

# 胚胎干细胞向肝细胞诱导分化

崔一方 刘爱莲\*

(上海第二医科大学, 新华医院, 发育生物学研究中心, 上海 200092)

**摘要** 胚胎干细胞具有分化成三胚层细胞的潜能。它已被视为治疗多种疾病的一种新兴策略。在现阶段, 通过不同的诱导途径可将胚胎干细胞诱导成为肝细胞: 体外诱导、体内诱导以及体外和体内相结合诱导分化。然而从体内实验结果来看, 其嵌合率及分化率不高, 这是一个亟需解决的问题, 否则就无法成功地将其应用于临床治疗。

**关键词** 胚胎干细胞; 肝细胞; 诱导分化

肝脏是人体中一个十分重要的器官, 它不仅是最大的消化腺, 而且还是进行物质代谢的重要器官。此外, 它还能清除从胃肠道进入机体的微生物等有害物质。它的损伤往往会带来严重的后果。然而面对某些肝脏疾病, 如肝硬化, 肝癌等, 目前还没有理想的治疗方法。科学家们正在寻求一种新的方法以替代传统的治疗手段。近年来的研究发现, 利用细胞移植治疗肝脏疾病是一种可行的方法, 主要有如下几种细胞来源: 成体肝细胞<sup>[1-4]</sup>、骨髓来源的造血干细胞<sup>[5-8]</sup>以及胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES 细胞), 都取得了可喜的进展。本文仅就胚胎干细胞作为肝细胞移植的来源做一综述。

胚胎干细胞是由囊胚内细胞团(inner cell mass, ICM)起源的全能(pluripotent)干细胞<sup>[9,10]</sup>。这种细胞与众不同的特征在于具有分化成机体三胚层的潜能<sup>[11,12]</sup>。胚胎干细胞作为个体发育之初的原始干细胞, 理论上, 它可以无限地分化为特异性细胞类型。由于它的这种特征, 胚胎干细胞有可能成为细胞替代疗法和组织器官移植的最佳来源。迄今为止, 已经成功地将胚胎干细胞诱导分化成为造血细胞<sup>[13,14]</sup>、心肌细胞<sup>[15]</sup>、平滑肌细胞<sup>[16-18]</sup>、神经元<sup>[19-21]</sup>、神经胶质细胞<sup>[22]</sup>、胰岛细胞<sup>[23]</sup>等多种细胞类型。胚胎干细胞同样也具有分化成为肝细胞的能力, 这就为治疗肝脏疾病提供了一条新的途径。

现在, 在诱导胚胎干细胞分化成为肝细胞的探索过程中已经取得了重大进展。多项实验证明了小鼠的胚胎干细胞确实能够分化成为肝细胞。其诱导途径主要有 3 种: 体外诱导、体内诱导以及体外和

体内相结合诱导分化。

## 1 体外诱导

胚胎干细胞在培养过程中, 当去除白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF), 以细胞悬液的方式生长时, 它们会聚集成为球状的细胞团, 被称之为类胚体(embryoid bodies, EBs)。人们发现类胚体细胞的发育分化过程与正常胚胎的发育状况惊人的相似<sup>[11,12]</sup>。因此, 这被视为一个成功的在体外模拟胚胎发育的模型, 可以此为基础, 深入地研究胚胎干细胞向各种不同类型细胞发育分化及其过程的可能性。胚胎干细胞向肝细胞分化的研究也是建立在这个基础上的。

早在 1996 年, Abe 等<sup>[24]</sup>就在培养胚胎干细胞的过程中发现, 当胚胎干细胞聚集形成类胚体后, 有向内胚层方向分化的趋势。他们运用 RT-PCR、Northern 印迹和原位杂交等方法检测后发现一些胚胎肝细胞特征性表达的标志: 甲胎蛋白( $\alpha$ -fetoprotein, AFP)、白蛋白(albumin, ALB)、甲状腺素运载蛋白(transthyretin, TTR)、肝细胞核因子 1(hepatocyte nuclear factor, HNF1)、HNF3 $\beta$ 、HNF4 等均为阳性反应。这是研究胚胎干细胞能否向肝细胞分化的一个重要发现。然而, 当初 Abe 等只是为了验证类胚体中的细胞能否向内胚层方向分化, 并没有进一步地检测和研究的细胞能否特异性地发育分化成为

