文章编号:1000-5404(2008)16-1541-04

论著

EGF和HGF体外诱导肝硬化患者骨髓间充质干细胞向肝细胞分化的实验研究

吴玉卓,张玉婷,毛小荣,陈 红 (兰州大学第一医院感染科,兰州 730000)

摘 要:目的 探讨表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)和肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)诱导肝硬化患者骨髓间充质干细胞(MSCs)向肝细胞分化的可行性。**方法** 取肝硬化志愿者骨髓,密度梯度离心法联合贴壁筛选法获取MSCs,分别用含有HGF、EGF、HGF+EGF或不加生长因子的培养基进行培养。用流式细胞仪、免疫细胞化学法鉴定细胞表型,酶联免疫吸附法检测培养上清液中Alb水平。**结果** 肝硬化患者骨髓MSCs生长良好,表型为CD29阳性,CD34阴性。诱导组细胞可在21~28 d时,形态变为三角形、多角型或类圆形。诱导组细胞7 d检测到AFP的表达,21、28 d检测出CK18阳性,并以时间依赖方式产生Alb。未诱导组在以上时间点未检测到上述指标。**结论** HGF、EGF均能诱导骨髓MSCs分化为肝样细胞,两者在一定程度上具有联合作用。

关键词: 肝硬化;干细胞;细胞分化;肝样细胞
中图法分类号: R329.21;R331.22;R575.202 **文献标识码:** A

Hepatocyte growth factor and epidermal growth factor induce mesenchymal stem cells isolated from patients with hepatocirrhosis into hepatocyte-like cells *in vitro*

WU Yu-zhuo, ZHANG Yu-ting, MAO Xiao-rong, CHEN Hong (Department of Infection, The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: Objective To explore the possibility of differentiation of mesenchymal stem cells isolated from patients with hepatocirrhosis into hepatocyte-like cells induced by EGF and HGF and to lay basis for transplanted autologous bone marrow MSCs in treatment of liver disease at terminal stage. Methods Bone marrow cells were obtained from volunteers with liver cirrhosis. MSCs were separated by density gradient centrifugation and were cultured through adhere culture. MSCs were cultured in DMEM medium with HGF, EGF, HGF+EGF or no growth factor. The phenotypes of MSCs were identified by flow cytometry, immunohistochemistry, and Albumin levels in culture supernatants were determined by ELISA. Results Growth and division of adherent cells obtained from the patients with hepatocirrhosis were good and the phenotypes of MSCs were CD29 positive and CD34 negative. The shape of MSCs changed from long fusiform to polygonal or round on 21^{th}-28^{th} days in grow factor induced groups. Immunocytochemical analysis for CK18 and AFP showed positive staining reaction for AFP on 7^{th} day, for CK18 on 21^{st} and 28^{th} day in grow factor induced groups with MSCs-induced Alb production increasing in a time-dependent manner. No markers of hepatocyte linear cells were detected in no growth factor induction group. Conclusion Both HGF and EGF can induce mesenchymal stem cells to differentiate hepatocyte-like cells alone or coordinately.

Key words: cirrhosis; stem cells; cell differentiation; hepatocyte-like cells

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有自我复制、多向分化潜能,而且取材方便,便于体外扩增,不存在伦理学问题,因此具有很大的应用价值[1,2]。目前对于终末期肝病的治疗仍没有一个经济易行的方法,具有巨大分化潜能和诸多优点的MSCs应用于治疗肝病成为许多科研人员研究的新视点。已有实验证明MSCs可以分化为肝细胞,但是目前MSCs大部分都是取材健康人骨髓,而且选取诱导的细胞因子较单一,很多还处于动物实验研究阶段。本实验取肝硬化患者骨髓MSCs,用肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、表皮细胞生长因子

