

## 研究论文

# 全反式维甲酸促进骨形态发生蛋白9诱导肝祖细胞成熟分化的作用研究

龚梦嘉<sup>1</sup> 惠 慧<sup>1</sup> 崔洁洁<sup>1</sup> 毕 杨<sup>1</sup> 何 昀<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>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; <sup>2</sup>重庆医科大学附属儿童医院胃肠新生儿外科, 重庆 400014)

**摘要** 该文研究了全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)促进骨形态发生蛋白9(bone morphogenetic protein 9, BMP9)诱导肝祖细胞14-19(hepatic progenitor cell 14-19, HP14-19)成熟分化的作用。重组腺病毒Ad-BMP9和ATRA单独及联合作用诱导肝祖细胞HP14-19成熟分化, 荧光素酶报告基因检测ALB-Gluc表达情况, Real-time PCR检测肝脏相关基因DLK、AFP、ALB和TAT的mRNA水平, Western blot及免疫荧光检测AFP、ALB、CK18和UGT1A蛋白质水平, PAS染色和ICG摄取实验检测成熟分化后的功能。Ad-BMP9组和ATRA组的ALB-Gluc活性较对照组增高, 而Ad-BMP9+ATRA组ALB-Gluc活性又显著高于Ad-BMP9组和ATRA组。Ad-BMP9+ATRA组的ALB和TAT mRNA水平以及ALB、CK18和UGT1A蛋白质水平均高于Ad-BMP9组和ATRA组, 但肝干细胞标志DLK、AFP的表达均降低( $P < 0.05$ )。Ad-BMP9+ATRA组的ICG摄取及PAS染色阳性细胞数显著高于Ad-BMP9组和ATRA组。ATRA和Ad-BMP9均诱导肝祖细胞HP14-19成熟分化, 联合作用强于单独作用。

**关键词** 全反式维甲酸; 骨形态发生蛋白9; 肝祖细胞; 分化

## The Effect of All-Trans Retinoic Acid on BMP9 Induced Mature Differentiation of Hepatic Progenitor Cells

Gong Mengjia<sup>1</sup>, Hui Hui<sup>1</sup>, Cui Jiejie<sup>1</sup>, Bi Yang<sup>1</sup>, He Yun<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>Stem Cell Biology and Therapy Laboratory of the 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; <sup>2</sup>Department of Gastroenterology Pediatric Surgery of the Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

**Abstract** This study was to investigate the effect of ATRA on Ad-BMP9 induced mature differentiation of hepatic progenitor cells (HP14-19). Ad-BMP9 and ATRA induced the differentiation of HP14-19, individually or jointly. Luciferase reporter gene was used to detect ALB promoter-driven Gluc activity. Real-time PCR detected the

收稿日期: 2017-07-03 接受日期: 2017-10-30

重庆市科委基础科学与前沿技术研究项目(批准号: cstc2016jcyjA0228)资助的课题

\*通讯作者: Tel: 023-63633113, E-mail: yun\_he@cqmu.edu.cn

Received: July 3, 2017 Accepted: October 30, 2017

This work was supported by the Basic Science and Frontier Technology Research Project of Chongqing Science and Technology Commission (Grant No.cstc2016jcyjA0228)

\*Corresponding author: Tel: +86-23-63633113, E-mail: yun\_he@cqmu.edu.cn

网络出版时间: 2018-01-05 17:43:13 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180105.1742.002.html>

level of mRNA of liver related genes and protein level was detected by Western blot and immunofluorescence. PAS staining and ICG uptake assay were used to detect the function of mature differentiation. Ad-BMP9+ATRA group could promote the differentiation. The activity of ALB-Gluc, mRNA expression level of *ALB* and *TAT*, and protein levels of ALB, CK18 and UGT1A were higher than that of Ad-BMP9 group and ATRA group. The levels of DLK and AFP were decreased ( $P<0.05$ ), liver function improved significantly. ATRA and Ad-BMP9 induced the mature differentiation of HP14-19, and the combined effect stronger than that of the single effect.

