

胆汁淤积性肝硬化来源的微环境因子对 肝脏干细胞分化的影响

王健^{1,2} 康权^{1,2*} 罗庆² 杨博^{1,2} 肖程^{1,2} 李志鹏^{1,2} 龚梦嘉² 毕杨²

(¹重庆医科大学附属儿童医院肝胆外科, 重庆 400014; ²重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所干细胞实验室, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014)

摘要 该研究探讨了胆汁淤积性肝硬化病理微环境来源的细胞因子在胆总管结扎小鼠不同时间点的表达变化, 且在体外致力寻找最优的细胞因子组合高效诱导肝脏干细胞HP14-19分化为成熟肝细胞。以Balb/c小鼠胆总管结扎(bile duct ligation, BDL)模拟胆汁淤积性肝硬化病理微环境; 免疫组织化学检测胆总管结扎小鼠肝组织中细胞因子EGF、HGF及TGF- α 的表达; 以小鼠胚胎肝干细胞HP14-19细胞为研究对象, 以不同浓度在不同时间点进行荧光素酶报告基因检测ALB-Gluc活性; qRT-PCR、Western blot检测肝细胞相关标志物表达; 吲哚菁绿(indocyanine green, ICG)及过碘酸-希夫(periodic acid-schiff, PAS)染色检测肝细胞的成熟功能。结果显示, 小鼠胆总管结扎能成功模拟胆汁淤积性肝硬化, 并随结扎时间延长肝硬化程度加重; 与对照相比, 在EGF(10 ng/mL)、HGF(20 ng/mL)、TGF- α (20 ng/mL)单独诱导HP14-19细胞能有效增强ALB-Gluc活性($P < 0.05$); 且在EGF(10 ng/mL)、HGF(20 ng/mL)、TGF- α (20 ng/mL)联合诱导HP14-19细胞时显著增强ALB-Gluc活性($P < 0.05$); qRT-PCR、Western-blot显示, ALB、CK18表达随时间增加而增加, 而AFP表达则相反。ICG摄取及PAS染色阳性细胞数显著增加($P < 0.05$)。因此, 胆汁淤积性肝硬化病理微环境来源的细胞因子能有效促进肝脏干细胞肝向分化, 将对细胞因子联合肝脏干细胞移植治疗胆汁淤积性肝硬化有一定的指导意义。

关键词 胆汁淤积性肝硬化; 胆总管结扎; 微环境细胞因子; 肝脏干细胞; 分化

Effects of Pathologic Microenvironmental Cytokines Derived from Cholestatic Cirrhosis on Liver Stem Cell Differentiation

Wang Jian^{1,2}, Kang Quan^{1,2*}, Luo Qing², Yang Bo^{1,2}, Xiao Cheng^{1,2}, Li Zhipeng^{1,2}, Gong Mengjia², Bi Yang²

(¹Department of Hepatology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China; ²Laboratory of Stem Cell Biology and Therapy, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing 400014, China)

Abstract The aim of this study is to investigate the changes of cytokines derived from pathologic microenvironment of cholestatic cirrhosis in different time points of common bile duct ligation mice, and

收稿日期: 2017-11-09 接受日期: 2018-01-24

国家自然科学基金(批准号: 81172545)和重庆市卫生和计划生育委员会项目(批准号: 2017MSXM041)资助的课题

*通讯作者: Tel: 023-63633113, E-mail: 564799351@qq.com

Received: November 9, 2017 Accepted: January 24, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81172545) and Chongqing Municipal Health and Family Planning Commission (Grant No.2017MSXM041)

*Corresponding author. Tel: +86-23-63633113, E-mail: 564799351@qq.com

网络出版时间: 2018-04-16 11:58:16 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180416.1157.016.html>

to find the optimal combination of cytokines to induce liver stem cells HP14-19 efficiently to differentiate into mature hepatocytes *in vitro*. The Balb/c mice underwent choledochal ligation (BDL) to simulate the microenvironment of cholestatic cirrhosis, the levels of EGF, HGF and TGF- α in liver tissue of mice with common bile duct ligation detected by immunohistochemistry. The mouse embryonic liver stem cells HP14-19 cells were employed in this study. ALB-Gluc assay was performed to evaluate ALB synthesis ability at different concentrations and different time points. qRT-PCR and Western-blot were used to detect the expression of differentiated cell markers AFP, CK18, ALB. ICG uptake and PAS staining were carried out to detect the metabolism and synthesis function of induced HP14-19 cells. Mouse choledochal ligation can successfully simulate cholestatic cirrhosis, and increase the degree of cirrhosis with the ligation time. Compared with the control, the activity of ALB-Gluc in HP14-19 cells was enhanced after treatment of EGF (10 ng/mL), HGF (20 ng/mL) and TGF- α (20 ng/mL) alone, and markedly enhanced in EGF (10 ng/mL), HGF (20 ng/mL), TGF- α (20 ng/mL) in combined treatment. The results of qRT-PCR and Western blot showed that ALB and CK18 expression increased as the growth of the time and AFP level was opposite, and ICG uptake and PAS staining were significantly increased. The results suggested that cholestasis of liver cirrhosis pathological microenvironment-derived cytokines could effectively promote the differentiation of liver stem cells into mature hepatocytes, and it might have a certain guiding role in the treatment of cholestatic cirrhosis through cytokines combined with liver stem cell transplantation.