基金项目:兰州大学医学基金(200655)
Supported by the Medical Foundation of Lanzhou University(200655)
作者简介:吴玉卓,女,河南省南阳市人,硕士研究生,主要从事自体干细胞治疗肝衰竭方面的研究。电话:(0377)67965689, E-mail: angel_060@126.com
通信作者:陈 红,电话:13109324136,E-mail:chenhong1956@126.com
收稿日期:2007-10-26;修回日期:2008-01-19

(epidermal growth factor, EGF)单独或联合诱导 MSCs 分化为肝样细胞,为研究自体骨髓干细胞治疗终末期肝病打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

低糖 DMEM 培养基购于 Gibco 公司,HGF、EGF 购自 Peprotech 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,抗人 CK18、AFP、SP Kit、DAB Kit 均购自北京中杉桥公司,白蛋白 ELISA Kit 购于美国 DSL 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 MSCs 的分离、培养 选取本院 2006 年 3 月至 2007 年 5 月收治的肝硬化患者 3 例(知情并同意),年龄 30 ~ 40 岁,肝功能 Child-B 级,抽取骨髓 5 ml,移入含相同体积 Percoll 淋巴细胞分离液的离心管上层,2 000 r/min 离心 20 min,吸取白色界面层,PBS 冲洗 3 次,加入含有 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,调整细胞数为 $1 \times 10^5 ml^{-1}$,分别接种于 25 cm × 25 cm 规格的培养瓶,于 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度孵箱内培养,9 d 后首次换液,以后每 3 ~ 4 天换液 1 次,观察细胞形态并拍照,细胞长到 80% ~ 90% 融合时,按 1∶2 传代,并标记为 P1,传代细胞隔日首次换液,以后每隔 3 天换液 1 次,当细胞长到 80% ~ 90% 融合时继续传代培养,并标记为 P2,依次类推标记为 P3、P4、P5 等。

1.2.2 MSCs 表面标志的测定 取第 3 代 MSCs,0.25% 胰酶和 1 mmol/L 的 EDTA 液消化收获细胞 1×10^6 个,加入鼠抗人 CD29、CD34 单克隆抗体工作液 0.1 ml,室温孵育 30 min,PBS 洗涤 2 次,弃上清,加入兔抗鼠 FITC 标记的二抗工作液 100 μl,避光室温孵育 30 min,加入 PBS 2 000 r/min 离心 20 min,弃上清,流式细胞仪检测细胞表面分子。

1.2.3 诱导分组 取第 3 代 MSCs,接种于 6 孔培养板上,分为单独 HGF (20 μg/L,A 组)、单独 EGF (1.5 mg/L,B 组)、HGF 与 FGF (20 μg/L + 1.5 mg/L,C 组)、无生长因子(D 组)4 个组,每组 4 个复孔,以后每周换液 2 次,在倒置显微镜下观察细胞形态的变化,分别于培养 7、14、21、28 d 时留取细胞以备检测。

1.2.4 免疫细胞化学法染色 留取的细胞用 95% 酒精固定 10 min, PBS 冲洗干净,加过氧化物酶阻断剂反应 10 min, PBS 冲洗,3 min/次,共 3 次。非免疫血清封闭 10 min,甩弃多余封闭液。加一抗:CK18、AFP,室温反应 2 h,PBS 代替一抗作阴性对照,PBS 冲洗,3 min/次,共 3 次。加生物标记的二抗 10 min。过氧化物酶标记的卵白素 10 min 冲洗,DAB 镜下显色,冲洗,苏木精复染或不复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,普通光学显微镜下观察,选数个高倍视野(×1 000)进行细胞计数,共计 300 个细胞。

1.2.5 培养上清液中人 Alb 水平检测 分别于细胞诱导分化的 7、14、21、28 d 用 PBS 冲洗培养的细胞,换成无血清的 DMEM 培养基,培养 24 h 后收集上清液,用 ELISA 对上清液中 Alb 进行检测。室温显色后用酶标仪于 450 nm 制成标准曲线测定各样本中白蛋白含量,同时记录培养细胞数。检测灵敏度为 1 mg/L。

