

大鼠骨髓来源的 $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ 细胞向肝细胞样细胞诱导分化的实验研究*

南雪¹ 王韞芳¹ 尉承泽² 梁峰¹ 张锐¹ 岳慧敏¹ 岳文¹ 裴雪涛^{1**}

1. 军事医学科学院输血医学研究所干细胞与再生医学研究室, 北京 100850;

2. 中国人民解放军 307 医院外一科, 北京 100039

摘要 为了观察大鼠骨髓来源的 $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ 细胞在体内外是否可定向诱导分化为肝细胞样细胞, 将雄性 F344 大鼠的 $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ 细胞通过肝门静脉移植入由丙烯醇诱导损伤的 F344 雌鼠体内, 观察移植细胞在受鼠肝内整合、增殖、分化、成熟以及损伤后的修复作用; 通过模拟丙烯醇肝损伤大鼠体内微环境, 将 $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ 细胞与损伤肝细胞共培养, 观察了 $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ 细胞的形态变化, 并检测了肝细胞特异性蛋白的表达和肝细胞特异性功能的变化。结果表明, 大鼠 $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ 细胞在体内外均可以分化为成熟的有功能的肝细胞, 提示微环境在成体干细胞定向诱导分化中起决定性作用, 这为骨髓成体干细胞移植治疗各种原因引发的肝功能障碍提供了新的途径。

关键词 移植 诱导分化 微环境

对由各种原因所致的终末性肝功能衰竭的治疗一直是一个全球性的难题, 目前临床常用的治疗方式有原位肝移植和生物人工肝等。然而, 这些治疗方式都面临着肝源短缺的问题。细胞治疗作为一种新的治疗策略, 在修复或替代患者受损组织中起到越来越重要的作用。在过去的几十年中, 异种或异体肝细胞移植或肝干细胞移植在临床上已被应用^[1], 但是其细胞来源以及移植后的一系列相关并发症使得它们在临床上的应用受到了很大的限制。近来研究显示成体干细胞尤其是骨髓来源的成体干细胞不仅可以分化为造血细胞, 还可以向其他细胞进行分化, 例如, 在特定的条件下骨髓来源的成体干细胞在体内或是体外均可向肝细胞分化^[2-4]。这一现象的发现, 为自体骨髓干细胞应用于各种难治性或终末性肝脏疾病提供了新的

治疗思路。

众所周知, 肝细胞生长因子 (HGF) 是分散因子, 它广泛分布于各个器官中, 参与多种组织的修复, 特别是在肝组织的修复与再生中扮演重要的角色^[5,6]。HGF 作为肝细胞潜在的有丝分裂源^[7,8], 而 $c\text{-met}$ 作为 HGF 的惟一受体, 在肝脏的发育和再生中起着相当重要的作用并且影响整个器官的发育^[9,10]。 $\beta_2\text{m}$ 作为最保守的蛋白广泛表达于哺乳动物的有核细胞内, 但是永生化的肿瘤细胞或是囊胚期的胚胎干细胞则不表达 $\beta_2\text{m}$, 因此, $\beta_2\text{m}^-$ 被认为是祖细胞的表面标志, 具有巨大的增殖潜能。本研究选用表达 $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ 的骨髓来源的干细胞为种子细胞在特定微环境下在体内外进行诱导分化, 为干细胞在肝脏疾病的细胞治疗中提供一种新的种子细胞来源。

2005-06-16 收稿, 2005-08-24 收修改稿

* 国家重点基础研究发展规划 (批准号: 2001CB509906, 2005CB522702)、国家“八六三”计划 (批准号: 2002AA205051, 2003AA205160) 和北京市科委 (批准号: H020220010190) 资助项目

** 通讯作者, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

1 材料与方法

1.1 动物模型建立与检测

成年雌性近交系 Fisher344 大鼠(中国医学科学院实验动物中心提供)10只,体重200—250g,腹膜内注射丙烯醇(AA)0.62 μmol/kg^[11],建立AA诱导的大鼠肝损伤模型.于不同时间点经眼球取血,分离血清,检测谷草转氨酶(AST)和乳酸脱氢酶(LDH)的含量.不同时间活杀大鼠,取肝组织进行石蜡原位包埋、切片,将固定的切片进行常规HE染色.

