文章编号:1000-5404(2006)06-0503-04

论著

小鼠胚胎干细胞分化为肝前体细胞及其脾内移植的实验研究

江海洪,王宇明,刘国栋,陈耀凯,李俊刚,赵文利 (第三军医大学西南医院全军感染病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 将体外小鼠胚胎干细胞(ESC)诱导为肝前体细胞(HPCs)并移植到预处理的C57/BL6小鼠脾脏,检测HPCs在小鼠脾脏内分化和移植细胞的功能及其在脾脏组织中的整合情况,探讨肝细胞合适的替换治疗细胞来源。**方法** 体外培养ESC并制备拟胚体(EBs),体外诱导EBs 18 d后得到HPCs,然后用Hochest 3342荧光标记HPCs并制备成6.0×10^7/ml细胞悬液。移植受体小鼠用2-乙酰氨基芴(2-AAF)处理,移植前受体鼠经过7 Gy ^{60}Co γ全身辐照和50%肝脏切除,造成小鼠体内对肝细胞的极大需求;然后将0.1 ml含6.0×10^6 HPCs细胞悬液经尾静脉注射移植入脾脏,细胞移植4周后,检测移植细胞在小鼠脾脏整合分化情况。**结果** 体外培养ESC并制备出EBs,EBs经体外诱导为HPCs,并将HPCs移植到小鼠脾脏,4周后观察到移植细胞能够嵌合到受体脾脏组织,在脾脏组织中未形成畸胎瘤,并且移植细胞能表达肝细胞较特异标志物白蛋白、CK19和糖原PAS染色呈阳性反应。**结论** 本实验建立一种将体外ESC诱导的HPCs移植并整合到脾脏的细胞移植技术,为研究肝细胞分化的分子机制和肝病的细胞替换治疗提供基础。

关键词:胚胎干细胞;脾脏;肝前体细胞;细胞移植;2-乙酰氨基芴
中图法分类号:R322.21;R322.47;R329.2 **文献标识码**:A

Engrafted hepatic precursor cells induced from mouse embryonic stem cells differentiate into functional hepatocytes in rat spleen

JIANG Hai-hong, WANG Yu-ming, LIU Guo-dong, CHEN Yao-kai, LI Jun-gang, ZHAO Wen-li (Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate differentiation of mouse embryonic stem cells (ESC) into hepatic precursor cells (HPCs) *in vitro* and transplant the induced HPCs into the rat spleen, then to explore ESC as a graft source of hepatocytes in the spleen. **Methods** Mouse ESC were cultured on the feeder layer of mouse embryonic fibroblasts (MEF) in the medium containing leukemia inhibitory factor (LIF), and embryonic bodies (EBs) were prepared. HPCs were selectively differentiated at day 18 in the medium including acid-fibroblast growth factor (acid-FGF), HGF, recombinant human oncostatin M (OSM) and ITS *et al*, added at different time point according to developmental biology of liver. In order to test the induced HPCs, albumin (ALB) was detected with immunohistochemistry by fluorescent microscope, CK19 was examined by immunohistochemical method and stained with DAB staining, glycogen of differentiated HPCs was observed with periodic acid Schiff's test (PAS). Transplanted cells were labeled by fluorescence dye Hochest 3342. Mice were injected with 0.4 mg 2-acetylaminofluorene (2-AAF) once a week. Fourteen days after injection, partial hepatectomy (PHx) (50%) followed radiation (RT, 7 Gy) was performed in mice. HPCs (6.0×10^6) were transplanted into the spleen intravenously through the caudal vein. Four weeks after cell transplantation, the spleen specimen was obtained for examination. **Results** ALB and CK19 were positive in induced HPCs. Induced HPCs/hepatocyte-like cells engrafted and did not formed teratomas 4 weeks after cell transplantation in the spleen. By tracing the HPCs labeled with Hochest3342 in the spleen, we found these cells were incorporated into the spleen tissue and could generate ALB. **Conclusion** HPCs/hepatocyte-like cells derived from mouse ESC engrafted without forming teratomas and differentiated into functional hepatocytes in the spleen.

