人胚胎干细胞体外诱导分化为肝脏细胞

裴海云* 王韞芳* 杨印祥 彭红梅 习佳飞 施双双
刘雨潇 南雪 白慈贤 裴雪涛†

(军事医学科学院野战输血研究所干细胞与再生医学研究室, 北京 100850; 解放军总医院妇产科, 北京 100853. * 同等贡献.

† 联系人, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn)

摘要 建立诱导人胚胎干细胞分化为肝细胞的方法, 为细胞移植与生物人工肝等肝病替代治疗提供新的种子细胞来源. 将人胚胎干细胞在细菌培养皿中悬浮培养 7 d, 形成囊性拟胚体, 接种至包被有 Ⅰ型胶原的组织培养皿, 以含有地塞米松、胰岛素的条件培养液进行诱导, 通过光学显微镜和电子显微镜观察细胞的形态变化; 免疫细胞化学和 RT-PCR 检测细胞诱导前后肝细胞特异性基因的表达; 用靛青绿摄取、排泌实验、糖原染色实验及白蛋白、尿素分泌检测肝细胞的相关功能. 条件诱导液培养 14 d, 细胞形态由圆形变为多角形和长梭形, 出现双核或多核, 表面有微绒毛, 胞浆内含丰富的线粒体、内质网、溶酶体及糖原颗粒等; 这些细胞表达幼稚或成熟肝细胞特异性的 AFP, ALB, CK18, CK19 和 CYP1B1 等基因, 并具有靛青绿摄取、排泌、贮存糖原和分泌白蛋白、氨基代谢生成尿素等功能. 形态、表型及功能的实验结果均证实人胚胎干细胞经上述方法培养可以向肝细胞分化.

关键词 胚胎干细胞 肝细胞 诱导分化 细胞治疗

有关胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES细胞)的研究是目前生物领域的热点. 自 1981 年 Evans 等人^[1]建立第一个小鼠 ES 细胞系以来的 20 多年中, 以其为模型, 研究人员已成功定向诱导出包括雌雄两性配子在内的 20 余种细胞, 涉及 3 个胚层来源的各种类型, 隶属于内胚层的肝细胞也涵盖其中. 大量深入的研究表明, 小鼠 ES 细胞在体外不仅可以诱导分化为肝祖细胞, 而且可以进一步成熟分化为有功能的肝细胞^[2]. 动物实验表明, 将体外分化得到的肝细胞移植入肝损伤模型体内, 移植细胞能够融合到肝脏组织, 并缓解了小鼠的肝损伤, 而且移植 3 个月内未发现畸胎瘤和肿瘤的形成^[3-5]. 如果人类 ES 细胞与小鼠 ES 细胞一样, 在体外可以分化为肝细胞, 并能发挥相应的功能, 这将为肝脏再生、修复以及多种疾病的治疗提供宝贵的细胞来源.

早在 20 世纪 50 年代, 人们就试图用细胞移植和生物人工肝(bioartificial liver, BAL)作为肝衰竭、重症肝炎的辅助支持治疗手段, 为患者等待肝移植或通过肝再生而自然恢复争取时间、创造条件. 经过数十年不懈的努力, 治疗手段日臻成熟, 但优良种子细胞来源仍是制约其进一步发展的瓶颈问题. 1998 年,

人 ES 细胞的成功建系^[6,7]打开了体外生产可供移植治疗的所有类型的人体细胞、组织乃至器官的大门. 因此, 体外定向诱导人 ES 细胞分化为肝脏细胞成为目前研究的热点. 我们采用以小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)作为饲养层, 观察人 ES 细胞的生长状况, 并尝试借助因子与胞外基质(extracellular matrix, ECM)联合诱导人 ES 细胞经过拟胚体(embryoid body, EB)向肝细胞的分化, 探讨诱导人 ES 细胞定向分化为肝细胞的可行性并探索其诱导条件, 为肝病的细胞治疗及其研究提供理论基础.

