

# 胎肝造血期胎肝间充质干细胞的分离、培养及生物学特性

吴北燕, 黄绍良, 陈惠芹, 张绪超, 魏菁

(中山大学附属第二医院干细胞研究中心, 广东 广州 510120)

**摘要:**【目的】分离、培养人胎肝造血期胎肝间充质干细胞(MSC), 研究其生长特性及表面标记的表达。【方法】取孕 16-20 周人胚胎肝脏, 分离培养胎肝 MSC, 传代培养成系并检测其增殖能力, 应用流式细胞术、免疫荧光方法检测其造血相关表面标记和细胞蛋白表达。【结果】人胎肝 MSC 呈成纤维样形态, 指数生长期倍增时间约为 16h, 细胞增殖 26.5 倍。传代 15 次仍有 94.18% 的细胞处于 G0/G1 期。流式细胞仪检测结果显示人胎肝 MSC 表达 CD29、CD44、CD105、CD106 和 CD166, 不表达 CD31、CD34、CD45, 不表达与 GVHD 相关的 HLA-DR、CD80、CD86、CD40、CD40L。免疫荧光检测结果显示胎肝 MSC 表达造血微环境细胞外基质蛋白 Fibronectin、 $\alpha$ -SMA 及上皮细胞标记蛋白 AFP 和 E-cadherin。【结论】人胎肝 MSC 具有胚胎造血组织和发育中的肝脏特异的相关分子表达, 免疫原性弱, 可以作为研究造血、胎肝发育机制的模式细胞。

**关键词:** 胎儿, 肝脏; 间充质干细胞; 造血发生; 肝脏发生

中图分类号: R329.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)05-0498-04

## Isolation, Culture, and Biological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells from Fetal Liver in Fetal Liver Hematopoietic Stage

WU Bei-yan, HUANG Shao-liang, CHEN Hui-qin, ZHANG Xu-Chao, WEI Jing

(Center for Stem Cell Research, Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:**【Objective】To isolate and culture the mesenchymal stem cells (MSC) from fetal liver in fetal liver hematopoietic stage and study the growth characteristics and surface markers in these cells.【Methods】MSC of fetal liver in human embryos of 16-20 weeks were isolated and cultured in vitro. Besides their growth characteristics were studied, expression of hematopoiesis related surface markers and proteins were analyzed by flow cytometry and immunofluorescence methods.【Results】Fetal liver MSC held the morphology of fibroblastoid cells. During logarithmic growth period, the cell doubling time was about 16 h. The maximal cell number was increased by 26.5 times. 94.17% of fetal liver MSC in P15 remained in G0/G1 stage. By flow cytometry, surface markers CD31, CD34, CD45 were negatively expressed, either the GVHD related HLA-DR, CD80, CD86, CD40 and CD40L. However, CD29, CD44, CD105, CD106, and CD166 were positively detected. Through immunofluorescence assay, hematopoiesis related extracellular proteins fibronectin and  $\alpha$ -SMA were positively expressed in fetal liver mesenchymal stem cells, as well as the epithelial marker protein AFP and Ecadherin.【Conclusions】Fetal liver MSC expressed some liver specific proteins as in fetal hematopoietic tissue, and in developing liver. It presents very weak immunogenicity, and can be used as model cells for further research in hematopoiesis and fetal liver ontogeny mechanisms.

**Key words:** liver, fetus; mesenchymal stem cells; research in hematopoiesis ontogeny, liver ontogeny

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2005, 26 (5):498-501]

在人类胚胎造血过程中, 造血细胞和造血器官在不同的发育位点、不同发育时段和功能状态下程序式精确进行, 其中胎肝是重要的造血器官

之一。它一方面支持和促进造血, 另一方面自身发育成熟为代谢器官。在胎肝造血期, 胎肝组织是造血细胞、内皮细胞、基质细胞和发育中的肝细胞的

收稿日期: 2005-02-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30300377); 教育部博士点基金资助项目(20030558070); 中国博士后科学基金资助项目(2003033432);“十五”863计划资助项目(2003AA205008)

作者简介: 吴北燕(1972-), 女, 广东汕头人, 在职博士生, 副主任医师, 现在汕头大学第一附属医院儿科工作; 通讯作者: 黄绍良, 教授, 博士生导师, E-mail: hshl@gzsums.edu.cn