收稿日期: 2004-02-04 接受日期: 2004-03-29

国家重点基础研究发展规划项目(973 计划)(No. 2001CB509904)

\* 通讯作者。 Tel: 021-65032508, Fax: 021-55570017, E-mail: al\_liu@yahoo.com

肝细胞。直到近几年,这方面的研究才取得了长足的进步。

2001年,Hamazaki等<sup>[25]</sup>发表了体外诱导胚胎干细胞分化成为肝细胞的报道。他们在类胚体形成后的第3天将其转入铺有明胶的培养皿中继续培养5天,然后分别于类胚体形成后的9~12天、12~18天以及15~18天加入酸性成纤维生长因子(acidic fibroblast growth factors, aFGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、制瘤素M(oncostatin M, OSM)、地塞米松(dexamethasone, Dex)、ITS [胰岛素(insulin)、转铁蛋白(transferring, TFN)、亚硒酸盐(selenium acid)] 细胞因子,其目的在于模拟胚肝发育过程中的微环境以诱导胚胎干细胞向肝细胞分化。通过RT-PCR检验,在类胚体形成后的第18天,不仅TTR、AFP、ALB、 $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶( $\alpha$ -1-antitrypsin, AAT)等这些在胚肝发育过程中特征性表达的标志为阳性,而且连只有在成体肝中才有表达的葡萄糖6磷酸酶(glucose-6-phosphatase, G-6-P)、酪氨酸转氨酶(tyrosine aminotransferase, TAT)也呈现阳性反应,未分化的胚胎干细胞则为阴性。Miyashita等<sup>[26]</sup>也做了类似的实验,他们在类胚体形成后并没有加入这些细胞因子,只是让它们在铺有明胶的培养皿中生长,21天后得到了相同的结果。Kuai等<sup>[27]</sup>在形成类胚体后,通过分别加入维甲酸(retinoic acid, RA)、HGF、神经生长因子( $\beta$ -nerve growth factor,  $\beta$ -NGF)以及HGF和 $\beta$ -NGF来观察不同因子对分化的作用。结果发现加入RA诱导的细胞并没能向肝细胞方向分化(没有表达一系列的肝细胞特异性标志),而无论HGF或 $\beta$ -NGF单独作用还是HGF和 $\beta$ -NGF共同作用都能诱导胚胎干细胞向肝细胞方向分化。胡安斌等<sup>[28]</sup>则在形成类胚体后的7~11天加入aFGF,11~15天加入HGF进行培养,作为对照组的类胚体不加入这些生长因子,使其自然分化。结果在实验组中,第8天就检出AFP,第10天检出细胞骨架蛋白:细胞角蛋白8(cytokeratin 8,CK8)、细胞角蛋白18(CK18),第11天表达ALB,而且随着培养时间的增加其表达逐渐增强。从细胞形态来看,这些阳性细胞与正常肝细胞也十分相似。对照组虽然在第8天开始表达AFP,但是浓度要比实验组低,CK8、CK18、ALB在第12天才少量表达。这些结果提示,体外能够诱导胚胎干细胞向肝细胞方向分化,而且加入一些细胞因子后,效果似乎更为显著。然

而,在这些实验中所选取的标志虽然是胚肝在发育过程中表达的,但并不是唯一的。例如AFP、ALB等,在其他由内胚层分化形成的脏器中亦有所表达<sup>[29]</sup>。因此,为了验证胚胎干细胞能否向肝细胞分化,还需选择一些特异性的标志。

