

## · 综 述 ·

# 诱导骨髓间质干细胞分化为肝细胞的方法研究\*

邓中华 综述, 曹友德<sup>△</sup> 审校

(湖南省人民医院, 长沙 410005)

**关键词:** 骨髓间质干细胞; 肝细胞; 细胞分化; 细胞移植**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.07.026**文献标识码:**A**文章编号:** 1673-4130(2012)07-0825-03

肝病是一种常见的疾病, 在各种慢性肝病发展的终末期常常会出现肝纤维化、肝硬化以及肝癌, 严重危害人类健康。自 1999 年 Peterson 等<sup>[1]</sup> 报道肝细胞有骨髓源性后, 骨髓干细胞在肝病治疗中的应用越来越受到关注。大量的研究证实, 骨髓间质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, MSCs)在一定的条件下能够分化为包括肝细胞在内的各种组织细胞<sup>[2]</sup>。同时, MSCs 还具备自我更新的潜能, 加上取材方便, 易于体外培养, 无移植免疫排斥反应等诸多优点使得 MSCs 具有极为广阔的应用前景<sup>[3]</sup>。

## 1 MSCs 的简介

1961 年 Friedenstein 等<sup>[4]</sup> 在骨髓培养过程中发现一类贴壁生长的单个核细胞, 它不同于骨髓干细胞, 但是在一定条件下能分化为各种组织细胞, 而这些分化了的细胞传代 20~30 代之后, 仍然具备多项分化的潜力, 这种细胞被命名为间质干细胞, 之后陆续有报道 MSCs 从脐带、脐血、脂肪、月经血中被分离出来<sup>[2,5]</sup>。但是, 目前用于肝脏疾病细胞移植治疗的间质干细胞主要来自骨髓。

MSCs 具有支持造血、调节免疫的功能, 并且能分泌营养因子使损伤组织再生, 具有组织修复的作用, 同时 MSCs 还具有自我更新的潜能<sup>[6-7]</sup>。MSCs 表面通常表达 CD12、CD73、CD29、CD44、CD71、CD90、CD105、CD106、CD120a 等分子, 不表达 CD11b、CD19、CD34、CD45<sup>[3,8-10]</sup>, 以及与人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)有关的 B7、B72 分子和主要组织相容性复合物Ⅱ类分子 HLA-DR 等<sup>[11]</sup>。因此 MSCs 属于免疫缺陷的细胞, 容易免疫耐受, 可避免移植排斥反应。

## 2 MSCs 的分离方法

**2.1 贴壁筛选法** 贴壁筛选法是基于诸多细胞混合的骨髓, 在体外培养的过程中, 红细胞不具备贴壁特性, 因而在不断的换液过程中被清除; 巨噬细胞、造血细胞、脂肪细胞以及间质干细胞具有贴壁特性而被保留下, 而 MSCs 能在消化酶的作用下较快地与培养介质分离, 从而与其他细胞分离, 使 MSCs 纯化。但此方法分离粗糙, 杂质细胞较多, MSCs 增殖速度相对较慢, 但不影响其多向分化的潜能<sup>[12]</sup>。

**2.2 密度梯度离心法** 密度梯度离心分离是基于骨髓各种细胞比重不同, 运用不同的密度分离液通过离心技术将不同比重细胞进行分离。由于不同细胞种群的密度差异非常微小, 因此选择适当的分离液是此方法的关键。现在广泛使用的分离液有 Percoll(1.073 g/mL) 或 Ficoll(1.077 g/mL) 两种。运用 Percoll 分离的 MSCs 为单一的间质干细胞, 具有独特的表型及化学特征; 而经 Ficoll 分离的细胞有基质细胞、造血细胞、成

纤维细胞等多种杂质细胞混入<sup>[13]</sup>。

**2.3 免疫磁珠和流式细胞分离法** 免疫磁珠分离法是利用固相吸附或者抗体包被的磁珠对表面带有某种确切抗原成分的 MSCs, 进行正向或者反向选择从而获得相对比较纯的 MSCs。流式细胞仪是利用针对 MSCs 表面特异抗原表位进行分选。CD105 和 CD11b 抗原已经被证实可以运用于磁珠和流式细胞仪分选细胞, 并且具有较高的分选效率<sup>[14]</sup>。使用免疫磁珠结合流式细胞仪分选 MSCs 具有更高的效率和专一性, 但可能对 MSCs 细胞活性有一定损伤<sup>[15]</sup>。

