

骨髓间充质干细胞及其向肝样细胞分化的潜能

范敬静(河北北方学院附属第一医院感染科, 河北省张家口市 075000)

文章亮点:

- 1 此问题的已知信息: 骨髓间充质干细胞具有多向分化潜能, 在不同的诱导条件下, 其具有向中胚层和神经外胚层组织细胞分化的能力, 如成骨细胞、成脂肪细胞等, 近几年来, 很多研究表明其也有向肝细胞分化的能力。
- 2 文章增加的新信息: 细胞因子和生长因子如肝细胞生长因子、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子及肿瘤坏死因子 1 等在肝脏的发育和再生过程中起重要的作用, 单独和联合应用会在体外诱导骨髓间充质干细胞增殖并向肝系细胞分化。
- 3 临床应用的意义: 将骨髓间充质干细胞作为肝细胞移植的细胞来源有重要的临床意义。但是, 若要在临床上广泛应用骨髓间充质干细胞治疗终末期肝病, 还需要进一步确定体外及体内诱导转化证据, 不断完善分离纯化、扩增和诱导分化的技术方法, 以更有效地改善病变肝组织的结构和功能将成为今后研究的重要内容。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 肝样细胞; 骨髓间充质干细胞; 细胞分化; 肝细胞生长因子; 成纤维生长因子 4

主题词:

骨髓; 间质干细胞; 细胞分化; 肝细胞

范敬静, 女, 1985年生, 河北省赤城县人, 汉族, 2011年福建医科大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事相关肝病的研究。

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.28.025

[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)28-04578-05

稿件接受: 2014-06-17

摘要

背景: 研究表明, 在一定条件下骨髓间充质干细胞可诱导分化为肝样细胞, 为治疗急性肝衰竭等终末期肝病提供了新的思路。

目的: 对骨髓间充质干细胞的发现、分离培养、诱导分化及应用前景等方面做一综述。

方法: 计算机检索中国期刊网全文数据库以及 PubMed 数据库 1999 至 2014 年期间有关骨髓间充质干细胞及其向肝样细胞分化的文章。检索词分别为“肝样细胞, 骨髓间充质干细胞, 细胞分化”和“hepatocyte-like cells, bone marrow mesenchymal stem cells, differentiation”。最后选择 52 篇文章纳入结果分析。

结果与结论: 目前, 肝组织工程的首要问题是寻找性状稳定具有肝特异性功能的种子细胞, 成熟肝细胞获取难度较大, 并具有产生免疫排斥反应、体外培养困难等缺陷, 严重限制了肝移植的开展。骨髓间充质干细胞具有多向分化、自我更新快、易于扩增及培养等优点, 被认为是最有前途的细胞来源。已有研究表明骨髓间充质干细胞在体内外均可分化为肝细胞, 并具有肝细胞的合成和分泌功能。但如何大量扩增此类细胞的同时又能保持其良好的分化潜能、体外培养的最佳条件、诱导分化机制和临床应用的安全性等尚需进一步研究和探讨。

范敬静. 骨髓间充质干细胞及其向肝样细胞分化的潜能[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(28):4578-4582.

Differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells

Fan Jing-jing (Department of Infection, First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Studies have demonstrated that bone marrow mesenchymal stem cells can be induced to differentiate into hepatocyte-like cells under certain condition, which provides a new idea for the treatment of end-stage liver diseases, such as acute hepatic failure.

OBJECTIVE: To review the discovery, isolation and culture, induction and differentiation, and application prospects of bone marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: A computer-based online research of CNKI and PubMed databases was performed to collect articles about bone marrow mesenchymal stem cells and their differentiation into hepatocyte-like cells published between 1999 and 2014. The key words were “hepatocyte-like cells, bone marrow mesenchymal stem cells, cell differentiation” in Chinese and English. Finally, 52 articles were included in result analysis.

