

骨髓基质干细胞向肝细胞的定向分化及体内移植

郭菲菲, 刘晓萍, 高胜利, 冯智慧

■背景资料

骨髓基质干细胞(BMSCs)是骨髓内的一种非造血干细胞, 他既有自我复制和高度增殖的能力, 又有多向分化的潜能。利用BMSCs的可获得性、可扩增性及可多向分化性, 可将BMSCs应用于细胞替代及组织器官再造等治疗方法, 具有重要的理论研究和临床价值。

郭菲菲, 青岛大学医学院病理生理学教研室 山东省青岛市 266021

刘晓萍, 冯智慧, 青岛大学医学院组织学与胚胎学教研室 山东省青岛市 266021

高胜利, 青岛大学医学院医学研究生教育管理办公室 山东省青岛市 266021

郭菲菲, 2002年青岛大学医学院硕士, 助教, 主要从事干细胞的研究。

通讯作者: 刘晓萍, 266021, 山东省青岛市登州路38号, 青岛大学医学院组织学与胚胎学教研室: xpliu572001@yahoo.com.cn 电话: 0532-82991708

收稿日期: 2006-10-26 接受日期: 2006-11-28

Differentiation into hepatocytes and transplantation of bone marrow stromal stem cells

Fei-Fei Guo, Xiao-Ping Liu, Sheng-Li Gao, Zhi-Hui Feng

Fei-Fei Guo, Department of Pathophysiology, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong Province, China

Xiao-Ping Liu, Zhi-Hui Feng, Department of Histology and Embryology, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong Province, China

Sheng-Li Gao, Office of Postgraduate Administration, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong Province, China

Correspondence to: Xiao-Ping Liu, Department of Histology and Embryology, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong Province, China. xpliu572001@yahoo.com.cn

Received: 2006-10-26 Accepted: 2006-11-28

Abstract

AIM: To investigate the differentiation of bone marrow stromal stem cells (BMSCs) into hepatocytes *in vitro* and the reparation of liver cells after BMSCs transplantation in mice with liver injury.

METHODS: BMSCs were induced by hepatic extract fluid (HE) to differentiate into hepatocytes *in vitro*, which was identified by immunocytochemistry and Indocyanine green (ICG) staining. The BrdU-labeled BMSCs were transplanted into the mice through caudal vein, and then the their distributions were detected by immunohistochemistry. The concentration changes of aspartate aminotransferase (AST, nkat/L), alanine

aminotransferase (ALT, nkat/L) and alkaline phosphatase (AKP, nkat/L) were observed by serum enzymology test on the 7th, 14th, 28th day after transplantation.

RESULTS: BMSCs were differentiated into hepatocytes under the induction of HE *in vitro*, but the expression levels of α 1-antitrypsin (4 d: 52.5 ± 3.9 vs 76.8 ± 4.5 , $P < 0.05$; 14 d: 60.3 ± 6.1 vs 85.4 ± 7.6 , $P < 0.05$; 21 d: 80.5 ± 8.0 vs 105.7 ± 8.6 , $P < 0.05$) and albumin (4 d: 43.2 ± 6.5 vs 71.6 ± 7.6 , $P < 0.05$; 14 d: 61.5 ± 10.4 vs 93.6 ± 13.9 , $P < 0.05$; 21 d: 80.6 ± 17.1 vs 128.3 ± 22.2 , $P < 0.05$) in the HE-induced cells were significantly higher than those in the hepatic growth factor-induced ones. It was found that the transplanted BMSCs slowly transferred from the portal area to liver parenchyma, and fused with liver cells. The serum concentration of ALT (7 d: 493.43 ± 120.02 vs 696.81 ± 140.03 , $P < 0.01$; 14 d: 558.45 ± 130.03 vs 780.16 ± 151.7 , $P < 0.01$; 28 d: 583.45 ± 138.36 vs 880.18 ± 170.53 , $P < 0.01$), AST (7 d: 1521.97 ± 186.7 vs 2342.14 ± 208.38 , $P < 0.01$; 14 d: 1590.32 ± 200.04 vs 2692.21 ± 238.38 , $P < 0.01$; 28 d: 1625.33 ± 208.38 vs 2872.24 ± 281.72 , $P < 0.01$) and AKP (7 d: 1.24 ± 0.22 vs 1.78 ± 0.18 , $P < 0.01$; 14 d: 1.21 ± 0.21 vs 2.00 ± 0.19 , $P < 0.01$; 28 d: 1.32 ± 0.19 vs 2.27 ± 0.20 , $P < 0.01$) were lower in the transplanted group than those in liver-injury group, but still higher than those in the normal controls.

CONCLUSION: BMSCs can differentiate into hepatocytes under the induction of HE *in vitro*, and the transplantation of BMSCs can be helpful in the repair of injured liver in mice.

