

# 诱导性多能干细胞治疗小鼠肝损伤的初步研究

王建军<sup>1</sup>, 赵平<sup>1</sup>, 靳雪源<sup>1</sup>, 程勇前<sup>1</sup>, 刘鸿凌<sup>2</sup>, 闫涛<sup>1</sup>, 卿松<sup>1</sup>, 丁宁<sup>1</sup>, 辛绍杰<sup>2</sup> (1.解放军第302医院 国际肝病诊疗中心, 北京 100039; 2.解放军302医院 肝衰竭诊疗与研究中心, 北京 100039)

**摘要:** 目的 了解诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, IPS细胞)对肝细胞损伤的治疗作用。方法 取健康雄性C57小鼠28只, 分为健康对照组、实验组和实验对照组。实验组小鼠腹腔内注射2500 mg/kg氨基半乳糖造小鼠肝功能损伤模型, 造模2天后在实验组小鼠尾静脉注射CFSE荧光标记后的IPS细胞。在注射IPS细胞后5天、10天、15天和20天时, 健康对照组、实验组、实验对照组各取两只小鼠处死, 取肝脏标本, 分别行冰冻切片显微镜观察荧光, 石蜡切片行HE染色, 取血行生物化学检查。结果 IPS细胞注射入小鼠体内后, 可在小鼠肝脏定植, 注射IPS细胞的小鼠血中ALT、AST下降速度较未注射IPS细胞的小鼠明显加快。肝脏病理损伤恢复情况较未注射IPS细胞的小鼠明显改善。结论 IPS细胞注射入肝功能损伤C57小鼠体内, 可对小鼠的肝功能损伤有一定的修复作用。

**关键词:** 诱导性多能干细胞; 肝功能损伤

## Primary study of induced pluripotent stem cells in treatment of liver injury in mice

WANG Jian-jun<sup>1</sup>, ZHAO Ping<sup>1</sup>, JIN Xue-yuan<sup>1</sup>, CHENG Yong-qian<sup>1</sup>, LIU Hong-ling<sup>2</sup>, YAN Tao<sup>1</sup>, QING Song<sup>1</sup>, DING Ning<sup>1</sup>, XIN Shao-jie<sup>2</sup> (1. International Centre for Diagnosis and Treatment of Liver Diseases, the 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China; 2. Liver Failure Treatment and Research Center, the 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China)

**Abstract: Objective** To investigate the therapeutic effect of induced pluripotent stem cells (IPS cells) on liver injury. **Methods** Total of 28 healthy male C57 mice were divided into healthy control group, experimental group and experimental control group. In the experimental group, a mouse liver injury model was induced by intraperitoneal injection of amino galactose (2500 mg/kg). After two days, the IPS cells were injected into the mice in the experimental group with fluorescence labeled CFSE. After 5 days, 10 days, 15 days and 20 days, the mice in healthy control group, experimental group and experimental control group were sacrificed and the liver samples were taken for frozen section and paraffin sections were stained with HE staining. The liver function were detected. **Results** The IPS cells can be settled in the liver of the mice after injection. ALT and AST in the blood of mice after injecting with IPS cells decreased significantly faster than those in the non IPS cells and the recovery of liver pathological injury improved significantly. **Conclusion** IPS cells can repair the damage of liver after injected into the C57 mice with liver injury.

**Key words:** Induced pluripotent stem cell; Liver injury

近年来, 国内外的多项研究<sup>[1-3]</sup>发现, 干细胞治疗, 包括胚胎干细胞、骨髓间充质干细胞、脐带血干细胞等可用于急性肝功能损伤、肝功能衰竭及肝硬化患者, 并取得了一定的疗效, 可以作为细胞替代治疗的来源。这些干细胞的共同特点是可以自我更新, 在体内具有向肝细胞分化的潜能。诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, IPS细

胞)具有类似胚胎干细胞的特性, 可以自我更新, 具有自主增殖、自我分化的多能性, 同时也可以避免胚胎干细胞临床应用所必须面对的伦理问题, 理论上也可以应用于肝功能损伤及肝功能衰竭的治疗。基于此, 本研究选择C57小鼠, 制造小鼠肝功能损伤模型, 通过在C57小鼠尾静脉注射IPS细胞, 了解IPS细胞对肝细胞损伤的治疗作用。

