

骨髓间质干细胞肝向诱导分化前后 肝功能代偿能力的比较

刘芳^{1,2}, 陈少红², 刘青波², 范新娟², 唐芳², 刘大伟², 赵国强²

(1. 南华大学医学院病理学教研室, 湖南衡阳 421001;

2. 中山大学附属第一医院 病理科)

摘要: **目的** 探讨不同分化状态骨髓间质干细胞移植对急性肝功能衰竭大鼠的肝功能重建的影响, 并进行综合比较评估。 **方法** 以 D-氨基半乳糖胺 (D-gal) 构建的雌性大鼠急性肝衰竭模型后大鼠, 随机分为 4 组: BMSCs 移植组, 幼稚肝细胞移植组, 成熟肝细胞移植组和空白对照组, 结合多项血生化指标对不同分化阶段 BMSCs 的肝功能代偿能力进行综合评估。并以 sry 基因为分子标志, 采用 PCR 技术检测植入细胞在受体动物体内的存留状态及定位情况。 **结果** 各组肝衰竭模型动物经细胞移植后, 所测各项血清生化指标均有显著变化。血清谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、总胆红素 (TBIL) 的水平明显下降, 白蛋白 (ALB) 的水平有所上升。各移植组之间相比, 诱导至成熟肝细胞状态的细胞无论对肝功能的改善或是降低动物死亡率, 效果均为最优。细胞移植后的第 30 天, 仍能在受体动物肝脏内检查到 sry 基因信号。 **结论** 体外诱导分化至不同阶段的 BMSCs 均能在一定程度上代偿衰竭肝脏的功能, 而诱导分化至成熟状态的细胞对肝功能的代偿能力最强, 可作为代偿肝功能的重要细胞源之一。

关键词: 骨髓间质干细胞; 定向分化; 肝衰竭; 细胞移植

中图分类号: 394.2 文献标识码: A 文章编号: 2095-1116(2011)03-0246-04

Comparative Study on the Effects on Restoring Hepatic Functions by Transplantation of Hepatic Induced Bone Marrow Stromal Cells in Different Differentiated State

LIU Fang, CHEN Shao-hong, LIU Qing-bo, et al

(Department of Pathology, Medical College, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects on restoring hepatic functions of acute hepatic failure model rat by transplantation of hepatic induced bone marrow stromal cells (BMSCs) in different differentiated state. **Methods** D-galactosamine (D-gal) was served as hepatic toxic agent, female SD rats with acute hepatic failure model were randomly divided into 4 groups: BMSCs transplantation group, mature hepatocyte-like cells transplantation group, immature hepatocyte-like cells transplantation group and control group. The compensatory ability of hepatic functions of the transplanted cells was evaluated according to the changes of biochemical markers in serum, and sry gene was tested in the liver and lung of the receiver rat by PCR technique. **Results** There are distinct changes of the tested serum biochemical markers of acute hepatic failure model rat after cell transplantation. The serum levels of ALT, AST, and TBIL were distinctly descended, and the level of ALB was ascended. The ability of improving hepatic function and depressing mortality of the mature induced hepatocyte-like cells is the best among all the cell transplantation groups. The signal of sry gene can be detected in the liver of the receiver rat till 30 days after cell transplantation. **Conclusions** Both the in vitro hepatic induced differentiated BMSCs

收稿日期: 2010-11-26

基金项目: 国家自然科学基金资助 (No. 30170473); 广东省自然科学基金资助 (No. 04009326); 湖南省教育厅课题资助 (No. 08C744); 肿瘤细胞与分子病理学湖南省高校重点实验室资助; 湖南省高校创新平台开放基金资助 (No. 09K074, 09K075).

通讯作者: 赵国强, 电话: 020-87331075, E-mail: zhaogq@mail.sysu.edu.cn.