1.2 c-met⁺β₂m⁻细胞分离纯化与纯度检测

健康 Fisher344 雄性大鼠颈动脉处死,无菌条件下取胫骨,去除软组织,切除胫骨两端,用培养基冲洗胫骨髓腔,将冲洗液收集并离心5 min(2000 r/min)后,弃上清液. PBS重悬细胞后经 Ficoll 分离液(相对比重为1.083 g/mL)(TBD公司)分出单个核细胞(MNC),用β₂m抗体(Santa Cruz Biotechnology)标记细胞,4℃孵育30 min, PBS洗涤两次,后用800 μL免疫分选磁珠(MACS)缓冲液(1%牛血清白蛋白,2 mmol/L EDTA)重悬细胞,加入200 μL免疫磁珠(Miltenyi Biotec)4℃孵育30 min, PBS洗涤两次后,将标记细胞通过置于磁场中的分离柱,收集被洗脱的β₂m⁻细胞.将β₂m⁻细胞再标记c-met抗体(Santa Cruz Biotechnology),同样4℃孵育30 min, PBS洗涤两次后标记磁珠抗体,将标记细胞通过置于磁场中的分离柱,c-met⁻β₂m⁻细胞被洗脱除去,将分离柱移出磁场,加压洗脱,收集组分为c-met⁺β₂m⁻细胞,台盼蓝染色检测细胞存活率,流式细胞仪(FACS)检测细胞分离纯度.

1.3 FACS 检测 c-met⁺β₂m⁻细胞表面标志

将收集的c-met⁺β₂m⁻细胞分别用细胞表面标志CD29-FITC, CD49f-FITC, CD90-FITC(SEROTEC), Alb(Santa Cruz Biotechnology)进行标记,4℃孵育30 min,避光,标记甲胎蛋白(AFP)的细胞先用0.3% Triton-PBS 孵育15 min后,再标记AFP(Santa Cruz Biotechnology)抗体,4℃孵育2 h,再将标记Alb, AFP的细胞分别标记相应的FITC荧光二抗(北京中山生物技术有限公司),4℃孵育

30 min,避光,充分洗涤标记后的细胞,重悬于1 mL PBS中,用FACS检测.

1.4 c-met⁺β₂m⁻细胞移植入AA诱导的Fisher344大鼠肝损伤模型

将大鼠c-met⁺β₂m⁻细胞用PKH26(Sigma)标记,将标记细胞经肝门静脉注射,剂量为1×10⁶个/只,以门静脉注射等量生理盐水作为阴性对照.

1.5 移植模型的检测

1.5.1 移植模型组织标本的取材 分别于移植后1, 7, 15, 40及80 d杀死受体大鼠,取肝脏、肺脏、脾脏等组织,各组织一部分直接行冰冻切片,置荧光显微镜下观察移植细胞的分布与定位,另一部分组织常规石蜡切片,用于sry基因原位杂交及免疫组织化学检测.

1.5.2 荧光标记细胞定位检测 分别取不同时间点的肝脏、肺脏及脾脏等组织的冰冻切片,置荧光显微镜下观察移植细胞对受体大鼠自身肝细胞的损伤后修复支持作用以及在大鼠体内的分布情况.

1.5.3 sry 基因原位杂交 取移植不同时间点肝组织石蜡切片,常规处理后在2×SSC溶液中75℃下老化,再经胃蛋白酶消化,梯度酒精脱水后,室温干燥,加入杂交液稀释的Dig-sry 20 ng,用塑料盖玻片覆盖,95℃变性后置37℃湿盒杂交16 h以上,经不同浓度SSC/SDS充分洗涤、杂交缓冲液封闭后与碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体37℃孵育2 h,清洗、平衡,NBT/BCIP显色;常规脱水、透明、封片,镜下观察.

1.5.4 免疫组织化学观察 取移植不同时间点肝组织石蜡切片常规处理后以3%过氧化氢处理消除内源性过氧化物酶,0.3% Triton-PBS 打孔,山羊血清封闭后,分别与alb, AFP, ov-6, CK19一抗工作液4℃孵育过夜,用生物素标记的二抗和辣根过氧化物酶标记链霉卵白素37℃孵育30 min,充分洗涤后DAB暗处显色30 min,常规脱水、透明、封片,镜下观察.

1.6 两步灌注法制备损伤大鼠肝脏细胞悬液

取AA损伤Wistar大鼠(军事医学科学院实验

动物中心提供)用2.5%戊巴比妥钠(1 mL/kg)腹腔内注射,麻醉后固定体位,消毒胸腹部皮肤,打开腹腔,暴露、游离门静脉后距肝门1.5—2.0 cm处用20 G穿刺针进入门静脉并固定,用含EGTA的D-Hanks灌流液以20 mL/min的流速灌流^[12,13],剪断肝下腔静脉,4—5 min后,改用经37℃预温的含Ca²⁺和Mg²⁺的0.05%胶原酶溶液100 mL,继续灌流10 min,取下肝组织,用尖嘴镊分离肝脏包膜,反复用滴管吹吸混匀肝脏细胞悬液,100目滤网过滤细胞,50 g离心2 min后弃上清,反复洗涤3次。

