

# 大鼠脂肪间充质干细胞诱导为类肝细胞及其细胞片的制备

卢永波, 邱峰, 陈咏竹, 赵晓军

四川大学华西医院 纳米生物医学技术与膜生物学研究所, 成都 610041

**摘要:** 成体多能干细胞, 如来自骨髓和脂肪组织的间充质干细胞等具有多向分化的潜能。虽然自体干细胞移植已经发展成为器官移植的有效代替疗法之一, 但是由于移植位点细胞的流失和分化条件的限制等问题使得这种疗法的效率大大降低。本研究目的是将由脂肪干细胞分化而来的类肝细胞制备成具有稳定细胞性状的可移植的肝细胞片。首先在体外分离扩增脂肪干细胞, 并通过控制严格地分化条件获得类肝细胞。然后将此细胞接种到聚 N-异丙基丙烯酰胺 (PNIPAAm) 结合的细胞培养皿表面, 通过调节培养温度到 20°C, 使细胞成片脱离培养皿形成细胞片。对细胞片进行了常规 HE 染色和免疫组化观察, 结果显示: 这类细胞片中平均含有 2~3 层细胞, 并且保持了细胞外基质的完整。同传统的胰酶消化收集移植用细胞相比, 细胞片方法极大地减少了对移植用细胞的细胞膜和细胞外基质的损伤, 这将大大促进细胞片和原位组织的相互作用, 增加细胞利用效率, 从而有望提高治疗效果。

**关键词:** 脂肪间充质干细胞, 肝细胞, 细胞片, 移植

## Cell sheet fabrication of hepatocyte-like cells differentiated from adipose tissue mesenchymal stem cells

Yongbo Lu, Feng Qiu, Yongzhu Chen, and Xiaojun Zhao

*Institute for Nanobiomedical Technology and Membrane Biology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China*

**Abstract:** Adult pluripotent stem cells, such as mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue are capable of multilineage differentiation. Although autologous stem cell transplantation is an effective alternative to organ transplantation, the loss of cell viability and differentiation confinement of implanted cells has largely impaired the therapeutic efficacy. To produce biomaterial-free liver construct to integrate into living tissue, we isolated adipose mesenchymal stem cells and subjected them to a delicate culture configuration to mediate the hepatocyte differentiation. The differentiated hepatocyte-like cells were then inoculated onto poly (N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) grafted cell culture dish. By lowering the culture temperature to 20°C, cells detached from the dish surface into a complete cell sheet. Hematoxylin and eosin staining and immunohistochemistry results showed that cell sheet was composed of 2–3 layers of cells and extracellular matrix was maintained intact. As compared with traditional cell harvest using trypsin digestion, cell sheet fabrication causes no damage to cell membrane and extracellular matrix. Hence, cell sheets would form a better interaction with tissues in situ, and a higher cell viability and therapeutic efficiency would be expected.

**Keywords:** adipose tissue derived mesenchymal stem cells, hepatocytes, cell sheet, transplantation

**Received:** December 4, 2008; **Accepted:** February 22, 2009

**Corresponding author:** Xiaojun Zhao. Tel: +86-28-8516-4069; Fax: +86-28-85164072; E-mail: Xiaojunz@mit.edu

毒性损伤、病毒感染、基因功能紊乱等诸多因素都会造成急性或是慢性肝功能衰竭。而作为目前晚期肝病治疗有效手段之一的肝器官移植又受到来源及免疫排斥等问题的限制<sup>[1,2]</sup>。随着对人体丰富的成体干细胞——脂肪间充质干细胞的分化潜能研究的深入<sup>[3,4]</sup>,使得在体外获得大量可移植的类肝细胞成为可能。但是传统的利用酶消化从培养皿上获得细胞的方法不仅造成了对细胞的直接损伤,也造成了移植后功能恢复效率的降低<sup>[5]</sup>。本实验用全新的温度敏感性培养基在体外制备分化后的类肝细胞的细胞片,探讨这类细胞片的微观结构以及潜在的应用空间。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

