

胚胎干细胞向肝系细胞定向分化及其在肝再生中的应用

裴海云 王韞芳 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. *联系人, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn)

摘要 细胞移植和生物人工肝(bioartificial liver, BAL)作为终末期肝病的辅助治疗方法, 在越来越受到广泛关注的同时, 也面临着细胞来源、数量限制、存活期短、功能迅速降低等问题, 因此迫切需要寻找新的、合适的细胞来源. 胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)是从囊胚内细胞团(inner cell mass, ICM)中分离获得的、具有无限增殖能力和分化全能性的原始细胞, 能在特定的诱导条件下分化成各种组织特异性细胞, 在临床上具有极其广阔的应用前景, 其向肝系细胞的定向分化使其可能成为肝脏细胞移植和BAL的一个重要细胞来源. 目前, 研究重点在于控制分化过程以获得足够数量的所需类型细胞. 本文概括了肝脏的发育与分化, 综述了ESC向肝系细胞定向诱导分化的最新研究进展, 并对其在肝再生中的应用和存在问题也进行了探讨, 希冀对该领域的研究提供一些新的思路.

关键词 胚胎干细胞 肝细胞 分化 肝再生

肝脏在哺乳动物中承载着许多重要的功能, 它不仅分泌胆汁参与消化活动, 而且有营养物质代谢、贮存糖原、解毒、吞噬防御等重要机能, 在胚胎期还有造血功能. 肝病特别是终末期肝衰竭仍然是困扰人类健康的一类顽疾, 目前, 它的治疗主要依赖于原位肝移植, 但是供体的极度短缺、移植及手术本身相关的死亡、终生服用免疫抑制剂及其所致的致死性并发症等一系列问题极大地限制了这一治疗手段的广泛开展. 肝细胞移植和生物人工肝(bioartificial liver, BAL)作为肝移植的辅助方式, 可以部分缓解上述问题, 但其来源细胞同样也面临着存活期短、难以大量扩增, 特别是随着培养时间的延长, 肝功能逐渐降低等问题, 因此, 寻求合适的肝细胞来源已迫在眉睫. 理想的候选细胞应具备体外大量扩增、所分化细胞为成熟的功能肝细胞、免疫原性较弱、便于长期低温保存且移植后参与肝组织重建等特点. 胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)的特性决定其基本符合这些标准. 继1981年Evans等人^[1]建立了第一个小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cell, mESC)系后, Thomson等人^[2]于1998年分离并克隆了人的胚胎干细胞(human embryonic stem cell, hESC). 随之国内外掀起了ESC研究的高潮, 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, 当

然也吸引了一大批肝病研究学者的极度关注.

1 ESC的优势与潜在问题

ESC是从哺乳动物的囊胚期内细胞团中分离得到的一种原始、高度未分化细胞. 较之成体干细胞(adult stem cell)具有如下优势: () 高度的自我复制能力, ESC在严格的体外培养条件下能够无限增殖并维持未分化状态, 可以传代建系; () 发育的全能性, 即可以分化为完整个体的所有组织细胞, 经典的证据就是将其接种于裸鼠体内, 可以产生包含内、中、外三个胚层的畸胎瘤; () 遗传的可操作性, 对其进行遗传改造后, 适当地定向诱导其分化为所需类型的细胞, 可以用作治疗性克隆, 从而解除免疫排斥反应带来的长期困扰. 这些特性使人类可以用hESC治疗各种因细胞丧失导致的疾病, 如肝病、血液病、糖尿病、帕金森病、心梗等, 为人类挑战病魔、还原健康带来新的希望.

诚然, ESC能分化成各种细胞类型, 但这种分化是“非定位性”的. 目前尚不能控制ESC在特定的部位分化成相应的细胞, 直接应用的做法极易导致畸胎瘤的发生, 也不排除致癌的风险. 所以在应用ESC治疗前, 定向诱导分化为较成熟的功能细胞研究便是当务之急.