1.7 c-met⁺β₂m⁻细胞与损伤肝细胞联合培养

将分离出的损伤肝细胞与采用免疫磁珠分离出的健康Wistar大鼠骨髓的c-met⁺β₂m⁻细胞共同接种于Transwell培养板中^[4],上室均匀涂铺I型胶原,接种肝细胞密度为1×10⁴个/cm²,下室中均匀涂铺Matrigel(25 μg/cm²)(BD),接种c-met⁺β₂m⁻密度为1×10⁵个/cm²。共同培养于DMEM/F12(含10%FBS)培养基中,完全培养基中添加牛血清白蛋白2.0 g/L、葡萄糖1.0 g/L、半乳糖2.0 g/L、鸟氨酸0.1 g/L、脯氨酸0.030 g/L、谷氨酰胺0.730 g/L、尼克酰氨0.610 g/L、肝细胞生长因子(HGF)(R&D)4 ng/mL,置于37℃,5%CO₂饱和湿度培养箱内培养,隔天换液。另外以同样密度仅接种c-met⁺β₂m⁻细胞,采用与上述培养条件完全相同的完全培养基,另外加入肝细胞生长因子(HGF)10 ng/mL。

1.8 诱导分化的肝样细胞的检测

1.8.1 细胞形态观察 光学显微镜下观察细胞诱导分化前后形态的变化,记录细胞诱导分化的过程。并取诱导分化8 d的细胞,以3%戊二醛于培养皿原位4℃前固定2 h,以1%锇酸4℃后固定1 h后,按常规方法进行电子显微镜样本的制备,用ULTRACUTE/S型切片机超薄切片,醋酸铀-枸橼酸铅双重染色,Philips CM120透射电子显微镜观察细胞超微结构。

1.8.2 间接免疫荧光检测 将诱导分化8 d的细胞进行双标记:Alb与CK8&18(北京中山生物技术有限公司),Alb与AFP,Alb与OV-6,4℃孵育2 h后,分别用不同荧光素标记的二抗(FITC与

TRICT)4℃继续孵育30 min,置共聚焦显微镜下观察,用LaserSharp 2000软件分析图像。

1.8.3 靛青绿(ICG)的摄取与排泄实验 诱导分化8 d的c-met⁺β₂m⁻细胞用PBS充分洗涤后,加入1 mg/mL ICG(辽阳制药三厂)于37℃孵育15 min后,显微镜下观察细胞颜色变化,再用PBS冲洗两遍后,换回完全培养基常规培养4 h后,观察细胞颜色变化。

1.8.4 尿素与白蛋白的合成实验 诱导分化8 d的c-met⁺β₂m⁻细胞经PBS冲洗换用无血清的DMEM培养基,加入0.15 mol/L的NH₄Cl,常规培养8 h后收集细胞培养上清,在全自动生化分析仪上检测培养上清中尿素和白蛋白的分泌量。

2 结果

2.1 动物模型的建立与观察

接受腹膜内注射AA的大鼠表现为精神萎靡,厌食,肝组织石蜡切片HE染色显示汇管区扩大、充血、水肿,组织出血、凝固性坏死,大量中性粒细胞及单个核细胞浸润密集。损伤后48—72 h,坏死范围不再增大,较易见到增生的卵圆细胞,其特征为体积大、核卵圆、核浆比例大,并且小胆管逐渐增生旺盛,此时,为移植的最佳时间点。血生化结果显示,血清ALT和LDH于损伤后10 h开始升高,24—48 h达峰值,提示此时大鼠肝功能受到严重的损害。第13天左右逐渐恢复正常^[11]。

2.2 FACS检测细胞表面标志

流式细胞仪分析结果显示少部分细胞表达造血干/祖细胞表面标志CD90,另有约90%左右的细胞表达胚胎发育中上皮细胞重要标志CD49f和CD29,另外大量细胞表达肝细胞早期特异性表面标志AFP,部分细胞表达成熟肝细胞特异性蛋白Alb(见表1)。

表1 c-met⁺β₂m⁻细胞表面标志阳性率

表面标志	阳性率/%
CD29	95.33±3.78
CD49f	92.34±3.37
CD90	26.7±5.39
AFP	96.72±2.04
Alb	55.39±6.78

2.3 移植模型的各项功能检测

将 $c\text{-met}^+ \beta_2m^-$ 移植入损伤大鼠体内, 随着移植时间的延长, 将不同移植时间点的冰冻切片置于荧光显微镜下观察发现, 移植 24 h 时, 大部分移植细胞散在存在于肝组织内. 移植 7 d 后, 大量阳性细胞聚集在损伤部位周围, 并整合入肝细胞板内; 移植 15 d 后, 阳性细胞进一步增多, 呈放射状分布于肝汇管区周围, 部分与受体肝细胞穿插排列; 移植 40 d 后, 汇管区周围阳性细胞继续增多, 并且形成胆小管, 表明部分移植细胞不仅可以整合入肝细胞板内分化为成熟的有功能的肝细胞, 而且还具有良

好的增殖能力(图 1(a)–(f)). *Dig-sry* 基因原位杂交结果同样显示大量移植细胞聚集并定位在汇管区周围(图 2(a)(b)). 组织石蜡切片免疫组织化学结果显示移植 7–40 d, 在汇管区附近出现大量高表达白蛋白的细胞, 并且这些细胞多为双核或者多核, 汇管区附近也有大量细胞表达 AFP 及 OV-6, 另有部分细胞表达胆小管特异性抗原(部分照片见图 3(a)–(f)). 在肺脏及脾脏等结缔组织中也发现了少量阳性细胞, 我们分析有可能是移植入的细胞随血液循环流经这些脏器而被截留, 因此细胞治疗的靶向性还需做进一步的探讨.

