

· 论 著 ·

人胎肝干细胞在重症联合免疫缺陷小鼠损伤肝脏中的植入

苏娟¹,李文林¹,陶欣荣¹,朱海英¹,王新民¹,李建秀¹,田棣¹,余宏宇²,Joseph T Lau³,胡以平^{1*}

(1. 第二军医大学基础医学部细胞生物学教研室,上海 200433; 2. 第二军医大学长征医院病理科,上海 200003; 3. The Department of Molecular and Cellular Biology, Roswell Park Cancer Institute, Elm and Carlton Streets, Buffalo, NY 14263, USA)

[摘要] **目的:**从孕 4.5~6 周的人胚胎肝脏中分离培养肝干细胞,并观察其在重症联合免疫缺陷(SCID)小鼠损伤肝脏中的植入。**方法:**从孕 4.5~6 周的人胚胎肝脏中分离干细胞并进行体外长期培养,用 RT-PCR 方法检测肝干细胞相关分子标志以及八聚物结合蛋白 4(Oct-4)的表达,然后植入经四氯化碳(CCl₄)造成急性肝损伤的 SCID 小鼠体内,在移植后 2、10、17 d 分别对受体鼠肝脏冰冻切片进行荧光观察和 H-E 染色。**结果:**所建立的胎肝细胞系不仅表达二肽水解酶 IV (DPPIV)、白蛋白(Alb)、细胞角蛋白(CK)19、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)、CK18、肝细胞生长因子受体(c-met)、干细胞因子受体(c-kit)等肝干细胞相关标志,还表达干细胞转录因子 Oct-4。在细胞移植后 2 d,肝脏冰冻切片未见绿色荧光;移植后 10 d 和 17 d 肝脏冰冻切片见散在的绿色荧光。对同一切片做 H-E 染色,发现绿色荧光部位为肝板内的多个成熟肝细胞。**结论:**从人胚胎肝脏中分离的干细胞能够植入 SCID 小鼠的损伤肝脏。

[关键词] 肝干细胞;胚胎;重症联合免疫缺陷;细胞移植

[中图分类号] R 593.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)03-0243-04

Engrafting human fetal liver stem cells into injured livers of mice with severe combined immunodeficiency disorder

SU Juan¹, LI Wen-lin¹, TAO Xin-rong¹, ZHU Hai-ying¹, WANG Xin-min¹, LI Jian-xiu¹, TIAN Di¹, YU Hong-yu², Joseph T Lau³, HU Yi-ping^{1*} (1. Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pathology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003; 3. The Department of Molecular and Cellular Biology, Roswell Park Cancer Institute, Elm and Carlton Streets, Buffalo, NY 14263, USA)

[ABSTRACT] **Objective:** To separate hepatic stem cells from human fetal livers of 4.5-6-week gestation and observe their engraftment into injured livers of mice with severe combined immunodeficiency (SCID). **Methods:** Stem cells isolated from human fetal livers were long-term cultured *in vitro*. RT-PCR was used to detect expression of hepatic stem cell related markers and octamer-binding protein 4 (Oct-4) in those cells. Then they were transplanted into SCID mouse liver with acute injury caused by carbon tetrachloride (CCl₄). Liver cryostat sections of recipient mice were observed by a fluorescence microscope at 2 d, 10 d and 17 d post-transplantation, then hematoxylin and eosin (H-E) dying was performed on the same liver sections. **Results:** The fetal liver cell lines not only expressed hepatic stem cell related markers such as dipeptidylpeptidase IV (DPP IV), albumin (Alb), cytokeratin (CK) 19, gamma-glutamyl transpeptidase (γ -GT), CK18, hepatocyte growth factor receptor (c-met), stem cell factor receptor (c-kit), but also expressed stem cell transcription factor Oct-4. At 2 d after transplantation no green fluorescence was observed in the recipient livers. At 10 d and 17 d several cell clusters with green fluorescence in different sizes were observed. H-E staining confirmed that there were clusters of hepatocytes in hepatic cord. **Conclusion:** The stem cells isolated from human fetal liver can be engrafted into injured livers of SCID mice.

