文章编号:1000-5404(2007)11-0993-03

论著

异体骨髓间充质干细胞在骨髓嵌合小鼠体内分化为肝细胞的实验研究

王连友[1],徐 辉[1],董世武[1],粟永萍[1],庞学利[2],刘登群[1],王军平[1],冉新泽[1],王锋超[1] (第三军医大学:[1]军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,[2]西南医院肿瘤科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨小鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)在体内分化为肝细胞的可行性。**方法** 雌性C57BL/6J小鼠全身一次性接受10Gy ^{60}Coγ射线照射后立即接受同品系绿色荧光蛋白(green fluorescence protein,GFP)转基因小鼠骨髓间充质干细胞移植。移植后1周、1、3个月取骨髓嵌合小鼠肝脏,石蜡切片行GFP抗体免疫组化,冰冻切片在荧光显微镜下观察GFP阳性细胞在肝内分布。石蜡切片行GFP抗体和白蛋白(albumin,Alb)抗体以及GFP抗体和细胞角蛋白18(cytokeratin 18,CK18)抗体免疫荧光双标染色法,以此检测GFP阳性细胞在受体小鼠肝内的分化情况。**结果** 移植后1周、1、3个月骨髓嵌合小鼠肝内皆可见GFP阳性细胞,且有随时间减少的趋势,并都可见GFP和Alb双阳性细胞。**结论** 异体骨髓间充质干细胞可在骨髓嵌合小鼠体内分化为表达Alb和CK18的肝细胞,为肝组织的再生和修复提供了新思路。

关键词:骨髓间充质干细胞;骨髓嵌合;转分化;肝细胞
中图法分类号:R322.47;R329.21;R331.22 **文献标识码**:A

Transdifferentiation of allotype BMSCs into hepatocytes in bone marrow chimeric mice

WANG Lian-you[1], XU Hui[1], DONG Shi-wu[1], SU Yong-ping[1], PANG Xue-li[2], LIU Deng-qun[1], WANG Jun-ping[1], RAN Xin-ze[1], WANG Feng-chao[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, [2]Department of Tumor, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To detect whether mice bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) can contribute to the regeneration of hepatocytes in bone marrow chimeric mice. **Methods** Female recipient mice (C57BL/6J) underwent whole body gamma-ray irradiation with a dose of 10 Gy to ablate their bone marrow, followed by immediate tail vein injection of BMSCs isolated from male GFP transgenic mice. Animals were killed at different phase points: 1 week, 1 month, and 3 months. Using fluorescence microscope we directly observed GFP-positive cells in the liver frozen sections, and we also prepared the parafilm sections to detect the GFP-positive cells and the coexpression of GFP and Alb, CK18 by immunohistochemistry and immunofluorescence respectively. **Results** We found numerous GFP-positive cells in recipient mice liver at 1 week after BMSCs transplantation, some at 1 month and seldom at 3 months. There were some cells coexpressing GFP and Alb, CK18 at all the phase points. **Conclusion** Allotype BMSCs can differentiate into Alb and CK18 positive hepatocytes in bone marrow chimeric mice, which will become an ideal cell resource for liver tissue project.

Key words: bone marrow mesenchymal stem cell; bone marrow chimerism; transdifferentiation; hepatocyte

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)是近年来研究较为深入的一种成体干细胞,在一定诱导因素下可定向分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、心肌细胞等。1999年,Petersen等[1]首次报道大鼠骨髓细胞能分化为肝实质细胞。然而至今,对于骨髓源性干细胞能否分化为有功能的肝细胞仍存在分歧[2-4]。本实验通过复制骨髓嵌合小鼠模型,观察BMSCs能否分化为肝实质细胞。

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(2005CB522605);中国博士后科学基金(2005038163);国家自然科学基金(30400247)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Project, 2005CB522605), the Postdoctoral Science Foundation of China (2005038163) and the National Natural Science Foundation of China (30400247)

作者简介:王连友(1979-),男,天津市宁河县人,硕士研究生,主要从事成体干细胞方面的研究。电话:(023)68771725, E-mail:quantin_wly@163.com
通讯作者:徐 辉,E-mail:xuhui@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2006-12-31;修回日期:2007-01-24

1 材料与方法

1.1 实验动物

受体C57BL/6J小鼠40只,体质量20~25 g,6周龄,SPF级雌性,购于第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。供体GFP小鼠20只,体质量20~25 g,6周龄,雄性。购于第二军医大学细胞生物学教研室。清洁级动物房饲养,正常饮食、进水。

