PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2004 August;12(8):1844-1848
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

人胎儿骨髓间充质干细胞来源的类肝细胞的分子生物学鉴定

何念海, 赵文利, 王宇明

何念海, 赵文利, 王宇明, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所 重庆市 400038
何念海, 男, 1965-03-20 生, 四川省遂宁市人, 汉族. 1986 年重庆医科科大学本科毕业, 2004 年第三军医大学博士毕业, 副教授, 副主任医师, 主要从事生物人工肝及相关基础研究.
国家高技术研究发展计划(863)资助项目, No. 2001AA216161
项目负责人: 王宇明, 400038, 重庆市沙坪坝区高滩岩正街 30 号, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所. wym417@mail.tmmu. com.cn
收稿日期: 2004-04-22 接受日期: 2004-05-09

Molecular biological identification of hepatocyte-like cells derived from human fetal marrow mesenchymal stem cells

Nian-Hai He, Wen-Li Zhao, Yu-Ming Wang

Nian-Hai He, Wen-Li Zhao, Yu-Ming Wang, Institute of Infectious Diseases of Chinese PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Supported by the 863 program of China, No. 2001AA216161
Correspondence to: Dr. Yu-Ming Wang, Institute of Infectious Diseases of Chinese PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, 30 Gaotanyan Zhengjie, Chongqing 400038, China. wym417@mail.tmmu.com.cn
Received: 2004-04-22 Accepted: 2004-05-09

Abstract

AIM: To identify hepatocyte-like cells derivated from the induced marrow mesenchymal stem cells (MMSCs) by molecular biological techniques.

METHODS: MMSCs were isolated from fetal marrow. MMSCs were cultured and induced *in vitro* in 10 g/L Matrigel as matrix, 2.5 mmoL/L AZA pretreatment for 10-12 h, HGF 10 μg/L+FGF4 10 μg/L+HGM medium. Creep plates of induction culture cell were collected at days 4, 7, 14, 21 and 28, and early marker s for hepatocyte such as AFP, CK19, early transcription factor GATA4 and mature markers for hepatocyte such as ALB, CK18, CK8, GST-π and hepatocyte transcription factor HNF1α were detected by HAB coloration of SABC immunohistochemical method. RNA and proteins of the induced differentiation cells were extracted at days 10 and 28, hepatocyte mRNA of the AFP, CK19, ALB, CK18, CYP1B1 and CYP2B6 expression were observed by using RT-PCR, and protein expression of CK18, AFP and ALB were detected with Western blot.

RESULTS: Undifferentiated MMSCs had few AFP expressed cells, and did not express any of the liver-specific transcription factors or cytoplasmic markers. Immunohistochemical detection showed that many cells in early induction were GATA4, AFP and CK19 expressed positively, and the expression reduced at the late induction, but the ratio of ALB, CK18, CK8, GST-π and hepatocyte transcription factor HNF1α positive cells increased gradually. RT-PCR detection showed that undifferentiated MMSCs expressed very weakly AFP mRNA, mRNA of AFP and CK19 expressed in early induction, but disappeared in late induction, mRNA of ALB, CK18, CYP1B1 expressed in early and late induction, CYP2B6 mRNA expressed very weakly in the late induction. Western blot detection showed the expression tendency of AFP, ALB and CK18 was similar the mRNA expression. Induction groups had AFP, ALB and CK18 objective strap at 65 ku, 68 ku and 45 ku respectively. AFP expressed in the early induction and disappeared in the late induction, CK18 and ALB expressed in early induction and enhanced in the late induction.

CONCLUSION: MMSCs differentiate firstly to the precursor of hepatocyte, then differentiate to mature hepatocyte, and hepatocyte-like cells with positive hepatocyte marker in replication, transcription and translation level are obtained under this experimental condition.

He NH, Zhao WL, Wang YM. Molecular biological identification of hepatocyte-like cells derived from human fetal marrow mesenchymal stem cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(8):1844-1848

摘要

目的: 对MMSCs来源类肝细胞进行分子生物学鉴定.