Key Words: Bone marrow stromal stem cell; Hepatocyte; Differentiation; Transplantation

Guo FF, Liu XP, Gao SL, Feng ZH. Differentiation into hepatocytes and transplantation of bone marrow stromal stem cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(5):464-470

摘要

目的: 研究骨髓基质干细胞(BMSCs)在体外向肝细胞的定向分化和体内移植后对小鼠受损肝脏的修复作用。

方法: 在体外培养体系中用肝细胞提取液(HE)模拟体内肝脏微环境, 诱导BMSCs向肝细胞定向分化, 以免疫细胞化学和吲哚靛青绿(ICG)染色检测其分化程度. 将5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)标记的BMSCs移植入小鼠体内, 免疫组织化学方法显示BMSCs在肝脏的分布, 血清酶学检测肝脏受损小鼠移植后7, 14, 28 d谷草转氨酶(AST, U/L)、谷丙转氨酶(ALT, U/L)和碱性磷酸酶(AKP, U/L)的含量变化.

结果: 在体外BMSCs可由HE诱导分化成肝细胞, 但HE诱导组 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶(4 d: 52.5 ± 3.9 vs 76.8 ± 4.5 , $P < 0.05$; 14 d: 60.3 ± 6.1 vs 85.4 ± 7.6 , $P < 0.05$; 21 d: 80.5 ± 8.0 vs 105.7 ± 8.6 , $P < 0.05$)和白蛋白(4 d: 43.2 ± 6.5 vs 71.6 ± 7.6 , $P < 0.05$; 14 d: 61.5 ± 10.4 vs 93.6 ± 13.9 , $P < 0.05$; 21 d: 80.6 ± 17.1 vs 128.3 ± 22.2 , $P < 0.05$)表达量少于HGF诱导组; 体内移植后BMSCs整合于肝实质内; 肝脏受损小鼠移植BMSCs后, 血清中ALT (7 d: 493.43 ± 120.02 vs 696.81 ± 140.03 , $P < 0.01$; 14 d: 558.45 ± 130.03 vs 780.16 ± 151.7 , $P < 0.01$; 28 d: 583.45 ± 138.36 vs 880.18 ± 170.53 , $P < 0.01$)、AST (7 d: 1521.97 ± 186.7 vs 2342.14 ± 208.38 , $P < 0.01$; 14 d: 1590.32 ± 200.04 vs 2692.21 ± 238.38 , $P < 0.01$; 28 d: 1625.33 ± 208.38 vs 2872.24 ± 281.72 , $P < 0.01$)和AKP(7 d: 1.24 ± 0.22 vs 1.78 ± 0.18 , $P < 0.01$; 14 d: 1.21 ± 0.21 vs 2 ± 0.19 , $P < 0.01$; 28 d: 1.32 ± 0.19 vs 2.27 ± 0.2 , $P < 0.01$)比损伤组小鼠相应值均有下降, 但仍高于正常对照组.

结论: BMSCs在体外可由HE诱导分化成肝细胞, 在体内移植后可促进小鼠受损肝脏的修复.

关键词: 骨髓基质干细胞; 肝细胞; 分化; 移植

郭菲菲, 刘晓萍, 高胜利, 冯智慧. 骨髓基质干细胞向肝细胞的定向分化及体内移植. 世界华人消化杂志 2007;15(5):464-470
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/464.asp>

0 引言

骨髓基质干细胞(bone marrow stromal stem cells, BMSCs)是骨髓内的一种非造血干细胞^[1], 他既有自我复制和高度增殖的能力, 又有多向分化的潜能^[2-4]. 利用BMSCs的可获得性、可扩增性及可多向分化性, 可将BMSCs应用于细胞替代及组织器官再造等治疗方法, 具有重要的理论研究和临床应用价值. 现已有大量研

究证实, 在体外培养条件下BMSCs可由HGF等细胞因子诱导向肝细胞分化, 并可释放多种肝细胞因子^[5], 但体内移植后BMSCs对受损肝脏是否有修复作用则鲜见报道. 本实验从小鼠骨髓中分离BMSCs细胞, 以肝细胞提取液(HE)模拟体内微环境, 体外诱导BMSCs向肝细胞分化; 然后将标记的BMSCs通过尾静脉移植入肝脏损伤小鼠体内, 检测BMSCs移植后在肝实质内的分布, 并检测移植后小鼠肝脏损伤修复程度. 以期摸索一种慢性肝脏损伤治疗的新途径, 为临床上应用BMSCs细胞移植治疗慢性肝脏疾病提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 DMEM-LG培养液(Gibco公司); 100 mL/L新生牛血清(奥地利PAA); 肝细胞生长因子(HGF, Sigma公司); AAT抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司); ALB抗体(丹麦Dako公司); ICG(吲哚靛青绿, Sigma公司); BrdU(Sigma公司).

