

TLR1/2 通路活化对脐带间充质干细胞免疫状态影响的研究

马宇¹, 张立², 江婷³, 刘志强⁴, 李全生^{3△}

1. 四川大学华西医院 甲状腺乳腺外科(成都 610041); 2. 四川大学华西医院 病理研究室(成都 610041);
3. 四川大学华西医院 胆道外科(成都 610041); 4. 德阳市第六人民医院 外二科(德阳 618000)

【摘要】 目的 研究 Toll 样受体 1/2(Toll like receptor 1/2, TLR1/2)活化后是否改变脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cell, UCMSC)的免疫状态。**方法** UCMSC 与外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)共培养体系中加入 TLR1/2 激动剂,用流式细胞术检测 PBMC 的增殖,并检测 PBMC 对 UCMSC 的杀伤作用;检测 TLR1/2 通路活化后 UCMSC 表面共刺激分子和干细胞标志物的表达变化;荧光定量 PCR 检测 UCMSC 多个免疫相关因子表达变化;对 UCMSC 进行定向诱导分化,检测 TLR1/2 活化对 UCMSC 分化能力的影响。**结果** TLR1/2 通路活化可促进 PBMC 增殖,并增强 PBMC 对 UCMSC 的免疫杀伤效应,但对 UCMSC 表面共刺激分子[CD80/CD86/人类白细胞抗原(HLA)-E]和干细胞标志物(CD29/CD59/CD90)无影响;荧光定量 PCR 结果表明 UCMSC 中多个免疫相关因子被 TLR1/2 明显诱导[白细胞介素(IL-2, IL-6, IL-10, IL-12),干扰素- γ (IFN- γ),核因子- κ B(NF- κ B),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)];TLR1/2 不影响 UCMSC 的定向分化能力。**结论** TLR1/2 可改变 UCMSC 的免疫状态,在一定程度诱导针对 UCMSC 的免疫攻击。

【关键词】 脐带间充质干细胞 Toll 样受体 1/2 免疫相关因子 免疫状态

The Study of Altered Immune Status of UCMSC upon the Activation of TLR1/2 Pathway MA Yu¹, ZHANG Li², JIANG Ting³, LIU Zhi-qiang⁴, LI Quan-sheng^{3△}. 1. Department of Thyroid and Breast Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Lab of Pathology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Department of Biliary Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 4. Department of the Second Surgery, the Sixth People's Hospital of Deyang City, Deyang 618000, China

△ Corresponding author, E-mail: liquansheng@medmail.com.cn

【Abstract】 **Objective** To study whether the activation of Toll like receptor 1/2 (TLR1/2) has influence on the immune status of umbilical cord mesenchymal stem cell (UCMSC). **Methods** TLR1/2 agonist Pam3CSK4 was conducted in UCMSC-peripheral blood mononuclear cell (PBMC) co-culture system. Flow cytometry and lactate dehydrogenase (LDH) detection were used to measure the proliferation of PBMC and immune attack of PBMC to UCMSC, respectively. The detection of expressions of co-stimulator and stem cell markers of UCMSC upon TLR1/2 activation was completed by flow cytometry. Real-time PCR was introduced to assay the expression of many immune-related molecules in UCMSC. Cell differentiation staining was conducted to study the change of differentiation ability of UCMSC. **Results** Activation of TLR1/2 pathway in UCMSC increased the proliferation of PBMC and attack of PBMC to UCMSC, but without influenced the expressions of co-stimulator and stem cell markers. The results of real-time PCR showed that many immune-related molecules were dramatically induced in UCMSC upon TLR1/2 activation, such as [interleukin (IL) -2, IL-6, IL-10, IL-12, interferon- γ (IFN- γ), nuclear factor- κ B (NF- κ B), tumor necrosis factor- α (TNF- α)]. However, the activation of TLR1/2 had no influence on the differentiation ability of UCMSC. **Conclusion** Activation of TLR1/2 altered the immune status of UCMSC, including increase the immune attack to UCMSC.

