胚胎干细胞分化为肝细胞的研究进展

Advances in the Research of Differentiation of Embryonic Stem Cells into Hepatocytes

周庆军[1]，邵健忠[1]*，项黎新[1]，张 铭[1]，陆永良[2]，姚 行[2]，戴利成[2]

ZHOU Qing-Jun[1], SHAO Jian-Zhong[1]*, XIANG Li-Xin[1], ZHANG Ming[1], LU Yong-Liang[2], YAO Hang[2] and DAI Li-Cheng[2]

1. 浙江大学生命科学学院，杭州 310012
2. 湖州市中心医院，湖州 313100
1. *College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China*
2. *Huzhou Central Hospital, Huzhou 313100, China*

摘 要 目前，细胞移植作为终末期肝病的辅助治疗方法，移植的细胞必须满足在受体肝脏中存活、增殖并可分化为成熟肝细胞两个重要条件，但目前应用的肝细胞来源有限，其功能随着培养时间的延长而逐渐下降等问题限制了这一治疗策略的广泛开展。作为具有发育全能性和无限增殖能力的细胞，胚胎干细胞向肝细胞的分化研究近年来引起了广泛的关注，并取得了较大的进展，寻找合适、高效的分化诱导方法是目前研究的热点之一。胚胎干细胞向肝细胞的分化研究既可以为临床细胞替代治疗提供合适的细胞来源，也可以在药物评估和肝脏发育分化基础研究方面起到重要的作用。通过概括肝脏和拟胚体分化发育的分子机制，对体外胚胎干细胞向肝细胞分化的几种诱导体系作了介绍，并对分化肝细胞的应用前景和存在的问题进行了讨论。

关键词 胚胎干细胞，肝细胞，分化

中图分类号 Q28 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)02-0171-06

Abstract Orthotopic liver transplantation has proven to be effective in the treatment of a variety of life-threatening liver diseases, however, the limitations of donated organs available and long-term immunosuppression provided an impetus for developing alternative therapies. Cell replacement strategies have been one major effective approach for overcoming the obstacles of organ transplantation in recent years. The exogenous cells should be able to proliferate and differentiate into mature hepatic cells after grafting. Use of mature hepatocytes is also hampered by limited tissue source and inability to proliferate and maintain the function for a long term *in vitro*. Embryonic stem cells are immortal and pluripotent and may provide a novel cell source for potential cell therapy. This review summarizes the mechanisms of controlling early liver development and hepatic differentiation of visceral endoderm in embryoid bodies, and provides an overview of diverse differentiation systems *in vitro* and *in vivo* that were applied to hepatic research in recent years. Several studies have demonstrated that ES cell-derived hepatocytes can incorporate into liver tissue and function *in vivo*, but a few of them have shown complete restoration of liver function after transplantation into mice with liver diseases. Further studies should be made to exploit efficient methods and clinical applications of hepatocytes derived from

Received: August 4, 2004; Accepted: November 1, 2004.

This work was supported by Grant from the Key Science and Technology Foundation of Zhejiang Province (No. J200020579-30116).

* Corresponding author. Tel: 86-571-88273287; E-mail: shaojz@zju.edu.cn

浙江省"十五"重大科技攻关计划基金资助(No. J200020579-30116)。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

ES cells in the future. In addition to clinical transplantation for treatment of liver diseases, ES cells can provide a valuable tool for drug discovery applications and study on of molecular basis of hepatic differentiation.

Key words embryonic stem cells, hepatocytes, differentiation

目前,对于肝功能衰竭(如肝坏死、肝硬化等)和肝脏相关的遗传性疾病的治疗主要依赖于原位肝移植,但供体肝来源严重不足和移植排斥等问题限制了这一治疗手段的广泛开展。肝细胞移植和生物人工肝作为肝移植的辅助方式,可以部分缓解上述问题,但其来源细胞同样也面临着存活期短,特别是随着培养时间的延长,肝功能逐渐降低等问题,因此,寻找合适的肝细胞来源已成为一个十分紧迫的课题。胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)是来源于囊胚内细胞团的多潜能干细胞,具有无限增殖能力,在合适的诱导条件下,可以分化为三胚层来源的功能细胞。随着胚胎干细胞研究特别是分化机制研究的不断深入,ES细胞分化为肝细胞的研究也取得了较大进展,从而为肝细胞移植、肝组织工程、生物人工肝等治疗方式提供了一个有效的细胞来源。本文就这方面的进展作一综述。