[KEY WORDS] hepatic stem cell; embryo; severe combined immunodeficiency; cell transplantation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(3): 243-246]

目前对于肝干细胞的研究还处于分离、培养和建系的初级阶段,而且又主要集中于对啮齿类动物的研究。至于人肝干细胞的研究,有人报道过人胎肝来源的原始上皮细胞系,但其细胞系实际上是一个未经筛选和克隆化培养的混合培养物,而且在体外不能稳定生长(即伴有明显的自发分化现象)^[1]。本研究在所在实验室成功分离培养了小鼠肝干细胞

的基础上^[2~4],从孕 4.5~6 周的人胚胎肝脏中分离了一种干细胞系,经脾植入肝损伤的重症联合免疫

[基金项目] 国家自然科学基金(30470876, 30270668, 30270603, 30200138);上海市科委重大项目(03DJ14020)。

[作者简介] 苏娟(1973-),女(汉族),博士,讲师。

* Corresponding author. E-mail: yphu@smmu.edu.cn

缺陷(SCID)小鼠体内,观察了它在损伤肝脏中的植入情况。

1 材料和方法

1.1 实验动物 2~3个月龄 BALB/c 品系 SCID 小鼠购自上海实验动物中心,在本实验室 SPF 级动物房饲养。

1.2 试剂与器材 DMEM、Trypsin / EDTA 购自 Gibco 公司,胎牛血清购自 Hyclone 公司,PBS 自备。免疫组化用各试剂均为 DAKO 公司产品。一次性培养瓶及培养板购自 Gibco 公司,倒置相差显微镜、荧光显微镜及显微摄影装置为 Nikon 公司产品。

1.3 人胚胎肝脏细胞的分离及接种培养 取胎龄 4.5~6 周的流产人胚胎(母亲自愿终止妊娠,签署知情同意书),以 PBS 充分洗涤后在解剖显微镜下小心分离出胚胎肝脏,置于 96 孔板内以 0.05% Trypsin/EDTA 消化约 5 min,然后加入改良 IM-DM-HAM F12 培养液终止消化,并用吸头反复吹打几次,静置几分钟后取悬液,置于铺有 0.2% 明胶的一次性培养瓶(或培养板)内,37℃、5%CO₂、95% 湿度条件培养。

1.4 细胞传代培养 细胞长至 90% 汇合时传代,

用吸管吸去培养瓶(或培养板)内培养液,PBS 充分洗涤,用 0.05% Trypsin/EDTA 消化至大部分细胞从底壁脱落后,加入含有胎牛血清的培养液终止消化,用吸管轻轻吹打成单细胞悬液,计数后以 1×10⁴/cm² 的密度接种至另一铺有 0.2% 明胶的培养瓶/皿中继续培养。

1.5 RT-PCR 用 RT-PCR 方法检测干细胞因子受体(c-kit)、细胞角蛋白(CK)19、肝细胞生长因子受体(c-met)、γ-谷氨酰转肽酶(γ-GT)、二肽水解酶 IV (DPP IV)、CK18、白蛋白(Alb)、八聚体结合蛋白 4 (Oct-4)的表达。将贴壁培养的细胞消化成单细胞悬液,1 500 r/min 离心 5 min 后,完全弃去上清液,用“EZ Spin Column RNA Isolation Kit”试剂盒抽取细胞总 RNA。逆转录反应酶为 Promega 公司产品,反应体系及条件参照试剂说明书。所用引物序列、扩增片段长度及退火温度如表 1 所示(由上海生工生物服务有限公司合成)。PCR 扩增反应体系为 50 μl:dNTP 200 μmol/L,上、下游引物各 1 μmol/L,cDNA 100 ng,Taq 酶 2.5 U。PCR 反应条件为:95℃ 5 min 变性后,94℃ 30 s→X℃ 30 s→72℃ 1 min 循环 30 次,然后 72℃ 延长 10 min。以 1.7% 的琼脂糖凝胶,取 10 μl PCR 产物进行电泳鉴定。