N-异丙基丙烯酰胺和 I 型胶原酶购自 Sigma 公司;肝细胞生长因子和成纤维细胞生长因子-4 购自 R&D Systems 公司;Trizol 购自 Invitrogen 公司;反转录试剂盒购自 Ferments 公司;大鼠白蛋白抗体和 FITC 标记的兔抗羊抗体分别购自 BETHYL 和 KPL。RT-PCR 扩增引物(表 1)由大连宝生物工程公司合成。一只雄性清洁级 SD 大鼠(6 周龄,150 g)用于脂肪间充质干细胞的分离和培养,动物实验符合动物伦理学标准。

表 1 RT-PCR 扩增引物  
Table 1 Primers for RT-PCR

Primer name	Primer sequence (5'-3')
AFP-S	AATCTGTTCTCATTGGCTAC
AFP-A	CTCTGTCAATTCAGGCTTTT
CX32-S	TGGCTGTCCGTCATCTTATC
CX32-A	CTTGTGCCTCTTTACCTCTTCC
CK18-S	TCTTGCCGCTGATGACTTTA
CK18-A	GAGGTCTGAGATTTGGGAG
Albumin-S	AAACGCCGTTCTGTTCGATAC
Albumin-A	GGCTTGTGTTTCACCAAGCTC
GAPDH-S	GTGCTGAGTATGTCGTGGAGT
GAPDH-A	GCATCAAAGGTGGAGGAAT

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养、分化及检测

大鼠脂肪间充质干细胞的分离和培养<sup>[6]</sup>:用水合氯醛将 SD 大鼠麻醉后,分离其腹股沟皮下脂肪

组织 1.5 g 并在冰冷 PBS 中涮洗 3 次。用手术剪将脂肪组织剪碎成 1 mm 左右的小颗粒,随后和 15 mL I 型胶原酶的 PBS 溶液(0.1 wt%)混合并在 37°C 消化 90 min。加入等体积的含 10% 胎牛血清的 DMEM-LG 培养基终止消化并用 200 目筛网过滤消化液,以去除大块细胞团。滤液在 1000 × g 离心 10 min,去除脂肪细胞层和上层液体。细胞沉淀用 DMEM-LG 完全培养基重悬并接种到 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,培养条件控制在 37°C、5%CO<sub>2</sub> 和饱和湿度。3 d 后换液去除未贴壁细胞,每 3 天更换一次培养基,待细胞长到 80% 融合的时候进行消化传代,接种细胞浓度为 1000 个/cm<sup>2</sup>。

大鼠脂肪间充质干细胞的体外分化<sup>[7,8]</sup>:将第 3 代细胞以 1000 个/cm<sup>2</sup> 的浓度接种到表面经过胶原处理的 6 孔细胞培养板。每 3 天换一次培养基,待细胞长到 100% 融合时,将原来的 DMEM-LG 培养基换成含有 59% DMEM-LG、39% MCDB201、1 × ITS、1 × 10<sup>-9</sup> mol/L 地塞米松、1 × 10<sup>-4</sup> mol/L 维生素 C、2% 胎牛血清、20 ng/mL 肝细胞生长因子、10 ng/mL 成纤维细胞生长因子的肝细胞诱导培养基并持续培养 4 周,每 3 天更换一次培养基。

RT-PCR:用 Trizol 分别提取未分化、分化 2 周、分化 4 周的细胞总 RNA,提取方法参照试剂说明书。第一链 cDNA 用反转录试剂盒的 oligo-dT 引物合成。混合 5 pmol Albumin、AFP、CX32、CK18 和 GAPDH 上下游引物后进行 PCR 扩增,其中 GAPDH 为内参。

PAS 染色<sup>[9]</sup>:PAS 染色可用于检测糖原。经 4% 多聚甲醛固定 30 min 的分化细胞用 0.5% 高碘酸氧化 5 min,然后用雪夫试剂处理 15 min。自来水冲洗 5 min 之后用苏木素复染 1 min,并镜下观察。