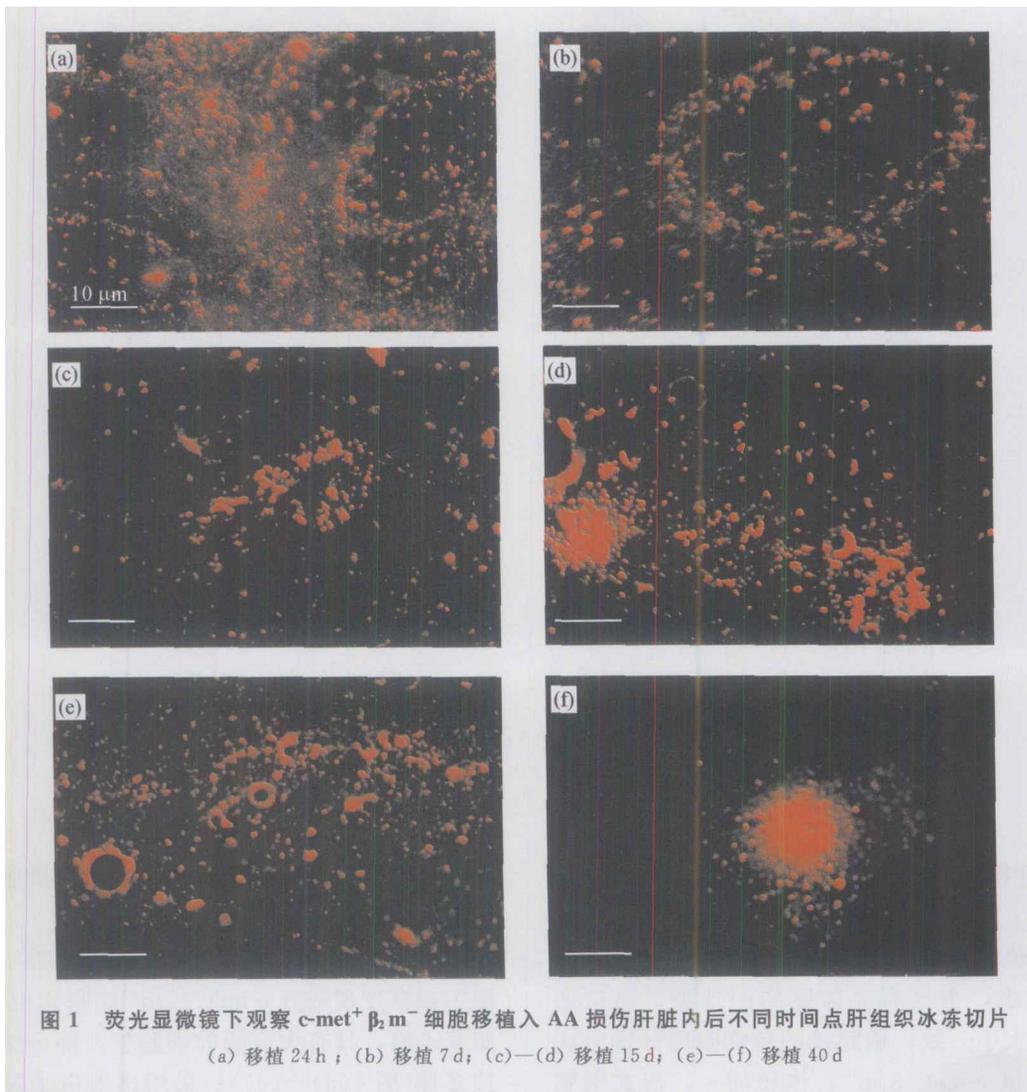


图 1 荧光显微镜下观察 $c\text{-met}^+ \beta_2m^-$ 细胞移植入 AA 损伤肝脏内后不同时间点肝组织冰冻切片
(a) 移植 24 h; (b) 移植 7 d; (c)–(d) 移植 15 d; (e)–(f) 移植 40 d