(immature induced and mature induced) and the non-induced BMSCs have a compensatory ability of the prostrate hepatic functions. However, the ability of the mature induced hepatocyte-like cells to improve hepatic function and to depress mortality is better than that of immature differentiated cells as well as non-induced BMSCs, and may be first selected as a cell source of cell transplantation.

Key words: bone marrow stromal cell; directed differentiation; hepatic failure; cell transplantation

急性肝功能衰竭是各种肝脏疾病的主要死因之一,其治疗是临床工作中的一个难题。目前,各种理化的肝功能支持治疗并不能很好地替代受损的肝功能。原位肝脏移植(Orthotopic Liver Transplantation, OLT)被认为是目前最有效的治疗方法,但健康肝脏来源的严重短缺使得肝脏移植的应用受到了极大的制约,以致许多病人在痛苦的等待中死亡。肝细胞或干细胞移植(Hepatic Cell Transplantation, HCT)技术可以通过向病人体内植入健康的肝细胞或具有向肝细胞分化能力的干细胞使肝脏的功能短暂重建,为等待肝脏移植赢得足够的时间。但细胞源问题和细胞移植技术的发展距临床上的要求还有较大的差距,仍需不断地完善。骨髓间质细胞(Bone marrow stromal cells, BMSCs)是一种多能干细胞,已有实验表明可在特定条件下向肝细胞方向分化^[1,2]。本研究组前期工作运用肝损伤动物模型的实验血清及肝组织萃取物成功诱导出了能够表达幼稚肝细胞标志和成熟肝细胞标志的肝细胞样细胞^[3~5]。本实验拟采用体外诱导的不同分化阶段的 BMSCs 进行体内移植,以观察其肝功能代偿能力,并对其性能优劣进行比较评估。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用健康雄性 SD 大鼠 4 只,6 周龄,体重 100 ~ 150 g,用于骨髓间质干细胞的供体;健康雌性 SD 大鼠 40 只,6 周龄,体重 100 ~ 150 g,用于构建急性肝衰竭动物模型及细胞移植的受体。所有动物均为清洁级,由中山大学实验动物中心提供。

1.2 BMSCs 的分离、培养和鉴定

断颈处死雄性 SD 大鼠,无菌条件下取双侧股骨和胫骨。用手术剪从股骨或胫骨的中间剪断,暴露骨髓腔, Hank's 液冲洗骨髓腔。用注射器将骨髓组织打散成单个细胞悬液,离心 10 min (1 000 r/min),去上清。用 DMEM/F12 (GIBCO, 美国) 培养液(含 10% 胎牛血清, 10 μ g/L EGF)重悬细胞,接种于 75 cm² 塑料培养瓶。3 天后首次换液,以后每 2 ~ 3 天换液一次,长至 8 ~ 9 分满时,即行传代。连续传至第 5 代,收集

贴壁细胞,即为骨髓间质细胞。经流式细胞仪分析,细胞的分子表型为 CD29⁺ CD44⁺ CD34⁻ CD45⁻^[3]。

1.3 BMSCs 的诱导分化

采用文献[3] ~ [5] 之方法,取传至第 5 代的 BMSCs 按 1 \times 10⁴ cells/cm² 接种至 75 cm² 塑料培养瓶,24 小时后除去含血清 DMEM/F12 培养基,换用诱导培养基(基础培养基 + 0.15 g/L 肝损伤组织萃取物)定向诱导。每三天换全液,分别于诱导的第 11 天和第 20 天收集细胞,对其分化状态进行检测。