**Keywords** all-trans retinoic acid; bone morphogenetic protein 9; hepatic progenitor cell; differentiation

肝脏是人体内具有多种生理功能的重要器官,严重的肝损伤导致肝各项生化功能出现严重障碍,称为肝功能衰竭(liver failure),肝功能衰竭是临床最常见、死亡率极高的肝病症候群<sup>[1-2]</sup>。目前针对肝功能衰竭的三种替代治疗方法分别为肝移植、人工肝和肝细胞移植。肝移植手术在供体来源和配型成功率上受到限制,人工肝的治疗费用高昂且容易引起并发症,而肝细胞移植在近年来的研究中表现出了广阔的应用前景<sup>[3-5]</sup>。

研究发现,肝祖细胞(hepatic progenitor cell, HPC)移植对肝功能衰竭有明确的治疗作用,是肝细胞移植的重要细胞来源<sup>[6-7]</sup>。如何有效地、稳定地诱导肝祖细胞分化成为成熟肝细胞,并发挥成熟肝细胞的功能,是肝细胞移植中的研究关键。基于本课题组前期的研究发现,骨形态发生蛋白9(bone morphogenetic protein 9, BMP9)可作为有效的诱导因子作用于肝祖细胞<sup>[8-9]</sup>,全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)是维生素A家族的重要成员,在肝疾病的治疗中发挥着重要的作用<sup>[10]</sup>。本文旨在研究ATRA在BMP9诱导肝祖细胞成熟分化中的作用,为临床肝细胞移植治疗肝功能衰竭提供相关数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、病毒及主要试剂

实验材料包括:小鼠胚胎肝祖细胞HP14-19、携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因的空载腺病毒、Ad-BMP9重组腺病毒(由美国芝加哥大学何通川教授馈赠,本实验室保存<sup>[11-13]</sup>)。

DMEM培养基及胎牛血清购自美国Gibco公司。蛋白质提取试剂盒、RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒及Real-time PCR试剂盒购自Bioteck公司。ATRA、ICG试剂盒、PAS染色试剂盒、荧光素酶报告基因检测试剂盒和polybrene购自美国Sigma公司。小鼠来源的 $\beta$ -actin一抗、白蛋白(albumin, ALB)一抗、

细胞角蛋白18(cytokeratin 18, CK18)一抗、甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)一抗、尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶1A(UDP-glucuronosyltransferase 1A, UGT1A)一抗、UGT1A二抗购自Santa Cruz公司。胰酶、青链霉素购自上海碧云天生物技术有限公司。PCR引物合成由北京六合华大基因科技有限公司完成。

### 1.2 细胞培养及实验分组情况

HP14-19细胞培养于含完全培养基(含1%青/链霉素、10%胎牛血清)37℃、5%二氧化碳的培养箱中。传代至合适数量后,消化制成细胞悬液备用。

本实验分为4组,组1为control组,待接种细胞密度合适时,加入polybrene(终浓度10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )及Ad-GFP重组腺病毒(MOI=10:1);组2为Ad-BMP9组,待接种细胞密度合适时,加入polybrene(终浓度10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )及Ad-BMP9重组腺病毒(MOI=20:1);组3为ATRA组,待接种细胞密度合适时,更换为ATRA终浓度为1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的完全培养基;组4为Ad-BMP9+ATRA组,待接种细胞密度合适时,更换为ATRA终浓度为1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的完全培养基,同时按照Ad-BMP9组加入polybrene及Ad-BMP9。

### 1.3 荧光素酶报告基因检测ALB-Gluc的表达

将HP14-19接种于24孔板中,细胞密度为30%,并设置3复孔,ATRA和Ad-BMP9处理4、7、10 d后,取各组各孔培养上清液检测荧光素酶报告基因ALB-Gluc的表达情况。Luciferin反应缓冲液:底物=100:1新鲜配置荧光素酶反应液,取20  $\mu\text{L}$ 各孔培养上清液加入1.5 mL EP管,再加入10  $\mu\text{L}$ 荧光素酶反应液,用移液枪迅速吹打混匀,立即置于单孔荧光检测仪下读数。本检测由一人独立操作,保证加入反应液至读数的时间间隔基本一致。

### 1.4 Real-time PCR检测mRNA水平的表达

将HP14-19接种于4个6 cm培养皿中,细胞密度为30%,开始进行Ad-BMP9和ATRA处理,10 d后试剂盒提取各组细胞总RNA,逆转录合成cDNA。

Real-time PCR扩增相关基因, 引物序列见表1。Real-time PCR反应体系为: cDNA 2 μL、上下引物各1 μL、2×SYBR Green反应液7.5 μL、加水至15 μL。Real-time PCR反应条件为: 72 °C 3 min, 94 °C 3 min, 94 °C 10 s, 55 °C 20 s, 72 °C 20 s, 共35个循环, 熔解曲线65 °C~95 °C, 每5 s增加0.5 °C, 读板。以*GAPDH*为内参标化模板。

### 1.5 Western blot及免疫荧光检测蛋白质水平

Western blot实验操作步骤如下。将HP14-19接种于4个6 cm培养皿中, 细胞密度约为30%, Ad-BMP9和ATRA处理10 d后, 提取各组细胞总蛋白。10% SDS-PAGE分离后, 电转移至PVDF膜上, 室温下封闭反应1.5 h, TBST洗膜, 分别加入1:400稀释的β-actin一抗、1:200稀释的AFP、ALB、CK18一抗, 4 °C孵育过夜, TBST洗膜, 加入二抗, 室温作用1 h, TBST洗膜, ECL发光。