1.2 方法 健康昆明种小鼠(δ , 体质量18-22 g)脊椎脱臼处死, 无菌条件下取股骨和胫骨. 用含100 mL/L新生牛血清的DMEM-LG培养液冲洗骨髓腔. 将收获的骨髓反复吹打成为细胞悬液, 离心后重新悬浮, 调整密度为 1×10^{10} 个/L, 放至37℃、50 mL/L CO₂、饱和湿度的CO₂培养箱中培养. 于24, 72 h换液, 以去除未贴壁的造血细胞, 之后每3 d换液一次. 培养至12-14 d时, 当细胞汇合80%时, 加入2.5 g/L胰蛋白酶和1 mmol/L EDTA混合消化液0.1 mL/cm², 消化1-2 min. 离心弃上清后重新悬浮, 以1:2比例接种, 此为第一代细胞. 在首次传代细胞汇合之前即再行传代.

1.2.1 体外诱导小鼠BMSCs向肝细胞分化 取新生小鼠肝脏, 称质量后加入D-hanks液匀浆, 调整浓度为1 g/L. 将此溶液4℃下5000 r/min离心20 min, 取其上清液, 过滤除菌制备肝细胞提取液(HE). 将培养第二代的BMSCs按 2×10^8 /L密度接种于预先置有小盖玻片的6孔板中, 分3组进行诱导实验, 未诱导组: 不加任何诱导剂; 肝细胞生长因子: 50 μ g/L; 肝细胞提取液(HE): 500 mg/L. 每组均3 d换液一次, 诱导组需重新加入上述剂量的诱导剂. 用倒置显微镜观察诱导组和未诱导组细胞分布及形态改变.

分别于诱导的第4、14、21天从诱导组和对照组的各个孔中取出一张小盖玻片, 40 g/L多聚甲醛固定. 常规免疫细胞化学方法检测 $\alpha 1$ -抗

■ 研究前沿

现已有大量研究集中在体外培养条件下BMSCs向肝细胞的分化, 但体内移植后BMSCs对受损肝脏是否有修复作用则鲜见报道, 如何调控BMSCs向肝细胞分化及分化后在肝脏修复中的作用是现在研究的热点.

■相关报道

目前多篇实验报道已证实BMSCs在体外可转化为肝细胞,诱导分化方法主要有细胞因子诱导,共培养和转基因3种,其中最常用的是在培养液中添加细胞因子的方法。

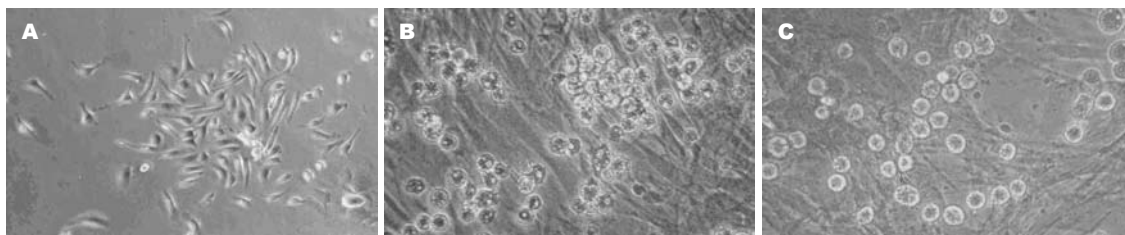


图1 体外诱导BMSCs向肝细胞分化的形态(10×20). A: 诱导前; B: HGF诱导21 d; C: HE诱导21 d.

表1 诱导后的骨髓基质干细胞AAT和ALB的表达(mean±SD, n=10)

	AAT(灰度值)			ALB(灰度值)		
	4 d	14 d	21 d	4 d	14 d	21 d
对照	33.8±5.1	37.4±7.5	43.2±9.1	13.6±3.4	18.2±4.5	23.9±7.4
HGF	76.8±4.5 ^b	85.4±7.6 ^b	105.7±8.6 ^b	71.6±7.6 ^b	93.6±13.9 ^b	128.3±22.2 ^b
HE	52.5±3.9 ^{ab}	60.3±6.1 ^{ab}	80.5±8.0 ^{ab}	43.2±6.5 ^{ab}	61.5±10.4 ^{ab}	80.6±17.1 ^{ab}

^aP<0.05 vs HGF组; ^bP<0.01 vs 对照组.

胰蛋白酶(AAT)的表达. 一抗为1:100兔抗AAT抗体, DAB显色, 中性树胶封片. 免疫细胞化学法检测白蛋白(ALB)的表达: 步骤同上, 一抗为1:200的ALB抗体. 采用MIAS-300型图像分析系统(pcvision85 plus, 美国)对AAT和ALB表达的免疫细胞化学结果进行灰度分析.

BMSCs诱导后ICG摄取检测: 诱导21 d后, 将非诱导组和两个诱导组的培养液吸弃, 加入ICG溶液, 37℃孵育30 min^[6]. 用PBS缓冲液轻洗3遍, 倒置显微镜下观察细胞颜色和分布.

