

大鼠骨髓间充质干细胞体外诱导为肝细胞样细胞***

张涛, 赵振国, 高辉

Induced differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells *in vitro*

Zhang Tao, Zhao Zhen-guo, Gao Hui

Abstract

BACKGROUND: The study of the induction of differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) into hepatocyte-like cells majorly concentrates on the induction of different inducing factors, and pays little attention on the induction of micro environment.

OBJECTIVE: To investigate the differentiation of rat BMSCs into hepatocyte-like cells.

METHODS: The rats BMSCs were isolated by density gradient centrifugation and purified by adherence cultivation, morphology feature of BMSCs were observed by microscope. The fetal liver cells were isolated by adherence cultivation after digesting the rats embryo liver of 3 weeks with collagenase. The negative control group was cultured in L-DMEM containing 10% fetal bovine serum. The purified BMSCs in the induced group were cultured in L-DMEM containing 10% fetal bovine serum with hepatocyte growth factor (HGF) and fetal liver cells.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with those in non-induced BMSCs, the levels of alpha-fetoprotein and albumin in the induced-BMSCs were higher ($P < 0.01$). Both glycogen and CK-18 were positive in the induced BMSCs. BMSCs can differentiate into hepatocyte-like cells with hepatic phenotype and function in the presence of HGF and fetal liver cells, which may be used as a kind of cell resources to treat severe hepatic disease.

Zhang T, Zhao ZG, Gao H. Induced differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells *in vitro*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(36): 6669-6672.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 目前体外诱导骨髓间充质干细胞分化为肝细胞样细胞的研究主要集中在不同诱导因子的诱导作用, 而微环境的诱导作用研究较少。

目的: 观察肝细胞生长因子、胎肝细胞对骨髓间充质干细胞体外诱导分化为肝细胞样细胞的影响。

方法: 采用密度梯度离心法分离大鼠骨髓间充质干细胞, 反复贴壁法纯化扩增骨髓间充质干细胞; 采用 I 型胶原酶消化法分离孕 3 周大鼠胚胎肝脏细胞, 差速贴壁法纯化肝脏细胞; 阴性对照组骨髓间充质干细胞只加入含体积分数为 10% 胎牛血清的 L-DMEM 培养基。诱导组在阴性对照组基础上加入一定浓度肝细胞生长因子或者与胎肝细胞共培养进行诱导分化。

结果与结论: 诱导组白蛋白、甲胎蛋白水平平均高于非诱导组 ($P < 0.01$), 诱导组糖原染色阳性, 免疫细胞化学染色 CK-18 阳性, 而非诱导组糖原染色、CK-18 均阴性。结果显示肝细胞生长因子和胎肝细胞均可在体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为具有肝细胞样细胞表型和功能的类肝细胞。

关键词: 肝细胞样细胞; 骨髓间充质干细胞; 胎肝细胞; 肝干细胞; 肝细胞生长因子

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.36.005

张涛, 赵振国, 高辉. 大鼠骨髓间充质干细胞体外诱导为肝细胞样细胞[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(36):6669-6672. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

越来越多的研究证明, 肝干细胞恶性转化为肝癌肝细胞是原发性肝癌发生的重要原因。骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 也称骨髓基质来源干细胞, 是肝细胞的重要来源细胞, BMSCs 可能是体内重要的肝干细胞, 其突变为肝癌干细胞可能是原发性发生的开始^[1-5]。因此, 人体干细胞的研究越来越受到人们的重视。目前体外诱导 BMSCs 分化为肝细胞样细胞的研究主要集中在探索不同诱导因子的诱导作用, 而微环境的诱导作用研究较少。本实验旨在观察肝细胞生

长因子 (hepatocyte growth factor, HGF)、胎肝细胞对 BMSCs 体外诱导分化为肝细胞样细胞的影响, 为研究 BMSCs 与肝癌肝细胞之间的关系打下坚实基础。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外观察。