2007-01-23 收稿, 2007-09-27 接受

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

2 肝脏的发育与分化

2.1 肝脏发育的分子机制

体内正常肝脏发育的分子事件可能为我们理解多能干细胞(如ESC)在体外分化为肝系细胞提供一些线索,从而指导我们有效地、针对性地制定一些定向诱导分化的方案。

肝脏发育起始于前肠腹侧内胚层的14~20体节期^[3]。最初形成肝芽,随后扩增进入横隔间质形成胚肝。研究发现,腹侧内胚层必须表达Gata-4和Foxa-2(以前称作Hnf-3 β)才能竞争性地向肝系分化^[4]。而由邻近的心源中胚层(cardiogenic mesoderm)产生成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)诱导前肠内胚层末端腹侧壁的上皮增生,发育到14~20体节期,可以形成一个向外突出的肝原基,到20~22体节期,肝原基细胞增殖并迁移到周围侧板(lateral plate)中胚层来源的横隔间质(septum transversum mesenchyme)中,接受由横隔间质产生的信号刺激,主要由骨形态形成蛋白(bone morphogenic proteins, BMPs)和间质基质中的胶原等成分介导,进一步分化发育^[5](图1,参考文献^[6])。这些信号联合诱导并促进了肝脏相关基因的表达,同时抑制胰腺相关的基因表达,从而完成了肝脏的早期发育。在随后肝脏细胞迅速增殖和功能分化过程中,由间质细胞分泌产生的肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、造血细胞分泌的制瘤素(oncostatin M, OSM)和糖皮质激素,血管内皮细胞, cMET, c-jun, SEK1 以及gp130 都起着重要的作用^[5]。人们还发现很多转录因子(如HNF1 α , β ; FoxA家族; HNF4 α , β ; HNF6 以及c/EBP家族等)可以通过与肝脏特异性基因的转录调控成分相结合,从而起到调节肝脏发育分化的作用^[5,7]。此外,细胞

外基质(extracellular matrix, ECM)和细胞间的信号传导同样起着重要的作用^[8]。

2.2 分化各期的标志

肝系细胞在发育分化过程中缺乏一致的特异性标志物,只有一些高度表达的标志物,目前鉴定主要检测其相关基因表达和相关蛋白表达,这些标志物为我们识别成功诱导分化的细胞奠定了一定的基础。

() 胚胎期标志。最早出现分化标记的是甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)和白蛋白(albumin, ALB) mRNA的表达,这两种基因表达先于细胞形态上的变化。锚蛋白重复域17 (ankyrin repeat domain 17, Ankrd17)则是相对特异性的标志物^[9]。

AFP是美国科学家Bergstyan和Czar于1956年在肝癌患者的血清中检测出的一种球蛋白,它也是内胚层分化以及早期胚肝的标志^[10,11]。随着肝脏的发育成熟,它的表达逐渐降低^[12]。然而,它在肝脏的表达并不是完全特异的,在体内卵黄囊内胚层同样也表达AFP^[9,10]。虽然这一只有70 kD的蛋白的功能还没有被完全弄清,但它对于生长调控、类固醇结合,免疫调节和渗透压平衡的维持等方面的作用已经被广泛接受。

ALB是一种可溶性的单体蛋白,几乎占据了成人血清蛋白总数的一半。白蛋白最初被确认为一种运载蛋白,运载类固醇、脂肪酸和甲状腺激素,并且稳定细胞外的液体体积以维持血液中的胶体渗透压^[13]。其mRNA的合成发生在AFP合成后不久,大约发生于小鼠的7~8体节期,即小鼠胚胎发育的8.5 d^[14]。尽管ALB的表达比AFP有更大的限制因素,但它在肝脏的表达也并不是完全特异的,在体内卵黄囊内胚层同样也表达^[15,16]。

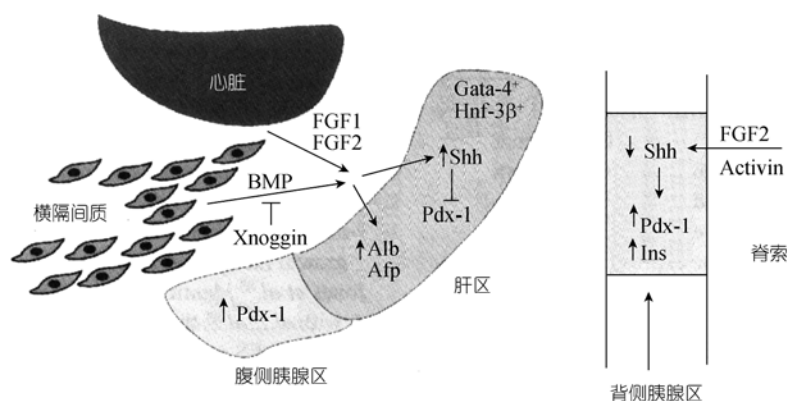


图1 腹侧内胚层分化为肝脏和胰腺的相关信号^[6]

Ankrd17起始表达于小鼠胚胎发育的8.5 d,产生于腹侧内胚层内特定向肝系分化的一群细胞.因此,它提供了肝表型的最早期的特异性标志物.然而,随着肝脏发育的逐步成熟,它的表达逐渐下调,在大多数成体肝细胞中并不表达,这一点限制了它作为肝标志的应用.

