

• 基础研究 •

小鼠再生肝浸出液体外诱导骨髓间充质干细胞向肝细胞样分化的研究

于俊兰^{1,2}, 李荣¹, 王文杰³, 李力¹, 刘巨超¹, 王金晶¹, 徐迎新¹

[摘要] 目的 应用小鼠再生肝浸出液体外诱导骨髓间充质干细胞向肝细胞样分化。方法 利用 2/3 肝部分切除术后 36 h 小鼠再生肝组织浸出液定向诱导小鼠骨髓间充质干细胞,在倒置显微镜下观察细胞形态,应用免疫荧光法鉴定细胞性质。结果 骨髓间充质干细胞经小鼠再生肝浸出液诱导 7 d 后,呈肝细胞样圆形,1~2 周后免疫荧光染色可见细胞表达肝细胞标记物 CK8、CK18 和清蛋白。结论 小鼠再生肝浸出液可诱导骨髓间充质干细胞向肝细胞方向分化。

[关键词] 骨髓间充质干细胞;肝样细胞;分化;组织工程

Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Differentiated into Hepatocyte like Cells Induced by Rebirth Liver Tissue Lixivium of Mouse in Vitro YU Jun-lan, LI Rong, WANG Wen-jie, et al. The Institute of General Surgery, the General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

Abstract: **Objective** To induce bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) differentiated into hepatocyte-like cells with rebirth liver tissue lixivium of mouse in vitro. **Methods** Mouse BMSCs were isolated and directionally induced with rebirth liver tissue lixivium of mouse 36 h after partial hepatectomy (PH). The morphology of cells was observed under an invert microscope, and the characteristics of differentiated cells was identified by immunofluorescence test. **Results** 7 days after induced by liver lixivium, the spindle shaped BMSCs became round and resembled hepatocyte-like cells. 1~2 weeks later, the differentiated cells expressed albumin, CK8 and CK18, which were known as characteristic markers of the hepatocyte. **Conclusion** BMSCs of mouse can be differentiated into hepatocyte-like cells under induction of liver tissue lixivium of mouse.

Key words: bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs); hepatocyte-like cells; differentiation; tissue engineering

[中图分类号] R329.2 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2006)12-1056-02

[本文著录格式] 于俊兰,李荣,王文杰,等.小鼠再生肝浸出液体外诱导骨髓间充质干细胞向肝细胞样分化的研究[J].中国康复理论与实践,2006,12(12):1056-1057.

骨髓来源的干细胞具有多向分化潜能,特别是其中的骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)具有向肝脏干细胞(hepatic stem cells)、肝细胞及血管内皮细胞分化的潜能^[1-3],而且因其扩增 100 代无衰老的稳定性和取材方便、无伦理学争议等特性,目前已成为自体干细胞修复受损组织的研究热点,有望成为肝组织工程新的种子细胞来源;更因其可以来自患者自身,无排斥反应,故具有重要的临床应用价值。我们应用 2/3 肝部分切除术(partial hepatectomy, PH)后 36 h 小鼠再生肝组织浸出液(以下简称再生肝浸出液)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)和表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF),诱导 BMSCs 定向肝细胞样分化,为肝组织工程选择种子细胞来源的途径提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 BMSCs 的分离培养 选取 6~8 周龄的雄性昆明小鼠(由军事医学科学院动物中心提供),在无菌条件下,取股骨和胫骨,用 IMDM 培养液(美国 Sigma 公司)冲洗出骨髓腔内的骨髓,充分混匀形成单细胞悬液,2000 r/min 离心 10 min,弃上清。沉淀用含 10% 小牛血清的 IMDM 培养液重悬后,层加到比重为 1.077 g/ml 的淋巴细胞分离液(天津市灏洋生物制造公司)上,2000 r/min 离心 30 min,收集中间的单个核细胞层,用 IMDM 培养液离心洗涤两次。将收集的细胞用含 10% 小牛血清的 IMDM 培养液混匀后,接种于 6 孔培养板中,置 37℃, 5%

CO₂ 培养箱中培养,3~4 d 换液一次,未贴壁的细胞被除去。待贴壁细胞铺满培养孔面积 80%~90% 时,用 0.25% 胰酶消化传代。收集脱壁细胞悬浮于培养液中备用,该细胞为相对纯化的 BMSCs。

1.2 再生肝浸出液的制备 取 6~8 周龄同源昆明小白鼠 2 只,无菌条件下行 2/3 肝部分切除手术,术毕喂养 36 h 后,取再生肝组织, PBS 液冲洗肝组织表面血迹,剪碎肝组织入匀浆器,加 IMDM 液进行匀浆,匀浆液放入 Eppendorfu 管反复冻融后,低温高速离心(4℃, 10000 g) 40 min,取上清,用 0.22 μm 的滤膜过滤后分装于 Eppendorfu 管中存放于 -20℃ 冰箱备用。