RESULTS AND CONCLUSION: Currently, the most important issue in liver tissue engineering is to find a kind of seed cells with stable traits and liver-specific functions. Mature hepatocytes are difficult to be harvested, and immune rejection and difficulty in *in vitro* culture also severely limit the development of liver transplantation. Bone marrow mesenchymal stem cells characterized as multiple differentiation, rapid self-renewal, easy to be cultured and proliferated have been considered as the most promising source of cells. Increasing studies have shown that bone marrow mesenchymal stem cells can differentiate into liver cells *in vitro* and *in vivo*, and differentiated cells have the synthesis and secretion functions same as hepatocytes. But how to proliferate such a large number of

Fan Jing-jing, Master, Physician, Department of Infection, First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China

Accepted: 2014-06-17

cells, to maintain the good differentiation potential of cells, to optimize the culture conditions *in vitro* as well as mechanisms of induction and differentiation mechanisms and clinical security need further studies.

Subject headings: bone marrow; mesenchymal stem cells; cell differentiation; hepatocytes

Fan JJ. Differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(28):4578-4582.

0 引言 Introduction

原位肝移植一直被认为是治疗各种终末期肝病的最理想方法^[1],但由于供肝缺乏、免疫排斥反应、手术风险大,费用高昂等缺陷限制了其广泛应用^[2]。于是,生物人工肝和细胞移植开始作为肝移植的辅助或替代疗法^[3-4],促进肝损伤后肝再生^[5]。目前,肝细胞虽然是理想供体,但同样其来源缺乏,并且肝细胞体外培养效果并不理想。在肝损伤的恢复过程中,干细胞起着重要的作用。近年来,成体干细胞可塑性概念的提出使成体干细胞的研究进入重新审视与发展的阶段。骨髓间充质干细胞具有多向分化潜能^[6],在不同的诱导条件下,其具有向中胚层和神经外胚层组织细胞分化的能力,如向成骨细胞^[7]、成软骨细胞^[8]、脂肪细胞^[9]、神经细胞^[10]、心肌细胞^[11]、肝细胞等分化^[12],同时骨髓间充质干细胞免疫原性低,可通过多种途径抑制同种异体免疫排斥反应,并且克服了使用胚胎干细胞和胚胎肝细胞治疗的伦理学问题,成为以干细胞为基础治疗肝病的更好选择。骨髓间充质干细胞的上述优势引起了科学工作者对骨髓间充质干细胞向肝细胞分化潜能的广泛关注。

最早提出骨髓间充质细胞有分化为肝细胞潜能的是Lee等^[13],他们在培养骨髓和脐血来源的间充质细胞时,先加入表皮生长因子和成纤维细胞生长因子,后加入烟酰胺、制瘤素M等进行诱导,结果发现不同来源的间充质细胞均可分化为具有肝细胞功能的类肝样细胞。2006年Snykers等^[14]以鸡尾酒方式诱导骨髓间充质细胞,按时间依从性连续加入:成纤维细胞生长因子、肝细胞生长因子、胰岛素-转铁蛋白-钠-亚硒酸盐、地塞米松,成功地模拟出体内肝细胞分化的不同阶段的模型,可用于药物临床前试验和研究细胞器官的发育。国内谢金敏等^[15]应用肝细胞生长因子、成纤维细胞生长因子4诱导人骨髓间充质干细胞分化为肝样细胞,分化的肝样细胞分泌肝细胞特异性产物甲胎蛋白、白蛋白、CK18等。大量实验研究使骨髓间充质干细胞成为了新的理想的种子细胞,为移植治疗急性肝衰竭等终末期肝病提供了新的思路。本课题从骨髓间充质干细胞的发现、分离培养、诱导分化及应用前景等方面做一综述。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 由作者检索 CNKI 数据库 (http://epub.cnki.net/kns/brief/default_result.aspx) 和 Pubmed 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)

的相关文献。中文检索词为“肝样细胞,骨髓间充质干细胞,细胞分化”;英文检索词为“hepatocyte-like cells, bone marrow mesenchymal stem cells, cell differentiation”。检索时间范围:1999至2014年。文献包括综述、临床研究和基础研究,共检索到250篇文献。

1.2 入选标准

纳入标准: ①具有原创性,论点论据可靠的文章。②有关骨髓间充质干细胞培养及鉴定的文章。③有关骨髓间充质干细胞向肝样细胞分化,应用类似于肝细胞生长因子的文章。④同一或相似内容选择近期发表或权威期刊发表的文章。