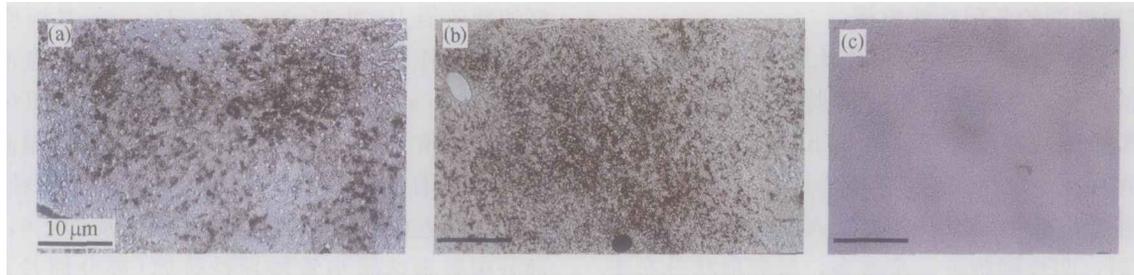


图2 $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ 细胞移植入 AA 损伤肝脏内 40 d 后 Dig-sry 原位杂交结果
(a)和(b)阳性结果；(c) sry 阴性

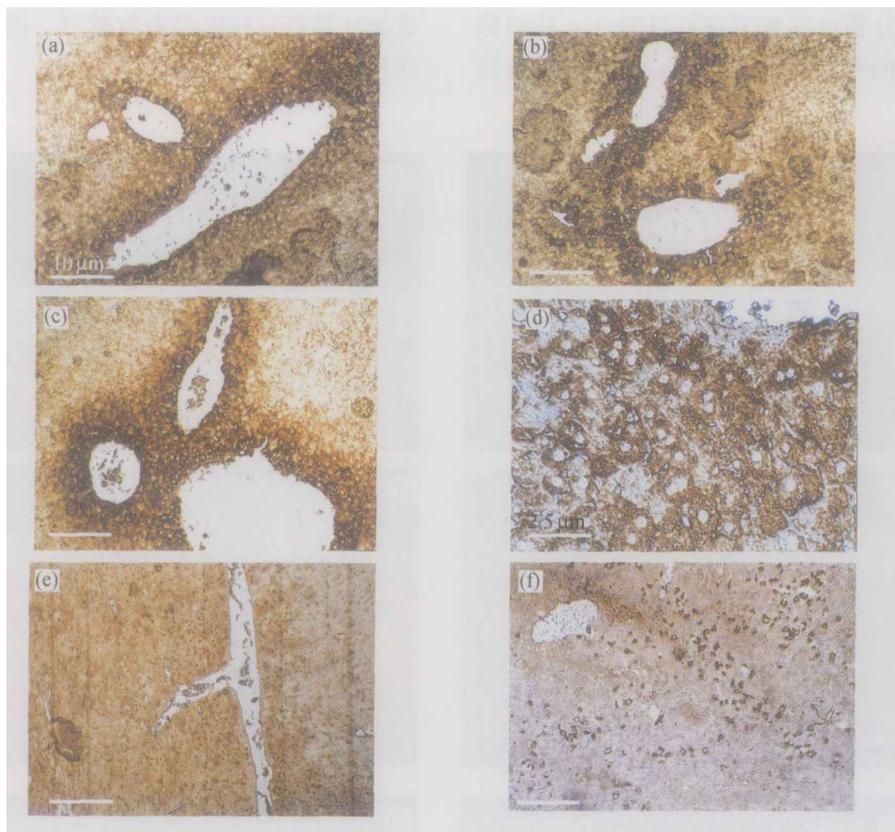


图3 $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ 细胞移植入 AA 损伤肝脏免疫组织化学检测结果
(a)–(c) 分别为移植 7 d, 15 d, 40 d 后 Alb 的表达；(d) 为移植 40 d 后 Alb 的表达；
(e)–(f) 分别为移植 15 d 后的 AFP 和 OV-6 的表达

2.4 大鼠肝细胞悬液及 $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ 细胞的制备与观察

采用原位二步灌流分离的肝细胞在显微镜下呈单个分散状态，为具有立体感的圆球形，晶莹透亮，体积上大小一致；用间接的免疫磁珠分选方法纯化获得大鼠 $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ ，体积均一，流式细胞仪检测分离纯度达 98% 左右。

2.5 大鼠肝细胞悬液与 $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ 细胞联合培养后细胞形态的观察

将两种细胞体外联合培养后第 8 天，光学显微镜下观察发现部分 $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ 细胞体积明显增大，胞浆丰富，具有大而圆的细胞核，部分细胞为双核或多核(图 4(a)–(c))；采用透射电子显微镜观察体积增大的细胞的超微结构，发现此种细胞具有丰富的细胞器，含有大量的圆形或椭圆形的线粒体，

