

HGF和FGF4体外诱导人骨髓CD45⁺CD117⁺细胞向肝细胞分化的研究

李文晰, 段芳龄, 马 军, 陈香宇

李文晰, 段芳龄, 马军, 陈香宇, 郑州大学消化疾病研究所
河南省郑州市 450003

李文晰, 女, 1977-11-10 出生, 汉族, 河南省延津县人. 2003 年于郑州大学医学院获内科消化硕士学位, 主要从事干细胞基础和临床应用研究.

河南省卫生厅创新人才基金资助项目, No. 2002223

项目负责人: 段芳龄, 450003, 河南省郑州市经八路 2 号, 河南省郑州大学消化疾病研究所. wenxili@eyou.com

电话: 0371-3974183

收稿日期: 2003-07-19 接受日期: 2003-09-24

Differentiation of adult bone marrow CD45⁺CD117⁺ stem cells into hepatocyte *in vitro*

Wen-Xi Li, Fang-Ling Duan, Jun Ma, Xiang-Yu Chen

Wen-Xi Li, Fang-Ling Duan, Jun Ma, Xiang-Yu Chen, Institute of Digestive Disease, Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, Henan Province, China
Supported by the Chuangxin Rencai Foundation of Henan Health Bureau, No.2002223

Correspondence to: Fang-Ling Duan, Institute of Digestive Disease, Zhengzhou University Medical School, 2 Jingba Road, Zhengzhou 450003, Henan Province, China. wenxili@eyou.com

Received: 2003-07-19 Accepted: 2003-09-24

Abstract

AIM: To observe whether the CD117⁺CD45⁺ bone marrow cell can differentiate into the cells with characters of hepatocyte by the stimulation of hepatocyte growth factor (HGF) and fibroblast growth factor-4 (FGF4), and to explore the acting mechanism of the growth factors.

METHODS: Bone marrow cells were from the stern or ilium of 4 healthy volunteers between 4-40 years old. CD117⁺CD45⁺ bone marrow cells separated by magnetic cell sorting method, cultured in DMEM medium with FGF4, HGF, FGF4+HGF or no growth factor were divided into four groups: groups A, B, C, and D accordingly. Cells were collected on days 0, 7, 14, 21, and 28 for detecting the hepatocyte markers: AFP, CK18, albumin by immunocytochemistry, glycogen by PAS staining and c-met, FGFR2 mRNA by RT-PCR.

RESULTS: The specific markers of hepatocyte were positive in groups A, B and C but not in group D. C-met and FGFR2 mRNA expressed at a low level in the cells newly isolated or cultured in the medium without growth factor, but at increasing level after cultured with growth factor.

CONCLUSION: HGF and FGF4 can induce CD45⁺CD117⁺ differentiate into hepatocyte-like cells. The effect of growth factor on cell differentiation is probably by the positive regulation between the growth factor and its receptor.

Li WX, Duan FL, Ma J, Chen XY. Differentiation of adult bone marrow CD45⁺CD117⁺ stem cells into hepatocyte *in vitro*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(3):697-701

摘要

目的: 探讨在 HGF、FGF4 诱导下人骨髓 CD45⁺CD117⁺ 细胞能否向肝细胞分化, 并探讨两种生长因子在诱导分化中可能的作用机制.

方法: 骨髓来自 4 名 4-40 岁健康志愿者的胸骨或髂骨. 用两步磁式分离法分离出 CD45⁺CD117⁺ 细胞, 分别用含有 FGF4, HGF, HGF+FGF4 或不加生长因子的 DMEM 培养基进行培养, 相应地分为 A, B, C, D 四组. 分别于新分离时和培养 7 d, 14 d, 21 d, 28 d 时留细胞. 制备免疫细胞化学检测 AFP, CK18, 白蛋白, PAS 染色检测糖原等肝系细胞的特征型标志, RT-PCR 检测 C、D 组细胞 c-met (HGF 受体) 和 FGFR2 (FGF4R) mRNA 表达情况.

结果: A, B, C 三组加生长因子诱导培养后的细胞均可检测到肝系细胞的标志, D 组细胞不加生长因子培养后没有检测到肝系细胞的标志. c-met 和 FGFR2 mRNA 在新分离的和 D 组培养 7 d, 14 d 时的细胞均有较弱的表达, 而在 C 组细胞诱导培养 7 d, 14 d 时表达升高.