混和细胞群,其中也包含了成体干细胞——间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)。目前关于MSC的研究主要集中于成人骨髓MSC,但由于造血发育不同时空位点的造血干细胞具有不同生物学特性,相应造血微环境的MSC也应具有不同的功能特点。因此本实验从胚胎造血发育主要时空点之一的造血旺盛期的胎肝组织分离培养MSC,并研究其生物学特性,为探讨人胚胎造血的发生机制提供模式细胞,为MSC的临床应用提供备选细胞源和实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

取自本院妇产科,经米索前列醇药物引产的16~20周人胚胎(经供者知情同意)。

### 1.2 主要试剂

LG-DMEM、2.5 g/L 胰蛋白酶购自 Gibco 公司。胎牛血清(FBS)购自 Hyclone 公司。荧光标志小鼠抗人抗体 CD31-PE、CD34-PE、CD45-FITC、CD29-PE、CD44-FITC、CD105-FITC、CD106-FITC、CD166-FITC、CD80-FITC、CD86-FITC、CD40-PE、CD40L-FITC、anti-HLA-DR-FITC 均为 Pharmingen 公司产品。小鼠抗人甲胎球蛋白(-Fetoprotein, AFP)、小鼠抗人 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白(-Smooth Muscle Actin, -SMA)、兔抗人纤维连接蛋白(Fibronectin, FN)、兔抗人E钙粘蛋白(E-cadherin)单克隆抗体及羊抗小鼠 IgG-FITC、BSA 封闭液购自武汉博士德公司,胶原酶、羊抗兔 IgG-Cys 购自 Sigma 公司。

### 1.3 人胎肝 MSC 的分离和培养

分离胎肝置含 50 mL/L FBS 的 PBS 中,反复剪切成 1~2 mm<sup>3</sup> 小块,0.5 g/L 胶原酶 37 °C 消化 20 min,吸管大力吹打成细胞悬液,消化液、组织块和细胞悬液的混和液顺序通过单层纱布和 200 目筛网,PBS 清洗后以 1.077 g/mL FicolI 分离液制备单个核细胞,洗涤后按 1×10<sup>6</sup>/cm<sup>2</sup> 密度接种 25cm<sup>2</sup> 培养瓶,加入胎肝 MSC 培养液,培养液为含有 10% FBS、双抗(青霉素加链霉素)的 LG-DMEM。置于 37 °C、体积分数 5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中,3 d 后全量换液去除未贴壁细胞,以后每 3~4 d 换液 1 次,待细胞融合达 80%~90%,用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化,按 1:3 的比例传代。并对细胞形态学进行观察。

### 1.4 人胎肝 MSC 生长特性的检测

1.4.1 绘制生长曲线 将细胞悬液以 2×10<sup>3</sup>/cm<sup>2</sup>

的密度接种于 6 孔板内,依次于培养第 1 天至第 9 天消化细胞计数,根据每天的细胞数绘制生长曲线。每个样本进行 3 次实验,每次实验均采用复孔。

1.4.2 细胞周期测定 分别将 P3 代、P15 代胎肝 MSC 用 PBS 洗涤后,用 700 mL/L 乙醇固定破膜, RNA 酶消化,PI 染色,流式细胞仪分析 DNA 含量。

### 1.5 人胎肝 MSC 表面标志的检测

1.5.1 流式细胞仪检测 将胎肝 MSC 用 PBS 洗涤后,分别加入荧光标志小鼠抗人抗体:CD31-PE、CD34-PE、CD45-FITC、CD29-PE、CD44-FITC、CD105-FITC、CD106-FITC、CD166-FITC、CD80-FITC、CD86-FITC、CD40-PE、CD40L-FITC、anti-HLA-DR-FITC,室温孵育 30 min, PBS 洗去未结合抗体,10 g/L 多聚甲醛固定,应用 FACScan 流式细胞仪(B-D 公司, Ver3.0) 检测细胞上述表面抗原的表达情况,同型 IgG 作为相应的阴性对照。

