

脐血干细胞转化为肝细胞的研究进展

赵淑磊, 刘吉勇, 杨崇美

赵淑磊, 刘吉勇, 杨崇美, 山东大学山东省立医院消化科 山东省济南市 250021
山东省自然科学基金资助课题, No. Y2002C10
通讯作者: 刘吉勇, 250021, 山东省济南市, 山东省立医院消化科. wenzhu24@yahoo.com.cn
电话: 0531-86641972
收稿日期: 2006-06-08 接受日期: 2006-06-23

摘要

自进行第1例脐血干细胞移植以来, 各国科研机构相继开展对于脐血干细胞的研究, 脐血库也纷纷建立. 随着再生医学的发展, 众多国内外学者在尝试进行非肝源性细胞向肝细胞分化方面的研究, 并已经证实脐血干细胞在特定的微环境下可以在体内和体外转化为肝样细胞, 为脐血干细胞在肝脏疾病中的应用奠定了基础. 本文就脐血干细胞向肝细胞转化的最新研究进展作一综述.

关键词: 脐血; 干细胞; 肝细胞

赵淑磊, 刘吉勇, 杨崇美. 脐血干细胞转化为肝细胞的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(24):2425-2427
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2425.asp>

0 引言

干细胞具有特定的分化潜能, 表现为它具有全能性、多能性和专能性的特点. 近年来, 已经在几乎所有的组织中发现了干细胞的存在. 因此, 如果科学家能够控制干细胞的分裂过程, 从而诱导其向特定的功能细胞分化, 就能够制造出不同的细胞及器官, 用于细胞或器官移植. 目前, 胚胎干细胞以及各种成体干细胞(包括骨髓干细胞、脐血干细胞以及各种组织来源的干细胞)已经成功地在体外被分离、培养和鉴定. 然而胚胎干细胞虽具有全能性, 理论上可以向各个胚层分化, 但分离培养困难以及所存在的伦理学问题限制了他的发展; 骨髓干细胞及各组织来源干细胞都存在来源有限的缺点; 与之相比, 脐血干细胞来源广泛、对于供者无痛苦、易于接受, 且较骨髓干细胞更为“幼稚”, 从而使其具有更诱人的应用前景.

1 脐血干细胞转化为肝细胞的研究

1.1 体外 研究表明, 通过添加几种生长因子, 脐血干细胞可以被诱导分化成为有功能的肝样细胞, 并且表达肝细胞相关的标记. 目前常用于诱导分化的生长因子, 包括成纤维细胞生长因子(FGF)、干细胞因子(SCF)、白血病抑制因子(LIF)、表皮生长因子(EGF)、肝细胞生长因子(HGF)、制瘤素M(OSM)等, 其中以HGF最为重要. Kakinuma *et al*^[1]通过比较各种不同的生长因子组合对于脐血干细胞向肝细胞转化的影响, 发现在含有HGF, FGF-1, FGF-2, SCF, LIF的培养基内ALB mRNA的表达最强, 而缺乏HGF时则几乎检测不到ALB mRNA的表达; 有学者认为, HGF可能对于白蛋白的表达并不起到增强的作用, 但是缺少HGF时却不能诱导干细胞转化为有功能的肝细胞^[2-3], Wang *et al*^[4]证实在含有硬化的肝贮脂细胞(CFSC)和HGF的饲养层培养条件下可以诱导脐血来源的 $\beta_2m\text{-c-Met}^+$ 细胞表达肝细胞谱系标志(ALB, AFP, CK18, CK19等); McGuckin *et al*^[5]第一次报道了在通过免疫磁珠法分离去除粒细胞、红细胞及某些造血祖细胞后, 在与血小板生成素、flt3配基及c-Kit配基共同培养7 d后, 可以观察到类似胚体克隆的胚胎样干细胞成簇生长, 并检测到了胚胎干细胞特有的标志(如TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA-4, SSEA-3, Oct-4)的表达, 提示可以通过脐血干细胞诱导生成具有向各个胚层分化潜能的胚胎干细胞, 并且在处于含有HGF, bFGF, EGF, c-Kit配基的肝脏三维培养系统中培养4 wk后检测到肝样细胞的产生; Lee *et al*^[6]将分离于脐血的间充质干细胞(MSC)通过2步法分别诱导其分化和成熟, 可以产生有功能的肝细胞, 并表达肝细胞特征性的标记, 认为HGF和OSM分别能够促进MSC向肝细胞的转化以及肝细胞自身的成熟; 另外还有关于联合应用FGF4和HGF成功诱导脐血MSC定向分化为肝细胞的报道^[7-8].

