSCs 注射组较生理盐水注射组肝细胞凋亡明显减少(图 2)。术后 12、72、168 h,BMSCs 注射组凋亡指数分别为 0.31±0.018、0.15±0.011、0.044±0.014,生理盐水注射组凋亡指数分别为 0.44±0.034、0.23±0.021、0.060±0.029,2 组间有显著性差异($P<0.05$)。

2.4 术后不同时间点 TGF-β1、Bcl-2、bax Western blot 结果分析

Bcl-2 在 BMSCs 注射组各时间点均显著高于生理盐水注射组($P<0.05$),bax 则显著低于生理盐水注射组($P<0.05$),TGF-β1 在 24、72、168 h 均低于生理盐水对照组,但 24、72 h 无显著性差异($P>0.05$),在 168 h 有显著性差异($P<0.05$,图 3)。



1:生理盐水注射组24 h;2:生理盐水注射组72 h;3:生理盐水注射组168 h;4:BMSCs注射组24 h;5:BMSCs注射组72 h;6:BMSCs注射组168 h;A: Western blot检测;B:半定量分析 a:$P<0.05$,与生理盐水注射组对应时间比较

图3 术后不同时间点检测TGF-β1、Bcl-2、bax蛋白水平

3 讨论

离体肝切除自体肝移植术是基于精确肝切除及肝移植技术的一种治疗肝脏特殊部位肿瘤新的手术方式[5-7]。我国是乙肝大国,肝癌患者多,对于特殊部位的肝癌,常规手术切除困难,出血多,且更容易导致肿瘤复发、转移。临床观察发现,行离体肝切除自体肝移植术患者围术期主要死亡原因仍为肝功能衰竭,尽管采取了术中保护措施(如4 ℃ UW液灌注等),为此我们探讨能否通过其他方法改善术后肝功能,并研究可能的机制。

BMSCs是由骨髓分离出来的非造血干细胞,可分化成各种特定的细胞。Oh等[8-9]成功地在体外将BMSCs诱导为肝细胞样细胞。周播江等[10]于2004年成功地在体内将BMSCs诱导为肝细胞样细胞。BMSCs可分泌一些细胞因子,通过与靶细胞作用而产生生物效应。国内外已有许多研究认为BMSCs可以改善心肌及脑组织缺血再灌注损伤,对于肝再生有一定作用,但其作用机制未得而知。我们采用BMSCs通过门静脉注入来了解BMSCs对于离体肝切除自体肝移植术大鼠肝功能是否有保护作用。离体肝切除自体肝移植模型首先建立于第三军医大学西南医院肝胆外科研究所,由刘文渊等[11]完成,基本上模拟了西南医院肝胆外科临床行离体肝切除的完整过程,经切除30%肝脏后将肝脏原位回植,手术由同一组人员在显微镜下操作完成。研究发现术中经门静脉注射BMSCs后,术后大鼠存活率较生理盐水注射组高(93.3% *vs* 80.0%),生化检测发现术后BMSCs注射组大鼠ALT、AST在12、24、48、72 h明显好于生理盐水注射组($P<0.05$),提示BMSCs有助于改善大鼠的肝功能,同时BMSCs注射组大鼠ALT、AST在48、72 h与假手术组无显著性差异,提示BMSCs有良好的促肝功恢复能力。但168 h两组大鼠肝功能无显著性差异,提示大鼠本身良好的肝脏再生及恢复能力,及术后3 d为防治肝功能衰竭的关键时间点。

影响肝功能的因素很多,其中手术打击、缺血再灌注损伤、胆道梗阻以及慢性肝病等都直接损害肝功能;改善肝细胞功能的药物也很多,但药物往往需要通过肝脏解毒后代谢,反而加重了肝脏的负担。BMSCs是良好的可能改善肝功能的选择之一,首先它能在体内及体外定向分化成肝细胞,直接支持肝脏的功能[8-10];第二,BMSCs能与肝细胞直接或间接作用产生一些细胞因子[12-15],进而改善肝细胞活性和功能,甚至治疗或逆转肝纤维化[16]。通过检测不同时间点GFP阳性细胞在肝脏的分布情况发现,GFP阳性细胞数168 h有较明显增殖,但12~72 h却增殖较少,提示BMSCs可能通过分泌一些细胞因子,改变肝脏内环境,使肝细胞状态发生改变进而改善肝功能。