表 1 RT-PCR 引物列表

Tab 1 Primers for RT-PCR

Gene	Primer sequence	Length of PCR products(bp)	Annealing temperature(t/°C)
c-kit	5'- CGT TGA CTA TCA GTT CAG CGA G - 3' 5'- CTG GGA ATG TGT AAG TGC CTC C - 3'	360	55
CK19	5'-TCC CGC GAC TAC AGC CAC TAC TAC ACG ACC -3' 5'-CGC GAC TTG ATG TCC ATG AGC CGC TGG TAC -3'	746	68
c-met	5'-GGG TCG CTT CAT GCA GGT TGT GGT-3' 5'-ATG GTC AGC CTT GTC CCT CCT TCA-3'	372	60
γ-GT	5'-GGA TTC TCC CAG AGA TTG CC -3' 5'-GAA GGT CAA GGG AGG TTA CC -3'	300	60.7
DPP IV	5'- TAC TCT GCT CTG TGG TGG TC - 3' 5'- AAT ACT TCG CCT CTT TAC TG - 3'	772	52
CK18	5' - TGC TGC TGA TGA CTT TAG AG -3' 5' - AGC CTC GAT CTC TGT CTC C -3'	139	55
β-actin	5'- GCA CTC TTC CAG CCT TCC TTC C -3' 5'- TCA CCT TCA CCG TTC CAG TTT TT -3'	516	55
Alb	5'- CCT TTG GCA CAA TGA AGT GGG TAA CC -3' 5'- CAG CAG TCA GCC ATT TCA CCA TAG G -3'	355	62.9
Oct-4	5'- CGT GAA GCT GGA GAA GGA GAA GCT G - 3' 5'- CAA GGG CCG CAG CTT ACA CAT GTT C - 3'	247	58

1.6 供体细胞体外标记 EGFP 报告基因 将稳定转染有 pLNCG C1 载体 DNA 的 PT67 细胞系(购自 Clonetech 公司)接种于 100 mm 的培养皿中,待细胞生长至大约 60% 融合时换新鲜培养液,继续培养 24 h,收获病毒上清,加入 8 μg/ml 的 Polybrene,

以 0.45 μm 的滤膜过滤,通过感染 NIH-3T3 细胞的方法测定病毒的滴度。供体细胞生长至大约 40% 汇合时,加入收获的含病毒培养液上清培养 20 h,换为新鲜细胞培养液继续培养 24~48 h;加入含 800 μg/ml G418 的细胞培养液培养 7 d,得到稳定

表达绿色荧光蛋白的供体细胞。

1.7 细胞移植 将标记有绿色荧光蛋白的供体细胞制备成单细胞悬液,调整至 1.2×10^7 /ml 的密度,置于冰上待用。取 2~3 个月大小 BALB/c 品系 SCID 小鼠 10 只,将 CCl_4 和橄榄油以 1:5 的比例混合配制成 CCl_4 溶液,于细胞移植前 24 h 腹腔注射入 SCID 小鼠体内 ($5 \mu\text{l/g}$)。将供体细胞混匀,以 1 ml 注射器吸取 0.2 ml 细胞悬液经脾缓慢注入 7 只 CCl_4 肝损伤 SCID 小鼠体内,每只注射细胞数 2.4×10^6 ,余 3 只分别注射 0.2 ml PBS 作对照。

1.8 标记细胞植入的检测 分别在移植后的第 2、10、17 天取受体鼠的肝组织做冰冻切片,于荧光显微镜下直接观察并拍照;然后同一切片做 H-E 染色,分析绿色荧光蛋白的分布情况。