Keywords cholestatic cirrhosis; common bile duct ligation; microenvironmental factors; liver stem cells; differentiation

先天性胆道闭锁是一种较罕见的新生儿疾病,患儿出生不久即出现阻塞性黄疸症状,如未及时治疗多数患儿最终均导致胆汁淤积性肝硬化,自然死亡率100%^[1]。目前,对于此类疾病的治疗,肝移植依旧是首选^[2]。但是,供体短缺、配型等待时间较长、手术难度高、费用较昂贵及其术后免疫排斥严重等不利因素制约其临床应用。近年来,干细胞移植的出现为治疗终末期肝脏疾病提供了新的途径。肝脏干细胞本身来源于肝脏,易获取且无免疫排斥反应,花费较少。干细胞微环境对干细胞本身的存活、增殖以及分化至关重要。干细胞在不同微环境中能分化为不同类型的细胞^[3-4]。研究表明,细胞因子对干细胞的定向分化非常重要^[5-7]。胆汁淤积性肝硬化的病理性微环境成分复杂,我们在胆汁淤积性肝硬化患儿肝脏标本中发现存在干细胞的动员,而此微环境中存在哪些细胞因子以及这些细胞因子对动员后的肝脏干细胞分化起到怎样的作用目前尚无具体报道。因此,本文将研究胆汁淤积性肝硬化来源的病理性微环境细胞因子对肝脏干细胞分化的影响,为后续进一步研究细胞因子及肝干细胞体内回输以配合手术治疗胆汁淤积性肝硬化奠定重要基础。

1 材料与方法

1.1 动物、细胞株与主要试剂

8周左右大小雄性Balb/c小鼠购自重庆医科大学动物中心;小鼠胚胎肝脏干细胞株HP14-19由美国芝加哥大学医学分子肿瘤实验室赠送;胎牛血清、DMEM高糖培养基、胰蛋白酶替代物购于Gibco公司;表皮细胞生长因子(epidermal, EGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、TGF- α 细胞因子购于Peprotech公司;Bioluminescence Assay Kit购于NEB公司;过碘酸-希夫(periodic acid-schiff PAS)染色试剂盒购于索莱宝公司;吖啶菁绿(indocyanine green, ICG)购于Sigma公司;Masson染色试剂盒购于雷根生物公司;EGF、HGF、TGF- α 一抗、山羊抗兔IgG及山羊抗鼠IgG二抗均购于Abcam公司;AFP、ALB、CK18一抗购于Proteintech公司;蛋白质裂解液、BCA蛋白质浓度测定试剂盒购于碧云天生物技术研究所;ECL发光液购于Bio-Rad公司;RNA提取试剂盒购于江苏凯基生物技术股份有限公司;RNA逆转录试剂盒及PCR试剂均购于TaKaRa公司;PCR引物由华大基因公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 胆总管结扎小鼠模型 在电热毯上用3.5%

水合氯醛腹腔内注射麻醉小鼠后,在剑突下沿腹中线偏右1 cm打开腹腔。轻微剥离胆总管周围组织,造模小鼠用6个“0”的丝线结扎胆总管后立即关闭腹腔。假手术组只游离胆总管周围组织不结扎,直接关闭腹腔。所有操作均在无菌条件下进行,两组小鼠术后均给予普通饲料喂养,自由摄取食物及水,喂养环境相同。分别在3、7、14、21采用离断颈椎处死,4%多聚甲醛固定后石蜡包埋行免疫组化染色及Masson染色。所有动物实验已通过重庆医科大学伦理委员会批准。

1.2.2 血清生化检测 用真空采血管(黄色头盖)采患儿清晨空腹血2~3 mL,采用全自动化学发光免疫分析仪检测实验组与对照组患儿AFP表达水平;3、7、14、21天实验组及假手术组小鼠血液室温3 000 r/min离心10~15 min,取上层血清送检,全自动生化分析仪检测总胆红素(total bilirubin, TBIL)、直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)、谷丙转氨酶(Alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(Aspartic aminotransferase, AST)。

1.2.3 细胞培养 HP14-19细胞用含10%的胎牛血清、加100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的DMEM培养基于37 °C、5% CO₂温育箱中培养,等待细胞贴壁生长至80%~90%汇合时,用胰蛋白酶消化及传代。

1.2.4 细胞分组与处理 取对数生长期的细胞接种于培养皿,待细胞贴壁后分别加入EGF、HGF、TGF-α细胞因子终浓度5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL、80 ng/mL以及联合使用细胞因子处理HP14-19细胞,同时设置空白对照组。以下实验均重复3次以上。

1.2.5 荧光素酶报告基因检测 每组设3复孔,待细胞贴壁后,于诱导后2、4、6天动态取细胞培养上清20 μL/孔于1.5 mL EP管中置于冰盒中,加入G-Luc反应液(反应缓冲液:底物=100:1,新鲜配置),混合后立即置于荧光检测仪下读数并记录。

1.2.6 qRT-PCR检测肝前体细胞及成熟肝细胞相关标志物mRNA水平 分别在细胞因子联合诱导后的第3、7、12天,试剂盒提取各组细胞总RNA,逆转录合成cDNA。PCR扩增相关基因,引物序列见表1,以肌动蛋白β-actin作为内参标化模板,检测基因水平表达情况。qRT-PCR 10 μL反应体系:cDNA 0.8 μL、上下引物各0.25 μL、2×SYBR Green反应液5 μL、

加ddH₂O水至10 μL。qRT-PCR反应条件为:95 °C 30 min;95 °C 5 min,53 °C 30 min,95 °C 5 min,53 °C 30 min,共40个循环;熔解曲线65~95 °C,每5 s增加0.5 °C,读板。

1.2.7 Western blot检测相关蛋白质水平 如上在细胞因子联合处理后的3、7、12天,收集各处理各时间点的细胞,预冷PBS洗3次,按每个6 cm培养皿加100 μL裂解液裂解细胞,用细胞刮刮下细胞,转移入1.5 mL EP管中,置于冰上,每隔10 min用震荡器剧烈震荡,反复3次。14 000 r/min离心5 min,取上清。BCA法测蛋白质浓度,12% SDS-PAGE、100 V、PVDF膜100 V转膜,5%脱脂牛奶室温封闭1 h,一抗β-actin(1:1 000)、CK18(1:1 000)4 °C过夜,8% SDS-PAGE胶对应跑AFP(1:1 000)、ALB(1:1 000),相对应属性二抗室温孵育1 h。ECL发光显影,ImageJ软件分析Western blot条带灰度值。