() 成熟肝细胞标志. 随着肝细胞的成熟,它开始表达几种其他蛋白,如a-1 抗胰蛋白酶(a-1 antitrypsin, AAT)、甲状腺素运载蛋白(transferrin, TTR)和谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS). 尽管肝脏富含这些蛋白,但它们无一例外都不是肝细胞特异性的标志.然而,这些基因在单一细胞中的联合表达却是一种有用的定义肝细胞表型的方法.此外,葡萄糖-6-磷酸酶(glucose-6-phosphatase, G6P)在胎肝和胎肾中表达^[17];酪氨酸氨基转移酶(tyrosine aminotransferase, TAT)直至新生期的肝细胞才表达^[18],由于这两种酶在肝脏发育早期不表达,常常用作评判肝成熟的标志.

3 ESC 向肝系分化的研究

3.1 mESC 向肝系细胞的分化研究

mESC 的研究已经有 30 多年的历史,它不仅证明了mESC的全能性,相应的诱导分化研究也取得了长足的进展.

() 自发分化. 2002年, Jones等人^[19]将基因载体L114插入mESC,这种基因能够在胚肝细胞早期发育过程中特异性地表达 β -半乳糖苷酶(β -gal). RT-PCR结果显示,在mESC来源的拟胚体(embryoid body, EB)形成的第9天已经有细胞开始表达 β -gal,证明了EB可以自发分化成早期未成熟肝细胞. Yamada等人^[20]则用另一种方法验证mESC自发分化为肝细胞的可能性.他们利用肝细胞能够特异性吸收靛青绿(indocyanine green, ICG)的特性来进行实验.发现在EB形成的第14天出现ICG⁺细胞,且超微结构观察、免疫细胞化学、RT-PCR等实验结果均支持其具有肝细胞特征.值得注意的是,ICG⁺细胞簇多出现在跳动的心肌附近,由此可以说明心源中胚层对内胚层细胞向肝系分化的诱导作用,同时也表明EB本身可以提供肝细胞分化的微环境.同年, Miyashita等人^[21]将形成的EB接种于铺有明胶的培养皿中生长,通过RT-PCR对EB自发分化过程中肝细胞相关基因的表达情况进行研究,发现在培养21 d后G6P等成熟肝细胞

的标志开始表达,且免疫细胞化学结果显示,肝细胞多位于EB铺展生长的外周区域.上述实验结果表明,EB自身能够提供肝细胞分化的微环境,从而启动并维持其向肝系细胞的分化,但考虑到自发分化的效率较低,细胞混杂,定向诱导分化及筛选目的细胞的研究就显得尤为重要.

() 定向诱导分化. 2001年, Hamazaki等人^[22]研究发现, mESC通过形成EB在体外具有定向分化为成熟肝细胞的能力.在培养基中未添加生长因子的情况下EB来源的细胞仅可表达AFP, ALB, TTR等内胚层特异性基因,但在序贯加入酸性成纤维细胞生长因子(acidic fibroblast growth factor, aFGF), HGF, OSM等分别作为早、中、晚期诱导剂时,这些细胞还表达肝细胞晚期分化标志物,如TAT及G6P.但Chinzei等人^[23]报道的结果与之不同,他们发现,在不添加任何外源性诱导因子的条件下,体内、体外mESC也可分化为肝细胞.结果的相悖可能与诱导剂的浓度和添加的时机、mESC的种系及EB的成熟状态等不同有关. Kuai等人^[24]也通过形成EB进行定向诱导,分为维甲酸(retinoic acid, RA), HGF, 神经生长因子(β -nerve growth factor, β -NGF)及HGF, β -NGF 两个诱导组,发现添加RA组诱导的细胞没有表达一系列肝细胞标志,而无论HGF和 β -NGF单独还是联合都能诱导mESC向肝系的分化.2004年, Hu等人^[25]利用TGF, bFGF, HGF等细胞生长因子进行mESC向肝细胞方向的定向诱导.结果表明,肝细胞特异基因AFP, ALB, G6P和TAT最早分别于第3, 9, 11及13天表达,肝细胞特异蛋白AFP, CK8, CK18和ALB最早分别于第7, 9, 9和11天开始表达,第12天开始检测到尿素出现,浓度为8.3 μ mol/L,并随着培养时间延长而浓度逐渐增加.2006年, Novik等人^[26]对mESC通过形成EB向肝系分化的4种诱导体系在肝细胞相关基因的表达层面进行了比较.定量原位免疫荧光和cDNA微阵列分析显示,自发分化和胶原介导的分化细胞高表达ALB,且仅在自发分化条件下表达成熟肝细胞的标志,暗示可能存在着不同的分化机制.那么,EB是否为分化的必经阶段呢?2005年, Teratani等人^[27]不通过形成EB,利用因子诱导直接将mESC分化为有功能的成熟肝细胞,并移植到小鼠肝损伤模型体内,依靠荧光示踪剂发现移植细胞弥散分布到损伤肝脏内,并大量增殖,部分缓解了小鼠的肝损伤,而将移植细胞种植到裸鼠皮下及肝脏也未见有畸胎瘤形成.