## 1 材料和方法

1.1 实验材料 C57小鼠购于斯贝福实验动物公司, 人IPS细胞(人包皮成纤维细胞诱导)购于思赛因

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2016.02.009

基金项目: 军队十二五重大课题(BWS11J075)

通讯作者: 辛绍杰 E-mail: xsj302@yahoo.com.cn

公司。注射用氨基半乳糖购于美国Inalco公司, 荧光染料CFSE购于日本DOjinDO公司, 人IPS细胞完全培养基(含血清)购于思赛因公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 C57小鼠肝功能损伤模型

1.2.1.1 造模实验 取7只C57小鼠, 腹腔内分别注射氨基半乳糖生理盐水注射液500 mg/kg、1000 mg/kg、1500 mg/kg、2000 mg/kg、2500 mg/kg、3000 mg/kg、3500 mg/kg。1天后取眼眶血行生物化学检查, 取肝脏行石蜡切片, HE染色行病理检查。

1.2.1.2 动物分组 健康雄性C57小鼠28只, 体重18~20 g, 分为健康对照组(10只), 实验组(10只)和实验对照组(8只)。

1.2.1.3 造模 根据上一步实验, 腹腔内注射2500 mg/kg氨基半乳糖可获得良好的肝功能损伤模型。在实验组和实验对照组小鼠腹腔内注射氨基半乳糖2500 mg/kg, 健康对照组小鼠腹腔内注射对应体积的生理盐水。

### 1.2.2 IPS细胞注射肝功能损伤C57小鼠

1.2.2.1 IPS细胞CFSE荧光染色 准备IPS细胞悬液, 用PBS(-)等合适的培养基, 调整细胞浓度至约 $10^7$ 个/ml。取1 ml细胞悬液于试管中, 加入适量CFSE工作液(终浓度5  $\mu$ mol/L), 轻轻搅拌混匀。在37℃培养箱中培养15~30分钟。离心后去上清, 加入2 ml PBS溶液, 再离心后去上清, 重复此操作1次。加入0.9%氯化钠溶液制成细胞悬液。

1.2.2.2 造模 2天后, 在实验组小鼠尾静脉注射CFSE荧光标记后的IPS细胞( $10^7$ 个/ml) 200  $\mu$ l。实验对照组尾静脉注射同等体积的生理盐水。同时随机选择实验组和健康对照组各2只小鼠处死, 取肝脏标本, 分别行石蜡包埋切片和HE染色, 取血行生物化学检查(ALT、AST)。

1.2.2.3 分别在注射IPS细胞后5天、10天、15天和20天, 健康对照组、实验组、实验对照组各取2只小

鼠处死, 取肝脏标本, 分别行冰冻切片显微镜观察荧光, 石蜡切片行HE染色, 取血行生物化学检查(ALT、AST)。

## 2 结果

2.1 腹腔内注射氨基半乳糖后的C57小鼠肝脏组织病理大体标本及生物化学结果 C57小鼠分别注射氨基半乳糖500 mg/kg、1000 mg/kg、1500 mg/kg、2000 mg/kg、2500 mg/kg、3000 mg/kg、3500 mg/kg, 1天后取小鼠肝脏进行观察。随着半乳糖注射量的增加, 肝脏的形态及颜色均有明显改变。应用 $\geq 2500$  mg/kg氨基半乳糖注射1天后, 肝脏失去鲜红色, 转为灰白色, 并可见表面有大量点状坏死灶, 提示肝脏损害明显。采用自动生化仪对小鼠血清行生物化学分析, 可见氨基半乳糖用量 $\geq 2500$  mg/kg时, 小鼠血清的ALT、AST明显升高, 与肝脏组织病理大体标本表现一致, 因此, 选择C57小鼠腹腔内注射2500 mg/kg氨基半乳糖作为肝功能损伤模型, 见图1。

2.2 IPS细胞的CFSE荧光染色 荧光染料CFSE可以结合细胞内的蛋白质, 显示为绿色荧光, 进入细胞后定位于细胞膜、细胞质和细胞核, 在细胞核的荧光最强。本实验中, IPS细胞消化后, 呈悬浮细胞状态, 经CFSE染色, 在荧光显微镜下可见到绿色荧光(图2), 提示IPS细胞染色良好。