1 胚胎中肝脏早期发育的分子机制

哺乳动物肝脏的早期发育起始于5~7体节期,即小鼠胚胎发育的8.25天,人胚胎发育的第4周左右,由邻近的心源中胚层(cardiogenic mesoderm)产生成纤维细胞生长因子(Fibroblast growth factors, FGFs)诱导前肠内胚层末端腹侧壁的上皮增生,发育到14~20体节期,可以形成一个向外突出的肝原基,到20~22体节期,肝原基细胞增殖并迁移到周围侧板(lateral plate)中胚层来源的横隔间充质(septum transversum mesenchyme)中,接受由横隔间充质产生的信号刺激,进一步分化发育[1]。在肝脏的早期发育研究中,Jung *et al*[2]发现,FGF1和FGF2都可以完全替代心源中胚层的诱导而启动肝脏的发育,FGF8b却不能诱导肝脏的起始发育。Rossi *et al*[3-4]则通过基因敲除等研究发现,由横隔间充质产生的信号主要由骨形态形成蛋白(Bone morphogenic proteins, BMPs)和间充质基质中的胶原等成分介导,这类信号对于肝细胞的增殖和完全分化都是必需的。目前,多数研究者认为,心源中胚层产生的FGFs和横隔间充质产生的BMPs联合诱导和促进了肝脏相关基因的表达,同时抑制胰脏相关的基因表达,从而完成了肝脏的早期发育决定。在随后肝脏细胞迅速增殖和功能分化过程中,由间充质细胞分泌产生的肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor, HGF)、造血细胞分泌的制瘤素(Oncostatin M, OSM)和糖皮质激素以及血管内皮细胞都起着重要的作用[1]。值得注意的是,在肝脏发育过程中,除了一些可溶性细胞因子外,细胞外基质和细胞间的信号传导同样起着重要的作用[5]。

2 拟胚体内胚层分化发育机制

拟胚体(embryoid body, EB)是胚胎干细胞在体外一定条件下自发形成的类似早期胚胎的球体结构,其三胚层的形成与分化基本模拟了体内胚胎早期发育中组织细胞分化的过程,可以作为研究哺乳动物胚胎发育尤其是早期谱系决定、胚层相互诱导等现象的理想体外模型[6]。由于肝细胞主要由脏壁内胚层(visceral endoderm)的细胞分化而来,因此利用拟胚体作为体外模型研究原始内胚层(primitive endoderm)经脏壁内胚层到肝细胞的分化显得尤为重要。Li *et al*[7]和Esner *et al*[8]用FGFR2(FGF recepter2)和FGFR1(FGF recepter1)突变干细胞进行研究发现,两种细胞形成的拟胚体都未出现内胚层和基膜等典型结构,由此表明FGF/FGFR信号转导通路可能在内胚层的分化过程中起着重要的作用。Coucouvanis *et al*[9]通过对BMP突变干细胞的研究发现,外胚层细胞分泌的BMP信号分子在脏壁内胚层的分化过程中起着重要的作用。Becker *et al*[10]在对F9细胞形成的拟胚体进行原位杂交时发现,Indian hedgehog (Hh)在分布于拟胚体外周的内胚层细胞中表达明显升高,而内部的细胞表达量较低;拟胚体经过Hh拮抗剂cAMP和forskolin处理后,Hh表达量明显降低,同时外周的原始内胚层细胞开始向腔壁内胚层(parietal endoderm)转变,因此认为,Hh信号可能也参与了拟胚体原始内胚层的分化过程。Kubo *et al*[11]发现,在减少血清刺激或在无血清条件下添加activin A均可以诱导内胚层的分化,将得到的分化细胞移植到受体小鼠的肾包膜后发现可以形成骨骼肌、肠、骨等结构(但未得到肝细胞结构,因为在肾脏中缺少合适的分化环境)。上述研究显示,拟胚体中脏壁内胚层的分化发育基本上模拟了胚胎发育期肝脏的分化过程,因此为利用拟胚体开展肝脏细胞的分化研究提供了理论依据。

3 胚胎干细胞向肝细胞的分化

3.1 自发分化

理论上,胚胎干细胞具有分化为全部组织类型细胞的潜能,但内胚层细胞的分化需要中胚层细胞、内皮细胞和间质细胞的诱导,这种协同诱导方式在体外很难单独模拟,因此,胚胎干细胞向肝细胞的自发分化实验都是通过拟胚体实现的。1996年,日本学者Abe *et al*[12]首先检测了拟胚体发育过程中内胚层标志基因的表达情况,结果发现,甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)和甲状腺运载蛋白(Transthyretin, TTR)的表达开始于拟胚体形成卵黄囊样结构时,并且其表达逐渐增强;肝细胞生长因子(Hepatocyte nuclear factor, HNF)1β和3β早于AFP和TTR的表达;HNF1α则晚于AFP和TTR的表达;白蛋白(Albumin, Alb)的表达只能在后期体积较大的囊状拟胚体中检测到。由此表明,拟胚体发育过程中内胚层基因的表达模式与小鼠胚胎体内发育过程相似。2001年Yamada *et al*[13]利用肝细胞对靛青绿(Indocyanine Green, ICG)的排泄现象,建立了一套分化肝细胞的检测方法,同时也对肝细胞的分化过程进行了研究,ICG^+细胞一般在拟胚体培