#### 1.2.2 脱片用细胞培养皿的准备<sup>[10]</sup>

滴加 100 μL 45 wt% 的 N-异丙基丙烯酰胺异丙醇溶液在直径为 3.5 cm 的聚苯乙烯细胞培养皿(FALCON 3001)表面,并将其铺展均匀。然后用电子束进行照射以促使 N-异丙基丙烯酰胺分子聚合并连接到聚苯乙烯表面,照射条件为 200 kV、10<sup>-5</sup> torr,照射剂量为 0.3 MGy。用纯水将培养皿表面未结合的分子清洗干净并用环氧乙烷对其灭菌完毕。

#### 1.2.3 细胞片的制备与观察

经过 4 周分化之后,用含 0.02% EDTA 的 2.5 g/L

胰酶将分化的细胞消化 1~2 min。加等体积的含 10% 胎牛血清的 DMEM-LG 培养基终止消化。混合液在  $100 \times g$  离心 5 min, 所得细胞沉淀用肝细胞诱导培养基重悬并以  $200\ 000$  个/ $\text{cm}^2$  的细胞浓度接种到脱片用细胞培养皿上。在  $37^\circ\text{C}$  培养 2 d 后, 细胞达到完全融合。将培养皿在  $20^\circ\text{C}$  放置 30 min 使细胞脱片。

组织化学与免疫组化<sup>[11]</sup>: 从培养皿表面脱离下来的细胞片用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 然后用 PBS 洗 3 次, 每次 1 min。固定后的细胞片分别在 50%、60%、70%、80%、90%、100% 酒精中梯度脱水 4 min, 然后用二甲苯透明 10 min, 并在  $65^\circ\text{C}$  液体石蜡中孵育 1 h。温度降低之后, 得到细胞片的石蜡包埋块, 切片 ( $6\ \mu\text{m}$ ) 用于常规 HE 染色和免疫组化实验。

## 2 结果与分析

### 2.1 细胞培养与分化

光学显微镜下观察到, 未分化的脂肪间充质干细胞呈典型的成纤维细胞形态, 而在肝细胞诱导培养基中分化 4 周的细胞形态发生了显著变化, 大部分从原来的梭形变成了多角形或卵圆形(图 1)。此外也有少数细胞分化为典型的神经样细胞。

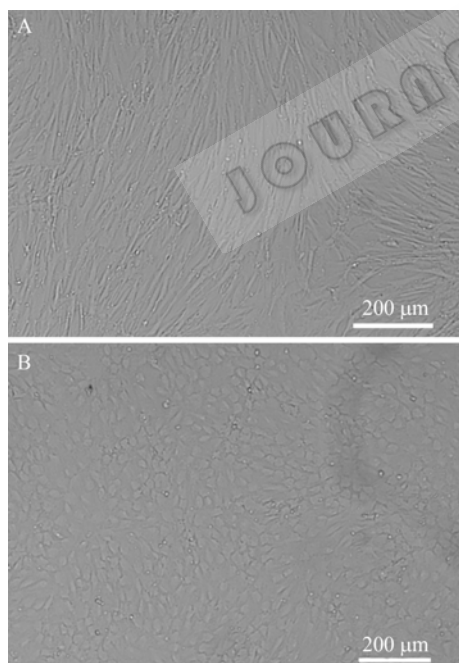


图 1 未分化与分化后脂肪间充质干细胞显微照片

Fig. 1 Microphotograph of undifferentiated and differentiated adipose mesenchymal stem cells. (A) Undifferentiated P3 adipose mesenchymal stem cells show typical fibroblast-like morphology. (B) The polygon morphology of differentiated hepatocyte-like cells.

