

# 不同诱导条件对大鼠骨髓间充质干细胞体外诱导类肝细胞的影响

何文艳, 刘树贤, 姜慧卿

何文艳, 姜慧卿, 河北医科大学第二医院消化科 河北省石家庄市 050000  
何文艳, 中国石油中心医院感染科 河北省廊坊市 065000  
姜慧卿, 河北医科大学第二医院消化科 河北省石家庄市 050000  
何文艳, 硕士, 主治医师, 主要从事肝病及传染病研究。  
河北省卫生厅科研课题, No. 062761355  
作者贡献分布: 本论文由姜慧卿指导; 刘树贤设计; 何文艳操作完成并撰写论文; 姜慧卿、刘树贤审阅。  
通讯作者: 姜慧卿, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院消化科. huiqingjiang@yahoo.com.cn  
电话: 0311-66002955  
收稿日期: 2007-10-17 修回日期: 2008-01-15

## Effect of different induction conditions on hepatocyte-like cells induced *in vitro* by rat bone marrow mesenchymal stem cells

Wen-Yan He, Shu-Xian Liu, Hui-Qing Jiang

Wen-Yan He, Hui-Qing Jiang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China  
Shu-Xian Liu, Center of Liver Diseases, the First Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, Hebei Province, China  
Supported by: the Science Research Programs of Healthy Department of Henan Province, No. 062761355  
Correspondence to: Dr. Hui-Qing Jiang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, 215 Heping Western Road, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. huiqingjiang@yahoo.com.cn  
Received: 2007-10-17 Revised: 2008-01-15

## Abstract

**AIM:** To study the optimal conditions for *in vitro* induction and culture of rat bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in order to provide the theoretical basis for the treatment of severe liver disease patients with MSCs.

**METHODS:** MSCs were isolated by gradient density centrifugation and plastic adherence and purified. MSCs were induced by different concentrations of FBS and cytokines. Levels of AFP and albumin in the supernatant were measured by radioimmunoassay on days 15, 21 and 27. On day 27, cells were collected.

Glycogen store of hepatocytes was determined by periodic acid-Schiff staining and the expression of CK-18 and CK-19 in MSCs were detected by immunocytochemical analysis.

**RESULTS:** The level of AFP was higher in induced MSCs than in non-induced MSCs on days 15, 21, 27, and reached its highest on day 21. There was no significant difference in albumin levels on day 15, between induced and non-induced MSCs. However, on days 21 and 27, the albumin level was higher in induced MSCs than in non-induced MSCs. Glycogen storage in induced MSCs was observed on day 27 but not in non-induced MSCs. The induced MSCs expressed CK-18 and CK-19 while the non-induced MSCs did not. Multiple factor analysis by ANOVA showed that MSCs should be cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 200 mL/L FBS, 20 µg/L hepatocyte growth factor (HGF) and 20 µg/L fibroblast growth factor 4 (FGF-4), which might be the best induction conditions for MSCs.

**CONCLUSION:** Rat MSCs can differentiate into hepatocyte-like cells with hepatic phenotypes and functions in the presence HGF and/or FGF-4 *in vitro*. The concentrations of fetal bovine serum, HGF and FGF-4 affect the differentiation of rat MSCs into hepatocyte-like cells. MSCs can be used in the treatment of severe hepatic diseases.

**Key Words:** Bone marrow; Mesenchymal stem cells; Hepatocyte-like cells; Hepatocyte growth factor; Fibroblast growth factor 4

He WY, Liu SX, Jiang HQ. Effect of different induction conditions on hepatocyte-like cells induced *in vitro* by rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(5): 473-478

## 摘要

**目的:** 探讨实验性大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)体外培养、诱导的最优条件, 为MSCs治疗临床重症肝病患者提供参考依据。

## ■背景资料

肝细胞移植越来越受到重视, 寻找合适的肝细胞来源成为重要的研究课题。MSCs可以分化为肝细胞, 可以自体取材, 植入体内无免疫排斥反应, 体内外均有极强分化潜能。MSCs有望成为治疗重症肝病的种子细胞。