1.2 体内 脐血干细胞向肝细胞的转化最早是在动物实验中得到证实, 研究者通过将干细胞注入急性肝损伤小鼠体内, 数日后可以在小鼠肝

■背景资料

随着社会经济和科学技术的发展, 许多疑难病症都已经找到了有效的治疗方法, 尤其是预防疫苗和强力抗生素的应用, 严重威胁人类健康的烈性传染性疾病已经得到了有效的控制和消除. 但许多疾病, 如肝硬化、恶性肿瘤、糖尿病、帕金森氏病、心脑血管病等临床上仍然没有理想的治疗措施. 最近几年, 干细胞技术的发展为这些难治性疾病的彻底治愈带来了新的希望.

■研发前沿

由于来源广泛、对供者无痛苦、免疫原性低, 对于脐血干细胞的研究越来越受到国内外学者的重视. 脐血干细胞在体内外向肝样细胞的成功转化也屡见报道, 但如何将其应用于临床尚存在难点.

■相关报道

已经发现多种生长因子可以在体外诱导脐血干细胞向肝细胞分化,并证实将脐血干细胞移植到NON-SCID鼠体内可以检测到肝细胞标记的表达。

组织切片中检测到肝细胞谱系的标记,表明肝组织损伤可能是激活干细胞增殖和分化的前提;但有文章提出在没有肝损伤的动物体内移植脐血干细胞后,也可以实现这种转化^[9-11]。(1)肝损伤动物模型的建立:非肥胖型糖尿病合并免疫缺陷(NON-SCID)小鼠是一种经改造后的重度复合免疫缺损小鼠,他不会排斥所移植的细胞,在连续7 d给NON-SCID鼠注射肝细胞增殖抑制剂2-乙酰氨基苄(2-AAF)后进行部分肝切除术,从而建立肝损伤模型^[1],然后通过门静脉进行脐血干细胞移植;其他的肝损伤模型包括四氯化碳肝损伤模型、乙醇肝损伤模型以及放射性肝损伤模型等;另外在Fas介导的肝损伤模型输入脐血后也可以检测到肝细胞谱系标记^[12]。(2)脐血干细胞移植:Kakinuma *et al*^[11]通过将脐血单个核细胞移植入肝损伤小鼠体内,在4-55 wk均检测到了肝细胞相关基因的表达,并在20 wk后可以通过FISH检测到小鼠肝脏组织切片中人X染色体着丝粒DNA的存在;Danet *et al*^[13]分离于脐血单个核细胞的C1qRp⁺干细胞在受体鼠内同样也可以实现这种转化,推测C1qRp⁺干细胞可能是一种同时具有分化为造血细胞和肝细胞潜能的新型干细胞,他在CD34⁺和CD34⁻细胞都有表达;Nonome *et al*^[12]将CD34⁺和CD34⁻细胞植入Fas介导的肝损伤小鼠模型体内,均检测到了肝细胞标记的表达,且两者没有显著性的差异;Kollet *et al*^[14]以及Son *et al*^[15]通过体内外研究认为SDF-1-CXCR4轴、HGF-c-Met轴以及MMP可能在脐血干细胞向受损肝组织的浓集中起重要作用。