## 3 诱导 MSCs 分化为肝细胞的方法

**3.1 细胞因子诱导** 研究指出肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、白细胞介素 3(interleukin 3, IL-3)、干扰素 $\beta$ (interferon  $\beta$ , INF- $\beta$ )和生长激素联合使用可以诱导 MSCs 向肝细胞定向分化<sup>[16]</sup>。HGF 又称扩散因子(scatter factor, SF), 最初在肝再生动物的血浆中发现并获得分离。对 HGF 功能的认识只是刺激肝细胞的增殖并参与肝脏再生, 近年来研究发现 HGF 是一种作用非常广泛的细胞因子, 其能诱导 MSCs 分化为肝细胞<sup>[17]</sup>。Abbas 等<sup>[18]</sup> 研究指出, 层黏连蛋白、IV 型胶原和硫酸肝素蛋白多糖对于支持 MSCs 向肝细胞分化具有重要作用。此外, 肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )也可诱导 MSCs 分化为肝细胞, 陆正峰等<sup>[19]</sup> 运用 TNF- $\alpha$  成功刺激 MSCs 表达、分泌 HGF, 从而诱导其分化为肝细胞。

**3.2 体外微环境诱导及影响** 微环境是指细胞间质及邻近组织细胞及其分泌的各种因子、体液成分等参与构成的细胞生存的环境, 是细胞正常增殖、分化和代谢的重要条件。体外微环境就是指运用现代生物技术, 在体外模拟一定的细胞生存环境或者是提取某种状态下活体生物体内产生的某些物质在体外使用。近年来体外微环境诱导 MSCs 向其肝细胞分化已有报道, 四氯化碳诱导的实验性大鼠肝硬化微环境、酒精性肝损伤微环境、急慢性肝损伤微环境都可定向诱导 MSCs 向肝细胞分化<sup>[3,20-22]</sup>。中山大学附属第二医院通过淤胆血清病理微环境也成功诱导胚胎干细胞向肝细胞分化<sup>[23]</sup>。

## 4 诱导后 MSCs 形态学变化及肝细胞特性检测

**4.1 形态学改变** MSCs 在诱导培养后经 HE 染色, 普通显微镜即可观察到其形态由干细胞性质的长梭形变为三角形、多角形或类圆形等, 随后分化为多边形、胞浆丰富、核大的肝样细胞形态<sup>[24-25]</sup>。形态学方法能够直接观察 MSCs 的形态改变, 但由于其不能明确地证明此细胞即分化后的肝细胞, 因此形态学检测通常不单独作为检测 MSCs 向肝细胞定向诱导成功判定

\* 基金项目: 湖南省科技厅科研条件创新专项计划(2010TT2046); 湖南省卫生厅科研基金(B2011-081)。 △ 通讯作者, E-mail: youde120@yahoo.com.cn。

的标准,常与其他生物化学、免疫组织化学和分子生物学检测手段相结合使用。

**4.2 免疫细胞化学检测** 免疫学检测方法是现今检测 MSCs 向肝细胞分化的常用方法之一,它通过标记抗体直接或间接检测细胞产生的特定蛋白质,具有较强的可靠性和准确性。目前,运用免疫细胞化学来鉴定的肝细胞样成分有未成熟肝细胞产物,如甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)<sup>[11,26]</sup> 和成熟肝细胞产物清蛋白(albumin, ALB)、肝糖原以及肌酸激酶(creatine kinase, CK)等<sup>[27]</sup>。

**4.3 RT-PCR 检测肝样细胞中的 mRNA** 逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)是现代生物医学中最常用的一种检测基因表达的方法,其具有结果准确可靠、灵敏度高、特异性好且操作简单等优点。RT-PCR 通过特定引物扩增诱导细胞的 mRNA 后,通过电泳、测序等手段确认是否有 AFP、ALB 和 CK19 肝细胞特征基因的表达。而实时荧光定量 PCR(realtime fluorescence quantitative PCR)的出现让 mRNA 的检测更加方便<sup>[28]</sup>。

**4.4 自动生化分析仪检测** 诱导 MSCs 形成的肝细胞具备肝细胞的合成功能,能够合成尿素、蛋白质以及各种酶类,因此运用全自动生化分析仪检测细胞培养液中的谷丙转氨酶、谷草转氨酶、尿素、ALB 等的含量,有助于判断诱导 MSCs 向肝细胞分化<sup>[10]</sup>。生化检测通常与核酸检测以及免疫细胞化学相结合,从而得出更全面的结果。