时间及地点: 实验于 2010-01/2011-01 在成都医学院免疫学教研室完成。

材料:

实验动物: 清洁级 Wistar 大鼠 40 只, 6 周龄, 雌雄不拘; 孕 3 周 Wistar 大鼠 5 只, 均由成都医学院实验动物中心提供, 实验过程中对动物的

Center of Tumor
Diagnosis and
Treatment, PLA
General Hospital of
Chengdu Military
Region, Chengdu
610083, Sichuan
Province, China

Zhang Tao★, Master,
Chief physician,
Center of Tumor
Diagnosis and
Treatment, PLA
General Hospital of
Chengdu Military
Region, Chengdu
610083, Sichuan
Province, China
zhangtao269@
163.com

Supported by: the
Health Bureau of
Sichuan Province,
No. 070388; the
Science and
Technology Bureau of
Sichuan Province,
No. 2009JY0016*;
the Funding Project
of Chengdu Military
Region, No.
MB07013*

Received: 2011-01-12
Accepted: 2011-04-29

解放军成都军区
总医院肿瘤诊治
中心, 四川省成都
市 610083

张涛★, 1963 年
生, 四川省内江市
人, 汉族, 1990
年解放军第三军
医大学毕业, 硕
士, 主任医师, 主
要从事肿瘤内科、
肝癌干细胞研究
工作。
zhangtao269@
163.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225
(2011)36-06669-04

收稿日期: 2011-01-12
修回日期: 2011-04-29
(20110112005/M · W)

处置符合动物伦理学标准。

实验试剂:

主要试剂	来源
淋巴细胞分离液	上海恒信生物公司
DMEM-F12 培养基、RNA 提取试剂盒	Gibco 公司
胎牛血清	Hyclone 公司
I 型胶原酶、胰蛋白酶	Sigma 公司
肝细胞生长因子	Proptech 公司
兔抗大鼠 CK18 多克隆抗体	美国 Chemi-Con 公司
羊抗兔 IgG-FITC	晶美公司
RT-PCR 试剂盒	Takara 公司

方法:

BMSCs和胎肝细胞的获取和培养: 常规密度梯度离心加贴壁法分离获取大鼠BMSCs。无菌条件下取大鼠胫骨、股骨, 除去骨表面附着的组织, PBS液冲出骨髓腔中的骨髓, 制成单细胞悬液至无菌离心管中, 将每组大鼠的细胞悬液混合; 室温1 500 r/min离心8 min, 收集沉淀物用含体积分数为20%胎牛血清DMEM重悬后加在等体积的淋巴细胞分离液(1.077 mg/L)上, 室温1 500 r/min离心10 min; 取白膜层到无菌离心管中, 用含体积分数为20%胎牛血清低糖DMEM重悬细胞, 1 500 r/min离心10 min, 洗涤细胞1次, 最后弃上清。取10 μ L上述细胞悬液与100 μ L 2%冰醋酸混匀, 进行细胞计数。调整单个核细胞数为 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$, 接种到细胞培养瓶内。加入5 mL低糖DMEM完全培养基(含体积分数为20%胎牛血清、青霉素100 mg/L、链霉素100 mg/L), 置37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为5% CO_2 、饱和湿度的 CO_2 细胞培养箱中培养。原代细胞培养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%融合时, 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BMSCs。

大鼠胎肝细胞取自于孕3周清洁级Wistar大鼠胚胎肝组织, 经 I 型胶原酶消化后贴壁培养后获得。

实验分组: 取传至第3代的BMSCs, 设立3组。阴性对照组: 加入含体积分数为10%胎牛血清的L-DMEM培养基; HGF诱导组: 在阴性对照组基础上加入20 $\mu\text{g/L}$ HGF诱导分化20 d; 大鼠胎肝细胞共培养组: 在阴性对照组基础上加入大鼠胎肝细胞共培养诱导分化20 d。每3 d换液1次, 分别于诱导培养第3, 7, 14, 20天取各组细胞爬片进行免疫荧光化学染色、PS糖原染色、RT-PCR检测。