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

养的第 14 天开始出现，形成独特的三维结构，可分泌产生白蛋白，并表达白蛋白、甲胎蛋白、尿素合成酶等肝细胞相关基因；将这些细胞通过门静脉移植入小鼠体内，发现可以整合到受体小鼠肝脏中，在形态上与受体肝细胞相似。特别注意到的是，ICG⁺ 细胞簇多出现在跳动的心肌附近，由此可以说明心源中胚层对内胚层细胞分化的诱导作用，同时也表明拟胚体本身可以提供肝细胞分化的微环境。2002 年 Miyashita *et al*[14] 通过 RT-PCR 和定量 PCR 对拟胚体自发分化过程中肝细胞相关基因的表达情况做了深入研究，发现在拟胚体体外培养 21 天后多数基因尤其是 6-磷酸葡萄糖（Glucose-6-phosphate, G6p）等成熟肝细胞的标志开始检测到，但表达量仅相当于初生小鼠肝脏的 0.12% 左右。白蛋白的免疫细胞化学分析表明，肝细胞多位于拟胚体铺展生长的外周区域。Jones *et al*[15] 利用带有基因陷阱载体（gene trap vector）的干细胞进行的研究也表明，拟胚体可以自发分化成早期未成熟肝细胞。

上述实验结果表明，拟胚体自身的条件或培养环境中的未知因素可以启动并维持肝细胞的早期分化过程，但自发分化得到的多是一些细胞的混合体，分化率比较低，分化的肝细胞也多处于早期未成熟状态，因此有必要对分化的肝细胞进行分选和进一步扩增，或进行更有效的定向诱导分化。

3.2 体外诱导分化

近年来，胚胎干细胞的诱导分化研究进展很快，已形成了多种方法和技术体系，如按是否经过拟胚体阶段可以分为通过拟胚体诱导和不通过拟胚体直接诱导两类；按诱导因素的性质来分，则有细胞因子和细胞外基质单独或协同诱导、化合物诱导、与分化的成体细胞共培养及遗传修饰等方法[16]。

3.2.1 细胞因子与胞外基质协同诱导：细胞因子与胞外基质协同诱导一般是指通过提供目的细胞分化、增殖和成熟的微环境从而实现对拟胚体分化过程中特定亚群细胞的纯化和选择性扩增。Hamazaki *et al*[17] 首先采用细胞因子分阶段诱导的方法检测了拟胚体诱导分化为肝细胞的可能性，他们将体外培养 5 天的拟胚体接入 I 型胶原包被的培养板中，贴壁 3 天后先后添加 FGF1、HGF 和 OSM、Dexamethasone（Dex）、ITS（insulin + transferrin + selenious acid）分别作为早、中、晚期诱导剂，连续诱导 9 天后分析，结果发现，在不添加胶原和细胞因子的对照组中，未检测到 G6p 和 TAT 两种成熟肝细胞基因的表达，添加细胞因子后的实验组则可以检测到，而且白蛋白的表达量提高了 9.5 倍，进一步的实验表明，中后期的诱导剂对于分化的肝细胞表达 G6P 和 TAT 是必须的。Chinzei *et al*[18] 也采用相似的诱导模式对悬滴培养 2 天的拟胚体进行了诱导，结果发现，添加的诱导因子并没有对肝细胞分化产生明显的促进作用，因为在未添加诱导因子的对照组中，也检测到了 TAT 等成熟肝细胞标志的表达，这与 Hamazaki 等报道的结果有所不同，原因可能与干细胞系的种类和状态、细胞因子的诱导时间和浓度、拟胚体的成熟程度甚至血清批次等因素有关。在我们的工作中也发现，拟胚体在不添加任何细胞因子的条件下，也可以表达 TAT、G6p 等成熟肝细胞的标志。Chinzei 等在实验中还同时对拟胚体消化得到的细胞进行了移植，发现来自分化 9 天的拟胚体细胞移植后无畸胎瘤产生，但用免疫组化和 FISH 杂交实验证实了移植细胞的存在和功能。国内 Hu *et al*[19] 利用 TGF（transforming growth factor）+ FGF2、Dex + ITS 和 HGF + OSM 三组诱导剂对拟胚体连续诱导 12 天，RT-PCR 结果显示，*Afp*、*Alb*、*G6p*、*TAT* 等肝细胞标志的表达与对照组相比都有所提前；其分泌白蛋白和合成尿素的能力随着分化时间的延长也随之增高，最后统计的肝细胞分化率明显高于对照组。