1.4 BMSCs 分化状态的确定

各组细胞分别提取总 RNA,以 RT-PCR 技术检测细胞的分化状态。各标志分子引物序列及扩增片段长度分别为:(1) M₂-PK (M₂ 型丙酮酸激酶,幼稚肝细胞分子标志),上游 5' CCATCTACCACTTGCAGTTATTCGA3',下游 5' TCATGGTACAGGCACTAC ACGC3',扩增片段长度 431 bp;(2) Albumin (成熟肝细胞分子标志),上游 5' GAGCCCGAAAGAAACGAGTGTT3',下游 5' GGGGAATCTCTGGCTCATA CG3',扩增片段长度 389 bp;(3) BST-1 (骨髓间质抗原,骨髓间质细胞分子标志),上游 5' TGTGCCCCCTCATGACTATGA3',下游 5' GGATCTTAACACTGCCTTCGC3',扩增片段长度 485 bp;(4) GAPDH (内参照),上游 5' CCATGGAGAAGGCTGGG3',下游 5' CAAAGTTGTCATGGATGACC3',扩增片段长度 180 bp。反应体系置于 PCR 仪(Eppendorf 5345, 德国)进行扩增,1.5% 琼脂糖电泳、显色、成像。

1.5 急性肝衰竭动物模型构建及分组

参照文献[6]之方法,雌性 SD 大鼠 40 只,禁食 12 小时后,一次性腹腔注射 D-gal 1.4 g/kg 构建大鼠急性肝衰竭模型。将大鼠随机分为 4 组:BMSCs 移植组:以未诱导的 BMSCs 细胞移植;幼稚肝细胞移植组:以诱导至 11 天,表达 M₂-PK 的细胞移植;成熟肝细胞移植组:以诱导至 20 天,表达 Albimin 的细胞移植;空白对照组:以无细胞的基础培养基进行假移植。

1.6 细胞移植

雌性大鼠一次性腹腔注射 D-gal 12 小时后,动物用 10% 水合氯醛以 2.5 mL/kg 体重腹腔注射麻醉。剪开腹股沟皮肤,暴露腹股沟静脉,各组以 5 \times

10⁶ cells/0.5 mL DMEM/F12,用1 mL注射器(4号针头)缓慢经腹股沟静脉注入,压迫止血,缝合皮肤。所有手术操作均遵循无菌术原则,术后青霉素20万IU/只肌注,一天一次,连续3天。

1.7 肝功能的检测

采用剪尾采血,离心后取血清,用全自动生化分析仪(日立7170,日本)检测细胞移植前后动物血清谷丙转氨酶(Alanine aminotransferase,ALT),谷草转氨酶(Aspartate aminotransferase,AST),总胆红素(Total bilirubin,TBIL),白蛋白(Albumin,ALB)等水平。

1.8 sry 基因检测

采用PCR技术对雄性性别决定基因sry进行跟踪,以监测植入细胞在受体动物体内的存留时间及定位情况。移植术后第7、第14和第30天断颈处死大鼠,取出肝脏和肺脏,提取DNA。sry基因引物序列及扩增片段长度为:上游5'-CATCTCTGACTTC-CTGGTTGCAA-3',下游5'-ATGCTGGATTCTGTT-GAG CC-3',扩增产物长度180 bp。反应体系置于PCR仪(Eppendorf 5345,德国)进行基因扩增,1.5%琼脂糖电泳、显色、成像。

1.9 统计学分析

采用统计软件SAS 8.1对各数据进行统计分析。实验结果采用 $\bar{x} \pm s$;两组样本均数比较采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 BMSCs 诱导分化过程中分子表达特征

作为骨髓间质细胞固有的分子标志,BST-1的表达一直持续到诱导分化的第11天,但在诱导至第20天时消失(图1A)。幼稚肝细胞的分子标志M₂-PK的表达信号在诱导分化的第11天开始出现,至第20天时重新消失(图1B)。成熟肝细胞的分子标志Albumin直至诱导分化的第20天才开始出现(图

1C)。

2.2 肝衰动物细胞移植前后血清学指标变化特征

各组肝衰模型动物经细胞移植后,所测各项血清生化指标均有显著变化。ALT、AST、TBIL的水平明显下降,ALB的水平有所上升。统计学分析显示,与对照组相比,各细胞移植组各类肝功能生化指标均有显著改善($P < 0.05$);各移植组之间相比,成熟肝细胞移植组对肝功能的改善优于幼稚肝细胞移植组($P < 0.05$);而幼稚肝细胞移植组和BMSC细胞移植组之间差异则无显著性($P > 0.05$,表1)。