方法: 从人胎儿骨髓中分离 MMSCs，在 10 g/L Matrigel 作基质，2.5 mmoL/L AZA 预处理 10–12 h，HGF 10 μg/L + FGF4 10 μg /L+HGM培养基中培养和诱导. 收集诱导培养4，7，14，21，28 d时的细胞爬片，SABC免疫组化法DAB显色检测肝细胞早期标志AFP，CK19及早期转录因子GATA4，成熟肝细胞标志ALB，CK18，GST–π，肝细胞转录因子HNF1α; 提取诱导分化10 d和第28 d细胞RNA及蛋白质，设计AFP，CK19，ALB，CK18，CYP1B1，CYP2B6引物，进行RT–PCR，观察在mRNA水平肝细胞标志的表达，采用 Western blot 检测CK18，AFP，ALB 的表达量.

结果: 未诱导培养的MMSCs中，有较少的细胞表达AFP，未见其他肝脏特有的转录因子或者胞质蛋白标志. 免疫组化显示在诱导早期可见较多细胞呈GATA4，AFP和CK19阳性表达，至诱导后期表达下降，而ALB，CK18，GST–π和肝细胞转录因子HNF1α阳性细胞比例逐渐上升. RT–PCR显示，未诱导的MMSCs仅可表达微弱的 AFP mRNA，诱导早期可见AFP mRNA和CK19 mRNA表达，诱导后期未见扩增，而ALB，CK18，CYP1B1 mRNA 早期和后期均可见表达，在诱导后期可见 CYP2B6 mRNA 表达，但很

弱. Western blot检测显示诱导细胞中AFP，ALB和CK18蛋白的表达趋势同基因表达类似. 在65 ku和68 ku处诱导细胞组可见AFP和ALB目的条带，在45 ku处诱导细胞组可见CK18目的条带. 未诱导的细胞和诱导早期细胞中AFP有表达，后期未见. 诱导早期和后期CK18和ALB均有表达，且后期增强.

结论: MMSCs向类肝细胞的横向分化是先分化为肝前体细胞，再分化为成熟肝细胞，在本实验诱导条件下可获得在复制及翻译各环节肝细胞标志阳性的类肝细胞.

何念海, 赵文利, 王宇明. 人胎儿骨髓间充质干细胞来源的类肝细胞的分子生物学鉴定. 世界华人消化杂志 2004;12(8):1844-1848

http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1844.asp

0 引言

骨髓间充质干细胞(marrow mesenchymal stem cells，MMSCs)作为成体干细胞(adult stem cells，ASCs)中最易获得的细胞，具有向多种中胚层和神经外胚层来源的组织细胞分化的能力，这些细胞包括肌细胞、成骨细胞、软骨细胞、成纤维细胞、皮肤细胞、神经细胞、脂肪细胞等，也可以分化为造血干细胞和基质细胞，在一定条件下，还可以形成肌小管和肌腱[1-4]. 大量研究显示MMSCs或者造血干细胞(hematopoietic stem cells，HSCs)可在人为诱发肝脏病变的实验鼠体内分化为肝细胞，重建肝脏，使病鼠肝脏功能恢复正常[5]. Ratajczak *et al* 报道CXCR4阳性细胞移出骨髓后表达早期肌肉、肝脏和神经细胞的mRNA[6]. 同时多家研究者在体外利用小鼠骨髓细胞或来自骨髓的成体多潜能干细胞在不同条件下分化为类肝细胞[5, 7-14]. 我们尝试利用人源性MMSCs在体外向类肝细胞诱导，对其分子生物学特性进行鉴定.

1 材料和方法

1.1 *材料* 选择孕期12-20周胎儿，胎儿母亲健康，肝功能正常，HBsAg(-)，选用米非司酮配伍米索前列腺醇引产，低温保存，并保持胎盘、脐带与胎体连接完整，防止细菌污染胎体腹腔. 均签署知情同意书.