## ■同行评议者

秦波, 教授, 重庆医科大学附属第二医院感染病科

## ■研究前沿

MSCs在不同理化环境和细胞因子的诱导下可以分化为多种组织细胞,研究MSCs定向分化为类肝细胞的最佳诱导条件是目前的一个热点问题。

**方法:**采用密度梯度离心法和贴壁法分离大鼠MSCs,经培养传代获得纯化的MSCs。采用析因实验,设不同诱导时间、不同浓度的FBS、不同浓度的细胞因子为3个因素,每个因素设不同水平,对纯化的MSCs进行分组诱导培养。留取15、21、27 d细胞培养液进行白蛋白(Alb)、甲胎蛋白(AFP)检测;于27 d时收集细胞爬片,采用过碘酸希夫(PAS)实验进行糖原染色和免疫细胞化学染色检测MSCs中CK-18和CK-19。

**结果:**诱导15、21、27 d,各MSCs诱导组AFP水平均高于MSCs非诱导组( $P<0.01$ ),21 d诱导组AFP水平最高;15 d各MSCs诱导组与MSCs非诱导组白蛋白水平无统计学意义,21、27 d各MSCs诱导组白蛋白水平均高于MSCs非诱导组( $P<0.01$ ),27 d诱导组白蛋白水平最高。27 d各MSCs诱导组糖原染色阳性,免疫细胞化学染色CK-18、CK-19均阳性,而MSCs非诱导组糖原染色、CK-18、CK-19均阴性。多因素方差分析表明,MSCs体外最佳诱导条件为含200 mL/L FBS的DMEM+肝细胞生长因子(HGF)20  $\mu\text{g/L}$ +成纤维细胞生长因子-4(FGF-4)20  $\mu\text{g/L}$ 。

**结论:**HGF和FGF-4可在体外诱导实验性大鼠MSCs分化为具有肝细胞样细胞表型和功能的类肝细胞;不同浓度的FBS、HGF和FGF-4影响MSCs的体外分化;MSCs可作为治疗临床重症肝病的一种细胞来源。

**关键词:**骨髓;间充质干细胞;类肝细胞;肝细胞生长因子;成纤维细胞生长因子-4

何文艳,刘树贤,姜慧卿.不同诱导条件对大鼠骨髓间充质干细胞体外诱导类肝细胞的影响.世界华人消化杂志 2008; 16(5): 473-478

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/473.asp>

## 0 引言

骨髓间充质干细胞(MSCs)是骨髓干细胞的重要组成部分。目前研究表明,该细胞能在不同理化环境和细胞因子的诱导下分化为成骨细胞<sup>[1-2]</sup>、脂肪细胞<sup>[3-4]</sup>、神经元样细胞<sup>[5-7]</sup>、心肌细胞<sup>[8-9]</sup>和肝实质细胞<sup>[10-11]</sup>等组织细胞。

当前重症肝病患者的肝移植已取得重大成就,但供移植的肝脏数量有限,而且直到目前机体组织的排异性仍未被攻克。因此,MSCs向肝细胞分化的研究越来越受到人们的关注<sup>[12-13]</sup>,MSCs有希望成为治疗重症肝病的理想方法。

本实验研究旨在发现含不同浓度FBS及细胞诱导因子的培养基对细胞诱导的影响,以探讨MSCs体外培养、诱导的最优条件,为MSCs

治疗临床重症肝病提供参考依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 清洁级Wistar大鼠6只(来自河北医科大学动物中心,合格证编号:DK0512051),体质量180-200 g,雌雄各半。DMEM低糖培养基购于美国HyClone;FBS购于中美合资兰州民海生物工程有限公司;细胞因子购于美国Pepro Tech;淋巴细胞分离液购于上海恒信化学试剂有限公司;AFP放射免疫分析药盒购于北京北方生物技术研究所;大鼠Alb放射免疫分析药盒购于北京市福瑞生物工程公司;CK-18、CK-19单克隆抗体购于北京中杉金桥生物公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 MSCs分离培养:**无菌条件下取大鼠胫骨、股骨,除去骨表面附着的组织。用肝素(200 kU/L)-PBS混合液冲出骨髓腔中的骨髓,制成单细胞悬液至无菌离心管中,将6只大鼠的细胞悬液混合;室温1500 r/min离心10 min,收集沉淀物用含200 mL/L FBS DMEM重悬后加在等体积的淋巴细胞分离液(比重1.077 kg/L)上,室温1500 r/min离心10 min;取白膜层到无菌离心管中,用含200 mL/L FBS低糖DMEM重悬细胞,1500 r/min离心10 min,洗涤细胞1次,最后弃上清。取10  $\mu\text{L}$ 上述细胞悬液与100  $\mu\text{L}$  20 mg/L醋酸混匀,进行细胞计数。调整单个核细胞数为 $1\times 10^5/\text{cm}^2$ ,接种到25  $\text{cm}^2$ 细胞培养瓶内。加入5 mL低糖DMEM完全培养基(含200 mL/L FBS、青霉素100 mg/L、链霉素100 mg/L),置37℃、50 mg/L  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度的 $\text{CO}_2$ 细胞培养箱中培养。