目前研究认为减少肝细胞凋亡能改善肝功能[17]。在肝脏缺血再灌注损伤中,肝细胞凋亡与坏死往往同时存在,且细胞凋亡率能一定程度上反映肝细胞坏死,肝细胞凋亡率下降同时意味着肝细胞坏死减少,残存肝细胞数目增加,使得肝功能好转[18-19]。实验发现,离体肝切除自体肝移植手术如何减少肝细胞凋亡成为预防肝功能衰竭重要的因素,我们认为注射BMSCs能改善大鼠离体肝切除自体肝移植手术的术后肝功能,至少部分是通过减少肝细胞凋亡来获得。进一步通过Western blot检测Bcl-2、bax发现,BMSCs注射组与生理盐水注射组Bcl-2、bax表达有差异,导致Bcl-2/bax值在BMSCs注射组中显著上升,而Bcl-2/bax值是影响细胞凋亡重要因素[20-22]。然而,BMSCs具体是通过释放何种细胞因子导致肝细胞内细胞因子水平的改变而引起Bcl-2/bax值的改变仍需要进一步研究证实。在肝组织中,TGF-β1是最关键的促纤维化生长因子,同时在促进肝细胞凋亡中有重要作用[23-24],其促进凋亡的途径有多条,其中TGF-β1/SMAD通路是最常见途径[23,25]。我们在大鼠离体肝切除手术后对BMSCs注射组与生理盐水注射组Bcl-2与bax行Western blot分析,发现BMSCs组肝细胞凋亡减少可能与Bcl-2/bax值增加有关,BMSCs能够直接或间接通过改变

Bcl-2/bax 值而改善肝功能。研究发现作为上游分子的 TGF-β1 在 BMSCs 注射组与生理盐水注射组在 24、72 h 无显著下降,仅在 168 h 有显著下降,预示 TGF-β1 可能与 Bcl-2/bax 值的变化无确切相关性,或由其他因子联合作用引起。在后续实验中,我们将进一步检测 TGF-βRI、TGF-βRII 及其他相关分子有无差异,以明确 BMSCs 具体通过何途径影响 Bcl-2/bax 值进而减少肝细胞凋亡,改善肝功能。

总之,我们通过实验动物随机对照研究证实了 BMSCs 能够改善离体肝手术大鼠术后肝功能,提高术后存活率,其可能通过非 TGF-β1 相关的途径影响 Bcl-2/bax 值,进而减少肝细胞凋亡,改善术后肝功能,为临床离体肝切除自体肝移植手术进行干细胞治疗提供动物实验支持。

参考文献:

[1] Zhong J H, Ma L, Wu L C, *et al*. Adoptive immunotherapy for postoperative hepatocellular carcinoma: a systematic review[J]. Int J Clin Pract, 2012, 66(1): 21 – 27.

[2] Fujiki M, Aucejo F, Kim R. General overview of neo-adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma before liver transplantation: necessity or option? [J]. Liver Int, 2011, 31(8): 1081 – 1089.

[3] Zhang H, Chen Z, Bie P, *et al*. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as immunosuppressants in liver transplantation: a review of current data[J]. Transfus Med Rev, 2012, 26(2): 129 – 141.

[4] 赵玉金, 李瑶琛, 赖洁娟, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞体外培养条件的优化及生物学特性[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(20): 2163 – 2167.

[5] Hemming A W, Cattral M S. *Ex vivo* liver resection with replacement of the inferior vena cava and hepatic vein replacement by transposition of the portal vein[J]. J Am Coll Surg, 1999, 189(5): 523 – 526.

[6] Sugimachi K, Shirabe K, Taketomi A, *et al*. Extracorporeal hepatic resection for advanced liver cancer[J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2010, 37(3): 399 – 401.

[7] Sugimachi K, Shirabe K, Taketomi A, *et al*. Successful curative extracorporeal hepatic resection for far-advanced hepatocellular carcinoma in an adolescent patient[J]. Liver Transpl. (2010), 16(5): 685 – 687.

