

脐血间充质干细胞体外诱导成肝细胞的研究进展

吴玉卓, 陈红(兰州大学第一医院 感染科, 兰州 730000)

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是干细胞的一种,具有多向分化的能力,因其可以分化为间质组织而得名。间充质干细胞可以修复、重建受伤或病变的多种组织器官,可用于神经系统疾病、肌腱损伤、心肌损伤、角膜损伤、肝脏组织损伤等多种疾病的治疗。若从异体采集干细胞,则存在免疫排斥、寻找配型的问题;若从成人自体采集,则存在采集过程痛苦、采集点可能感染、细胞数量少、耗时长等问题。但若从脐血采集,则解决了上述所有问题。本文就近年来脐血间充质干细胞体外诱导成肝细胞的研究进展综述如下。

1 间充质干细胞的一般特性

1.1 间充质干细胞的来源

最早发现间充质干细胞形成于发育中的骨髓腔,目前为止已经从骨髓以外的其他组织,如外周血^[1]、脐血^[2-5]、胎盘、胎膜组织、羊水^[6]、皮肤、脐带间质^[7]及脂肪组织、胰腺、肝脏^[8]分离到间充质干细胞。

1.2 间充质干细胞的体外分离及纯化

目前, MSC的分离方法主要有以下几种:①贴壁法:主要根据MSC的贴壁生长特性来实现分离;②密度梯度离心法:主要根据细胞成分的比重不同,清除红细胞,分离提取单个核细胞进行贴壁培养。普遍采用Ficoll或Percoll进行密度梯度离心。颌玉欣等^[9]运用不同的分离液、离心温度、速度、培养液及不同品种胎牛血清等分离细胞并进行对比分析,发现无论使用哪种分离液,只要其离心密度在1.073 g/L均能获得较纯的MSCs,温

度、时间、速度等条件恒定的条件下,选择合适的胎牛血清是取得实验成功的关键。有文献^[10]对密度梯度离心和贴壁法分离间充质干细胞增殖活性作了比较,发现密度梯度离心法所获得的MSCs纯度高,杂质细胞少,增殖活性强,而贴壁法所获MSCs纯度低,增殖速度相对较慢,且经数次传代仍有较多杂质细胞存在;③细胞表面分子标记分选法:主要是根据MSCs的细胞表面分子特征来分离。一般采用流式细胞仪、免疫磁珠或免疫沉积法来进行分选。但由于目前仍未找到MSCs特异性的细胞表面标记,该法较少采用;④细胞筛选法:主要是根据细胞大小来实现分离。利用1种有3 ml小孔的塑料培养皿筛选出MSCs。

1.3 间充质干细胞的扩增

脐血MSCs含量很低,只占有核细胞总数的0.001%~0.01%,因此要获得足量的脐血MSCs,必须在体外进行大量扩增。目前认为影响脐血MSCs扩增的因素有:①血清:血清对大量扩增脐血MSCs起着重要的作用,不同浓度的血清对培养脐血MSCs纯度的影响亦较大,常用10%的胎牛血清培养脐血MSCs。最近,Shetty等^[11]研究表明,脐血血清培养的间充质干细胞与胎牛血清培养细胞的无差异,而且用脐血血清培养的间充质干细胞的细胞数量较多,因此认为在培养间充质干细胞时可以用脐血血清代替胎牛血清。②密度:脐血MSCs的体外扩增速度与其接种密度也有关,一般认为较低密度种植有益于增殖,高密度接种后细胞生长较慢的原因可能是由于细胞间的接触抑制,或细胞释放到培养基中的因子影响了MSCs的生长。③细胞因子:一些细胞因子对于维持脐血MSCs增殖和未分化状态亦十分重要。

基金项目:兰州大学医学基金(LZUYX200655)