**1.2.2 MSCs纯化:**原代骨髓细胞培养48 h后进行首次换液弃掉悬浮细胞,以后每3 d更换新鲜的低糖DMEM完全培养基。在细胞接近90%汇合时,进行消化传代,在传至第3代时,已完全去除非贴壁的球形骨髓造血细胞,得到纯化的MSCs。

**1.2.3 体外诱导:**采用析因设计,取诱导时间、FBS浓度、细胞因子浓度作为3个因素,其中诱导时间取15、21、27 d三个水平;FBS浓度取100 mg/L、200 mg/L两个水平;细胞因子浓度取10  $\mu\text{g/L}$ 肝细胞生长因子(HGF)+10  $\mu\text{g/L}$ 成纤维细胞生长因子-4(FGF-4)、20  $\mu\text{g/L}$  HGF+20  $\mu\text{g/L}$  FGF-4、20  $\mu\text{g/L}$  HGF、0  $\mu\text{g/L}$  HGF+0  $\mu\text{g/L}$  FGF-4四个水平。将纯化的MSCs分为8个处理组,重复实验2次,按 $10^4$ /孔接种于24孔培养板。每3 d换液一次。

第1组加用含100 mg/L FBS的低糖



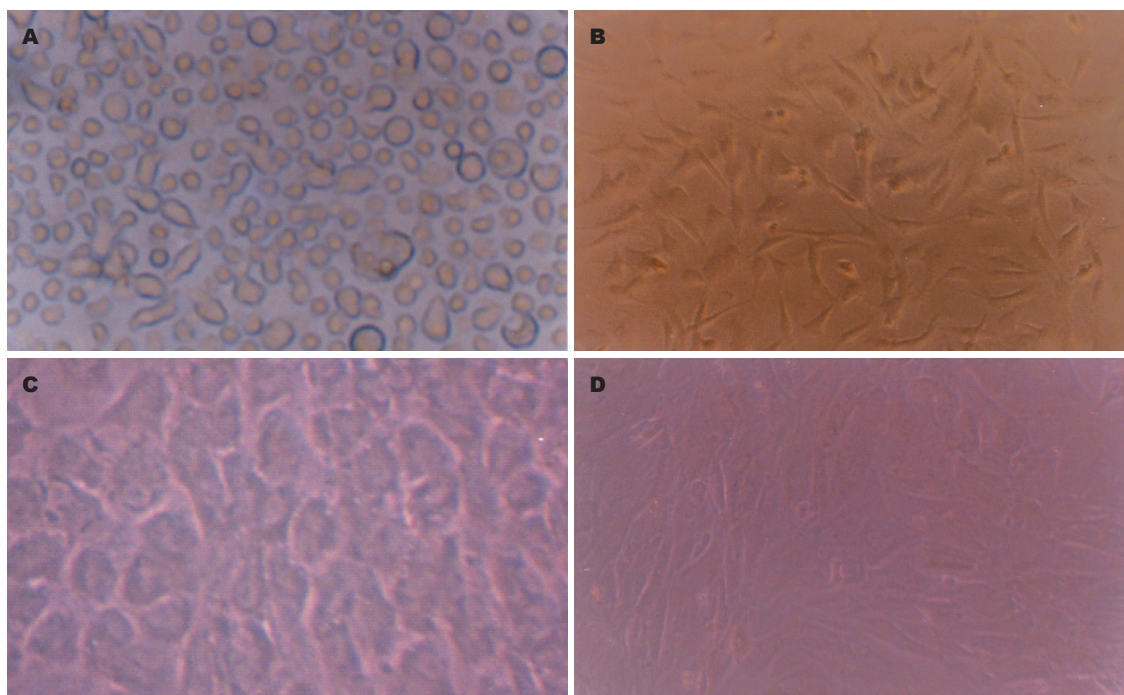


图1 MSCs的显微镜观察(×100). A: 原代培养48 h; B: 原代培养7 d; C: 诱导培养21 d; D: 非诱导培养21 d.