1.2.2 小鼠体内注射BMSCs治疗慢性肝损伤 72只小鼠, 随机分为正常对照组(A组)、CCl₄损伤组(B组)和CCl₄损伤+BMSCs移植组(C组), 每组24只.

将CCl₄溶液按0.1 mL/kg给B组和C组小鼠腹腔注射, 每7 d注射2次, 共28 d^[7], 制备慢性肝损伤模型. 第二代BMSCs细胞培养3 d后, 在培养瓶中加入10 μL BrdU溶液(BrdU, 50 mg; 二甲基亚砜, 0.8 mL; 双蒸水, 1.2 mL)标记BMSCs 72 h. 慢性肝损伤模型制备完毕后, 将C组小鼠选其尾部左右两侧粗大静脉注入10⁵个BrdU标记的BMSCs, 在尾静脉注射后继续按原剂量腹腔注射CCl₄^[7].

免疫组织化学法检测受体肝脏内移植细胞的分布: 分别于尾静脉注射BMSCs 7, 14和28 d后取C组小鼠肝脏, 入40 g/L多聚甲醛固定24 h, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡包埋, 石蜡切片. 免疫组织化学法检测受体肝脏内移植细胞

的分布.

于BMSCs移植后7, 14和28 d将3组小鼠眼球摘除取血, 离心获得血清, 全自动生化仪检测谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)和碱性磷酸酶(AKP)的含量^[8-9].

统计学处理 数据资料以mean±SD表示并进行双因素方差分析, 以P<0.05为有统计学差异, P<0.01为有显著性差异. 应用统计软件SPSS 11.0分析数据.

2 结果

2.1 体外诱导BMSCs向肝细胞分化 体外培养的BMSCs细胞在HE或HGF诱导后形态逐渐发生变化: 贴壁细胞聚集成簇状分布, 细胞突起回缩, 细胞变圆, 并逐渐增多; 21 d后部分BMSCs呈肝细胞样圆形, 有的可见双核. 而无诱导组BMSCs大部分保持梭形, 带有长的胞质突起, 细胞核较大, 扁圆形, 呈成纤维细胞样形态(图1).

应用免疫细胞化学方法检测HGF或HE诱导后BMSCs细胞中AAT和ALB的表达量, 图2为免疫细胞化学法显示诱导14 d后AAT, ALB的表达情况. HGF或HE诱导组细胞在诱导4, 14和21 d后AAT和ALB在细胞中的表达量明显高于未诱导组, 差异有统计学意义(P<0.01); 并且HE诱导组与HGF诱导组的AAT和ALB表达量间存在统计学差异(P<0.05)(表1). 另外从表1中可见, 无论有无诱导剂3组细胞中AAT和ALB的表达量都表现出随时间而递增的趋势.

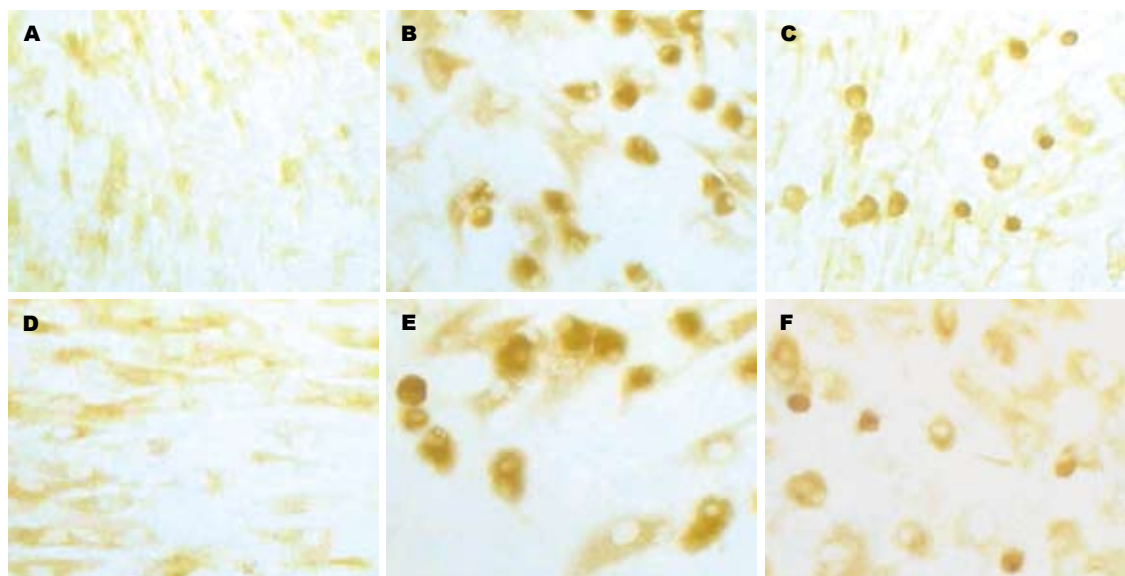


图 2 BMSCs诱导14 d后AAT, ALB的表达(10×20). A, B, C: AAT; A: 未诱导组; B: HGF诱导组; C: HE诱导组; D, E, F: ALB; A: 未诱导组; B: HGF诱导组; C: HE诱导组.