1.3 条件培养液体外诱导 BMSCs 定向分化 将 BMSCs 分组,在不同条件下培养及诱导:①阴性对照组:含 10% 小牛血清的 IMDM 培养液;②浸出液组:含 50% 再生肝浸出液的 IMDM 培养液;③EGF、HGF 组:含终浓度为 200 ng/ml 的 HGF 和 20 ng/ml 的 EGF(美国 BD 公司)的 IMDM 培养液(阳性对照组)。每 3 d 换液一次。细胞诱导 1~2 周后进行鉴定。

1.4 形态学观察 细胞培养与诱导过程中,用倒置显微镜观察细胞形态并拍照,特别是观察在基础培养液中添加再生肝浸出液诱导后, BMSCs 肝细胞样分化的情况。

1.5 免疫荧光法检测肝细胞标志物 取对照组未分化细胞与诱导分化后的细胞进行免疫荧光法染色,检测肝细胞标志物 CK8、CK18 和清蛋白。过程如下:用 PBS 洗去培养液,用 80% 冷乙醇 4℃ 固定 30 min 后,分别加入鼠抗 CK18(美国 Gene Tech 公司)、鼠抗 CK8(英国 Abcam 公司)的单克隆抗体和兔抗清蛋白(1:100)(DAKO, Denmark)抗体作为一抗,37℃ 孵育 30 min, PBS 洗涤 2 次,再加入 RPE 标记的兔抗鼠 IgG(1:10)作为检测 CK18、CK8 的二抗(DAKO, Denmark),以及异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的抗兔 IgG(1:20)作为检测清蛋白的二抗,孵育 60 min,反复洗涤后,用倒置荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司)或激光共聚焦显微镜(英国 BIORAD 公司)观察并拍照。

2 结果

基金项目:全军医药卫生科研基金“十五”计划面上项目(No. 01 MB084)

作者单位:1. 解放军总医院普通外科研究所,北京市 100853;2. 解放军 291 医院,内蒙古包头市 014040;3. 清华大学材料系生物材料实验室,北京市 100084。作者简介:于俊兰(1968-),女,内蒙古包头市人,副主任医师,硕士研究生,主要从事肛肠疾病的研究和临床工作。通讯作者:徐迎新(1953-),女,山东鄄城县人,研究员,主要研究方向:外科修复与重建。

2.1 形态学观察 贴壁后的 BMSCs 在培养初期大多呈梭形或长纺锤状,细胞体饱满,胞浆清澈、透明,细胞核位于细胞中央,贴壁较紧,可见克隆形成;1 周后可以观察到细胞成纤维细胞样变长,2~3 周时细胞铺满培养孔底(见封三图 3.1)。取出该细胞在条件培养液中诱导 1~2 周后,梭形或纺锤形细胞逐渐变成肝细胞样圆形,且贴壁能力减弱,换液时诱导孔中细胞减少(见图封三 3.2),而使用含 10% 小牛血清 IMDM 培养液的对照组细胞仍保持 BMSCs 的梭形或纺锤形,贴壁较紧。

2.2 免疫荧光染色 诱导分化后的圆形细胞经免疫荧光染色,CK8、CK18 和清蛋白抗体反应均呈阳性(见封三图 3.4、图 3.6、图 3.8),浸出液组在相同时间点较 EGF、HGF 组诱导表达升高(见封三图 3.3、图 3.5、图 3.7),而未诱导的对照组细胞则呈阴性反应。

3 讨论

肝组织工程研究的首要任务就是选择可靠的肝细胞来源,并能提供足够的细胞数量。用于体外人工肝装置的肝细胞来源有多种选择,如目前正应用于临床试验的有来源于人肝细胞瘤的细胞系 C3A 细胞、新鲜分离的猪肝细胞等,但都不适用于体内肝组织工程的构建。BMSCs 是骨髓基质中具有多种分化潜能的干细胞,在体内外可以向 3 个胚层的组织分化,如内皮细胞、具有肝细胞功能的上皮细胞、骨髓、脾、肺、肝和肠上皮细胞等^[2-6]。尽管进行了大量的研究,但对 BMSCs 分化机制仍缺乏统一的定论。有实验表明,BMSCs 可以表达多种组织细胞的特征性基因,为其多种分化潜能提供了理论依据^[7]。而且,BMSCs 在动物体内作为循环干细胞,可以经血液循环进入各种组织,在不同组织环境的作用下,启动不同基因片断表达,进而分化为特定的组织细胞^[8]。更重要的是,采用患者自身的 BMSCs 可以避免组织器官移植后的免疫排斥反应。因此,我们选择 BMSCs 作为种子细胞进行肝组织工程的细胞来源研究。