结论: HGF 和 FGF4 可诱导人骨髓 CD45⁺CD117⁺ 细胞向肝细胞样细胞分化. 生长因子诱导分化的作用可能通过与其受体之间的正反馈调节.

李文晰, 段芳龄, 马军, 陈香宇. HGF 和 FGF4 体外诱导人骨髓 CD45⁺CD117⁺ 细胞向肝细胞分化的研究. 世界华人消化杂志 2004;12(3):697-701

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/697.asp>

0 引言

骨髓干细胞向肝细胞分化潜能的发现, 给肝病的治疗带了新思路和新的前景. 但目前向肝细胞分化的具体的骨髓亚型来源及调控骨髓干细胞定向分化的机制尚不清楚. 我们选用了 CD45⁺CD117⁺ 细胞, 用 HGF 和 FGF4 诱导其向肝细胞分化, 为了进一步探讨肝细胞的骨髓源问题. 还检测了所用生长因子的受体诱导前后表达情况, 以探讨骨髓干细胞向肝细胞可能的分化机制. 为骨髓干细胞应用于临床奠定理论基础.

1 材料和方法

1.1 材料 抗人 CD45 Microbead、抗 PE Microbead 购自德国 Miltenyi 公司, 抗人 PE-CD117 抗体、HGF、FGF4 购自 BD 公司, 淋巴分离液购自 TBD 公司, DMEM、ITS

购自 GIBCO, 胎牛血清购自天津血研所, RNA 抽提试剂盒购自 QIAGEN 公司, Revertaid First Strand cDNA synthesis kit 购自 MBI 公司, Probest Taq 酶购自 Takara 公司, DAPI 购自 Roche 公司, GeneRuler™ 100 bp DNA ladder 购自 MBI 公司, 抗人 CK18 抗体、兔、鼠 SP 试剂盒购自福州迈新生物公司, 抗人白蛋白抗体、抗人 AFP 抗体购自 DAKO 公司, DAB 试剂盒购自北京中山生物公司, 鼠尾胶原, Schiff 试剂自制。

1.2 方法 骨髓源于 4 名健康志愿者, 年龄 4-40 岁, 从胸骨或髂骨抽取 8 mL 骨髓, 先用淋巴分离液初步分离出骨髓单个核细胞。再用磁式分离法分离出 CD45⁺CD117⁺ 细胞。具体步骤: (1) 密度梯度离心法分离出骨髓单个核细胞, 再将其过 Pre-separation filter 柱。(2) 加 10 μ L PE 标记的抗人 CD117(c-kit) 于细胞悬液中(10 μ L 抗体/10⁷ 个细胞), 混匀后 4 $^{\circ}$ C 避光反应 5-10 min。(3) 洗细胞后, 重悬细胞, 并加抗 PE 微磁珠 20 μ L, 混匀后 6-12 $^{\circ}$ C 孵育 15 min (20 μ L 磁珠/10⁷ 个细胞)。(4) 用 2 mL 除气 Buffer 润湿 LD 柱, 将 3) 的细胞悬液加于柱子上, 让其流到一新备的收集管中, 既得 CD117⁺ 细胞。(5) 重悬细胞并加抗人 CD45 磁珠混匀, 4 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。(6) 洗细胞后, 将其重悬, 加到一新的 LD 柱。(7) 收集流下的细胞, 得到的即为 CD117⁺CD45⁺ 细胞。留部分作细胞计数, 并分别通过台盼兰染色和 DAPI 复染细胞核计算细胞活率和纯度, 余用 Hank's 洗 1 遍后加培养基。分离好的细胞以 4 \times 10⁴ 个细胞/cm² 的密度接种于铺有鼠尾胶原的 24 孔培养板上, 加低糖型 DMEM(GIBCO), 含 20 mL/L FBS, 1 \times ITS, 青霉素 100 kU/L, 链霉素 100 kU/L, 1 g/L BSA, 10⁻⁸ mol/L 地塞米松, 10⁻⁴ mol/L 抗坏血酸, 分为单独 HGF, 单独 FGF₄, HGF 与 FGF₄、无生长因子 4 个组, 分别计为 A, B, C, D 组, 每组 6 个复孔, 以后每周换液 2 次, 分别于培养 7, 14, 21, 28 d 时留取细胞以备检测。