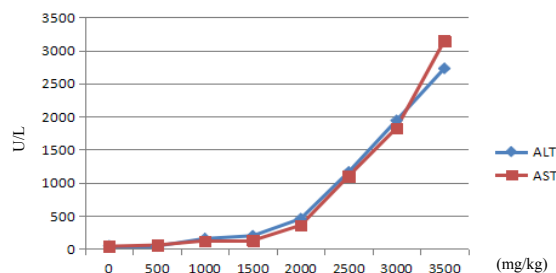


图1 不同浓度的氨基半乳糖腹腔注射1天后小鼠血清肝功能指标

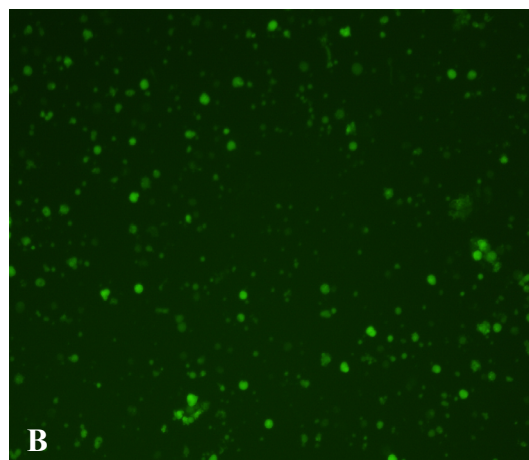
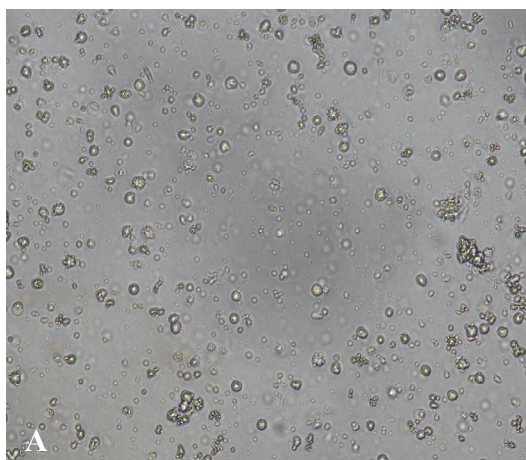


图2 IPS细胞经CFSE染色荧光显微镜观察结果( $\times 100$ )

注: A: 白光; B: 绿色荧光

**2.3 冰冻切片观察注射IPS细胞后在小鼠肝脏的定植情况** 应用CFSE荧光染色的IPS细胞经尾静脉注射入肝损伤的C57小鼠5天后，小鼠仍然存活，一般情况良好，取肝脏行冰冻切片检查，小鼠肝脏内可见散在的绿色荧光，提示有标记的IPS细胞定植，随着细胞的分裂，CFSE荧光减弱，镜下可见部分细胞的荧光较弱，提示可能存在IPS细胞在小鼠肝脏内分化，如图3。10天后小鼠肝脏标本冰冻切片于荧光显微镜下观察未见明显荧光，其原因可能是随着细胞的分裂增殖，子代的荧光逐渐减弱，已不能被观察到。

**2.4 小鼠肝脏生物化学功能的改变情况** 肝损伤模型的C57小鼠在注射IPS细胞治疗后，与未注射IPS细胞的小鼠比较，血清ALT、AST水平均逐渐下降，但注射IPS细胞的小鼠在注射5天、10天、15天后的ALT、AST水平均较未注射IPS细胞的小鼠水平低，20天后两组小鼠的ALT及AST水平均接近健康对照

组小鼠的水平（图4）。

**2.5 肝功能损伤小鼠注射IPS细胞后不同阶段的组织病理学改变** 与正常肝组织相比，C57小鼠腹腔注射2500 mg/kg氨基半乳糖2天后，可见较多肝细胞水肿呈气球样变，汇管区可见炎细胞浸润，并可见少数点状坏死灶、凋亡小体等（图5）。IPS细胞注射肝功能损伤小鼠20天后，与未注射IPS细胞的小鼠相比，两者肝脏病理损害均有所改善，但注射IPS细胞的小鼠肝脏改善明显，接近正常小鼠肝脏。提示注射IPS细胞后，小鼠的肝脏损伤已获得明显修复，IPS细胞对小鼠的肝功能损伤有修复作用（图6）。

