

利用人脐血单个核细胞重建急性肝损伤小鼠肝组织的实验研究 Human Umbilical Cord Blood-derived Mononuclear Cells Repopulate Injured Mouse Liver

赵文利¹, 陈耀凯^{1*}, 章 容², 王宇明¹

ZHAO Wen-Li¹, CHEN Yao-Kai^{1*}, ZHANG Rong² and WANG Yu-Ming¹

1 重庆第三军医大学西南医院感染病研究所, 重庆 400038

2 重庆第三军医大学西南医院病理科, 重庆 400038

1 Department of Infectious Diseases, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

2 Department of Pathology Southwest Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

摘 要 利用人脐血单个核细胞重建急性肝损伤小鼠肝组织, 探索建立人-小鼠嵌合肝模型方法。15 只 SCID 小鼠, 以四氯化碳 (CCL₄) 制备急性肝损伤模型, 24h 后行 2/3 肝切除, 然后分为三个实验组: 细胞移植组 (7 只)、阴性对照组 (3 只) 及空白对照组 (5 只), 将人脐血单个核细胞悬液注入细胞移植组小鼠脾脏内, 阴性对照组小鼠脾脏内注入等量磷酸盐缓冲液 (PBS), 空白对照组不注射细胞悬液和 PBS。术后 7d、14d 及 21d 取小鼠肝组织观察病理变化、检测人白蛋白 (ALB) 及细胞角蛋白 19 (CK19), 同时检测小鼠血清及肝组织匀浆中人 ALB 含量。全部小鼠表现出急性肝损伤组织学特征, 细胞移植组小鼠术后 7d、14d、21d 肝组织内均见大量人 ALB 及 CK19 阳性表达细胞, 血清及肝组织匀浆可检测出人 ALB, 阴性对照组小鼠肝组织未见人 ALB 及 CK19 阳性表达, 血清及肝组织匀浆中未检测出人 ALB。人脐血单个核细胞在部分肝切除的急性肝损伤小鼠肝组织内可大量分化为肝细胞及胆管细胞, 在建立模型方面已取得关键突破。

关键词 人脐血, 单个核细胞, 急性肝损伤, 肝组织重建

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)03-0467-04

Abstract AIM To repopulate the liver of mice with acute liver injury and to make mouse models with chimeric liver by using human umbilical cord blood (hUCB)-derived mononuclear cells. METHODS Fifteen acute liver injury mouse models were induced by carbon tetrachloride intraperitoneal injection followed by two-thirds hepatectomy and all mice were divided into three groups: cell transplantation group ($n = 7$), negative control group ($n = 3$) and blank control group ($n = 5$). HUCB cell preparations were transplanted into mouse spleens of cell transplantation group and phosphate buffered saline (PBS) was injected into spleens of negative controls. Neither cell suspension nor PBS was given to the blank controls. Pathological changes were observed 7, 14 and 21 days after cell transplantation. Human albumin (ALB) and cytokeratin 19 (CK19) were also detected in the mouse sera and liver tissues. RESULTS All mice showed histological features of acute liver injury. Positive expression of human ALB and CK19 were observed in liver tissues of cell transplantation group 7, 14 and 21 days after cell transplantation. Human ALB could be detected from the sera and liver homogenates of cell-transplanted mice. No positive expression of human ALB and CK19 were observed in liver tissues and no human ALB was detected in sera of negative control group. CONCLUSIONS HUCB-derived mononuclear cells can differentiate into functional human hepatocytes and biliary cells in large quantity in mouse

Received: October 13, 2006; Accepted: December 4, 2006.

This work was supported by the grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 30370391).

* Corresponding author. Tel: +86-23-68754475-8006; E-mail: yaokaichen@hotmail.com

国家自然科学基金资助 (No. 30370391)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

models with acute liver injury, thus a great progress were made in establishing mouse models with chimeric liver.

Key words human umbilical cord blood, mononuclear cells, acute liver injury, hepatocyte repopulation

骨髓间充质干细胞及造血干细胞具有多项分化潜能,体内微环境在 MSCs 分化方向中至关重要,已对体内干细胞微环境的构成和部分调控机制有所了解,但其启动和诱导 MSCs 的详细机制有待进一步研究^[1,2]。也有研究显示,人脐血细胞在肝损伤小鼠体内可分化为肝细胞样细胞(hepatocyte-like cells),提示其可能具有分化为肝细胞的潜能^[3,4]。本研究将人脐血单个核细胞移植入急性肝损伤小鼠脾脏内,观察小鼠肝组织内人源细胞的分布、表型特征及功能,旨在利用人脐血干细胞的多向分化特性重建小鼠肝组织,以期探索人-小鼠嵌合肝模型的建立方法。