研究证实,肝损伤后 12~24 h 肝细胞 DNA 合成增加,22~24 h 达高峰,肝部分切除后完整的细胞分裂增殖过程仅需 16.5 h,24 h 后就有非实质细胞开始增殖,其分泌的 EGF 等因子又反馈调控促进肝细胞的再生。最近有研究显示,大鼠肝部分切除后 24 h,细胞增殖抗原 Ki-67 开始突然升高,36 h 达到峰值^[9]。据此,我们建立 KM 小鼠 2/3 肝部分切除模型,于术后 36 h 取其再生肝组织制备浸出液,分别与基础培养基按 1:1、1:2、2:1 三种不同浓度刺激诱导从同源小鼠分离纯化来的 BMSCs。在预实验中我们观察到,浸出液与基础培养基按 1:1 浓度诱导效果最佳。我们以前的研究显示,在体外应用 EGF、HGF 可诱导 BMSCs 向肝细胞方向分化^[10]。因此,本实验我们选择该条件诱导作为阳性对照。

肝脏再生是一个非常复杂的修复和适应性代偿反应,需要机体局部和全身动员,通过内分泌和旁分泌作用生成的激素、细胞因子、体液因子和酶等共同调控完成。肝损伤后诱生的损伤素能诱导肝及肝外细胞分泌大量的 HGF,启动肝的再生,而再生的肝细胞又合成细胞增殖转化必须的蛋白质和酶类。髓源干细胞向肝系细胞分化的生物学机制可能是:病损肝内首先产生基质源性因子 1 α (stroma-derived factor-1 α , SDF1 α),召集骨髓干细胞至肝内,并使可溶性纤连蛋白(fibronectin, FN)增多,细胞在干细胞因子(stem cell factor, SCF)的共同作用下植入病损部位。肝内汇管区星形细胞的扩增引起 HGF 转化生长因子 α (transforming growth factor α , TGF α)等生长因子增多,同时细胞外间质中储存的 HGF、EGF 也开始释放,这些因子的共同作用使髓源干细胞向肝系细胞分化。

再生肝组织浸出液含有因肝细胞大量受损,机体局部和全身动员,通过内分泌和旁分泌作用而产生的促肝细胞再生的各

种激素、酶、体液因子、细胞因子,而且因肝细胞功能不全而导致的代谢产物的蓄积,对细胞的转化也有一定促进作用,亦能对细胞起筛选作用(不能适应这种环境的细胞将凋亡)。HGF 是作用于肝脏发育及肝再生过程的最基本的细胞因子,是目前已知最强烈的促肝细胞分裂原,在体外刺激肝细胞增殖的活性是 EGF 和 TGF α 的 100 倍。肝受到损伤后,HGF mRNA 和 HGF 活性增加,HGF 基因的表达在 2/3 肝部分切除术后 30 h 即开始,是肝再生的可能的启动因子。EGF 是促进肝细胞增殖与分化的另一个重要的细胞因子,主要通过作用于靶细胞膜上的 EGF 受体(EGFR)而发挥作用,并通过解除细胞核内组蛋白对 DNA 的阻遏作用,促进肝细胞 DNA 的合成。

CK8、CK18、清蛋白均为肝系细胞特异性的标记。CK8/18 是一种角蛋白,为肝细胞相对特异,在幼稚的肝前体细胞不表达,当肝细胞趋于成熟时或已成熟时表达。清蛋白是一种胞浆蛋白,是常用的肝细胞功能的检测标记,在体内主要由肝细胞合成、分泌,但量极少,故本实验采用上述 3 种标记物的抗体,通过免疫荧光染色方法检测 BMSCs 在体外向肝细胞样细胞的转化情况。本研究显示,应用肝浸出液成功将 BMSCs 诱导分化为肝样细胞,而且单用肝浸出液刺激诱导 BMSCs 分化为肝样细胞的效果较单用 EGF、HGF 方法好,提示肝组织浸出液中含有有别于 EGF 和 HGF 的促进 BMSCs 定向肝样细胞分化的有效成份。因此,有必要对浸出液的成份及作用机制进行进一步分析研究。

本实验获得的分化后细胞较少,可能是 BMSCs 中分化为肝细胞的群体贴壁特性改变所致,也可能是并非所有的 BMSCs 都能向肝细胞方向分化,分化的只是其中的某一种亚型,比如 Avital 等从骨髓中分离出的 β_2 小球蛋白(β_2 microglobulin, β_2 m)细胞^[11]。分化后的细胞免疫荧光染色表达不均匀,相对较弱,可能与分化后细胞的成熟状态有关。