1.5.2 免疫荧光细胞化学染色 采用间接免疫荧光方法。将胎肝 MSC 培养至 50%~60% 融合, PBS 洗涤后无水乙醇固定,每孔加 BSA 封闭液 0.2 mL, 37 °C 保湿封闭 20 min。去血清后分别加一抗小鼠抗人 AFP、小鼠抗人 $\alpha$ -SMA、兔抗人 FN、兔抗人 E 钙粘蛋白,并以 PBS 代替一抗建立阴性对照, 37 °C 保湿孵育 30 min 后, PBS 充分洗涤加二抗抗体羊抗小鼠 IgG-FITC、羊抗兔 IgG-Cy3 37 °C 保湿孵育 1 h。PBS 洗涤后,荧光显微镜下观察并记录拍照。

## 2 结果

### 2.1 人胎肝 MSC 的分离培养及形态学观察

接种后 3 d 换液时可见贴壁细胞呈圆形、纤维样或内皮细胞样,均为单个细胞,未见细胞克隆,5~7 d 出现成团生长的细胞集落,15~21 d 长满瓶底,此时内皮样细胞少见,圆形细胞消失。经胰酶消化传代,经 5~7 d 细胞铺满,P2 代之后细胞生长迅速,2~5 d (平均 3 d) 细胞长满,2~3 代后内皮样细胞逐渐消失,维持成纤维样形态(见图 1)。

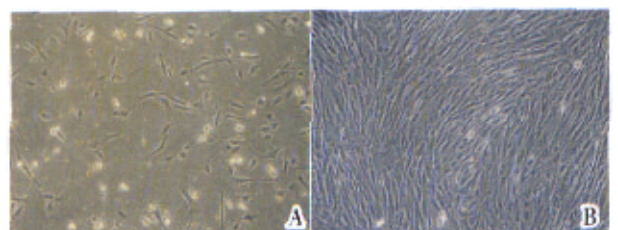


图 1 FL-MSC 细胞原代(A)和第 3 代(B)的细胞形态学, Fig.1 Morphology of FL-MSC of passages 0 and 3 (100×)

### 2.2 人胎肝 MSC 的生长特性

自第 2 代后细胞稳定生长, 以  $2 \times 10^3/\text{cm}^2$  接种于六孔板中, 1~2 d 为潜伏期, 第 4 d 进入指数生长期, 第 6~8 d 可长满, 生长速度减慢进入平台期。随着传代次数的增加, 细胞生长速度无明显改变, 指数期细胞倍增时间约 16 h。P3 传代第 8 天细胞计数达最高峰, 细胞倍增 26.5 倍, 细胞总数达  $53.87 \times 10^3/\text{cm}^2$ , 生长曲线见图 2。大部分细胞生长活跃、不分化, 处于  $G_0/G_1$  期, P15 代细胞的周期分析见图 3。

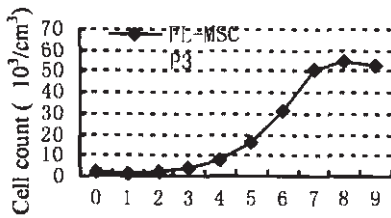
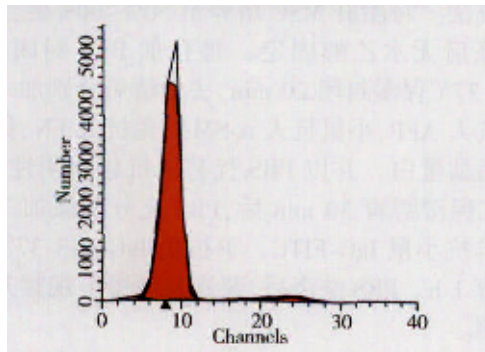