排除标准: 重复或类似的同一研究。

1.3 质量评估 共检索到相关文献250篇,其中英文111篇,中文139篇。阅读标题和摘要进行初筛,排除与研究目的不符和重复性文章;查阅全文,判断与纳入标准一致的文章,最后选择52篇符合标准的文献。

2 结果 Results

2.1 骨髓间充质干细胞的发现 1987年,Friedenstein等发现在塑料培养皿中培养的贴壁的骨髓单个核细胞在一定条件下可分化为骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞和肌肉细胞,而且这些细胞扩增20-30代后仍能保持其多向分化潜能,这类细胞被称骨髓间充质干细胞。此研究不仅证实了骨髓间充质干细胞的存在,而且为应用于临床提供了可靠的理论基础。

2.2 骨髓间充质干细胞的生物学特点 骨髓间充质干细胞最主要的生物学特点是体外扩增容易和黏附贴壁性强^[16],快速的增殖能力是应用其进行细胞治疗的基础,而黏附贴壁性有利于细胞的纯化培养。

2.2.1 表面标志 目前为止,尚未发现骨髓间充质干细胞特异的表面标志^[17-18]。但可表达区别于造血干细胞的表面标志,包括CD13、SH2、SH3、CD29、CD71、CD90、CD100、CD166、CD120a、CD124、CD49b等,表达低水平的CD44、CDW90,不表达造血系特征标志CD14、CD34、CD45、CD50,也不表达与人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)识别有关的共刺激分子B7-1、B7-2及主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC) II类分子报告,如HLA-DR抗原等。

2.2.2 分离培养 目前常用的分离骨髓间充质干细胞的方法主要有4种:①全骨髓贴壁培养法^[19]:此方法根

据骨髓间充质干细胞具有贴壁生长而造血细胞悬浮生长的特性对其进行筛选。应用贴壁培养法通过多次传代换液, 除去悬浮生长的造血细胞, 细胞增殖较快, 可短时间内获得大量细胞, 缺点是所得细胞的纯度不足, 细胞均一性差, 但其分化诱导特性不受影响。②密度梯度离心法: 该法根据骨髓间充质干细胞与其他细胞的密度不同而采用Percoll分离液, 能有效地将红细胞、白细胞和骨髓间充质干细胞分离开来, 分离获得的细胞较为均一, 但多向分化及增殖力较差。③流式细胞仪分选法及免疫磁珠法: 此两种方法虽具有高度专一性, 但成本较高、步骤复杂、分选后的细胞不易贴壁, 对细胞的活性影响较大。根据骨髓间充质干细胞有贴壁生长的特点, 在实际使用中往往更多地使用密度梯度离心法和贴壁培养法联合分离骨髓间充质干细胞。Petersen等^[20]采用全骨髓贴壁培养法分离纯化骨髓间充质干细胞, 通过多次换液、传代除去造血系细胞等非贴壁细胞, 得到纯度较高的骨髓间充质干细胞, 利用流式细胞技术进行鉴定, 所得细胞表达CD29、CD90, 不表达CD34、CD45等造血干细胞表面特异标志。此法能较大限度的保持干细胞活性, 而且操作简便, 有利于临床干细胞的移植。

2.3 骨髓间充质干细胞的诱导分化潜能 骨髓间充质干细胞可塑性已得到证实, 它具有定向分化或是横向分化为一些成体细胞的潜能。Petersen等1999年首先报道, 用2-AFF阻断大鼠肝细胞增殖, CCL4造成肝细胞损伤, 进行性别交叉骨髓细胞移植, 或者全肝移植, 在肝脏中发现来源于骨髓的肝细胞。Theise等^[21]又报道了女性患者接受男性供体的骨髓移植后, 受体的一些肝细胞和胆管上皮细胞核内含有Y染色体。两者均证明了骨髓干细胞或造血干细胞能够在鼠肝内转化为肝卵圆细胞甚至成熟的肝细胞和胆管细胞。Terai等^[22]发现荧光蛋白阳性标记的骨髓细胞定植在肝小叶门脉周围, 4周后肝脏中有25%的细胞是骨髓细胞, 并横向分化为能分泌白蛋白的成熟肝细胞。以上均表明, 体内环境和肝脏本身微环境是促进骨髓间充质干细胞向肝样细胞转化的关键因素, 分化的肝样细胞能够对损伤肝脏起到一定的修复作用。