除了经典的因子诱导之外,人们也正积极尝试着各种不同的诱导方法。

Zhou等人^[28]尝试以化合物丁酸钠(sodium butyrate)为诱导剂将mESC诱导分化为肝祖细胞,实验结果显示,分化细胞胞浆少,核卵圆形、能迅速扩增,表达一系列肝祖细胞标志物且具有向肝细胞和胆管上皮细胞双向分化的潜能。

Fair等人^[29]根据肝脏发育过程中中胚层对原始内胚层诱导作用的原理,通过共同培养系统(ESC与鸡胚中胚层细胞的共培养)来诱导mESC向肝细胞的分化,进一步印证了心脏中胚层产生的FGFs对胎肝发育的重要诱导作用。Soto-Gutierrez等人^[30]将mESC与人肝脏非实质细胞(胆管上皮细胞、内皮细胞及肝星状细胞等)共培养,并添加FGF-2,人activin-A及HGF,发现可以诱导为表达肝特异性基因,分泌ALB,代谢氨类、利多卡因及安定的有功能的肝细胞,并通过ALB启动子基础上的流式分选获得这些细胞,将其灌输入BAL,可以缓解90%肝切除所致的肝损伤,且与原代肝细胞作为种子细胞的BAL具有类似的功能。

2005年,Ogawa等人^[31]巧妙利用了微环境对于分化的潜在作用,它将EB中大量细胞诱导为心肌和内皮细胞,模拟体内肝脏发育时的微环境,以此来诱导肝细胞的分化取得了成功。2006年,Gouon-Evans等人^[32]又进一步研究并证实了BMP-4对于mESC来源的内胚层向肝系分化的重要性。研究发现,在无血清培养条件下添加activin A可以使mESC有效地形成共表达Brachyury, Foxa-2和c-Kit,或c-Kit和Cxcr4的内胚层祖细胞,而再添加BMP-4与bFGF则有45%~70%的细胞在蛋白水平表达AFP和ALB,在转录水平表达Afp, Alb, Tat, Cps1, Cyp7a1以及Cyp3a11等,且能分泌ALB、储存糖原及表达成熟肝细胞特有的超微结构。

Imamura等人^[33]首次利用三维培养系统研究mESC的肝系分化,发现无论在体内还是体外,mESC来源的EB均可在胶原支架三维培养系统与外源生长因子等共同作用下形成肝样细胞。2006年,Maguire等人^[34]研究海藻酸盐-聚赖氨酸-海藻酸微胶囊(alginate-PLL microencapsulation, APA)对于mESC分化为肝系细胞的作用,发现藻酸盐微环境可以保持细胞存活、促进分化且维持分化细胞的功能。