免疫细胞化学 SP 法检测 CK18、AFP、白蛋白, 步骤: 留取的细胞用 Carnoy 固定液固定 10 min, 用 PBS 冲洗干净后, 加过氧化物酶阻断剂反应 10 min, 0.1 mol/L PBS 冲洗干净, 非免疫血清封闭 10 min, 甩弃多余封闭液, 加一抗: CK18 工作液, AFP 用 PBS 1:200 稀释, 白蛋白 1:300 稀释, 50 μ L/片, 室温反应 2 h, PBS 代替一抗作阴性对照。PBS 冲洗, 3 min \times 3。加生物标记的二抗 10 min。过氧化物酶标记的卵白素 10 min 冲洗, DAB 镜下显色, 冲洗, 苏木素复染或不复染, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 镜下观察, 选数个高倍视野进行细胞计数(每个指标源于 4 标本), 共计 500 个细胞。

PAS 染色检测糖原: 留取细胞, 用 950 mL/L 酒精固定 10 min, 冲洗干净, 10 g/L 过碘酸水溶液反应 10 min, 冲洗, 晾干, 加 Schiff 试剂 30 min, 亚硫酸水洗 3 遍, 自来水冲洗, 晾干, 加 2% 甲绿反应 15 min, 自来水冲洗、脱水、透明、中性树胶封片。

RT-PCR 检测 c-met 和 FGFR2 mRNA: 分别取新鲜分离出的 CD117⁺CD45⁺ 细胞及 C 组、D 组诱导培养 7、14 d 的细胞, 各 5 \times 10⁶ 个, 抽提 RNA(按试剂盒说明书进行), 加 600 μ L RLT 制成细胞悬液, 用自动匀浆器匀浆 30 s。加 700 mL/L 乙醇 600 μ L 到匀浆液中, 抽吸均匀后将其加于柱子上, 离心 15 s。加 700 μ L RW₁ 于柱子, 离心 15 s。加 500 μ L RPE 于 Rneasy 柱, 离心 15 s, 并重复。将柱子放入 1 个 1.5 mL 收集管中, 加 30-50 μ L 无 RNA 酶水于柱子中, 大于或等于 8 000 g 离心 1 min。用紫外分光光度计测 A₂₆₀ 和 A₂₈₀ 值, 按公式计算出 RNA 的浓度和纯度。逆转录参照试剂盒说明书, 冰上加: 总 RNA 10 μ L (0.2 mg), oligo (dT)₁₈ 引物 1 μ L; 水 1 μ L, 混匀 3-5 s。70 $^{\circ}$ C 反应 5 min, 冰上速冷。按如下顺序在冰上加: 5 \times buffer 4 μ L; 核酶抑制剂 1 μ L; 10 mmol/L dNTP \times 2 μ L, 混匀并离心片刻。37 $^{\circ}$ C 反应 5 min。ReverAid M-MuLV 逆转录酶(200 u/ μ L) 1 μ L, 混匀。42 $^{\circ}$ C 反应 60 min。之后在 70 $^{\circ}$ C 反应 10 min, 冰上冷却结束反应。PCR 所用引物 C-met1, 5'-cattctgaagccgtttatgc-3'; C-met2, 5'-atgccctctcctatgatct-3', 产物长度 601 bp。FGFR2_U, 5'-aacaccacggacaaagagat-3'; FGFR2_L, 5'-tcttggtcggtgttcttcattcg-3', 产物长度 265 bp。 β -actin1, 5'-ccaaggccaaccgcgagaagatga-3'; β -actin2, 5'-agggtacatggtggtgccgccaga-3', 产物长度 587 bp。

以肝癌组织 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 作为阳性对照, 以鉴定引物设计及合成质量, 以 β -actin 作内参。PCR 反应体系: 10 \times buffer 5 μ L; Taq 酶 0.125 μ L; dNTPs (2.5 mmol/L), 2.5 μ L; 引物 mix (100 pmol/L) 1 μ L; 模板(100 ng/ μ L) 1 μ L; 灭菌水 17.875 μ L; 总体积 25 μ L。循环条件: 94 $^{\circ}$ C, 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C (c-met, FGFR₂)/62 $^{\circ}$ C (β -actin) 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 后延伸 3 min。分别取 PCR 产物 5 μ L, DNA ladder 6 μ L, 用 1 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 紫外投射仪下观察并照像, 用 Quantity one 软件分析。以 DNA ladder 的表达值为标准, 用各个待测条带的灰度值与标准参照相比得到校正值, 再分别将各标本的 c-met, FGFR₂ 的校正值与其相应的 β -actin 的校正值相比, 得出一个比值, 即二次校正值, 然后进行各组间比较。