免疫荧光操作步骤如下。将HP14-19接种于24孔板中, 30%细胞密度, 并设置3复孔, 培养过夜。Ad-BMP9和ATRA处理10 d后, 弃培养基, 4%多聚甲醛固定, PBS洗净。加入0.5% Triton打孔处理20 min, PBS洗净; 5%羊血清封闭1 h, PBS洗净。分别加入1:200稀释的ALB和UGT1A一抗, 4 °C孵育过夜, PBS洗净。加入二抗, 室温避光孵育1 h, PBS洗净。加入DAPI染料, 室温避光孵育5 min, PBS洗净。然后, 在荧光显微镜下摄片。

### 1.6 ICG摄取实验及PAS染色实验检测肝细胞功能

ICG摄取实验操作步骤如下。将HP14-19接种于24孔板中, 30%细胞密度, 并设置3复孔, 培养过夜。经Ad-BMP9和ATRA处理10 d后, 弃培养基, 每孔加入250 μL ICG染液(浓度为1 mg/mL), 37 °C孵育1 h, 弃染液, PBS洗净, 显微镜下观察细胞摄取ICG情况并摄片。

PAS染色实验操作步骤如下。将HP14-19接种于24孔板中, 30%细胞密度, 并设置3复孔, 培养过夜。经Ad-BMP9和ATRA处理10 d后, 弃培养基, 4%多聚甲醛固定, PBS洗净。依次加入0.5% PAS、Schiff solution和Hepatoxylin, 分别作用时间为5 min、15 min及3 min, 每种试剂作用后均用ddH<sub>2</sub>O轻轻冲洗, 显微镜下观察染色面积并摄片。

### 1.7 统计学分析

采用SPSS 19.0软件进行统计学分析, 数据以均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 两两组间采用LSD-*t*检验, 多组之间采用单因素方差分析,  $P < 0.05$ 为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 HP14-19培养情况及HP14-19感染腺病毒后的荧光表达

肝祖细胞HP14-19于培养皿中贴壁生长, 经腺病毒感染后, 生长状态良好。感染72 h后, 显微镜下荧光观察control组、Ad-BMP9组和Ad-BMP9+ATRA组各组细胞的荧光表达情况, 荧光表达率均为60%~70%(图1), 可保证后续实验的可行性和均一性。

### 2.2 荧光素酶报告基因检测ALB-Gluc表达情况

各组细胞经处理后, 分别于第4、7、10 d观察细胞状态是否良好并动态检测细胞培养上清中ALB-Gluc的表达。结果显示, 各组的ALB-Gluc的表达水平均随着作用时间的延长而升高。Ad-BMP9组和ATRA组的ALB-Gluc活性均高于相同时间点的对照组, 而Ad-BMP9+ATRA联合诱导组则显著高于Ad-BMP9组和ATRA组, 具有统计学差异(图2,  $P < 0.05$ ), 且随着时间的延长差异更明显。此结果提示, Ad-BMP9和ATRA可促进ALB-Gluc的表达, 联合作用效果更佳。

### 2.3 Real-time PCR检测肝特异性标志物mRNA水平

Real-time PCR结果(图3)显示, 肝干细胞相关基因*DLK*和*AFP*以及成熟肝细胞标志物*ALB*和*TAT*, 在HP14-19中有低水平的基础表达, 经Ad-BMP9和ATRA处理后, *DLK*及*AFP*的表达下降, *ALB*和*TAT*的表达增加, 但是ATRA组的*AFP*及*TAT*的表达与对照组相比无统计学差异( $P > 0.05$ )。而Ad-BMP9+ATRA组中各肝细胞相关标志物表达水平的下降和增加幅度最为显著, 均强于单独处理组, 具有统计学意义( $P < 0.05$ )。此结果提示, Ad-BMP9和ATRA均可诱导

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物名称	序列(5'→3')
Primer name	Sequence (5'→3')
DLK Fwd	GCT GGG ACG GGA AAT TCT
DLK Rev	AAC CCA GGT GTG CAG GAG
AFP Fwd	ACG AGG AAA GCC CCT CAG
AFP Rev	GCC ATT CCC TCA CCA CAG
ALB Fwd	CCA GAC ATT CCC CAA TGC
ALB Rev	CAA GTT CCG CCC TGT CAT
TAT Fwd	ACC TTC AAT CCC ATC CGA
TAT Rev	TCC CGA CTG GAT AGG TAG