2 结果

2.1 人胎肝原始细胞系 hFLPC 的建立 将胎龄 4.5~6 周的流产人胚胎肝脏消化成单细胞悬液于培养皿内培养。分离的胎肝细胞很快贴壁,极少细胞悬浮。贴壁细胞形体较大,形态混杂。这些细胞在 2 周后生长停滞,而代之以一种小梭形或三角形细胞的优势生长。这些小三角形细胞在原代培养初期数目极少,在镜下连续观察很难发现。一旦在镜下注意到它们的存在,它们在 3~4 d 之内就会迅速增殖成片。鉴于干细胞数目极少,且有集落样生长的特性,我们认为这种小三角形细胞有可能为较原始的干细胞类型,因此将其作为目的细胞进行纯化和鉴定。挑取成片生长的小三角形细胞至孔板内进行扩大化培养,得到形态均一且增殖稳定的小三角形细胞系,将其命名为人胎肝干细胞 (human fetal liver derived progenitor cells, hFLPC)。以 1×10^4 / cm^2 的细胞密度接种后,每 4~5 d 即传代 1 次。

2.2 hFLPC 细胞表达多种肝干细胞相关的分子标志和干细胞转录因子 Oct-4 对传至第 4 代、第 9 代和第 12 代的 hFLPC 细胞用 RT-PCR 的方法检测分子标志的表达。结果显示 hFLPC 细胞不仅表达肝系标志 DPPIV、Alb,胆系标志 CK19、 γ -GT,以及肝系和胆系共同表达的标志 CK18、c-met,还表达干细胞生长因子受体 c-kit 和干细胞转录因子 Oct-4 (图 1)。这些检测结果初步显示 hFLPC 为胎肝内的一种干细胞。

2.3 hFLPC 细胞在受体鼠损伤肝脏中增殖并分化为肝细胞 为了研究 hFLPC 细胞的体内分化潜能,我们将 hFLPC 细胞标记 EGFP 报告基因后,植

入经 CCl_4 损伤的 SCID 小鼠体内,然后在不同的时间对再生肝脏作冰冻切片观察绿色荧光的分布情况。结果发现,在移植后 2 d,肝脏冰冻切片未见绿色荧光;移植后 10 d,肝脏冰冻切片见散在绿色荧光;移植后 17 d,EGFP 阳性细胞较为均匀的散布于肝脏中,通常 6~7 个细胞一团,甚至更多(图 2)。对同一切片做 H-E 染色,发现绿色荧光所处位置为肝板内的多个成熟肝细胞(图 3),从而有力地证明了 hFLPC 细胞可以在损伤肝脏中增殖并分化为肝细胞。