### 3 讨论

干细胞在细胞替代治疗的重要性主要体现在其可以分化为特定的体细胞，起到细胞替代的作用。同时，干细胞移植还可以促进宿主细胞内特定细胞的再生。异体细胞移植可能会出现移植后排斥反

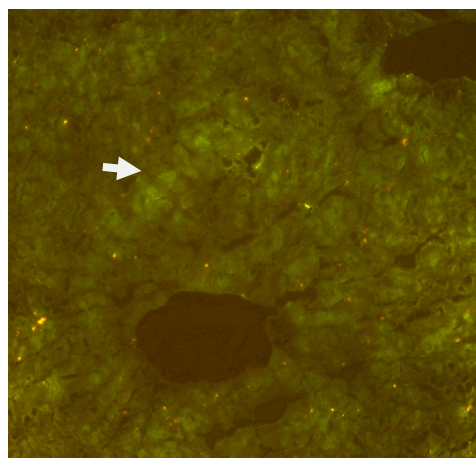
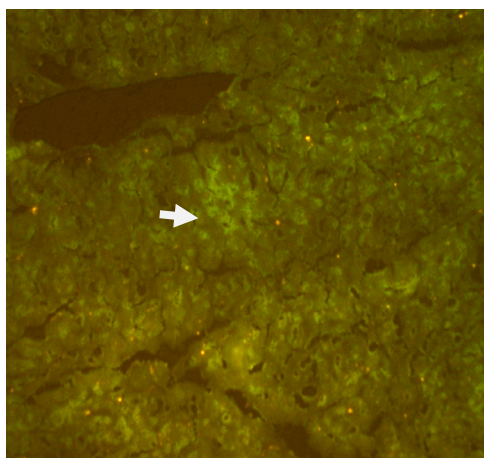


图3 肝功能损伤 C57 小鼠注射 IPS 细胞 5 天后肝脏冰冻切片荧光显微镜观察结果（×200）  
注：箭头所指的即为定植在肝细胞内的 IPS 细胞

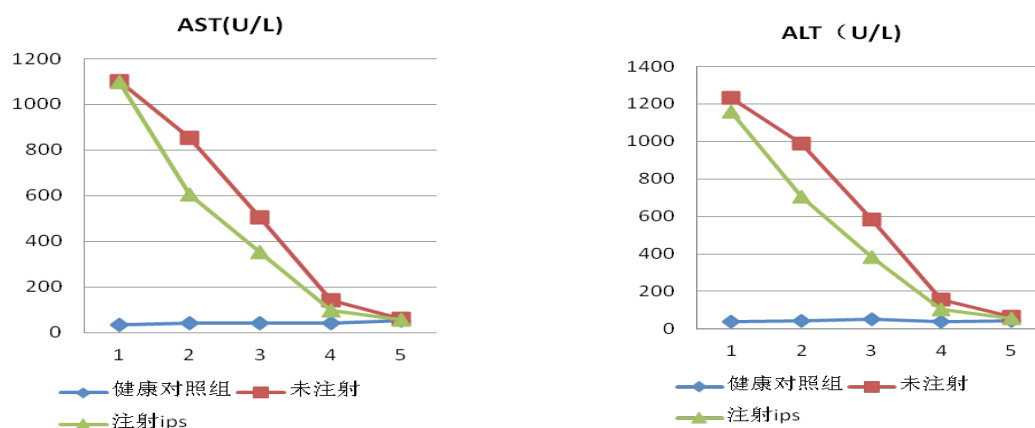


图4 肝功能损伤 C57 小鼠不同时间点血清 ALT、AST 水平  
注：1：造模后 2 天；2：注射 IPS 细胞 5 天；3：注射 IPS 细胞 10 天；4：注射 IPS 细胞 15 天；5：注射 IPS 细胞 20 天