1.2.8 免疫组织化学染色检测细胞因子的表达 肝组织块经SP两步法行免疫组织化学染色。石蜡切片经梯度酒精水化,流水冲洗3 min;枸橼酸缓冲液煮沸还原抗原,冷却至室温,PBS洗3次/2 min;3%过氧化氢封闭10 min,PBS洗3次/2 min;分别滴加EGF、HGF、TGF-α一抗4 °C过夜;PBS洗3次/2 min,滴加试剂1,室温孵育20 min;PBS洗3次/2 min,滴加试剂2,室温孵育20 min,PBS洗3次/2 min。DAB(1:1 000,现配)显色。流水冲洗、复染、酒精梯度脱水、完成封片。

1.2.9 Masson染色 石蜡切片放置于58~60 °C烤箱中2~3 h,以防组织脱片。二甲苯I、II分别脱蜡10 min和5 min,可适当延长,以组织透明为准。依次梯度酒精100%、95%、80%、75%各1 min水化切片,完成后将切片放于蒸馏水3 min。按试剂盒操作说明,首先滴Bouin固定液,37 °C孵育2 h媒染,自来水冲洗至黄色基本消失;天青石蓝染色5 min,自来水冲洗1 min;Mayer苏木素滴染5 min,自来水冲洗返蓝,盐酸酒精分化10 s,自来水冲洗5 min;丽春红酸性复红液滴染10 min,自来水冲洗1 min;1%磷钼酸分化处理3~5 min,不洗直接滴苯胺蓝染色液浸没组织5 min,0.2%冰醋酸浸洗2 min;依次梯度酒精脱水(同上),二甲苯透明,封片,显微镜拍照,记录。

1.3 PAS染色

取上述各处理时间点24孔板细胞,室温下进行如下操作:PBS洗3次,4%多聚甲醛固定10 min,PBS洗3次,吸弃固定液,0.5%高碘酸液处理5 min;流水冲

表1 qRT-PCR引物序列
Table 1 qRT-PCR primer sequences

引物名称 Name of primers	引物序列(5'→3') Sequences of primers (5'→3')	
	Forward	Reverse
AFP	ACG AGG AAA GCC CCT CAG	GCC ATT CCC TCA CCA CAG
ALB	CCA GAC ATT CCC CAA TGC	CAA GTT CCG CCC TGT CAT
CK18	GCC ATT CCC TCA CCA CAG	ACA GAG CCA CCC CAG ACA
β-actin	AGG GAA ATC GTG CGT GAC	CGC TCG TTG CCA ATA GTG A

表2 临床胆道闭锁及胆总管囊肿患儿AFP表达情况
Table 2 Clinical biliary atresia and choledochal cyst AFP expression in children

疾病类型 Disease type	AFP值升高(例) The number of increased AFP value	AFP正常(例) The number of normal AFP value
Choledochal cyst	0	20
Biliary atresia	92*	8

Fisher确切概率法, * $P < 0.05$ 。

Fisher exact test, * $P < 0.05$.

洗5 min, 滴加schiff染液, 染色15 min, 流水清洗5 min, 显微镜下观察拍照, 每组选取大于10个非重复视野, 胞质染为紫红色即为阳性细胞。

1.3.1 ICG摄取释放实验 取上述各处理时间点细胞, 移除孔内培养基, PBS洗3次, 加入1 mg/mL ICG染液(用培养基稀释)200 μL, 37 °C 5% CO₂孵箱孵育1 h, PBS洗3次。显微镜下观察照相, 每组选取大于10个非重复视野, 胞核染为绿色即为阳性细胞。随后移除孔内PBS, 换回原来的培养基, 37 °C、5% CO₂孵箱孵育6 h, 显微镜下观察细胞ICG释放。

1.4 统计学分析

计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, SPSS 13.0软件进行统计学分析, 组间比较采用单因素方差分析; 计数资料采用Fisher确切概率法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胆道闭锁及胆总管囊肿患儿干细胞动员的检测

首先检测了临床100例胆道闭锁及20例胆总管囊肿手术患儿血清AFP表达, 与胆总管囊肿患儿相比, 胆道闭锁患儿血清AFP值明显升高(表2, $P < 0.05$); 免疫组化检测结果显示, 胆道闭锁患儿手术肝标本干细胞标志物OV-6及C-kit明显高表达(图1)。

2.2 胆总管结扎模拟胆汁淤积性肝硬化模型的建立与鉴定

分别在结扎Balb/c小鼠后的3天、7天、14天、

21天处死收取肝脏标本, 行血生化AST、ALT、TBL及DBL指标检测; Masson染色以及Western blot纤维化特异性指标α-SMA检测。结果显示, 与假手术组相比, 血生化指标均不同程度升高(图2, $P < 0.05$); Masson染色蓝色区域随造模时间延长而增多, 纤维化程度加重(图3); α-SMA蛋白质随造模时间延长表达亦上调(图4, $P < 0.05$)。