**4.5 透射电镜和扫描电镜观察** 通过电镜直接观察诱导前后细胞本身的变化是最直接的方法, MSCs 诱导成为肝细胞后,电镜可观察到细胞表面出现大量微绒毛,细胞内线粒体、糙面内质网、溶酶体、吞饮泡等,符合肝细胞结构特点。但由于电镜成本较高,需专人操作,并且观察前标本的制备过程非常复杂,因此电镜通常仅在有条件的实验室中运用。

## 5 MSCs 移植在肝脏疾病治疗中的运用

目前 MSCs 移植逐渐由动物实验转向临床实验及应用,研究显示 MSCs 能够改善肝缺血-再灌注损伤,并且具有诱导肝细胞的增殖行为的作用<sup>[10]</sup>。近年来,国内有学者利用自体骨髓干细胞移植治疗肝硬化,结果显示经干细胞移植治疗 2~3 个月之后,大多数患者腹水减少,食欲增强,下肢水肿减轻,肝功能明显好转,IL-18、TNF-α、TGF-β1 水平呈下降趋势,而 HGF 水平上升<sup>[29]</sup>。Qiao 等<sup>[30]</sup>研究指出黄芩苷能够在体外促进 MSCs 的分化,它与 MSCs 共同作用能够提高 MSCs 移植治疗肝纤维化的疗效。目前大规模的临床实验少有报道,而一项多中心、随机并针对大量肝硬化失代偿期患者的骨髓来源 MSCs 移植治疗实验正在伊朗德黑兰大学进行之中<sup>[31]</sup>。

## 6 小结

综上所述, MSCs 移植可以作为中晚期肝脏疾病治疗的一种新方法。MSCs 定向诱导分化为肝细胞还处于实验研究阶段,尚无标准的诱导分化的方法, MSCs 移植后的风险、并发症等还不明确。采用什么样的方式将 MSCs 运用于临床肝衰竭患者的治疗中还没有确切的方法。诸多问题还值得不断地进行研究探讨。

## 参考文献

- [1] Peterson KR, Papayannopoulou T, Priestley GV, et al. Hemopoietic lineage commitment decisions: in vivo evidence from a transgenic mouse model harboring micro LCR-beta-pro-LacZ as a transgene[J]. Blood, 2000, 95(4): 1274-1282.
- [2] Schraufstatter IU, Disciplo RG, Khaldoyanidi S. Mesenchymal stem cells and their microenvironment[J]. Front Biosci, 2011, 17(6): 2271-2288.
- [3] Vemuri MC, Chase LG, Rao MS. Mesenchymal stem cell assays and applications[J]. Methods Mol Biol, 2011, 698(7): 3-8.
- [4] Friedenstein AJ. Osteogenic activity of transplanted transitional epithelium[J]. Acta Anat, 1961, 45(12): 31-59.
- [5] Aurich H, Sgiodda M, Kaltwaer P, et al. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo[J]. Gut, 2009, 58(4): 570-581.
- [6] Hu L, Ruonan X, Zheng Z, et al. Implications of the immunoregulatory functions of mesenchymal stem cells in the treatment of human liver diseases[J]. Cellular Mol Immunol, 2011, 8(4): 19-22.
- [7] Meirelles S, Nardi NB. Methodology biology and clinical applications of mesenchymal stem cells[J]. Front Biosci, 2009, 14(6): 4281-4298.
- [8] Takahiro O, Yusuke Y, Agnieszka B. Commitment of stem cells into functional hepatocytes[J]. Differentiation, 2010, 79(2): 65-73.
- [9] Olivier EN, Bouhassira EE. Differentiation of human embryonic stem cells into mesenchymal stem cells by the “raclure” method [J]. Methods Mol Biol, 2011, 690(41): 183-193.
- [10] Hiroyuki K, Yasuhiro F, Takumi T, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate hepatic ischemia reperfusion Injury in a rat model[J]. PLoS ONE, 2011, 6(4): 191-195.
- [11] Puglis MA, Saulnier N, Piscaglia AL, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and hepatic differentiation: old concepts and future perspectives[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2011, 15(4): 355-364.
- [12] Luc S, Philippe B, Karin T. Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells[J]. Human Gene Therapy, 2011, 22(1): 19-26.
- [13] Manas KM, Eunice W, Elisabeth AM, BMP-2 and BMP-9 promote chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcome the inhibitory Effect of IL-1[J]. J Cell Physiol, 2001, 189(3): 275-284.
- [14] Sadia M, Sulaiman S, Ghazanfar A. Enhanced hepatic differentiation of mesenchymal stem cells after pretreatment with injured liver tissue[J]. Differentiation, 2011, 81(17): 42-48.
- [15] Dah CD, Woei CS, Shinn ZL. Mesenchymal Stem Cells[J]. Cell Transplantation, 2011, 20(11): 5-14.
- [16] Rubio D, Garcia J, Mart MC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation[J]. Cancer Res, 2005, 65(8): 3035-3039.
- [17] Lee HJ, Cha KE, Hwang SG, et al. In vitro screening system for hepatotoxicity: comparison of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and placenta-derived stem cells[J]. J Cell Biochem, 2011, 112(1): 49-58.
- [18] Abbas P, Mojtaba RV, Mansoureh S, et al. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells on nanofibers and their transplantation into a carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model[J]. Stem Cell Rev, 2011, 7(1): 103-118.
- [19] 陆正峰, 姜海行, 覃山羽, 等. 肿瘤坏死因子 α 刺激骨髓间充质干细胞表达及分泌肝细胞生长因子[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(14): 2540-2544.
- [20] Sinyoung K, Han SK, Eugene L, et al. In vivo hepatic differentiation potential of human cord blood-derived mesenchymal stem cells[J]. Int J Mol Med, 2011, 27(5): 701-706.