Key words: embryonic stem cell; spleen; cell transplantation; hepatic precursor cell

基金项目:国家高技术研究发展计划("863")资助项目(2001AA216161)
Supported by the National "863" High-Tech Development Plan of China (2001AA216161)
作者简介:江海洪(1969-),男,重庆市人,博士研究生,讲师,主要从事生物人工肝细胞材料方面的研究。电话:(023)68754141-8017
通讯作者:王宇明,E-mail: wym417@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2005-09-19;**修回日期**:2005-12-31

小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)可分化为机体各种类型细胞,其具有自我更新、高度增殖和多向分化潜能而成为组织工程和细胞替补治疗的主要来源细胞,但 ESC 直接移植到体内会导致肿瘤组织的产生[1,2],若将 ESC 定向分化为各种组织中的多能干细胞或前体细胞,然后作为组织构建和细胞替补治疗来源,就可能会克服此缺点[3]。目前虽然在体外利用各种细胞因子如肝细胞生长因子(recombinant human hepatocyte growth factor, HGF)和纤维细胞生长因子-1,4(fibroblast growth factor, FGF)等能将 ESC 诱导分化为肝前体细胞(hepatic precursor cells, HPCs)[4,5],但更重要的是如何将 ESC 移植到体内,并促进 ESC 定向分化为功能性肝细胞,以便于临床作为肝细胞的补充来源,特别是当肝脏功能损伤严重,肝脏结构遭到严重破坏,寻求肝脏以外的细胞移植部位显得特别重要。本实验将 ESC 体外诱导的具有肝干细胞特性的 HPCs 从小鼠尾静脉注射移植到脾脏,探讨在脾脏中将 ESC 诱导为功能性肝细胞以作为机体肝细胞补充和替换来源,为胚胎干细胞生物学特性的认识和细胞治疗的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 培养 C57/BL6 小鼠 ESC、制备拟胚体 EBs(embryoid bodies, EBs)并诱导为 HPCs

ESC 来源及 EBs 培养方法见文献[6]。用含 10 mg/L 丝裂霉素 C(mitomycin C, mito C)的培养液处理 C57/BL6 小鼠胚胎纤维细胞(mouse embryonic fibroblast cells, MEF)1 h,使 MEF 失去分裂能力,然后将 ESC 接种到 MEF 上。ESC 在 MEF 饲养层上培养,培养液含 150 ml/L 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、1×10^6 IU/L 重组人白血病抑制因子(recombinant human leukemia inhibitory factor, LIF))、100 μmol/L β-巯基乙醇。培养时每天更换培养液,2~3 d 传代 1 次。利用细菌培养皿悬滴法悬浮培养制备 EBs。在诱导介质中按照以下不同时间加入肝细胞诱导分化的启动因子和成熟因子,以 ESC 悬浮培养开始时为第 1 天:作为早期诱导因子酸性纤维细胞生长因子(acid-fibroblast growth factor, acid-FGF) 在第 9 天加入,浓度为 10 μg/L;作为中期因子 2×10^{-5} g/L HGF 在第 12 天加入,作为晚期因子 1×10^{-5} g/L 致瘤素(recombinant human oncostatin M, OSM)、10^{-7} mol/L 地塞米松、ITS (5 g/L 胰岛素、5 g/L 转铁蛋白、5 mg/L 硒酸)混合物在第 15 天加入。诱导介质含 150 ml/L FBS,300 μmol/L α-巯基甘油,每天换液 1 次。

1.2 HPCs 的分子标志物染色

用 40 g/L 多聚甲醛固定细胞 30 min,正常血清封闭 20 min,用 3 ml/L H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶 10 min,加入 ALB 一抗(DAKO; 1∶100)、CK19 一抗(DAKO; 1∶100),然后 4 ℃过夜。白蛋白(ALB)二抗为带有免疫绿色荧光 FITC,CK19 为 DAB 显色方法。其余步骤按传统 ABC 方法操作。