■创新盘点

目前, 关于干细胞转化为肝细胞的研究集中在对分化条件及分化机制的探索上, 本实验以肝细胞提取液(HE)为培养微环境, 体外诱导BMSCs向肝细胞分化; 并将BMSCs移植入小鼠体内, 检测移植后小鼠肝脏损伤修复程度, 为诱导干细胞向肝细胞分化以及人工肝研究提供了一个新的思路.

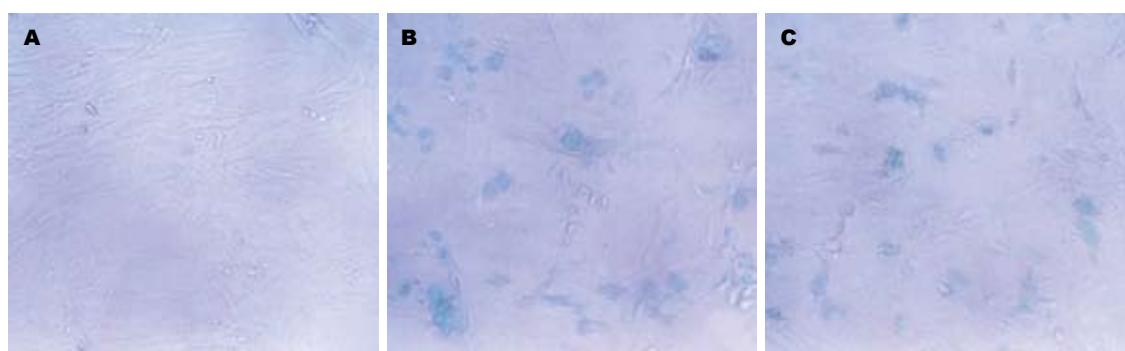


图 3 BMSCs细胞诱导14 d后ICG摄取(10×10). A: 未诱导组; B: HGF诱导组; C: HE诱导组.

诱导14 d后, 在整个视野中HE组约有20%的BMSCs细胞形态变成卵圆形, 并能摄取ICG, 在显微镜下观察呈现绿色(图3A); HGF组细胞约50%可摄取ICG, 并成簇状排列, 细胞形态也由卵圆形变为肝细胞样圆形(图3B); 而对照组细胞则不能摄取ICG(图3C).

2.2 小鼠体内注射BMSCs治疗慢性肝脏损伤 在BMSCs细胞经尾静脉移植一定天数后, 将肝脏损伤小鼠处死, 观察BrdU标记BMSCs细胞在肝脏内的分布: 7 d后在肝脏汇管区周围的肝实质内可见BMSCs细胞(图4A); 14 d后BMSCs细胞向肝实质内转移(图4B); 28 d后BMSCs细胞在肝脏内散在分布, 并与肝细胞紧密结合, 呈索状排列(图4C).

BMSCs细胞体内移植7, 14和28 d后分别检测3组小鼠的血清中ALT, AST和AKP的变化, 损伤组和损伤+BMSCs移植组ALT, AST和AKP值

明显高于正常对照组(两组均为: $P < 0.01$), 损伤+BMSCs移植组ALT, AST和AKP值与损伤组之间差异有显著统计学意义($P < 0.01$). 另外, 损伤组和损伤+BMSCs移植组ALT, AST和AKP值随损伤时间的延长逐渐增大(表2).

3 讨论

骨髓中存在两种干细胞: 造血干细胞和BMSCs, 有实验证实, BMSCs诱导后可向多种方向分化, 包括神经细胞、肝细胞、成骨细胞、脂肪细胞、胰岛细胞等, 这些分化过程需要多种不同的细胞因子参与诱导^[10-11]. Miyazaki *et al*^[12]采用不同浓度的HGF诱导BMSCs分化, BMSCs在用较高浓度的HGF诱导时分化比较低浓度时好, 细胞形成了类似成年大鼠肝细胞的结构; Oh *et al*^[13]及张刚庆 *et al*^[14]的研究也有同样的结果. 在单独或联合应用FGF, SCF, HGF和EGF的条件

■应用要点

本研究诱导BMSCs向肝细胞分化,为临床上应用干细胞的再生和分化治疗肝脏疾病提供有价值的实验依据。

表 2 ALT, AST和AKP在3组小鼠血清中的表达(mean \pm SD, $n = 10$)(nkat/L)