1 材料和方法

() 人 ES 细胞的培养. 将北京大学第三医院生殖中心建立的人 ES 细胞系 PKU1^[8]接种在小鼠胚胎成纤维细胞饲养层(经 γ 射线照射灭活有丝分裂活性, 接种在 0.1%明胶包被的培养皿中)上, 培养液为无血清人 ES 细胞培养液(Knockout DMEM 培养基(Gibco), 含 20% 血清替代物(Gibco)、1% 非必需氨基酸(HyClone)、0.1 mmol/L β -巯基乙醇(Gibco)、1 mmol/L 谷氨酰胺(Gibco)、4 ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF, Chemicon)、50 IU/mL 青霉素、50 IU/mL 链霉

2007-03-18 收稿, 2007-08-15 接受

国家重点基础研究发展规划(批准号: 2005CB522702)、国家高技术研究发展计划(批准号: 2006AA02A107)和国家自然科学基金(批准号: 30671098)资助项目

素)). 37℃, 5% CO₂ 条件下培养, 每天更换培养液. 一周左右细胞汇合生长, 用 1 mg/mL 胶原酶 (Gibco) 在 37℃ 条件下孵育 10~20 min 进行消化传代, 离心, 重悬, 以 1:4~1:6 接种于新的培养皿.

() EB 的形成. 汇合生长的细胞用胶原酶消化、离心, 沉淀用 EB 培养液(即无血清人 ES 细胞培养液撤除 bFGF 因子)悬浮, 细胞悬液移入 100 mm 的低吸附性细菌培养皿中, 37℃, 5% CO₂ 条件下培养, 每 2 天更换 1 次培养液.

() EB 向肝细胞的诱导分化. 在细菌培养皿中培养 7 d 的 EB 用 0.25% 的胰酶消化成单个细胞, 接种到预先包被有 I 型胶原的培养板上, 加入肝细胞诱导条件培养液(IMDM 培养基(Sigma), 含 20% 胎牛血清(Gibco), 50 nmol/L 地塞米松(Sigma), 0.0625 U/mL 人胰岛素(Lilly France S.A.S)). 37℃, 5% CO₂ 条件下培养, 每 2 天更换培养液, 观察条件培养的定向诱导分化作用.

() 细胞形态观察. 光学显微镜下观察细胞诱导分化前后形态的变化, 记录细胞诱导分化的过程, 并取诱导分化 14 d 的细胞, 吸弃培养液, 以 PBS 洗涤两遍, 在 4℃ 条件下以 3% 戊二醛于培养板原位前固定 2 h, 再以 1% 锇酸后固定 1 h, 用蔗糖缓冲液反复漂洗, 梯度乙醇脱水、加入丙酮后, 以树脂渗透、包埋、聚合, 用 ULTRACUTE/S 型切片机超薄切片, 醋酸铀-枸橼酸铅双重染色, Philips CM120 透射电子显微镜观察细胞超微结构.

() 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测人 ES 细胞诱导前、后相关基因 mRNA 的表达变化. 用 TRIzol 试剂(Invitrogen)提取诱导分化前后的细胞总 RNA 并进行反转录, 分别用引物(表 1)对 cDNA 进行

PCR, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用 Alpha Imager3300 软件对结果进行分析.

() 间接免疫细胞化学检测. 将诱导 14 d 的细胞用 PBS 洗涤两遍, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.1% 的 Triton X-100 破膜 15 min, 山羊血清室温封闭抗原 30 min 后, 分别与甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP) (R&D)、细胞角蛋白 18 (cytokeratin 18, CK18)(Santa Cruz)一抗工作液 4℃ 孵育过夜, 再以不同荧光素(FITC, TRITC)标记的二抗(北京中杉生物科技公司产品)避光继续孵育 30 min, DAPI 衬染细胞核, 置共聚焦显微镜下观察, 用 Laser-Sharp 2000 软件分析图像.