1 材料和方法

1.1 材料

BALB/c 品系 SCID 小鼠 15 只,2~3 个月龄,雌 8 只/雄 7 只,购自北京实验动物中心,在本校实验室 SPF 级动物房饲养。DMEM、Trypsin/EDTA 购自 Gibco 公司,胎牛血清购自 Hyclone 公司。抗人细胞角蛋白 19(CK19)抗体及抗人白蛋白(ALB)抗体均为 DAKO 公司产品。一次性培养瓶及培养板购自 Gibco 公司,倒置相差显微镜、荧光显微镜及显微摄影装置为 Olympus 公司产品。

1.2 人脐血单个核细胞的分离

胎儿娩出后(胎盘仍在宫腔内),无菌条件下距胎儿 5~7cm 脐带处进行双结扎并剪断脐带,消毒脐带表面,脐静脉穿刺并用脐血收集袋收集脐血 50~100mL(肝素抗凝),充分混匀。脐血与 0.01mol/L pH7.4 PBS 按 1:1 混匀,再与 5g/L 甲基纤维素按 4:1 混匀,静置 30min 沉降红细胞,收集上清液以 4℃ 下 500g × 离心 5min,弃上清,沉淀细胞用 PBS 液重新悬浮混匀,轻轻叠加到 Ficoll 淋巴细胞分离液上(Ficoll 与脐带血体积比大约 1:1),20℃ 下 900g × 离心 20min,此时血清、白膜状单个核细胞、分离液、红细胞沉淀分为四个清晰层面;用吸管小心地收集单个核细胞层,用含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基洗涤 2 次,500g × 离心 5min,将细胞制备成单细胞悬液,调整密度至 2×10^7 /mL,置于冰上待用。留取细胞爬片,免疫组化染色检测人 ALB 及 CK19 等细胞表型。

1.3 小鼠急性肝损伤模型的制备与细胞移植

15 只小鼠于实验第 1 天开始分笼饲养,自由饮

水,喂以基础饲料(第三军医大学实验动物中心制备)。第 2 天将四氯化碳(CCl_4)和橄榄油以 1:5 的比例混合配制成 CCl_4 溶液,按每克体重 $5\mu\text{L}$ 的剂量注入小鼠腹腔,24h 后行 2/3 肝切除(切除肝左叶与中叶)。并将全部 15 只小鼠分为三个实验组:①细胞移植组 7 只,在部分肝切除的同时,以 1mL 注射器吸取 0.2mL 细胞悬液缓慢注入脾脏内,每只小鼠注射移植的细胞数约 3×10^6 ;②阴性对照组 3 只,分别将 0.2mL PBS 注入脾脏内作为阴性对照;③空白对照组 5 只,仅行部分肝切除,不作细胞悬液或 PBS 脾脏注射。

1.4 肝组织学检查

细胞移植后 7d、14d、21d 采用颈椎脱臼法处死小鼠,开腹观察记录肝脏大体病变后,取小块肝组织用 10% 福尔马林固定 24h,常规石蜡包埋,4 μm 连续切片备用。HE 染色观察肝脏病理改变,免疫组化染色观察人源性细胞的分布及表型特征。免疫组化主要步骤:脱蜡后以 3% 过氧化氢溶液浸泡 10min 灭活内源性过氧化物酶;抗原热修复后以正常山羊血清封闭,然后加第一抗体工作液 4℃ 过夜,加生物素标记的第二抗体 37℃ 45min;加结合过氧化物酶链霉亲和素 37℃ 45min,加新鲜配制的 DAB,显微镜下观察 5~10min,棕黄色染色为阳性信号。小鼠抗人 ALB 及 CK19 单克隆抗体由博士德公司提供,以博士德公司提供的阳性片为阳性对照,用 PBS 代替第一抗体作为阴性对照。

1.5 小鼠血清和肝组织匀浆中人 ALB 含量检测

处死小鼠前从眼眶取血 0.3mL,不抗凝,1200 r/min 离心 15min,分离血清置于 -20℃ 冰箱待测。颈椎脱臼处死小鼠后取肝组织 0.5g,加入生理盐水 1.0mL 匀浆器制备肝组织匀浆,1200r/min 离心 15min,分离上清置于 -20℃ 冰箱待测。采用放射免疫分析法(RIA)检测小鼠血清和肝组织匀浆中人 ALB 含量,以生理盐水为对照,每份标本测 3 次,取其均值作为该份标本检测结果,试剂盒由北京北方生物技术研究所提供,严格按检测操作说明书进行。