() 遗传修饰。近年来,随着体外遗传操作技

术的进一步成熟,肝细胞的分化研究也相应地得到迅速发展。Kanda等人^[35]从提高mESC体外分化为肝细胞的效率入手,通过“过度表达”肝细胞相关转录因子即肝细胞核因子3 β (hepatic nuclear factor 3 β , HNF-3 β)的遗传修饰方法来实现高效分化。转染后的mESC再以成纤维细胞生长因子-2(FGF-2)为外源性诱导因子进行诱导,发现几乎所有转染细胞中均可检测到AFP, ALB, TTR的表达。然而,尽管分化效率在逐步提高,但诱导所得细胞仍旧多是一些细胞的混合物,因此有必要对分化的肝细胞进行分选。2002年,Yin等人^[36]首次以AFP为标志分离纯化mESC来源的肝脏祖细胞。次年,Hamazaki等人^[37]采用相似的遗传修饰方法以AFP基因的启动子调控绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)基因的表达来筛选肝前体细胞,对mESC进行分化研究。在添加FGF1, HGF和OSM等诱导因子后,GFP⁺细胞可以表达AFP, ALB, CK19和细胞色素P450(CYP1A1)等基因,且高表达AFP和ALB蛋白。Yamamoto^[38]等首先构建了含ALB启动子调控的GFP基因的质粒pALB-EGFP,将其转入mESC中,筛选出稳定转染的细胞移植到四氯化碳致损的小鼠肝脏,发现GFP⁺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。Asahina等人^[39]根据卵黄囊虽表达AFP, ALB等肝细胞标志物,但并不表达CYP7a1的特性,将一个新的报告基因(由肝细胞特异的增强型CYP7a1启动子调节GFP)引入mESC,发现形成的EB可以产生GFP⁺的上皮样细胞,从而排除了卵黄囊等因素的干扰,证明了mESC向肝细胞的分化。2006年,Heo等人^[40]又将另一个报告基因(由肝细胞特异性的增强型ALB启动子调节GFP)导入mESC,经过EB诱导为肝祖细胞,并移植入MUP-uPA/SCID小鼠体内,发现GFP⁺细胞不仅能够融合到肝脏组织缓解小鼠的肝损伤,还能分化成胆管上皮细胞,这也证明了肝祖细胞的双相分化潜能。

3.2 大鼠胚胎干细胞(rat embryonic stem cell, rESC)向肝系细胞的定向诱导分化

目前,在小鼠以外的动物,ESC分离、建系及应用方面的研究仍然相对薄弱。Ruhnke等人^[41]首先分离建立了rESC系,然后对其分化能力进行了鉴定,他们采用了未经EB阶段的直接诱导分化方法,将rESC培养在Matrigel包被的盖玻片上,用含FGF4的培养液实施肝细胞的诱导,免疫组化结果显示其表达AFP,

ALB, CK18, AAT等蛋白, RT-PCR检测发现AFP, TTR等表达量明显升高, 但肝细胞分化的中后期标志如HNF-1 α 和CYP2B1等却未见升高。

3.3 hESC 向肝系细胞的定向诱导分化

hESC的研究起步虽然相对较晚, 但目前mESC的研究成果给正在进行的hESC研究很大的助力。2003年, Rambhatla等人^[42]率先发现丁酸钠可以通过EB或直接诱导hESC定向分化为肝细胞, 但诱导的同时伴随着大量细胞的死亡。剩余的细胞(10%~15%)与原代培养肝细胞形态相似, 且其中70%~80%的细胞可以表达肝特异性的蛋白质(ALB, AAT, cyto-keratin 8和18)、储存糖原以及可诱导的细胞色素P450活性, 此外, 细胞不表达AFP。同年, Levenberg等人^[43]利用可降解的生物支架材料(聚羟基乙酸和聚乳酸共聚合形成)对hESC的分化进行了研究, 在activin A或胰岛素样生长因子1 (insulin-like growth factor 1, IGF)的诱导下, hESC可以形成具有早期肝脏生化特性(产生高水平的AFP和ALB蛋白)的结构。次年, Shirahashi等人^[44]则对mESC和hESC定向分化为肝细胞过程中的培养液、生长和分化诱导因子以及包被基质等因素进行了比较、优化, 发现在型胶原包被条件下, 利用添加有20%胎牛血清、胰岛素和地塞米松的IMDM培养液最有利于肝细胞的分化。2005年, Schwartz等人^[45]又对完全无血清条件下hESC定向分化为有功能肝细胞的诱导体系进行了比较、优化, 发现型胶原、SF培养液、FGF4及HGF成为促进分化最佳的组合。2004年, Lavon等人^[46]利用DNA微阵列检测自发分化EB的肝富基因表达水平, 发现一些细胞表达胎肝富含的基因, 为了分离出这群肝样细胞, 他们将一个报告基因(由肝细胞特异的ALB启动子调节GFP)引入hESC。共聚焦显微镜结果表明, GFP⁺的肝样细胞簇大约出现在EB形成的第20天; 免疫印迹结果显示, 这些细胞多数表达ALB, 而且一些细胞仍表达肝细胞早期标志物AFP。