平结果相一致,提示经Ad-BMP9和ATRA分别诱导后的肝祖细胞可显著表达成熟肝细胞蛋白质标志物ALB和CK18以及显著下调AFP蛋白质水平,而经Ad-BMP9与ATRA联合作用后,其诱导成熟肝细胞

分化的作用更为显著。

免疫荧光检测各组ALB及UGT1A蛋白质水平,图中绿色荧光部分为目的蛋白质,肝祖细胞中几乎无表达(图4)。Ad-BMP9和ATRA处理后均可不同程度

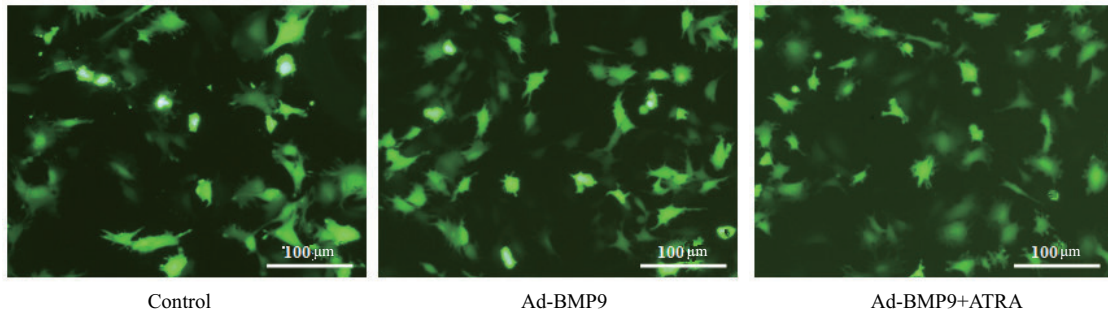
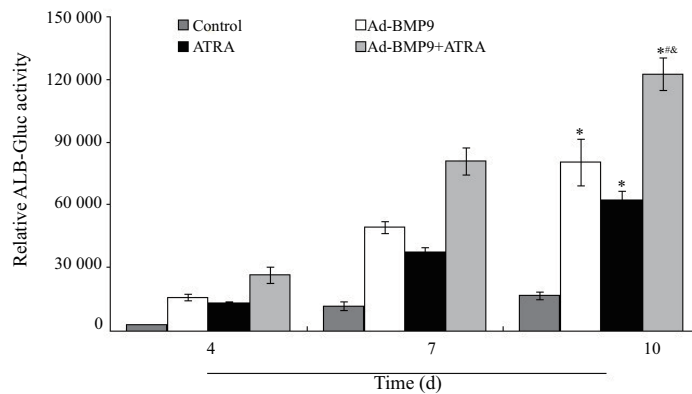


图1 腺病毒感染HP14-19后的荧光表达情况

Fig.1 Fluorescence intensity in HP14-19 after infection with adenvirus

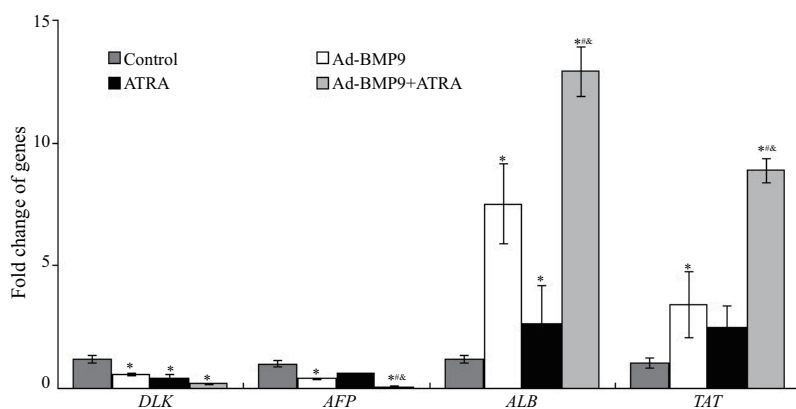


\* $P < 0.05$ , 与control组比较; # $P < 0.05$ , 与Ad-BMP9组比较; \* $P < 0.05$ , 与ATRA组比较。

\* $P < 0.05$  compared with control group; # $P < 0.05$  compared with Ad-BMP9 group; \* $P < 0.05$  compared with ATRA group.

图2 各组细胞上清液中ALB-Gluc活性

Fig.2 ALB-Gluc activities in the cell supernatant of different groups



\* $P < 0.05$ , 与control组比较; # $P < 0.05$ , 与Ad-BMP9组比较; \* $P < 0.05$ , 与ATRA组比较。

\* $P < 0.05$  compared with control group; # $P < 0.05$  compared with Ad-BMP9 group; \* $P < 0.05$  compared with ATRA group.