统计学处理 阳性率在各组之间, 各时间点之间的比较用 χ^2 检验, P < 0.05 为有显著性差异。

2 结果

在倒置相差显微镜下观察, 细胞大小均匀, 透光度良好, DAPI 染核后, 在荧光显微镜下观察, PE 标记的细胞占细胞总数的百分率小于 1%。台盼蓝染色, 细胞活率大于 95%。细胞均呈克隆性生长, 单个不形成克隆的细胞容易死亡。24 h 起开始有贴壁生长, 之后逐渐增多, 贴壁的细胞呈卵圆形或梭形。诱导至 28 d 时, 细胞形态呈上皮样细胞。C 组细胞生长速度快于 A、B 两组细胞。细胞达对数生长期的时间, 在不同的细胞供应者之间

有差异, 在 7-20 d 之间。

2.1 RT-PCR检测c-met与FGFR₂的结果 以肝癌cDNA为模板扩增, c-met, FGFR₂均有很亮的条带(图1)。以新鲜分离骨髓干细胞或诱导培养后细胞的cDNA为模板的RT-PCR产物, 其电泳结果经肉眼观察, 并用Quantity One分析的结果均表明: c-met与FGFR₂ mRNA在新鲜分离的骨髓 CD117⁺CD45⁺ 细胞有表达, 在 C 组细胞诱导培养 7, 14 d 时表达均升高, 而 D 组培养 7, 14 d 时表达量变化不明显(图 2, 3)。其内参对照 β -actin 在各组, 各时间点无明显差异(图 4), 均有较亮的条带。Quantity one 软件分析结果见表 1。

表 1 c-met 与 FGFR2 电泳条带分析结果

分组	β -actin		c-met		FGFR2	
	表达值	校正值	表达值	校正值	表达值	校正值
新分离的细胞	75.26	0.57	59.17	0.47	36.60	0.18
C 组 7 d	77.78	0.59	85.49	0.68	64.53	0.32
D 组 7 d	80.91	0.61	59.74	0.48	36.70	0.18
C 组 14 d	74.02	0.56	89.42	0.72	62.15	0.31
D 组 14 d	73.90	0.56	57.39	0.46	30.65	0.15

该组数据是 4 个标本的均数。



图 1 c-met, FGFR₂ 的 RT-PCR 产物。1: 肝癌为模板的 c-met; 2: CD117⁺CD45⁺ 细胞为模板的 c-met; 3: CD117⁺CD45⁺ 为模板的 FGFR₂; 4: Marker; 5: 肝癌为模板的 FGFR₂。

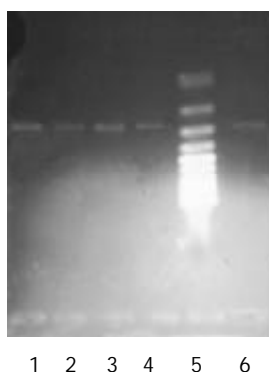


图 2 FGFR₂ RT-PCR 结果。1: C 组 14 d; 2: D 组 14 d; 3: C 组 7 d; 4: D 组 7 d; 5: Marker; 6: 新分离的细胞。

2.2 检测 AFP, CK18, 白蛋白和糖原的结果 AFP 在新分离的细胞有少数细胞表达, 阳性率在 2% 左右。在

加生长因子诱导培养 7 d, 14 d 时表达较高。诱导培养 21, 28 d 时较低。经统计学分析 AFP 表达从 7-28 d 呈下降趋势($P < 0.01$, 表 2, 图 5B)。但在 3 个组之间无明显差异($P > 0.05$)。不加生长因子培养的 7-28 d 细胞和无一抗对照均未见染色(见图 5A)。白蛋白在新分离的细胞有少数的细胞呈阳性, 加生长因子诱导的 3 组细胞, 阳性率随着诱导培养时间的延长有逐渐升高的趋势($P < 0.01$, 表 2, 图 5C), 在 3 组间白蛋白的表达无明显差异($P > 0.05$)。不加生长因子组在 7-28 d 均未见白蛋白表达, 无一抗对照未见染色。CK18 表达随着加生长因子诱导培养时间的延长, 有逐渐升高的趋势($P < 0.01$, 表 2, 图 5D), 在 3 组间未见明显差异。不加生长因子组和无一抗对照均未见阳性染色。随细胞培养时间的延长, 加生长因子诱导培养的 3 组细胞, 糖原染色的阳性率逐渐升高($P < 0.01$, 见表 2, 图 5E), 在 3 组间无明显差异($P > 0.05$)。而不加生长因子培养的细胞, 各个时间点均未见糖原阳性染色, 阴性对照未见染色。