1.2 *方法* 采用体外细胞分离培养技术从胎儿长骨骨髓中获得MMSCs，MMSCs以$20 \times 10^3/cm^2$接种于110 g/L Matrigel作基质，2.5 mmoL/L AZA预处理10-12 h，HGF 10 μg/L + FGF4 10 μg/L+HGM培养基进行培养和诱导，观察细胞形态变化. 分别于诱导4，7，14，21，28 d收集细胞，并以未诱导MMSCs及同一胎儿的胎肝细胞或胎肝组织切片作为阴性和阳性对照，以免疫组织化学法检测肝细胞早期标志AFP，CK19及转录因子GATA4，成熟肝细胞标志ALB，CK18，CK8，GST-π和肝细胞转录因子HNF1α的表达. 操作按SABC免疫组化说明书进行. 选择6个具有代表性的高倍视野(100 ×)，计数阳性细胞比例. 比较不同时相细胞中肝细胞标志表达情况. 分别收集未诱导的MMSCs和诱导10，28d的细胞. RNA的提取按Roche公司试剂盒(Tripure分离试剂)说明书进行，取上述溶液4 μL加入996 μL无Rnase水中，在紫外分光光度计上测定A_{260}和A_{280}的值. A_{260}/A_{280}在1.8以上说明RNA纯度符合要求. 吸10 μL (0.4 g/L) RNA样品10 g/L琼脂糖凝胶，160 V电压电泳15 min，于凝胶成像仪上，拍照. 以提取的RNA为模板进行逆转录和PCR反应. 设计引物如下，并由上海生物工程有限公司合成. AFP基因引物，特异性扩增片段428 bp. 上游引物: 5'-AAATGCGTTTCTCGTTGC-3'; 下游引物: 5'-CAGCCTCAAGTTGTTCCTCT-3'; ALB基因引物，特异性扩增片段162 bp. 上游引物: 5'-TGCTTGAATGTGCTGATGACAGGG-3'; 下游引物: 5'-AAGGCAAGTCAGCAGGCATCTCATC-3'; CK19基因引物，特异性扩增片段328 bp. 上游引物: 5'-ATGGCCGAGCAGAACCGGAA-3'; 下游引物: 5'-CCATGAGCCGCTGGTACTCC-3'. CK18基因引物，特异性扩增片段361 bp. 上游引物: 5'-GAACCACGAAGAGGAAGTAAA-3'; 下游引物: 5'-CATCTGTAGGGCGTAGCG-3'; CYP2B6基因引物，特异性扩增片段276 bp. 上游引物: 5'-GATCACACCATATCCCCGGA-3'; 下游引物: 5'-CACCCTACCACCCATGACCG-3'; CYP1B1基因引物，特异性扩增片段357 bp. 上游引物: 5'-GAGAACGTACCGGCCACTATCACT-3'; 下游引物: 5'-GTTAGGCCACTTCAGTGGGTCATGAT-3'; 逆转录 在0.5 mL EP管内依次加入DEPC处理过的去离子水3 μL; RNA模板5 μL (2 μg); Oligo dT (100 mg/L) 1 μL; 70 ℃ 5 min，以使模板变性，冰上冷却5 min，再加入5 ×缓冲液5 μL; dNTPs (2.5 mmoL/L) 2 μL; RNA酶抑制剂(40 MU/L) 1.5 μL; M-MLV反转录酶(10 MU/L) 3 μL; DEPC处理过的去离子水将总体积补至25 μL，42 ℃温浴60 min，逆转录. 完成后，70 ℃加热5 min，以灭活反转录酶. 以逆转录完成后的产物cDNA为模板进行PCR. 扩增反应体系: 10 ×缓冲液(含25 moL/L $MgCl_2$) 2.5 μL; dNTP (2.5 moL/L) 2 μL; TaqDNA聚合酶(2MU/L) 0.5 μL; 消毒ddH_2O 10 μL; cDNA模板2 μL; 上游引物4 μL; 下游引物4 μL; 总反应体系25 μL. 扩增步骤: ALB，CYP1B1，CK18，CK19基因扩增反应条件为: 95 ℃ 4 min，95 ℃ 40 s→62.5 ℃ 30 s→72 ℃ 40 s 13个循环(每循环1次退火温度下降0.5 ℃)，95 ℃ 40 s→56 ℃ 30 s→72 ℃ 40 s，30个循环，72 ℃延伸5 min，4 ℃ 5 min. AFP基因扩增反应条件为: 95 ℃ 4 min，95 ℃ 40 s→59 ℃ 30 s→72 ℃ 40 s，13个循环(每循环1次退火温度下降0.5 ℃)，95 ℃ 40 s→54 ℃ 30 s→72 ℃ 40 s，30个循环，72 ℃延伸5 min，4 ℃ 5 min. 同时扩增看家基因GAPDH作为各泳道总RNA上样量相同的参照，扩出的片段长度应为520 bp. 扩增反应条件为: 95 ℃ 4 min，95 ℃ 40 s→62.5 ℃ 30 s→72 ℃ 40 s，13个循环(每循环1次退火温度下降0.5 ℃)，95 ℃ 40 s→56 ℃ 30 s→72 ℃ 40 s，