如图 2 所示, RT-PCR 结果表明脂肪间充质干细胞向肝细胞分化。未成熟肝细胞标志甲胎蛋白(AFP)的转录在分化早期能够被检测, 但在 4 周之后的成熟分化细胞中不能被检测。本实验中所有的样品均显示成熟肝细胞特征标志间隙接头蛋白 CX32 阳性, 其表达水平有随着分化时间的增长而升高。另外一个成熟肝细胞相关基因 CK18 在分化 2 周还有分化 4 周的细胞中表达为阳性而在未分化的脂肪间充质干细胞中为阴性。同这 3 个基因相比, 分化中白蛋白的转录水平较高。此实验结果和 Sgodda<sup>[8]</sup>关于脂肪间充质干细胞分化研究的结果基本一致。

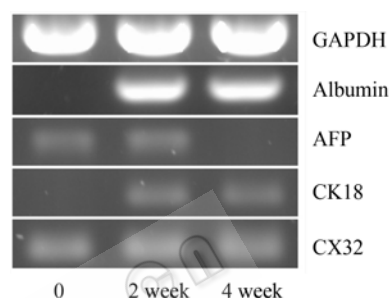


图 2 RT-PCR 结果

Fig. 2 RT-PCR results. RT-PCR results show the transcription level of Albumin, CK18 and CX32 increase with differentiation time. But the AFP transcripts can not be identified at the late stage of differentiation, indicating most cells have differentiated into mature hepatocytes.

PAS 染色结果显示弥散状红色糖原颗粒分布在细胞质中(图 3), 表明分化 2 周之后的细胞开始具备糖原储存的功能。此外, 细胞片的免疫组化结果也表明肝细胞特征白蛋白表达在细胞片中依然旺盛(图 7)。以上结果说明成体脂肪间充质干细胞具有向肝细胞分化的潜能。

### 2.2 细胞片的制备与观察

聚 N-异丙基丙烯酰胺是一类温度敏感的高分子, 它的临界溶解温度为  $32^\circ\text{C}$ <sup>[12]</sup>。当环境温度低于  $32^\circ\text{C}$  时, PNIPAAm 链和水分子形成氢键并溶于水, 分子链呈松散卷曲状; 而当温度高于  $32^\circ\text{C}$  时, 分子内部形成氢键, 异丙基暴露于分子链的外侧, 从而呈现出疏水性, 分子链也变成致密的球状<sup>[13]</sup>。PNIPAAm 的水溶液在  $4^\circ\text{C}$  和  $40^\circ\text{C}$  时分别表现为透明溶液和白色胶体(图 4)。

N-异丙基丙烯酰胺单体分子受到电子束照射之后能聚合到聚苯乙烯表面从而使细胞培养皿表面获得对温度响应的性质。如图 5 所示, 表面结合的纳

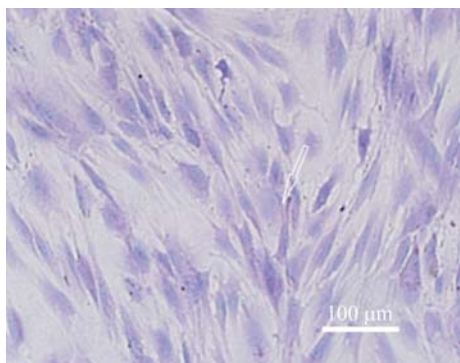


图3 PAS染色结果

Fig. 3 PAS staining result. Glycogen, as indicated by the white arrow, was detected by PAS staining in cells with two weeks of differentiation.