2.3 免疫组化检测BDL小鼠肝脏中HGF、EGF、TGF-α细胞因子的表达

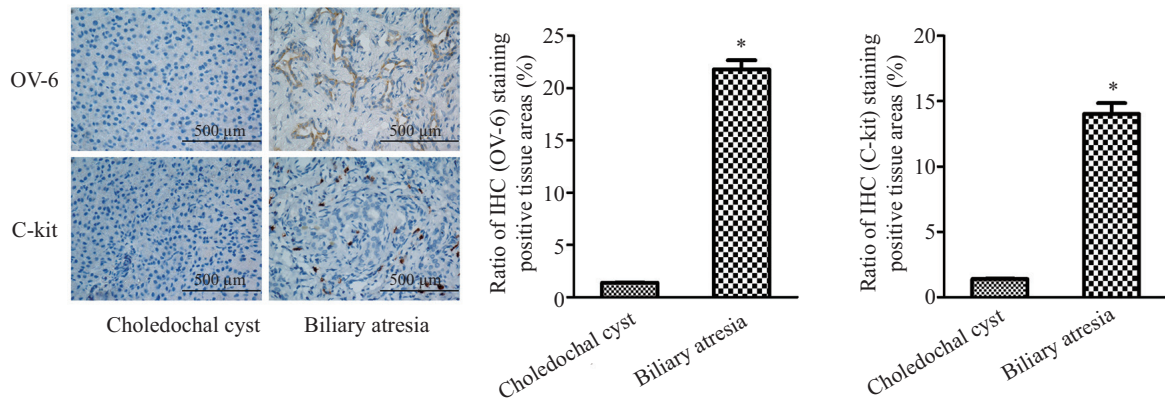
分别取假手术组以及结扎3天、7天、14天、21天的小鼠肝组织切片做免疫组化染色。结果显示, 与对照相比, EGF在肝细胞及胆管周围表达较多, 且于7~14天到顶峰; HGF、TGF-α与EGF类似, 于14天达顶峰。14天后细胞因子表达降低可能与后期细胞坏死有关。

2.4 细胞因子HGF、EGF、TGF-α联合诱导HP14-19细胞对ALB-Gluc活性的影响

将细胞因子分别单独以及联合诱导HP14-19细胞。结果可见, 在细胞因子单独处理时: 10 ng/mL EGF、20 ng/mL HGF以及20 ng/mL TGF-α效果最好(图6, $P < 0.05$); 而当EGF(10 ng/mL)、HGF(20 ng/mL)、TGF-α(20 ng/mL)联合应用时比单独效果好(图6, $P < 0.05$)。因此, 选择此组合浓度继续做接下来的实验。

2.5 qRT-PCR检测肝前体细胞和成熟肝细胞相关基因mRNA的表达

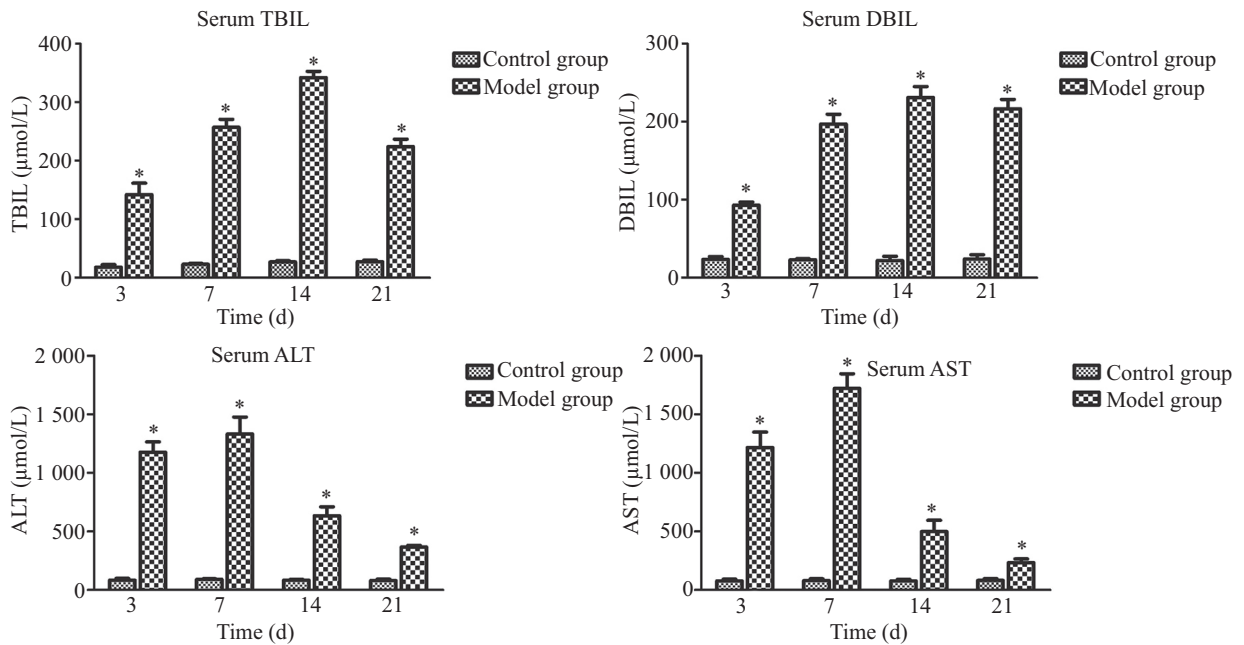
qRT-PCR结果显示, 与对照组相比, 处理组随着



* $P < 0.05$, 与choledochal cyst组比较。
 * $P < 0.05$ vs choledochal cyst group.

图1 胆总管囊肿和胆道闭锁患儿OV-6及C-kit的水平

Fig.1 The levels of OV-6 and C-kit in children with choledochal cyst and biliary atresia



* $P < 0.05$, 与对照组(0 ng/mL)比较。
 * $P < 0.05$ vs control group (0 ng/mL).

