·论　著·

体外诱导的骨髓源肝细胞样细胞移植治疗肝功能衰竭的实验研究*

刘　芳[1]，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、肿瘤细胞与分子病理学湖南省高校重点实验室，湖南衡阳 421001；
2.中山大学中山医学院病理学教研室、中山大学附属第一医院病理科，广州 510080）

摘　要：目的　探讨骨髓源肝细胞样细胞移植对急性肝功能衰竭的治疗作用。**方法**　体外诱导大鼠骨髓间质干细胞（BMSCs）分化，以 BST-1、清蛋白（ALB）为分子标志，采用逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）和流式细胞技术（FCM）检测其分化状态。构建大鼠急性肝功能衰竭模型，随机分为两组：实验组（骨髓源肝细胞样细胞移植）和对照组，结合多项血生化指标、病理形态学和生存状况综合评估骨髓源肝细胞对肝功能重建的影响。**结果**　诱导 20 d 的 BMSCs 髓系来源标志 BST-1 表达消失，成熟肝细胞标志 ALB 的表达出现，流式细胞术检测结果亦表明其高表达 ALB；骨髓源肝细胞移植可降低血清丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（AST）、总胆红素（TBIL）水平，提高清蛋白合成能力，改善大鼠肝功能和生存状况。**结论**　骨髓源肝细胞样细胞移植对肝功能恢复可以起到有效作用，可作为肝功能衰竭进行细胞移植的一个理想细胞源。

关键词：间质干细胞；肝功能衰竭，急性；细胞移植
doi：10.3969/j.issn.1671-8348.2011.24.003　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1671-8348(2011)24-2398-03

Study on the therapy of hepatic failure using hepatocyte-like cells derived from bone marrow transplantation*

Liu Fang[1]，*Chen Shaohong*[2]，*Liu Qingbo*[2]，*Fan Xinjuan*[2]，*Tang Fang*[2]，*Liu Dawei*[2]，*Zhao Guoqiang*[2△]
（1.*Department of Pathology，Medical College，University of South China/University Key Laboratory of Cancer Cellular and Molecular Pathology in Hunan Province，Hengyang，Hunan* 421001，*China*；2.*Department of Pathology，Zhongshan School of Medicine，Sun Yatsen University/Department of Pathology，the First Affiliated Hospital，Sun Yat-sen University，Guangzhou* 510080，*China*）

Abstract：Objective　To explore the therapeutic effect of acute hepatic failure by transplanting hepatocyte-like cells derived from bone marrow. **Methods**　BMSCs were differentiated *in vitro*. RT-PCR and flow cytometry (FCM) were performed to examine the cellular differentiated states by exploring the expression of BST-1 and albumin. Rats with acute hepatic failure model were randomly divided into 2 groups：experimental group(hepatocyte-like cells transplantation) and control group. The levels of biochemistry，pathological morphology and survival state analysis were used to evaluate the ability of hepatocyte-like cells derived from bone marrow to improve the liver functions. **Results**　Hepatocyte-like cells expressed the gene of albumin，but the gene of BST-1 disappeared after the induction for 20 days. The result of FCM showed that hepatocyte-like cells expressed albumin too. Hepatocyte-like cells transplantation could lower the level of AST，ALT and TBIL，enhanced the ability to synthesizing ablumin，and improved the liver functions and survival rate of acute hepatic failure rats remarkably. **Conclusion**　Hepatocyte-like cells derived from bone marrow can improve hepatic function，which can be used for a perfect cell source of HCT.

Key words：mesenchymal stem cells；liver failure，acute；cell transplantation

骨髓间质干细胞（bone marrow mesenchymal stem cells，BMSCs）是一种多能干细胞，已有大量实验证明其可在特定条件下向肝细胞方向诱导分化[1-3]。本研究组前期在国家自然科学基金的资助下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清蛋白的肝细胞样细胞[4-8]。然而，这些体外诱导的细胞虽然已在形态学和分子谱上具备了肝细胞的某些特征，但是否具备肝细胞的生物学功能？能否对受损肝脏起到一定的功能代偿作用？能否用作肝细胞移植和生物人工肝技术的细胞源？要回答这些问题，还需要进一步的体内实验研究。本实验采用体外诱导的肝细胞样细胞进行体内移植，综合评估其对肝功能衰竭的代偿能力。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物　健康雄性 SD 大鼠 4 只，6 周龄，体质量 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，体质量 100～150 g，用于构建急性肝功能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。