#### ■相关报道

近年的研究报道表明, HGF、FGF-4、OSM和EGF等多种细胞因子及血清浓度均在MSCs诱导分化为类肝细胞中起作用, 但最佳诱导条件仍需进一步探讨.

DMEM+10  $\mu\text{g/L}$  HGF+10  $\mu\text{g/L}$  FGF-4; 第2组加用含100  $\text{mg/L}$  FBS的低糖DMEM+20  $\mu\text{g/L}$  HGF+20  $\mu\text{g/L}$  FGF-4; 第3组加用含100  $\text{mL/L}$  FBS的低糖DMEM+20  $\mu\text{g/L}$  HGF; 第4组加用含100  $\text{mL/L}$  FBS的低糖DMEM, 不加细胞因子; 第5组加用含200  $\text{mL/L}$  FBS的低糖DMEM+10  $\mu\text{g/L}$  HGF+10  $\mu\text{g/L}$  FGF-4; 第6组加用含200  $\text{mL/L}$  FBS的低糖DMEM+20  $\mu\text{g/L}$  HGF+20  $\mu\text{g/L}$  FGF-4; 第7组加用含20  $\text{mL/L}$  FBS的低糖DMEM+20  $\mu\text{g/L}$  HGF; 第8组加用含200  $\text{mL/L}$  FBS的DMEM, 不加细胞因子.

1.2.4 白蛋白与AFP检测: 采用放射免疫分析法, 分别于细胞诱导分化的15、21、27 d收集细胞培养液进行白蛋白与AFP检测. 以未诱导的MSCs细胞培养液为阴性对照.

1.2.5 糖原染色: 采用过碘酸希夫(PAS)实验. 于诱导27 d收集诱导细胞爬片, 甲醇固定, 以未诱导培养27 d的MSCs作阴性对照. 载玻片用1%过碘酸氧化5 min, 蒸馏水漂洗3次. 然后用Schiff试剂处理15 min, 蒸馏水漂洗5-10 min, 苏木精染色1 min, 蒸馏水漂洗. 常规脱水、透明, 中性树胶封片. 红紫色染色的积聚物看作糖原储存, 显微摄像.

1.2.6 免疫细胞化学染色检测MSCs中CK-18、CK-19: 于诱导27 d收集诱导细胞爬片, 丙酮固定10 min, 进行免疫细胞化学染色检测. 按说明操作, 胞质内呈现棕黄色颗粒为阳性染色.

**统计学处理** 计量资料组间比较采用 $t$ 检验、方差分析; 所有统计数据均采用SPSS13.0软件处理;  $P<0.05$ 有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 MSCs的显微镜观察** 倒置显微镜下观察新鲜分离的骨髓干细胞大小均匀, 透光度好. 接种24-48 h后, 几乎所有的细胞都沉积于瓶底, 少部分细胞贴壁, 呈圆形(图1A). 72 h后, 贴壁细胞数增加, 呈小梭形, 并开始分裂增殖. 7 d后, 贴壁分裂细胞形成不同大小、分散的细胞集落, 细胞多呈梭形(图1B). 14 d后, 集落中细胞数量增多, 呈放射状向周围扩张, 集落间渐汇合成单层. 21 d左右细胞达90%汇合, 可以传代; 传代后细胞3-4 h开始贴壁, 24 h内完全贴壁, 展成梭形, 开始迅速增殖, 7 d左右可达90%汇合, 可继续传代; 经细胞因子诱导处理的细胞与非诱导细胞在最初1 wk细胞形态变化不大, 随诱导时间延长, 诱导细胞自梭形逐渐变成多角形, 且细胞数量逐渐增多(图1C). 单用HGF组的细胞增长速度慢于HGF、FGF-4合用组. 而非诱导细胞仍为成纤维细胞样, 细胞密度增加, 局部有重叠交错(图1D).