Jones等<sup>[30]</sup>选用了一株转基因的胚胎干细胞来进行实验。这株胚胎干细胞携带有I.114基因,这种基因能够在胚肝细胞早期发育分化过程中特异性地表达 $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -gal)。他们运用RT-PCR的方法检测到在类胚体形成后的第9天,已经有细胞开始表达 $\beta$ -gal了。而与此同时,同样由携带有I.114基因的胚胎干细胞分化形成的胚外内胚层细胞中却检测不到 $\beta$ -gal的表达。为了进一步验证这一发现的可靠性,Jones等用免疫荧光双重染色技术进行检测,所用的抗体有抗 $\beta$ -gal、AFP、ALB、TFN抗体。结果发现绝大多数细胞在表达 $\beta$ -gal的同时也表达AFP、ALB、TFN这些胚肝发育分化过程中的标志。他们还观察了这些 $\beta$ -gal<sup>+</sup>细胞的超微结构。同正常的胚肝细胞相比,其超微结构十分相似。这些都表明了胚胎干细胞确实能够向肝细胞分化。另外,他们还发现,当形成类胚体后,继续以悬浮状态培养和转到铺有明胶的培养皿中培养,两者的效果是不同的。利用后一种方法培养的一类胚体中表达 $\beta$ -gal的细胞数目明显高于前者。这一现象与Ben-Ze'ev等人<sup>[31]</sup>的结果相吻合。提示基底膜中的组分对于肝细胞的分化是有一定影响的。

Yamada等<sup>[32]</sup>则运用了另一种方法验证胚胎干细胞分化成为肝细胞的可能性。他们利用肝细胞能够特异性地吸收吲哚花青绿(indocyanine green, ICG),而其他类型的细胞不能这一特点来进行实验。在形成类胚体后的第14天,出现了ICG<sup>+</sup>的细胞;而作为对照的未分化的胚胎干细胞中则没有ICG<sup>+</sup>细胞的出现。将这些ICG<sup>+</sup>细胞分离出来后,Yamada等同样采取了免疫细胞化学、RT-PCR以及观察其超微结构的方法来检测,结果发现这些细胞与肝细胞相比十分相似,仅仅在一些指标上略低于肝细胞。

Chinzei等<sup>[33]</sup>还检测了这些诱导形成的肝细胞功能。众所周知,肝细胞具有合成尿素和产生白蛋白的能力,而这些诱导形成的肝细胞是否具有这些功能呢?Chinzei检测后发现在类胚体形成后的9天之内并没有检测到尿素,而从第12天起就开始有尿素合成了,至第18天达到顶峰;而作为对照的未分化的胚胎干细胞则没有任何尿素产生的迹象。类胚

体形成后的 9 天内, 没有任何胚肝发育的标志产生。从第 9 天起, AFP 开始表达。到了第 12 天, 可见 ALB mRNA 表达。从第 15 天起, ALB 蛋白开始表达, 并随着培养时间的延长而不断增多。

Fair 等<sup>[34]</sup>通过共同培养的方式来诱导胚胎干细胞分化。他们把胚胎干细胞和鸡胚生心区的中胚层共同培养。4 天后胚胎干细胞在形态上发生了很大变化。不仅体积增大, 而且细胞器也增多, 还出现了多倍体细胞。这都与肝细胞的前体细胞非常相似。RT-PCR 的结果也表明这些共培养的胚胎干细胞确实在向肝细胞方向分化: HNF3 $\beta$ 、Sox17 $\alpha$ 、AFP 等肝细胞特异性标志都由阴性转为阳性或由低表达转为高表达。