应,但从目前的研究来看,干细胞移植所产生的排斥反应很少。国外研究发现,某些干细胞(如人脐带干细胞或骨髓间充质干细胞)所表达的HLA I类分子和 $\beta 2$ -微球蛋白的水平很低,而一些共刺激分子如CD86、CD80、CD40以及HLA-DR在干细胞中几乎不表达<sup>[4]</sup>,提示这些干细胞可能具有低免疫原性。另外,干细胞移植后可以影响免疫性细胞的增殖和成熟,还存在着一定的免疫抑制作用,如Kitazawa等<sup>[5]</sup>研究发现,多能干细胞可以抑制一些异型抗原所诱导的特异性T细胞的增殖;Tobin等<sup>[6]</sup>研究发现,骨髓间充质干细胞通过抑制骨髓供体的CD4<sup>+</sup>T细胞,可以治疗移植后的急性排斥反应。还有研究发现,多能干细胞(如骨髓间充质干细胞)可以抑制促炎细胞因子的释放,进一步改变细胞因子在免疫细胞的分泌水平<sup>[7]</sup>。这些都说明干细胞在异体移植方面具有不可替代的优势。

目前有许多关于干细胞治疗肝细胞衰竭的研究,1999年,Peterson等<sup>[8]</sup>第1次报道将骨髓干细胞植入体内,可在受体肝脏内分化为肝细胞样细胞,提示肝功能损伤疾病以及遗传性肝病患者有希望

通过骨髓干细胞移植来治疗。随后研究发现,骨髓干细胞可以促进肝细胞的再生,抑制细胞的炎症反应、细胞凋亡和肝星状细胞的活化,还可通过分泌一些细胞因子和生长因子来改善肝脏的纤维化<sup>[9-11]</sup>。Tsai等<sup>[12]</sup>研究发现,人脐带间充质干细胞移植入肝纤维化大鼠模型体内,可促进大鼠肝细胞的修复与再生,进而改善肝脏的纤维化进展。Doan等<sup>[13]</sup>研究发现,通过在肝细胞微环境下培养脐血干细胞,可以在这些干细胞中检测到一些肝细胞特异的表面标志物的表达。近年来,国内也有应用脐血干细胞和骨髓干细胞治疗肝硬化及肝功能衰竭的报道,均取得了良好的疗效<sup>[14-16]</sup>。

IPS细胞是由体细胞诱导的具有多分化潜能的细胞,与其他干细胞类似,具有自我更新和自我繁殖的能力,体外实验也提示其具有多潜能性,在体外特定的培养条件下可以诱导为肝细胞样细胞<sup>[17-20]</sup>。王华等<sup>[21]</sup>研究发现,诱导性多能干细胞移植到行部分肝切除的肝硬化大鼠体内,有利于大鼠肝功能的恢复。提示其与其他干细胞一样,直接注射入体内后,也可能在肝细胞定植,通过释放一些生长因

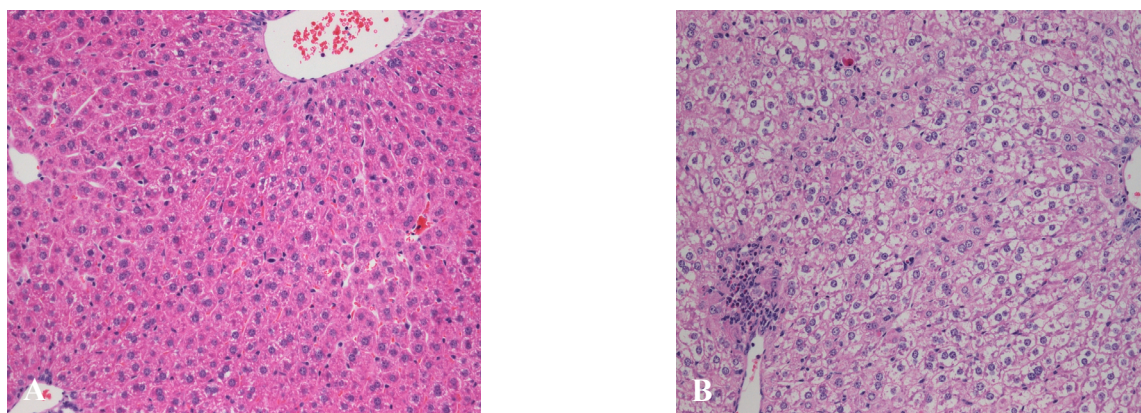


图5 正常小鼠肝脏与肝功能损伤模型小鼠肝脏病理图(HE,  $\times 200$ )