2 结果

2.1 各组小鼠存活状况

细胞移植组 7 只小鼠中最终存活 6 只,阴性对照组 3 只中 24h 内 2 只死亡,空白对照组 5 只中 24h

内死亡 3 只。

2.2 肝脏病理变化

实验小鼠在部分肝切除术当天(注射 CCL₄ 溶液后 24h),肝脏大体表现为肿胀、苍白、饱满及肝叶边缘圆钝,显微镜下见肝细胞水肿、疏松、气球样变,肝细胞坏死以汇管区多见,病变以中央静脉周围的腺泡Ⅲ区为重;肝小叶结构紊乱,肝窦充血。术后 7d、14d 及 21d 肝脏肿胀及苍白情况逐渐消退,部分小鼠在大部肝切除结扎处见小片状缺血性坏死区。显微镜下见变性及坏死细胞逐渐减少,汇管区炎症细胞消退。三个实验组小鼠在各取样时间点肝脏大体改变及病理变化无明显差异,但细胞移植组小鼠

肝内细胞增生似多于阴性对照组和空白对照组。

2.3 免疫组化染色结果

细胞爬片免疫组化染色显示,分离出的脐血单个核细胞抗人 ALB 及 CK19 染色呈阴性。细胞移植组小鼠术后 7d、14d、21d 肝组织内均见人 ALB 及 CK19 阳性表达细胞,ALB 阳性细胞多呈片状分布于肝实质区和中央静脉区,而 CK19 阳性细胞多散在分布于汇管区或小胆管增生明显处(图 1、图 2)。术后 7d、14d、21d 脾脏组织内亦见人 ALB 及 CK19 阳性表达的肝细胞样细胞,但数量少。阴性对照组小鼠术后 7d、14d、21d 肝组织内均未见人 ALB 及 CK19 阳性表达。



图 1 移植后肝组织抗人 ALB 染色

Fig. 1 Anti-human ALB immunohistochemistry staining in transplanted liver

Hepatocytes in peripheral zones of central veins showed positive for ALB staining 7 days after hUCB-derived mononuclear cells transplantation (A, 200 \times); Large amount of ALB staining positive cells were observed in liver parenchyma 14 days after hUCB-derived mononuclear cells transplantation (B, 200 \times); HUCB-derived mononuclear cells were smeared on a slide and stained negatively for anti-human ALB (C, 100 \times).

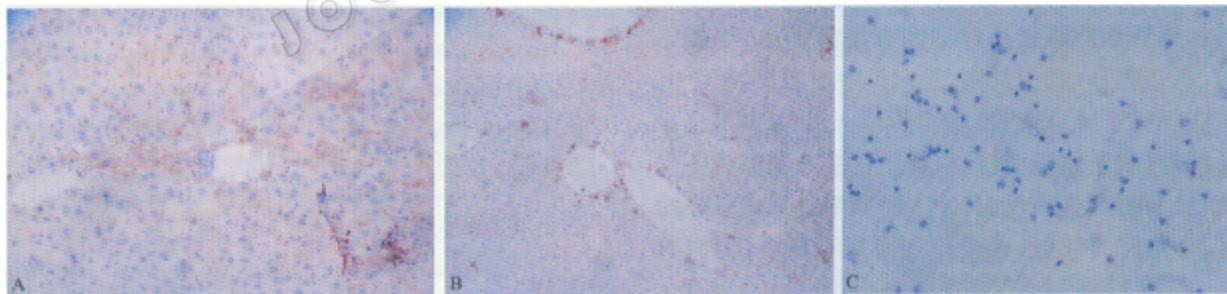


图 2 移植后肝组织抗人 CK19 染色

Fig. 2 Anti-human CK19 immunohistochemistry staining in transplanted liver.

Cells in periportal area of liver tissue showed positive for anti-human CK19 staining 7 days after hUCB-derived mononuclear cells transplantation (A, 200 \times); Ductular proliferation were observed in liver liver tissue 21 days after hUCB-derived mononuclear cells transplantation and these ductular cells were positive for anti-human CK19 staining (B, 100 \times); HUCB-derived mononuclear cells were smeared on a slide and stained negatively for anti-human CK19 (C, 200 \times).