【Key words】 Umbilical cord mesenchymal stem cell Toll like receptor 1/2 Immune-related molecules Immune status

间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)以其多向分化潜能^[1]、低免疫原性和免疫抑制功能^[2],目前已广泛用于多个临床领域,并已在治疗血

液疾病^[3]、心血管疾病^[4]、肝硬化^[5]、自身免疫疾病^[6]等方面取得了较好的进展。但近年研究表明在特定条件下, MSC 会诱导体内免疫反应并最终导致 MSC 体内排斥,主要机制包括启动 T 细胞反应^[7],被宿主补体系统攻击及诱导分化后 MSC 免疫原性

增加^[8]。Toll 样受体(Toll like receptors, TLRs)是 I 类跨膜糖蛋白,主要功能是识别外源性病原体成分和体内循环配体,诱导免疫反应或炎症反应^[9]。TLRs 对 MSC 的作用包括增加骨分化潜能(TLR3 和 TLR4)、增加 MSC 的迁移能力(TLR8)等^[10]。本课题组前期研究表明 TLR7 通路活化后可增加脐带间充质干细胞(umbilical cord MSC, UCMSC)的免疫原性,表明 TLRs 在调节 MSC 免疫状态中起重要作用^[11]。

TLR1/2 主要识别肽聚糖、脂蛋白、脂多肽、脂壁酸、阿拉伯甘聚糖等^[12]。研究报道 TLR1/2 活化可导致 MSC 的成骨、成软骨分化能力下降,且可增加 MSC 的迁移^[13]。但未见 TLR1/2 在 MSC 免疫原性改变中的相关报道,本研究选取 UCMSC,用 TLR1/2 激动剂刺激后,在不同时间点检测 TLR1/2 通路活化后对 UCMSC 免疫原性改变及对 UCMSC 分化能力的影响。

1 材料及方法

1.1 UCMSC 培养及 TLR1/2 活化

UCMSC 由四川省脐血干细胞库提供,37 °C 水浴融化后加入 5 mL 无血清 DMEM 培养基洗 1 次(1 200 r/min, 5 min),在 6 孔板中培养(1×10^5 /孔, 2 mL)。TLR1/2 激动剂 Pam3CSK4 购自 Biovision(1700-100),溶于超纯水中(贮存浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),在培养的 UCMSC 中每孔加入 10 μL ,使其终浓度为 50 ng/mL)。

1.2 UCMSC 刺激淋巴细胞增殖实验及细胞杀伤实验

抽取健康志愿者外周血 5 mL,用淋巴细胞分离液,采用梯度离心法分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs),用高压灭菌后的 PBS 洗 2 次(1 200 r/min, 5 min)。细胞计数后加入羟基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯(CFSE)对 PBMC 进行荧光标记(终浓度为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$),室温避光标记 5 min 后用预冷的 DMEM 完全培养基终止反应,用预冷的 PBS 洗 3 次(1 200 r/min, 5 min)。将 CFSE 标记的 PBMC 与 UCMSC 共培养(PBMC 加入细胞量为 1×10^6 /孔),72 h 后收集 PBMC,以流式细胞仪检测其增殖水平变化。实验共分为 3 组:PBMC+UCMSC 组、PBMC+UCMSC+TLR1/2 激动剂组(共培养时加入 TLR1/2 激动剂,剂量见 1.1)、PBMC-Negative 组(不加 UCMSC 培养)。

PBMC 与 UCMSC 共培养 24、48 和 72 h 后收集共培养上清,离心去除上清中的淋巴细胞及细胞碎片(2 000 r/min, 10 min),用 Promega 公司的乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒检测共培养上清中 LDH 水平,培养上清中 LDH 水平越高,表明细胞受损程度越严重,杀伤比例计算用以下公式: $100 \times (E - M) / (T - M)$,其中 E 表示实验组的 LDH 释放量 A_{450} 值[在波长 450 nm 处的吸光度(A)值],M 是用作对照的培养基的 A_{450} 值,T 为细胞裂解后的最大 LDH 释放量(A_{450} 值)。实验共分为两组:PBMC+UCMSC+TLR1/2 激动剂组(共培养时加入 TLR1/2 激动剂,剂量见 1.1),PBMC+UCMSC 组。