1.3 小鼠原代肝细胞培养

4~5 周小鼠利用两步胶原酶灌流方法灌注肝脏,分离出肝细胞。细胞接种在胶原蛋白Ⅰ型包被的平板上培养 12 h 贴壁待用。培养介质为 Williams'E 培养介质,含 10% 的胎牛血清、2 mmol/L L-谷氨酰胺、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素。

1.4 PAS 染色

将诱导好的 HPCs,甲醇固定。1% 的过碘酸氧化 5 min,PBS 洗涤 5 次,然后用希夫试剂染色 15 min。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。

1.5 HPCs 的荧光标记

应用无菌磷酸缓冲液(PBS)配制荧光染料 Hochest 3342。培养的 HPCs 用 PBS 洗涤 3 次,加入 Hochest 3342,终浓度为 5 mg/L。37 ℃、5% CO_2 孵育 30 min。然后用 PBS 洗涤 5 次,收集 HPCs,调整细胞浓度为 6.0×10^7/ml 细胞悬液。

1.6 荧光标记的 HPCs 移植入脾脏

用聚乙二醇-400 将 2-AAF 配成 20 g/L 储备液,应用液在应用当天配制。移植前 2 周,将 4~5 周龄 C57/BL6 小鼠按体质量 2 mg/kg 2-乙酰氨基芴(2-acetylaminofluorene,2-AAF)经腹腔注射,每周 1 次,以抑制小鼠体内肝细胞增殖。细胞移植前,应用射线剂量为 7 Gy ^{60}Co γ 全身辐照小鼠,以抑制小鼠对移植细胞的排斥反应以及肝细胞的增殖作用,并在 2% 的戊巴比妥钠麻醉下将肝脏部分切除 50% PHx(partial hepatectomy, PHx),然后将体外诱导分离的 HPCs 在 0.01 mol/L PBS 中形成细胞悬液(6.0×10^7 细胞/L)。将 0.1 ml 含 6.0×10^6 细胞悬液通过小鼠尾静脉注射进行移植,并压迫尾静脉以防止移植细胞漏出;本实验以 0.1 ml 不含移植细胞的 PBS 液作为移植对照组。

1.7 脾脏移植细胞的检测

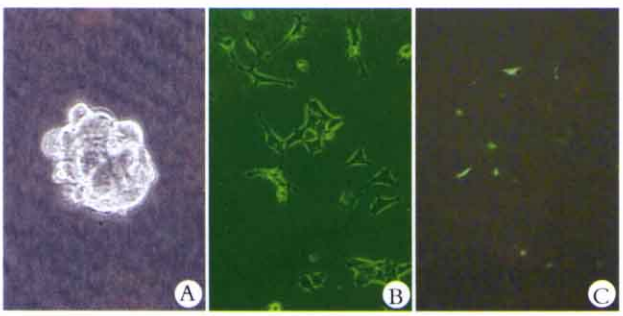
在小鼠移植 HPCs 4 周后,在 2% 的戊巴比妥钠麻醉下取出脾脏,观察 C57/BL6 小鼠脾脏外观情况。将 C57/BL6 小鼠脾脏进行冰冻切片,切片厚度 5 μm。一方面冰冻切片进行常规 HE 染色;另一方面进行免疫组织化学染色,具体方法如下。将脾脏冰冻切片粘贴于多聚赖氨酸处理过的玻片,彻底吹干。加入抗 ALB-抗体(DAKO;1∶100),在湿盒内 4 ℃过夜,利用 0.01 mol/L 的 PBS 轻轻洗涤 3 遍,快速风干,加入羊抗鼠带有红色荧光 TRITC 二抗(博士德),在 37 ℃孵箱内孵育 1 h, 用 0.01 mol/L 的 PBS 轻轻洗涤 3 遍,风干,滴加甘油封片。立即在荧光显微镜下检测。