1.2 照射与分组

照射前给予受体小鼠含庆大霉素320 mg/L、红霉素280 mg/L饮水,3 d后受体小鼠接受^{60}Co γ射线一次性全身均匀照

射,吸收剂量:10 Gy。照射后分为移植组与对照组各 20 只。

1.3 BMSCs 细胞的获取及移植

供体小鼠超净台上断颈处死后,取股骨,去除肌肉及软组织,剪开骨髓腔,用一次性 1 ml 注射器吸取 DMEM/F12 培养基(Hyclone)反复冲洗骨髓腔,直至髓腔发白。收集冲洗液于预先加入密度为 1.073 g/L 的 percoll 液的离心管中,2 500 r/min 离心 20 min。小心吸取白膜层至另一离心管,加入生理盐水吹打成单细胞悬液,血球计数板计数,调整细胞悬液为 2×10^7/ml。

照射后 2 h 内照射组小鼠尾静脉注射获取的细胞悬液,0.3 ml/只,对照组注射相同剂量的生理盐水。

1.4 GFP 阳性细胞分布情况观察

移植后 1 周、1、3 个月取肝脏做冰冻切片以及 4% 中性甲醛固定。冰冻切片立即在荧光显微镜下观察。固定组织做石蜡切片。

1.5 GFP 阳性细胞分化情况观察

一抗为兔抗小鼠 GFP 抗体(beyotime)、羊抗小鼠 Alb 抗体(Santa Cruz)、鼠抗小鼠 CK18 抗体(Santa Cruz)。二抗为羊抗兔 FITC 标记抗体、兔抗羊和羊抗小鼠 RITIC 标记抗体(北京中杉公司)。按说明书操作,荧光显微镜下观察,同一视野两种荧光拍照后图片整合检测细胞共表达 GFP 和 Alb、GFP 和 CK18 情况。

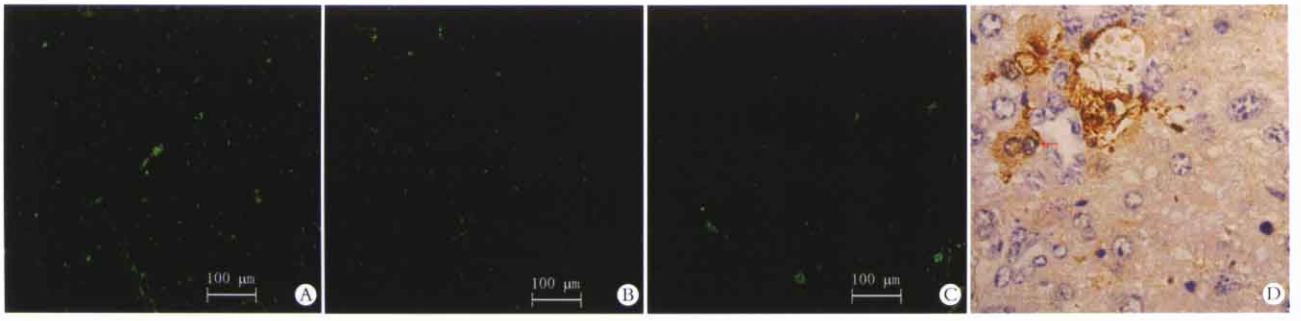
2 结果

2.1 GFP 阳性细胞分布情况

GFP 阳性细胞在荧光显微镜下激发绿色荧光点,移植后 1 周、1、3 个月骨髓嵌合小鼠肝冰冻切片皆可见 GFP 阳性细胞,1 周时阳性细胞最多,3 个月时最少。免疫组化结果显示阳性细胞主要见于小血管周围,细胞呈圆形与肝细胞形态相似。对照组小鼠肝脏未见荧光细胞(图 1)。