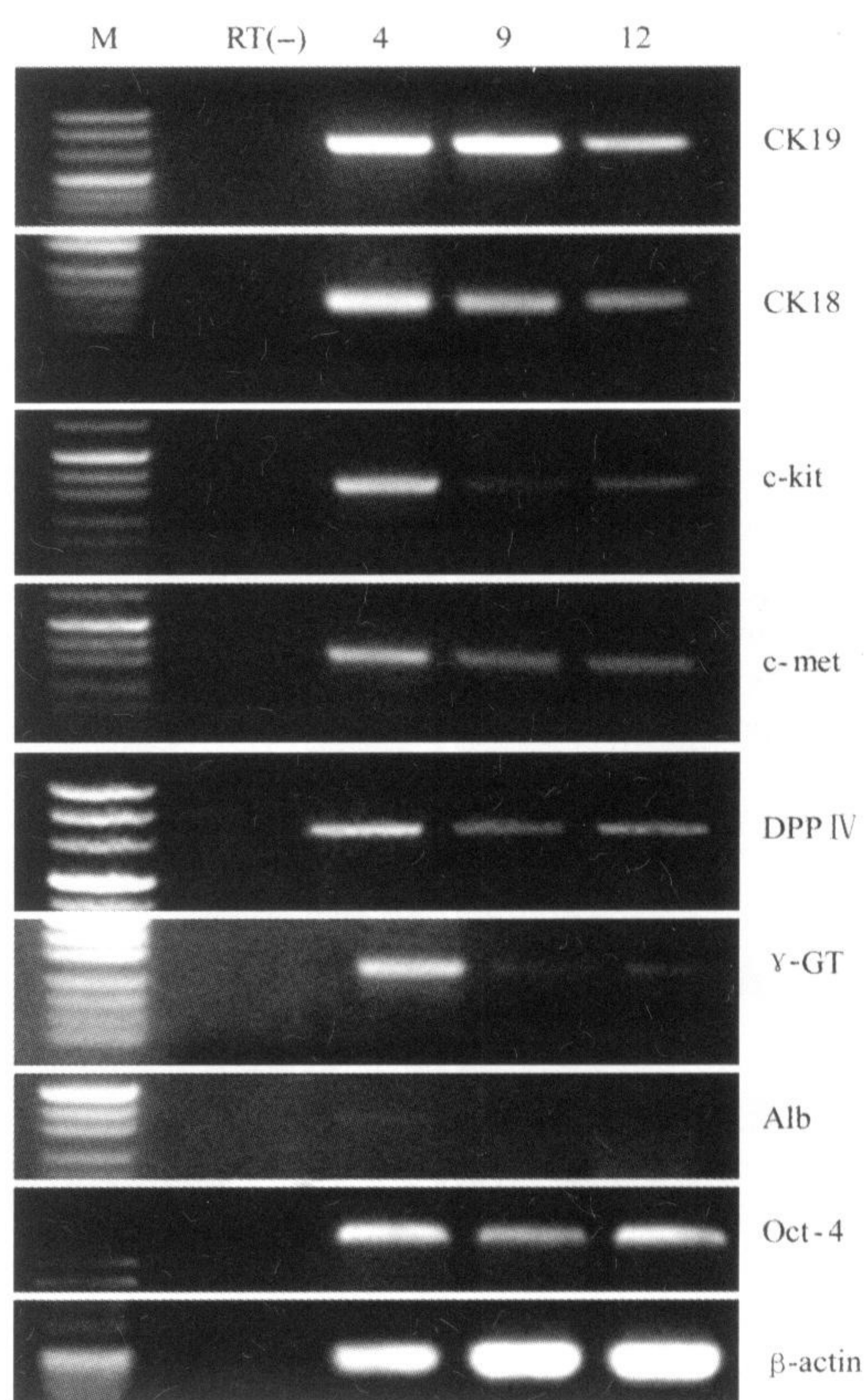


图 1 hFLPC 分子表型的 RT-PCR 检测结果

Fig 1 Gene expression of hFLPC detected by RT-PCR

M: pUC mix marker; RT(-): mRNA sample without reverse transcription; 4, 9, 12: cDNA from the 4th, 9th, 12th passage of hFLPC

3 讨论

肝脏于胚胎发育的 4.5 周开始出现,于胚胎发育的第 6 周开始造血^[5]。我们设想在这种早期的肝始基中干细胞所占比例相对较高,因此选择从 4.5~6 周的人胚胎肝脏中分离干细胞,通过培养条件的反复优化,建立了能够长期体外培养的细胞系 hFLPC。