通讯作者:陈红 Email:chenhong1956@126.com

1.4 脐血间充质干细胞的特征

脐血MSCs体外培养的形态主要表现为梭形、纺锤形,少数为多角形,胞浆丰富,核染色质细,核仁明显,平行排列或旋涡样生长。脐血MSCs在体外具有很强增殖能力,可以在体外大量扩增和长期培养,并且可以长时间保持其未分化状态;其表达免疫表型为:①黏附分子家族:CD166、CD102、CD54和CD50;②整合素家族分子:CD49a、CD49b、CD49c、CD29和CD104;③细胞因子受体家族:白细胞介素-1受体(IL-1R)、IL-3R、IL-4R、IL-6R、干扰素受体 γ 、肿瘤坏死因子 α ;④其他:CD105、CD90、SH1和SH3。不表达造血细胞表面标志,如CD14、CD34、CD45、CD3、CD4等,也不表达主要组织相容性复合物分子。

2 体外诱导间充质干细胞向肝细胞分化

2.1 细胞因子诱导

Kang等^[12]分别将人脐血MSCs接种到铺有基质明胶的培养瓶中,并加入肝细胞生长因子(HGF)和成纤维细胞生长因子-4(FGF-4)。培养的第7天,MAPC分化成上皮样细胞,并表达甲胎蛋白(AFP);第2~4周期间,表达CK18,约在21天后,63.6%的细胞CK18、白蛋白(ALB)染色呈阳性。功能方面的检测:分泌ALB,储备糖原功能。体外MAPC在传了100代后仍能保持未分化状态,且经HGF和FGF-4的诱导可分化为具有形态、表型和功能特性的肝细胞。Tang等^[13]用HGF和FGF-4体外诱导人脐血间充质干细胞,并将其植入CCl₄受损小鼠体内,结果用免疫组织化学检测到鼠肝脏组织人类AFP和ALB的片段表达,进一步说明了HGF和FGF-4可以诱导脐血MSCs分化为肝样细胞。Lee等^[14]采用两步法诱导方案,脐血间充质干细胞分离后,用96孔板进行单克隆扩增,并接种于含20 ng/ml表皮生长因子(EGF)和10 ng/ml成纤维细胞生长因子(FGF)无血清培养液中培养2天,第3天加入0.61 g/L烟酰胺,培养7天后改为含20 ng/ml制瘤素M、1 μ mol/L地塞米松、50 g/L ITS等诱导因子的培养方案。在诱导的不同阶段,细胞表现出肝细胞功能的各种特征:

2周时,细胞由原来的长梭形逐渐转变为肝细胞的多角形,开始表达AFP、ALB、CK18并储备肝糖原,4周后具有摄取低密度脂蛋白能力、表达酪氨酸转氨酶和能诱导苯巴比妥活性的细胞色素P450,在诱导6周后开始分泌尿素,同时表达肝细胞核因子-4。实验结果提示人类不同来源的间充质干细胞诱导分化后可成为具有肝细胞功能的肝样细胞。

2.2 与肝细胞共培养

许诚等^[15]采用密度梯度离心法联合贴壁筛选法获取人脐血MSCs,加入人肝细胞株L-02细胞培养上清液或诱导因子(联用HGF和FGF-4)共培养,结果无论是添加L-02细胞培养上清液,还是采用诱导因子HGF和FGF-4均可在诱导后第7天、14天检测到细胞内细胞角蛋白18(CK18)、白蛋白及糖原的表达。结果从脐血中分离获得均一贴壁的MSCs;在人脐血间充质干细胞(umbilical cord blood mesenchymal stem cells, UBCMSCs)培养体系中,均可诱导MSCs细胞内表达中晚期成熟肝细胞表面标志物CK18、白蛋白及糖原。雄中华等^[16]将第6代的人脐血间充质干细胞采用梯度冷冻技术冻存6个月,复苏后培养至第8代时,加入肝细胞生长因子和成纤维细胞生长因子-4联合诱导28天。将第8代人脐带血间充质干细胞爬片与诱导28天后的类肝细胞爬片共培养。结果表明:共培养28天后,在人脐血间充质干细胞爬片中,位于中心的小部分细胞胞浆中有CK18和白蛋白的同时表达,且糖原染色阳性,与加入诱导因子(肝细胞生长因子和成纤维细胞生长因子-4)诱导成功的类肝细胞形态及表型相似,分化的类肝细胞可能具有促使人脐血间充质干细胞向肝系细胞定向分化的作用。