并且在胞浆中大量分布点状或簇状的糖原颗粒(图5)。单加 HGF 组只有极少量细胞可分化为肝细胞。

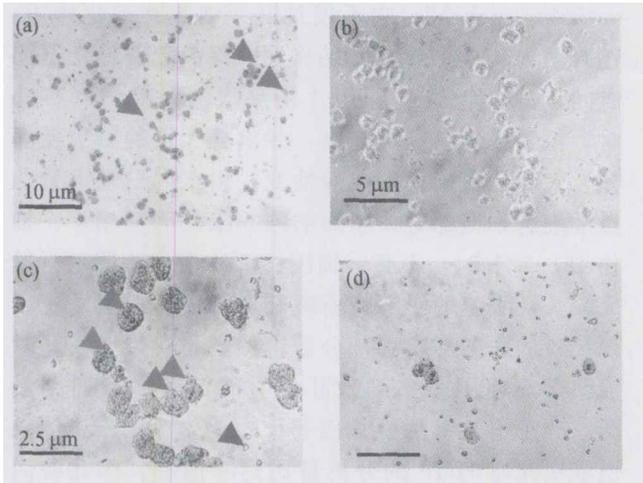


图4 诱导第8天, $c\text{-met}^+ \beta_2m^-$ 细胞向肝细胞样细胞诱导分化

(a)–(c) 紫色箭头所指示的为已诱导分化的细胞, 绿色箭头所示已分化为双核甚至多核的肝细胞, 蓝色箭头为未分化细胞; (d) 为单加 HGF 组培养组

2.6 诱导分化细胞的检测

间接免疫荧光结果从蛋白水平证实, 分化后的

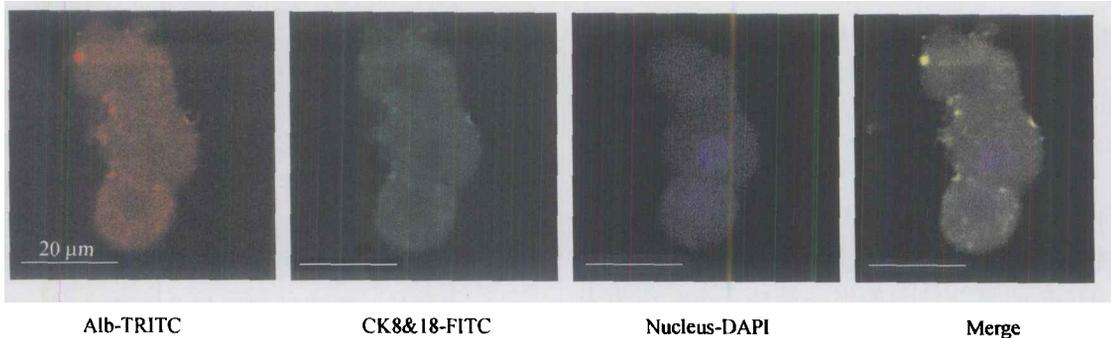


图6 诱导第8天, 共聚焦显微镜观察诱导分化细胞的蛋白表达

3 讨论

采用哪种或几种表面标志作为骨髓来源的肝干细胞的特异性抗原一直是近来被关注的焦点. Lagasse 等^[14]认为高度纯化的造血干细胞可以几乎完全向肝细胞分化. Suzuki 等^[15]用 FACS 方法从小鼠胎肝中分选出 $c\text{-met}^+ CD49f^+ / c\text{-kit}^- CD45^- TER119^-$ 细胞, 可分别向肝细胞、胰腺上皮细胞及肠上皮细胞分化. 但是采用上述方法分选出的细胞有可能会

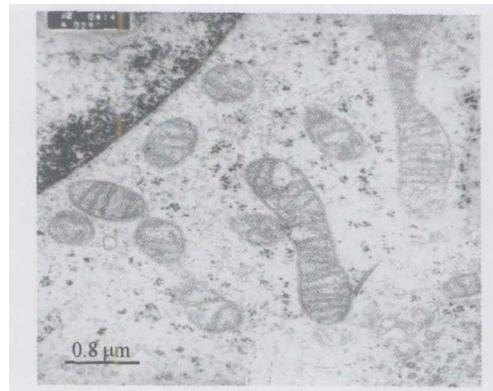


图5 诱导第8天时, 透射电子显微镜下观察细胞超微结构

肝细胞样细胞均表达成熟肝细胞特异的 Alb 与 CK18, 并且表达肝细胞早期标志 AFP 与 OV-6, 提示该群细胞具有良好的增殖潜能(部分照片见图6). 对诱导分化细胞进行靛氰绿摄取排泄功能鉴定, 结果表明, 体积增大的细胞具有肝细胞特有的摄取及排泄功能(图7), 证明该类细胞不仅具有肝细胞的形态而且具有肝细胞的功能; 另外尿素与白蛋白合成实验也证实诱导分化的细胞具有肝细胞所特有的分泌白蛋白和尿素的功能(图8).