- [21] Tian ZL, Jae HK, Hyun HC, et al. Therapeutic potential of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells differentiated with growth-factor-free coculture method in liver-injured rats[J]. *Tissue Engineering: Part A*, 2010, 8(16): 2649-2660.
- [22] Kharaziha P, Hellström PM, Noorinayer B, et al. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 21(10): 1199-1205.
- [23] 方天翊, 闵军, 邓小耿. 含淤胆血清的培养体系体外诱导胚胎干细胞表达肝细胞功能的研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(12): 726-729.
- [24] 李芙蓉, 侯卫平, 程锐, 等. SD 大鼠间充质干细胞的分离培养及生物学特性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(5): 425-429.
- [25] Pan Q, Fouraschen SM, Kaya FS, et al. Mobilization of hepatic mesenchymal stem cells from human liver grafts[J]. *Liver Transplantation*, 2011, 17(5): 596-609.
- [26] 杨洋, 汤华, 浦永, 等. 甲胎蛋白的液相芯片法检测与方法学评价

· 综述 ·

[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(1): 96-98.

- [27] 任红英, 赵钦军, 邢文, 等. 脐带间充质干细胞体外分化为有功能的低免疫原性肝细胞样细胞[J]. 中国医学科学院学报, 2010, 32(2): 190-196.
- [28] 周刚, 邱大卫, 秦大江, 等. 二重荧光定量 RT-PCR 检测胰腺癌患者 CD44v6 基因的表达[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(18): 2051-2054.
- [29] 付汉东, 张爱华, 鲁艳. 自体骨髓干细胞移植治疗肝硬化患者血清 IL-18、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1、HGF 水平变化及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3): 329-330.
- [30] Qiao H, Tong Y, Han H, et al. A novel therapeutic regimen for hepatic fibrosis using the combination of mesenchymal stem cells and baicalin[J]. *Pharmazie*, 2011, 66(1): 37-43.
- [31] Lee KD. Applications of mesenchymal stem cells: an updated review[J]. *Chang Gung Med J*, 2008, 31(3): 228-236.