1.1.2　主要试剂　低糖型 DMEM/F-12 培养基（GIBCO 公司）、D-氨基半乳糖盐酸盐（D-galactosamine，D-gal，江苏启东九丰工贸有限公司）、胎牛血清（杭州四季青公司）、表皮生长因子（epidermal growth factor，EGF，PeproTech，英国）、DNA 提取试剂盒（Omega，美国）、Taq 酶（Promega，美国）、一抗（兔抗鼠 ALB 抗体，albumin，ALB，DAKO 公司）、二抗（羊抗兔 IgG-FITC，Santa Cruz）。

1.1.3　主要仪器　PCR 仪（Eppendorf，德国）、倒置相差显微镜（Olymplus，日本）、紫外透射分析仪（WFH-202B，上海）、凝胶成像仪（UVP，美国）、稳压稳流电泳仪（上海）、细胞培养箱

*　**基金项目：**国家自然科学基金（NO：30170473）；广东省自然科学基金（NO：04009326）；湖南省教育厅课题（NO：08C744）；湖南省重点学科建设资助项目（2006-180）；湖南省高校重点实验室资助项目。　△　**通讯作者**，Tel：(020)87331075；E-mail：zhaogq@mail.sysu.edu.cn。

表 1　细胞移植后 12、72 h 时间点各移植组肝功能生化指标变化($\bar{x}\pm s$)

指标	移植前	移植后 12 h		移植后 72 h	
		实验组	对照组	实验组	对照组
ALT(U/L)	42.40±14.31	362.10±16.65[a]	997.60±99.50	268.00±17.81[a]	425.00±21.61
AST(U/L)	103.30±17.38	911.90±27.34[a]	2 795.90±22.82	650.40±39.19[a]	930.60±50.60
TBIL(μmol/L)	0.40±0.22	3.33±0.33[a]	31.00±3.08	1.70±0.46[a]	210.00±1.81
ALB(g/L)	36.50±3.02	33.20±1.94[a]	25.30±1.80	33.10±2.15[a]	25.60±0.89

[a]：$P<0.05$，实验组与对照组比较。

(Precision，美国)、全自动生化分析仪(日本日立 7170 型)、流式细胞仪(BECKMAN-COULTER 公司，ELITE；激光波长 488 nm，功率 15 mW)。

1.2　实验方法

1.2.1　雄性大鼠 BMSCs 的分离、培养和鉴定　分离和培养的方法见文献[5]。细胞经流式细胞仪分析，显示出 CD29＋CD44＋CD34－CD45－的分子表型，流式结果见文献[6]。

1.2.2　BMSCs 的诱导分化　按文献[6-8]方法，取传至第 5 代的 BMSCs 按 1×10^4 个/cm^2 接种至 75 cm^2 塑料培养瓶，24 h 后除去含血清 DMEM/F-12 培养基，换用含 0.15 g/L 大鼠肝损伤组织萃取物蛋白的培养液定向诱导，每 3 d 换全液。

1.2.3　逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction，RT-PCR)**检测 BMSCs 的分化状态**　提取定向诱导至 20 d 的 BMSCs 总 RNA，分别检测肝细胞的分子标志 Albumin 及骨髓间质细胞的分子标志 BST-1 的表达状态。引物及扩增条件见文献[4]，选用 GAPDH 为内参照。

1.2.4　流式细胞技术检测 BMSCs 的分化状态　胰蛋白酶消化后计数，用 PBS 调整细胞浓度至 1×10^7 个/mL 的单细胞悬液，免疫组化固定液固定 15 min，破膜剂破膜，依次加入一抗 ALB 和二抗，分别于室温孵育 30 min，上机，用流式细胞仪检测 ALB 的表达。

1.2.5　急性肝功能衰竭动物模型构建及分组　按参考文献[9]方法，取雌性 SD 大鼠 40 只，禁食 12 h 后，一次性腹腔注射 D-gal 1.4 g/kg 构建大鼠急性肝功能衰竭模型。将大鼠随机分为 2 组：实验组以诱导 20 d 的 BMSCs 为细胞源进行移植($n=20$)；仅注射无细胞的基础培养基作为对照组($n=20$)。