分组	ALT			AST			AKP		
	7 d	14 d	28 d	7 d	14 d	28 d	7 d	14 d	28 d
A	275.06 \pm	300.06 \pm	291.73 \pm	503.43 \pm	525.11 \pm	515.10 \pm	0.55 \pm	0.57 \pm	0.56 \pm
	106.69	101.69	98.35	130.03	135.03	133.36	0.12	0.13	0.13
B	696.81 \pm	780.16 \pm	880.18 \pm	2342.14 \pm	2692.21 \pm	2872.24 \pm	1.78 \pm	2.00 \pm	2.27 \pm
	140.03 ^b	151.70 ^b	170.53 ^b	208.38 ^b	238.38 ^b	281.72 ^b	0.18 ^b	0.19 ^b	0.20 ^b
C	493.43 \pm	558.45 \pm	583.45 \pm	1521.97 \pm	1590.32 \pm	1625.33 \pm	1.24 \pm	1.21 \pm	1.32 \pm
	120.02 ^{bd}	130.03 ^{bd}	138.36 ^{bd}	186.70 ^{bd}	200.04 ^{bd}	208.38 ^{bd}	0.22 ^{bd}	0.21 ^{bd}	0.19 ^{bd}

^b $P < 0.01$ vs 组B; ^d $P < 0.01$ vs 组A.

下,骨髓来源的多能干细胞可分化为肝细胞样细胞,并可以分泌白蛋白等肝细胞特异性物质^[15-17]。还有报道将BMSCs与肝细胞共同培养可诱导BMSCs分化成为肝细胞^[18-19], NGF也可成功诱导干细胞分化成为肝细胞^[20]。这就证明BMSCs分化并不是受单一因子的调控,而具体调控分化的机制目前还不明确。动物或人体内环境复杂,多种因素共同发挥作用维持体内稳态,所以体内不可能存在单纯一种或几种细胞因子发挥作用的环境。本实验脱离以前单独某种因子作用的模式,以肝细胞提取液(HE)模拟肝脏内微环境。HE是由新生小鼠肝脏匀浆离心后获得,包含了多种新生小鼠肝细胞成熟所需的细胞因子和肝细胞自身分泌的多种因子,既有促进肝细胞再生的因子,又有抑制肝细胞增生过度的因子,所以HE可很好的模拟新生小鼠肝脏内微环境,为下一步体内移植BMSCs打下良好的基础。

从光镜下观察HE, HGF诱导的BMSCs形态都发生了变化,即细胞贴壁伸出的长触角回缩,有由成纤维型逐渐变圆的趋势,部分BMSCs细胞形成胞质少、核呈卵圆形的小细胞,而对照组则无此变化。目前研究认为,卵圆细胞是一种肝前体细胞,具有分化为肝细胞和胆管上皮细胞的双向分化能力^[21-25]。为进一步鉴定这种分化细胞的性质,我们用免疫细胞化学染色和细胞摄取ICG验证。 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶(AAT)和白蛋白(ALB)是常用的肝细胞检测标志,在体内主要由成熟肝细胞分泌;能摄取ICG的细胞具有肝细胞特异性的标志如ALB, AFP, HNF3 β , LST-1等,可以推论ICG的摄取是肝细胞特异性的^[6,26]。HE诱导组与HGF诱导组在诱导后细胞形态变化、免疫细胞化学染色和ICG摄取实验结果均显示:HE诱导组细胞分化明显高于未诱导组而比HGF

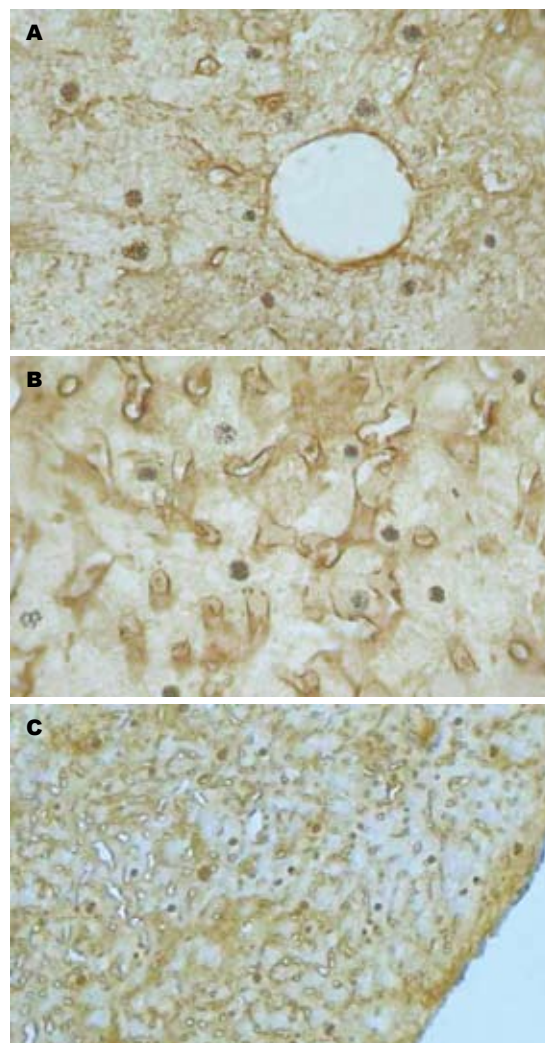


图 4 BMSCs体内移植后在肝脏内的分布。A: 7 d(10 \times 20); B: 14 d(10 \times 20); C: 28 d(10 \times 10)。