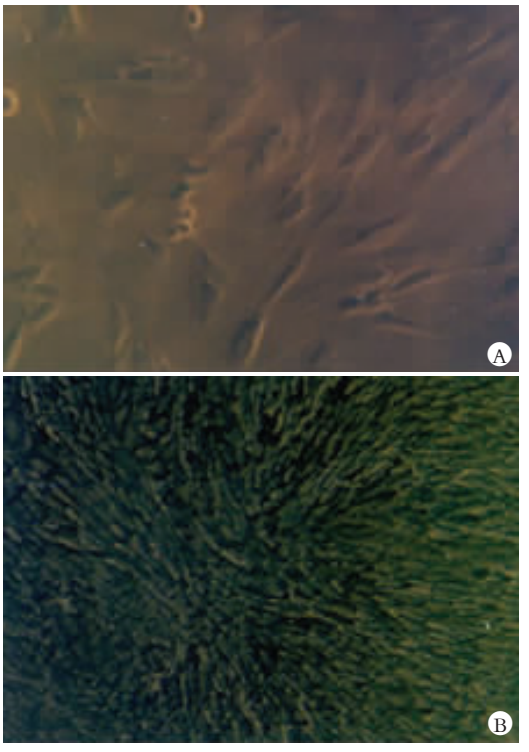
1.3 统计学处理

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件,组间比较采用无重复测量设计的方差分析,两两比较采用 Tukey 法。

2 结果

2.1 MSCs 原代、传代培养及表型特征鉴定

细胞大小均匀,呈梭型,长纤维型(图 1)。原代细胞生长较缓慢,20 ~ 24 d 铺满整个培养皿底部。传代细胞生长周期较原代细胞短,1 周后细胞生长融合培养皿底达 90% 以上。流式细胞仪测定 MSCs 表面分子显示:CD29 阳性(阳性率 87.6%),CD34 阴性(阳性率 6.52%)。



A:原代培养; B:传代培养

图 1 肝硬化患者 MSCs 原代及传代培养 9 d 观察 (倒置显微镜 ×100)

2.2 诱导细胞的形态观察

诱导组细胞在 21 ~ 28 d 时,形态由长梭形变为三角形、多角形或类圆形,细胞转圆率为 40% ~ 50%,双核细胞比率为 4% ~ 5%(图 2)。

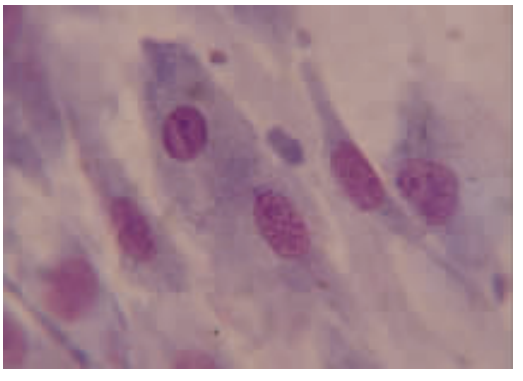
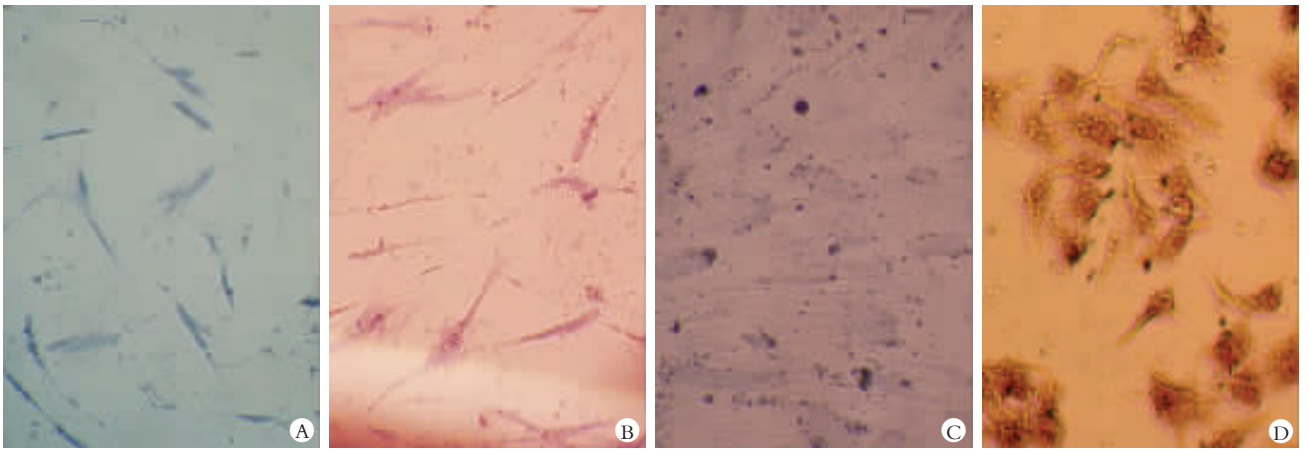