骨髓间充质干细胞在动物体内可以分化为肝样细胞得到了证实, 但对其诱导的最佳环境还处于摸索阶段。对于诱导分化的条件, 目前尚未发现比较理想的统一方法。在体外诱导剂的作用下, 骨髓间充质干细胞也可以向肝实质细胞转化^[23-27]。细胞因子和生长因子如肝细胞生长因子^[28]、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子及肿瘤坏死因子1等在肝脏的发育和再生过程中起重要的作用, 单独和联合应用会在体外诱导骨髓干细胞增殖并向肝系细胞分化。肝细胞生长因子主要在肝脏Kupfer细胞与窦内皮细胞中产生, 对肝细胞有促进有丝分裂作用, 在肝脏的发育成熟和再生过程中发挥重要作用, 因

此添加肝细胞生长因子被广泛用在肝相关干细胞体外诱导分化的实验中。成纤维细胞生长因子4也是一种多功能细胞生长因子, 能刺激来源于中胚层和神经外胚层细胞的生长。ITS等营养物质也在肝细胞发育和再生中起着不可代替的作用。

白蛋白、甲胎蛋白、细胞角蛋白18及糖原均为肝系细胞的特异性标志。甲胎蛋白和白蛋白都是一种胞浆蛋白, 甲胎蛋白由肝前体细胞分泌, 随着细胞的成熟而消失, 成熟肝细胞不表达。细胞角蛋白18是肝细胞相对特异性的一种角蛋白, 在幼稚的肝前体细胞不表达, 当肝细胞趋于成熟或已成熟时表达。糖原合成是成熟肝细胞特有的功能。有实验采用肝细胞生长因子(20 $\mu\text{g/L}$)和成纤维细胞生长因子4(10 $\mu\text{g/L}$)作为诱导剂, 辅以ITS、Dex等因子体外诱导骨髓间充质干细胞向肝细胞样细胞定向分化^[29]。经过多个检测结果验证, 支持骨髓间充质干细胞向成熟肝细胞定向分化, 且随着诱导时间的延长, 具有分泌白蛋白、合成糖原功能的肝细胞样细胞逐渐增多, 提示此类细胞具有成熟肝细胞的功能, 为替代肝细胞移植打下了一定基础。Schwartz等^[30]从人、大鼠及小鼠骨髓中分离出间充质干细胞, 在培养体系中加入成纤维细胞生长因子4、肝细胞生长因子等诱导后, 检测到CK18、甲胎蛋白等一些肝细胞特有的表面标志。Lange等^[31]用GFP标记骨髓间充质干细胞, 纤维连接蛋白为底物, 加入胎肝细胞共同培养, 流式细胞仪分离GFP(+)、GFP(-)细胞, RT-PCR发现2周后表达甲胎蛋白、细胞角蛋白18、白蛋白, 提示骨髓间充质干细胞和胎肝细胞共同培养的微环境不但有利于骨髓间充质干细胞向肝细胞的分化扩增, 也利于胎肝细胞的分化。Chen等^[32]将CCl₄注射的小鼠肝脏进行培养, 收集肝损伤血清, 用于诱导小鼠骨髓单个核细胞分化。诱导后细胞呈类圆形肝细胞样变化。RT-PCR示: 第7天甲胎蛋白、细胞角蛋白19基因表达; 第14天白蛋白、细胞角蛋白18、肝细胞核因子3 β 基因表达; 第21天酪氨酸胺基转移酶表达。免疫荧光示: 第21天白蛋白、细胞角蛋白18、细胞角蛋白19、甲胎蛋白基因表达。Chivu等^[33]也相继证实骨髓间充质干细胞暴露于体外诱导因素, 可向肝样细胞分化。但是有关干细胞诱导的肝样细胞多是进行表型鉴定, 而没有在功能水平进行分析, 而肝样细胞的功能是细胞治疗的前提。所以应该就进入肝中定植的骨髓间充质干细胞发挥的具体作用机制做进一步深入研究。