Kanda 等<sup>[35]</sup>则是通过将 HNF3 $\beta$  转入普通的胚胎干细胞(称为 HTC 细胞)来研究其是否能向肝细胞方向分化。经过 5 天的悬浮培养形成类胚体后, 转入铺有明胶的培养皿中继续培养, 并且加入成纤维生长因子 2(FGF2)。作为对照的普通胚胎干细胞也采取同样的培养方式。经过 2 天的进一步培养, 几乎所有的 HTC 分化细胞能够表达 ALB, 而此时只有少数胚胎干细胞表达 ALB。通过 RT-PCR 检测, 在培养 7 天后(从悬浮培养开始), HTC 分化细胞就开始表达 TTR、AFP 以及 ALB, 胚胎干细胞分化细胞则只有痕量表达。14 天后, 可检出 HTC 分化细胞表达 AAT, 对磷酸烯醇式丙酮激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)以及色氨酸 2, 3-双氧酶(tryptophan-2, 3-dioxygenase, TDO) 这些成熟肝细胞表达的标志, 胚胎干细胞的分化细胞仅低水平表达 ALB 和 AAT。形态学检测发现在培养了 33 天后, HTC 分化细胞呈现肝细胞样形态, 而胚胎干细胞的分化细胞则表现出多种不同的形态。实验结果提示可以通过事先转入某些胚肝发育所必需的基因来促进胚胎干细胞向肝细胞分化。Ishizaka 等<sup>[36]</sup>的实验结果也证实了这一点。

以上这些实验表明, 通过体外诱导, 胚胎干细胞确实能够向肝细胞方向分化, 表达肝细胞的一些特征性标记。然而要最终实现利用胚胎干细胞的衍生细胞来进行细胞移植, 以达到治疗肝脏疾病的目的, 这些还是远远不够的。还需要进行体内的实验来验证这种操作的可能性。

## 2 体内诱导

Choi 等<sup>[37]</sup>将未分化的胚胎干细胞注入雌性裸鼠

的脾内, 3 周以后, 脾内注射部位出现了畸胎瘤。通过形态学观察, 这些畸胎瘤多数是由肝细胞样的细胞所组成。他们进一步通过 RT-PCR 和免疫组化的方法来检测这些细胞是否为肝细胞。分别以 HEP-PAR 抗体(成熟肝细胞特异性抗体)和抗 AFP 抗体进行检验。结果在这些畸胎瘤中既有 HEP-PAR<sup>+</sup> 的细胞, 也有 AFP<sup>+</sup> 的细胞。提示在体内诱导过程中, 胚胎干细胞的分化并不是完全一致的, 有些分化的较快, 而有些则比较慢。他们还观察到, HEP-PAR<sup>+</sup> 细胞能够表达苯丙氨酸羟化酶(phenylalanine hydroxylase, PAH)——肝细胞特异性表达酶, 并且在一些细胞中还发现有糖原的储存, 提示这些细胞是有功能的肝细胞。所有这些都表明胚胎干细胞能够在体内环境的诱导下向肝细胞分化。

Yamamoto 等<sup>[38]</sup>把增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)通过转染的方式转入胚胎干细胞中, 并且通过 ALB 的启动子来启动其表达。这株细胞被命名为 pALB-EGFP/ES。pALB-EGFP/ES 在去除 LIF 的培养液中培养了 24 h 后, 通过尾静脉注入四氯化碳处理过的 129SVJ 小鼠体内。这些细胞在体内分化, 最终在肝脏中形成了畸胎瘤。取出这批小鼠的肝脏, 通过荧光显微镜可以观察到畸胎瘤中有 14%~28% 绿色荧光蛋白阳性的细胞存在, 而其他部位则没有。用免疫组化的方法检测这些 GFP<sup>+</sup> 细胞, 发现成熟肝细胞的标志 ALB、AAT、TFN 等都有表达, 而未成熟肝细胞的标志 AFP 在一些细胞中也有较弱的表达。这说明了在体内诱导过程中胚胎干细胞确实能够向肝细胞方向分化, 但并不是同步的, 而是处于不同的阶段。光镜和电镜形态学检查也证实了这一点。

至此, 我们可以看到, 不论是在体外诱导, 还是在体内诱导, 胚胎干细胞都能向肝细胞方向分化。如果将两者结合起来, 效果是不是会更好呢?