图 2 诱导组 21 d 细胞观察 (瑞士染色 ×100)



A:诱导 14 d 细胞 AFP 蛋白阴性; B:诱导 7 d 细胞 AFP 蛋白阳性; C:未诱导 21 d 细胞 CK18 蛋白阴性; D:诱导 21 d 细胞 CK18 蛋白阳性

图 3　诱导细胞中肝细胞标志表达　(DAB ×100)

2.3　免疫细胞化学染色结果

未诱导的 D 组 7、14、21、28 d 时 AFP、CK18 均为阴性。选取诱导组不同视野的 300 个细胞,计数染色阳性细胞,计算细胞的阳性染色率,发现:CK18 在各组中都随时间增加阳性率增高($P<0.05$),诱导分化 C 组 > A 组 > B 组($P<0.05$),AFP 染色在各组中都随时间增加阳性率降低($P<0.05$),各组间无明显差异($P>0.05$)(图 3,表 1、2)。

表 1　AFP 在不同时间点诱导组的阳性率比较($n=300$, $\bar{x}\pm s$)

组别	7 d	14 d	21 d	28 d
A	38.50 ±3.69	26.65 ±2.08	18.15 ±1.47	9.49 ±1.43
B	30.14 ±2.52	20.69 ±3.08	12.00 ±2.99	6.61 ±1.85
C	65.25 ±3.70	6.21 ±2.31	6.16 ±0.88	1.40 ±0.60

因素$_{天数}$的 $F=8.939$, $P=0.012$;不同天数两两比较 $P<0.05$

表 2　CK18 在不同时间点诱导组的阳性率比较($n=300$, $\bar{x}\pm s$)

组别	7 d	14 d	21 d	28 d
A	14.62 ±1.54	23.51 ±2.25	35.21 ±2.72	42.43 ±1.95
B	10.82 ±1.22	19.80 ±0.75	29.18 ±1.01	40.07 ±1.24
C	25.69 ±1.38	38.28 ±1.76	47.00 ±2.09	56.16 ±3.15

因素$_{天数}$的 $F=323.465$, $P=0.000$; 因素$_{组间}$的 $F=212.640$, $P<0.05$;不同天数两两比较 $P<0.05$

2.4　ELISA 检测培养上清液中 Alb 含量

在诱导组 7、14、21、28 d 上清液中白蛋白的含量时间依赖式增加,未加生长因子诱导组 MSCs 细胞没有分泌 Alb。同一时间点诱导组间细胞上清液 Alb 的含量联合诱导组与单独诱导组间有明显差异($P<0.05$),单独诱导组间无明显差异($P>0.05$)。见表 3。

表 3　不同时间点培养液中 Alb 质量浓度测定(mg/L, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	7 d	14 d	21 d	28 d
A	13.93 ±1.38[a]	24.34 ±1.77[a]	36.61 ±1.54[a]	40.87 ±2.93[a]
B	11.85 ±0.90[a]	20.62 ±2.34[a]	31.43 ±2.03[a]	36.53 ±3.02[a]
C	26.34 ±2.58	63.97 ±4.03	106.99 ±2.33	114.37 ±4.32