2.4 骨髓间充质干细胞的应用前景及存在的问题 中国是肝病大国, 慢性乙型肝炎患者占全国总人数的1/10, 约30%的肝炎患者最终因肝功能衰竭而死亡, 虽然肝移植手术在临床上已有了广泛的开展, 因供肝缺乏, 费用昂贵, 尚存在免疫排斥问题, 严重限制了肝移植的开展^[34-43], 故其临床价值受限, 受益者极少。目前主要采取维持和支持疗法治疗各种急慢性肝病, 生物人工

肝和肝细胞移植因肝细胞来源所限而不能在临床上发挥更大作用,故应用骨髓间充质干细胞作为新型的种子细胞治疗终末期肝病具有很多优点:其体外分离、纯化、扩增、定向诱导分化技术及相应的分子调控机制等方面取得一定进展;取材于患者本人,传代扩增并定向分化为靶细胞后再回输给患者本人,安全性高;没有异体排斥反应,并且避免了胚胎干细胞研究的伦理学争论,故临床应用前景非常突出^[44]。

同时,骨髓间充质干细胞也存在一些不足:①由于人骨髓中具有能分化为肝细胞的骨髓间充质干细胞数量很少,约占骨髓中有核细胞数量的1/100 000,5 mL骨髓中仅能得到300-1 000个,所以原代获得的骨髓间充质干细胞数量远不能满足肝组织工程的需要。②骨髓间充质干细胞体外扩增纯化速度较慢,尚无法在短时间内获得足够数量的肝干细胞,来满足急性肝衰竭患者的迫切需要。③种植后的干细胞是否能够持续数代的有效分裂和存活,并发挥相应的功能。④移植数量需达到临床需要的移植要求。⑤选择合适的移植部位以避免肺栓塞的发生,以及进入受体体内细胞数量的多少均有待于进一步探讨。⑥干细胞的归巢和定位及体内增殖情况:目前常用的细胞追踪定位方法多为GFP绿色荧光蛋白及菲力磁等,但此类方法只表明细胞进入定植部位,但对定植体内后细胞的分化增殖及功能活性状态尚缺乏进一步的了解。

3 结论 Conclusion

目前,肝组织工程的首要问题是寻找性状稳定具有肝特异性功能的种子细胞,成熟肝细胞获取难度较大,并具有产生免疫排斥反应、体外培养困难等缺陷,故严重限制了肝移植的开展。骨髓间充质干细胞具有多向分化、自我更新快、易于扩增及培养等优点,这使得其具有较大的临床价值,被认为是最有前途的细胞来源。已有研究表明骨髓间充质干细胞在体内外均可分化为肝细胞,并具有肝细胞的合成和分泌功能^[45-52]。但如何在大量扩增此类细胞的同时又能保持其良好的分化潜能、体外培养的最佳条件、诱导分化机制和临床应用的安全性等尚需进一步研究和探讨。

作者贡献: 资料收集、分析、成文均为范敬静。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 未涉及伦理冲突的内容。

学术术语: 免疫磁珠法-这一方法的核心是在磁珠表面包被具免疫反应性的抗体进行抗原抗体反应,在细胞表面形成玫瑰花结,这些结合了磁珠的细胞一旦置于强大的磁场下,就会与其他未被结合的细胞分群,具超强顺磁场的磁珠脱离磁场后立即消失磁性,这样就可以筛选或去除所标记的细胞,从而达到阳性或阴性选择细胞的目的。