1.3 荧光定量 PCR 方法检测 UCMSC 免疫相关因子表达变化

TLR1/2 激动剂活化处理 UCMSC 后不同时间段(4、12、24、72 和 120 h),按照说明书提取 UCMSC 总 RNA(Qiagen)。逆转录反应试剂盒为北京天根公司 RT 试剂盒(FSQ-101),逆转录程序:65 °C 5 min \rightarrow 37 °C 15 min \rightarrow 98 °C 5 min,-20 °C 保存样品,使用时按 1:50 稀释。

定量 PCR 检测为 RealMaster Mix (SYBR green)(北京天根,FP202),定量检测反应在 Beckman 公司 iCycler iQ™ Optical Module 完成,反应条件为:95 °C 30 s;95 °C 30 s,58 °C 30 s,70 °C 30 s,共 40 个循环。所有检测均进行 3 次,用 Bio-Rad iQ5 软件分析定量 PCR 结果,以 GAPDH 为内参,未处理的 UCMSC 为阴性对照,按照文献报道采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析^[14]。扩增引物见表 1。

1.4 流式细胞术检测 UCMSC 表面分子表达变化

UCMSC 加入 TLR1/2 激动剂 72 h 后,胰酶消化并收集细胞,PBS 洗 2 次(1 200 r/min, 5 min)后,加入 2 μL 单克隆抗体,室温避光标记 30 min,并用 PBS 洗 2 次(1 200 r/min, 5 min)后,进行流式检测(FACScan, Beckman)。检测抗体为①共刺激分子:CD86 (eBioscience, 12-0869)、CD80 (eBioscience, 11-0809)和人类白细胞抗原-E (HLA-E, eBioscience, 17-9953);②常规干细胞标志物:CD29 (eBioscience, 17-0299)、CD59 (eBioscience, 11-0596)和 CD90 (eBioscience, 45-0909)。阴性对照组为未处理 UCMSC。

1.5 体外诱导 UCMSC 分化实验

UCMSC 加入 TLR1/2 激动剂 7、14 和 21 d

表 1 定量 PCR 引物

Table 1 Sequences of primers used real-time PCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>IL-2</i>	CAAGAATCCCAAACTCACCAGG	GACTCTGAAGATGTTTCAGTTC
<i>IL-6</i>	GACCCAACCACAAAATGCCA	GTCATGTCCTGCAGCCACTG
<i>IL-10</i>	GGTGATGCCCAAGCTGA	TCCCCAGGGAGTTCACA
<i>IL-12</i>	CGGTCATCTGCCGCAA	CAAGATGAGCTATAGTAGCGG
<i>IFN-γ</i>	CCAACGCAAAGCAATACATGA	CGCTTCCCTGTTTTAGCTGC
<i>IP-10</i>	GAAATTATCTCTGCAAGCCAA	CAGACATCTCTCTCACCCCTC
<i>TNF-α</i>	GGTGCTTGTTCCCTCAGCCTC	CAGGCAGAAGAGCGTGGTG
<i>NF-κB</i>	AGAGTGCTGGAGTTCAGGATA	AAGGTGGATGATTGCTAAGTG
<i>GAPDH</i>	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTC

IL-2: Interleukin-2; *IL-6*: Interleukin-6; *IL-10*: Interleukin-10; *IL-12*: Interleukin-12; *IFN-γ*: Interferon-γ; *IP-10*: Interferon-inducible protein-10; *TNF-α*: Tumor necrosis factor-α; *NF-κB*: Nuclear factor-κB; *GAPDH*: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

后,接种 UCMSC 于 6 孔板中(1.5×10^5 /孔),待细胞全部贴壁后加入 2 mL 条件培养基,分别进行成骨(GIBCO, A10072-01)、成软骨(GIBCO, A10071-01)和成脂(GIBCO, A10070-01)诱导(37 °C, 5% CO₂),每 3 d 更换 1 次条件培养基。茜素红用于成骨细胞,茜素红用于成骨细胞,番红用于成软骨细胞,用奥林巴斯倒置显微镜采图(Olympus, 1X71)观察 UCMSC 的分化情况。阴性对照组为未处理 UCMSC。