因大量的标志阴性而被忽视了其向肝细胞分化的潜能, 因此利用肝细胞特有的生理学特性或功能进行分选有可能会避免以上不足. 大量研究表明在哺乳动物肝脏发育过程中, HGF 通过与细胞表面的 $c\text{-met}$ 形成复合物激活细胞内的多种信号传导途径, 导致细胞分裂或分化增加, 运动能力增强, 细胞连接消失等变化, 对肝脏间质细胞和上皮细胞的生成起着决定性的作用. 最近更多的研究检测了四氯化碳毒性作用后或部分肝叶切除的大鼠血浆 HGF 水

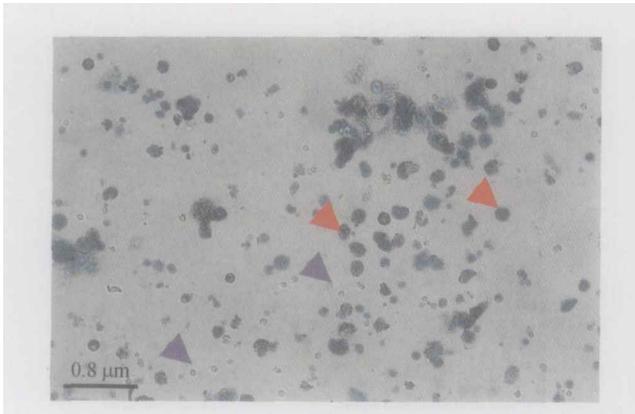


图7 诱导第8天, $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ 细胞分化为肝细胞样细胞的 ICG 摄取实验红色箭头示已分化细胞, 蓝色箭头示未分化细胞

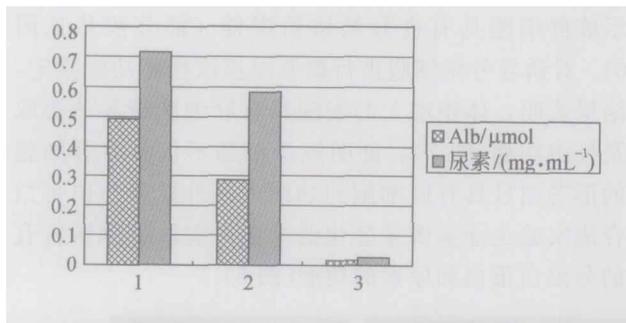


图8 诱导第8天, $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ 细胞诱导分化为肝细胞样细胞的尿素和白蛋白的分泌

1, 阳性对照(正常成熟肝细胞); 2, $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ 细胞分化为肝细胞样细胞; 3, 未经诱导的 $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ 细胞

平的变化, 进一步揭示了 HGF 对于肝再生的关键作用. 本研究采用在肝脏发育过程中起着极为重要作用的 HGF 的目前已知的惟一受体 $c\text{-met}$ 作为表面标志分离纯化了骨髓来源的 $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ 细胞. 我们通过 FASC 对 $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ 细胞的表面标志进行分析, 结果发现这部分细胞表达发育早期内胚层细胞的表面标志 $\alpha 6$ (CD49f) 和 $\beta 1$ (CD29), 并且还表达胎肝特异性的 AFP 和成熟肝细胞特异性的 Alb, 这些结果揭示这些细胞有可能是一群未分化的并且有向肝细胞分化潜能的干细胞^[15,16]. 对这部分细胞在特定微环境下进行诱导分化, 通过 HGF 与其受体 $c\text{-met}$ 之间的相互作用, 促使 $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ 细胞向肝样细胞分化. 结果表明, 该群细胞具有良好的向肝细胞分化和增殖的潜能.

本室前期一些研究工作表明, 由丙烯醇导致的

大鼠肝损伤微环境为骨髓干细胞向有功能的肝细胞定向诱导分化提供了一个有效的“分化龛位(differentiation niche)”, 它不仅对肝干细胞有趋化作用, 还有诱导其分化和增殖的作用. 我们分析损伤不同时间点的肝组织病理切片结果表明, 损伤后 24 h 时, 汇管区周围组织充血, 并出现大量的凝固性坏死, 大部分细胞发生嗜酸性变, 组织内出现大量的炎性细胞, 但此时, 卵圆细胞并未见明显增多; 损伤 48—72 h 时, 汇管区周围组织的损伤范围不再扩大, 炎性细胞的浸润有所减轻, 在坏死组织周围出现大量的卵圆细胞和部分新生的胆小管, 说明此时损伤微环境中多条刺激肝再生的信号传导通路激活, 分泌出大量的生长因子, 血清学 ELISA 结果也证实此时 HGF 的分泌量达到峰值^[11]. 因此我们选择 48—60 h 作为移植的最佳时间点, 此时不仅有利于骨髓干细胞的归巢与植入, 而且更有利于阳性细胞在靶位的分化与增殖, 以达到修复损伤的目的. 我们采用免疫磁珠分选技术从大鼠骨髓中分离纯化 $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ 细胞, 体外标记核染料 PKH26 后, 由肝门静脉移植入受鼠体内. 免疫组化与原位杂交结果对比表明, 移植的阳性细胞大多可定位于损伤的肝组织内, 特别是汇管区周围, 一部分细胞在肝板中定向分化为成熟的肝细胞, 直接参与组织的替代与修复, 发挥功能代偿的作用, 并且此部分细胞多为双核或者多核细胞, 胞浆丰富, 具有极强的增殖潜能; 另有少部分细胞则分布于肝板内表达早期肝细胞特异性抗原, 为肝脏长期重建并恢复其正常代谢功能起重要作用.