图2 胆总管结扎小鼠血清TBIL、DBIL、ALT及AST检测

Fig.2 Serum TBIL, DBIL, ALT and AST in common bile duct ligation mice

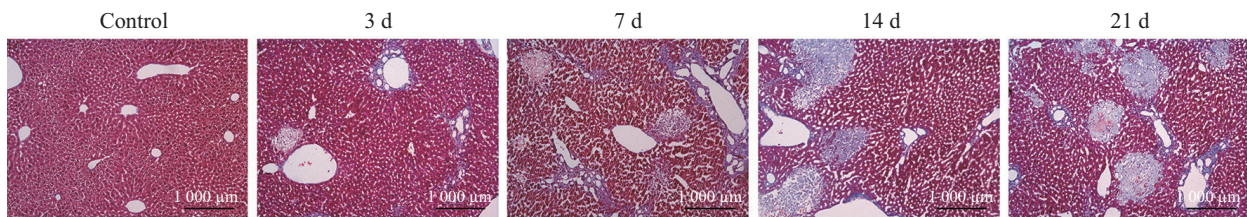
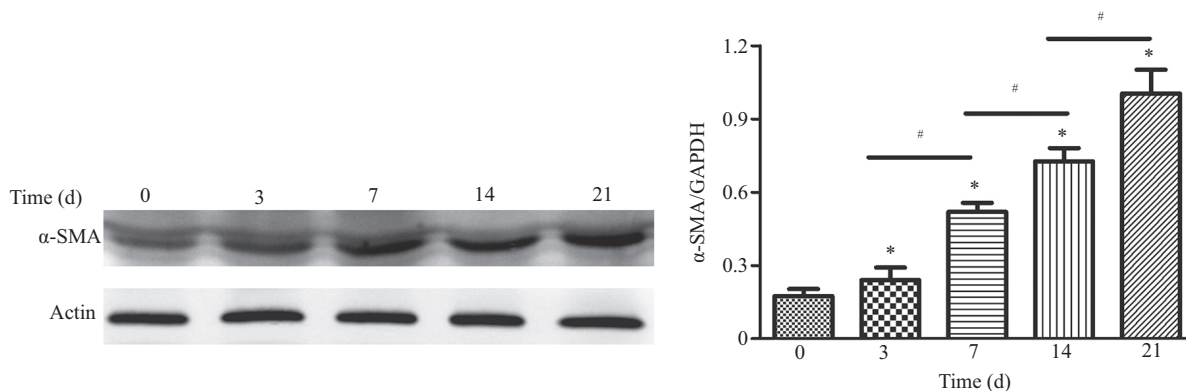


图3 Masson染色检测胆总管结扎小鼠肝组织纤维化情况

Fig.3 Masson staining of liver tissue fibrosis in common bile duct ligation



* $P < 0.05$, 与对照组(0 $\mu\text{g/mL}$ 组)比较; # $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group (0 $\mu\text{g/mL}$ group); # $P < 0.05$ 。

图4 Western blot检测BDL小鼠肝组织 α -SMA蛋白质水平

Fig.4 BDL mouse liver α -SMA protein level detected by Western blot

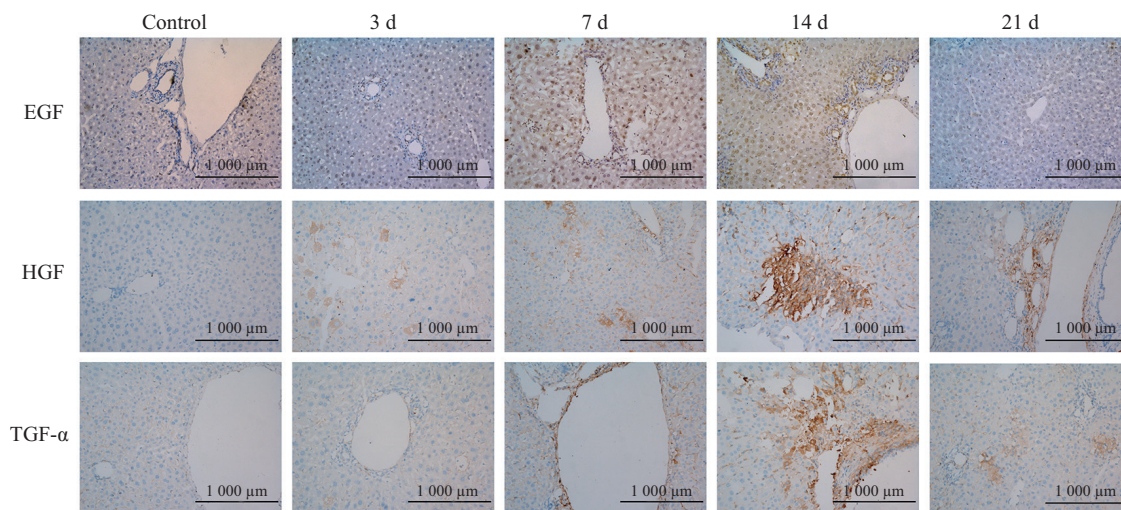


图5 BDL小鼠肝组织中细胞因子EGF、HGF、TGF- α 的表达

Fig.5 Expression of cytokines EGF, HGF and TGF- α in the liver of BDL mice

诱导时间延长肝前体细胞标志基因 AFP 表达明显下调(图7, $P < 0.05$), 肝细胞标志基因 $CK18$ 、 ALB 表达明显增强(图7, $P < 0.05$)。

2.6 Western blot检测干性标志物AFP以及肝细胞相关蛋白质ALB、CK18水平

细胞因子联合诱导HP14-19 3、7、12天后, Western blot检测结果显示, 干性标志物 AFP 水平随诱导时间延长而降低, 肝细胞相关蛋白质 ALB 、 $CK18$ 水平则升高(图8, $P < 0.05$)。