30个循环，72 ℃延伸5 min，4 ℃ 5 min. 上游引物: 5'-GTCAACGGATTTGGTCTGTATT-3'; 下游引物: 5'-AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3'. PCR产物的凝胶成像分析: 取5 μL扩增液加1 μL溴酚蓝于20 g/L琼脂糖凝胶电泳，并加小分子量标记，电压50 V，电泳40 min，取下凝胶紫外线下观察结果，并在凝胶成像仪上电脑拍照. Western blot检测诱导细胞肝细胞标志蛋白表达: 细胞总蛋白的提取按Roche公司试剂盒(Tripure分离试剂)说明书进行. 采用Bradford法(F. 奥斯伯)[15]测定蛋白质含量. 将所提蛋白质进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、电转移、免疫印迹后凝胶成像仪上摄像.

2 结果

2.1 诱导细胞中肝细胞标志的表达 未诱导培养的MMSCs中，免疫组织化学方法检测有较少的细胞表达AFP，未见其他肝脏特有的转录因子或者胞质标志. 诱导培养的MMSCs在4 d后表达GATA4和较低水平的CK19，AFP阳性细胞比例达到最高，同时非常稀少的细胞呈HNF1α，ALB，或者CK18染色阳性. 在7 d时，大的上皮细胞出现HNF1α染色阳性，同时ALB和CK18染色强度增加. 只有非常少的细胞表达AFP. MMSCs在诱导培养14，21，28 d后，大的上皮细胞GATA4，HNF1α，GST-π，CK18和ALB染色阳性，而AFP或者CK19染色阴性(表1，图1).