在体外, 我们采用双层共培养体系, 模拟在向肝细胞样细胞定向分化中起到决定性作用的体内损伤微环境, 将 AA 损伤的肝细胞接种于 Transwell 培养板上室中, 通过孔径为 $0.4 \mu\text{m}$ 的半透膜将促进肝再生的环境信号分子以及一些营养物质作用于下室接种的 $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ 细胞, 诱导 $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ 细胞向肝样细胞分化. 在添加少量生长因子的培养条件下, 第 8 天, 镜下观察部分细胞聚集生长, 体积明显增大, 表现出肝细胞的形态特征. 而单独培养 $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ 并未见细胞形态发生变化, 仍保持接种时的形态特征. 向分化的细胞培养上清中加入 NH_4Cl , 检测结果表明诱导 8 d 后的 $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ 细胞已具有与成熟肝细胞近似的合成尿素及白蛋白的

功能. 此外, 我们将诱导分化的细胞采用免疫荧光标记的方法从蛋白水平证实它们是否表达肝特异性蛋白, 例如 Alb, CK18 等, 结果均为阳性, 说明这群细胞不仅表达成熟肝细胞特异性的蛋白, 并且表达较幼稚时期的一些特异性蛋白, 揭示该群细胞具有良好的增殖潜能. 由于在整个实验过程中, 两种细胞被完全分隔, 只有蛋白分子的交流, 因而在整个培养微环境中, 肝实质细胞和非实质细胞的相互作用及复杂的信号转导调控网络对 $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ 细胞的有效分化起到至关重要的作用, 这至少可以说明我们的细胞并不是通过“细胞融合”而达到“转分化”的.

上述研究结果表明, 骨髓来源的 $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ 细胞进入肝损伤微环境后, 对其中的调节信号作出反应后进行重编程(genetically reprogramming), 从而分化为新的成熟的细胞类型. 因此决定肝干细胞分化方向的关键因素就是微环境中产生的一些已知或未知的细胞因子、生长因子或应激/炎性信号分子等. 在本研究中, 种子细胞的选择也起决定性作用, 我们利用在哺乳动物肝脏发育中起重要作用的 HGF/ $c\text{-met}$ 介导的信号通路, 更加合理地利用肝再生的微环境, 从而高效地诱导 $c\text{-met}^+ \beta_2\text{m}^-$ 细胞分化为成熟的有功能的肝样细胞, 为肝脏疾病的细胞治疗提供了更适宜的种子细胞. 并且也证实适当的环境因素影响干细胞的分化方向, 为成体干细胞是否具有“可塑性”提供了合理的实验模型, 也为成体干细胞在肝脏疾病中的应用提供了技术基础.

参 考 文 献

- 1 Nakahata T, Ogawa M. Hemopoietic colony-forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono- and multipotential hemopoietic progenitors. *J Clin Invest*, 1982, 70: 1324—1328
- 2 Wang Y F, Nan X, Zhang R, et al. Differentiation of bone marrow-derived $\text{Thy-1}^+ \beta_2\text{m}^-$ cells into hepatocytes induced by coculture with transgenic CFSCs. *Chinese Science Bulletin*, 2004, 49: 889—894
- 3 Theise N D, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*, 2000, 32(1): 11—16

- 4 Avital I, Inderbitzin D, Aoki T, et al. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 288: 156—164
- 5 Oh S H, Miyazaki M, Kouchi H, et al. 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
- 6 Wang P P, Wang J H, Yan Z P, et al. Expression of hepatocyte-like phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320: 712—716
- 7 Nakamura T, Teramoto H, Ichihara A, et al. Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 6489—6493
- 8 Gohda E, Tsubouchi H, Nakayama H, et al. Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminant hepatic failure. *J Clin Invest*, 1988, 81: 411—419
- 9 Michalopoulos G K, DeFrances M C. Liver regeneration. *Science*, 1997, 276: 647—651
- 10 Ichihara A. HGF, and proteasomes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 266: 1177—1180
- 11 王福芳, 南雪, 尉承泽, 等. 丙烯醇致肝损伤微环境定向诱导骨髓干细胞向肝细胞分化. *中华肝脏病杂志*, 2005, 13(4): 274—277
- 12 Seglen P O. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol*, 1976, 13: 29
- 13 Chia S M, Leong K W, Li J, et al. Hepatocyte encapsulation for enhanced cellular functions. *Tissue Eng*, 2000, 5: 481—483
- 14 Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med*, 2000, 6: 1229—1234
- 15 Suzuki A, Zheng Y W, Kaneko S, et al. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *J Cell Biol*, 2002, 156: 173—184
- 16 Newsome P N, Johannessen I, Boyle S, et al. Human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion. *Gastroenterology*, 2003, 124: 1891—1900
- 17 Suzuki A, Zheng Y, Kondo R, et al. Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver. *Hepatology*, 2000, 32: 1230—1239