因素$_{组间}$的 $F=12.027$, $P=0.008$; 因素$_{天数}$的 $F=4.753$, $P=0.050$; a: $P<0.05$,与 C 组比较

3　讨论

干细胞移植临床上已经应用于治疗急性肝衰竭、遗传代谢性肝病以及终末期肝病,并且发挥了一定作用,但大多采用同种异体的干细胞直接输入体内,对其远期效果及输入体内的干细胞能否向肝细胞分化或过度分化还缺乏进一步的研究。目前诱导干细胞向肝细胞分化的方法以细胞因子诱导多见,对其诱导的最佳环境及诱导后的细胞是否具有肝细胞的特征还处于摸索阶段。HGF 可诱导 MSCs 向肝样细胞分化已经被证实,关于 EGF 一直以来被认为是一种促有丝分裂因子,具有促进 MSCs 增殖、促进其贴壁生长的作用,但对其诱导 MSCs 向肝细胞分化的实验研究还为数不多。本实验取肝硬化患者骨髓,采用加入细胞因子(HGF、EGF 单独或联合)诱导 MSCs 向肝样细胞分化,探索简单有效的诱导条件。

人骨髓中具有能分化为肝细胞的 MSCs 数量很少,约占骨髓中有核细胞数量的 1/100 000[3],5 ml 骨髓中仅能得到 300 ~ 1 000 个,所以原代获得的 MSCs 数量远不能满足肝组织工程的需要,因此纯化和体外扩增是临床上广泛应用的前提。近年来国内外学者不断进行大量的研究,探索 MSCs 分离、纯化、体外扩增的方法,根据 MSCs 贴壁生长而造血细胞系细胞悬浮生长的特性对两者进行分离,但得到的细胞成分复杂,MSCs 的纯度不足。单克隆抗体磁珠分离系统和流式细胞仪技术对细胞活性影响大,而且实验条件要求高,需要骨髓量大,费用高。本实验把密度梯度离心与贴壁培养法相结合,用 Percoll 分离液对骨髓作梯度离心,除去绝大部分红细胞、粒细胞、脂肪细胞和血小板,

获得纯度较高的 MSCs。再根据贴壁性差异,随换液弃除悬浮生长的造血细胞。贴壁细胞主要是 MSCs,也可能混有单核细胞、淋巴细胞,每次传代严格掌握消化酶的量和消化时间,保证 MSCs 在短暂的作用时间内与培养瓶底分开,进一步纯化 MSCs。2 次传代,细胞变为更均匀有序的成纤维细胞样外观,连续传 10 代细胞形态无明显变化,提示对骨髓 MSCs 做传代有益于纯化 MSCs。这种将密度梯度离心、贴壁培养和消化时间控制相结合的方法,操作简单、实用、经济,对细胞活性影响小,获得的细胞纯度较高,是比较理想的分离、纯化 MSCs 的方法。通过上述分离纯化和扩增,原代可以获得 4.0×10^5 个细胞,第 3 代可以获得 1.0×10^8 个细胞。经流式细胞仪检测细胞表面标志为:CD29 阳性,CD34 阴性,这与 Pittenger 等[4]的研究结果一致。