注: A 为正常小鼠的肝组织; B 为肝功能损伤模型小鼠的肝组织

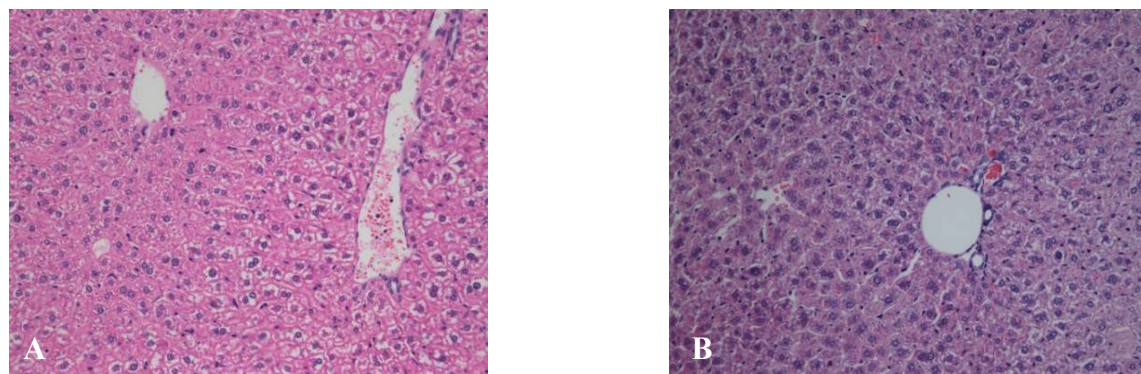


图6 IPS细胞注射肝功能损伤小鼠20天后的肝脏病理图(HE,  $\times 200$ )

注: A 为未注射IPS细胞的肝功能损伤小鼠的肝组织; B 为注射IPS细胞的肝功能损伤小鼠的肝组织

子和抗凋亡因子刺激内源性肝细胞的再生,甚至有可能进一步在肝脏的微环境下,分化为肝细胞样细胞,对肝功能损伤起到修复作用。为验证这一猜想,本研究选择C57小鼠,应用氨基半乳糖制造肝功能损伤模型,氨基半乳糖可以干扰肝细胞内磷酸尿嘧啶核苷的代谢,引起肝细胞损伤,通过与脂多糖联用造肝功能或肝衰竭模型<sup>[22,23]</sup>。单用氨基半乳糖造小鼠或大鼠肝功能损伤模型的剂量在文献中的报道并不相同,大多在500~3000 mg/kg。本研究所构建的模型,既可以反应肝功能损伤的表现,又未严重到使模型小鼠迅速死亡而不能完成实验。通过预实验发现,小鼠腹腔内注射2500 mg/kg的氨基半乳糖可获得理想的肝损伤模型。本研究选择的IPS细胞是由人包皮成纤维细胞所诱导的,已经过验证有良好的多潜能性及正常核型,经多次传代扩增生长状态良好,应用CFSE对IPS进行荧光染色作为细胞的体内示踪剂。整个实验过程中所有实验组及实验对照组小鼠均存活。IPS细胞经尾静脉注射入小鼠体内,5天后应用冰冻切片可发现细胞在小鼠肝脏内定植,生物化学检查提示无论是否注射IPS细胞,C57小鼠的肝功能都能逐渐恢复,但注射IPS细胞的小鼠血中ALT、AST下降速度较未注射IPS细胞的小鼠明显加快。20天后组织病理切片结果提示:注射IPS细胞后,小鼠肝脏病理损伤恢复情况较未注射IPS细胞的小鼠明显改善。以上研究均表明IPS细胞注入肝功能损伤的C57小鼠体内,对小鼠的肝功能有一定的修复作用。推测IPS细胞与其他干细胞类似,可能对肝细胞的损伤有恢复作用,但是否能够在肝脏的微环境下进一步分化为肝细胞样细胞,仍需进一步的研究来证实。本实验仅为对IPS细胞的这一功能的初步研究,还需要进一步的大样本实验来验证IPS细胞的这一功能,并进一步了解其具体的作用机制。