### 2.2 放射免疫检测结果

2.2.1 细胞培养上清液AFP检测结果: 15、21、27 d的诱导细胞的培养上清液AFP水平均高于非诱导细胞( $P<0.01$ ), 且21 d各诱导细胞培养

## ■创新盘点

HGF单独或联合FGF-4使用是比较常见的诱导MSCs分化为类肝细胞的方法,但两种细胞因子浓度的相关性以及与血清浓度的相关性报道较少。

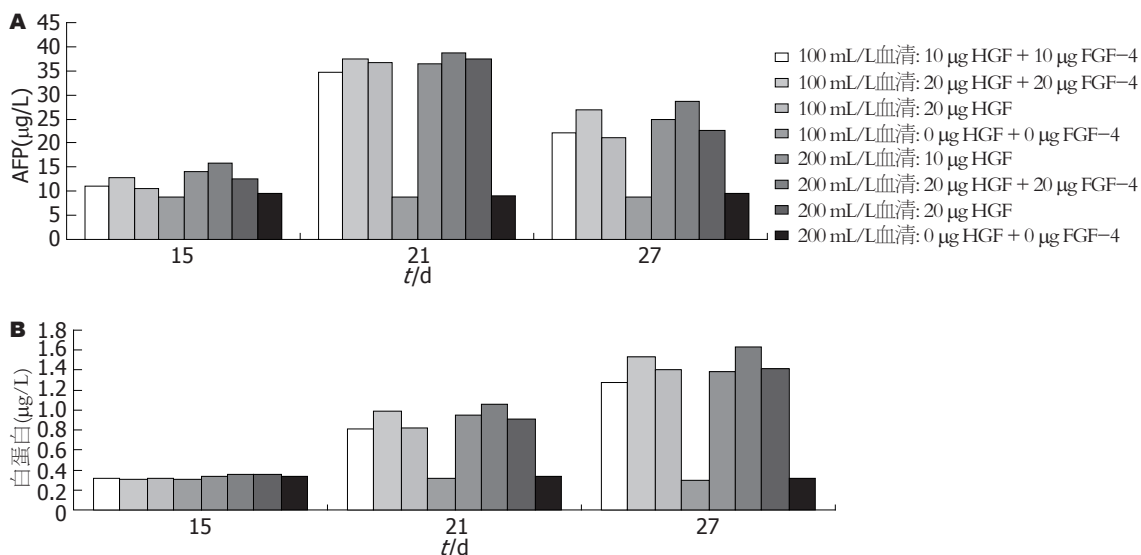


图2 各处理组AFP和白蛋白水平. A: AFP; B: 白蛋白.

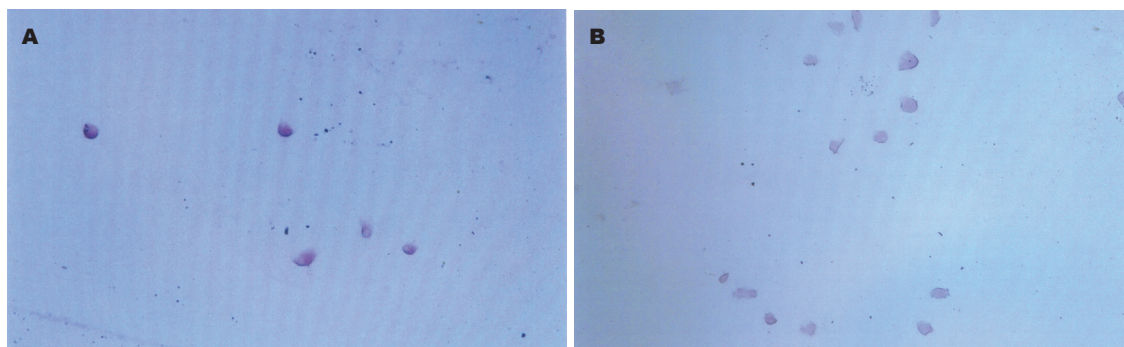


图3 糖原染色( $\times 100$ ). A: 诱导组; B: 非诱导组.