在细胞因子组合诱导方面，Schuldiner *et al*[20] 还检测了 8 种细胞因子受体在拟胚体阶段的表达情况，而后研究了这些细胞因子对人胚胎干细胞分化的影响，结果发现 NGF（nerve growth factor）和 HGF 可以诱导肝细胞相关基因的表达，但 NGF 的效果显得更为明显；Kuai *et al*[21] 利用小鼠 D3 细胞形成的拟胚体进行 β-NGF 和 HGF 诱导肝细胞分化试验，也得到相同的结果；Shirahashi *et al*[22] 则对干细胞定向分化为肝细胞过程中的培养液、生长和分化诱导因子以及包被基质等因素进行了优化，发现在 I 型胶原包被条件下，利用添加有 20% 胎牛血清、胰岛素和地塞米松的 IMDM 培养液最有利于肝细胞的分化。

Ruhnke *et al*[23] 首先分离建立了大鼠的胚胎干细胞系（Rat embryonic stem cells, RESCs），然后对其分化能力进行了鉴定，他们将 RESCs 培养在 Matrigel 包被的盖玻片上，采用含 FGF4 的培养液进行肝细胞的直接诱导分化，诱导 21 天后，细胞形态逐渐变成圆形，贴附于培养皿底部，细胞直径增大，部分细胞变成双核，细胞质变暗；免疫组化表明其表达 CK18、albumin、AFP、AAT 等蛋白；半定量 RT-PCR 检测发现 Afp、TTR 等表达量有明显的升高，但肝细胞分化的中后期标志如 HNF-1α 及 CYP2B1（细胞色素 P450）等却未见升高。实验中，Ruhnke 采用了未经拟胚体阶段的直接诱导分化方法，虽然分化的肝细胞成熟程度和诱导效率不高，但为细胞因子直接诱导干细胞向肝细胞分化打下了一定的基础。

3.2.2 遗传修饰方法：干细胞分化的遗传修饰方法一般分为两种，一种是组织特异性转录因子组成（过度）表达法，即用组成型启动子启动组织特异性转录因子的持续表达，从而诱导干细胞分化为目的细胞；另一种是选择性标记基因筛选法，即用组织特异性启动子启动选择性标记基因（Green Fluorescent Protein、neomycin 等）的表达，而后用抗生素或流式细胞仪对表达标记基因的分化细胞进行筛选、富集和进一步扩增[16,24]。近年来，随着体外遗传操作技术的进一步成熟，肝细胞的诱导分化也得到了迅速的发展。

2002 年，Ishizaka *et al*[25] 首先构建了鸡 β-actin 启动子驱动的、含潮霉素抗性基因和 HNF-3β 的质粒 pPyCAG-hygro-HNF-3β，将其转染小鼠 CGR8 细胞，而后进行筛选，得到 4 个稳定表达的细胞系（HNF-3β-transfected CGR8 cells, HTC）。HTC 细胞用含 10% FBS、FGF2、Dex、L-ascorbic-2-phosphate、nicotinamide 的 α-MEM 培养液在 96 孔圆底培养板中培养 1 个月