2 结果

2.1 制备 EBs、诱导 18 d 的 HPCs 及 Hochest 3342 荧光标记 HPCs 移植细胞

ESC 在去除 LIF 后悬浮培养形成 EBs,培养 5 d 后的 EBs 呈球状,表面有细胞结节状突起(图 1A)。EBs 在包被胶原蛋

白Ⅰ型的培养瓶内贴壁生长，加入肝细胞诱导物质，经过一定时期的培养，适合诱导培养基的 HPCs 生长良好，其他细胞不能存活。诱导培养 18 d 后，非 HPCs 死细胞很容易用 PBS 缓冲液冲洗掉（图 1B）。诱导 18 d 后的 HPCs 用 Hochest 3342 进行荧光标记，以作为移植细胞的标志，标记率 95% 以上即可用作移植细胞材料。荧光标记后的 HPCs 可见蓝绿色荧光（图 1C）。

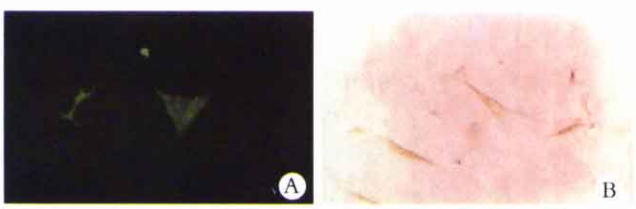


A：培养 5 d 的 EBs（×40）；B：诱导 18 d 的 HPCs（×150）；C：Hochest 3342 荧光标记 HPCs 移植细胞（×100）

图 1　Hochest 3342 荧光标记 HPCs

2.2　HPCs 的分子标志物 ALB、CK19、PAS 染色表达

应用免疫组化测定 HPCs 中 ALB 的表达，其二抗带有 FITC 绿色荧光，图中可见 HPCs 细胞 ALB 染色阳性，伸展细胞核荧光较淡（图 2A）；CK19 染色阳性（图 2B）；HPCs 的 PAS 染色中，4～5 周龄小鼠原代肝细胞培养的细胞质内可见紫红色沉淀聚集物，染色较浓（图 3A），从 ESC 诱导来的 HPCs 亦有紫红色沉淀聚集物但着色较淡（图 3B），在移植嵌合的细胞团中核发出蓝绿色荧光和细胞质 ALB 阳性区域可以考虑为来源于移植细胞（HPCs）的肝细胞或者肝细胞样细胞/HPCs 所形成的细胞团，表明 HPCs 还未发育成成熟的肝细胞。

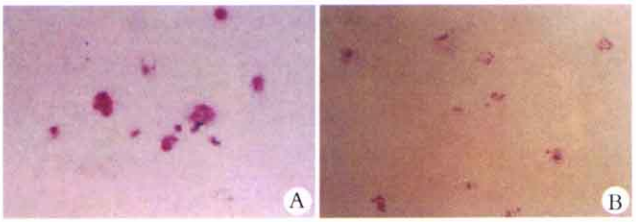


A：ALB 免疫荧光染色，伸展细胞可见细胞质绿色荧光，而细胞核荧光较淡（×100）；B：CK19 免疫组化染色，未卷曲细胞质染色深，细胞核着色浅（SABC×100）

图 2　HPCs 中 ALB、CK19 表达

2.3　HPCs 移植受体 C57/BL6 小鼠脾脏大体观察以及组织学检测

C57/BL6 小鼠在饲养 2-AAF 后能抑止其肝脏自身肝细胞增殖，移植前采用 PHx 和 RT 造成移植受体鼠肝细胞的需求，并减轻其对移植细胞的免疫排斥反应。实验结果表明，移植 HPCs 的 C57/BL6 小鼠脾脏未见肿瘤组织或者畸胎瘤生成，脾脏组织学切片显微镜下观察也未见明显的肿瘤细胞浸润。