作者声明: 文章为原创作品,无抄袭剽窃,无泄密及署名和专利争议,内容及数据真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Ng KK, Lo CM. Liver transplantation in Asia: past, present and future. *Ann Acad Med Singapore*. 2009;38(4):322-332.
- [2] Gilchrist ES, Plevris JN. Bone marrow-derived stem cells in liver repair: 10 years down the line. *Liver Transpl*. 2010;16(2): 118-129.
- [3] Kawashita Y, Guha C, Yamanouchi K, et al. Liver repopulation: a new concept of hepatocyte transplantation. *Surg Today*. 2005; 35(9):705-710.
- [4] Stieger B, Peters R, Sidler MA, et al. Hepatocyte transplantation: potential of hepatocyte progenitor cells and bone marrow derived stem cells. *Swiss Med Wkly*. 2007;137 Suppl 155:55S-59S.
- [5] Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology*. 2004;39(6): 1477-1487.
- [6] Hang HL, Xia Q. Role of BMSCs in liver regeneration and metastasis after hepatectomy. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(1):126-132.
- [7] Yang Y, Tao C, Zhao D, et al. EMF acts on rat bone marrow mesenchymal stem cells to promote differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Bioelectromagnetics*. 2010;31(4):277-285.
- [8] Hu J, Feng K, Liu X, et al. Chondrogenic and osteogenic differentiations of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on a nanofibrous scaffold with designed pore network. *Biomaterials*. 2009;30(28):5061-5067.
- [9] Allan EH, Ho PW, Umezawa A, et al. Differentiation potential of a mouse bone marrow stromal cell line. *J Cell Biochem*. 2003;90(1):158-169.
- [10] Alberti E, Los M, García R, et al. Prolonged survival and expression of neural markers by bone marrow-derived stem cells transplanted into brain lesions. *Med Sci Monit*. 2009; 15(2):BR47-54.
- [11] Yoon J, Choi SC, Park CY, et al. Bone marrow-derived side population cells are capable of functional cardiomyogenic differentiation. *Mol Cells*. 2008;25(2):216-223.
- [12] Anzalone R, Lo Iacono M, Corrao S, et al. New emerging potentials for human Wharton's jelly mesenchymal stem cells: immunological features and hepatocyte-like differentiative capacity. *Stem Cells Dev*. 2010;19(4):423-438.
- [13] Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*. 2004;40(6):1275-1284.
- [14] Snykers S, Vanhaecke T, Papeleu P, et al. Sequential exposure to cytokines reflecting embryogenesis: the key for in vitro differentiation of adult bone marrow stem cells into functional hepatocyte-like cells. *Toxicol Sci*. 2006;94(2): 330-341.
- [15] 谢金敏, 陈建锋, 高毅, 等. 人骨髓间充质干细胞体外分化为肝样细胞的实验研究[J]. *南方医科大学学报*, 2006, 26(10): 1439-1442.
- [16] Pontikoglou C, Deschaseaux F, Sensebé L, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells: biological properties and their role in hematopoiesis and hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cell Rev*. 2011;7(3):569-589.