表 2 各指标在不同组不同时间点的表达情况(单位为 %, $n=500$)

指标	组别	7 d	14 d	21 d	28 d	χ^2	P 值
AFP	A	80.0	42.0	8.8	2.0	804.42	0.000
	B	79.0	41.6	7.6	1.8	803.51	0.000
	C	78.4	40.0	9.2	2.0	771.22	0.000
白蛋白	A	19.0	76.4	94.0	96.0	774.06	0.000
	B	21.0	75.6	92.2	97.4	759.865	0.000
	C	19.4	76.0	95.2	98.0	808.6	0.000
CK18	A	17.4	65.0	89.8	92.8	672.496	0.000
	B	18.0	63.0	90.0	91.8	759.865	0.000
	C	18.4	64.8	90.4	92.6	808.6	0.000
糖原	A	1.2	8.0	61.0	88.0	1026.5	0.000
	B	1.4	8.4	60.4	87.0	998.8	0.000
	C	1.0	7.8	62.0	89.0	1054.6	0.000

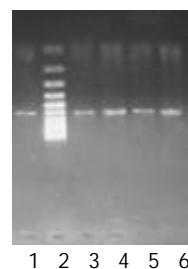


图 3 c-met RT-PCR 结果。1: 新分离的细胞; 2: Marker; 3: D 组培养 7 d; 4: C 组培养 7 d; 5: D 组培养 14 d; 6: C 组培养 14 d。

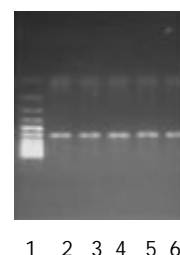


图 4 β -actin RT-PCR 结果。1: Marker; 2: D 组培养 14 d; 3: C 组培养 14 d; 4: D 组培养 7 d; 5: C 组培养 7 d; 6: 新分离的细胞。

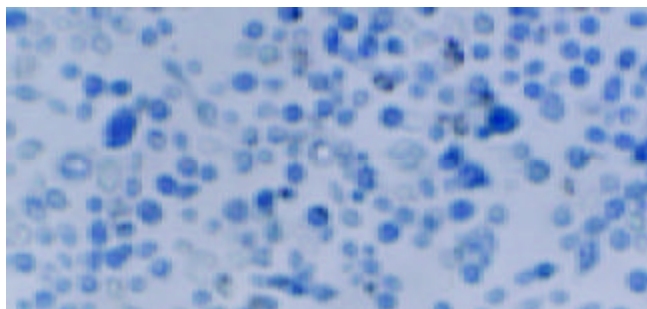


图5A C组细胞诱导培养28 d无一抗对照($\times 400$).

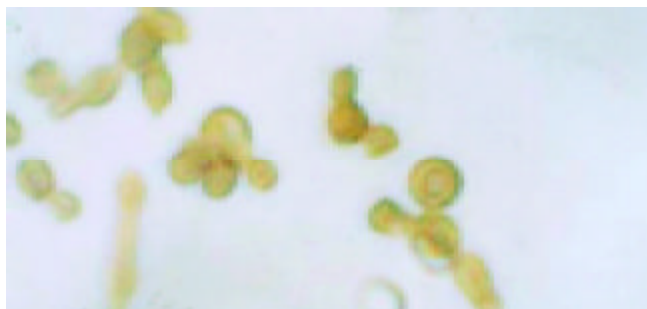


图5B A组诱导培养7 d AFP表达($\times 400$).

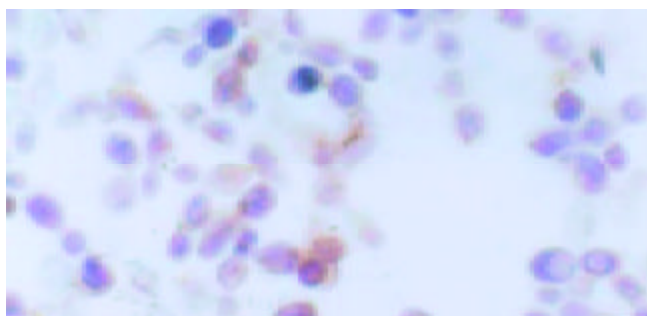


图5C C组诱导培养14 d时白蛋白表达情况($\times 400$).