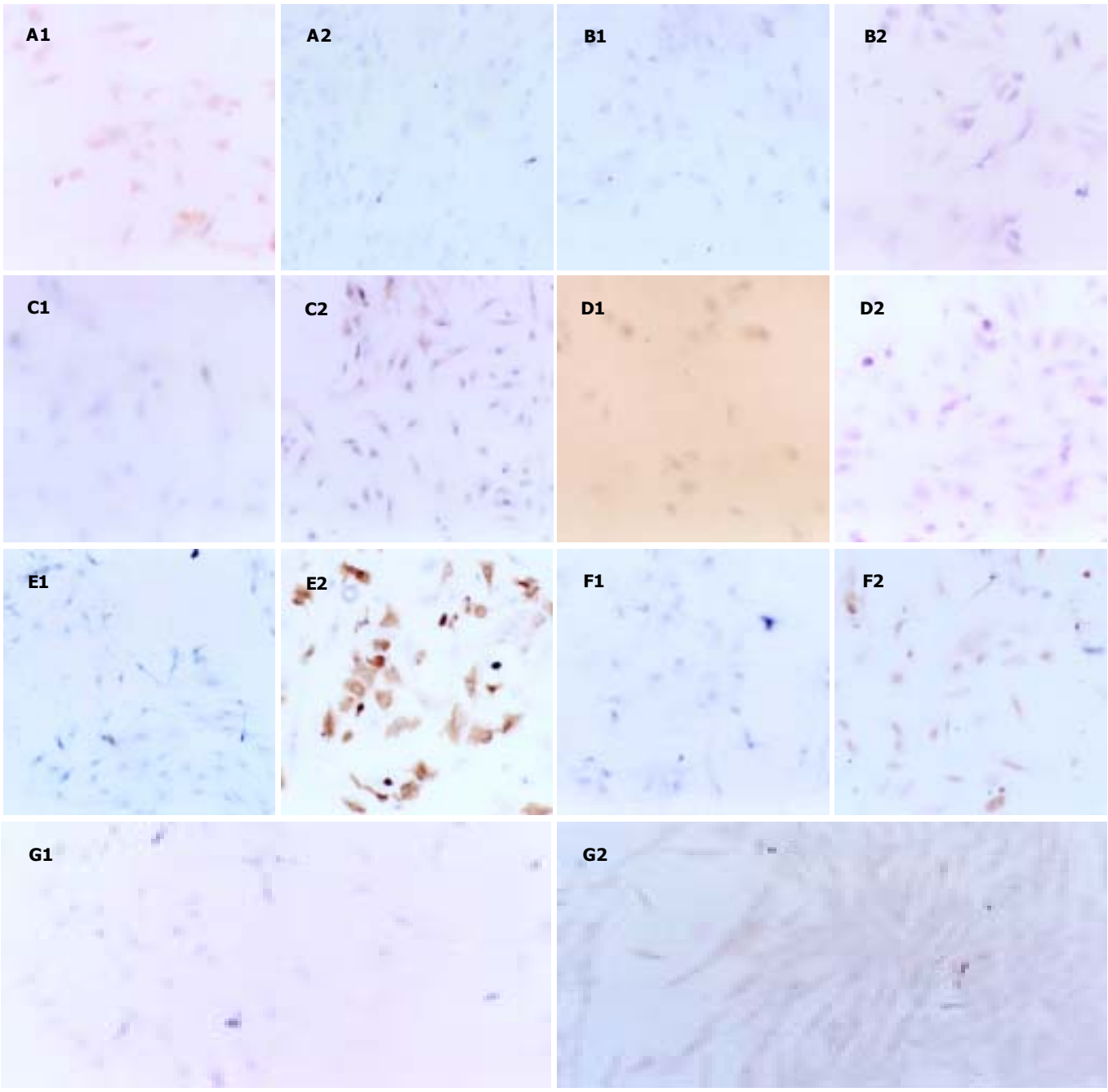

图1 诱导及未诱导细胞中肝细胞标志表达 SP × 100. A1: 未诱导细胞胞质AFP阳性; A2:诱导21 d细胞未见AFP阳性; B1: 未诱导细胞未见CK19阳性 B2: 诱导14 d细胞胞质阳性; C1: 未诱导细胞未见GATA4阳性; C2: 诱导21 d细胞胞核阳性; D1: 未诱导细胞未见ALB阳性; D2: 诱导14 d细胞胞质阳性; E1: 未诱导细胞未见CK18阳性; E2: 诱导14 d细胞胞质阳性; F1: 未诱导细胞未见HNF1α阳性; F2: 诱导14 d细胞胞核阳性; G1: 未诱导细胞未见GST-π阳性; G2: 诱导7 d细胞胞质阳性.

表1 MMSCs 细胞免疫组化结果(n =5)

标志	未诱导 MMSCs	t(诱导的 MMSCs)/d					胎肝细胞
		4	7	14	21	28	
AFP	+	+++	+	−	−	NT	++
CK19	−	±	+	−	−	NT	+
GATA4	−	±	+	++	+++	+++++	+
ALB	−	稀少±	++	+++	++++	+++++	+++++
CK18	−	稀少±	+++	++++	++++	+++++	+++++
HNF1α	−	稀少±	−	±	+	+	NT
GST−π	−	稀少±	±	+	++	+++	++

2.2 诱导细胞肝细胞标志蛋白基因的表达 RT−PCR 方法检测 A_{260}/A_{280} 比值在1.75−1.90之间; 经10 g/L琼脂糖凝胶电泳分析表现为3条的规则条带，无降解现象，说明RNA质量好，纯度高(图2). RT−PCR显示，未诱导的MMSCs仅可表达微弱的AFP mRNA，诱导早期可见AFP mRNA和CK19 mRNA表达，诱导后期未见扩增，而ALB mRNA，CK18 mRNA，CYP1B1 mRNA早期和后期均可见表达(图3).

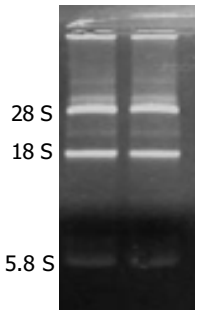

图2 Tripure 提取RNA 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳.

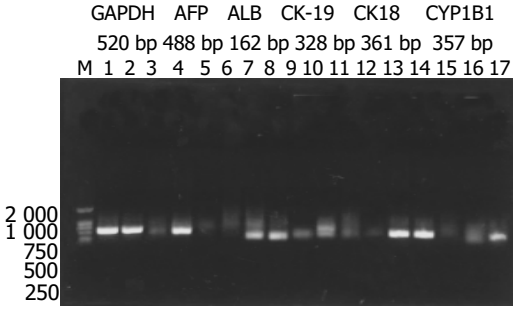

图3 RT−PCR 产物 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳. 1, 3, 6, 9, 12, 15 为未诱导MMSCs, 2, 4, 7, 10, 13, 16为诱导10 d; MMSCs, 5, 8, 11, 14, 17为诱导28 d MMSCs.