图3 Real-time PCR检测DLK、AFP、ALB及TAT的mRNA水平

Fig.3 The mRNA levels of DLK, AFP, ALB and TAT detected by Real-time PCR

肝祖细胞表达成熟肝细胞的特异性标志物, 而Ad-BMP9+ATRA联合诱导时*DLK*和*AFP*的表达降低以及*ALB*和*TAT*的表达增高更为显著。

### 2.4 Western blot及免疫荧光检测肝脏特异性标志物蛋白水平的表达

Western blot结果(图4A)显示, ATRA组和Ad-BMP9组的AFP蛋白质水平明显降低, ALB和CK18蛋白质水平明显升高, 而Ad-BMP9+ATRA组中AFP蛋白质水平低于单独处理组, ALB、CK18蛋白质水平均显著高于单独处理组。蛋白质水平与mRNA水

度的表达ALB及UGT1A, 且Ad-BMP9+ATRA组表达量最高, 提示Ad-BMP9和ATRA的联合作用可促进其分化。

### 2.5 ICG摄取实验及PAS染色实验检测诱导后细胞的储存及糖元合成功能

PAS染色实验(图5A)可检验肝脏细胞合成糖元的能力, ICG摄取释放染色实验(图5B)为检验肝细胞存储功能的常规实验。结果显示, HP14-19细胞的ICG摄取和糖元合成能力弱, 阳性细胞比例很小, 而经Ad-BMP9及ATRA单独处理后, 其ICG摄取和PAS

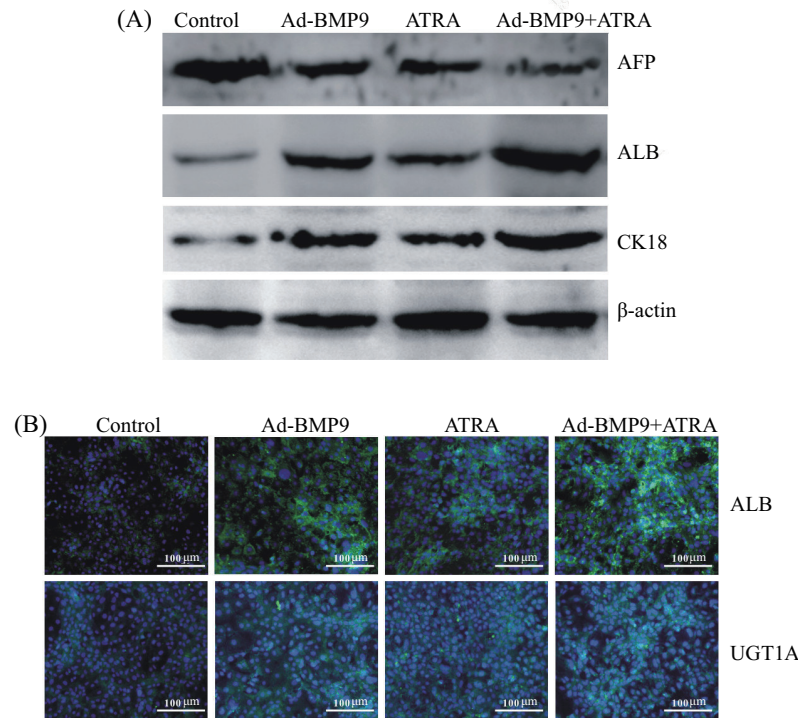


图4 Western blot(A)及免疫荧光(B)检测相关蛋白质水平  
Fig.4 The levels of related proteins detected by Western blot (A) and immunofluorescence (B)

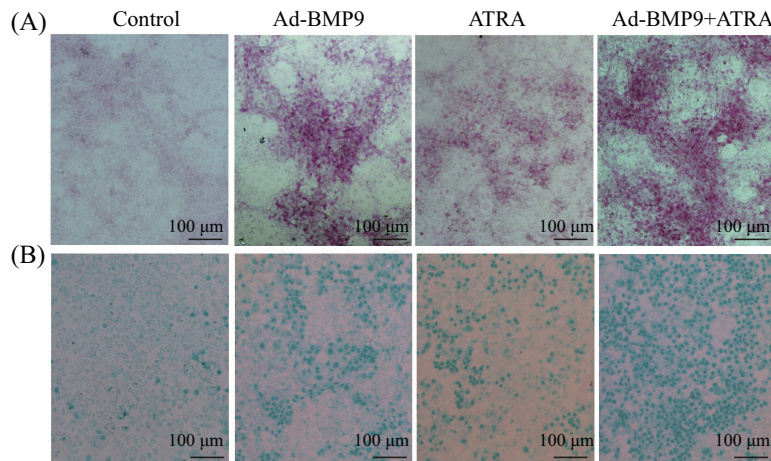


图5 PAS染色(A)和ICG(B)摄取实验结果  
Fig.5 The results of PAS staining (A) and ICG uptake assay (B)