1.2.6　细胞移植　雌性大鼠一次性腹腔注射 D-gal 12 h 后，所有动物均用 10%水合氯醛 2.5 mL/kg 腹腔注射麻醉。5×10^6 个骨髓源肝细胞/0.5 mL DMEM/F-12，经 1 mL 注射器接 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，术后每只大鼠肌肉注射青霉素 20 万 IU，1 次/d，连续 3 d。

1.2.7　移植疗效观察　诱发急性肝功能衰竭后，观察大鼠精神状态、食欲、活动度等情况；记录大鼠生存时间；行细胞移植术前、细胞移植后 12、72、96、168 h 剪尾采血，离心后取血清，用生化分析仪检测细胞移植前后动物血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase，ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase，AST)、总胆红素(total bilirubin，TBIL)和清蛋白(albumin，ALB)的含量水平；细胞移植后第 7 天取大鼠肝脏进行病理形态学观察。

1.3　统计学处理　应用统计软件 SPSS13.0 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。用 Log-rank 方法检验生存率。以 $P=0.05$ 为检验水准，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　　果

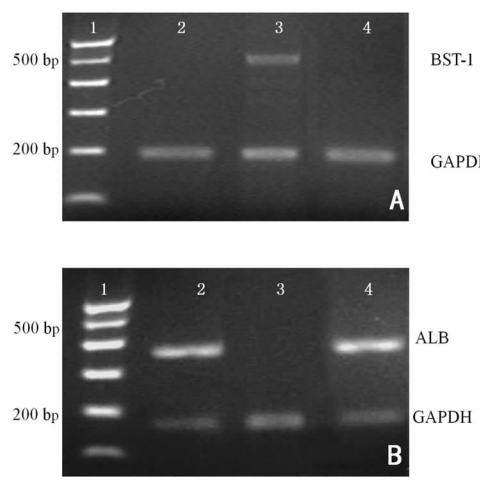
2.1　BMSCs 诱导分化过程中的形态学改变　原代骨髓混合细胞接种 24 h 后倒置显微镜下观察，可见大量悬浮细胞和少量稀疏贴壁细胞，细胞形态有星形，椭圆形，扁平形，长梭形不等。第 4 天可见大的克隆样细胞集落形成，集落不断扩大，第 10 天可互相融合成单层。传至第 5 代，杂质细胞不断被除去，细胞形态为长梭形，BMSCs 逐渐被纯化(封 2 图 1A)。诱导后第 3 天 BMSCs 未见明显形态改变；6 d 后可见成纤维样细胞细长，略有缩短；9 d 后，细胞突起缩短更加明显；11 d 后细胞可呈簇状生长，大部分细胞突起完全消失呈圆形或近圆形类上皮样形态，细胞团之间的稀疏区仍可见较多梭形细胞存在；其后成纤维细胞逐渐减少，上皮样细胞继续增多；至第 20 天时几乎所有的细胞均呈圆形或类圆形(封 2 图 1B)。

2.2　诱导前后 BMSCs 的分子表达特征：

2.2.1　BST-1 的表达特征　未诱导的 BMSCs 表达，但诱导至第 20 天的 BMSCs BST-1 的表达消失(图 2A)。

2.2.2　Albumin 的表达特征　未诱导的 BMSCs 不表达，而诱导至第 20 天的 BMSCs 可检测到其表达(图 2B)。

2.3　流式细胞技术检测诱导 20 d BMSCs Albumin 的表达　定向诱导 20 d BMSCs Albumin 表达率高达 98.0%。



A：BST-1 的表达特征；B：ALB 的表达特征；1. 标准品；2. 正常大鼠肝细胞对照；3. 未诱导 BMSCs；4. BMSCs 诱导 20 d。

图 2　BMSCs 诱导分化过程中分子表达特征

2.4　细胞移植前后血清学指标变化特征　骨髓源肝细胞移植能显著降低 ALT、AST、TBIL 水平及提高 ALB 合成能力，改善肝功能。实验组与对照组相比(以移植后 12、72 h 时间点为例)，经统计学分析，各类肝功能生化指标均有显著改善($P<0.05$)(表 1)。

2.5 大鼠肝脏病理形态学观察 移植术后第 7 天，移植组大鼠肝脏大体观体积、切面及颜色均较正常，镜下肝小叶结构基本正常，仅见少量炎症细胞浸润和少量肝细胞脂肪变性；而对照组大鼠肝脏大体观肝脏表面淤血、肿胀，被膜紧张，无光泽，镜下肝细胞变性坏死仍较明显及结构破坏，可见充血、出血和大量炎症细胞浸润(封 2 图 3)。