免疫荧光细胞化学染色(间接法): 各组在诱导20 d后行免疫荧光细胞化学染色, 一抗为兔抗大鼠CK-18 (1:100), 二抗为羊抗兔IgG-FITC, 荧光显微镜观察, 阳性结果为胞浆出现绿色荧光。

过碘酸希夫(PAS)实验: 于诱导20 d收集诱导细胞爬片, PBS漂洗细胞2次, 采用过碘酸希夫实验进行糖原

染色, 红紫色染色的积聚物视作糖原储存。

RT-PCR检测: 各组在诱导20 d进行细胞总RNA提取, 并进行AFP、ALB mRNA 的RT-PCR检测, 引物由Primier 5.0进行设计。AFP的引物: AFP Sense: 5'-TGC AGC CAA AGT GAA GAG GGA AGA-3', Anti sense: 5'-CAT AGC GAG CAG CCC AAA GAA GAA-3', 产物为317 bp。ALB的引物: ALB Sense: 5'-TGC TTG AAT GTG CTG ATG ATG ACA GGG-3', Anti sense: 5'-AAG GCA AGT CAG CAG GCA TCT CAT C-3', 产物为162 bp。GAPDH(内参照物): Sense: 5'-GGT GAA GGT CGG AGT CAA CG-3', Anti sense: 5'-CAA AGT TGT CAT GGA TGG ACC-3', 产物为500 bp。反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸45 s, 共30循环, 最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR产物于2%的琼脂糖凝胶、0.5 $\times$ TBE缓冲液中电泳检测, 电泳条件为60 V恒压, 紫外透视仪下观察电泳条带, 凝胶成像仪照相记录。

主要观察指标: ①BMSCs体外诱导后的形态学变化。②BMSCs体外诱导后免疫荧光染色检测CK18表达。③BMSCs体外诱导后过碘酸希夫实验检测储存糖原情况。④BMSCs体外诱导后RT-PCR检测AFP、ALB的mRNA表达。

2 结果

2.1 大鼠BMSCs体外诱导的形态学观察 见图1。

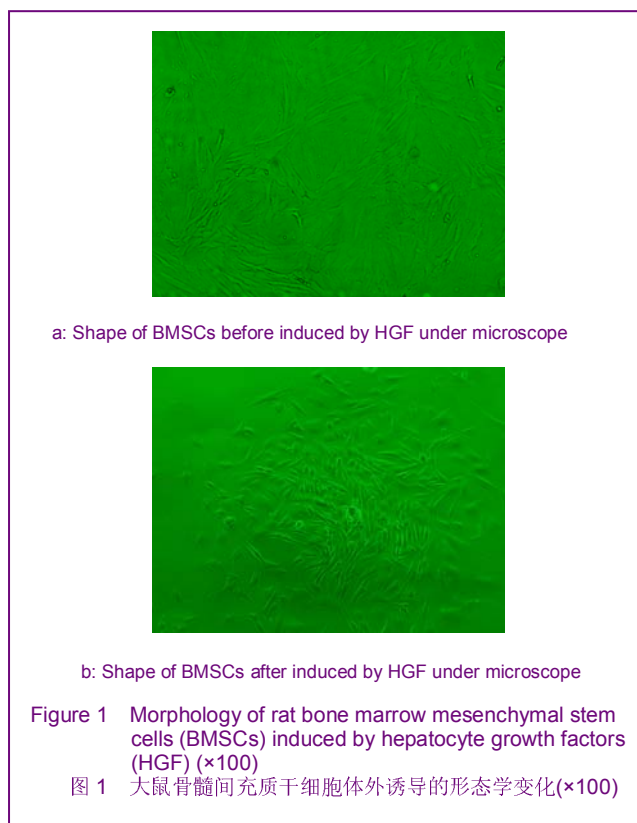
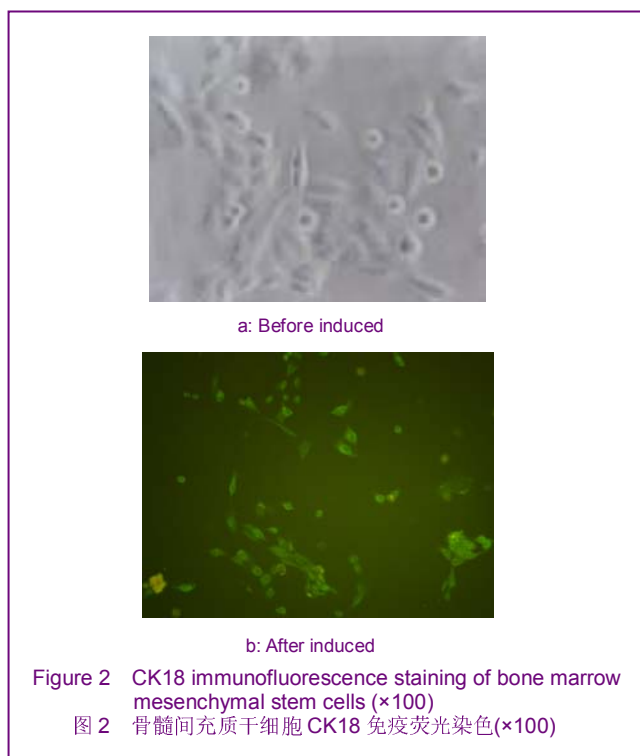