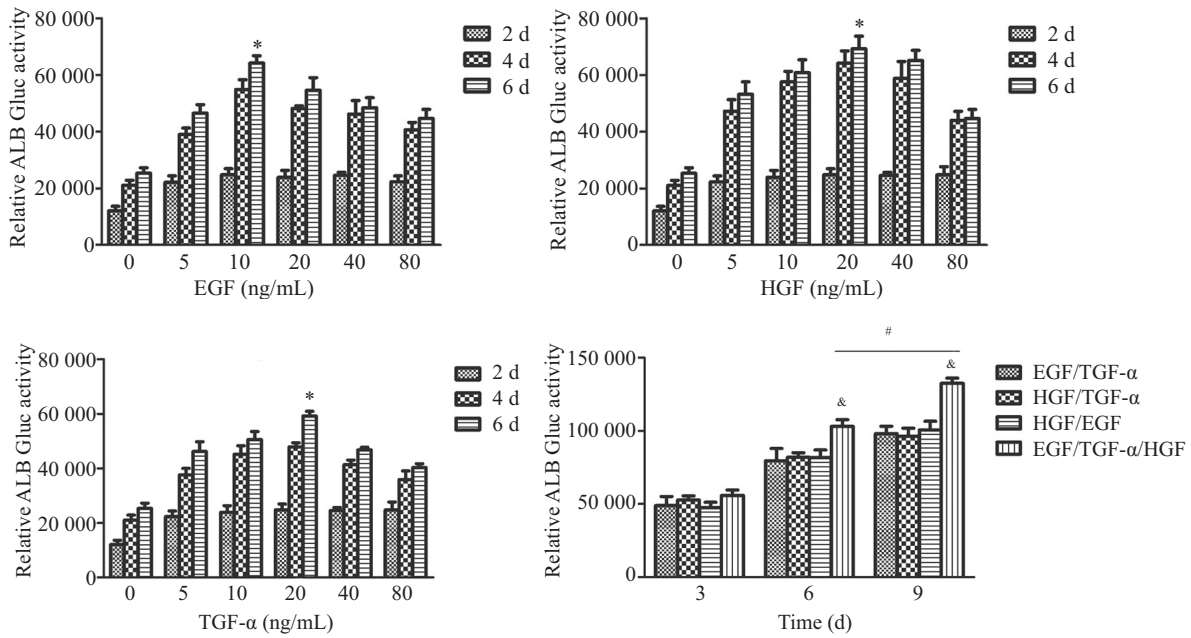
2.7 细胞因子联合诱导HP14-19细胞的成熟功能检测

ICG摄取实验以及PAS染色用于检测肝细胞的代谢解毒以及糖原合成功能^[8-9]。如图8所示, 对照组细胞胞质内几乎没有紫红颗粒即无糖原合成, 而处理组随诱导时间延长, 胞质内红色颗粒逐渐增多, 说

明糖原合成能力增强($P < 0.05$); 与PAS染色相似, 对照组几乎没有摄取吲哚菁绿而诱导组随时间延长摄取量增加($P < 0.05$), 这说明细胞代谢能力增强。

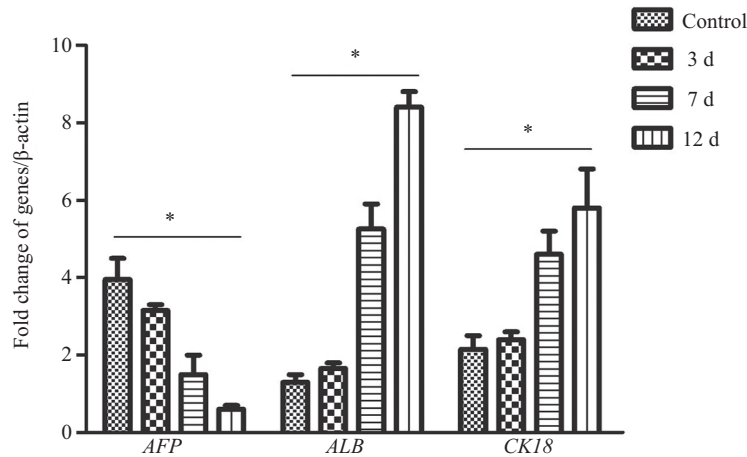
3 讨论

新生儿胆道闭锁是一种严重威胁患儿生命的先天性疾病, 对先天性胆道闭锁导致的淤胆性肝硬化, 目前肝移植仍旧是首选^[1-2]。但由于供体的短缺、花费较高、配型等待时间较长、手术难度高风险高、术后并发症及免疫排斥反应严重等因素制约其发展, 因此, 急需寻求新的治疗方式。近年来, 随着组织工程研究的蓬勃发展, 干细胞移植已成为治疗终末期疾病的一种最具有广阔应用前景的方法^[10-11]。肝脏干细胞本身来源于肝脏, 是早期肝发育中肝实质的主要成分, 具有自我更新以及成肝、成胆管双向分



* $P < 0.05$, 与对照组(0 $\mu\text{g/mL}$ 组)比较; * $P < 0.05$, 与3天组比较; # $P < 0.05$.
 * $P < 0.05$ vs control group (0 $\mu\text{g/mL}$ group); * $P < 0.05$ vs 3 d group; # $P < 0.05$.

图6 细胞因子联合诱导HP14-19细胞对ALB-GLUC活性的影响
 Fig.6 ALB-GLUC activity in HP14-19 cells induced by cytokines



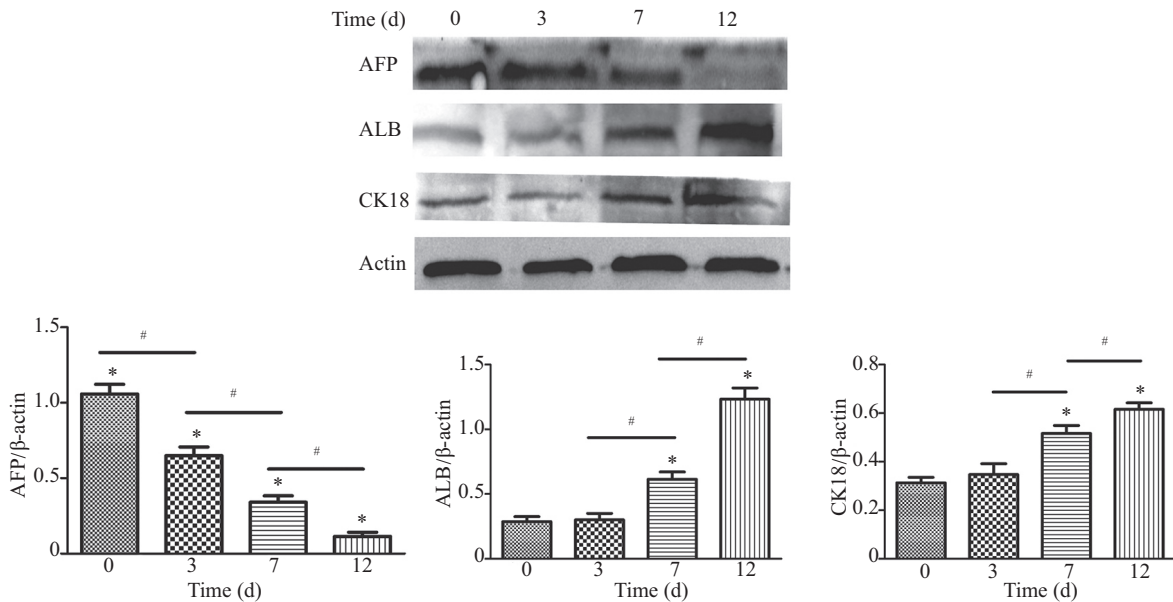
* $P < 0.05$.