本研究用肝部分切除术后 36 h 再生肝组织浸出液诱导 BMSCs 定向肝细胞样分化,为肝组织工程提供了新的细胞来源途径,但这只是初步的工作,尚需进一步分析该浸出液的成份,优化诱导条件,特别是解决诱导后细胞的扩增问题。

【参考文献】

- [1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. Science, 1999, 284 (5411): 143-147.
- [2] Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cell [J]. Science, 1999, 284: 1168.
- [3] Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone differentiate into functional hepatocyte-like cells [J]. J Clin Invest, 2002, 109(10): 1291-1302.
- [4] Theise ND, Badve S, Saxena R, et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation [J]. Hepatology, 2000, 31(1): 235-240.
- [5] Alison MR, Poulson R, Jeffery R, et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells [J]. Nature, 2000, 406(6793): 257.
- [6] Jiang YH, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow [J]. Nature, 2002, 418(4): 41-49.
- [7] Treman N, Korkko J, Ibberson D, et al. MicroSAGE analysis of 2353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages [J]. Stem Cells, 2001, 19(5): 408-418.
- [8] Liechty KW, Mackenzie TC, Shaaban AF, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep [J]. Nat Med, 2000, 6(11): 1282-1286.
- [9] 王伟, 龚建平, 裴法祖. 大鼠肝再生期间两种检测细胞增殖与凋亡方法的比较 [J]. 中华实验外科杂志, 2002, 19(6): 603.
- [10] 徐迎新, 王文杰, 宋旭华, 等. 骨髓间充质干细胞定向肝细胞样分化的研究 [J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(2): 152-153.
- [11] Avital I, Inderbitzin D, Aoki T, et al. Isolation, characterization and transplantation of bone marrow-derived hepatocytes stem cell [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 288(1): 156-164.

(收稿日期: 2006-07-17)



图2.3 诱导分化8 h后NBT染色阳性细胞(100×)



图2.4 诱导分化8 h后NBT染色阳性细胞(100×)

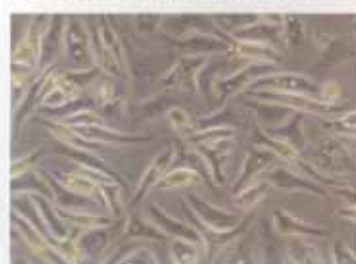


图3.1 IMCQ大多呈长纺锤状, 旺盛生长, 聚体致密(200×)

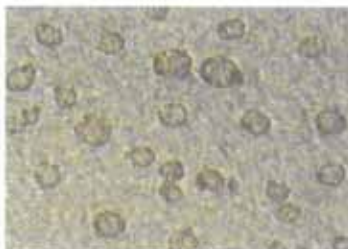


图3.2 诱导两天后, 细胞大部分变圆, 孔底可见漂浮出的细胞(200×)



图3.3 用ICF、ICF诱导后的细胞, 其滴蛋白抗体免疫荧光检测呈阳性, 为图中绿色荧光(200×)

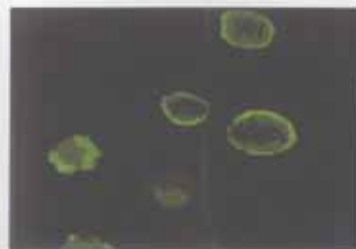


图3.4 用再生肝浸出液诱导后的细胞, 其滴蛋白抗体免疫荧光检测呈阳性, 为图中绿色荧光(200×)



图3.5 用ICF、ICF诱导后的细胞, 其CK8抗体免疫荧光检测呈阳性, 为图中红色荧光(200×)



图3.6 用再生肝浸出液诱导后的细胞, 其CK8抗体免疫荧光检测呈阳性, 为图中红色荧光(200×)



图3.7 用ICF、ICF诱导后的细胞, 其CK19抗体免疫荧光检测呈阳性, 为图中红色荧光(200×)

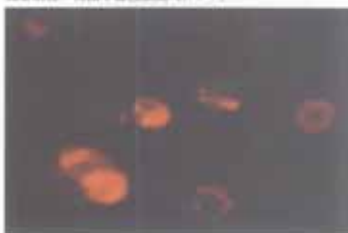


图3.8 用再生肝浸出液诱导后的细胞, 其CK19抗体免疫荧光检测呈阳性, 为图中红色荧光(200×)

图1.1—图1.4 正文见P1052—1053

图2.1—图2.4 正文见P1054—1055

图3.1—图3.8 正文见P1056—1057