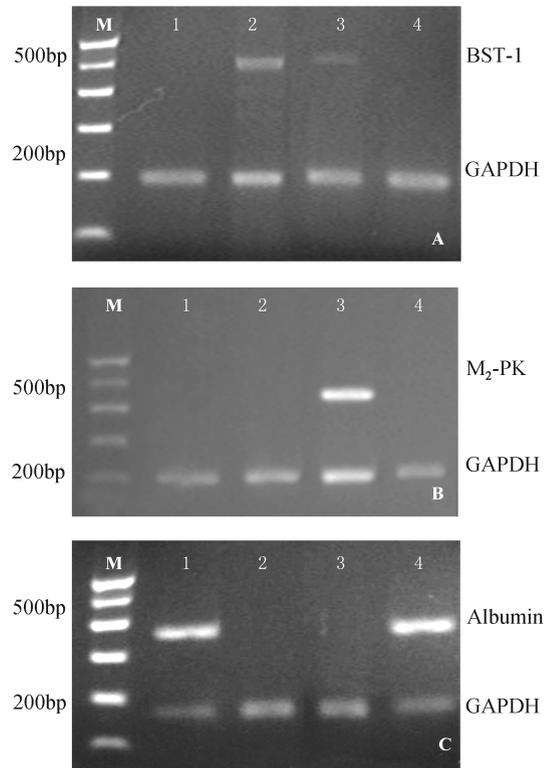


图1 BMSCs 诱导分化过程中分子表达特征

A:BST-1 的表达;B:M₂-PK 的表达;C:Albumin 的表达
M:Marker I;1:正常大鼠肝细胞对照;2:未诱导 BMSCs;3:诱导 11 天的 BMSCs;4:诱导 20 天的 BMSCs

表1 细胞移植后不同时间点各移植组肝功能生化指标变化(n=10)

组别	细胞移植后 12 h				细胞移植后 72 h			
	ALT (U/L)	AST (U/L)	TBIL (μmol/L)	ALB (g/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	TBIL (μmol/L)	ALB (g/L)
BMSCs 移植组	394.0 ± 24.97 ^a	1 038.8 ± 90.38 ^a	4.7 ± 0.97 ^a	30.5 ± 1.60 ^a	313.5 ± 16.92 ^a	673.2 ± 25.86 ^a	2.8 ± 0.96 ^a	30.7 ± 2.16 ^a
幼稚肝细胞移植组	399.4 ± 27.57 ^a	1 029.0 ± 109.18 ^a	4.0 ± 0.73 ^a	30.4 ± 1.51 ^a	319.3 ± 13.09 ^a	710.4 ± 37.41 ^a	2.8 ± 0.94 ^a	30.6 ± 2.44 ^a
成熟肝细胞移植组	362.1 ± 16.65 ^{ab}	911.9 ± 27.34 ^{ab}	3.33 ± 0.33 ^{ab}	33.2 ± 1.94 ^{ab}	268.0 ± 17.81 ^{ab}	650.4 ± 39.19 ^{ab}	1.7 ± 0.46 ^{ab}	33.1 ± 2.15 ^{ab}
空白对照组	997.6 ± 99.50	2 795.9 ± 22.82	31.0 ± 3.08	25.3 ± 1.80	425.0 ± 21.61	930.6 ± 50.60	21.0 ± 1.81	25.6 ± 0.89

a:与空白对照组比较, $P < 0.05$;b:与 BMSCs 移植组和幼稚肝细胞移植组比较, $P < 0.05$

2.3 细胞移植对大鼠死亡率的影响

肝衰模型大鼠在 D-gal 注射后 24 小时开始出现死亡,72 h 时 BMSC 细胞移植组死亡率为 40%,幼稚肝细胞移植组为 40%,成熟肝细胞移植组为 30%,对照组为 60%。细胞移植组死亡率明显低于对照组。