表1 AFP和白蛋白水平方差分析表

分组	AFP		白蛋白	
	F	P	F	P
FBS $\times$ 细胞因子	10.76	<0.01	4.13	<0.05
FBS $\times$ 细胞因子 $\times$ 时间	0.54	>0.05	2.39	>0.05

上清液AFP水平最高(图2A). 通过多因素方差分析(表1), 15、21、27 d最佳诱导条件均为含200 mL/L FBS的DMEM+20 μg/L HGF+20 μg/L FGF-4.

2.2.2 细胞培养上清液白蛋白检测结果: 15 d各诱导组细胞与非诱导组细胞培养上清液白蛋白水平比较无统计学意义( $P>0.05$ ), 而21、27 d诱导组细胞培养上清液白蛋白水平平均高于非诱导组细胞, 而且呈时间依赖性( $P<0.01$ ), 即27 d诱导组细胞培养上清液白蛋白水平最高(图2B). 通过多因素方差分析(表1)可以看出, 15、21、27 d最佳诱导方案均为含200 mL/L FBS的DMEM+20

μg/L HGF+20 μg/L(图1D).

2.3 过碘酸希夫(PAS)实验糖原染色结果 27 d各诱导组MSCs糖原染色强阳性, 而非诱导组MSCs糖原染色阴性(图3).

2.4 免疫细胞化学染色检测CK-18、CK-19的结果 27 d各诱导组MSCs CK-18、CK-19均阳性. 非诱导组MSCs CK-18、CK-19均阴性(图4).

### 3 讨论

肝移植是肝脏功能衰竭后的理想治疗方案, 但由于供体肝源不足、移植后的排斥反应及治疗费用昂贵, 限制了肝衰竭患者接受肝移植. 而肝细胞移植越来越受到重视, 已显示潜在的应用前景, 寻找合适的肝细胞来源成为重要的研究课题. MSCs来源充足, 可以分化为肝细胞, 可以自体取材, 植入体内无免疫排斥反应, 遗传背景稳定, 增殖能力强, 体内外均有极强分化潜能, 易于临床应用.

从骨髓中分离得到MSCs, 有贴壁法<sup>[14]</sup>、密



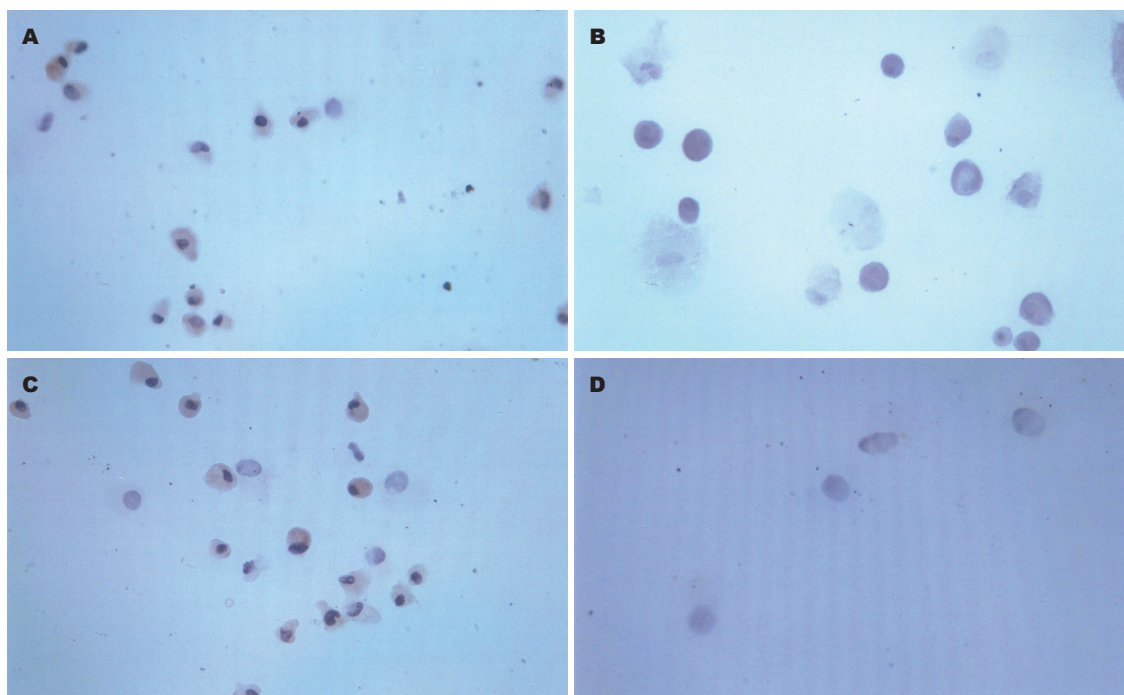


图 4 CK-18和CK-19免疫细胞染色( $\times 100$ ). A: 诱导组CK-18阳性; B: 非诱导组CK-18阴性; C: 诱导组CK-19阳性; D: 非诱导组CK-19阴性.