2.6 大鼠生存状况观察 与对照组相比，移植组的大鼠生存状况明显改善，表现为动物饮水和进食增加，活动增多。对照组多在 72 h 内死亡，仅 6 例存活时间超过 72 h，实验组大多活过 72 h，实验组和对照组存活率分别为 75.0%、30.0%，两组间生存率比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨 论

急性肝功能衰竭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，但健康肝脏来源的短缺使肝脏移植受到严重制约，以致许多患者在痛苦的等待中死亡。肝细胞或干细胞移植(hepatic cell transplantation，HCT)技术可以通过向患者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。但细胞源问题仍是制约 HCT 技术发展的一个关键问题。

BMSCs 作为一种成体干细胞，除了具有自我更新能力外，还具有多向分化的潜能。近年来，BMSCs 在体外不同的诱导环境下定向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相对较少[10-15]。本课题组利用肝损伤组织匀浆蛋白体外诱导 BMSCs 至表达成熟肝细胞标志 ALB，然后将其植入急性肝功能衰竭大鼠的体内。结果显示，骨髓源肝细胞植入后能显著降低动物血液内的 ALT、AST、TBIL 水平，提高 ALB 的合成能力。肝脏受损时，血液内 ALT、AST、TBIL 水平上升，ALB 水平下降。细胞植入后，各项指标开始向正常水平回归。同时病理形态学结果也证实实验组肝脏较对照组组肝脏的修复明显加快，这些结果均提示植入的细胞发挥了一定的生理功能，对衰竭的肝脏功能在一定程度上起到了代偿作用，使肝细胞衰竭大鼠肝脏功能重建，从而延长了大鼠存活时间，改善了生存状况，提高了生存率。

通过本实验，本组发现这些经体外诱导后在形态学和分子生物学上具备了肝细胞分子特征的骨髓源肝细胞，通过体内移植，能对肝功能衰竭大鼠的肝功能起到一定的代偿作用，其可能具备了肝细胞的一些生物学功能，通过进一步研究可用作肝细胞移植和生物人工肝技术的细胞源。

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] 陈小菊，王嫣，王兰，等. 诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的实验研究[J]. 重庆医学，2009，38(10)：1185-1187.

[3] 梁梓宇，覃山羽，姜海行，等. 骨髓间充质干细胞诱导肝纤维化大鼠肝星状细胞凋亡和 Caspase-3 表达[J]. 重庆医学，2010，39(20)：2721-2723.

[4] 刘芳，陈少红，刘青波，等. 黄嘌呤核苷促进骨髓间质干细胞体外快速扩增的实验研究[J]. 中国病理生理学杂志，2010，26(12)：2389-2393.

[5] 刘芳，陈少红，刘青波，等. 骨髓间充质干细胞移植后的肝功能重建[J]. 中国组织工程研究与临床康复，2011，15(10)：1803-1808.

[6] Ke Z，Zhou F，Zhao G，et al. Down-regulation of Wnt signaling could promote bone marrow-derived mesenchymal stem cells to differentiate into hepatocytes[J]. Biochem Biophy Res Commun，2008，367：342-348.

[7] Chen JZ，Guo HH，Zhao Q，et al. A selective tropism of transfused oval cells for liver[J]. World J Gastroenterology，2003，9(3)：544-546.

[8] Hong H，Chen JZ，Zhao GQ，et al. Influence of experimental serum of liver-damaged rats on differentiation tendency of bone marrow derived stem cells[J]. World J Gastroenterology，2004，10(15)：2250-2253.

[9] 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.

[10] 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.

[11] 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(3)：405-415.

[12] Eguchi S，Lilja H，Hewitt WR，et al. Loss and recovery of live regeneration in rats with fulminant hepatic failure[J]. J Surg Res，1997，72(2)：112-122.

[13] 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.

[14] 许海云，施晓雷，褚薛慧，等. 自体骨髓间充质干细胞移植对实验性急性肝功能衰竭的治疗作用[J]. 世界华人消化杂志，2009，17(10)：962-968.

[15] 王忠琼，刘彦，钟晓琳，等. 骨髓来源干细胞门静脉移植治疗肝纤维化得实验研究[J]. 山东医药，2009，49(32)：17-19.

(收稿日期：2011-01-15 修回日期：2011-04-27)