## 3 体外和体内结合诱导分化

Chinzei 等<sup>[33]</sup>按照经典的方法将胚胎干细胞诱导形成类胚体, 然后把雌性的 C57BL/6 小鼠部分肝切除, 通过脾脏分别注入未分化的胚胎干细胞和不同时期(2, 4, 6, 9 天)的类胚体制成的单细胞悬液。4 周以后观察到注入未分化胚胎干细胞的小鼠形成畸胎瘤的比例最高, 随着类胚体形成时间的延长, 畸胎瘤形成的比例逐渐减低, 直至类胚体形成后的第 9 天, 畸胎瘤就不再出现了。这同他们 RT-PCR 的

结果相同。类胚体形成后的第9天开始表达AFP,说明胚胎干细胞开始向肝细胞分化。于是他们选择第9天的类胚体,将其制成单细胞悬液通过门静脉注入部分肝切除的雌性C57BL/6小鼠的肝内。4周后用FISH检测这些肝脏,在部分细胞核内可以检测出Y染色体,表明这些细胞就是注入的诱导的胚胎干细胞。进一步检测发现在这些细胞的胞浆内有ALB表达,而体外检测时,第9天的类胚体并没有表达ALB。通过这些检测,不难得出这样一个结论:体外诱导的胚胎干细胞注入体内后能够进一步朝着体外诱导的方向分化,而且比直接注入未分化的胚胎干细胞的效果更好(没有畸胎瘤的形成)。

然而,这些诱导后的胚胎干细胞是否具有肝细胞的功能呢?Yamamoto等<sup>[38]</sup>就做了这方面的检测。他们把通过体内诱导形成的畸胎瘤取下,分离出其中的GFP<sup>+</sup>细胞,在体外用肝细胞培养液培养,同时加入了许多肝细胞生长因子,诸如转铁蛋白、抗坏血酸、烟酰胺等,用以进一步诱导。在体外培养过程中,这些细胞始终保持着典型的肝细胞形态,双核细胞随处可见。在培养21天后,免疫组化结果表明ALB、AAT、转铁蛋白等标志在这些GFP<sup>+</sup>细胞中仍有表达,RT-PCR也证实了这一点。在功能性检测中发现这些细胞具有合成葡萄糖以及清除培养液中氨的能力。把这些经过体外诱导的GFP<sup>+</sup>细胞注入经过四氯化碳处理过的小鼠脾脏内,它们能够迅速分布到肝脏门静脉周围,从形态上很难将它们与正常肝细胞区分开。而且在注入细胞后的3个月内并没有观察到任何畸胎瘤或肝脏肿瘤的产生。当肝脏用四氯化碳处理过6h后注入这些胚胎干细胞来源的细胞,第2天就可以发现凝血酶原时间、血清总胆红素、血氨浓度都有恢复的迹象。

由于类胚体能够向三胚层分化,而肝脏是由内胚层分化而来的,Yin等<sup>[39]</sup>把那些表达AFP的类胚体细胞分离出来,单独诱导,然后制成单细胞悬液,通过脾脏注入B6.129S7-Gtosa26小鼠体内(一种转基因小鼠,能够特异性地在全身各个组织内表达Lac-Z)。3周后,没有畸胎瘤形成,通过X-gal染色,在肝脏中观察到了一些Lac-Z<sup>-</sup>细胞。它们的形态同正常肝细胞一样,排列成索状,并且能够表达ALB,说明这些细胞在体内确实能够向成熟肝细胞分化。在确定了这一点后,他们将这些AFP<sup>+</sup>的胚胎干细胞注入部分肝切除的载脂蛋白-E(Apo-E)缺陷性小鼠和触珠蛋白(haptoglobin)缺陷性小鼠的体