1.6 统计学方法

计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 UCMSC 中 TLR1/2 活化对 PBMC 免疫攻击作用的影响

淋巴细胞增殖实验结果显示,加入 TLR1/2 激动剂, PBMC 与 UCMSC 共培养 72 h 后, PBMC 的增殖率为 $18.8\% \pm 3.1\%$, 高于另 2 个组 ($P < 0.05$); PBMC-Negative 组 PBMC 的增殖率仅 $4.2\% \pm 1.3\%$; 而 PBMC+UCMSC 组 PBMC 的增殖率为 $7.5\% \pm 3.1\%$, 与 PBMC-Negative 组比较差异无统计学意义。表明 UCMSC 的 TLR1/2 通路活化可刺激 PBMC 增殖。见图 1。

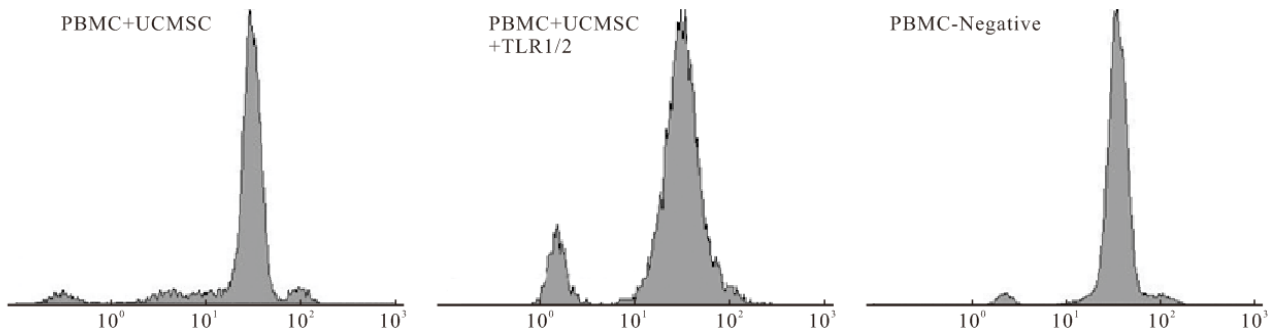


图 1 流式细胞仪检测 TLR1/2 通路活化对 UCMSC-PBMC 共培养 72 h 后 PBMC 增殖的影响

Fig 1 Proliferation influence of TLR1/2 activation on PBMC in 72 h post UCMSC-PBMC co-culture by flow cytometry

细胞杀伤实验结果显示,共培养 24、48 h 后, PBMC+UCMSC+TLR1/2 激动剂组与 PBMC+UCMSC 组间细胞杀伤比例差异无统计学意义, 72 h 后 PBMC+UCMSC+TLR1/2 激动剂组细胞杀伤比例较 PBMC+UCMSC 组升高 ($P < 0.05$), 表明 UCMSC 的 TLR1/2 通路活化可引起 PBMC 的免疫攻击。见表 2。

2.2 TLR1/2 活化对 UCMSC 免疫相关因子表达的影响

在白介素类检测中,发现 *IL-2* 和 *IL-6* 在 TLR1/2 活化后不同时间段(4、12、24、72 和 120 h)

表 2 UCMSC-PBMC 共培养不同时间后的细胞杀伤比例

Table 2 Cell killing ratio in UCMSC-PBMC co-culture system

	PBMC+UCMSC (n=3)	PBMC+UCMSC+TLR1/2 (n=3)	<i>P</i>
24 h	$9.2\% \pm 4.5\%$	$8.1\% \pm 8.0\%$	0.987
48 h	$14.8\% \pm 6.4\%$	$15.8\% \pm 6.8\%$	0.873
72 h	$21.1\% \pm 9.5\%$	$37.0\% \pm 10.8\%$	< 0.05