#### 参考文献

- [1] Kim TY, Kim DJ. Acute-on-chronic liver failure[J]. Clin Mol Hepatol,2013,19:349-359.
- [2] Li M, Ikehara S. Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for organ repair [J]. Stem Cells Int,2013,2013:132642.
- [3] 李卫国,蔡峻岭,张金良,等. 脐血干细胞移植对失代偿期乙型肝炎硬化的疗效[J]. 中国实用医刊,2013,40:112-114.
- [4] Deuse T, Stubbendorff M, Tang-Quan K, et al. Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells[J]. Cell Transplant,2011,20:655-667.
- [5] Kitazawa Y, Li XK, Xie L, et al. Bone marrow-derived conventional, but not cloned, mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation and prevent graft-versus-host disease in rats[J]. Cell Transplant,2012,21:581-590.
- [6] Tobin LM, Healy ME, English K, et al. Human mesenchymal stem cells suppress donor CD4<sup>+</sup> T cell proliferation and reduce pathology in a humanized mouse model of acute graft-versus-host disease[J]. Clin Exp Immunol,2013,172:333-348.
- [7] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses[J]. Blood,2005,105:1815-1822.
- [8] Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells.Science,1999,284:1168-1170.
- [9] LIU F, LIU ZD, WU N, et al. Transplanted endothelial progenitor cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in rats[J]. Liver Transpl,2009,15:1092-1100.
- [10] Muraca M. Evolving concepts in cell therapy of liver disease and current clinical perspectives[J]. Dig Liver Dis,2011,43:180-187.
- [11] 郑盛,肖琼怡,殷芳,等. 骨髓间充质干细胞移植对急性肝功能衰竭大鼠肝组织miRNA-155和TNF- $\alpha$ 表达的影响[J/CD]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版),2014,4:79-83
- [12] Tsai PC, Fu TW, Chen YM, et al. The therapeutic potential of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in the treatment of rat liver fibrosis[J]. Liver Transpl,2009,15:484-495.
- [13] Doan CC, Le TL, Hoang NS, et al. Differentiation of umbilical cord lining membrane-derived mesenchymal stem cells into endothelial-like cells[J]. Iran Biomed J,2014,18:67-75.
- [14] 韩建平,陈钟. 骨髓间充质干细胞经脾移植治疗大鼠急性肝功能衰竭的实验研究[J]. 中国普外基础与临床杂志,2014,21:669-675.
- [15] 王可敬,罗晓红,孙厚坦,等. 脐血干细胞移植对失代偿期肝硬化肝功能及血流动力学的影响[J]. 疑难病杂志,2014,13:1126-1129.
- [16] 王帅,周一鸣,范公忍,等. 骨髓间充质干细胞移植后在肝损伤大鼠体内的分布及其治疗作用[J]. 中国体视学与图像分析,2014,19:187-195.
- [17] Kawabata K, Inamura M, Mizuguchi H. Efficient hepatic differentiation from human IPS cells by gene transfer[J]. Methods Mol Biol,2012,826:115-124.
- [18] Chen YF, Tseng CY, Wang HW, et al. Rapid generation of mature hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells by an efficient three-step protocol[J]. Hepatology,2012,55:1193-1203.
- [19] Willenbring H, Soto-Gutierrez A. Transplantable liver organoids made from only three ingredients[J]. Cell stem cell,2013,13:139-140.
- [20] JI S, ZHANG L, HUI L. Cell fate conversion: direct induction of hepatocyte-like cells from fibroblasts[J]. J Cell Biochem,2013,114:256-265.
- [21] 王华,刘天金,胡鹏,等. 肝硬化大鼠诱导性多能干细胞移植对急性肝损伤的影响[J]. 江西医药,2012,47:301-304.
- [22] 尹学哲,金延华,王玉娇,等. 大豆异黄酮和皂甙对D-氨基半乳糖所致肝损伤小鼠肝脏抗氧化活性的影响[J]. 大豆科学,2014,33:139-141.
- [23] 李迪,申镐源,赵薇,等. 草苈蓉环烯醚D-氨基半乳糖所致急性肝损伤小鼠肝组织抗氧化活性的影响[J]. 延边大学医学学报,2012,35:97-100.

收稿日期: 2015-10-28