2 脐血干细胞向肝细胞转化的标记

为了证实脐血干细胞能够转化为肝细胞,我们必须明确转化成功后的检测标记。例如通过RT-PCR可以检测到ALB, AFP, CK18, CK19, HGF, TAT, GS, CPS, HNF4, GAPDH, PEPCK等肝细胞特有蛋白或酶mRNA的表达,利用免疫组化、免疫荧光染色、Western印记等方法检测肝细胞胞质内AFP, ALB, CK18, CK19等特异性蛋白的存在;基于转化中基因表达的阶段性,我们把这些肝细胞谱系标志划分为两组^[16]:ALB, AFP, CK18, CK19, GS属于早期肝细胞标记,而TAT, HGF, PEPCK, CPS等则归为晚期肝细胞标记,细胞在不同的分化及成熟阶段可以检测到不同的肝细胞标记的表达;同时还需要检测反映成熟肝细胞功能的指标,包括肝细胞分泌尿素及摄取LDL的能力、苯巴比妥诱导肝细胞色素P450

的活性、PAS染色鉴定糖原贮存功能等。此外,在转化过程中干细胞也会发生相应的形态学改变。

3 脐血干细胞向肝细胞转化的机制

虽然在体内和体外均有转化成功的报道,但是究竟是脐血中哪种干细胞通过何种方式转化为肝细胞还不是十分明确。

3.1 转化的干细胞类型 脐血中含有包括造血干细胞(HSC)、间充质干细胞(MSC)和多能祖细胞(MAPC)等在内的多种类型的干细胞,但在诱导分化中究竟是哪一种干细胞实现了转化尚存在分歧。Ishikawa *et al*^[17]将分离的CD34⁺或CD45⁺细胞移植到NON-SCID鼠体内,通过免疫组化证实人白蛋白的表达,受体鼠骨髓内人CD45⁺细胞占21.0%-45.9%;Danet *et al*^[13]则报道源于脐血的C1qRp⁺干细胞可以在受体鼠内转化为肝细胞;而脐血来源的β₂m⁺c-Met⁺细胞在体外一定条件下也能实现这种转化^[4]。总之,HSC和一些源于HSC的成体祖细胞可能对于这种分子重构起着重要的作用。2000年,Erices *et al*^[18]将分离的脐血单个核细胞在体外培养获得MSC以来,他的地位越来越受到重视,很多研究小组已通过各种不同的方法在体外成功诱导脐血MSC向肝细胞转化^[6-8,16]。

3.2 转化的方式 在关于干细胞通过与已存在的分化细胞自发性地融合产生肝样细胞的报道^[19-20]后,成体干细胞的可塑性一度受到质疑。但Jang *et al*^[21]将造血干细胞与受损伤的肝组织共同培养,并在两者之间隔以0.4 μm尼龙膜,仍然检测到了干细胞向肝细胞转化的证据,认为造血干细胞可以在没有融合的前提下数日内转化为肝细胞。另外,一些研究显示,通过FISH分析可以检测到受体鼠肝组织人着丝粒DNA的存在,从而排除了在转化中自发性细胞融合的可能^[1]。尽管对于是融合还是转化促成这种改变还存在争议,但是从临床的观点出发,最重要的一点就是产生了有功能的肝细胞,并使受损的肝组织得到了恢复。

目前,我国乙肝携带者超过1亿,每年死于终末期肝病的人数大于30万。异基因肝移植仍被认为是治疗终末期肝病的最佳手段,但由于供体有限、移植后GVHD发生率高、需长期服用抗排异药物及费用昂贵,其应用受到了很大的限制,迫切需要一种替代疗法。因此,脐血干细胞向肝细胞转化的研究倍受重视,但其诱导

■应用要点

对于难以逆转的慢性肝病和终末期肝衰竭,肝移植或肝细胞移植是最理想的治疗途径,但两者都存在肝源有限的缺点。如果能够在体外诱导脐血干细胞转化为肝细胞,并用他来替代坏死或损伤的肝组织,将为肝病患者的带来希望。

分化机制以及促转化因子等尚存在难点. 一旦问题得到解决, 利用脐血干细胞作为肝细胞移植的来源治疗终末期肝病将成为一种新的治疗肝功能衰竭的手段, 不但能够替换坏死和损伤的肝细胞, 而且还有利于患者造血功能及免疫功能的改善. 如果我们能够冷藏保存新分离的脐血干细胞, 并在体外大规模地诱导其转化为肝细胞以作为肝细胞移植的来源, 就能够最终解决异基因肝移植存在的供体短缺和伦理学问题, 将对终末期肝病的治疗引入一个新的境界.