4 ESC 在肝再生医学中的应用前景与存在的问题

ESC向肝系的定向分化, 无论对深入阐明其发育分化机制的基础研究还是对可能的临床应用都具有重要的意义, 肝脏发育机制的逐步明晰会更好指导定向分化方案的设定与实施。该领域的研究最终将对肝硬化、肝坏死等肝功能衰竭的治疗采用

细胞移植或生物人工肝辅助治疗产生广泛的影响。此外, 肝脏发育具体机制的剖析可以明确遗传性肝脏疾病中, 哪些基因和细胞因子出现异常, 并提出针对性的以干细胞为载体的基因治疗策略, 这对于肝病高发的中国来讲, 意义尤为重大。

尽管ESC来源的分化细胞应用于动物模型的细胞治疗已取得令人振奋的结果, 但乐观之余, 我们也清醒地认识到, 要将这些细胞应用于临床治疗, 仍有重重障碍: 首先, hESC培养所依赖的饲养层目前多是鼠源性的, 临床应用时如何避免鼠源性的蛋白质污染? 这也是我们研究组正在致力于从事的研究领域之一, 人源性饲养层细胞的建立, 无饲养层、无血清细胞培养体系的建立等最终将实现摆脱动物源性污染的hESC的培养和扩增。其次, 如何得到具有功能的、纯化的分化细胞? 由于可靠的肝细胞的特异性标志物仍难以确定, 因此如何确认并从混杂细胞(如未分化ESC, 其他型分化细胞)中分离出纯的肝细胞, 并要求这些方法对后续研究尽可能不产生影响, 这仍是一个巨大的困难与挑战。笔者实验室曾开展多种细胞分化为肝脏细胞的研究^[47~52], 累积了一定的分化、鉴定与移植经验, 目前正开展hESC的肝系分化研究, 并尝试ECM与细胞因子联合诱导的方法。免疫细胞化学结果显示分化细胞表达AFP和CK18; RT-PCR结果证实表达AFP, ALB, CK19和CYP1B1; 糖原染色实验即高碘酸-雪夫反应(periodic acid-Schiff, PAS)及ICG摄取排泌实验均呈阳性; 透射电子显微镜结果显示分化细胞表面有微绒毛, 内含丰富的线粒体、核糖体、溶酶体及内质网等, 是肝细胞典型的超微结构。与此同时, 我们也正尝试将连有肝细胞相对特异性的启动子的载体转入hESC中, 实施可视化的诱导与分选。再次, 细胞移植所需的细胞量为数不少, 如生物人工肝大约需要的细胞量在 $10^7 \sim 10^{10}$ 左右, 如何满足如此庞大的需求? 在致力于提高诱导分化效率之余, 我们也正开展利用生物反应器对hESC及EB进行三维的大规模培养, 希冀对分化前的源头细胞实施扩增来满足对细胞数量的需求。第四, 如何避免分化细胞植入人体后的免疫排斥反应? 解决方法其实早在Rideout等人^[53]进行的体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SNT)研究中便已提出, 但研究多止于SCID小鼠, 必须加快“治疗性克隆”的研究和hESC建库的步伐。最后, 移植的分化细胞是否能够定位于肝脏组织, 如果不能, 它在非肝组织又

有何转归? 上述问题的回答将有效指导hESC在肝病细胞治疗中的应用。

综上所述, 将 ESC 精确定向诱导分化的技术尚处于研究的初级阶段, 许多问题依然悬而未决, 从基础研究到临床应用, 对于胚胎干细胞治疗的征途来说仍有很长的路要走, 但我们的热情与信念丝毫未减, 因为正是它的出现为人类最终战胜顽症展现了新的曙光。