图1可见,第2代大鼠BMSCs大多呈现内皮细胞样的梭型或成纤维细胞样长条形,贴壁较紧,有克隆形成,平均10 d长满培养瓶底。加入各种诱导成分后,梭形或成纤维细胞样细胞随着诱导时间的延长变成纺锤型、不规则圆形或多角形,细胞数量逐渐变多。

2.2 免疫荧光细胞化学染色结果 HGF诱导后5 d及与大鼠胎肝细胞共培养7 d BMSCs CK18免疫荧光染色均呈现阳性,而阴性对照组为阴性着色,见图2。



2.3 过碘酸希夫实验结果 见图3。

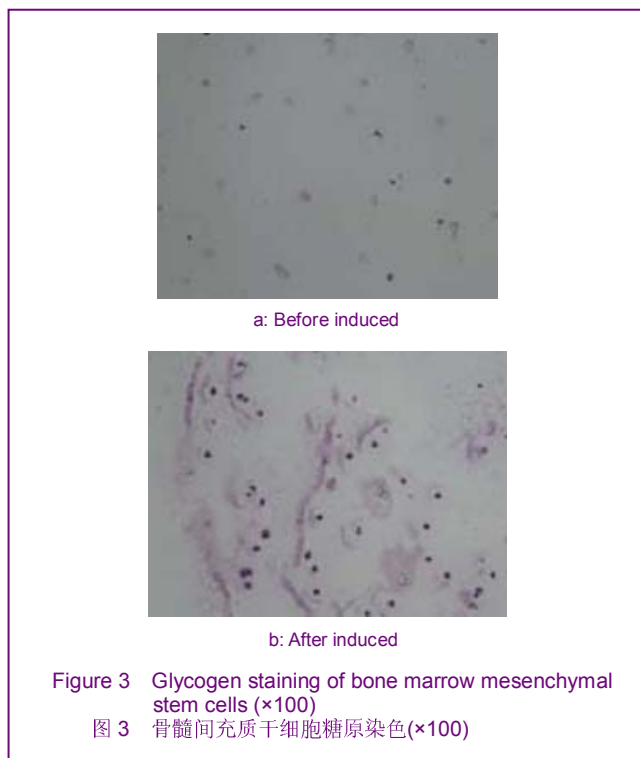
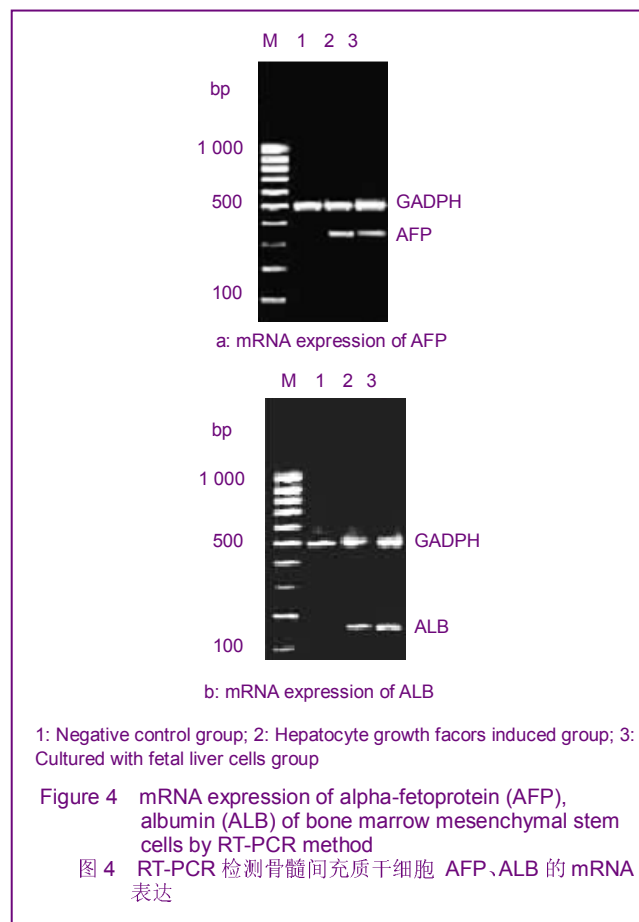


图3可见, HGF诱导后5 d及与大鼠胎肝细胞共培养7 d BMSCs糖原染色均呈强阳性。

2.4 RT-PCR结果 在诱导后20 d, HGF诱导组、与胎肝细胞共培养组AFP、ALB mRNA均呈阳性表达,而阴性对照组细胞的AFP、ALB mRNA呈阴性表达。结果表明HGF、与胎肝细胞共培养均能诱导大鼠BMSCs向肝细胞样细胞分化,见图4。



3 讨论