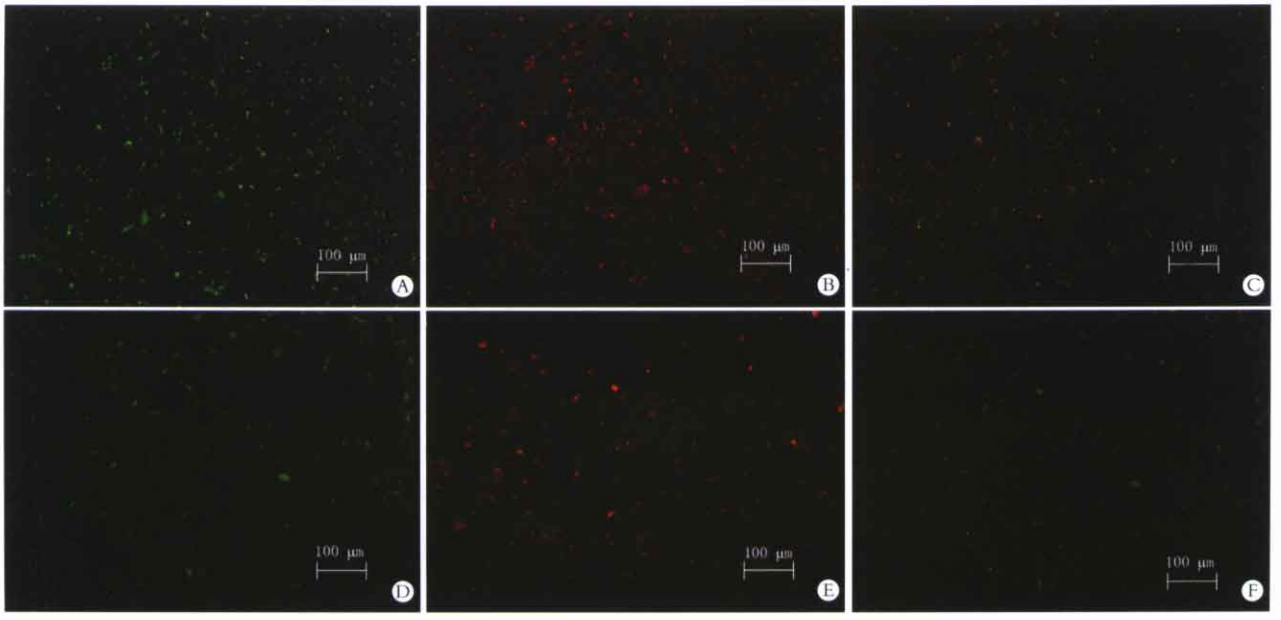
2.2 GFP 阳性细胞分化情况

骨髓嵌合小鼠肝脏石蜡切片在荧光显微镜下观察到 GFP、FITC 标记细胞显绿色荧光,Alb、CK18 TRITC 标记细胞显红色荧光。整合后共表达 Alb 和 GFP 的细胞以及共表达 CK18 和 GFP 的细胞显黄色,见图 2。



A:移植后 1 周(荧光显微镜);B:移植后 1 个月(荧光显微镜);C:移植后 3 个月(荧光显微镜);D:免疫组化染色结果示棕色的 GFP 阳性细胞(箭头示) (SABC×100)

图 1 荧光显微镜及免疫组化染色观察骨髓嵌合小鼠肝脏内 GFP 阳性细胞分布



A:GFP 抗体、FITC 标记,绿色荧光点表示 GFP 阳性细胞;B:Alb 抗体、TRITC 标记,红色荧光点表示 Alb 阳性细胞;C:A、B 整合后,黄色光点表示共表达 GFP 和 Alb 位置;D:GFP 抗体、FITC 标记,绿色荧光点表示 GFP 阳性细胞 E:CK18 抗体、TRITC 标记,红色荧光点表示 CK18 阳性细胞 F:D、E 整合后,黄色光点表示共表达 GFP 和 CK18 位置

图 2 移植后 1 个月骨髓嵌合小鼠肝石蜡切片免疫荧光结果 (荧光显微镜)

3　讨论

目前国内外许多学者利用 GFP 转基因鼠的细胞为标记细胞，研究骨髓干细胞在体内的分布和分化情况，已证实 BMSCs 能够向多种组织分化。因此，我们建立以 GFP 转基因小鼠的 BMSCs 为示踪的骨髓嵌合模型小鼠，以便更直观地观察骨髓干细胞在小鼠体内的分布和分化情况。

BMSCs 是一种具有自我增殖、多向分化特点的细胞。目前已有关于 BMSCs 向肝细胞分化的报道，但对其具体是否能分化为有功能的肝细胞仍存在分歧。如 Kohneh-Shahri 等[5]报道在雌性大鼠接受雄性大鼠骨髓移植和雄性 DPP IV^- 大鼠肝切除后接受雄性 DPP IV^+ 细胞移植两种模型中，都未检测到供体来源细胞。为进一步寻找 BMSCs 向肝细胞分化的证据，本实验观察了移植后 1 周、1、3 个月骨髓嵌合小鼠肝脏中供体来源的 BMSCs 的分布，结果显示：移植后 1 周、1、3 个月骨髓嵌合小鼠肝脏冰冻切片皆可见 GFP 阳性细胞，1 周时阳性细胞最多，3 个月时最少，阳性细胞主要集中于小血管周围。提示 BMSCs 能够迁移并定植于肝脏，而且 GFP 阳性细胞随时间延长而减少的趋势提示骨髓间充质干细胞有可能只是代偿性的维持肝损伤后的功能，而不是分化为肝干细胞参与肝损伤的修复，因此随着肝自身细胞的不断分化更新，骨髓来源的细胞逐渐被替代。嵌合小鼠模型复制过程中应用密度梯度离心分离所得的 BMSC，这种分离方法能够比较有效的去除造血干细胞的干扰，因此比较肯定嵌合小鼠肝脏中 GFP 阳性细胞源于 BMSCs，但没有经过进一步纯化筛选，实验中所观察到的 GFP 阳性细胞具体是源于 BMSCs 中的哪一亚型还有待进一步验证。