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

后,形成了一种球体结构的细胞团,这种细胞团在含几丁质纤维的塑料培养瓶中,用去除了 FGF2 的培养液继续培养 3 个月,然后进行免疫组化分析,结果显示 Albumin$^+$ 和 CK18$^+$ 多出现在球体结构的外层,电镜观察发现外层细胞具有丰富的线粒体、内质网和糖原颗粒,经合适的诱导剂诱导后,这些细胞可以表达补体 C3、细胞色素 P450、PEPCK(phosphoenolpyruvate carboxykinase)等基因,其合成尿素的速度是相同数量大鼠肝细胞的 4 倍多,细胞内三酰基甘油的含量是大鼠原代肝细胞的 2 倍多。由此可见,强制表达 HNF-3β 的干细胞在添加 FGF2 等诱导剂的三维培养系统中能分化产生肝细胞并维持其长时间的代谢活性。2003 年,Kanda *et al*[26] 开展了类似研究,他们采用 FGF2 对悬滴培养 5 天的拟胚体进行诱导,分化 28 天后进行分析鉴定,发现在 HTC 来源的拟胚体中,大多数细胞形成了单层多角上皮样细胞,其白蛋白免疫反应呈阳性,RT-PCR 分析显示其可以表达许多肝细胞功能相关的基因。综上研究表明,通过"过度表达"肝细胞相关转录因子的遗传修饰方法为干细胞向肝细胞的分化提供了一条有效的途径。此外,Hamazaki *et al*[24] 还提出了一种选择性标记基因筛选肝前体细胞的方法,他们以 Afp 基因的启动子调控 GFP 基因的表达,在去除 LIF 后的 2 天内,即可检测到 GFP$^+$ 细胞出现在拟胚体外层的腔壁内胚层中,但拟胚体贴壁培养 3 天后,这些细胞的 GFP 表达逐渐减弱,同时,在拟胚体的外周缘出现一层到数层形态不同的 GFP$^+$ 区,到第 12 天时,GFP$^+$ 区域又出现于拟胚体的中央,随着培养时间的延长,这一类群细胞逐渐增多,培养 18 天时,通过流式细胞仪检测,GFP$^+$ 细胞可以达到细胞总数的 1.2% ± 0.9%,添加 FGF1、HGF 和 OSM 等诱导因子后,GFP$^+$ 细胞量可达 2.4% ± 0.9%。对 GFP$^+$ 细胞的性质鉴定发现,这些细胞可以表达 *Afp*、*Albumin*、*CK*19 和细胞色素 P450(*CYP1A1*)等基因,并且高表达 AFP 和 Albumin 蛋白。Yin *et al*[27] 在采用相似的遗传修饰方法进行肝细胞分化的同时,对传统的拟胚体形成方法进行了部分修改,结果经 FACS 检测发现,GFP$^+$ 细胞可以占到总细胞数的 30% ~ 50%。

3.2.3　共培养方式诱导:Fair *et al*[28] 根据肝脏发育过程中心源中胚层对原始内胚层诱导作用的原理,采用鸡胚心源中胚层细胞与胚胎干细胞共培养的方法,研究了共培养系统在干细胞向肝细胞分化中的作用。结果发现,两种细胞在培养 24h 内就可迁移到对方群体内部,在共培养 4 天后,干细胞的形态发生了明显的变化,细胞逐渐由 10μm 增大到 25 ~ 35μm,细胞质内颗粒度增加,细胞出现多倍体现象;实时 PCR 分析表明,HNF3β 和 Sox17α 在共培养的第 1 天即可检测到,*GATA*、*Afp* 和 *albumin* 的表达也有明显的提高。然而在实验中也发现,当共培养时间到达 4 天后,*Afp* 和 *albumin* 的表达量不再明显增加,而且分化得到的细胞并未表达成熟肝细胞的标志,由此说明,心源中胚层的诱导只能限于特定的早期阶段,存在时空上的局限性,因此这种共培养的方法只能作为研究肝细胞早期分化机制的体外模型。Kuai *et al*[29] 设计了一种特殊的共培养装置,使小鼠胎肝细胞和干细胞不直接接触,但培养液相通,结果发现,干细胞与胎肝细胞共培养后,可以分化成单一形态的上皮样细胞,其形态与胎肝细胞相似,Albumin 和 TTR 基因和蛋白表达量都很高。我们在实验过程中也发现,胎肝细胞的条件培养液也可以诱导胚胎干细胞向肝细胞方向的分化,而且得到的细胞形态均一,Albumin 和 AFP 检测均呈阳性,并有双核细胞出现。