图 2 FL-MSC 细胞生长曲线图

Fig.2 Diagram of cell counting for FL-MSC



$G_0/G_1$  期占 94.18%, S 期占 1.51%,  $G_2/M$  期占 4.3%

图 3 P15 代 FL-MSC 细胞周期分析

Fig.3 Cell cycle analysis for FL-MSC of passage 15

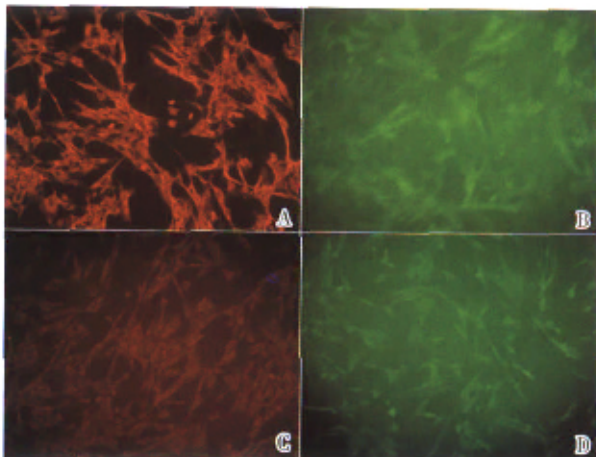


图 4 FL-MSC 相关分子的免疫荧光法检测

Fig.4 Immunofluorescence assay for related molecules in FL-MSC (100  $\times$ )  
Fibronectin(A),  $\alpha$ -SMA(B), E-cadherin(C) and AFP(D) were all positively expressed in FL-MSC

### 2.3 人胎肝 MSC 的表面标记检测

流式细胞仪检测结果显示内皮细胞或造血细胞抗原 CD31、CD34、CD45 在人胎肝 MSC 表面为阴性表达, 而 CD29、CD44、CD105、CD106、CD166 均为阳性表达; 与 GVHD 发生相关的标记 HLA-DR、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、CD40、CD40L 均为阴性。间接免疫荧光检测结果显示人胎肝 MSC 表达细胞外基质蛋白 Fibronectin、 $\alpha$ -SMA, 同时表达发育中的胎肝细胞即上皮细胞的标记 AFP 和 E-cadherin(图 4)。

## 3 讨论

人 MSC 是一种具有多向分化功能的成体干细胞, 最早从成人骨髓分离获得<sup>[1]</sup>。Sechi 等<sup>[2]</sup>报道 MSC 是在特定条件下能多向分化的匀质细胞, 易纯化, 体外培养 3 代纯度即达 95% 以上。周敦华等<sup>[3]</sup>比较脐血、胎儿骨髓、成人骨髓来源 MSC 发现, 不同来源 MSC 表面标志无明显差别。本研究从妊娠 16~20 周胚胎组织取材, 培养胎肝来源的 MSC, 以流式细胞仪检测细胞表面免疫标记发现, 培养细胞不表达造血细胞表面标志 CD45, 不表达内皮细胞表面标志 CD31、CD34, 高度表达黏附分子 H-CAM (CD44) 和 CD29、低表达黏附分子 VCAM-1 (CD106), 表达 CD105、CD166 等间充质细胞表面标志。同时胎肝 MSC 的 P3 代细胞 CD29、CD44、CD105、CD166 阳性细胞数达到 95% 以上, 为高度匀质的细胞群, 符合 MSC 特点。国内学者以同样的培养体系也获得了胎肝来源 MSC, 同时诱导分化实验还表明, 胎肝来源 MSC 具有向成骨、脂肪组织分化的能力和向肝脏组织分化的潜能, 证实了胎肝 MSC 的干细胞特性<sup>[4]</sup>。

本研究以流式细胞技术检测了与 GVHD 发生相关的标记: HLA-DR、B7-1 (CD80)、B7-2(CD86)、CD40、CD40L 均为阴性。作为细胞移植的备选细胞, MSC 是否表达与 GVHD 相关的组织相容抗原及其共刺激因子是移植成功的一个要素。HLA 抗原及其共刺激因子 CD80/CD86 是机体识别和提呈异体抗原的免疫基础, 而 CD40/CD40L 亦是一条重要的共刺激途径, 在 GVHD 中起重要作用<sup>[5]</sup>。已有研究证实胎肝 MSC 不表达 HLA- 类抗原<sup>[6]</sup>, 本研究与其结果一致, 同时与 GVHD 密切相关的共刺激分子 CD80/CD86 和 CD40/CD40L 为阴性, 表明胎肝 MSC 免疫原性弱, 有利于异基因移植应用。