本实验结果表明 hFLPC 不仅表达肝干细胞相关的分子标志,如 DPPIV、Alb、CK19、 γ -GT、CK18、

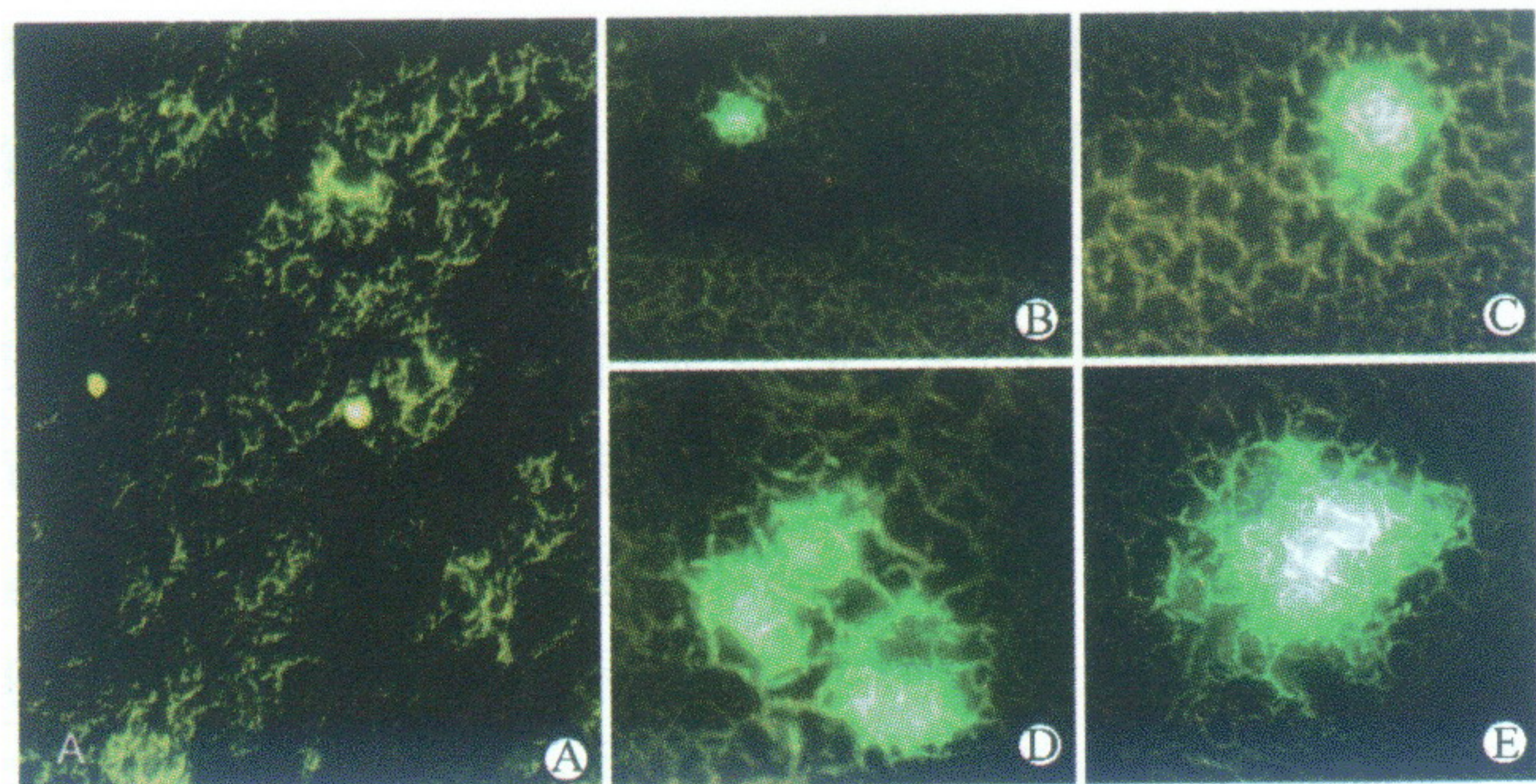


图2 荧光显微镜下受体 SCID 小鼠肝脏绿色荧光分布情况

Fig 2 Distribution of green fluorescence in recipient SCID mouse liver observed by fluorescence microscopy

At 2 d no green fluorescence was observed in the recipient liver (A). At 10 d(B, C) and 17 d(D, E) various sizes of cell clusters with green fluorescence scattered in the liver(A: $\times 40$; B: $\times 100$; C, D, E: $\times 200$)