3.2.4　化合物诱导:化学合成的复合物具有半衰期长的特点,因此更适合于干细胞的长期分化诱导过程。2003 年,Geron 公司的研究者[30] 发现丁酸钠(sodium butyrate)可以通过拟胚体或直接诱导 hES 细胞定向分化为肝细胞,分化得到的细胞与原代培养肝细胞形态相似,70% ~ 80% 的细胞可以表达肝特异性的蛋白质(albumin, α-1-antitrypsin, cytokeratin 8 和 18)、储存糖原以及可诱导的细胞色素 P450 活性,且细胞不表达甲胎蛋白,但丁酸钠具有较高的毒性,在分化过程中可观察到明显的细胞死亡现象,最后只有 10% ~ 15% 的细胞能存活并分化成肝细胞。有研究表明,丁酸钠通过其组蛋白去乙酰化酶抑制剂活性可以介导多种细胞的分化[31],因此研究者采用一种已知的组蛋白去乙酰化酶抑制剂 trichostatin A 对胚胎干细胞进行诱导,也得到了相似的结果。由此表明,丁酸钠可能是作为一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂介导了干细胞的定向分化,这与 Lee *et al*[32] 的研究明显不同,Lee 等同样采用 trichostatin A 进行实验,却发现 ES 细胞的分化受到了抑制,这种相反的研究结果可能与诱导剂的浓度以及干细胞的种类和状态有关。以前的研究也发现,组蛋白乙酰化、DNA 甲基化修饰在干细胞分化过程中起着一定的作用,如作为 DNA 甲基化抑制剂的 5-氮胞苷(5-azacytidine, 5aza)可以诱导间充质细胞分化到心肌细胞[33],而 5aza 2′deoxycytidine (5aza D) 和 trichostatin A 则可以影响造血干细胞的命运[34]。总之,通过去甲基化、去乙酰化等修饰方法有可能成为诱导干细胞定向分化的一条新途径。

3.2.5　三维诱导:Levenberg *et al*[35] 利用聚羟基乙酸(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA)和聚乳酸(poly L-lactic acid, PLLA)共聚合形成的支架对 hES 细胞的分化进行了研究,发现外源化合物和生长因子如 RA (Retinoic acid)、TGFβ、Activin-A 和 IGF(Insulin-like growth factor)同样可以诱导生长在支架上的 hES 细胞分化,并且可以形成特定的组织,分化形成的组织结构与功能受到支架结构的影响。在 Activin-A 或 IGF 的诱导下,hES 细胞可以形成具有早期肝脏生化特性(产生高水平的 AFP 和 Albumin 蛋白)的结构,这与 Kubo *et al*[11] 的研究相似,但 activin-A 同时还可以诱导胰脏相关基因 PDX-1 的高表达,因此 activin-A 可能是诱导 ES 细胞向内胚层来源的组织进行分化,而不是只诱导肝细胞方向的分化。

3.3　体内诱导分化

Choi *et al*[36] 为了研究小鼠 ES 细胞的体内分化潜能,将其注入免疫缺陷小鼠的脾脏内,结果形成了畸胎瘤,对其结构等的观察和分析表明,在畸胎瘤的某些部位存在典型形态的肝细胞,这些细胞可以表达肝细胞特异的基因和蛋白质,分化得到的细胞是不同成熟程度的肝细胞的混合体。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

Yamamoto *et al*[37] 首先构建了含 albumin 启动子调控的绿色荧光蛋白基因的质粒 pALB-EGFP，转入小鼠 ES 细胞中，将筛选得到的 pALB-EGFP/ES 细胞植入到经 CCl4 处理的肝损伤小鼠体内，3 周后取出肝脏，在实验组的肝脏中观察到很多肿瘤的形成，分析发现，GFP^+ 细胞占到了整个肝脏的 14% ~ 28%，光镜和电镜观察结果均证实其与正常肝细胞或肝前体细胞相似，免疫组化分析结果发现一部分 GFP^+ 细胞可以产生 ALB、AAT、Transferrin 和 CK18 等成熟肝细胞相关的蛋白质，另一部分则弱表达 GSTP（glutathione S-transferase placental form）和 AFP 等未成熟肝细胞的蛋白质，胆管上皮细胞的标志 CK19 没有检测到，该结果表明，干细胞在肝损伤的微环境下可以分化为成熟和未成熟的肝细胞。为了检测其体外培养性质，Choi 等对酶解分离的 GFP^+ 细胞进行了培养和功能分析，发现这些细胞可以连续增殖 3 ~ 4 周，增殖速度比较慢，肝细胞形态可以维持 1 个月，培养 21 天后，细胞仍可以产生 Albumin、AAT 等蛋白，并具有产生葡萄糖和清除氨的能力，GFP^+ 细胞的另一个特点是不能在软琼脂上生长。将体外培养 1 周的细胞移植到肝损伤小鼠脾脏后，细胞可以迅速扩散到肝门部位，至少可以存活 14 天，移植 3 个月后检测，并未发现畸胎瘤产生，肝损伤小鼠的肝功能如凝血时间、血清总胆红素和血氨水平都有所改善。此外，作者还通过对供体细胞 Y 染色体的检测证实了此分化并非细胞融合所致。Yin*et al*[27] 为了检测 AFP/GFP^+ 细胞是否能在移植到体内后继续分化成肝细胞，将分化 6 天的 GFP^+ 细胞移植到肝损伤小鼠体内，在移植的 100 多只小鼠中未发现畸胎瘤。移植 3 周后，对受体小鼠肝脏的分析发现，移植的 GFP^+ 细胞直径为 15 ~ 20μm，多由 10 ~ 15 个细胞组成细胞簇，与受体自身的肝细胞形成连续的肝索结构，并具有成熟肝细胞的部分性质。此外，在 $ApoE^-$ 和 $haptoglobin^-$ 两种功能缺陷小鼠上的移植实验也得到了相似的结果。