内,3周后发现,虽然表达的量很少,但是Apo-E缺陷性的小鼠确实能够表达Apo-E了,而相同的情况也出现在了触珠蛋白缺陷性小鼠的身上,能够表达少量的触珠蛋白了。通过上述功能性的实验,进一步说明了通过体外和体内相结合诱导,胚胎干细胞能够分化成为功能性肝细胞。

#### 4 肝细胞的分化与调节

肝细胞在发育分化过程中,受到许多因子的调控。上文中已经提到制瘤素、HGF、 $\beta$ -NGF、aFGF、FGF2等对ES细胞向肝细胞分化的诱导作用<sup>[25,27,28,35]</sup>。另外,通过研究发现,心脏中胚层产生的FGFs对胎肝发育起着一定的诱导作用。横膈间充质通过表达骨形成蛋白(bone morphogenic proteins, BMPs)也参与了肝的诱导过程。HGF、cMET、c-Jun、SEK1(MKK4)以及gp130在肝脏的发育分化过程中也发挥了一定的作用<sup>[40]</sup>。人们还发现很多转录因子可以通过与肝脏特异性基因的转录调控成分相结合,从而起到调节肝细胞分化的作用<sup>[40,41]</sup>。这些因子包括:HNF1 $\alpha$ ,  $\beta$ ; c/EBP家族; HNF3 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ (FoxA家族); HNF4 $\alpha$ ,  $\beta$ ; 以及近年来报道的HNF6。在HNF4 $\alpha$ 之前,人们通常认为这些转录因子的单一缺失或异常并不会影响到肝细胞的正常分化,只会在少数肝细胞特异性基因的表达上有所反映。然而,有些基因的异常表达确实会导致严重的肝功能紊乱。例如, c/EBP $\alpha$ 的作用在于调控那些参与肝糖元合成,糖异生以及脂质平衡的基因表达。虽然c/EBP $\alpha$ <sup>-/-</sup>的胎肝发育正常,但是新生儿却容易死于低血糖症,而且新生儿的肝细胞有明显的增生,这些都与c/EBP $\alpha$ 的缺失有关。3种FoxA同源因子(HNF3 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ )对于胚肝的发育分化以及肝脏的功能也起到了调节作用。例如, FoxA3<sup>-/-</sup>的肝脏表达TAT和TFN的量减少了50%左右。然而,总体来说,这些转录因子的突变并不会影响到肝细胞的分化,这是因为转录因子是协同作用于肝脏特异性基因,从而达到调节基因表达的目的。这些基因的启动子通常是与多个转录因子相结合的,单一的或少数转录因子的异常可以通过其他因子的作用来弥补。但是HNF4 $\alpha$ 却是个特例,它对于一系列肝脏特异性基因的表达都起到了非常重要的作用。

Watt等<sup>[42]</sup>发现HNF4 $\alpha$ 对于肝细胞的分化以及功能来说是一个十分重要的调控因子。HNF4 $\alpha$ 可以通过与HNF1 $\alpha$ 的转录调控组分相结合起到正向调节

作用。HNF4 $\alpha$ 也可以与Pxr (Pregnane X receptor)的启动子相结合,从而调节Pxr的表达。这就意味着HNF4 $\alpha$ 可以通过激活一系列的转录因子来调节肝细胞的正常分化。另外Li等<sup>[43]</sup>则通过比较正常胚胎肝细胞以及从HNF4 $\alpha^{-/-}$ ES产生的肝细胞,发现有14个在肝细胞中起着重要作用的基因在后者中无法检测到或者低表达。同样的情况也发生在缺乏HNF4 $\alpha$ 的成年肝细胞中。Parviz等<sup>[44]</sup>通过电镜观察正常肝细胞以及HNF4 $\alpha$ 变异的肝细胞,发现HNF4 $\alpha$ 对肝细胞的形态和功能分化是非常重要的,是一个支配调节器(dominant regulator),因为它不仅能诱导间质细胞向上皮细胞的转化,而且对正常肝脏结构和血窦内皮结构的形成和分化等都起到了重要的作用。HNF4 $\alpha$ 是通过激活细胞黏附分子和细胞连接分子的表达来起作用的。这些都表明了HNF4 $\alpha$ 对于肝细胞的分化起着至关重要的作用。