诱导组弱,这也很好的说明了HE作用的复杂性。随着体外培养时间的延长,未诱导组和诱导组免疫细胞化学反应都有AAT和ALB阳性细胞,并且表达逐渐增强,提示了在没有外源性细胞因子存在的条件下BMSCs细胞也可由原始干细胞分

化为肝细胞, 这可能与BMSCs细胞能够分泌多种细胞因子如TNF, HGF, GM-CSF, IL-6等^[27]有关。

Okumoto *et al*^[18], 张刚庆 *et al*^[19]分别将BMSCs与肝细胞共同培养, 观察到BMSCs细胞形态变成圆形, PCR和免疫细胞化学结果显示分化后细胞能够表达白蛋白、HNF1 α 、CK8、AFP及CK-18等肝细胞特异性蛋白。本实验采用肝细胞提取液作为诱导剂, 与将BMSCs和肝细胞共培养的方法类似, 都使其培养环境中含有多重因子, 可更好地模拟肝内微环境。两种实验比较发现, 分化后的细胞形态、数量和免疫细胞化学结果相似, 说明肝细胞提取液中诱导BMSCs分化的有效物质主要来之于肝细胞。上述共培养的实验研究未对分化后的BMSCs作功能性检测, 无法与本实验中BMSCs体内移植后的功能性研究作进一步的比较。

本实验中BrdU标记的BMSCs细胞经尾静脉注射入慢性肝脏损伤的小鼠体内后, 由汇管区向肝实质内扩散。在此过程中, BMSCs细胞不断分化成肝细胞, 并在肝脏微环境下与成熟的肝细胞紧密结合呈索状排列。Terada *et al*^[4]证实BMSCs细胞可以和其他种类的细胞发生自发性融合, 接受来自外源细胞的表型, 包括与胚胎干细胞, 脾细胞, 骨细胞等融合, 并表达其表型。本实验中BMSCs细胞进入肝脏也可能与肝细胞发生一定程度的融合, 从而可以在短期内发挥修复受损肝脏的作用; 同时还按原肝细胞的生长方式排列, 避免了细胞异常增生可能造成的胆管或血管的阻塞。

我们在肝脏受损小鼠体内移植BMSCs细胞后, 肝功能指标与未治疗组相比有明显好转, Takeda *et al*^[27]发现BMSCs可通过分泌细胞因子IL-6刺激肝细胞修复和再生, 由此推测可能是BMSCs细胞分泌的多种细胞因子发挥了促进受损肝脏功能恢复的作用, 这有待我们进一步通过实验进行研究。

BMSCs移植后在体内微环境、细胞生长因子、基质细胞、细胞外基质等多种因素的共同作用下, 不仅可以分化为肝细胞, 还有对受损肝细胞的修复功能^[28-29], 这为以后临床上治疗慢性肝损伤提供了一个新的选择。干细胞诱导后能否具有肝细胞完整的功能且无致癌性将是我们今后研究的重点。

4 参考文献

- Bonnet D. Biology of human bone marrow stem cells. *Clin Exp Med* 2003; 3: 140-149
- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001; 19: 180-192
- Mertelsmann R. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2000; 9: 957-960
- Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; 416: 542-545
- Wang PP, Wang JH, Yan ZP, Hu MY, Lau GK, Fan ST, Luk JM. Expression of hepatocyte-like phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320: 712-716
- Yamada T, Yoshikawa M, Kanda S, Kato Y, Nakajima Y, Ishizaka S, Tsunoda Y. In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. *Stem Cells* 2002; 20: 146-154
- Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, Omori K, Watanabe T, Ohata S, Katada T, Miyamoto K, Shinoda K, Nishina H, Okita K. An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem (Tokyo)* 2003; 134: 551-558
- Han KH, Hashimoto N, Shimada K, Sekikawa M, Noda T, Yamauchi H, Hashimoto M, Chiji H, Topping DL, Fukushima M. Hepatoprotective effects of purple potato extract against D-galactosamine-induced liver injury in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006; 70: 1432-1437
- He SX, Luo JY, Wang YP, Wang YL, Fu H, Xu JL, Zhao G, Liu EQ. Effects of extract from Ginkgo biloba on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3924-3928
- Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001; 226: 507-520
- Quintavalla J, Uziel-Fusi S, Yin J, Boehnlein E, Pastor G, Blancuzzi V, Singh HN, Kraus KH, O'Byrne E, Pellas TC. Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (MSCs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects. *Biomaterials* 2002; 23: 109-119
- 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
- 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
- 张刚庆, 方驰华, 池达智. 肝细胞生长因子诱导骨髓间充质干细胞向肝细胞分化的实验研究. *中华外科杂志* 2005; 43: 716-720
- Saji Y, Tamura S, Yoshida Y, Kiso S, Iizuka AS, Matsumoto H, Kawasaki T, Kamada Y, Matsuzawa Y, Shinomura Y. Basic fibroblast growth factor promotes the trans-differentiation of mouse bone marrow cells into hepatic lineage cells via multiple liver-enriched transcription factors. *J Hepatol* 2004;