2.4 植入细胞在受体动物体内存留状况及定位

PCR 检测结果显示,细胞经腹股沟静脉移植后的第 7 天、第 14 天和第 30 天,各移植组动物肝脏内均能检测到 sry 基因,而对照组则无检测信号(图 2A)。在肺脏组织内也无 sry 基因信号检出(见图 2B)。

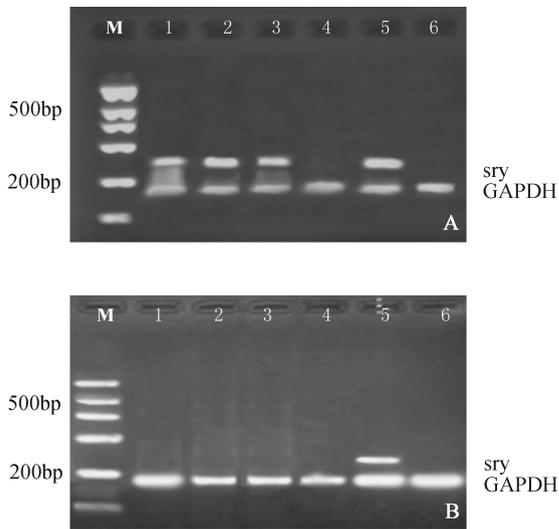


图 2 移植后第 30 天 sry 基因在雌性受体大鼠体内的表达 A: 肝脏组织; B: 肺组织

M: Marker; 1: BMSCs 移植组; 2: 幼稚肝细胞移植组; 3: 成熟肝细胞移植组; 4: 空白对照组; 5: 雄性大鼠肝脏阳性对照; 6: 雌性大鼠阴性对照

3 讨论

BMSCs 作为种子来源细胞具有如下优势: (1) 取材容易; (2) 细胞处于未分化状态, 并能在体外传代和大量扩增; (3) 可以直接取材于患者本人, 传代扩增并定向分化为靶细胞, 再回输给患者本人, 安全性高, 无异体排斥反应, 并且避免了胚胎干细胞研究的伦理学争论。

BMSCs 在体外定向诱导分化为肝细胞样细胞的实验报道较多, 然而这些经诱导分化后的肝细胞样细胞在体内是否能发挥肝细胞功能的报道仍很少^[7-10]。本实验利用肝损伤组织萃取物先将 BMSCs 在体外定向诱导至不同分化阶段(分别表达幼稚肝细胞标志 M₂-PK 和成熟肝细胞标志 Albumin),

然后再分别植入急性肝衰竭模型大鼠体内, 以观察植入细胞对肝功能的代偿能力。结果显示, 不同分化阶段的 BMSCs 植入后均能显著降低动物血清的 ALT、AST、TBIL 水平, 提高白蛋白 ALB 的合成能力。其中, TBIL 和 ALB 两个指标最能反映肝功能的变化特征, 前者反映了肝细胞对胆红素的代谢能力, 而后者则反映了肝细胞的白蛋白合成能力。细胞移植后动物血清内总胆红素 TBIL 水平的下降和白蛋白 ALB 水平的上升, 说明受体动物的肝功能较之细胞移植前有所改善。ALT 和 AST 本是反映肝损伤程度的两个指标, 在实施细胞移植后也明显下降, 其机理尚不明确。这一现象是否和植入细胞的肝脏修复能力有关, 仍需进一步探讨。

本研究重点比较分析了 BMSC 诱导前后及不同分化阶段的肝功能代偿能力。结果显示, 未经诱导分化的 BMSC 也具有一定的肝功能代偿能力, 与诱导至幼稚肝细胞状态的细胞相当, 但仍不及诱导分化至成熟肝细胞状态的细胞。这可能是 BMSC 进入体内后, 在肝损伤环境的影响下发生了肝向分化的缘故。但由于体内分化过程的时间迟滞, 故对急性肝衰竭的代偿作用不及诱导至成熟肝细胞状态的细胞快捷、有效。再则, BMSC 具有多向分化潜能, 在体内环境下除向肝细胞分化外是否还向其他细胞类型分化, 仍不得而知, 存在潜在的安全隐患。而 BMSC 先在体外诱导, 无论处于幼稚或成熟肝细胞状态, 其分化方向均已确定, 在安全性上也具有一定优势, 可作为细胞源的首选。