表达均高于阴性对照组 ($P < 0.001$), 但 *IL-6* 在 72 h 和 120 h 时表达有下降趋势; *IL-10* 在活化后 4 h 表达最高 ($P < 0.001$), 然后呈下降趋势; *IL-12* 在活化后 4 h 开始升高 ($P < 0.05$), 随后逐渐呈上升趋势, 在 12、24、72 和 120 h 检测时与阴性对照组比

较差异均有统计学意义($P < 0.001$)。见图 2A。

在细胞因子检测中, $IFN-\gamma$ 在活化后 4 h 和 12 h 时无明显变化, 24 h 和 72 h 时表达最高($P < 0.001$), 120 h 时表达有所下降, 但仍高于阴性对照组($P < 0.05$)。 $IP-10$ 和 $TNF-\alpha$ 在活化后 4 ~

120 h 均高于阴性对照组($P < 0.001$)。 $NF-\kappa B$ 在活化后 4 h 开始升高($P < 0.05$), 在 120 h 时表达最高($P < 0.001$)。见图 2B。

2.3 TLR1/2 活化对 UCMSC 分化能力的影响

见图 3。结果显示, 在诱导后不同时间点(7、14

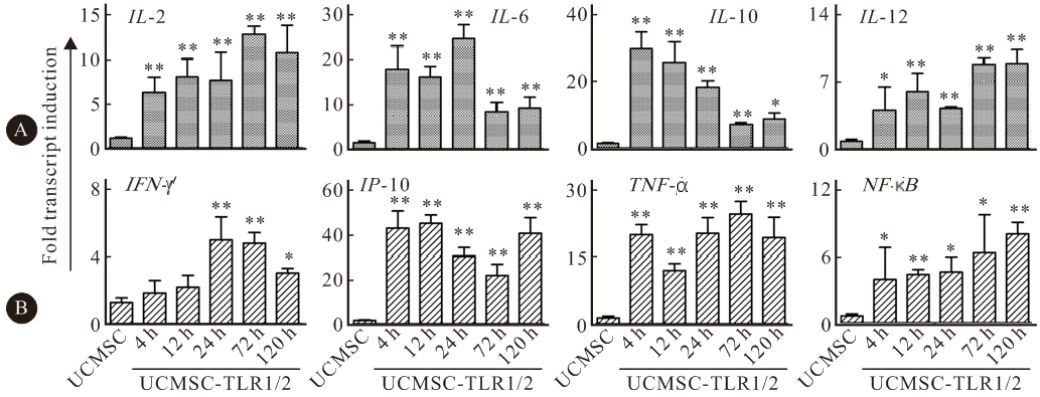


图 2 UCMSC 中免疫相关因子表达

Fig 2 Assay of immune-related molecules of UCMSC upon TLR1/2 activation

A: Interleukins; B: Cytokines. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, vs. UCMSC (negative control group)