参 考 文 献

- Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292(5819): 154—156[DOI]
- Thomson J A, Itskovitz E J, Shapiro S S, et al. Embryonic stem cell line derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282(5391): 1145—1147[DOI]
- Douarin N M. An experimental analysis of liver development. *Med Biol*, 1975, 53(6): 427—455
- Bossard P, Zaret K S. GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation. *Development*, 1998, 125(24): 4909—4917
- Duncan S A. Mechanisms controlling early development of the liver. *Mech Dev*, 2003, 120(1): 19—33[DOI]
- Lanza R, Gearhart J, Hogan B, 等. *Handbook of Stem Cells*. 北京: 科学出版社, 2006. 361
- Costa R H, Kalinichenko V V, Holterman A X, et al. Transcription factors in liver development, differentiation, and regeneration. *Hepatology*, 2003, 38(6): 1331—1347
- Suzuki A, Iwama A, Miyashita H, et al. Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development*, 2003, 130 (11): 2513—2524[DOI]
- Watt A J, Jones E A, Ure J M, et al. A gene trap integration provides an early *in situ* marker for hepatic specification of the foregut endoderm. *Mech Dev*, 2001, 100: 205—215[DOI]
- Jones E A, Clement-Jones M, James O F, et al. Differences between human and mouse alpha-fetoprotein expression during early development. *J Anat*, 2001, 198(5): 555—559[DOI]
- Tyner A L, Godbout R, Compton R S, et al. The ontogeny of alpha-fetoprotein gene expression in the mouse gastrointestinal tract. *J Cell Biol*, 1990, 110: 915—927[DOI]
- Spear B T. Alpha-fetoprotein gene regulation: Lessons from transgenic mice. *Semin Cancer Biol*, 1999, 9(2): 109—116[DOI]
- Putnam, F W. The plasma proteins: Structure, function, and genetic control. *Q Rev Biol*, 1986, 61(1): 160—161
- Gualdi R, Bossard P, Zheng M, et al. Hepatic specification of gut endoderm *in vitro*: cell signaling and transcriptional control. *Genes Dev*, 1996, 10(13): 1670—1682[DOI]
- Meehan R R, Barlow D P, Hill R E, et al. Pattern of serum protein gene expression in mouse visceral yolk sac and foetal liver. *EMBO J*, 1984, 3(8): 1881—1885
- Cascio S, Zaret K S. Hepatocyte differentiation initiates during endodermal-mesenchymal interactions prior to liver formation. *Development*, 1991, 113(11): 217—225
- Pan C J, Lei K J, Chen H, et al. Ontogeny of the murine glucose-6-phosphatase system. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 358(1): 17—24[DOI]
- Greengard O. The hormonal regulation of enzymes in prenatal and postnatal rat liver. Effects of adenosine 3',5'-(cyclic)-monophosphate. *Biochem J*, 1969, 115(1): 19—24
- Jones E A, Tosh D, Wilson D I, et al. Hepatic differentiation of murine embryonic stem cells. *Exp Cell Res*, 2002, 272(1): 15—22[DOI]
- 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(2): 146—154[DOI]
- Miyashita H, Suzuki A, Fukao K, et al. Evidence for hepatocyte differentiation from embryonic stem cells *in vitro*. *Cell Transplant*, 2002, 11(5): 429—434
- Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, et al. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells *in vitro*. *FEBS Lett*, 2001, 497(1): 15—19[DOI]
- Chinzei R, Tanaka Y, Shimizu-Saito K, et al. Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. *Hepatology*, 2002, 36(1): 22—29[DOI]
- Kuai X L, Cong X Q, Li X L, et al. Generation of hepatocytes from cultured mouse embryonic stem cells. *Liver Transplant*, 2003, 9(10): 1094—1099[DOI]
- Hu A B, Cai J Y, Zheng Q C, et al. High-ratio differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes *in vitro*. *Liver Int*, 2004, 24(3): 237—245[DOI]
- Novik E I, Maguire T J, Orlova K, et al. embryoid body-mediated differentiation of mouse embryonic stem cells along a hepatocyte lineage: Insights from gene expression profiles. *Tissue Eng*, 2006, 12(6): 1515—1525[DOI]
- Teratani T, Yamamoto H, Aoyagi K, et al. Direct hepatic fate specification from mouse embryonic stem cells. *Hepatology*, 2005, 41(4): 836—846[DOI]
- Zhou Q J, Xiang L X, Shao J Z, et al. *In vitro* differentiation of hepatic progenitor cells from mouse embryonic stem cells induced by sodium butyrate. *J Cell Biochem*, 2007, 100(1): 29—42[DOI]
- Fair J H, Cairns B A, Lapaglia M, et al. Induction of hepatic differentiation in embryonic stem cells by co-culture with embryonic cardiac mesoderm. *Surgery*, 2003, 134(2): 189—196[DOI]
- 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(11): 1412—1419[DOI]
- Ogawa S, Tagawa Y, Kamiyoshi A, et al. Crucial roles of mesodermal cell lineages in a murine embryonic stem cell-derived *in vi*