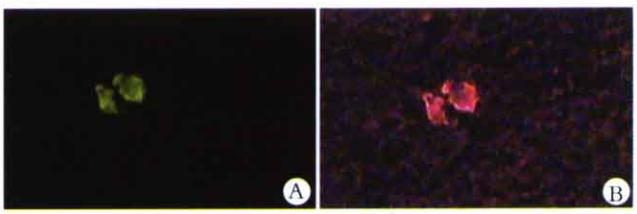


A：小鼠 4～5 周龄原代培养的肝细胞（×100）；B：ESC 体外诱导 18 d 后的 HPCs（×100）

图 3　HPCs 中 PAS 染色，细胞质内可见紫红色聚集物

2.4　脾脏移植细胞白蛋白 ALB 免疫荧光染色分析

我们研究了从 ESC 诱导分化来的 HPCs 通过 C57/BL6 小鼠尾静脉注射移植到脾脏，观察 HPCs 能否整合到脾脏并分化产生具有功能性的肝细胞或肝细胞样细胞。我们将 ESC 分阶段诱导 18 d 后获得 HPCs，并将其作为移植细胞来源移植到受体 C57/BL6 小鼠。在 C57/BL6 小鼠脾脏经免疫荧光染色证实了有部分细胞来源于移植细胞 HPCs（图 4A），并且该细胞能产生白蛋白（图 4B）；以 0.1ml 不含移植细胞的 PBS 液作为移植对照组的标本切片中未见到双染细胞。



A：移植细胞 Hochest 3342 荧光标记检测显示，细胞团的核呈蓝绿色荧光（×200）；B：移植细胞 ALB 免疫荧光检测，细胞团中细胞质呈红色为产生白蛋白区域（×200）

图 4　在移植受体 C57/BL6 小鼠脾脏，移植细胞核标记荧光与 ALB 免疫组织荧光抗体染色对照分析

3　讨论

1988 年 Bumgardner 等[7]率先提出了肝细胞移植概念，1993 年 Mito 等[8]在世界上开展了第 1 例人体肝细胞移植技术，自此 10 余年来，从原位肝移植到肝细胞移植，进而发展到干细胞移植，肝细胞移植治疗技术取得了巨大进展，肝细胞移植技术具有损伤小、技术简单，移植失败或产生排斥反应对受体影响不大等优点，已经广泛应用到临床各种肝病的治疗当中，例如急性或者慢性肝衰竭以及遗传性肝功能紊乱等，特别是当肝脏功能损伤严重，肝脏结构遭到严重破坏（固缩、坏死等），寻求肝脏以外的细胞移植部位显得特别重要。

由于缺乏供体肝脏，并且成熟肝细胞在体外难于增殖和维持其功能，因而治疗用的正常肝细胞来源越来越受限而使肝细胞移植技术受到阻碍。ESC 在体外具有无限增殖和保持多向分化能力，因而可成为肝细胞替补疗法的可移植细胞来源。目前已经在小鼠、猴子、人等建立起了胚胎干细胞系。将 ESC 直接移植到体内会导致肿瘤组织的产生，本研究探讨在体外将 ESC 定向分化为 HPCs，然后作为细胞替补治疗来源移植到处理过的受体小鼠脾脏内，以使移植细胞能整合到脾脏组织并产生功能性肝细胞。

将 ESC 分化成为 HPCs 主要存在两种途径：一是在体外诱导，除了采用丁酸钠与 HGF、FGF-4 结合的诱导技术从 ESC 分化产生肝细胞样细胞/HPCs 以外，还有采用 ESC 与胎肝细胞共培养以及对 ESC 细胞进行基因修饰后使其有利于向 HPCs 分化的方法，近来有学者进一步提出可以采用密度梯度离心、MACS 和 FACS 技术从 ESC 诱导出的的细胞中提取肝细胞样细胞[9]，虽然所纯化的细胞均能产生白蛋白，但是细胞数量较少，难于用于细胞移植以达到临床治疗效果；其二是在体内诱导，通过处理移植受体使体内环境能促进将 ESC 诱导为 HPCs。但是仅仅在体内将未诱导的 ESC 移植到脾脏、肝脏或者其他部位，无论如何处理移植受体，只能形成畸胎瘤或肿瘤组织，而不能使 ESC 定向诱导为 HPCs。如 Kobayashi 等[1]将移植受体肝脏 50% PHx，并在移植前将受体小鼠进行剂量为 10 Gy 的致死剂量的射线照射，均不能在体内将 ESC 细胞诱导为肝细胞/HPCs。因而在移植前对 ESC 进行定向诱导分化显得十分必要。我们在将 ESC 移植到脾脏前，先将 ESC 诱导分化为 HPCs，然后进行脾脏移植，采取体内体外诱导相结合，实验证实，此方法可避免产生畸胎瘤或肿瘤组织。