() 细胞培养上清中尿素和白蛋白(albumin, ALB)的产量. 诱导分化 14 d 的细胞经 PBS 冲洗换用无血清的 IMDM 培养基, 加入 0.15 mol/L NH₄Cl, 常规培养 8 h 后收集细胞培养上清, 在全自动生化分析仪(Olympus, Tokyo, Japan)上检测培养上清中尿素和 ALB 的分泌量.

() 靛青绿(indocyanine green, ICG)(Sigma)的摄取、排泌实验. 诱导分化 14 d 的细胞用 PBS 充分洗涤后, 加入 1 mg/mL ICG 于 37℃ 孵育 30 min, 显微镜下观察细胞颜色的变化; 再用 PBS 冲洗 2 遍, 换回完全培养液继续常规培养, 并观察细胞颜色的变化.

() 糖原染色实验即高碘酸-雪夫反应(periodic acid-Schiff, PAS). PAS 试剂盒(上海仁宝医用试剂研究有限公司)用于检测细胞内的糖原. 将涂片滴加固定液固定 3~5 min, 水洗, 晾干; 滴加过碘酸于涂片上氧化 10 min, 水洗, 晾干; 放入雪夫氏溶液中, 置 37℃ 水温箱 5~10 min; 取出后流水洗涤 10~20 min, 晾干, 镜检.

() 统计学处理. 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据

表 1 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)引物^{a)}

基因名称	引物序列	扩增片段长度/bp
AFP	S: 5'-TGCAGCCAAAGTGAAGAGGGAAGA-3' A: 5'-CATAGCGAGCAGCCCAAGAAGAA-3'	217
Alb	S: 5'-TGCTTGAATGTGCTGATGACAGGG-3' A: 5'-AAGGCAAGTCAGCAGGCATCTCATC-3'	162
CK19	S: 5'-ATGGCCGAGCAGAACCGGAA-3' A: 5'-CCATGAGCCGCTGGTACTCC-3'	328
CYP1B1	S: 5'-GAGAACGTACCGGCCACTATCACT-3' A: 5'-GTTAGGCCACTTCAGTGGGTCATGAT-3'	357
β -actin	S: 5'-GATCCACATCTGCTGGAAGG-3', A: 5'-AAGTGTGACGTTGACATCCG-3'	251

a) AFP, alpha-fetoprotein(甲胎蛋白); Alb, albumin(白蛋白); CK19, cytokeratin 19(细胞角蛋白 19); CYP1B1, cytochrome P450 1B1(细胞色素 P450 酶 1B1); β -actin, beta-actin(β -肌动蛋白); S, sense(正义链); A, antisense(反义链); bp, base pair(碱基对)

处理及统计学分析采用 SPSS 统计软件包, 样本比较采用组间方差分析。

2 结果

2.1 人 ES 细胞培养及 EB 的形成

人 ES 细胞呈集落状生长, 将其接种于低吸附性的细菌皿后, ES 细胞呈悬浮生长, 逐渐聚集成小团, 约 1 周左右囊性变, 称为成熟 EB, 继续培养, EB 逐渐形成中空的囊状, 成为老化的 EB (图 1)。

2.2 条件培养液诱导前后形态学变化

光学显微镜下观察到, 在诱导之初, 细胞处于旺盛的分裂状态, 细胞大, 核仁多个且明显。随着时间的推移, 细胞逐渐由圆形变为长梭形或多角形, 分化出较多的上皮样细胞, 可见双核和多核细胞。透射式电子显微镜下观察到, 诱导 14 d 后的细胞其内细胞器相当丰富, 可见大量特征性的圆形或椭圆形、大小不一、嵴稀的线粒体、分布于光面内质网周围的簇状糖原颗粒、溶酶体等细胞器, 细胞表面出现类似指状突起的微绒毛, 符合肝细胞典型的超微结构(图 2)。

2.3 RT-PCR 检测

RT-PCR 检测细胞诱导前后肝细胞相关基因在 mRNA 水平的表达, 电泳结果显示, 诱导后细胞表达原始肝细胞标志 AFP, CK19 和成熟肝细胞标志 ALB, 细胞色素 P450 (CYP)1B1, 而作为阳性对照的胎儿肝脏细胞, 由于尚处于不成熟期, 所以不能表达肝细胞晚期标志物 CYP1B1 (图 3)。