染色阳性细胞显著增多,而Ad-BMP9+ATRA组阳性细胞显著大于各单独处理组,提示Ad-BMP9和ATRA可明显诱导肝祖细胞分化并具有一定成熟肝细胞功能,与之前各项实验结果一致,Ad-BMP9+ATRA组的作用更强。

### 3 讨论

与肝移植和人工肝相比,肝细胞移植具有细胞来源较广、移植手术简单、术后影响较小等特点,目前正发展成为治疗肝衰竭有效可行的方法。干细胞作为细胞来源,在治疗肝脏疾病方面已有很多的研究,包括骨髓间充质干细胞、造血干细胞、脐血干细胞等。研究表明,在一定条件下可诱导干细胞分化并表达成熟肝细胞标志物,但未能获得较好的肝细胞功能<sup>[14]</sup>。肝祖细胞是肝来源的干细胞,具有自我更新能力及双向分化潜能,可在体外培养和扩增,并诱导分化成为肝细胞和胆管细胞,是肝细胞移植的重要细胞来源<sup>[15]</sup>。同时肝祖细胞的来源、保存、优化使用、诱导分化等影响细胞移植成功的因素也是研究的重点。随着研究的深入,肝细胞移植将成为治疗肝功能衰竭的一种有效手段。目前诱导肝祖细胞分化为有功能的成熟肝细胞的实验方案还没有完善,需要进一步优化诱导方案。

BMP属于TGF- $\beta$ 超家族成员之一,BMP可调节细胞增殖、分化及凋亡,尤其在胚胎机体发育过程中对组织器官形态发生,在成年机体生长过程中对组织器官形态的维持起重要作用<sup>[16]</sup>。研究发现,BMP与肝脏也存在着各种关系。Ozkaynak等<sup>[17]</sup>在较早的研究中就检测出小鼠胚胎肝脏中有多种BMP的表达。Bi等<sup>[18]</sup>的研究中提到,BMP9的表达与肝纤维化有着密切关系,BMP9调节肝纤维化的作用可能有助于理解肝脏疾病的病理机制。García-Álvaro等<sup>[19]</sup>最新研究进展中提出BMP9在肝脏疾病中可能具有双重作用,一方面可稳定上皮表型和抑制增殖,另一方面在肝癌细胞中,有促进细胞生长和迁移的作用。消化病领域权威杂志《Gut》上,近期发表的一篇文章表示,BMP9促进肝细胞成熟分化有明确的作用,但是过度的BMP9表达会导致肝纤维化和肝损伤<sup>[20]</sup>。

ATRA是维生素A的衍生物,是目前公认的能有效诱导干细胞和肿瘤细胞分化的重要因子。人体95%的维生素A都贮存在肝内,肝脏病变时大大降低体内维生素A的储存,因此维甲酸类药物在肝脏疾

病的治疗中具有重要的意义<sup>[21]</sup>。ATRA是一种作用很强的分化诱导剂,在多种组织的前体细胞分化过程中有重要的作用,主要是对于神经干细胞的诱导分化<sup>[22]</sup>。近年来,也有较多的学者将ATRA应用于肝前体细胞的诱导分化,ATRA可诱导肝祖细胞成熟分化,在10  $\mu\text{mol/L}$  ATRA的浓度下,细胞功能更成熟,但是伴随细胞形态间质化<sup>[23]</sup>。

目前肝祖细胞成熟分化的诱导方式有很多,通常检测mRNA水平及蛋白质水平均可表达肝细胞标志物。然而,大部分的研究均未检测成熟肝细胞的功能,且体外诱导仍存在分化效率较低、表达不稳定等问题,因此需要优化诱导分化方案。深入研究肝前体细胞分化调控机制,对于认识各种肝脏疾病的发病机制以及肝细胞移植治疗肝衰竭都具有重要的意义。BMP9和ATRA均有明确的促进肝祖细胞成熟分化的作用,单独采用BMP9或ATRA诱导,过量的细胞因子刺激可能导致肝细胞纤维化或间质化。本研究中,联合两种因子、降低单因子用量,起到协同诱导肝祖细胞成熟分化的作用。