诱导骨髓 MSCs 向肝细胞分化,主要依赖于一定的培养条件。因此控制好培养条件就成为体外诱导分化为肝细胞的关键。HGF 也叫肝细胞生长因子,主要在肝脏 Kupffer 细胞与窦内皮细胞中产生,对肝细胞有促进有丝分裂作用,是正常肝细胞最强的促有丝分裂剂,因此添加 HGF 被广泛用在了肝相关干细胞体外诱导分化的实验中[5-7]。EGF 是作用于肝细胞增殖与分化的另一重要细胞因子,可通过表皮生长因子受体(EGFR)刺激肝细胞增殖。EGFR 可调节 EGF 和转化生长因子-α(TGF-α)信号,在肝细胞中有高表达[8],EGF 和 TGF-α 是肝细胞潜在的促有丝分裂原,部分肝脏切除后 EGF 血浆水平升高 2 ~ 3 倍,EGF/EGFR 在肝脏再生早期阶段有促有丝分裂作用[9],EGF 和 HGF 都可以诱导形成肝细胞的基因表达[10]。徐迎新等[11]用 EGF 和 HGF 体外诱导小鼠骨髓 MSCs,观察细胞形态变为肝细胞样圆型,免疫荧光染色检测到肝细胞标志物 CK18 和白蛋白。何忠杰等[12]也用 EGF 和 HGF 诱导大鼠 MSCs 细胞向类肝细胞分化,用 RT-PCR 检测到:AFP mRNA 在第 7 天呈阳性表达,Alb mRNA 及 CK-18 mRNA 开始即有表达,21 d 增强;用电镜观察到诱导 21 d 的 MSCs 形态结构与肝细胞相吻合。本实验分别采用含有 HGF、EGF、HGF + EGF 或不加生长因子的 DMEM 培养基进行诱导,结果诱导后细胞从形态上具有肝细胞样形态,免疫组化染色上可见分化后细胞表达肝细胞标志物 CK18,功能上产生白蛋白,以上表明 EGF、HGF、EGF + HGF 均能诱导 MSCs 向肝样细胞分化,并且两者联合效果更佳。

骨髓 MSCs 在体外易于分离培养,并能保持其多向分化潜能,遗传背景稳定,植入体内无免疫排斥反应,可作为组织工程的理想种子细胞,作为自体细胞构建的肝组织工程应用于临床。

参考文献:

[1] Heino T J, Hentunen T A. Differentiation of osteoblasts and osteocytes from mesenchymal sten cells[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2008, 3(2): 131 - 145.

[2] Tae S K, Lee S H, Park J S, *et al*. Mesenchymal Stem cells tor tissve engineering and regenerative Medicine[J]. Biomed Mater, 2006, 1(2): 63 - 71.

[3] Mingull J J, Conget P, Erices A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells[J]. Braz J Med Biol Res, 2000, 33(8): 881 - 887.

[4] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143 - 147.

[5] Oh S H, Miyazaki M, Kouchi H, *et al*. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage *in vitro*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 279(2): 500 - 504.

[6] 张刚庆, 方驰华, 池达智. 肝细胞生长因子诱导骨髓间充质干细胞向肝细胞分化的实验研究[J]. 中华外科杂志, 2005, 43(11): 716 - 720.

[7] Forte G, Minieri M, Cossa P, *et al*. Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: proliferation, migration, and differentiation[J]. Stem Cells, 2006, 24(1): 23 - 33.

[8] Huitfeldt H S, Skarpen E, Lindeman B, *et al*. Differential distribution of Met and epidermal growth factor receptor in normal and carcinogen-treated rat liver[J]. J Histochem Cytochem, 1996, 44(3): 227 - 233.

[9] Skarpen E, Oksvold M P, Grosvik H, *et al*. Altered regulation of EGF receptor signaling following a partial hepatectomy[J]. J Cell Physiol, 2005, 202(3): 707 - 716.

[10] Michalopoulos G K, Bowen W C, Mule K, *et al*. HGF-, EGF-, and dexamethasone-induced gene expression patterns during formation of tissue in hepatic organoid cultures[J]. Gene Expr, 2003, 11(2): 55 - 75.

[11] 徐迎新,王文杰,宋旭华,等. 骨髓间充质干细胞定向肝细胞样分化的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(2): 152 - 153.

[12] 何忠杰,方驰华,马俊勋,等. 肝细胞生长因子与表皮细胞生长因子联合诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为类肝细胞[J]. 解放军医学杂志, 2006, 31(5): 446 - 449.

(编辑 郭建秀)