图7 细胞因子联合诱导HP14-19细胞对相关标志物mRNA水平的影响
 Fig.7 The mRNA levels of associated markers in cytokines induced HP14-19 cells

化的生物学潜能, 免疫原性低, 具有潜在的临床应用价值^[12]。

干细胞微环境对干细胞本身的存活、增殖与分化极为重要。目前国内外对于干细胞肝向分化的体外研究, 均主要着眼于细胞因子诱导以及与肝脏微环境细胞之间的共培养两方面, 干细胞的诱导分化可能是多种细胞因子共同作用的结果。Perán等^[13]研究

发现, 提取心肌组织匀浆能够诱导人脂肪来源的干细胞(h-ASC)分化为心肌细胞。Xue等^[14]用同样的方法提取正常SD大鼠肝脏组织匀浆, 成功诱导人脐带间充质干细胞(h-UCMSCs)分化为肝样细胞。组织匀浆成分非常复杂, 具体是哪些有效成分诱导干细胞肝向分化目前并不清楚。因此, 本文研究了胆汁淤积性肝硬化病理微环境中具体细胞因子对肝脏干细胞



* $P < 0.05$, 与对照组(0天组)比较; # $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group (0 d group); # $P < 0.05$ 。

图8 细胞因子联合诱导HP14-19细胞对相关标志物水平的影响

Fig.8 The levels of associated markers in HP14-19 cells induced by cytokines

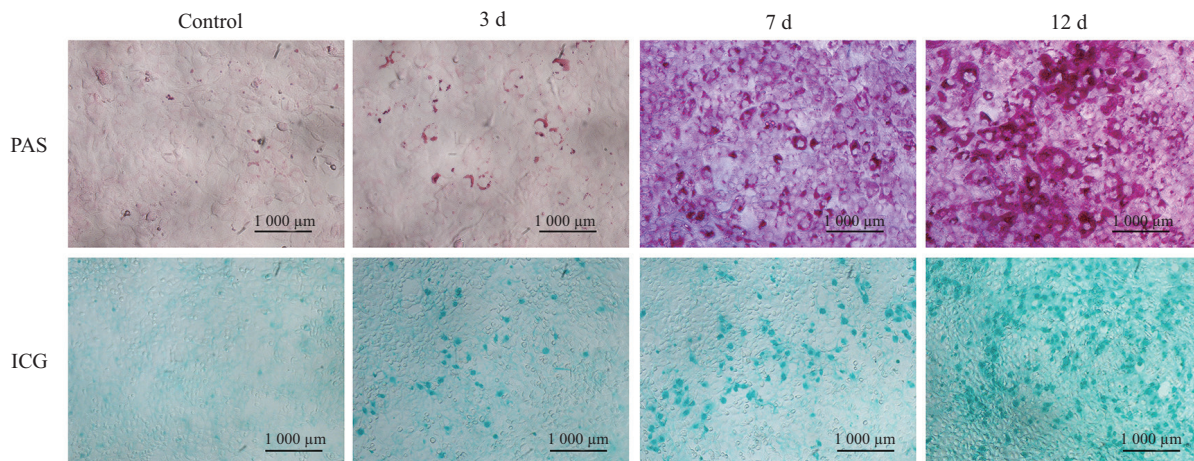


图9 细胞因子联合诱导HP14-19细胞对ICG摄取及PAS染色的影响

Fig.9 ICG uptake and PAS staining of HP14-19 cells induced by cytokines

胞分化的影响。

我们留取了胆汁淤积性肝硬化以及胆总管囊肿患儿肝脏手术标本, 免疫组织化学染色检测发现, 前者干细胞标志物OV-6以及C-kit^[15]水平明显升高; 同时, 检测了我科100例胆汁淤积性肝硬化患儿以及20例胆总管囊肿患儿的血清AFP值发现, 前者明显升高。以上结果表明, 在胆汁淤积性肝硬化微环境中存在干细胞的动员。接着, 我们以Balb/c小鼠胆总管结扎(BDL)的方式模拟胆汁淤积性肝硬化微环境^[16-17]: 血生化指标ALT、AST、TBL、DBL等与假手术组相比明显升高。Masson染色显示, 随着造模

时间延长, 蓝色区域染色增加表明组织纤维化加重。 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)是目前公认的显示纤维化的一个特异性指标, 我们通过Western blot检测发现, 同样随着时间延长, 造模组 α -SMA蛋白质的水平逐渐升高, 和胆汁淤积性肝硬化疾病进程一致, 提示造模成功。

目前, 已有多项研究表明, EGF、HGF、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)^[6-7,18]等对干细胞的分化有明显的调节作用。我们用免疫组织化学染色在造模小鼠肝组织检测到了EGF、HGF以及TGF- α 因子的表达均上调, 说明在此病理微环