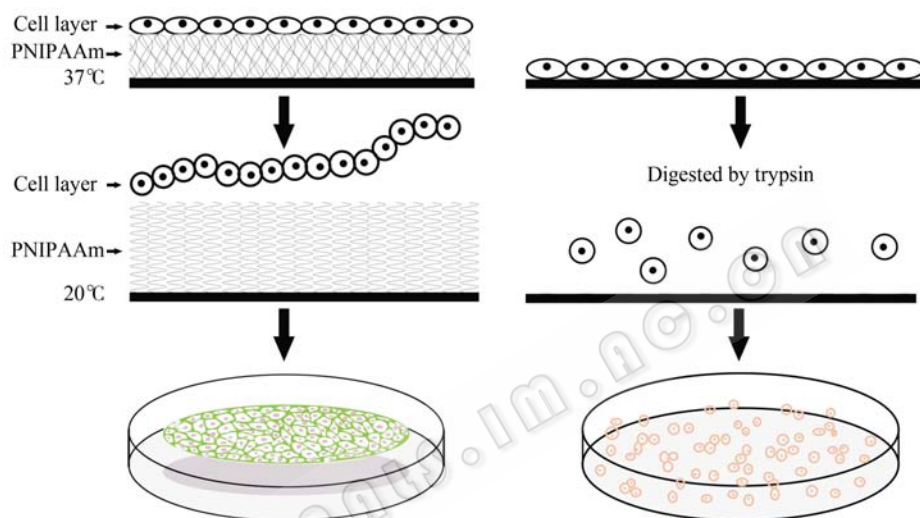


图5 细胞脱片过程示意图

Fig. 5 Schematic map of cell detachment from PNIPAAm grafted cell culture dish.

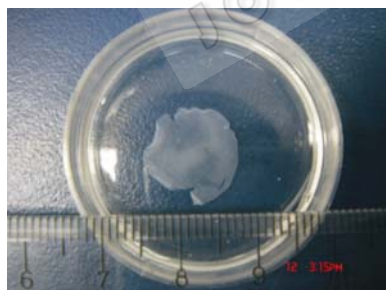


图6 从脱片用培养皿表面脱离下来的类肝细胞细胞片  
Fig. 6 Detached hepatocyte-like cell sheet from PNIPAAm grafted cell culture dish.



图7 类肝细胞细胞片的HE染色结果

Fig. 7 HE staining result of hepatocyte-like cell sheet.



图4 PNIPAAm水溶液在4°C和40°C时的性状

Fig. 4 The character of PNIPAAm solution at 4°C and 40°C. The PNIPAAm aqueous solution incubated at 4°C remains transparent fluid and turns into white hydrogel when surrounding temperature was raised to 40°C.

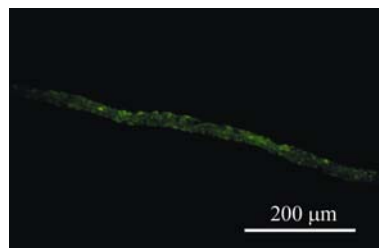


图8 类肝细胞细胞片的白蛋白免疫组化结果

Fig. 8 Albumin immunohistochemistry result of hepatocyte-like cell sheet.

米级 PNIPAAm 层在温度降到 32°C 以下时, 发生亲疏水性和构型的双重变化。其上培养的细胞层在感受到这种物理刺激时发生应激反应, 从培养底物表面脱离。本实验发现, 细胞脱片效率与温度及培养皿表面上 PNIPAAm 的结合状态密切相关。最理想的脱片培养皿是在聚苯乙烯表面结合上一层约 10 nm 厚的 PNIPAAm<sup>[14]</sup>。结合不足、过剩或没有将

表面黏附的 NIPAAm 分子清洗干净都将大大地影响细胞的脱片效率。在经过电子束照射却没有清洗的培养皿上直接培养细胞,结果显示细胞不能正常地贴壁生长。这可能是由于表面疏水性太高或者是一些没有聚合的 N-异丙基丙烯酰胺的毒性造成的。影响细胞脱片的另外一个重要因素是温度。比较在 20°C 和 4°C 下的脱片结果发现,20°C 下的脱片效率要高。20°C 下的脱片时间为 20~30 min,而在 4°C 下要等 4 h 以上才能脱片,也有很多培养皿上观察不到脱片现象。这说明脱片过程是由 2 种因素共同促发的:一个是温度变化引起的 PNIPAAm 分子链的构象改变,另外一个因素是细胞对这个变化的应激性反应<sup>[5]</sup>。过低的温度造成细胞的活性降低,从而使脱片的效率也大大降低。