综合已知文献可以得出下列简单的结论:肝细胞发育分化需要多种因子参与,而多数情况下是两种或两种以上因子相互平衡和协调控制的结果。但这是很复杂的过程,目前对这一过程的了解还不够深入,要明确这一过程的分子机制还需要进行大量的研究工作。

## 5 小结与展望

综上所述,胚胎干细胞确实能够向肝细胞分化。然而要达到利用它来治疗肝脏疾病的目的,现阶段的探索还是不够的,仍然面临着许多的问题:如ES的分离和应用一直存在着伦理学上的争论;ES细胞永恒生长的潜能使其远期的致癌风险不容忽视;ES细胞定向诱导分化为肝细胞的精确调控机制仍不清楚;如何获得高数量和高纯度的肝分化细胞;影响干细胞嵌合率和分化率的因素等。另外,以往的实验研究都是利用小鼠的ES细胞,人的ES细胞是否同样能够取得令人满意的效果,还不得而知。如果这些问题不得到解决的话,通过ES细胞来治疗肝脏疾病只能是一个梦想。

因为ES细胞处于高度未分化状态,容易形成畸胎瘤,不能直接移植给患者。因此,在细胞进行体内移植前,必须进行体外分化,诱导ES细胞定向分化成移植所需的细胞。而如何控制ES细胞定向分化是ES细胞应用于临床医学的关键因素。首先必须进行基础研究,弄清胚胎干细胞分化的调控机制,使其定向分化为形态结构和功能上完全成

熟的肝细胞。移植细胞的嵌合率和分化率是干细胞移植普遍面临的问题。只有移植细胞在受体内定居存活并有效扩增及分化才能在临床上获得长期稳定的疗效。这需从理论和技术上对细胞移植、扩增和分化等进行更深入的研究探索。从上述所提及的实验中可以看到,细胞因子对于分化来说起着至关重要的作用。在体外诱导过程中添加不同的与肝细胞发育分化过程相关的细胞因子来优化诱导条件,以促进ES细胞进一步向肝细胞方向分化。除体外实验外,还需对细胞移植进行体内研究。研究移植细胞在宿主肝脏微环境内定居存活、增殖分化能力、成熟和功能整合情况及影响因素。另外在注入细胞后,可以给予动物模型一些免疫抑制剂,以防止注入的细胞被机体的自身免疫系统所排斥。总之,体外定向诱导分化涉及到干细胞体外扩增和诱导分化的最佳因子组合、最适培养系统及条件的确定等问题。而体内嵌合率和分化率等问题取决于基因表达调控方面的不同诱导因子、靶细胞/组织状态和局部微环境等多种因素的影响。虽然还有很多未知领域,但是有理由相信,随着科学技术的高速发展,必将对认识肝脏的功能和治疗与肝脏相关的疾病提供新的思路。