- tro liver organogenesis system. *Stem Cell*, 2005, 23: 903—913[DOI]
- 32 Gouon-Evans V, Boussemart L, Gadue P, et al. BMP-4 is required for hepatic specification of mouse embryonic stem cell-derived definitive endoderm. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(11): 1402—1411[DOI]
- 33 Imamura T, Cui L, Teng R, et al. Embryonic stem cell-derived embryoid bodies in three-dimensional culture system form hepatocyte-like cells *in vitro* and *in vivo*. *Tissue Eng*, 2004, 10(11-12): 1716—1724[DOI]
- 34 Maguire T, Novik E, Schloss R, et al. Alginate-PLL microencapsulation: effect on the differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 93(3): 581—591[DOI]
- 35 Kanda S, Shiroy A, Oujy Y, et al. *In vitro* differentiation of hepatocyte-like cells from embryonic stem cells promoted by gene transfer of hepatocyte nuclear factor 3 beta. *Hepatol Res*, 2003, 26(3): 225—231[DOI]
- 36 Yin Y, Lim Y K, Salto-Tellez M, et al. AFP (+), ESC-derived cells engraft and differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Stem Cells*, 2002, 20(4): 338—346[DOI]
- 37 Hamazaki T, Terada N. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes. *Methods Enzymol*, 2003, 365: 277—287
- 38 Yamamoto H, Quinn G, Asari A, et al. Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes: Biological functions and therapeutic application. *Hepatology*, 2003, 37(5): 983—993[DOI]
- 39 Asahina K, Fujimori H, Shimizu-Saito K, et al. Expression of the liver-specific gene Cyp7a1 reveals hepatic differentiation in embryoid bodies derived from mouse embryonic stem cells. *Genes Cells*, 2004, 9(12): 1297—1308[DOI]
- 40 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(6): 1478—1486[DOI]
- 41 Ruhnke M, Ungefroren H, Zehle G, et al. Long-term culture and differentiation of rat embryonic stem cell-like cells into neuronal, glial, endothelial, and hepatic lineages. *Stem Cells*, 2003, 21(4): 428—436[DOI]
- 42 Rambhatla L, Chiu C P, Kundu P, et al. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant*, 2003, 12(1): 1—11
- 43 Levenberg S, Huang N F, Lavik E, et al. Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(22): 12741—12746[DOI]
- 44 Shirahashi H, Wu J, Yamamoto N, et al. Differentiation of human and mouse embryonic stem cells along a hepatocyte lineage. *Cell Transplant*, 2004, 13(3): 197—211
- 45 Schwartz R E, Linehan J L, Painschab M S, et al. Defined conditions for development of functional hepatic cells from human embryonic stem cells. *Stem Cell Dev*, 2005, 14: 643—655[DOI]
- 46 Lavon N, Yanuka O, Benvenisty N, et al. Differentiation and isolation of hepatic-like cells from human embryonic stem cells. *Differentiation*, 2004, 72: 230—238[DOI]
- 47 王韞芳, 南雪, 张锐, 等. 转基因肝星状细胞定向诱导骨髓 $\text{Thy-1}^+\beta_2\text{M}^-$ 细胞向肝细胞分化. *科学通报*, 2004, 49(6): 549—553
- 48 王韞芳, 南雪, 李艳华, 等. 诱导大鼠骨髓 $\text{Thy-1}^+\beta_2\text{M}^-$ 细胞分化为肝脏细胞. *中华血液学杂志*, 2005, 26(2): 69—73
- 49 王韞芳, 南雪, 尉承泽, 等. 丙稀醇致肝损伤微环境定向诱导骨髓干细胞向肝细胞分化. *中华肝脏病杂志*, 2005, 13(4): 274—277
- 50 Wang Y F, Nan X, Li Y H, et al. Induction of umbilical cord blood derived $\beta_2\text{m}^-\text{c-Met}^+$ cells into Hepatocyte-like cells by coculture with CFSC/HGF cell strain. *Liver Transplant*, 2005, 11(6): 635—643[DOI]
- 51 南雪, 王韞芳, 尉承泽, 等. 大鼠骨髓来源的 $\text{c-Met}^+\beta_2\text{m}^-$ 细胞向肝细胞样细胞诱导分化的实验研究. *自然科学进展*, 2006, 16(1): 32—39
- 52 李绍青, 管利东, 王韞芳, 等. 人脂肪来源的干细胞体外培养特性及分化为肝细胞样细胞的研究. *自然科学进展*, 2006, 16(4): 421—426
- 53 Rideout W M, Hochedlinger K, Kyba M, et al. Correction of a genetic defect by nuclear trans-plantation cell and gene therapy. *Cell*, 2002, 109(1): 17—27[DOI]