[8] Oh S H, Miyazaki M, Kouchi H, *et al*. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage *in vitro*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 279(2): 500 – 504.

[9] Schwartz R E, Reyes M, Koodie L, *et al*. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells [J]. J Clin Invest, 2002, 109(10): 1291 – 1302.

[10] 周播江, 钟翠平, 顾云娣, 等. 肝再生大鼠血清诱导骨髓干细胞向肝细胞分化的实验研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(12): 730 – 733.

[11] 刘文渊, 张玉君, 徐土炳, 等. 离体肝切除联合自体肝移植大鼠模型的建立[J]. 山西医科大学学报, 2011, 42(9): 703 – 705.

[12] Chen S, Xu L, Lin N, *et al*. Activation of Notch1 signaling by marrow-derived mesenchymal stem cells through cell-cell contact inhibits proliferation of hepatic stellate cells[J]. Life Sci, 2011, 89(25/26): 975 – 981.

[13] Chivu M, Dima S O, Stancu C I, *et al*. *In vitro* hepatic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells under differential exposure to liver-specific factors[J]. Transl Res, 2009, 154(3): 122 – 132.

[14] Chen Y, Xiang L X, Shao J Z, *et al*. Recruitment of endogenous bone marrow mesenchymal stem cells towards injured liver[J]. J Cell Mol Med, 2010, 14(6B): 1494 – 1508.

[15] Mouiseddine M, Francois S, Souidi M, *et al*. Intravenous human mesenchymal stem cells transplantation in NOD/SCID mice preserve liver integrity of irradiation damage[J]. Methods Mol Bio, 2012, 826: 179 – 188.

[16] Zhao W, Li J J, Cao D Y, *et al*. Intravenous injection of mesenchymal stem cells is effective in treating liver fibrosis[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(10): 1048 – 1058.

[17] Kosai K, Matsumoto K, Funakoshi H, *et al*. Hepatocyte growth factor prevents endotoxin-induced lethal hepatic failure in mice[J]. Hepatology, 1999, 30(1): 151 – 159.

[18] Yin X M. The dynamic duo of apoptosis and necrosis in liver injury and liver carcinogenesis[J]. Gastroenterology, 2011, 141(6): 1969 – 1972.

[19] Chattopadhyay P, Chaudhury P, Wahi A K. Bcl-2 expression alters the mitochondrial tri carboxyl Acid pathway in hepatic ischemic and reperfusion induced necrosis and apoptosis in rat liver[J]. Indian J Pharm Sci, 2010, 72(4): 437 – 441.

[20] Zhou C, Li X, Du W, *et al*. Antitumor effects of ginkgolic acid in human cancer cell occur *via* cell cycle arrest and decrease the Bcl-2/Bax ratio to induce apoptosis[J]. Chemotherapy, 2010, 56(5): 393 – 402.

[21] Zhang G, Oldroyd S D, Huang L H, *et al*. Role of apoptosis and Bcl-2/Bax in the development of tubulointerstitial fibrosis during experimental obstructive nephropathy[J]. Exp Nephrol, 2001, 9(2): 71 – 80.

[22] Karamanolis D G, Kyrlagkitsis I, Konstantinou K, *et al*. The Bcl – 2/Bax system and apoptosis in ulcerative colitis[J]. Hepatogastroenterology, 2007, 54(76): 1085 – 1088.

[23] Sola S, Amaral J D, Castro R E, *et al*. Nuclear translocation of UDCA by the glucocorticoid receptor is required to reduce TGF-beta1-induced apoptosis in rat hepatocytes[J]. Hepatology, 2005, 42(4): 925 – 934.

[24] Cain K, Freathy C. Liver toxicity and apoptosis: role of TGF-beta1, cytochrome c and the apoptosome[J]. Toxicol Lett, 2001, 20(1/3): 307 – 315.

[25] 王春雷, 黄志强, 周宁新, 等. TGF-β1 诱导鼠肝细胞凋亡信号转导机制的研究[J]. 中华消化外科杂志, 2004, 3(6): 439 – 442.

(**收稿**:2012-01-07;**修回**:2012-02-28)

(编辑 龙 亮)