(收稿日期: 2012-01-17)

## 易感基因和单核苷酸多态性与乳腺癌关系的研究进展\*

罗丹<sup>1</sup>综述, 袁军<sup>2</sup>审校

(1. 湖南省长沙市中心医院检验科 410004; 2. 贵州省人民医院中心实验室, 贵阳 550000)

**关键词:** 乳腺肿瘤; 单核苷酸多态性; BRCA1 基因; BRCA2 基因; HER2 基因

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.07.027

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2012)07-0827-04

乳腺癌作为女性健康的杀手, 占各种恶性肿瘤的 7%~10%, 我国虽然是乳腺癌的低发地区, 但仍稳居城市女性肿瘤首位, 发病率为 49.25/100 000, 而且近年来呈现年轻化和病例数明显增加的趋势<sup>[1]</sup>。随着细胞分子生物技术的发展, 人们对乳腺癌发病的分子遗传机制的研究也越来越深入, 乳腺癌的易感基因和单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)易感位点成为了研究的热点和难点。现将乳腺癌易感基因中应用最为广泛、研究较透彻的 BRCA1、BRCA2 及 HER-2 基因与乳腺癌易感 SNP 作一综述。

### 1 BRCA1、BRCA2 基因

乳腺癌的发生发展是一个多基因、多因素、多环节共同长期作用的结果。外部因素主要有个人生活方式、放射线、环境致癌物、使用激素、生殖方式、生活环境等<sup>[2-3]</sup>, 存在基因-环境交互作用(gene-environment interaction, GEI)<sup>[4]</sup>。内部因素主要与基因的遗传多态性相关。在相同的致癌背景下, 只有少数人群对某些致癌因素敏感, 称之为肿瘤的易感性。与肿瘤密切相关的基因或等位基因称之为肿瘤的易感基因。自 MikiI 等<sup>[5]</sup>分离出第 1 个与家族性乳腺癌和卵巢癌相关的 BRCA1 基因以来, 目前 BRCA1 与 BCRA2 基因已经成为研究较为确切的与乳腺癌发生有密切关系的易感基因。

BRCA1 基因位于人类 17 号染色体 q21, 长约 100 kb, 由 22 个编码外显子和 2 个非编码外显子共同构成, 主要功能为抑制细胞生长、对细胞周期调控、基因转录调控、蛋白质泛素化以及 DNA 损伤修复和细胞凋亡、维持基因组稳定等。BRCA2 由 Wooster 等<sup>[6]</sup>发现, 定位于人类染色体 13q12, 由富含 AT 核

苷酸的 10 254 个核苷酸组成, 包含 27 个外显子, 含半数编码序列的基因, 主要功能是在转录水平上调节基因表达以及 DNA 损伤修复、中心体功能等<sup>[7]</sup>。

BRCA1 和 BRCA2 是 2 种致癌基因, 在乳腺癌、卵巢癌等肿瘤中高表达。在家族性和遗传性乳腺癌中 2 种基因突变检出率较高, 80% 以上的患者存在 BRCA1 基因结构和功能的变异。大约 40%~50% 的遗传性乳腺癌患者存在 BRCA1 基因突变, 约 80% 的乳腺癌和卵巢癌都高发的家族患者存在 BRCA1 基因突变。BRCA2 基因突变属于特异性微缺损, 80% 的男性家族性乳腺癌患者中 BRCA2 基因发生突变, 50% 的散发性乳腺癌患者的癌组织中 BRCA2 呈阳性表达<sup>[8]</sup>, 但体细胞中的突变却十分罕见。

BRCA1 和 BRCA2 同属抑癌基因, 常用于乳腺癌的风险评估。携带 BRCA1 和 BRCA2 的突变者患乳腺癌的风险为 47%~66% 和 40%~57%, 且易早年发病。BRCA1 和 BRCA2 在遗传性乳腺癌和卵巢癌中占有相当的比例, 发生乳腺癌的风险估计也明显增加, 约为 50%~80%。BRCA1 和 BRCA2 相关性乳腺癌一般发病早、双侧性、高分级、分化差、浸润性强, 髓样癌的比例高, 尤其是 BRCA1 基因突变者; 雌激素受体、孕激素受体和 HER-2、erb-BO2 的阳性检出率低而 p53、cyclinE 基因的突变率高。

BRCA 基因在指导乳腺癌的治疗方面也很关键性的作用。首先在外科治疗方面, 如果发生 BRCA 突变, 建议对双侧乳腺进行切除。研究表明, 在遗传性乳腺癌患者进行保乳手术后, 10 年累积局部复发率(in-breast tumor recurrence, IBTR)

\* 基金项目: 国际合作基金(黔科合外 G 字[2011]7038 号); 贵州省科技基础条件应用基金(黔科平台[2010]4005); 贵阳市科技创新基金([2008]筑科 4 第 27 号); 贵阳市科技创新平台([2010]筑科 4 第 3-1 号)。