细胞移植对肝衰动物的死亡率也产生了重要影响。实验表明, 较之非细胞移植组, 各细胞移植组均明显降低了动物死亡率, 降低幅度达 20% ~ 30% 不等。成熟肝细胞移植组对死亡率的影响明显优于幼稚肝细胞移植组和未经诱导的 BMSC 组, 而幼稚肝细胞移植组和未经诱导的 BMSC 组的作用相当。

植入细胞在受体动物体内的存留时间及定位对于细胞移植实验的成败具有重要意义。为便于示踪植入细胞, 实验中刻意选择雌性动物为移植受体, 以雄性动物的骨髓源肝细胞为细胞源。选择雄性性别决定基因 sry 为分子标志, 采用 PCR 技术检测植入细胞在受体大鼠体内的存留时间和定位状态。结果显示, 在细胞植入后的第 7 天、第 14 天和第 30 天, 均能在受体大鼠肝脏内检测到 sry 基因, 而在肺脏和其他脏器则未检测到 sry 基因信号。说明植入细胞在受体大鼠体内至少存留 1 个月, 并且有选择性地定居在肝脏内。

(下转第 257 页)

(上接第 249 页)

综上所述, BMSC 不仅可以在体外诱导成肝细胞样细胞, 具有肝细胞的某些分子表达特征, 这些细胞植入体内后对肝功能的恢复和重建也具有一定的促进能力, 可以作为肝细胞移植细胞源的一个重要选择。

参考文献:

[1] Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells[J]. *Science*, 1999, 284(14):1168-1170.

[2] Popp FC, Piso P, Schlitt HJ, et al. Therapeutic potential of bone marrow stem cells for liver diseases[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2006, 1(3):411-418.

[3] Zun-fu Ke, Feng Zhou, Guo-qiang Zhao, et al. Down-regulation of Wnt signaling could promote bone marrow-derived mesenchymal stem cells to differentiate into hepatocytes[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 367(2):342-348.

[4] Jian-Zhi Chen, Hai Hong, Guo-Qiang Zhao, et al. A selective tropism of transfused oval cells for liver[J]. *World J Gastroenterology*, 2003, 9(3):544-546.

[5] Hong H, Chen J Z, Zhao GQ, et al. Influence of experi-

mental serum of liver-damaged rats on differentiated tendency of bone marrow derived stem cells[J]. *World J Gastroenterology*, 2004, 10(15):2250-2253.

[6] 刘芳, 陈少红, 赵国强, 等. 急性肝衰竭模型构建及细胞移植途径初探[J]. *南华大学学报(医学版)*, 2006, 34(4):482-486.

[7] Okumoto K, Saito T, Haga H, et al. Characteristics of rat bone marrow cells differentiated into a liver cell lineage and dynamics of the transplanted cells in the injured liver[J]. *J Gastroenterol*, 2006, 41(1):62-69.

[8] Aurich I, Mueller LP, Aurich H, et al. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers[J]. *Gut*, 2007, 56:405-415.

[9] Haga J, Wakabayashi G, Shimazu M, et al. In vivo visualization and portally repeated transplantation of bone marrow cells in rats with liver damage[J]. *Stem Cells Dev*, 2007, 16(2):319-328.

[10] Takagi M, Umetsu Y, Fujiwara M, et al. High inoculation cell density could accelerate the differentiated of human bone marrow mesenchymal stem cells to chondrocyte cells[J]. *J Biosci Bioeng*, 2007, 103(1):98-100.

(此文编辑 蒋湘莲)