2.4 免疫细胞化学检测

间接免疫荧光结果从蛋白水平证实, 以肝细胞条件诱导培养液培养 14 d 后, 部分细胞表达肝细胞早期标志 AFP 与成熟肝细胞特异性标志 CK18 (图 4)。

2.5 细胞培养上清中尿素和 ALB 的产量

取细胞培养上清经全自动生化仪检测, 结果显示, 诱导分化 14 d 的细胞具有与正常肝细胞类似的分泌 ALB 和氨基代谢生成尿素的功能, 而未加以诱导的 ES 细胞组几乎未测到尿素和 ALB (图 5)。

2.6 ICG 摄取、排泌实验

ICG 摄取、排泌实验目的是检查肝细胞的染料排

图 1 人 ES 细胞及形成的 EB

(a) 生长旺盛的人 ES 细胞, 呈克隆样生长, 形似鸟巢状($\times 40$); (b)~(d) 分别为 3 d, 7 d(成熟)和 14 d(老化)的 EB ($\times 100$)

图 2 形态学观察

(a) 光学显微镜下($\times 40$), 条件培养后分化出较多的上皮样细胞; (b) 透射电子显微镜下, 诱导 14 d 后的细胞其内细胞器相当丰富, 可见大量线粒体、光面内质网、簇状的糖原颗粒、溶酶体等细胞器, 细胞表面出现类似指状突起的微绒毛(分别为红、蓝、粉、黄、绿箭头所示)

图3 RT-PCR 检测肝脏细胞特异性基因的表达

1, DL2000 分子量标准; 2, AFP; 3, ALB; 4, CK19; 5, CYP1B1; 6, β -actin 的扩增结果. A~C 分别为诱导 14 d 后的细胞、正常人胎肝细胞(阳性对照)和人 EB 的扩增结果

泄能力, 是评价肝细胞储备功能的经典实验^[9]. 在向诱导 14 d 的培养体系中加入 1 mg/mL ICG 孵育 30 min 后, 发现诱导后细胞约 50% 被染成深绿色, 而其余的颜色无变化(图 6); 换回完全培养基常规培养 6 h 之内, 着色细胞的颜色完全退去.

2.7 PAS 实验

肝细胞具有贮存糖原的功能, 镜检诱导后细胞发现, PAS 阳性物呈红色颗粒或弥散状, 定位于细胞浆中. 红色的深度因所含糖原的量有关: 量少呈淡红色, 量多呈深红色(图 7).

3 讨论

ES 细胞的诱导分化研究已经形成了多种方法和技术体系, 如按是否经过 EB 阶段可以分为通过 EB 诱导和不通过 EB 直接诱导两类; 按诱导因素的性质

来分, 则有化合物诱导、细胞因子单独或联合 ECM 协同诱导、遗传修饰及与分化的成体细胞共培养等方法. 本研究采用通过 EB 阶段的因子与 ECM 联合诱导.

EB 是 ES 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^[10], 也是我们借助其形成, 从而向内胚层进而肝细胞分化的很好途径. 在本研究中, 我们在培养初期先制备 7 d 的 EB, 以期增加细胞与细胞之间的作用, 模拟体内环境, 构成三胚层结构, 并在 Shirahashi 等人^[11]利用细胞因子与 ECM 联合的诱导体系基础之上加以改良, 对国内建系的人 ES 细胞进行肝系诱导. 在研究过程中, 我们发现一些问题: () EB 形成大小及成熟度与 ES 细胞消化接种时的密度及细胞团大小密切相关, 接种细胞量过少则形成 EB 很小, 不利于进一步分化, 接种密度太大则 EB 很快形成且体积过大, 很容易出现老化、凋亡现象, 本实验中我们所采用的接种密度大约为 1.0×10^5 个细胞/mL; () 对比以前描述的 EB 直接接种的分化方法, 形成单细胞悬液后再接种到培养板上进行单层细胞培养, 此种方法使得日后的免疫细胞化学及功能鉴定等实验更为简单、有效, 也更利于因子及胞外基质对其充分作用. 本文选用形成 7 d, 大小较为均一的 EB, 在 37 °C 条件下用胰酶作