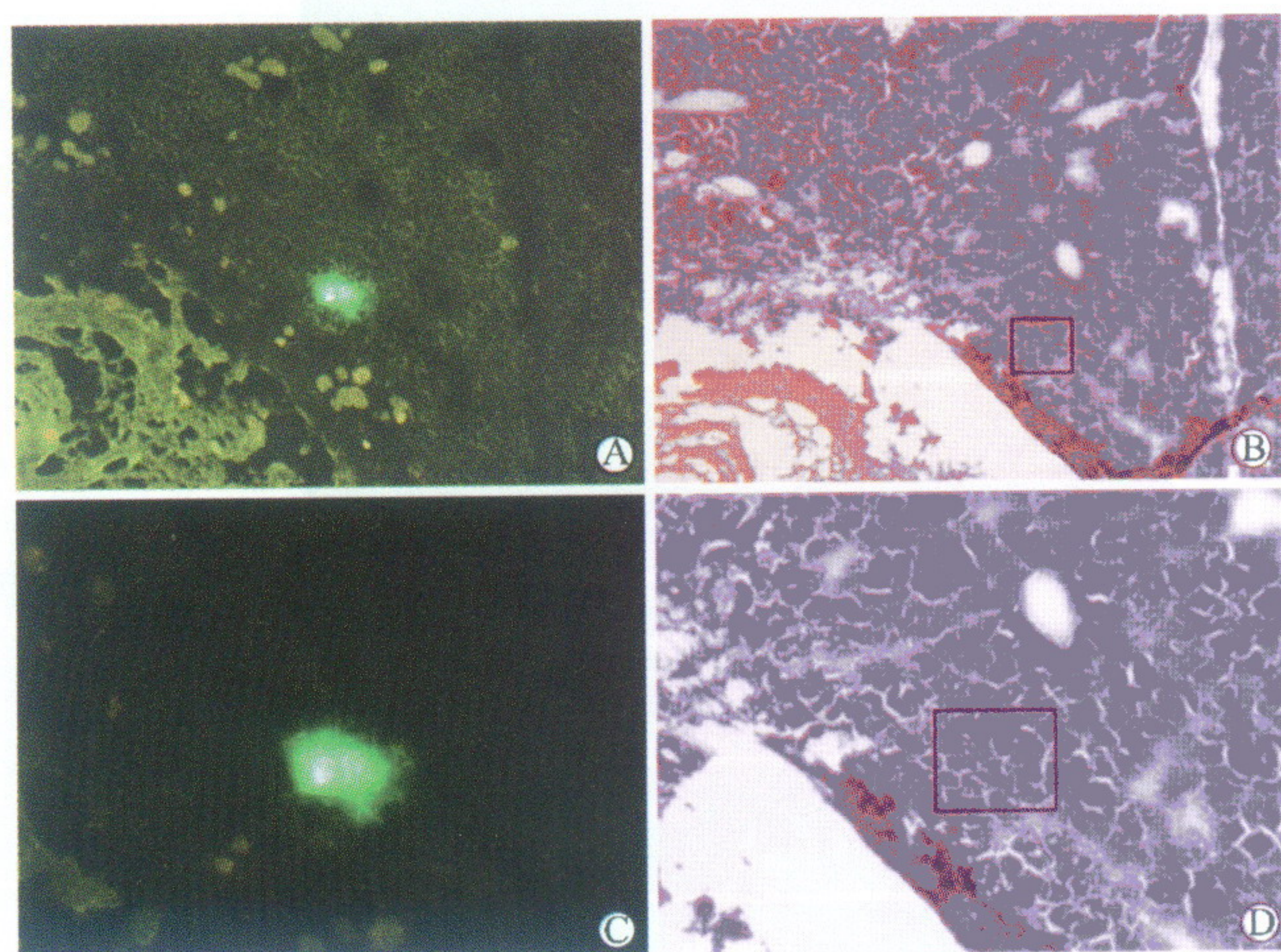


图3 H-E 染色显示受体 SCID 小鼠肝脏中绿色荧光对应的组织结构

Fig 3 Location and structure of green fluorescence in recipient SCID mouse liver by H-E staining