2.3 诱导细胞中AFP，ALB，CK18蛋白的表达 诱导细胞中Western blot方法检测AFP，ALB，CK18蛋白的表达趋势同基因表达类似. 在65 ku和68 ku处诱导细胞组可见AFP和ALB目的条带，在45 ku处诱导细胞组可见CK18目的条带. 未诱导的细胞和诱导早期细胞中AFP有表达，后期未见. 诱导早期和后期CK18、ALB均有表达，且后期增强(图4).

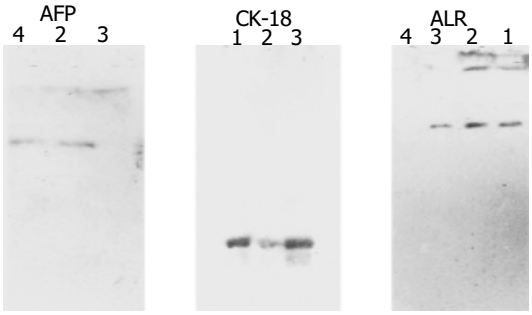

图4 Western blot 显示肝细胞标志表达. 1: 肝细胞; 2: 诱导10 d MMSCs; 3: 诱导28 d MMSCs; 4: 未诱导的MMSCs.

3 讨论

在添加FGF4和HGF的Matrigel上诱导培养MMSCs21−28 d时，通过免疫组织化学方法检测诱导细胞中肝细胞标志的表达发现未诱导培养的MMSCs中，有较少的细胞表达AFP，未见其他肝脏特有的转录因子或者胞质标志. 诱导培养的MMSCs在4 d后表达肝脏特有的转录因子GATA4和较低水平的胞质蛋白CK19，AFP阳性细胞比例达到最高，同时非常稀少的细胞呈现肝细胞分化中重要的转录因子HNF1α，胞质蛋白ALB，或者CK18染色阳性. 在7 d时，大的上皮细胞出现HNF1α染色阳性，同时ALB和CK18染色强度增加. 只有非常少的细胞表达AFP. MMSCs在诱导培养14，21和28d后，大的上皮细胞GATA4，HNF1α，GST−π，CK18和ALB染色阳性，而AFP或者CK19染色阴性. 用蛋白质印迹分析确认了AFP，CK18和ALB的免疫组化结果. RT−PCR确证了肝细胞分化中重要的胞质蛋白如CK19，CK18，AFP，ALB，CYP1B1. Schwartz *et al* [16]证明新生小鼠、大鼠和人骨髓来源的多潜能成人祖细胞(multipotent adult progenitor cells，MAPCs)能在体外分化为一种具有肝细胞表型和功能的内胚层细胞. 通过免疫荧光显微镜和三标细胞显示，MAPCs在肝细胞分化条件下培养后以时间依赖方式表达原始和成熟肝细胞标志. 蛋白表达轮廓是肝细胞特异性的而不是伪造的，因为非肝细胞标志不会与肝细胞抗原同时表达. 用蛋白质印迹分析确认了免疫组化结果. RT−PCR确证了在内胚层分化中重要的转录因子HNF−3β和GATA4; 肝细胞分

化中重要的转录因子如HNF1α，胞质蛋白如CK19，CK18，AFP，ALB等.