境下, 这些细胞因子对动员后的肝脏干细胞分化可能会起到一定作用。因此, 我们在体外以肝脏胚胎干细胞HP14-19细胞为研究对象, 首先通过检测ALB-Gluc活性筛选EGF/HGF/TGF- α 细胞因子的最佳诱导分化组合浓度。我们发现, EGF(10 ng/mL)、HGF(20 ng/mL)、TGF- α (20 ng/mL)的组合时, ALB-Gluc活性明显比单独诱导时高且具有统计学差异。接着, 通过qRT-PCR检测了肝前体细胞相关标志基因AFP和肝细胞标志基因CK18、ALB, 结果显示, 随着诱导时间延长AFP表达下降, CK18及ALB表达增加。Western blot检测了AFP、CK18、ALB蛋白的表达, 结果同样显示, AFP下调, 而CK18及ALB上调, 说明细胞因子联合诱导HP14-19后, 能够使其肝向分化。同时, 我们通过PAS及ICG染色检测发现, 同样随着诱导时间的延长, 阳性染色细胞明显增加, 说明诱导后的细胞具有成熟肝细胞的功能。因此, 综合ALB-Gluc、qRT-PCR、Western blot、PAS和ICG染色的结果我们可以得出, EGF(10 ng/mL)、HGF(20 ng/mL)、TGF- α (20 ng/mL)联合应用时能够有效诱导肝脏干细胞的肝向分化且诱导后的细胞具有成熟肝细胞的功能。

综上所述, 采用胆总管结扎方式能够有效模拟胆汁淤积性肝硬化, 为我们的研究提供了良好的动物模型基础; 对于胆汁淤积性肝硬化病理微环境来源的保护性细胞因子对肝脏干细胞具有良好的促肝向分化作用, 能稳定维持肝细胞功能; 且EGF(10 ng/mL)、HGF(20 ng/mL)及TGF- α (20 ng/mL)组合时, 促肝向分化效率较高, 对进一步研究细胞因子联合肝脏干细胞移植治疗胆汁淤积性肝硬化具有一定的指导意义。

参考文献 (References)

- Feldman AG, Mack CL. Biliary atresia: Clinical lessons learned. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2015; 61(2): 167-75.
- Superina R. Liver transplantation for biliary atresia: does the insurance type really make a difference. *Liver Transpl* 2013; 19(5): 470-1.
- Calvi LM, Link DC. The hematopoietic stem cell niche in homeostasis and disease. *Blood* 2015; 126(22): 2443-51.
- Wan PX, Wang BW, Wang ZC. Importance of the stem cell microenvironment for ophthalmological cell-based therapy. *World J Stem Cells* 2015; 7(2): 448-60.
- Lee KD, Kuo TK, Whang PJ. *In vitro* hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004; 40(6): 1275-84.
- 熊剑勇, 陈斌, 倪勇. 体外诱导人骨髓间充质干细胞向肝样细胞分化: 肝细胞生长因子和表皮细胞生长因子的作用. *中国组织工程研究与临床康复*(Xiong Jianyong, Chen Bin, Ni Yong. *In vitro* differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells: Effect of hepatocyte growth factor and epidermal growth factor. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*) 2010; 14(14): 2503-7.
- 王忠琼, 李昌平, 杜光红, 钟晓琳, 陈霞. 多种细胞因子诱导骨髓间充质干细胞向肝细胞的分化. *中国组织工程研究与临床康复*(Wang Zhongqiong, Li Changping, Du Guanghong, Zhong Xiaolin, Chen Xia. Several kinds of cytokines induce differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocytes) 2008; 12(21): 4035-8.
- Yamada T, Yoshikawa M, Kanda S, Kato Y, Nakajima Y, Ishizaka 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): 146-54.
- Kamo N, Yasuchika K, Fujii H, Hoppo T, Machimoto T, Ishii T, *et al.* Two populations of Thy1-positive mesenchymal cells regulate *in vitro* maturation of hepatic progenitor cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292(2): G526-34.
- Kamo N, Yasuchika K, Fujii H, Hoppo T, Machimoto T, Ishii T, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One* 2007; 2(9): e941.
- Kakinuma S, Nakauchi H, Watanabe M. Hepatic stem/progenitor cells and stem-cell transplantation for the treatment of liver disease. *J Gastroenterol* 2009; 44(3): 167-72.
- Zhang W, Li W, Liu B, Wang P, Li W, Zhang H. Efficient generation of functional hepatocyte-like cells from human fetal hepatic progenitor cells *in vitro*. *J Cell Physiol* 2012; 227(5): 2051-8.
- Perán M, Marchal JA, López E, Jiménez-Navarro M, Boulaiz H, Rodríguez-Serrano F, *et al.* Human cardiac tissue induces transdifferentiation of adult stem cells towards cardiomyocytes. *Cytotherapy* 2010; 12(3): 332-7.
- Xue G, Han X, Ma X, Wu H, Qin Y, Liu J, Hu Y, *et al.* Effect of microenvironment on differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into hepatocytes *in vitro* and *in vivo*. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 8916534.
- Weiss TS, Lichtenauer M, Kirchner S, Stock P, Aurich H, Christ B, *et al.* Hepatic progenitor cells from adult human livers for cell transplantation. *Gut* 2008; 57(8): 1129-38.
- Prado IB, dos SMH, Lopasso FP, Iriya K, Laudanna AA. Cholestasis in a murine experimental model: lesions include hepatocyte ischemic necrosis. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 2003; 58(1): 27-32.
- Tag CG, Sauer-Lehnen S, Weiskirchen S, Borkham-Kamphorst EI, Tolba RH, Tacke F, *et al.* Bile duct ligation in mice: induction of inflammatory liver injury and fibrosis by obstructive cholestasis. *J Vis Exp* 2015; (96).
- Bi Y, He Y, Huang JY, Xu L, Tang N, He TC, *et al.* Induced maturation of hepatic progenitor cells *in vitro*. *Braz J Med Biol Res* 2013; 46(7): 559-66.