2.4 小鼠血清及肝组织匀浆中人 ALB 含量检测结果

细胞移植后 7d,细胞移植组 2 只小鼠血清中未检出人 ALB,肝组织匀浆中人 ALB 含量分别为 2.013mg/L 和 2.503mg/L,细胞移植后 14d,细胞移植组 2 只小鼠血清中人 ALB 含量分别为 1.036mg/L 和 1.135mg/L,肝组织匀浆中人 ALB 含量分别为

3.078mg/L 和 3.277mg/L,细胞移植后 21d,细胞移植组 3 只小鼠血清中人 ALB 含量分别为 1.102mg/L、1.241mg/L 和 1.201mg/L,肝组织匀浆中人 ALB 含量分别为 3.035mg/L、3.340mg/L 和 3.134mg/L。在各观测时间点,阴性对照组小鼠血清及肝组织匀浆中均未检测出人 ALB。

3 讨论

人脐带血中富含可塑性极强的间充质干细胞和造血干细胞,脐血移植已被用于血液系统恶性肿瘤及某些实体肿瘤的治疗^[5,6]。本研究小组前期研究显示,人脐血间充质干细胞在体外培养条件下可诱导分化为表达 ALB 的肝细胞样细胞^[7]。鉴于此,我们推测如果体内微环境适宜,人脐血细胞在体内可诱导分化为具有特异性细胞功能的肝细胞样细胞,可能参与肝损伤小鼠的肝组织重建。为制造肝细胞再生的微环境,本研究利用 CCL4 对实验小鼠进行了肝损伤,并在细胞移植前进行肝大部切除,以此造成肝再生需求。结果发现,细胞移植后 7d、14d、21d 受体小鼠肝组织内均见大量人源性细胞嵌入,不仅表明本实验策略是成功的,也证实人脐血单个核细胞在体内可诱导分化为具有白蛋白合成能力的肝细胞样细胞。本研究还发现,位于汇管区或小胆管增生明显处的细胞表达 CK19,表明人脐血单个核细胞不仅可分化为肝细胞样细胞,还可根据肝再生的需求分化为胆管细胞样细胞,参与受体小鼠的肝组织重建。我们后续研究中进一步优化移植条件,发现人源性细胞的嵌入率可进一步提高,并可持续更长的时间,研究结果另外行文报道中。

利用活性细胞治疗各种疾病是当前医学研究的重点领域,肝脏是最早进行细胞移植实验的器官之一。利用肝细胞移植治疗肝病有诸多优点,如技术简单、易于操作、费用低廉、手术风险小等,但限制其临床应用的主要障碍有:①正常成人肝细胞因自身更新缓慢、缺乏增殖活性,移植后在受体肝脏内不能增殖,且易引起排斥反应;②人胎肝细胞移植免疫源性弱、增殖能力较强,但受伦理限制不能广泛利用;

③动物源性肝细胞移植亦存在免疫排斥、动物病毒传播及伦理问题;④肝细胞株存在致肿瘤性。因此寻找新的细胞来源成为当前研究重点^[8]。人脐血干细胞免疫原性弱、可塑性强、来源丰富且不受伦理限制,结合本研究结果可以认为,人脐血细胞/脐血干细胞用于治疗肝病是较为理想的细胞来源。本研究基于人脐血细胞建立的人-小鼠嵌合肝模型亦可作为嗜肝病病毒病原学研究的良好模型,进一步研究仍在进行中。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Ngan TH. The potential of stem cells. *MURJ* 2002 **6**: 49 - 51.
- [2] 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.
- [3] Nonome K, Li XK, Takahara T, Kitazawa Y, et al. Human umbilical cord blood-derived cells differentiate into hepatocyte-like cells in the Fas-mediated liver injury model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005 **289**: G1091-G1099.
- [4] Sharma AD, Cantz T, Richter R, et al. Human cord blood stem cells generate human cytochrome 18-negative hepatocyte-like cells in injured mouse liver. *Am J Pathol* 2005 **167**: 555 - 564.
- [5] Brunstein CG, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation and banking. *Annu Rev Med*, 2006, **57**: 403 - 417.
- [6] Gluckman E, Rocha V. History of the clinical use of umbilical cord blood hematopoietic cells. *Cytotherapy* 2005 **7**: 219 - 227.
- [7] He NH(何念海), Zhao WL(赵文利), Wang YM(王宇明). Hepatocyte-like cells induced from human umbilical cord blood mesenchyme stem cell *in vitro*. *World Chinese Journal of Digestology*(世界华人消化杂志), 2005, **13**(15): 1814 - 1818.
- [8] Wang YM(王宇明), Chen YK(陈耀凯). Progress and challenges in hepatocyte transplantation. *Chinese Journal of Hepatology*(中华肝脏病杂志), 2003, **11**(6): 325 - 326.