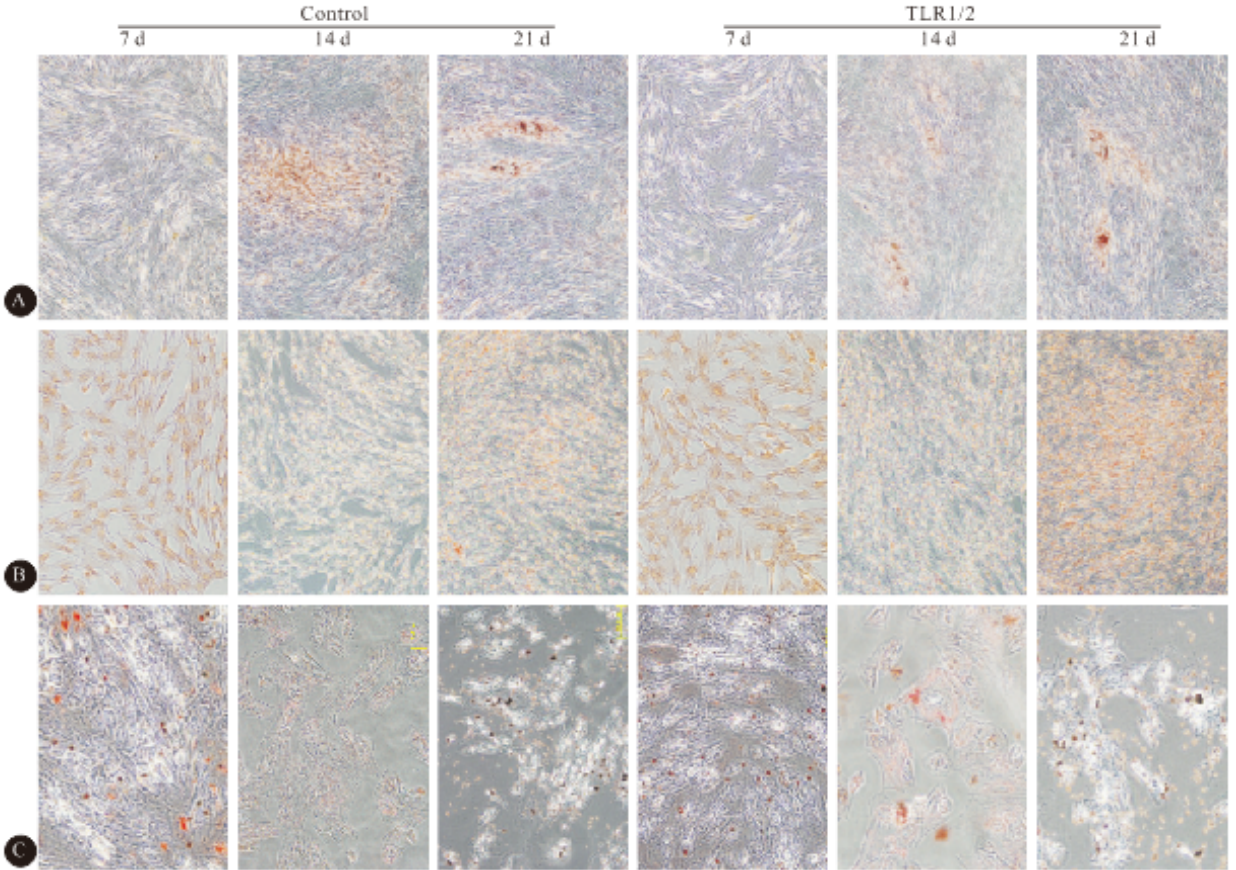


图 3 UCMSC 诱导分化实验。×200

Fig 3 Cell differentiation detection on UCMSC. ×200

A: Osteoblasts; B: Chondrocyte; C: Adipocyte

和21 d), TLR1/2 激动剂处理组和阴性对照组的成骨、成软骨和成脂染色均无明显差异。

2.4 TLR1/2 活化对 UCMSC 表面共刺激分子及干细胞标志物表达的影响

结果显示,阴性对照组和 TLR1/2 激动剂处理组比较,CD29、CD59 和 CD90 的表达差异均无统计学意义;3 种共刺激分子 CD80、CD86 和 HLA-E 在 TLR1/2 激动剂处理组和阴性对照组间差异亦无统计学意义。见表 3。

表 3 TLR1/2 活化后 UCMSC 表面干细胞标志物及共刺激分子的表达($n=3, \%$)

Table 3 Expressions of stem cell markers and co-stimulatory factors of UCMSC upon TLR1/2 activation ($n=3, \%$)

		Negative control	UCMSC+ TLR1/2
Stem cell markers	CD29	94.5±3.2	93.9±2.7
	CD59	96.3±4.1	97.8±1.7
	CD90	91.5±5.2	94.6±3.4
Co-stimulators	CD80	2.8±2.2	3.1±0.9
	CD86	3.1±2.1	3.2±1.3
	HLA-E	4.2±1.8	4.5±2.3