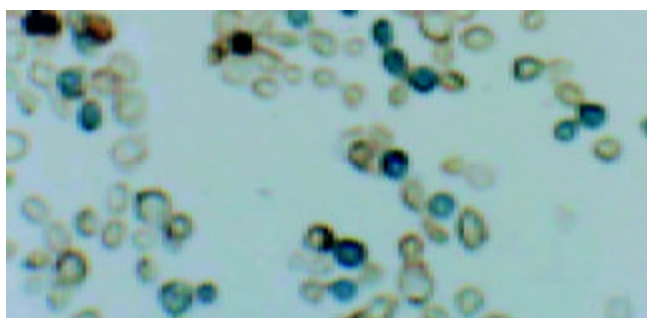


图5D B组诱导培养21 d时CK18表达情况($\times 400$).

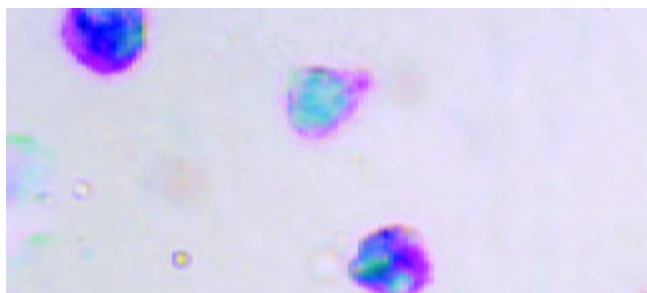


图5E C组诱导培养21 d时糖原染色情况($\times 1\,000$).

3 讨论

体内外试验证实肝细胞可来源于骨髓干细胞^[1-6], 这为肝脏疾病的治疗提供了新思路, 因而人们对这方面的研究倾注了极大的热情, 但目前向肝细胞分化的骨髓来源问题还没搞清. CD117, 也叫 c-kit, 是干细胞因子(SCF)的受体, 表达于未分化的造血前体细胞, 是最常用的造血干细胞标志之一^[7-9]. CD45表达于除红细胞和血小板以及他们的前体以外的所有造血源性细胞^[10-12], 因而我们分离的CD117⁺CD45⁺细胞为骨髓非造血干细胞的一个亚型. 这种亚型的骨髓干细胞向肝细胞的分化情况目前尚无人研究. 本试验选择了CD117⁺CD45⁺细胞, 诱导他们向肝细胞分化, 旨在探讨肝细胞的骨髓来源问题.

磁式分离法可以利用细胞的表面标志分离出造血干细胞或非造血干细胞, 能更精确的将细胞分类. 我们用磁式分离得到的细胞, 透亮度好, 台盼蓝染色发现活细胞比率大于95%, 这说明本实验分离的细胞活力尚可, 适合用于细胞培养. 用荧光染料DAPI染核检测纯度, 荧光显微镜观察发现PE标记的细胞占总数的99%, 这说明此法分离出的细胞具有很高的纯度.

AFP是一种胞质蛋白, 由肝前体细胞分泌, 随着细胞逐渐成熟而消失^[13-15]. 我们实验中加生长因子诱导培养后, AFP符合一个规律: 7, 14 d时表达均处于较高水平, 21, 28 d时表达较低, 总体上呈下降趋势. 这一规律与肝系细胞从幼稚到成熟这一过程中AFP变化规律相一致.

CK18, 白蛋白, 糖原均是成熟肝细胞的标志. CK18在幼稚的肝前体细胞不表达, 当肝细胞趋于成熟或已成熟时表达^[16-18]. 白蛋白是肝细胞功能的一个标志物, 在体内他主要由成熟肝细胞分泌^[19-21]. 糖原合成和储存是正常肝细胞特有的功能^[22-24], 因而联合检测这三个指标能较准确的反应肝系细胞的特征.

我们的试验结果显示这些标志物在细胞诱导培养过程中的表达符合肝细胞逐渐趋于成熟过程中的表达规律.