本文以胚胎肝祖细胞HP14-19为研究对象,Ad-BMP9和ATRA的单独及联合作用后,检测细胞中的相关肝细胞标志物的mRNA水平、蛋白质水平、荧光素酶报告基因以及成熟肝细胞功能。DLK是肝母细胞的重要标志,在小鼠的胚肝细胞中高表达,而正常的成熟肝细胞中表达很低。AFP是肝干细胞和肝肿瘤的标志物,AFP的降低提示成熟分化。肝细胞是合成ALB的唯一场所,是检测肝的首选指标,肝发生病变时,ALB表达会下降。TAT是出生后肝细胞特异性分化的一个重要的标志酶,肝祖细胞几乎不表达TAT。CK18是肝内主要的中间丝蛋白,在肝组织中高表达。尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶(UDP-glucuronosyltransferase, UGT)是人体内重要的II相结合反应的酶,UGT1A主要分布于肝脏<sup>[24]</sup>。本研究结果显示,Ad-BMP9+ATRA处理后,DLK及AFP表达下降,ALB、TAT、CK18及UGT1A表达显著上调。这提示,Ad-BMP9+ATRA可诱导肝祖细胞成熟分化,且分化效率高于BMP9或ATRA的单独作用。ICG摄取实验和PAS染色实验检测分化后的细胞功能得出,联合诱导组显示出更好的代谢解毒及糖原合成的成熟肝细胞功能。

BMP/Smad信号通路是BMPs发挥作用的一条主要途径,BMPs的功能主要由Smad家族蛋白质介

导, Smad家族包括8个成员, 其中Smad 1、Smad 5和Smad 8介导BMPs的信号转导, 而Smad 2和Smad 3介导TGF- $\beta$ 的信号转导。有研究表明, BMP9+ATRA诱导小鼠间充质干细胞成骨分化作用, BMP9+ATRA组Smad 1/5/8磷酸化水平明显强于单用BMP9组, BMPR-Smad报告质粒荧光素酶活性也呈相同变化趋势<sup>[25]</sup>。他们的研究结果提示, ATRA能增强BMP9诱导间充质干细胞成骨分化的作用, 其机制可能与促进Smads信号转导活性有关。ATRA可以通过部分介导激活Smad信号通路来抑制骨肉瘤细胞的增殖, 提示ATRA可能结合其他化疗药物来用于骨肉瘤的治疗<sup>[26]</sup>。Chen等<sup>[27]</sup>研究了ATRA通过调节BMP/Smad信号通路来诱导小鼠胚胎肝细胞的分化, 研究中抑制Smad 1/5途径后, 显著降低了ATRA介导的胚芽特异性基因表达的上调。本研究表明, ATRA可能是通过BMP/Smad信号通路介导发挥生物学作用。下一步, 我们拟从TGF- $\beta$ /Smad信号通路入手, 深入探讨ATRA在促进BMP9诱导肝祖细胞成熟分化中的信号通路及相关的分子, 为优化肝祖细胞成熟分化的方案提供理论依据, 进一步为肝祖细胞在细胞移植治疗肝功能衰竭开辟新的途径。

### 参考文献 (References)

- 1 Wu DB, Chen EQ, Bai L, Tang H. Propylthiouracil-induced liver failure and artificial liver support systems: a case report and review of the literature. *Ther Clin Risk Manag* 2017; 13: 65-8.
- 2 Giard JM, Decker KA, Lai JC, Gill RM, Logan AC, Fix OK. Acute liver failure secondary to hemophagocytic lymphohistiocytosis during pregnancy. *ACG Case Rep J* 2016; 3(4): e162.
- 3 Wang P, Petrella F, Nicosia L, Bellomi M, Rizzo S. Molecular imaging of stem cell transplantation for liver diseases: monitoring, clinical translation, and theranostics. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 4058656.
- 4 Chung PC, Chen HP, Lin JR, Liu FC, Yu HP. Impact of preoperative chronic renal failure on liver transplantation: a population-based cohort study. *Ther Clin Risk Manag* 2016; 12: 1855-60.
- 5 Animizu N, Ichinohe N, Ishii M, Kino J, Mizuguchi T, Hirata K, *et al.* Liver progenitors isolated from adult healthy mouse liver efficiently differentiate to functional hepatocytes *in vitro* and repopulate liver tissue. *Tissue-Specific Stem Cells* 2016; 34(12): 2889-901.
- 6 Yong KS, Keng CT, Tan SQ, Loh E, Chang KT, Tan TC, *et al.* Human CD34<sup>lo</sup> CD133<sup>lo</sup> fetal liver cells support the expansion of human CD34<sup>hi</sup> CD133<sup>hi</sup> hematopoietic stem cells. *Cell Mol Immunol* 2016; 13(5): 605-14.
- 7 Wolf B, Krieg K, Falk C, Breuhahn K, Keppeler H, Biedermann T, *et al.* Inducing differentiation of premalignant hepatic cells as a novel therapeutic strategy in hepatocarcinoma. *Cancer Res* 2016; 76(18): 5550-61.
- 8 Herrera B, García-Álvaro M, Cruz S, Walsh P, Fernández M, Roncero C, *et al.* BMP9 is a proliferative and survival factor for human hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One* 2013; 8(7): e69535.
- 9 Bidart M, Ricard N, Levet S, Samson M, Mallet C, David L, *et al.* BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69(2): 313-24.
- 10 Tripathy S, Chapman JD, Han CY, Hogarth CA, Arnold SL, Onken J, *et al.* All-trans-retinoic acid enhances mitochondrial function in models of human liver. *Mol Pharmacol* 2016; 89(5): 560-74.
- 11 Bi Y, He JY, Huang L, Xu N, Tang TC. Induced maturation of hepatic progenitor cells *in vitro*. *Brazilian J Med Biologi Res* 2013; 46: 559-66.
- 12 Bi Y, He Y, Huang J, Su Y, Zhu GH, He TC, *et al.* Functional characteristics of reversibly immortalized hepatic progenitor cells derived from mouse embryonic liver. *Cell Physiol Biochem* 2014; 34: 1318-38.
- 13 He Y, Cui J, He T, Bi Y. 5-azacytidine promotes terminal differentiation of hepatic progenitor cells. *Mol Med Rep* 2015; 12: 2872-8.
- 14 Chen L, Zeng W, Yang B, Cui X, Feng C, Wang L, *et al.* Expression of antisense of microRNA-26a -5p in mesenchymal stem cells increases their therapeutic effects against cirrhosis. *Am J Transl Res* 2017; 9(3): 1500-8.
- 15 Mahansaria SS, Kumar S, Bharathy KG, Kumar S, Pamecha V. Liver transplantation after bone marrow transplantation for end stage liver disease with severe hepatopulmonary syndrome in dyskeratosis congenita: A literature first. *J Clin Exp Hepatol* 2015; 5(4): 344-7.
- 16 Lamplot JD, Qin J, Nan G, Wang J, Liu X, He TC, *et al.* BMP9 signaling in stem cell differentiation and osteogenesis. *Am J Stem Cells* 2013; 2(1): 1-21.
- 17 Ozkaynak E. Murine osteogenic protein (OP-1): high levels of mRNA in kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 179(1): 116-23.
- 18 Bi J, Ge S. Potential roles of BMP9 in liver fibrosis. *Int J Mol Sci* 2014; 15(11): 20656-67.
- 19 García-Álvaro M, Addante A, Roncero C, Fernández M, Fabregat I, Herrera B, *et al.* BMP9-induced survival effect in liver tumor cells requires p38MAPK activation. *Int J Mol Sci* 2015; 16(9): 20431-48.
- 20 Breitkopf-Heinlein K, Meyer C, König C, Gaitantzi H, Addante A, Thomas M, *et al.* BMP-9 interferes with liver regeneration and promotes liver fibrosis. *Gut* 2017; 66(5): 939-54.
- 21 Ewees MG, Abdelghany TM, Abdel-Aziz AA, Abdel-Bakky MS. All-trans retinoic acid mitigates methotrexate-induced liver injury in rats; relevance of retinoic acid signaling pathway. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2015; 388(9): 931-8.
- 22 Tan BT, Wang L, Li S, Long ZY, Wu YM, Liu Y. Retinoic acid induced the differentiation of neural stem cells from embryonic spinal cord into functional neurons *in vitro*. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8(7): 8129-35.
- 23 Cui J, Gong M, He Y, Li Q, He T, Bi Y. All-trans retinoic

- acid inhibits proliferation, migration, invasion and induces differentiation of hep1-6 cells through reversing EMT *in vitro*. *Int J Oncol* 2016; 48(1): 349-57.
- 24 Ochiai W, Hirose A, Kawamura T, Komachi K, Yamamoto Y, Kitaoka S, *et al*. Role of the drug-metabolizing enzyme CYP during mouse liver development. *Biol Pharm Bull* 2016; 39(12): 2015- 21.
- 25 Liu Y, Liu Y, Zhang R, Wang X, Huang F, Yan Z, *et al*. All-trans retinoic acid modulates bone morphogenic protein 9-induced osteogenesis and adipogenesis of preadipocytes through BMP/Smad and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 2014; 47: 47-56.
- 26 Yang QJ, Zhou LY, Mu YQ, Zhou QX, Luo JY, Cheng L, *et al*. All-trans retinoic acid inhibits tumor growth of human osteosarcoma by activating Smad signaling-induced osteogenic differentiation. *Int J Oncol* 2012; 41(1): 153-60.
- 27 Chen W, Jia W, Wang K, Zhou Q, Leng Y, Duan T, *et al*. Retinoic acid regulates germ cell differentiation in mouse embryonic stem cells through a Smad-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 418(3): 571-7.