4 问题和展望

胚胎干细胞的无限增殖能力、多向分化潜能以及外源基因高效转染系统的建立为其诱导分化产生肝细胞的研究奠定了坚实的基础，对肝硬化、肝坏死等肝功能衰竭的治疗采用细胞移植或生物人工肝辅助治疗、对遗传性肝脏疾病采用干细胞进行基因介入治疗是最新发展起来并具有广泛应用前景的肝脏病治疗策略，对于病毒性肝炎高发的中国具有更远大的意义[38-39]。目前，国际上对干细胞分化为肝细胞的研究已取得了很大进展，构建了多种分化诱导技术体系，并对分化得到的肝（前体）细胞的功能和可移植性进行了初步的研究，取得了较大的进步。但也存在着很多的问题，如不同研究小组通过拟胚体方法分化得到的肝细胞在成熟程度、功能、基因和蛋白表达特征方面均存在较大的差异；通过化合物诱导得到的肝细胞虽然比较均一，但化合物本身可能就具有致畸性，这在临床应用上存在潜在风险；遗传修饰法作为新发展起来的干细胞分化方法，有着很大的应用前景，关键在于选择合适的组织特异性基因和筛选标记，同时其安全性问题也值得注意；此外，目前的多数实验结果来自鼠源性干细胞的研究，人胚胎干细胞的分化体系、分化调控机制以及临床移植的系列问题等都还需要进一步的深入研究，但随着生物技术的迅猛发展，胚胎干细胞会成为肝组织工程、肝细胞移植以及生物人工肝等肝病治疗过程中一个有效的细胞来源。

REFERENCES（参考文献）

[1] Duncan SA. Mechanisms controlling early development of the liver. *Mech Dev*, 2003, **120**(1): 19 - 33

[2] Jung J, Zheng M, Goldfarb M *et al*. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science*, 1999, **284**(5422): 1998 - 2003

[3] Rossi JM, Dunn RN, Hogan BLM *et al*. Distinct mesodermal signals, including BMPs from septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev*, 2001, **15**(15): 1998 - 2009

[4] Cascio S, Zaret KS. Hepatocyte differentiation initiates during endodermal-mesenchymal interactions prior to liver formation. *Development*, 1991, **113**(1): 217 - 225

[5] Suzuki A, Iwama A, Miyashita H *et al*. Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development*, 2003, **130**(11): 2513 - 2524

[6] Desbaillets I, Ziegler U, Groscurth P *et al*. Embryoid bodies: an *in vitro* model of mouse embryogenesis. *Exp Physio*, 2000, **85**(6): 645 - 651

[7] Li X, Chen Y, Scheele S *et al*. Fibroblast growth factor signaling and basement membrane assembly are connected during epithelial morphogenesis of the embryoid body. *J Cell Biol*, 2001, **153**(4): 811 - 822

[8] Esner M, Pachernik J, Hampl A *et al*. Targeted disruption of fibroblast growth factor receptor-1 blocks maturation of visceral endoderm and cavitation in mouse embryoid bodies. *Int J Dev Biol*, 2002, **46**(6): 817 - 825

[9] Coucouvanis E, Martin G R. BMP signaling plays a role in visceral endoderm differentiation and cavitation in the early mouse embryo. *Development*, 1999, **126**(3): 535 - 546

[10] Becker S, Wang ZJ, Massey H *et al*. A role for Indian hedgehog in extraembryonic endoderm differentiation in F9 cells and the early mouse embryo. *Dev Biol*, 1997, **187**(2): 298 - 310

[11] Kubo A, Shinozaki K, Shannon J M *et al*. Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development*, 2004, **131**(7): 1651 - 1662

[12] Abe K, Niwa H, Iwase K *et al*. Endoderm-specific gene expression in embryonic stem cells differentiated to embryoid bodies. *Exp Cell Res*, 1996, **229**(1): 27 - 34

[13] Yamada T, Yoshikawa M, Kanda S *et al*. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. *Stem Cells*, 2002, **20**(2): 146 - 154