目前对骨髓干细胞分化潜能的研究已比较多, 且骨髓干细胞的多向分化潜能已成定论. 但骨髓干细胞分化的机制及其定向分化的控制因素还是困扰研究者的一大难题, 这在骨髓干细胞应用于临床方面设置了巨大障碍. 生长因子是调控分化的众多因素中的一个重要元素. 我们试验中运用了2种生长因子: HGF和FGF4. HGF也叫肝细胞生长因子, 在胚肝发育成熟过程中发挥着重要作用, 并能促进未活化的肝细胞分化^[25-27]. 因其在体内的作用, 使其成为了目前体外诱导骨髓干细胞向肝细胞分化的研究中应用最多且效果比较肯定的一个生长因子. 本实验将其作为FGF4, FGF4与HGF联合的对照以观察他们诱导向肝细胞分化的作用. FGF4在内胚层的形成时是一重要的因子, 对保持内胚层的特异性起重要作用^[28-30]. 我们的结果显示不管单独HGF, 单独FGF4或二者联合刺激组均检测到了肝细胞表型和功能信号. 这说明了HGF, FGF4, 这两个生长因子均具有诱导骨

髓干细胞向肝细胞分化的功能. 当 FGF4 与 HGF 联合应用时, 虽肝细胞特异性标志阳性的细胞比率与单独 HGF、单独 FGF4 无明显差异, 但细胞生长速度要快于后者, 因而 HGF 与 FGF4 还是起到了一定的协同作用.

RT-PCR 作为鉴定引物质量和操作问题的阳性对照和内参对照均有较亮的条带, 这说明引物设计合成质量及 PCR 各项反应条件均合适. 对骨髓细胞的检测发现在新鲜分离的细胞有微弱的条带, 这提示了二者在 CD117⁺CD45⁺ 干细胞中的低表达状态, 也间接提示了这种亚型骨髓干细胞均有可能受 HGF 与 FGF4 的诱导, 这种假设在细胞培养过程中得到了验证. 动态观察诱导培养 7 d, 14 d 时 c-met、FGFR₂ 表达的情况, 发现加生长因子的一组细胞, 其 c-met、FGFR₂ mRNA 表达均升高, 而不加生长因子时则未见 c-met、FGFR₂ mRNA 表达变化. 这提示 HGF 与 FGF4 对其相应的受体可能有诱导其活化或诱导性表达的作用. 提示 HGF、FGF4 发挥作用时可能存在正反馈机制.

既然新鲜分离的骨髓干细胞表面就存在一些生长因子受体, 我们可以考虑从这些受体入手, 找出与之相应的配体, 然后再通过细胞培养或动物试验等方法检测这些配体的作用效果. 沿此路线去寻找调控分化的因素, 或许也是值得考虑的路径. 另外从检测骨髓干细胞与肝细胞表面共同存在的受体入手, 可能也是找出骨髓干细胞向肝细胞分化的调控因素的一种途径.