把分化之后的类肝细胞以 200 000 个/cm<sup>2</sup> 浓度接种到 PNIPAAm 结合的培养皿表面,在 37°C 培养 3 d 后放于 20°C、10 min 之后就可以发现细胞层开始从培养皿边缘脱离,30 min 后细胞层脱离完全,形成一张厚薄均一的细胞片(图 6)。

HE 染色发现细胞片内普遍含有 2~3 层细胞(图 7)。大鼠白蛋白的免疫组化实验证明分化细胞在细胞片制备之后,肝细胞特征白蛋白的表达依然旺盛。细胞片上也有一些区域表现为白蛋白阴性,说明还有一部分杂细胞的存在(图 8)。

细胞是组织工程的重要素材,大规模细胞培养以获得临床上可用的细胞量是组织工程研究的重点之一。常规胰酶消化法收集细胞会造成细胞外基质的崩解,使细胞膜以及膜上蛋白受到一定程度的伤害,从而减弱细胞的原有功能<sup>[15-17]</sup>。尤其是对胰酶敏感的细胞株来讲,这种方法不能达到预期的治疗及科研的目的。而从 PNIPAAm 结合的细胞培养皿上直接脱片形成的细胞避免了酶对细胞造成的损伤,同时也保持了细胞外基质的完整,使得细胞能和活体组织更好更快地建立相互联系并发挥自身的功能<sup>[10,11,18,19]</sup>。细胞脱片技术适用于广泛的细胞种类,能为组织研究模型和病变组织替换提供丰富的来源。对肝病的组织工程治疗而言,无论是肝脏移植还是肝细胞移植都受到来源和数量的限制。随着对成体干细胞增殖、分化研究的深入,人们发现骨髓、脂肪间充质细胞可能成为极具潜力的肝外细胞来源。除了移植器官和悬浮细胞<sup>[20,21]</sup>之外,

把成体干细胞分化为类肝细胞并制备成可移植的细胞片将为肝病提供新的替代疗法。

由于细胞片基底细胞外基质的完整,多个同种或是异种的细胞片经层叠培养能形成全细胞的三维组织。通常三维组织的构建都依赖生物支架对细胞的支持。虽然生物材料的选择范围很广,能被加工成特定的结构供细胞贴附生长,但不可避免地伴随着一些风险。通过细胞片移植,可以大大降低由生物支架带来的炎症以及移植部位纤维化等风险<sup>[11]</sup>。此外,这类细胞片能主动贴附到一些移植部位<sup>[22]</sup>,避免了缝合线的使用,降低了某些手术的难度也能提升患者的康复质量。

## REFERENCES

- [1] Lee SW, Wang X, Chowhury NR, *et al.* Hepatocyte transplantation: State of the art and strategies for overcoming existing hurdles. *Ann Hepatol*, 2004, **3**(1): 48-53.
- [2] Grompe M. Liver repopulation for the treatment of metabolic diseases. *J Inher Metab Dis*, 2001, **24**(2): 231-244.
- [3] Parker AM, Katz AJ. Adipose-derived stem cells for the regeneration of damaged tissues. *Expert Opin Biol Ther*, 2006, **6**(6): 567-578.
- [4] Gimble JM, Guilak F. Differentiation potential of adipose derived adult stem (ADAS) cells. *Curr Top Dev Biol*, 2003, **58**(1): 137-160.
- [5] Okano T. Cell sheet engineering for tissue and organ regeneration. *Tissue Eng*, 2007, **13**(4): 882-883.
- [6] Zheng B, Cao BH, Li GH, *et al.* Mouse adipose-derived stem cells undergo multilineage differentiation *in vitro* but primarily osteogenic and chondrogenic differentiation *in vivo*. *Tissue Eng*, 2006, **12**(7): 1891-1901.
- [7] Talens-Visconti R, Bonora A, Jover R, *et al.* Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol*, 2006, **12**(36): 5834-5845.
- [8] Sgodda M, Aurich H, Kleist S, *et al.* Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue *in vitro* and *in vivo*. *Exp Cell Res*, 2007, **313**(13): 2875-2886.
- [9] Aurich I, Mueller LP, Aurich H, *et al.* Functional integration of human mesenchymal stem cell-derived hepatocytes into mouse livers. *Gut*, 2006, **56**(4): 405-415.
- [10] Okano T, Yamada N, Sakai H, *et al.* A novel recovery-system for cultured-cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly (N-Isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res*, 1993, **27**(10): 1243-1251.