4 参考文献

- 1 Kakinuma S, Tanaka Y, Chinzei R, Watanabe M, Shimizu-Saito K, Hara Y, Teramoto K, Arii S, Sato C, Takase K, Yasumizu T, Teraoka H. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells* 2003; 21: 217-227
- 2 Chinzei R, Tanaka Y, Shimizu-Saito K, Hara Y, Kakinuma S, Watanabe M, Teramoto K, Arii S, Takase K, Sato C, Terada N, Teraoka H. Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. *Hepatology* 2002; 36: 22-29
- 3 Kania G, Blyszczuk P, Jochheim A, Ott M, Wobus AM. Generation of glycogen- and albumin-producing hepatocyte-like cells from embryonic stem cells. *Biol Chem* 2004; 385: 943-953
- 4 Wang Y, Nan X, Li Y, Zhang R, Yue W, Yan F, Pei X. Induction of umbilical cord blood-derived beta2m-c-Met+ cells into hepatocyte-like cells by coculture with CFSC/HGF cells. *Liver Transpl* 2005; 11: 635-643
- 5 McGuckin CP, Forraz N, Baradez MO, Navran S, Zhao J, Urban R, Tilton R, Denner L. Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell Prolif* 2005; 38: 245-255
- 6 Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004; 40: 1275-1284
- 7 孙艳, 段芳龄, 陈香宇, 孙嫣, 李玉龙, 曾艳丽, 王豪勋. 体外诱导人脐血间充质干细胞向肝细胞样细胞分化的研究. *胃肠病学和肝病学杂志* 2004; 13: 239-243
- 8 Kang XQ, Zang WJ, Bao LJ, Li DL, Song TS, Xu XL, Yu XJ. Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7461-7465
- 9 Huang S, Yam H, Pang C, Chen M, Gong Z, Zeng F, Ling S, Zeng Y. The expression of human specific proteins in liver tissue of chimeric goats engrafted with human hematopoietic stem cells. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002; 82: 894-898
- 10 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
- 11 Almeida-Porada G, Porada CD, Chamberlain J, Torabi A, Zanjani ED. Formation of human hepatocytes by human hematopoietic stem cells in sheep. *Blood* 2004; 104: 2582-2590
- 12 Nonome K, Li XK, Takahara T, Kitazawa Y, Funeshima N, Yata Y, Xue F, Kanayama M, Shinno E, Kuwae C, Saito S, Watanabe A, Sugiyama T. Human umbilical cord blood-derived cells differentiate into hepatocyte-like cells in the Fas-mediated liver injury model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G1091-1099
- 13 Danet GH, Luongo JL, Butler G, Lu MM, Tenner AJ, Simon MC, Bonnet DA. ClqRp defines a new human stem cell population with hematopoietic and hepatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 10441-10445
- 14 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
- 15 Son BR, Marquez-Curtis LA, Kucia M, Wysoczynski M, Turner AR, Ratajczak J, Ratajczak MZ, Janowska-Wieczorek A. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells* 2006; 24: 1254-1264
- 16 Hong SH, Gang EJ, Jeong JA, Ahn C, Hwang SH, Yang IH, Park HK, Han H, Kim H. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 1153-1161
- 17 Ishikawa F, Drake CJ, Yang S, Fleming P, Minamiguchi H, Visconti RP, Crosby CV, Argraves WS, Harada M, Key LL Jr, Livingston AG, Wingard JR, Ogawa M. Transplanted human cord blood cells give rise to hepatocytes in engrafted mice. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 996: 174-185
- 18 Erices AA, Allers CI, Conget PA, Rojas CV, MingueLL JJ. Human cord blood-derived mesenchymal stem cells home and survive in the marrow of immunodeficient mice after systemic infusion. *Cell Transplant* 2003; 12: 555-561
- 19 Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003; 422: 897-901
- 20 Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003; 422: 901-904
- 21 Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 532-539

■同行评价

本文综述了脐血干细胞向肝细胞分化的研究进展, 对同行有一定参考意义, 对脐血干细胞移植治疗肝病有启示作用.

电编 张敏 编辑 潘伯荣