■名词解释

骨髓基质干细胞(BMSCs): 是骨髓内的一种非造血干细胞, 它具有强大的增殖能力和多向分化潜能, 取材容易便于自体移植, 安全性高, 为肝脏疾病的细胞移植治疗提供了可利用的细胞库。

■同行评价

目前,国内外学者多采用HGF为主的多个细胞因子组合来进行诱导分化。本研究在上述基础上首先提出用新生小鼠肝细胞悬液做为诱导剂,成功的使骨髓基质干细胞向肝细胞样细胞定向分化,并具有一定的功能,且优于HGF诱导组。这是本文的新颖和独到之处,为诱导干细胞向肝细胞分化以及人工肝研究提供了一个新的思路。

- 41: 545-550
- 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
- 17 Lange C, Bassler P, Lioznov MV, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC. Hepatocytic gene expression in cultured rat mesenchymal stem cells. *Transplant Proc* 2005; 37: 276-279
- 18 Okumoto K, Saito T, Hattori E, Ito JI, Adachi T, Takeda T, Sugahara K, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S. Differentiation of bone marrow cells into cells that express liver-specific genes *in vitro*: implication of the Notch signals in differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 691-695
- 19 张刚庆, 方驰华, 池达智. 共同培养诱导骨髓基质干细胞向肝细胞分化的研究. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 648-651
- 20 蒯小玲, 从笑倩, 李秀兰, 萧树东. 小鼠胚胎干细胞诱导为肝细胞的研究. *胃肠病学* 2003; 8: 6-10
- 21 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
- 22 马俊勋, 方驰华. 卵圆细胞及其与原发性肝癌关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 448-451
- 23 王宇明, 陈耀凯. 肝干细胞的研究进展. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 337-342
- 24 万东君, 王春雨, 李六金. 肝干细胞研究现状. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 452-454
- 25 陈耀凯, 王宇明, 李俊刚, 郎松. 大鼠肝卵圆细胞的生物学特性. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 430-433
- 26 Faybik P, Hetz H. Plasma disappearance rate of indocyanine green in liver dysfunction. *Transplant Proc* 2006; 38: 801-802
- 27 Takeda M, Yamamoto M, Isoda K, Higashiyama S, Hirose M, Ohgushi H, Kawase M, Yagi K. Availability of bone marrow stromal cells in three-dimensional coculture with hepatocytes and transplantation into liver-damaged mice. *J Biosci Bioeng* 2005; 100: 77-81
- 28 Suzuki A, Iwama A, Miyashita H, Nakauchi H, Taniguchi H. Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development* 2003; 130: 2513-2524
- 29 Dumble ML, Croager EJ, Yeoh GC, Quail EA. Generation and characterization of p53 null transformed hepatic progenitor cells: oval cells give rise to hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2002; 23: 435-445

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会征文启事

本刊讯 为提高我国消化内镜诊疗技术的整体水平,《中华消化内镜杂志》编辑部拟于2007-08在新疆乌鲁木齐召开“全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会”,邀请消化和消化内镜专家作有关专题学术报告.会议将出论文汇编,并授予继续教育 I 类学分,《中华消化内镜杂志》将择优刊登应征论文.

1 征文内容

征文内容包括消化系统疾病的内镜(食管镜、胃镜、十二指肠镜、小肠镜、大肠镜、肠道镜、腹腔镜、超声内镜等)诊疗技术;内镜外科的临床应用及进展;食管、胃、肠、肝胆、胰腺疾病的基础研究、临床诊治及其进展(炎症、溃疡、出血、肿瘤、异物等);消化系统疾病的中医、中西医结合治疗及其进展;消化内镜消毒及护理技术,消化系统疾病的急诊护理.

2 征文要求

应征文章按《中华消化内镜杂志》稿约要求撰写打印,并寄3000字以内全文及500字以内的论文摘要各一份;已投《中华消化内镜杂志》尚未发表的稿件,请注明稿号.应征文章经单位推荐盖公章后,寄南京市紫竹林3号《中华消化内镜杂志》编辑部卜小乐、赵在文同志收.邮编:210003.信封左下脚注“征文”字样,同时汇寄审稿费10元.请自留底稿,恕不退稿.截稿日期2007-05-31.有关会议的具体事项另行通知.联系电话:025-83472831, 86086091.