2.3 转基因法使向肝细胞分化

关于转基因法使脐血间充质干细胞向肝细胞分化的研究还不多见,有关用此方法使脐血造血干细胞向肝细胞分化研究的报道却很多。范烨等^[17]将HGF的裸DNA质粒通过尾静脉快速注入6~8周龄的非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠体内,酶联免疫吸附

法(ELISA)检测外周血中HGF水平,收集足月妊娠产妇的脐血,磁式分选法选出CD34⁺造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC), 20 μl 四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)腹腔注射建立NOD / SCID小鼠急性肝损伤模型,分别输注CD34⁺ HSC和或HGF质粒,结果显示:快速注入HGF质粒后,体内HGF水平明显上升,实验各组存活率及肝功能恢复情况无明显差异,病理切片显示:联合应用HGF+HSC的实验组,其肝组织损伤程度最轻,单独应用HGF或HSC的两个实验组结果类似,对照组肝组织损伤最重。在两组注射HSC的小鼠肝组织中,均可检测到人源性的、分泌白蛋白的肝样细胞,且联合应用HGF的实验组中,此种细胞更多,分布更广。

尽管近年来对MSC的研究取得了很大进展,但仍有许多问题尚待解决:到目前为止还没有十分完善的分离、培养和扩增MSC的方案,目前仍未能建立鉴定MSC的统一标准,至今还未能筛选到MSC特异性的标记分子;是何种信号诱导了MSC向多系分化,其诱导分化为肝细胞的分子机制尚未明了。这些问题都有待于进一步研究和探讨。MSC的可获得性、可扩增性及可向肝细胞分化性为我们展示了良好的研究和应用前景,它所具有向肝细胞分化能力和免疫原性弱的特点在细胞替代治疗、基因治疗以及组织器官的再造中具有重要的临床应用价值。

参考文献

- [1] Fernandez M, Simon V, Herrera G, et al. Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients[J]. Bone Marrow Transplant, 1997, 20: 265-271.
- [2] Erices A, Conget P, Minguell J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood[J]. Br J Haematol, 2000, 109: 235-242.
- [3] Godwin HS, Bicknese AR, Chien SN, et al. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat and neural marker[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2001, 7: 581-588.
- [4] Rosada C, Justesen J, Melsvik D, et al. The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells[J]. Calcif Tissue Int, 2003, 72: 135-142.
- [5] Lee OK, Kuo TK, Chen WM, et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord[J]. Blood, 2004, 103: 1669-1675.
- [6] Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 5807-5812.
- [7] Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative source of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord[J]. Stem Cells, 2003, 21: 105-110.
- [8] Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver and bone marrow[J]. Blood, 2001, 98: 2396-2402.
- [9] 顾玉欣, 张进贵, 郭晓华, 等. 体外分离大鼠骨髓间充质干细胞方法研究[J]. 河北医科大学学报, 2004, 25: 136-138.
- [10] 韩立赤, 胡静, 戚孟春, 等. 密度梯度离心和贴壁法分离大鼠骨髓间充质干细胞增殖活性和成骨功能比较[J]. 现代口腔医学杂志, 2005, 19: 287-290.
- [11] Shetty P, Bharucha K, Tanavde V. Human umbilical cord blood serum can replace fetal bovine serum in the culture of mesenchymal stem cells[J]. Cell Biol Int, 2007, 31: 293-298.
- [12] Kang XQ, Zang WJ, Bao LJ, et al. Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11: 7461-7465.
- [13] Tang XP, Zhang M, Yang X, et al. Differentiation of human umbilical cord blood stem cells into hepatocytes in vivo and in vitro[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12: 4014-4019.
- [14] Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. Hepatology, 2004, 40: 1275-1284.
- [15] 许诚, 王松, 何清, 等. 体外定向诱导脐血间充质干细胞向类肝细胞分化的研究[J]. 中国基层医药, 2006, 13: 1976-1979.
- [16] 熊中华, 许倩, 陆德云, 等. 冻存人脐血间充质干细胞向类肝细胞的诱导分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 2: 1252-1255.
- [17] 范焱, 王学浩, 张峰, 等. HGF质粒体内表达诱导脐血干细胞向肝系细胞分化[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14: 767-771.

收稿日期: 2007-12-22