骨髓是 MSC 的重要来源, 但成人骨髓中 MSC

的含量极低,约 $10^4\sim 10^5$ 个单个核细胞中才含有1个MSC<sup>[1]</sup>;而胚胎组织中MSC的含量相对较高,妊娠中期胎肝细胞中每 $10^3$ 个细胞约含有MSC 2.8个,比例低于同期的骨髓和脾脏,但高于成人骨髓的MSC含量。比较不同来源MSC的分化能力,还发现尽管他们表型基本一致,但体外增殖特性不尽相同,胎肝来源的MSC分化为成骨组织的能力低于胎儿骨髓、脾脏来源的MSC<sup>[7]</sup>;周敦华等<sup>[3]</sup>也发现胎儿骨髓和脐血来源MSC与成人骨髓MSC比较更原始、具有更高的增殖潜能。因此认为MSC的功能与发育阶段、组织定位关系密切,不同时期、不同组织的MSC可能具有不同的临床应用前景。本研究对胎肝MSC体外培养的结果显示,培养获得的细胞呈梭型、为成纤维细胞样细胞群,早期与少数内皮样细胞共生长,多次传代后细胞均一、生长迅速,倍增时间为16h,倍增速度明显快于成人骨髓MSC(30~33h)<sup>[1]</sup>和妊娠早期胚胎来源MSC(49.5~52.2h)<sup>[8]</sup>的倍增时间,生长高峰期培养细胞总数扩增26.5倍。传代15次获得的细胞生长周期检测显示94.18%的细胞处于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期。提示胎肝MSC具有较大的增殖潜能,其纯度和增殖特性符合临床组织工程的要求。

造血干/祖细胞与造血微环境、造血支持细胞间的相互作用对造血的发育发挥了重要作用。目前认为,造血支持细胞(包括MSC、基质细胞等)与其分泌的细胞外基质蛋白共同构成造血细胞赖以生存的空间支架,同时分泌造血因子间接地、和通过表面的黏附分子直接作用于造血细胞,支持和促进造血。本课题组的研究已发现,胎儿骨髓、脐血、成人骨髓来源的MSC均分泌造血生长因子TPO、Flt-3L和SCF;另一项研究则表明永久造血起源部位AGM区的造血支持细胞对脐血HSCs具有扩增作用,其中对CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>的原始细胞和LTR-IC作用尤为明显(为待发表资料)。胎肝作为胚胎发育期独特的器官,仅在胎肝造血期具有造血支持作用,待自身的代谢功能成熟后造血功能消失,因此胎肝造血旺盛期的MSC应具有鲜明的造血特性。本研究初步以间接免疫法检测胎肝MSC的蛋白表达发现,胎肝MSC表达Fibronectin、 $\alpha$ -SMA这两种细胞外基质蛋白,提示胎肝MSC能分泌构成造血微环境所必需的基质成分,从而在胎肝造血中对细胞黏附、分化及迁移过

程发挥重要作用。表达甲胎球蛋白(AFP)是早期胚胎肝细胞的特点,随着肝脏的代谢功能成熟表达水平逐渐下降,而与代谢有关的酶、白蛋白表达水平逐渐增高,具有成熟代谢功能后造血作用丧失。间接免疫荧光法检测到胎肝MSC同时也表达AFP和E-cadherin,这两种蛋白都是胎肝期上皮细胞、在胎肝也即发育中的肝脏细胞的标记蛋白,胎肝MSC的这种特性为研究者关注的以MSC作为肝病替代疗法种子细胞的设想提供了理论依据。而有关胎肝MSC分泌造血生长因子的情况及其对造血细胞的支持作用仍有待深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999,284(5411):143- 7.
- [2] Seshi B, Kumar S, Sellers D, et al. Human bone marrow stromal cells: coexpression of marker specific for multiple mesenchymal cell lineages[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2000, 26(3): 234- 46.
- [3] 周敦华,黄绍良,吴燕峰,等. 人间充质干细胞体外扩增及生物学特性的研究 [J]. *中华儿科杂志*, 2003, 41(8): 607- 10.
- [4] 赵运转,魏来,韩梅,等. 胎肝来源间充质干细胞的分离、培养与多向分化[J]. *中华肝脏病杂志*, 2004, 12(12): 711- 3.
- [5] 陈纯,黄绍良. CD40- CD40L在移植免疫中的研究进展. *国外医学输血与血液学分册* [J], 2001, 24(3): 217- 20.
- [6] Gotherstrom C, Ringden O, Tammik C, et al. Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2004, 190(1):239- 45.
- [7] in t Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential [J]. *Haematologica*, 2003, 88(8):845- 52.
- [8] Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow [J]. *Blood*, 2001, 98(8):2396- 402.

(编辑 张恩健)