3 讨论

MSC 不表达 CD80/CD86/CD40/HLA 等共刺激分子,因此 MSC 细胞移植中不易诱导宿主免疫反应,同时 MSC 还可在体内抑制 T 细胞、B 细胞、DC 细胞、NK 细胞的功能^[15]。UCMSC 分离自人脐带,且细胞含量、增殖能力均优于骨髓 MSC,且有研究表明其免疫原性低于骨髓 MSC,并且具有取材方便、无伦理争议等优点,因此在细胞移植中起着越来越重要的作用^[16]。TLRs 是一种模式识别受体,除识别多个病原体成分并在抗感染免疫中起重要作用外,在 MSC 中也起重要作用,如 MSC 分化(TLR3, TLR4),增殖(TLR8),迁移(TLR4)^[10]。

本课题组前期研究表明 TLR7 通路活化可明显增加 UCMSC 的免疫原性,并增加 UCMSC 的成骨分化能力,表明 TLRs 在 UCMSC 中的重要作用^[11]。因此本研究选取 TLRs 中另一重要的家族成员 TLR1/2,研究其活化后对 UCMSC 免疫状态和免疫原性的影响。结果表明 TLR1/2 活化后可增加 UCMSC 的免疫原性,导致 PBMC 增殖及 PBMC 对 UCMSC 的免疫杀伤效应。但 TLR1/2 通路活化对 UCMSC 表面共刺激分子 CD80/CD86/HLA-E 无影响,表明这 3 种共刺激分子未参与 UCMSC 免疫状态的变化。UCMSC 表面标志物

CD29/CD59/CD90 表达也无变化,表明 TLR1/2 活化对 UCMSC 干细胞特性无影响。定量 PCR 检测结果表明 TLR1/2 活化后可在不同时间段导致多个免疫相关因子表达的明显升高(*IL-2*、*IL-6*、*IL-10*、*IL-12*、*IFN- γ* 、*IP-10*、*TNF- α* 和 *NF- κ B*),因此我们推测 TLR1/2 是通过诱导这些免疫相关因子的表达,从而影响 UCMSC 的免疫状态,但具体机制仍需深入研究。有研究表明 MSC 在分化过程中免疫原性会升高,从而增加针对 MSC 的免疫排斥反应^[17],因此本研究检测 TLR1/2 活化是否增加 UCMSC 的分化能力,结果表明 UCMSC 成骨、成软骨、成脂细胞分化均无明显变化,表明 TLR1/2 通路活化与 UCMSC 诱导分化能力无关。

研究表明在人体内除病原体特定成分外,还有多个内源性配体可活化 TLRs,如尿酸、粒细胞来源蛋白、透明质酸、热休克蛋白、低密度脂蛋白等^[18]。本研究提示 TLR1/2 活化可在一定程度上改变 UCMSC 的免疫状态,因此在 UCMSC 的临床细胞移植中必须考虑 TLR1/2 对 UCMSC 体内存活的影响,对临床细胞移植有一定的指导意义。

参 考 文 献

- Bassi E, Aita CA, Camara NO. Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: where do we stand? *World J Stem Cells*, 2011; 3(1): 1-8.
- Shi M, Liu ZW, Wang FS. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol*, 2011; 164(1): 1-8.
- Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells*, 2007; 25(11): 2896-2902.
- Vojtassak J, Danisovic L, Kubes M, et al. Autologous biograft and mesenchymal stem cells in treatment of the diabetic foot. *Neuro Endocrinol Lett*, 2006; 27(Suppl 2): 134-137.
- Kharaziha P, Hellstrom PM, Noorinayer B, et al. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase-II clinical trials. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2009; 21(10): 1199-1205.
- Sun L, Wang D, Liang J, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2010; 62(2): 2467-2475.
- Nauta AJ, Westerhuis G, Kruijselbrink AB, et al. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood*, 2011; 108(6): 2114-2120.
- Li Y, Lin F. Mesenchymal stem cells are injured by complement after their contact with serum. *Blood*, 2012; 120(17): 3436-3443.