4 参考文献

- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284:1168-1170
- Avital I, Inderbitzin D, Aoki T, Tyan DB, Cohen AH, Ferrareso C, Rozga J, Arnaout WS, Demetriou AA. Isolation, characterization and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:156-164
- Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001;105:3769-3778
- 李文晰, 段芳龄, 马军, 朱武凌, 高天慧, 陈香宇, 颜伏归, 李蔚, 韩娜, 王晓, 孙艳, 孙嫣. 人骨髓单个核细胞向肝细胞诱导分化的体外研究. *胃肠病学和肝病杂志* 2003;12:144-147
- 马军, 段芳龄, 李文晰, 颜伏归, 王晓, 王智卿, 朱武凌, 陈香宇, 高天慧. 大鼠移植骨髓细胞向肝细胞转化的实验研究. *胃肠病学和肝病杂志* 2003;12:138-143
- 杨明智, 彭志海. 骨髓源性肝干细胞的研究进展. *世界华人消化杂志* 2003;11:1035-1036
- Jordan JH, Walchshofer S, Jurecka W, Mosberger I, Sperr WR, Wolff K, Chott A, Buhning HJ, Lechner K, Horny HP, Valent P. Immunohistochemical properties of bone marrow mast cells in systemic mastocytosis: evidence for expression of CD2, CD117/Kit, and bcl-x (L). *Hum Pathol* 2001;32:545-552
- Niemeyer GP, Hudson J, Bridgman R, Spano J, Nash RA, Lothrop CD. Isolation and characterization of canine hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 2001;29:686-693
- Nadin BM, Goodell MA, Hirschi KK. Phenotype and hematopoietic potential of side population cells throughout embryonic development. *Blood* 2003;102:2436-2443
- Ohmura K, Kawamoto H, Lu M, Ikawa T, Ozaki S, Nakao K, Katsura Y. Immature multipotent hemopoietic progenitors lacking long-term bone marrow-reconstituting activity in the aorta-gonad-mesonephros region of murine day 10 fetuses. *J Immunol* 2001;166:3290-3296
- Niemeyer GP, Hudson J, Bridgman R, Spano J, Nash RA, Lothrop CD. Isolation and characterization of canine hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 2001;29:686-693
- McKinney-Freeman SL, Majka SM, Jackson KA, Norwood K, Hirschi KK, Goodell MA. Altered phenotype and reduced function of muscle-derived hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 2003;31:806-814
- Fiegel HC, Kluth J, Lioznov MV, Holzhtuter S, Fehse B, Zander AR, Kluth D. Hepatic lineages isolated from developing rat liver show different ways of maturation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;305:46-53
- Okumura K, Nakamura K, Hisatomi Y, Nagano K, Tanaka Y, Terada K, Sugiyama T, Umeyama K, Matsumoto K, Yamamoto T, Endo F. Salivary gland progenitor cells induced by duct ligation differentiate into hepatic and pancreatic lineages. *Hepatology* 2003;38:104-113
- Azuma H, Hirose T, Fujii H, Oe S, Yasuchika K, Fujikawa T, Yamaoka Y. Enrichment of hepatic progenitor cells from adult mouse liver. *Hepatology* 2003;37:1385-1394
- Libbrecht L, Desmet V, Van Damme B, Roskams T. Deep intralobular extension of human hepatic progenitor cells correlates with parenchymal inflammation in chronic viral hepatitis: can progenitor cells migrate? *J Pathol* 2000;192: 373-378
- Libbrecht L, Desmet V, Van Damme B, Roskams T. The immunohistochemical phenotype of dysplastic foci in human liver: correlation with putative progenitor cells. *J Hepatol* 2000; 33:76-84
- Ruhnke M, Ungefroren H, Zehle G, Bader M, Kremer B, Fandrich F. Long-term culture and differentiation of rat embryonic stem cell-like cells into neuronal, glial, endothelial, and hepatic lineages. *Stem Cells* 2003;21:428-436
- Miyazaki M, Akiyama I, Sakaguchi M, Nakashima E, Okada M, Kataoka K, Huh NH. Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298:24-30
- Kollet O, Shvitiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S, Goichberg P, Kalinkovich A, Arenzana-Seisdedos F, Nagler A, Hardan I, Revel M, Shafritz DA, Lapidot T. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34⁺ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 2003;112:160-169
- Yamamoto H, Quinn G, Asari A, Yamanokuchi H, Teratani T, Terada M, Ochiya T. Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes: biological functions and therapeutic application. *Hepatology* 2003;37:983-993
- Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002;109:1291-1302
- Honda M, Yamada T, Nomura T, Miki Y, Kanda S, Seki A, Sasaki J. Differential, histochemical and immunohistochemical changes in rat hepatocytes after isoflurane or sevoflurane exposure. *Acta Med Okayama* 2003;57:1-12
- Ishizaka S, Shiroy A, Kanda S, Yoshikawa M, Tsujinoue H, Kuriyama S, Hasuma T, Nakatani K, Takahashi K. Development of hepatocytes from ES cells after transfection with the HNF-3beta gene. *FASEB J* 2002;16:1444-1446
- Hamamoto R, Kamihira M, Iijima S. Growth and differentiation of cultured fetal hepatocytes isolated various developmental stages. *Biosci Biotech Biochem* 1999;63:395-401
- Okano J, Shiota G, Matsumoto K, Yasui S, Kurimasa A, Hisatome I, Steinberg P, Murawaki Y. Hepatocyte growth factor exerts a proliferative effect on oval cells through the PI3K/AKT signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:298-304
- Enomoto H, Yoshida K, Kishima Y, Okuda Y, Nakamura H. Participation of hepatoma-derived growth factor in the regulation of fetal hepatocyte proliferation. *J Gastroenterol* 2002;37:158-161
- Wells JM, Melton DA. Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development* 2000; 127:1563-1572
- Isfort RJ, Cody DB, Kerckaert GA. Analysis of the transforming potential of growth and differentiation factors in syrian hamster embryo cells: reversible and irreversible transformation. *Vitr Mol Toxicol* 1999;12:133-148
- Henderson JK, Draper JS, Baillie HS, Fishel S, Thomson JA, Moore H, Andrews PW. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells* 2002;20:329-337