BMSCs具有多向分化潜能,是体内多种组织的种子细胞。BMSCs来源充足,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,很可能是肝干细胞重要的来源细胞。目前体外诱导BMSCs分化为肝细胞样细胞的研究主要集中在探索不同诱导因子的诱导作用,而对微环境的诱导作用研究较少。目前认为肝干细胞恶性转化为肝癌肝细胞是原发性肝癌发生的重要原因。

本实验采用梯度密度离心法,得到含BMSCs的骨髓单个核细胞,再利用BMSCs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BMSCs^[6-8]。这也是近年研究多采用的BMSCs分离方法。

HGF在肝细胞的发育和再生中起着不可替代的作用^[8-10]。本实验根据此前进行的诱导条件对大鼠BMSCs体外诱导类肝细胞的研究, 确定采用20 µg/L HGF在体外诱导BMSCs的分化。AFP、白蛋白、CK-18和糖原均为肝系细胞较为特异的标志。本实验诱导分化后的两组BMSCs均能够分泌AFP、白蛋白, 储存糖原, 表达CK-18肝细胞标记^[11-16], 证明HGF、与大鼠胎肝细胞同培养均成功诱导了大鼠BMSCs向具有肝细胞表型和功能的类肝细胞的分化。说明HGF和大鼠胎肝细胞为BMSCs体外分化提供了微环境, HGF和大鼠胎肝细胞是BMSCs分化为类肝细胞的关键因素。