感谢褚建新和杨庆章教授对本文的评阅。

## 参考文献 (References)

- [1] Chowdhury JR *et al. Pediatrics*, 1998, **102**: 647
- [2] Fox IJ *et al. N Engl J Med*, 1998, **338**: 1422
- [3] Strom SC *et al. Semin Liver Dis*, 1999, **19**: 39
- [4] Kobayashi N *et al. Science*, 2000, **287**: 1258
- [5] Petersen BE *et al. Science*, 1999, **284**: 1168
- [6] Lagasse E *et al. Nat Med*, 2000, **6**: 1229
- [7] Theise ND *et al. Hepatology*, 2000, **32**: 11
- [8] Alison MR *et al. Nature*, 2000, **406**: 257
- [9] Evans MJ *et al. Nature*, 1981, **292**: 154
- [10] Martin GR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**: 7634
- [11] Robertson EJ. Embryo-derived stem cell lines In: Robertson EJ ed. *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, Washington, DC: IRL Press, 1987, 71
- [12] Keller GM. *Curr Opin Cell Biol*, 1995, **7**: 862
- [13] Potocnik AJ *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **84**: 10295
- [14] Ling V *et al. J Cell Physiol*, 1997, **171**: 104
- [15] Klug MG *et al. J Clin Invest*, 1996, **98**: 216
- [16] Ng WA *et al. Pediatr Res*, 1997, **41**: 285
- [17] Drab M *et al. FASEB J*, 1997, **11**: 905
- [18] Yamada T *et al. Stem Cells*, 2002, **20**: 41
- [19] Bain G *et al. Dev Biol*, 1995, **168**: 342
- [20] McDonald JW *et al. Nat Med*, 1999, **5**: 1410
- [21] Lee SH *et al. Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 675
- [22] Brustle O *et al. Science*, 1999, **285**: 754

- [23] Lumelsky N *et al. Science*, 2001, **292**: 1389  
[24] Abe K *et al. Exp Cell Res*, 1996, **229**: 27  
[25] Hamazaki T *et al. FEBS Lett*, 2001, **497**: 15  
[26] Miyashita H *et al. Cell Transplant*, 2002, **11**: 429  
[27] Kuai XL *et al. Liver Transpl*, 2003, **9**: 1094  
[28] 胡安斌等. *中华医学杂志*, 2003, **83**: 1592  
[29] Meehan RR *et al. EMBO J*, 1984, **3**: 1881  
[30] Jones EA *et al. Exp Cell Res*, 2002, **272**: 15  
[31] Ben-Ze'ev A *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**: 2161  
[32] Yamada T *et al. Stem Cells*, 2002, **20**: 146  
[33] Chinzei R *et al. Hepatology*, 2002, **36**: 22  
[34] Fair JH *et al. Surgery*, 2003, **134**: 189  
[35] Kanda S *et al. Hepatol Res*, 2003, **26**: 225  
[36] Ishizaka S *et al. FASEB J*, 2002, **16**: 1444  
[37] Choi D *et al. Cell Transplant*, 2002, **11**: 359  
[38] Yamamoto H *et al. Hepatology*, 2003, **37**: 983  
[39] Yin Y *et al. Stem Cells*, 2002, **20**: 338  
[40] Duncan SA. *Mech Dev*, 2003, **120**: 19  
[41] Costa RH *et al. Hepatology*, 2003, **38**: 1331  
[42] Watt AJ *et al. Hepatology*, 2003, **37**: 1249  
[43] Li J *et al. Genes Dev*, 2000, **14**: 464  
[44] Parviz F *et al. Nat Genet*, 2003, **34**: 292

## Differentiation of Embryonic Stem Cells into Hepatocytes

Yi-Fang Cui, Ai-Lian Liu\*

(Center for Developmental Biology, Xinhua Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200092, China)

**Abstract** Embryonic stem (ES) cells are pluripotent cells with the potential to give rise to all three primary germ layers of the embryo. ES cells have been regarded as a new cell source for cell replacement therapy. Recently, differentiation of hepatocytes from ES cells has been reported using either *in vitro*, *in vivo* differentiation protocols, or protocols combining both approaches. Although hepatocytes derived from ES cells promise a potential for treating liver or liver-related diseases, further studies are needed to improve *in vivo* integration of these cells.

**Key words** embryonic stem (ES) cell; hepatocyte; differentiation

Received: February 4, 2004 Accepted: March 29, 2004

This work was supported by the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No. 2001CB509904)

\*Corresponding author. Tel: 86-21-65032508, Fax: 86-21-55570017, E-mail: al\_liu@yahoo.com