- [17] Poliseti N, Chaitanya VG, Babu PP, et al. Isolation, characterization and differentiation potential of rat bone marrow stromal cells. *Neurol India*. 2010;58(2):201-208.
- [18] Hasebe Y, Hasegawa S, Hashimoto N, et al. Analysis of cell characterization using cell surface markers in the dermis. *J Dermatol Sci*. 2011;62(2):98-106.
- [19] Li W, Liu SN, Luo DD, et al. Differentiation of hepatocytoid cell induced from whole-bone-marrow method isolated rat myeloid mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol*. 2006;12(30):4866-4869.
- [20] Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. 1999;284(5417):1168-1170.
- [21] Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*. 2000;32(1):11-16.
- [22] Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, et al. An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem*. 2003;134(4):551-558.
- [23] 司煜安,许文荣,严永敏,等.体外诱导人骨髓间质干细胞分化为肝细胞样细胞[J].江苏大学学报:医学版,2008,18(1):6-10,14.
- [24] Shi XL, Qiu YD, Wu XY, et al. In vitro differentiation of mouse bone marrow mononuclear cells into hepatocyte-like cells. *Hepatol Res*. 2005;31(4):223-231.
- [25] 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.
- [26] Snykers S, Vanhaecke T, Papeleu P, et al. Sequential exposure to cytokines reflecting embryogenesis: the key for in vitro differentiation of adult bone marrow stem cells into functional hepatocyte-like cells. *Toxicol Sci*. 2006;94(2):330-341.
- [27] Xie JM, Chen JF, Gao Y, et al. Hepatocyte growth factor and fibroblast growth factor-4-induced differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells in vitro. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2006;26(10):1439-1442.
- [28] 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.
- [29] 范敬静,李东良,何秀华,等.骨髓间充质干细胞向肝样细胞的诱导及分化[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(14):2491-2494.
- [30] 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.
- [31] Lange C, Bruns H, Kluth D, et al. Hepatocytic differentiation of mesenchymal stem cells in cocultures with fetal liver cells. *World J Gastroenterol*. 2006;12(15):2394-2397.
- [32] Chen Y, Dong XJ, Zhang GR, et al. In vitro differentiation of mouse bone marrow stromal stem cells into hepatocytes induced by conditioned culture medium of hepatocytes. *J Cell Biochem*. 2007;102(1):52-63.
- [33] Chivu M, Dima SO, Stancu CI, et al. In vitro hepatic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells under differential exposure to liver-specific factors. *Transl Res*. 2009;154(3):122-132.
- [34] 中华医学会感染病学分会,中华医学会肝病学会.肝衰竭诊疗指南[J].中华肝脏病杂志,2006,14(9):643-646.
- [35] Nguyen NT, Vierling JM. Acute liver failure. *Curr Opin Organ Transplant*. 2011;16(3):289-296.
- [36] Dahlke MH, Popp FC, Bahlmann FH, et al. Liver regeneration in a retrorsine/CCl4-induced acute liver failure model: do bone marrow-derived cells contribute. *J Hepatol*. 2003; 39(3):365-373.
- [37] 姚鹏,王帅,胡大荣,等.肝动脉自体骨髓干细胞移植治疗失代偿期肝硬化30例[J].世界华人消化杂志,2005,13(13):1639-1640.
- [38] Miyazaki M, Hardjo M, Masaka T, et al. Isolation of a bone marrow-derived stem cell line with high proliferation potential and its application for preventing acute fatal liver failure. *Stem Cells*. 2007;25(11):2855-2863.
- [39] Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One*. 2007;2(9):e941.
- [40] Sharma AD, Cantz T, Manns MP, et al. The role of stem cells in physiology, pathophysiology, and therapy of the liver. *Stem Cell Rev*. 2006;2(1):51-58.
- [41] Am Esch JS 2nd, Knoefel WT, Klein M, et al. Portal application of autologous CD133+ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells*. 2005; 23(4):463-470.
- [42] Gilchrist ES, Plevris JN. Bone marrow-derived stem cells in liver repair: 10 years down the line. *Liver Transpl*. 2010;16(2):118-129.
- [43] Serralta A, Donato MT, Martinez A, et al. Influence of preservation solution on the isolation and culture of human hepatocytes from liver grafts. *Cell Transplant*. 2005;14(10):837-843.
- [44] Kasai S, Sawa M. Hepatocyte transplantation for the treatment of hepatic failure. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. 2000;45(13 Suppl):2301-2306.
- [45] Li J, Wu W, Xin J, et al. Acute hepatic failure-derived bone marrow mesenchymal stem cells express hepatic progenitor cell genes. *Cells Tissues Organs*. 2011;194(5):371-381.
- [46] Li J, Tao R, Wu W, et al. Transcriptional profiling and hepatogenic potential of acute hepatic failure-derived bone marrow mesenchymal stem cells. *Differentiation*. 2010; 80(2-3):166-174.
- [47] 何金秋.骨髓间质干细胞的研究现状及其在肝衰竭治疗中的应用[J].传染病信息,2008,21(5):275-277.
- [48] 邢全台,孙启龙,李栋,等.骨髓间充质干细胞向肝细胞样细胞的诱导分化[J].世界华人消化杂志,2009,17(26):2654-2661.
- [49] Shi XL, Qiu YD, Wu XY, et al. In vitro differentiation of mouse bone marrow mononuclear cells into hepatocyte-like cells. *Hepatol Res*. 2005;31(4):223-231.
- [50] Bird TG, Lorenzini S, Forbes SJ. Activation of stem cells in hepatic diseases. *Cell Tissue Res*. 2008;331(1):283-300.
- [51] Kuo TK, Hung SP, Chuang CH, et al. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells. *Gastroenterology*. 2008; 134(7):2111-2121.
- [52] Yagi K, Kojima M, Oyagi S, et al. Application of mesenchymal stem cells to liver regenerative medicine. *Yakugaku Zasshi*. 2008;128(1):3-9.