总之, 正常状态下的大鼠BMSCs在体外通过HGF、与大鼠胎肝细胞共培养均可诱导分化为具有肝细胞功能和表型的类肝细胞。尽管所分化的肝细胞功能尚需进一步检测, 但从实验结果看, 初步认定大鼠BMSCs具有向肝细胞分化的能力, 进一步为研究其与肝癌干细胞之间的关系奠定了基础。

4 参考文献

- [1] Zhang M, Rosen JM. Stem cells in the etiology and treatment of cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2006;16(1):60-64.
- [2] Ma S, Chan KW, Hu L, et al. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2542-2556.
- [3] Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2003;362(9399):1907-1917.
- [4] Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, et al. Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*. 2006;66(19):9339-9344.
- [5] Yamashita T, Ji J, Budhu A, et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology*. 2009;136(3):1012-1024.
- [6] Heng BC, Haider HK, Sim EK, et al. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro. *Cardiovasc Res*. 2004;62(1):34-42.
- [7] Mallet VO, Mitchell C, Mezey E, et al. Bone marrow transplantation in mice leads to a minor population of hepatocytes that can be selectively amplified in vivo. *Hepatology*. 2002;35(4):799-804.

- [8] Chen Y, Dong XJ, Zhang GR, et al. Transdifferentiation of mouse BM cells into hepatocyte-like cells. *Cytotherapy*. 2006;8(4):381-389.
- [9] Ong SY, Dai H, Leong KW. Hepatic differentiation potential of commercially available human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng*. 2006;12(12):3477-3485.
- [10] Wang PP, Wang JH, Yan ZP, et al. Expression of hepatocyte-like phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;320(3):712-716.
- [11] Sheng XG, Feng JZ, Wu SL, et al. Diyi Junyi Daxue Xuebao. 2004;24(3):290-294.
- [12] Kang XQ, Zang WJ, Song TS, et al. Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes in vitro. *World J Gastroenterol*. 2005;11(22):3479-3484.
- [13] Wang LX, Fa Xen, Hou JF. *Shiyong Shenjing Jibing Zazhi*. 2005;8(2):8-9.
- [14] Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*. 2002;109(10):1291-1302.
- [15] Fiegel HC, Lioznov MV, Cortes-Dericks L, et al. Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells. *Stem Cells*. 2003;21(1):98-104.
- [16] Seo MJ, Suh SY, Bae YC, et al. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;328(1):258-264.

来自本文课题的更多信息一

基金资助: 四川省卫生厅课题(070388), 课题名称: 骨髓间充质干细胞在二乙基亚硝胺诱导大鼠原发性肝癌模型中的转化研究; 四川省科技厅课题(2009JY0016), 课题名称: 间充质干细胞在原发性肝癌微环境下的转归研究; 成都军区资助课题(MB07013), 课题名称: MSC在DENA诱导大鼠原发性肝癌模型中的转归研究。

作者贡献: 实验设计为张涛, 实施为赵振国, 实验评估为张涛, 资料收集为高辉。张涛成文、审校、对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

医学英语单词例句: 本刊英文部

Remit的用法及例句:

- vt. 汇出, 提交, 宽恕, 免除, 延迟
- vi. 汇款, 缓和, 减轻
- n. 移交事项

英英解释:

名词 remit:

1. the topic that a person, committee, or piece of research is expected to deal with or has authority to deal with
2. (law) the act of remitting (especially the

referral of a law case to another court)

同义词: remission, remittance

动词 remit:

1. send (money) in payment
2. hold back to a later time
- 同义词: postpone, prorogue, hold over,
- put over, table, shelve, set back, defer, put off
3. release from (claims, debts, or taxes)
4. refer (a matter or legal case) to another committee or authority or court for decision
- 同义词: remand, send back

5. forgive

6. make slack as by lessening tension or firmness

同义词: slacken

7. diminish or abate

本刊例句:

Because the sample size of this study was relatively small, and all patients were in the acute stages, further advances in understanding the role of uric acid in LETM could be gained from large-scale, longitudinal studies, with the inclusion of cases in the **remitting** stages or patients before and after treatment.