图4 免疫荧光检测

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/2007-52-18-2135>

图 5 诱导第 14 天时分化细胞尿素和白蛋白的 8 h 分泌量
1, 未经诱导的人 ES 细胞; 2, EB 培养于条件诱导培养液 14 d;
3, 阳性对照(正常人胎肝细胞). $n = 5$

图 6 ICG 摄取实验

红色箭头示孵育 30 min 内已摄取 ICG 的细胞, 蓝色箭头示未摄取 ICG 的细胞. $\times 100$

图 7 PAS 实验

红色箭头示细胞内贮存的糖原颗粒. $\times 200$

用约 5 min 直至轻轻吹打可以形成单细胞悬液, 再接种到预先包被有型胶原的培养板上, 以含有地塞米松和胰岛素的条件培养液支持其生长. 在诱导初期, 细胞分裂相多见, 增殖旺盛, 有少数细胞分化为

典型的神经样细胞与成纤维样细胞; 诱导至第 10 天, 细胞不再增殖, 多分化为上皮样细胞, 超微结构、细胞特异性基因及蛋白表达的检测基本符合肝细胞的特征, 并具有靛青绿摄取、排泄、贮存糖原和分泌白蛋白、氨基酸代谢生成尿素等功能, 证明人 ES 细胞具有向功能肝细胞分化的潜能.

人 ES 细胞的诱导分化研究已经越来越激发起人们将其应用于细胞治疗、组织再生的热情, 然而治疗的安全性及实用性是不容忽视的紧要问题. 尽管研究表明, 人 ES 细胞与小鼠 ES 细胞类似, 体外可以分化为肝脏细胞, 但这些分化所得的细胞能否整合入肝脏组织并长期存活、能否发挥相应的功能、是否有致瘤性等, 尚需进一步深入研究.

参 考 文 献

- 1 Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292: 154—156
- 2 Heo J, Factor V M, Uren T, et al. Hepatic precursors derived from murine embryonic stem cells contribute to regeneration of injured liver. *Hepatology*, 2006, 44: 1478—1486[DOI]
- 3 Takumi T, Hanako Y, Kazuhiko A, et al. Direct hepatic fate specification from mouse embryonic stem cells. *Hepatology*, 2005, 41: 836—846[DOI]
- 4 Soto-Gutierrez A, Kobayashi N, Rivas-Carrillo J D, et al. Reversal of mouse hepatic failure using an implanted liver-assist device containing ES cell-derived hepatocytes. *Nat Biotechnol*, 2006, 24: 1412—1419[DOI]
- 5 Yamamoto H, Quinn G, Asari A, et al. Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes: Biological functions and therapeutic application. *Hepatology*, 2003, 37: 983—993[DOI]
- 6 Thomson J A, Itskovitz E J, Shapiro S S, et al. Embryonic stem cell line derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282: 1145—1147[DOI]
- 7 Reubinoff B E, Pera M F, Fong C Y, et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation *in vitro*. *Nat Biotech*, 2000, 18: 399—404[DOI]
- 8 彭红梅, 陈贵安. 人类胚胎干细胞体外诱导分化为神经干细胞. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2005, 35: 196—200
- 9 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: 146—154[DOI]
- 10 Desbaillets I, Ziegler U, Groscurth P, et al. Embryoid bodies: An *in vitro* model of mouse embryogenesis. *Exp Physiol*, 2000, 85: 645—651[DOI]
- 11 Shirahashi H, Wu J, Yamamoto N, et al. Differentiation of human and mouse embryonic stem cells along a hepatocyte lineage. *Cell Transpl*, 2004, 13: 197—211