A and C: Fluorescence view; B and D: The same view stained by H-E. Rectangle circle showed location of cells and tissues giving off green fluorescence (A, B: $\times 100$, C, D: $\times 200$)

c-met、c-kit 等,还表达 Oct-4 这一多能性干细胞标志。Oct-4 是一种 POU 转录因子^[6],在维持胚胎干细胞的全能性上发挥了重要作用^[7,8]。在体外培养的细胞中,Oct-4 除了在分离自多个物种内细胞团的胚胎干细胞表达,有人还在从骨髓中分离的多潜能性干细胞^[9]以及从亚急性肝衰成体肝脏获得的上皮细胞克隆中检测到 Oct-4 mRNA 的表达^[10]。我们采用 RT-PCR 的方法对传代多次的 hFLPC 进行检测,发现都有 Oct-4 mRNA 的表达。提示 hFLPC 是具有多潜能性的干细胞。

将干细胞置于体内的微环境中是评价干细胞分化潜能最有说服力的方法。但是,在正常的生理条件下,肝脏不易接受外源细胞。因此将肝干细胞移植到肝脏前,通常先造成宿主肝脏的损伤,从而形成外源细胞的生长优势。CCl₄是肝脏毒理学中研究较多的亲肝性毒物,对肝脏具有较强的损伤作用,可导致肝细胞的变性、坏死、脂肪变性、纤维化和癌变^[11]。我们将标记了 EGFP 报告基因的 hFLPC 植入经 CCl₄ 损伤的 SCID 小鼠体内,10 d 后在小鼠的肝脏中发现散在的、大小不等的绿色荧光细胞团出现。成团的绿色荧光细胞少则 3~4 个,多至十几个一组。H-E 染色显示绿色荧光细胞为肝板内的成熟肝细胞,表明 hFLPC 在小鼠肝脏内发生了多次分裂,并分化为成熟的肝细胞。这一结果提示 hFLPC 能够植入 SCID 小鼠的损伤肝脏,可能参与 SCID 小鼠损伤肝脏的修复。

[参考文献]

[1] Malhi H, Irani AN, Gagandeep S, et al. Isolation of human progenitor liver epithelial cells with extensive replication capacity and differentiation into mature hepatocytes [J]. *J Cell Sci*, 2002, 115 (Pt 13): 2679-2688.

[2] 苏娟,姚玉成,胡以平,等. 干细胞样肝原始细胞的分离和鉴定 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2000, 12(4): 200-201.

[3] 苏娟,姚玉成,胡以平,等. 肝干细胞在小鼠脾脏中集落样生长 [J]. *科学通报*, 2001, 46(19): 1625-1627.

[4] Su J, Yao YC, Hu YP, et al. Clonogenic colony-forming ability of hepatic stem cells in the spleens of mice [J]. *Chin Sci Bull*, 2002, 47(3): 211-213.

[5] Shiojiri N, Lemire JM, Fausto N. Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development [J]. *Cancer Res*, 1991, 51 (10): 2611-2620.

[6] Scholer H, Ruppert S, Suzuki N, et al. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct4 [J]. *Nature*, 1990, 344 (6265): 435-439.

[7] Pesce M, Scholer H. Oct4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development [J]. *Stem Cells*, 2001, 19(4): 271-278.

[8] Pesce M, Scholer HR. Oct-4: control of totipotency and germ-line determination [J]. *Mol Reprod Dev*, 2000, 55(4): 452-457.

[9] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow [J]. *Nature*, 2002, 418 (6893): 41-49.

[10] Selden C, Chalmers SA, Jones C, et al. Epithelial colonies cultured from human explanted liver in subacute hepatic failure exhibit hepatocyte, biliary epithelial, and stem cell phenotypic markers [J]. *Stem Cells*, 2003, 21 (6): 624-631.

[11] Plaa GL. Chlorinated methanes and liver injury: highlights of the past 50 years [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2000, 40: 42-65.

[收稿日期] 2004-10-27

[修回日期] 2004-12-25

[本文编辑] 邓晓群