目前关于骨髓间充质干细胞定位肝脏后的分化趋势众说纷纭，有学者认为 BMSCs 主要分化为有功能的实质细胞，如 Arikura 等[6]报道移植的 BMSCs 能定植于 Nagase's analbuminemic 大鼠（一种白蛋白表达缺陷大鼠）肝脏且分化为表达白蛋白的肝细胞；Yokoyama 等[7]观察 BMSCs 移植后大鼠血清白蛋白表达变化，间接提示 BMSCs 能分化为肝实质细胞，有效的促进肝组织再生；但也有人认为 BMSCs 定位于肝脏后并不是分化为肝实质细胞而是分化为间质细胞，如 Russo 等[8]通过追踪骨髓来源细胞在肝脏的分化，发现移植 BMSCs 后的硬变肝脏中，只有 0.6% 的肝实质细胞为 BMSCs 来源，而 68% 的星形细胞，70% 的肌纤维母细胞为 BMSCs 来源。白蛋白是肝细胞特异性合成并分泌的相对分子质量为 650×10^3 的蛋白质，合成与分泌白蛋白能力是检测功能肝细胞活性与功能的一个重要指标。CK18 是正常肝脏中成熟肝细胞特异性表达的细胞角蛋白，是肝细胞中间丝细胞骨架的主要组成部分。本实验利用免疫荧光双标方法检测骨髓嵌合鼠肝脏内 GFP 阳性细胞表达 Alb 和 CK18 的能力。结果显示，在 1 周、1、3 个月的嵌合鼠肝脏石蜡切片都能检测 GFP 以及 Alb、CK18 的表达，通过同一视野下两种荧光拍照后图片整合的方法可以观察到部分细胞共表达 GFP 和 Alb、CK18，说明部分骨髓来源的 BMSCs 能定位于肝脏并能分化为表达 Alb 和 CK18 的肝实质细胞。

BMSCs 在骨髓嵌合小鼠体内表现出的分化潜能为肝组织的再生和修复提供了新思路，显示了其在肝病治疗中的较大应用潜力。如在不久的将来，有望利用此类细胞移植替代肝脏移植救治肝坏死、肝硬化、肝功能衰竭等晚期肝病患者，这将极大地提高患者的生存机会，还可避免肝脏移植给患者带来的排斥反应的痛苦和长期服用免疫抑制剂所带来的危害；也可通过体外诱导扩增的肝细胞样细胞作为生物人工肝的细胞来源等途径用于患者。目前对 BMSCs 的研究还处于理论阶段，研究仍然以动物实验为主，骨髓源性的肝细胞要达到治疗水平的肝脏重建需要解决的问题还很多。总之，BMSCs 是一种具有较大应用前景的细胞，是一个值得研究的课题，如果存在的问题得以解决，将会对终末期肝病的治疗起到较大的推动作用。

参考文献：

[1] Petersen B E, Bowen W C, Patrene K D, *et al*. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells[J]. Science, 1999, 284(5417): 1168 - 1170.

[2] Theise N D, Badve S, Saxena R, *et al*. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation[J]. Hepatology, 2000, 31(1): 235 - 240.

[3] Theise N D, Nimmakayalu M, Gardner R, *et al*. Liver from bone marrow in humans[J]. Hepatology, 2000, 32(1): 11 - 16.

[4] Kanazawa Y, Verma I M. Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(Suppl 1): 11850 - 11853.

[5] Kohneh-Shahri N, Regimbeau J M, Terris B, *et al*. Liver repopulation trial using bone marrow cells in a retrorsine-induced chronic hepatocellular injury model[J]. Gastroenterol Clin Biol, 2006, 30(3): 453 - 459.

[6] Arikura J, Inagaki M, Huiling X, *et al*. Colonization of albumin-producing hepatocytes derived from transplanted F344 rat bone marrow cells in the liver of congenic Nagase's analbuminemic rats[J]. J Hepatol, 2004, 41(2): 215 - 221.

[7] Yokoyama Y, Terai S, Ishikawa T, *et al*. Proteomic analysis of serum marker proteins in recipient mice with liver cirrhosis after bone marrow cell transplantation[J]. Proteomics, 2006, 6(8): 2564 - 2570.

[8] Russo F P, Alison M R, Bigger B W, *et al*. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis[J]. Gastroenterology, 2006, 130(6): 1807 - 1821.

（编辑　邓强庭）