#### ■应用要点

HGF、FGF-4可在体外诱导MSCs分化为类肝细胞,可能成为肝细胞移植和生物人工肝的种子细胞,以期治疗临床重症肝病.

度梯度离心法<sup>[15]</sup>、免疫磁珠法<sup>[16]</sup>、流式细胞仪法<sup>[17]</sup>. 各种方法各有利弊, 近年研究<sup>[18-19]</sup>多先采用密度梯度离心法, 得到含MSCs的骨髓单个核细胞, 再利用MSCs贴壁生长的特性加以纯化, 与此同时, 大量不贴壁的造血系细胞随着更换培养液得以除去. 再通过传代使其更加纯化. 此种方法操作简单, 很易得到纯化的MSCs. 故我们采用此种分离方法作为实验手段.

我们采用了不同浓度的FBS和HGF、FGF-4在体外诱导MSCs的分化. HGF是肝细胞生长因子, 他是一种普遍存在并具有多能性的细胞因子, 通过与受体C-met相互作用而对多种细胞产生促有丝分裂作用及促形态形成作用, 在肝脏的发育成熟和再生过程中发挥重要作用<sup>[20-22]</sup>. FGF-4在体内是一种重要的来源于中胚层和内胚层的信号分子, 可促进胚胎肝脏的形成和发育<sup>[23]</sup>. 鼠胚胎干细胞在含有FGF-4的培养液中进行诱导培养, 也可分化为表达肝细胞特征基因和抗原的细胞<sup>[24]</sup>. HGF、FGF-4在肝细胞的发育和再生中起着不可替代的作用<sup>[25]</sup>. 培养液中FBS成分复杂, 含有多种生长因子和促分化因子. 我们发现在诱导过程中单用HGF组的细胞增长速度慢于HGF、FGF-4合用组, 这可能与FGF-4不仅诱导细胞分化, 而且可以促进细胞增殖以及HGF的促分化作用强于促增生作用有关.

本实验从功能和表型对诱导分化后的

MSCs进行了检测, AFP、白蛋白、CK-18、CK-19和糖原均为肝系细胞较为特异的标志. AFP是幼稚肝细胞分泌的, 是肝细胞分化早期的标志; CK-19也是肝细胞分化早期的标志物; 白蛋白是肝细胞成熟的标志; CK-18是肝细胞相对特异性的标志物, 在幼稚的肝前体细胞不表达, 当肝细胞趋于成熟后表达量增高; 糖原合成和储存是肝细胞的特征性功能. 本实验诱导组MSCs能够分泌AFP、白蛋白, 储存糖原, 表达CK-18、CK-19肝细胞标记. 诱导组MSCs培养上清液中AFP的水平, 均为21 d最高, 27 d反而下降; 白蛋白水平呈时间依赖性, 27 d达最高. 这也说明诱导所得类肝细胞功能逐渐完善. 27 d诱导组MSCs CK-18、CK-19均阳性, 而非诱导组MSCs CK-18、CK-19均阴性. 这表明诱导的MSCs已分化为类肝细胞且并未完全成熟, 仍有继续分化的潜能. 最终诱导结果显示, 6种诱导条件均使MSCs诱导分化为类肝细胞, 但通过析因分析得出: 最佳诱导条件为含200 mL/L FBS的低糖DMEM合用20  $\mu$ g/L的HGF和20  $\mu$ g/L FGF-4. 说明由于200 mL/L的FBS含有更多的生长因子和促分化因子, 加之两种细胞因子同时应用, 促进了细胞的增殖和分化. HGF、FGF-4和FBS为MSCs体外分化提供了微环境, 是MSCs分化的关键因素, 尤其是HGF、FGF-4的浓度更为重要.