Caspase-3 得以激活。本研究为今后以 *Bax* 为靶点的肿瘤基因治疗打下了基础。

参 考 文 献

- 1 Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature*,2000;407(6805):796-801.
 - 2 Wei M, Zong W, Cheng E, *et al.* Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*,2001;292(5517):727-730.
 - 3 袁铸, 严飞, 赵新宇等. 小鼠凋亡相关新基因 PNAS-4 真核表达载体的构建、表达及体外抗肿瘤作用. *细胞与分子免疫学杂志*,2007;23(12):1140-1143.
 - 4 Parsons MJ, Green DR. Mitochondria in cell death. *Essays Biochem*,2010;47:99-114. doi: 10.1042/bse0470099.
 - 5 Waterhouse N, Goldstein J, Von Ahsen O, *et al.* Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *J Cell Biol*,2001;153(2):319-328.
 - 6 Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*,2000;10(9):369-377.
 - 7 施一公. 细胞凋亡的结构生物学研究进展. *生命科学*,2010;22(3):224-228.
 - 8 Schuler M, Maurer U, Goldstein JC, *et al.* p53 triggers apoptosis in oncogene-expressing fibroblasts by the induction of Noxa and mitochondrial Bax translocation. *Cell Death Differ*, 2003;10(4):451-460.
 - 9 Fraga H, Bech-Serra JJ, Canals F, *et al.* The mitochondrial intermembrane space oxidoreductase Mia40 funnels the oxidative folding pathway of the cytochrome c oxidase assembly protein Cox19. *J Biol Chem*,2014;289(14):9852-9864.
 - 10 Jimenez-Gutierrez LR, Uribe-Carvajal S, Sanchez-Paz A, *et al.* The cytochrome c oxidase and its mitochondrial function in the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* during hypoxia. *J Bioenerg Biomembr*,2014;46(3):189-196.
 - 11 Widlak P, Garrard W. Roles of the major apoptotic nuclease-DNA fragmentation factor-in biology and disease. *Cell Mol Life Sci*,2009;66(2):263-274.
 - 12 陈登榜, 曹康, 杨靖等. *Noxa* 基因的克隆及其诱导 A549 细胞凋亡的研究. *四川大学学报(医学版)*,2013;44(5):713-716.
 - 13 Milosevic J, Hoffarth S, Huber C, *et al.* The DNA damage-induced decrease of Bcl-2 is secondary to the activation of apoptotic effector caspases. *Oncogene*, 2003; 22(44):6852-6856.
 - 14 Jourdain A, Martinou JC. Mitochondrial outer-membrane permeabilization and remodelling in apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol*,2009;41(10):1884-1889.
- (2015-01-13 收稿, 2015-04-20 修回)
编辑 余琳
-
- (上接第 683 页)
- 9 Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity*,2010;32(3):305-315.
 - 10 DelaRosa O, Lombardo E. Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors; implications on therapeutic potential. *Mediators Inflamm*,2010;10(2):865-601.
 - 11 Zhang L, Liu D, Pu D, *et al.* The TLR7 agonist Imiquimod promote the immunogenicity of mesenchymal stem cells. *Biol Res*,2015;48(1):6. doi: 10.1186/0717-6287-48-6.
 - 12 Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*,2006;124(4):783-801.
 - 13 Pevsner-Fischer M, Morad V, Cohen-Sfady M, *et al.* Toll like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood*,2007;109(4):1422-1432.
 - 14 Alaina BS, Chen BY, Marc LN, *et al.* Validation of the 2-calculation as alternate method of data analysis for quantitative PCR of BCR-ABL P210 transcripts. *Diag Mol Path*,2006;15(1):56-61.
 - 15 VanPoll D, Parekkadan B, Cho CH, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology*,2008;47(5):1634-1643.
 - 16 Kong D, Zhuang X, Wang D, *et al.* Umbilical cord mesenchymal stem cells transfusion ameliorated hyperglycemia in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Lab*,2014;60(12):1969-1976.
 - 17 Huang XP, Sun Z, Miyagi Y, *et al.* Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces immunogenicity and limits their long-term benefits for myocardial repair. *Circulation*,2010;122(23):2419-2429.
 - 18 Tomchuck SL, Zvezdaryk KJ, Coffel SB, *et al.* Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells*,2008;26(1):99-107.
- (2015-03-12 收稿, 2015-07-18 修回)
编辑 余琳