- [11] Ohashi K, Yokoyama T, Yamato M, *et al.* Engineering functional two- and three-dimensional liver systems in vivo using hepatic tissue sheets. *Nat Med*, 2007, **13**(7): 880–885.
- [12] Zhang XZ, Yang YY, Chung TS, *et al.* Preparation and characterization of fast response macroporous poly (N-isopropylacrylamide) hydrogels. *Langmuir*, 2001, **17**(20): 6094–6099.
- [13] Zareie HM, Bulmus EV, Gunning AP, *et al.* Investigation of a stimuli-responsive copolymer by atomic force microscopy. *Polymer*, 2000, **41**(18): 6723–6727.
- [14] Harimoto M, Yamato M, Hirose M, *et al.* Novel approach for achieving double-layered cell sheets co-culture: Overlaying endothelial cell sheets onto monolayer hepatocytes utilizing temperature-responsive culture dishes. *J Biomed Mater Res*, 2002, **62**(3): 464–470.
- [15] Waymouth C. To disaggregate or not to disaggregate, injury and cell disaggregation, transient or permanent. *In Vitro*, 1974, **10**(1): 97–111.
- [16] Osunkoya BO, Mottram FC, Isoun MJ. Synthesis and fate of immunological surface receptors on cultured burkitt lymphoma cells. *Int J cancer*, 1969, **4**(2): 159–165.
- [17] Revel JP, Hoch P, Ho D. Adhesion of culture cells to their substratum. *Exp Cell Res*, 1974, **84**(2): 207–218.
- [18] Okano T, Yamada N, Okuhara M, *et al.* Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces. *Biomaterials*, 1995, **16**(4): 297–303.
- [19] Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, *et al.* Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med*, 2006, **12**(4): 459–465.
- [20] Han B, Lu Y, Meng B, *et al.* Cellular loss after allogenic hepatocyte transplantation. *Transplantation*, 2009, **87**(1): 1–5.
- [21] Strom SC, Fisher RA, Thompson MT, *et al.* Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation*, 1997, **63**(4): 559–569.
- [22] Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, *et al.* Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med*, 2004, **351**(12): 1187–1196.

### 我单位《生物工程学报》等4种期刊论文数据库制作完成并上网

为提高期刊的显示度, 加强对历史文档的整理、保护和利用, 更好地为科研人员提供信息服务, 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部历时近1年, 将包括《生物工程学报》、《微生物学报》、《菌物学报》、《微生物学通报》等4种期刊自第1卷第1期开始, 全部逐页扫描、分类检索, 进行数字化制作, 建成了回溯文档全文数据库, 共计130卷620余期, 约1万多篇论文。由于年代久远, 很多版本已成孤本, 搜集整理及制作工作耗时半年多, 目前已全部完成, 并已上传至各编辑部网页供所有读者免费浏览下载。读者只要输入题目、关键词、年卷期、作者、单位等信息, 就可以方便地检索出四刊发表过的全部相关文章。

此外, 2008年起, 我所四刊将采用 Open Access(开放存取)模式出版, 各刊当期新发表的文章将先于印刷版在网上全文发布, 以利信息的更快传播, 提高文章的阅读量和被引频次。

欢迎浏览下载, 欢迎投稿。请登录期刊联合编辑部网址: <http://journals.im.ac.cn>。