[14] Miyashita H, Suzuki A, Fukao K *et al*. Evidence for hepatocyte differentiation from embryonic stem cells *in vitro*. *Cell Transplant*, 2002, **11**(5): 429 - 434

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

[15] Jones EA, Tosh D, Wilson DI *et al*. Hepatic differentiation of murine embryonic stem cells. *Exp Cell Res*, 2002, **272**(1): 15 – 22

[16] Heng BC, Cao T, Haider HK *et al*. An overview and synopsis of techniques for directing stem cell differentiation *in vitro*. *Cell Tissue Res*, 2004, **315**(3): 291 – 303

[17] Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M *et al*. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells *in vitro*. *FEBS Lett*, 2001, **497**(1): 15 – 19

[18] Chinzei R, Tanaka Y, Shimizu-Saito K *et al*. Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. *Hepatology*, 2002, **36**(1): 22 – 29

[19] Hu AB, Cai JY, Zheng QC *et al*. High-ratio differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes *in vitro*. *Liver Int*, 2004, **24**(3): 237 – 245

[20] Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J *et al*. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(21): 11307 – 11312

[21] Kuai XL, Cong XQ, Li XL *et al*. Generation of hepatocytes from cultured mouse embryonic stem cells. *Liver Transpl*, 2003, **9**(10): 1094 – 1099

[22] Shirahashi H, Wu J, Yamamoto N *et al*. Differentiation of human and mouse embryonic stem cells along a hepatocyte lineage. *Cell Transplant*, 2004, **13**(3): 197 – 211

[23] Ruhnke M, Ungefroren H, Zehle G *et al*. Long-term culture and differentiation of rat embryonic stem cell-like cells into neuronal, glial, endothelial, and hepatic lineages. *Stem Cells*, 2003, **21**(4): 428 – 436

[24] Hamazaki T, Terada N. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes. *Methods Enzymol*, 2003; **365**: 277 – 287

[25] Ishizaka S, Shiroi A, Kanda S *et al*. Development of hepatocytes from ES cells after transfection with the HNF-3beta gene. *FASEB J*, 2002, **16**(11): 1444 – 1446

[26] Kanda S, Shiroi A, Ouji Y *et al*. *In vitro* differentiation of hepatocyte-like cells from embryonic stem cells promoted by gene transfer of hepatocyte nuclear factor 3 beta. *Hepatol Res*, 2003, **26**(3): 225 – 231

[27] Yin Y, Lim YK, Salto-Tellez M *et al*. AFP(+), ESC-derived cells engraft and differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Stem Cells*, 2002, **20**(4): 338 – 346

[28] Fair JH, Cairns BA, Lapaglia M *et al*. Induction of hepatic differentiation in embryonic stem cells by co-culture with embryonic cardiac mesoderm. *Surgery*, 2003, **134**(2): 189 – 196

[29] Kuai XL (蒯小玲), Cong XQ (丛笑倩), Li XL (李秀兰) *et al*. study of hepatocytes induced by cultured mouse embryonic stem cells. *Chin J Gastroenterol* (胃肠病学), 2003, **8**(1): 6 – 10

[30] Rambhatla L, Chiu CP, Kundu P *et al*. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant*, 2003, **12**(1): 1 – 11

[31] Chen WY, Bailey EC, McCune SL *et al*. Reactivation of silenced, virally transduced genes by inhibitors of histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, **94**(11): 5798 – 5803

[32] Lee JH, Hart SR, Skalnik DG. Histone deacetylase activity is required for embryonic stem cell differentiation. *Genesis*, 2004, **38**(1): 32 – 38

[33] Xu W, Zhang X, Qian H *et al*. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp Biol Med* (Maywood), 2004, **229**(7): 623 – 631

[34] Milhem M, Mahmud N, Lavelle D *et al*. Modification of hematopoietic stem cell fate by 5aza 2′deoxycytidine and trichostatin A. *Blood*, 2004, **103**(11): 4102 – 4110

[35] Levenberg S, Huang NF, Lavik E *et al*. Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, **100**(22): 12741 – 12746

[36] Choi D, Oh HJ, Chang UJ *et al*. *In vivo* differentiation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes. *Cell Transplant*, 2002, **11**(4): 359 – 368

[37] Yamamoto H, Quinn G, Asari A *et al*. Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes: biological functions and therapeutic application. *Hepatology*, 2003, **37**(5): 983 – 993

[38] Sukhikh GT, Shtil AA. Stem cell transplantation for treatment of liver diseases: from biological foundations to clinical experience. *Int J Mol Med*, 2003, **11**(3): 395 – 400

[39] Wang YJ. Bioartificial Liver. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002

journals.im.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn