18 Miao J, Chen GG, Chun SY, et al. Hepatitis B virus X protein induces apoptosis in hepatoma cells through inhibiting Bcl-xL expression. J Cancer Lett, 2006, 236: l15-124.

19 Forgnes M, marrogi AJ, Spillare EA, et al. Interaction of the hepatitis B virus X protein witll the Crml-dependent nuclear export pathway. J Biol Chem, 2001, 276: 22797-22803.

20 Wang HP, Chen XP, Bai XG, et al. Hepatic cell apoptosis was triggerred by HBx accumulation and independent on verapamil. J huazhong university of science and technology, 2004, 24: 2812283.

(收稿日期:2008-05-27)

(本文编辑:赖荣陶)

脂肪间充质干细胞诱导向肝系细胞分化

殷莉波　王效民

大多数肝脏疾病终末期并发严重肝功能障碍,肝移植是治愈的唯一办法。但是临床可供移植肝来源短缺、移植伦理以及移植后排异问题,限制了肝移植在临床的广泛应用。细胞疗法的出现为肝脏疾病治疗提供了另一种可选途径。干细胞替代治疗或者刺激体内肝脏细胞再生是细胞治疗的主要目标[1]。哺乳动物肝脏可以自身修复或再生,卵圆细胞在肝脏修复过程中扮演重要作用。他们可以向肝实质细胞以及向胆管细胞分化[2]。但在损伤超过肝脏自身修复能力时,我们就希望其他来源的干细胞能替代卵圆细胞修复受损肝脏。到目前为止,其他非肝来源的间充质干细胞,如:骨髓、脐带血、脂肪、胎盘已成功诱导向肝细胞分化[3]。这些成体干细胞的发现以及成功向肝细胞的诱导分化具有深刻意义。人们利用间充质干细胞移植已取得了可喜进展,如:改善了延胡索酸乙酰乙酸水解酶缺陷豚鼠的生存,重建了部分肝脏功能[4];降低了肝毒损伤致肝衰豚鼠的死亡率,这些结果都表明间充质干细胞在治疗肝脏疾病上有很大的潜在应用价值。但是肝脏干细胞来源问题困扰着许多学者,未定型间充质干细胞陆续在其他组织中被发现,如:脐带血、胎肺、脂肪组织等有望解决这一难题。研究者开始把目光转转向其他组织来源间充质干细胞的研究,并成功将这些组织中分离获得的间充质干细胞诱导分化为其他成熟细胞。其中脂肪来源的干细胞越来越受到关注[5]。

一、脂肪间充质干细胞的优点

Zuk 等[6-11]2001 年首次在人脂肪组织中成功分离获得脂肪间充质干细胞,并命名为人脂肪间充质干细胞(human adipose derived stem/ stomal cells, hADSCs 或 adipose-derived adherent stromal cells/ adipose-derived adult stem cells, ADASs)、(adipose tissue-derived stromal cells, ATSCs)、(adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, AT-MSCs)等。人脂肪间充质干细胞在不同条件下被成功诱导分化为成骨细胞、软骨细胞、骨骼肌细胞等中胚层细胞,同时也可向其他胚层分化,证实脂肪间充质干细胞是多分化潜能干细胞。利用分子生物学方法分析脂肪间充质干细胞表面分子及特征与其他组织来源的间充质干细胞相似[12]。研究表明人脂肪来源的成体干细胞应用具有不可比拟的优点。第一、避免了伦理及法律上的问题;第二、获得来源是从患者皮下脂肪,创伤较小并且来源较易;第三、与已分化细胞相比,ADSCs 在体外扩增能获得相对较高的细胞浓度并易培养[6,12]。四、脂肪来源间充质干细胞比骨髓来源的间充质干细胞相比具有更长的培养期以及更高的增殖能力[13];五、自体细胞,避免了移植免疫。

二、hADSCs 的分离培养及初步鉴定

人脂肪组织主要来源于吸脂术及其他外科手术获得的皮下脂肪。借助整形外科手术或其他外科手术一般难度不大,风险较小[11]。得到的脂肪碎片 PBS 冲洗数遍,然后胶原酶(1 mg/ml) 37 ℃消化 1 h。也可胶原酶(2 mg/ml)消化 45 min[14]。消化后的组织加入等量的含有 10 %胎牛血清 DMEM 室温下孵育 10 min,此时溶液分为两层,取下层溶液(400 g)离心 10 min,室温下沉淀再次悬浮于 160 mmol/L NH_4Cl 溶液,裂解残存的红细胞。用此种方法 300 ml 脂肪组织可获得 2×10^8～6×10^8 个干细胞[15],而正常成人一次只能只能抽取10～20 ml 骨髓,而其所含的间充质干细胞不到 300 ml 脂肪的几十分之一。再次离心后加入含有 15 %人 AB 血清(胎牛血清亦可)的 DMEM 低糖培养基中。接种于细胞培养瓶,37 ℃,5 %CO_2孵箱中培养 48 h,每周两次换液。细胞融合达到 85 %时,用 0.4 %胰酶和 0.2 %EDTA 消化并收获,调整细胞到$(5\sim10)\times10^3/cm^2$浓度传代培养[16]。细胞可在体外反复传代$(10\sim20)\times10^3/cm^2$仍表现良好活性。由于目前 hADSCs 仍然缺乏特异的表面标志,分离纯化较难,表 1 是一些学者对 hADSCs 标志的测定,基本符合间充质干细胞特征:表达 CD105、CD73 和 CD90;不表达造血细胞表面分子 CD45、CD34、CD14[19]。

三、人脂肪间充质干细胞向肝样细胞分化

(一) 体外诱导　大多数学者采用直接原代细胞细胞培养的方式,2005 年 Seo 等[20]将正常成人皮下脂肪分离获得的传代在 3～15 之间的脂肪间充质干细胞(hADSCs)调整浓度至

作者单位:361000　厦门大学附属中山医院肝胆外科,厦门大学医学院

通信作者:王效民

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

(2.5～3) ×10⁴/cm²接种到包被有纤维连接蛋白(FN)的培养

表 1 人脂肪间充质干细胞表面 CD 分子

作者	表达的 CD 分子	不表达的 CD 分子
Banas 等[11]	CD10 ,CD13 ,CD34 ,CD59 ,CD105 ,CD166 ,CD49d ,SH3 ,CD29 , CD44 ,CD71 ,CD90 ,CD106 ,CD120a ,CD124	CD11b ,CD45 ,CD48 ,CD135
Zuk 等[12]	CD29 ,CD44 ,CD71 ,CD90 ,CD105	CD31 , CD34 , CD45
Lee 等[17]	CD29 ,CD44 ,CD105 , CD90	CD34 ,CD45 , CD14 , HLA-DR
Katz 等[13]	HLA-ABC ,CD29 ,CD49e ,CD51 ,CD90	HLA-DR ,CD4 , CD8a , CD11a , CD11b , CD11c , CD18 , CD41a , CD49f ,CD62L CD62P , CD106 , CD117 (c-kit) , CD133 , CD243 (MDR-1) , ABCG2

皿中扩增 24 h ,然后 Hank's 平衡盐溶液液洗涤两遍。获得的细胞移入培养瓶中,培养基含 10 ng/ml 肝细胞生长因子(HGF)和致瘤素(OSM)以及 0。1 %二甲基亚砜(DMSO) ,诱导 3～4 周。28 d 后,只加 HGF 的培养瓶中,细胞形态未发生明显改变;同时加入 OSM 的细胞诱导成为圆形、不贴壁细胞。细胞诱导分化的第 7 天, 分化细胞开始表达白蛋白(ALB) 、甲胎蛋白(AFP) 、并随着诱导时间的增加而增强。CK18、CK19 表达未见明显增加。功能方面的检测,这些上皮样细胞具有肝细胞的功能特征:分泌尿素和白蛋白,具有摄取低密度脂蛋的功能。实验结果提示 hADSCs 经 HGF 和 OSM 联合诱导可分化为具有形态、表型和功能特性的肝样细胞。

上述方法虽然比较简便,但是由于分离获得的细胞是一个混合群体,混杂细胞较多。虽然目前 hADSCs 还缺少特异性的表面标志,已有学者开始尝试利用细胞表面 CD 分子分选细胞。Katz 等利用 CD105 分子,磁珠分选获得 CD105 阳性 hADSCs 行体外扩增,再进行诱导分化[18]。2～3 ×10⁵ CD105 阳性细胞加入 60 mm 规格 I型胶原酶包被的培养皿培养。前三周加入肝细胞生长因子(HGF 150 ng/ml)成纤维细胞生长因子-1(FGF1) 300 ng/ml , (成纤维细胞生长因子-4 (FGF4) 25 ng/ml ,接下来用致瘤素 (OsM) 30ng/ml 和地塞米松 2 × 10⁵ mol/l诱导两周。在整个诱导过程中,细胞形态逐渐由成纤维细胞样转化成圆形上皮样细胞。RT-PCR 分析, AFP 随着诱导细胞的成熟表达量逐渐减少;白蛋白、色氨酸 2 ,3-二加氧酶(TDO2) 、细胞色素氧化酶 P450-7A1(P450-7A1)诱导 6 d 开始表达,一直持续到 70 d。肝细胞核因子-4α 在 41 d 被检测到;甲状腺激素结合蛋白(TTR) 、细胞色素氧化酶 P450-3A4 (CYP3A4) 、角蛋白-18(CK-18)在诱导 6 周后开始表达;2 周时大约 20 %的被诱导细胞表现出摄取低密度脂蛋白的能力、40 d 时几乎所有的细胞表现出这种特性。其他方面如:氨清除能力、糖原积累都表现出肝细胞功能特性。也有作者[21]采用曲古抑菌素(TSA)作为诱导剂诱导间充质干细胞向肝细胞分化取得良好效果,检测多药抗药性相关蛋白-2 (MRP-2) 、CCAT-增强子结合蛋白α(C/EBPα) 、ALB、CK-18 等肝细胞特异分子表达阳性。

(二) 体内诱导 一般大多数学者利用 CCl_4 诱导的小鼠肝衰竭模型,CCl_4 经尾静脉注入细胞,也可经肝动脉或肝门静脉。注入的细胞有两种:一种未诱导的 hADSCs[20];另一种经诱导的 hADSC 肝样细胞[11] ,都能在宿主肝脏中存活,并发挥作用。4 周后发现多数移植细胞分布于门静脉周围的肝实质内,未诱导 hADSC 也能表达 ALB 等肝细胞标志,同时能降低血氨、转氨酶。实验结果提示,在肝衰竭裸鼠模型体内、未经体外诱导 hADSC 在 3 d 后就能检测到 ALB 表达,而正常小鼠则不能。实验证明,脂肪间充质干细胞干细胞可横向分化为肝细胞来更好地修复损伤的肝脏,肝衰模型为脂肪间充质干细胞分化成为肝样细胞提供了良好的微环境。Wang 等[22]认为,若细胞从外周血管进入体内,经过全身循环后可能只有少量定植于肝脏。实验通过两种不同方式即门静脉注射和尾静脉注射将脂肪间充质干细胞移植入受体鼠内,免疫荧光结果显示,两种不同方法移植后,定居于肝脏的细胞数量无显著差异这可能与间充质干细胞有向缺血或损伤组织归巢的特征有关,而与移植途径无关,但其具体机制有待进一步探讨。

四、问题与展望

尽管上述研究结果令人备受鼓舞,仍有许多问题尚未解决。首先、从脂肪组织游离出来的具有向多系分化能力的细胞群并不单一。Zuk 等[6]发现 hADSCs 是由多数间充质起源的细胞和少数内皮细胞、平滑肌细胞、外周细胞组成。其次、至今尚未找到一种脂肪间充质干细胞的特异性标志、有学者用 CD105 或 CD133(干细胞抗原)分离间充质细胞也缺乏足够的理论依据。分离培养获得的干细胞生物学特性有差异,hADSC 向肝细胞分化的效率较低,如何在体外控制细胞分化的程度,使细胞停留在增殖、分化能力俱佳的时期,均待进一步研究。第三、脂肪间充质肝干细胞分化为肝细胞的机制尚不明确,需探索不同细胞因子在体内外对分化调控的影响以及体内移植的时机问题:究竟是诱导后移植、还是未诱导直接移植效果更佳等都是未来研究的方向。hADSCs 分化为肝细胞的研究和应用正不断取得新突破。hADSCs 作为一种来源广泛的自体干细胞具有许多不可比拟的优势,相信随着研究的不断深入,其有望应用于肝病治疗。hADSCs 成功诱导为肝细胞,为肝脏疾病的细胞、基因治疗以及生物人工肝的开发寻找到了又一细胞来源,前景广阔[20]。

参 考 文 献

1 Kashofer K, Bonnet D. Gene therapy progress and prospects: stem cell plasticity. Gene Ther ,2005 ,12: 1229-1234.

2 Gordon GJ , Coleman WB , Hixson DC , et al. Liver regeneration in rats with retrorsine-induced hepatocellular injury proceeds through

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

a novel cellular response. Am J Pathol, 2000, 156: 607-619.
3 Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. J Clin Invest, 2002, 109: 1291-1302.
4 Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. Nat Med, 2000, 6: 1229-1234.
5 Alison MR, Poul som R, J effery R, et al. Hepatocytes from nonhepatic adult stem cells. Nature, 2000, 406: 257.
6 Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng, 2001, 7: 211-228.
7 Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, et al. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. Stem Cells, 2005, 23: 412-423.
8 Brzoska M, Geiger H, Gauer S, et al. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. Biochem Bioph Res Co, 2005, 330: 142-150.
9 Guilak F, Lott KE, Awad HA, et al. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipocyte-derived adult stem cells. Cell Physiol, 2006, 206: 229-237.
10 Lee RH, Kim B, Choi I, et al. Characterizationand expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. Cell Physiol Biochem, 2004, 14: 311-324.
11 Agnieszka Banas, Takumi Teratani, Yusuke, et al. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a Source of Human Hepatocytes,. Hepatology, 2007, 46: 219-228.
12 Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol. Biol. Cell, 2002, 12: 4279-4295.
13 Kern S, Eichler H, Stoeve J, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue. Stem Cells, 2006, 24: 1294-1301.
14 Val érie Planat Benard, Jean-S ébastien, Silvestre, et al. Plasticity of Human Adipose Lineage Cells Toward Endothelial Cells:。Physiological and Therapeutic Perspectives. Circulation, 2004, 109: 656-663.
15 Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, et al. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue derived stromal cells. Tissue Eng, 2001, 7: 729-741.
16 R Tal éns-Visconti, A Bonora, R Jover, et al. Human mesenchymal stem cells from adipose tissue: Diferentiation into hepatic lineage. Toxicology in Vitro, 2007, 21: 324-329.
17 Lee RH, Kim B, Choi I, et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue, Cell Physiol. Biochem, 2004; 14: 311-324.
18 Adam J. Katz, Ashok Tholpady, Sunil S. Tholpady, et al. Cell Surface and Transcriptional Characterization of Human Adipose-Derived Adherent Stromal (hADAS) Cells. Stem Cells, 2005, 23: 412-423.
19 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minmal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells Cytotherapy, 2006, 8: 315-317.
20 Seo MJ, Suh SY, Bae YC, et al. Diferentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 328: 258-264.
21 Sarah S, Vanhacke T, De Becker A, et al, Chromatin remodeling agent trichostatin A: a key-factor in the hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells derived of adult bone marrow. Bmc Develop Biology, 2007, 7: 1186-1201.
22 Wang X, Montini. E, AL. Dhalimy. M, et al. Kinetics of liver repopulation af ter bone marrow t ransplantation. Am J Pathol, 2002, 161: 565-574.

(收稿日期:2008-07-15)
(本文编辑:赖荣陶)

乙型肝炎病毒表面抗原定量检测的临床意义

卢锋　廖雪雁　石爽　庄辉

乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)是乙型肝炎病毒(HBV)的外膜蛋白,由病毒S基因编码,含226个氨基酸残基,本身不具有传染性,但在病毒感染肝细胞过程中起重要作用。人感染HBV后4～7 d,血清中出现HBsAg,且常伴有HBV存在,因此,可作为HBV感染的标志。在免疫耐受期、慢性乙型肝炎期(免疫清除期)、非活动携带状态期和再活动期,HBV感染以及部分肝硬化和肝癌患者的血清中均可检测到HBsAg。此外,在HBV感染的潜伏期后期、急性期也可检测到HBsAg。

HBV在宿主体内复制是慢性HBV感染的主要决定因素,血清HBV DNA水平是病毒复制活动最直接和最可靠的标志,也是目前评价HBV复制情况的"金标准",血清HBV DNA水平与传染性密切相关[1]。随着荧光定量聚合酶链反应(PCR)技术在临床上的广泛应用,定量测定HBV DNA为研究病毒水平与病情严重程度的关系,监测疾病进展和评价抗病毒药物的疗效等提供了可靠依据。但是,PCR操作技术较复杂,费用相对较高,对实验条件和操作人员的要求也较严格,因此,在偏远

作者单位:100083　北京 北京大学医学部病原生物学系
通信作者:庄辉

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net