在本实验中我们研究了 ESC 在体外可以诱导为有功能性的肝细胞或 HPCs，并将 HPCs 作为肝外移植细胞来源移植到小鼠体内，整合到脾脏，并继续分化为能产生白蛋白的肝细胞样细胞/HPCs，不产生肿瘤组织或畸胎瘤。首先，我们将 ESC 诱导分化为能产生白蛋白的肝细胞或 HPCs。白蛋白是肝细胞特异性较好的一个指标，虽然早在胚胎发育的卵黄囊期就有微弱白蛋白合成，但白蛋白主要由肝细胞合成，在成熟肝细胞才达到合成高峰。我们在 HPCs 中检测到了白蛋白，并且 CK19 阳性，有部分细胞 PAS 染色阳性，表明我们的前期 ESC 的分化诱导中可以产生 HPCs；其次，我们将 HPCs 移植到小鼠脾脏前，用 2-AAF 饲养 2 周，以抑制自身肝细胞增殖，然后在移植前将肝脏 PHx 50%，以造成机体肝细胞极大需求环境，并且对受体小鼠进行 ^{60}Co γ 射线剂量为 7 Gy 全身辐照，以抑制小鼠对移植细胞的排斥反应，随后将 HPCs 经尾静脉移植到脾脏，移植后 4 周，检测发现移植细胞 HPCs 能整合到小鼠脾脏并能产生白蛋白而发挥其功能，并且不产生肿瘤组织或畸胎瘤，说明移植还是成功的。本实验通过免疫组化方法应用荧光显微镜证实了脾脏中整合有肝细胞并且肝细胞具有产生白蛋白功能，表明来源于 ESC 的 HPCs 可以作为肝病的移植细胞来源。研究结果加深了对胚胎干细胞的生物学特性和肝再生的分子机制的认识，并为肝脏肿瘤、组织工程及细胞替换治疗等问题的深入研究奠定了基础，在肝病方面对以 ESC 为基础的临床应用起到前期的探索作用。

参考文献：

[1] KOBAYASHI N, ANDO M, KOSAKA Y, *et al*. Partial hepatectomy and subsequent radiation facilitates engraftment of mouse embryonic stem cells in the liver[J]. Transplant Proc, 2004, 36(8): 2352 - 2354.

[2] TERAMOTO K, HARA Y, KUMASHIRO Y, *et al*. Teratoma formation and hepatocyte differentiation in mouse liver transplanted with mouse embryonic stem cell-derived embryoid bodies[J]. Transplant Proc, 2005, 37(1): 285 - 286.

[3] CHINZEI R, TANAKA Y, SHIMIZU-SAITO K, *et al*. Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes[J]. Hepatology, 2002, 36(1): 22 - 29.

[4] SCHWARTZ R E, REYES M, KOODIE L, *et al*. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells[J]. J Clin Invest, 2002, 109(10): 1291 - 1302.

[5] RAMBHATLA L, CHIU C P, KUNDU P, *et al*. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells[J]. Cell Transplant, 2003, 12(1): 1 - 11.

[6] 江海洪，向德栋，刘国栋，等. 小鼠胚胎干细胞体外分步诱导为肝细胞的实验研究[J]. 世界华人消化杂志，2005，13(15)：1849 - 1851.

[7] BUMGARDNER G L, FASOLA C, SUTHERLAND D E. Prospects for hepatocyte transplantation[J]. Hepatology, 1988, 8(5): 1158 - 1161.

[8] MITO M, KSUSANO M, SAWA M. Hepatocyte transplantation for hepatic failure[J]. Transplant Rev, 1993, 7: 35 - 43.

[9] KUMASHIRO Y, TERAMOTO K, SHIMIZU-SAITO K, *et al*. Isolation of hepatocyte-like cells from mouse embryoid body cells[J]. Transplant Proc, 2005, 37(1): 299 - 300.

（编辑 王 红）