大量研究显示骨髓细胞或纯化的造血干细胞(haemopoietic stem cells，HSCs)均可在体内转化为肝细胞. 1999年Petersen *et al*[9]将Y染色质Sry标志的♂供体骨髓细胞，移植给经2-乙酰氨基芴和四氯化碳处理后的♀大鼠，或以二肽酶Ⅳ(dipeptidyl peptidase Ⅳ，DPPⅣ)为鉴定标志，将阳性的骨髓细胞移植给DPPⅣ缺损的受体大鼠，在其肝中可见供体来源的肝卵圆细胞和肝细胞. Theise *et al*[10]分别将♂小鼠骨髓细胞和纯化的CD34(+)lin(-)的HSCs移植入经致死剂量射线照射后的B6D2F1♀小鼠体内，在肝内均可找到Y染色体阳性供体细胞分化而来的肝细胞，新生肝脏中供体来源的细胞占2.2%. 同年Lagasse *et al*[7]也分别将骨髓细胞和纯化的HSCs通过静脉注入Ⅰ型酪氨酸血症延胡索酰乙酰乙酸水解酶(FAH)(-/-)小鼠体内，从而重建肝脏功能，并可见供体来源的肝细胞再生，在6 mo后供体来源的重建部分达到30%以上. 同年Theise *et al*[5]和Alison *et al*[11]在人体内进行了类似研究，给予男性骨髓细胞后可在女性患者肝内检测到Y染色体阳性的肝细胞，分析表明，他们是由捐赠骨髓中的HSCs发育而成，同样在男性患者移植入女性供体肝脏后，可在肝内检测到由自体HSCs发育来的Y染色体阳性肝细胞，同时也发现了供体来源的胆管细胞，其中1例由HSCs来源的肝细胞高达5-40%. Krause *et al*[8]移植纯化HSCs给小鼠后在肝脏胆管中还发现受体来源的上皮细胞.

现已从动物体内分离出骨髓细胞，在体外定向分化培养发育成肝细胞. Oh *et al*[12]分离成年大鼠骨髓细胞，在含表皮细胞生长因子(EGF)的无血清DF (DMEM/F12)培养基中培养，前5 d加入剂量达1 mg/L的肝细胞生长因子(HGF)诱导分化，共培养21 d后采用RT-PCR可检测到分化后的类肝细胞内AFP、ALB和HGF的受体c-Met的mRNA表达，组化染色亦可见到细胞内AFP、ALB、CK8和CK18的表达. 2 a后Miyazaki *et al*[13]改用优化后的更适于向肝细胞分化的HGM培养基代替Oh *et al*[12]采用的DF培养基培养Wistar大鼠骨髓细胞，再次诱导出类肝细胞，且分化程度较诱导的肝细胞更成熟，RT-PCR监测到肝细胞分化终末阶段标志色氨酸-2，3-二氧合酶(tryptophan-2，3-dioxygenase)和酪氨酸氨基转移酶(tyrosineaminotransferase)的mRNA. 最近Yamazaki *et al*[14]改用5'-氮胞苷(AZA)刺激小鼠骨髓细胞12 h后再置于肝脏非实质细胞的滋养细胞层上培养，并以肝衰竭患者血清、制瘤素M、地塞米松、50 μg/L HGF刺激诱导，2 wk后对细胞进行组化染色和RT-PCR均显示类肝细胞集落中可见肝细胞ALB，CK8，CK18和CK19的表达. 将流产胎儿体内的MMSCs植入人为诱发病变的实验鼠肝脏内，发现干细胞在实验鼠体内生长为肝细胞，病鼠肝脏恢复正常功能[5]. MMSCs向类肝细胞的横向分化是先分化为肝前体细胞，表达肝细胞分化的早期标志GATA4、CK19和AFP，再分化为成熟肝细胞，表达肝细胞的晚期标志HNF1α，HNF-3β，CK18和ALB. MMSCs在诱导条件下可获得在复制及翻译各环节肝细胞标志阳性的类肝细胞.

4 参考文献

1 Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR, Flake AW. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 2000;6:1282-1286

2 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147

3 Mezey E, Chandross KJ. Bone marrow: a possible alternative source of cells in the adult nervous system. *Eur J Pharmacol* 2000;405:297-302

4 Fukuda K. Reprogramming of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *C R Biol* 2002;325:1027-1038

5 Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000;32:11-16

6 Ratajczak MZ, Kucia M, Reca R, Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia* 2004;18:29-40

7 Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000;6:1229-1234

8 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;105:369-377

9 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

10 Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000;31:235-240

11 Alison MR, Poulsom R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000;406:257

12 Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsuji T, Shima N, Higashio K, Namba M. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:500-504

13 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

14 Yamazaki S, Miki K, Hasegawa K, Sata M, Takayama T, Makuuchi M. Sera from liver failure patients and a demethylating agent stimulate transdifferentiation of murine bone marrow cells into hepatocytes in coculture with nonparenchymal liver cells. *J Hepatol* 2003;39:17-23

15 奥斯伯 F, 金斯顿 RE, 塞德曼 JG, 著. 颜子颖, 王海林. 译. 精编分子生物学实验指南. 第1版. 北京. 科学出版社, 1998:332-366

16 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