## ■同行评价

本研究具有一定的意义,可以为人类肝衰竭的肝细胞移植和生物人工肝的治疗提供一定的指导。

总之, MSCs可以在体外通过诱导分化为具有肝细胞功能和表型的类肝细胞;可以作为人工肝和肝细胞移植的一种细胞来源,为临床治疗重症肝病提供新的途径。

## 4 参考文献

- 1 Atmani H, Chappard D, Basle MF. Proliferation and differentiation of osteoblasts and adipocytes in rat bone marrow stromal cell cultures: effects of dexamethasone and calcitriol. *J Cell Biochem* 2003; 89: 364-372
- 2 Chen TL, Shen WJ, Kraemer FB. Human BMP-7/OP-1 induces the growth and differentiation of adipocytes and osteoblasts in bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Biochem* 2001; 82: 187-199
- 3 Allan EH, Ho PW, Umezawa A, Hata J, Makishima F, Gillespie MT, Martin TJ. Differentiation potential of a mouse bone marrow stromal cell line. *J Cell Biochem* 2003; 90: 158-169
- 4 Porter RM, Huckle WR, Goldstein AS. Effect of dexamethasone withdrawal on osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 2003; 90: 13-22
- 5 Wislet-Gendebien S, Leprince P, Moonen G, Rogister B. Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. *J Cell Sci* 2003; 116: 3295-3302
- 6 Rismanchi N, Floyd CL, Berman RF, Lyeth BG. Cell death and long-term maintenance of neuron-like state after differentiation of rat bone marrow stromal cells: a comparison of protocols. *Brain Res* 2003; 991: 46-55
- 7 Song S, Kamath S, Mosquera D, Zigova T, Sanberg P, Vesely DL, Sanchez-Ramos J. Expression of brain natriuretic peptide by human bone marrow stromal cells. *Exp Neurol* 2004; 185: 191-197
- 8 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatr Transplant* 2003; 7 Suppl 3: 86-88
- 9 Orlic D. Adult bone marrow stem cells regenerate myocardium in ischemic heart disease. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 996: 152-157
- 10 Wang X, Montini E, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M. Kinetics of liver repopulation after bone marrow transplantation. *Am J Pathol* 2002; 161: 565-574
- 11 Mallet VO, Mitchell C, Mezey E, Fabre M, Guidotti JE, Renia L, Coulombel L, Kahn A, Gilgenkrantz H. Bone marrow transplantation in mice leads to a minor population of hepatocytes that can be selectively amplified in vivo. *Hepatology* 2002; 35: 799-804
- 12 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
- 13 Zhang Y, Fan Y, Zhao L, Tang H. Differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocyte in vivo. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 2005; 22: 521-524
- 14 Meirelles Lda S, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol* 2003; 123: 702-711
- 15 盛小刚, 冯建章, 吴书林, 靳立军, 余细勇, 张斌. 骨髓间充质干细胞的肌源性诱导分化及转染VEGF基因的表达. *第一军医大学学报* 2004; 24: 290-294
- 16 Locatelli F, Corti S, Donadoni C, Guglieri M, Capra F, Strazzer S, Salani S, Del Bo R, Fortunato F, Bordini A, Comi GP. Neuronal differentiation of murine bone marrow Thy-1- and Sca-1-positive cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2003; 12: 727-734
- 17 王运涛. 骨髓间充质干细胞分离培养的研究进展. *国外医学生物医学工程分册* 2002; 25: 184-188
- 18 Kang XQ, Zang WJ, Song TS, Xu XL, Yu XJ, Li DL, Meng KW, Wu SL, Zhao ZY. Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes in vitro. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3479-3484
- 19 王利霞, 法宪恩, 侯剑峰. 人骨髓间充质干细胞体外培养特性的初步观察. *实用神经疾病杂志* 2005; 8: 8-9
- 20 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
- 21 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
- 22 Fiegel HC, Lioznov MV, Cortes-Dericks L, Lange C, Kluth D, Fehse B, Zander AR. Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 2003; 21: 98-104
- 23 Jung J, Zheng M, Goldfarb M, Zaret KS. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 1999; 284: 1998-2003
- 24 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
- 25 Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 258-264

编辑 程剑侠 电编 郭海丽