

ES 细胞体外定向分化为成熟肝细胞的实验研究*

胡安斌^{1,2)} 蔡继业¹⁾** 郑启昌²⁾ 洪 岸¹⁾
何晓青¹⁾ 戴 云¹⁾ 单 于³⁾ 潘运龙¹⁾ 李凌松^{1,4)}

(¹⁾暨南大学生命科学院, 广州 510632; (²⁾华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科中心, 武汉 430022;

(³⁾中山大学医学院, 广州 510080; (⁴⁾北京大学干细胞研究中心, 北京 100083)

摘要 探讨了肝细胞在胚胎干细胞 (ES cell) 体外诱导分化系统中成熟分化的条件、机制及其鉴定方法。利用 TGF, bFGF、HGF 等细胞生长因子进行 BALB/c 小鼠 ES 细胞向肝细胞方向的定向诱导。利用反转录聚合酶链反应 (RT-PCR)、免疫细胞化学 (ICC) 和放射免疫法 (RIA) 动态检测肝细胞特异性基因和蛋白 AFP, ALB, G6P, TAT, CK8, CK18 等在培养体系中的表达, 并测定肝细胞的尿素合成功能, 最后测定肝细胞分化率。结果, 肝细胞特异基因 AFP, ALB, G6P 和 TAT 最早分别于第 3、9、11、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 $\mu\text{mol/L}$, 并随培养时间延长而浓度逐渐增加。最后, 测得生长因子诱导组肝细胞的分化率为 32%, 对照组肝细胞分化率为 8%。说明肝细胞可以在 ES 细胞体外诱导分化系统中出现并成熟分化, bFGF、HGF、OSM 等可以明显提高细胞分化率和成熟度, 有望成为解决肝功能替代疗法中细胞来源问题的新希望。

关键词 胚胎干细胞, 肝细胞, 定向分化

学科分类号 Q254

胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ES cell) 是从囊胚内细胞团中分离出来的原始全能干细胞, 是所有细胞的分化源头, 具有分化为所有组织和细胞的潜能^[1~4]。控制 ES 细胞的定向分化进而得到各种成熟的细胞、组织和器官, 是当今研究的热点。现在, ES 细胞已经用于多种细胞诱导分化研究, 取得了许多成果并积累了相当的经验^[5~9]。但是, ES 细胞向肝细胞分化方面的研究却起步很晚, 一些重要的问题, 如诱导分化的肝细胞的功能和肝细胞分化率等仍未有报道^[10~16]。而这对于解决肝细胞移植和肝脏组织工程中的细胞来源问题至关重要^[10]。为此, 本实验研究了一系列细胞因子和培养条件在 ES 细胞向肝细胞分化中的作用, 在利用多种肝细胞标记物对细胞进行充分鉴定的基础上, 对诱导培养系统中肝细胞的分化率进行了测定并力求提高肝细胞分化率, 为肝细胞移植和肝脏组织工程等奠定细胞来源的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 ES 细胞及细胞培养试剂: 实验细胞为 BALB/c 系小鼠 ES 细胞^[17]。ES 细胞培养基的成分为, DMEM (Gibco, BRL, USA), 20% 胎牛血清 (杭州四季清生物工程公司), 0.1 mol/L 2-巯基乙醇、25 mmol/L HEPES、100 U/ml 青霉素、100 mg/L 链霉素和 1 000 U/ml 重组小鼠白血病抑制因子

(Leukemia inhibitory factor, LIF) (Gibco, Bra, USA)。拟胚体 (embryonic body, EB) 培养基为不含 LIF 的 ES 培养基即为 EB 培养基。转化生长因子 (transform growth factor, TGF), 碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF)、制瘤素 (oncostatin M, OSM)、地塞米松 (DEX)、胰岛素、明胶和亚硒酸 (Sigma 公司, USA), 转铁蛋白 (transferrin, Gibco BRL, USA)。

1.1.2 RT-PCR 试剂: 总 RNA 提取和 RT-PCR 试剂盒购自上海 SANGON 公司。所用引物为, 甲胎蛋白 (α -fetoprotein, AFP, 5' TCGTATTCCAAC-AGGAGG, 5' AGGCTTTTGCTTCACCAG, 173 bp), 白蛋白 (albumin, ALB, 5' GCTAGGCACACAGTCTTG, 5' CAGGATTGCAGACAGATAGTC, 260 bp), 酪氨酸氨基转移酶 (tyrosineaminotransferase, TAT, 5' ACCTTCAATCCCATCCGA, 5' TCCCAGACTGGA-TAGGTAG, 206 bp), 葡萄糖-6-磷酸酶 (glucose-6-phosphatase, G6P, 5' CAGGACTGGTTCATCCTT, 5' GTTGCTGTAGTAGTCGGT, 210 bp), 内参照 β -actin (5' TTCCTTCTTGGGTATGGAAT, 5' GAGC-

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (2001CB510101) 和国家自然科学基金 (重点项目 30230350; 面上项目 60278014) 资助。

** 通讯联系人。 Tel: 020-85223569, E-mail: tjycj@jnu.edu.cn
收稿日期: 2003-11-24, 接受日期: 2004-02-25

AATGATCTTGATCTTC, 200 bp). 引物由上海SANGON公司合成.

1.1.3 ICC和RIA检测试剂和仪器: 抗小鼠AFP、细胞角蛋白8(CK8)和细胞角蛋白18(CK18)(DAKO, DENMARK), 抗小鼠ALB(Biodesign公司, USA). 免疫荧光及间接免疫细胞化学(SABC-ICC)试剂盒(BOSTER公司, 武汉). RIA试剂盒(上海生物制品研究所). 生化分析仪(Beckman Coulter, USA).

1.2 方法

1.2.1 ES细胞的肝细胞定向分化: 将存于液氮中的ES-BALB/c细胞解冻复苏, 用含LIF的ES培养基在0.1%明胶铺底的培养瓶中培养, 细胞密度为 2×10^4 /ml. ES细胞换用EB培养基, 摇动培养法培养5天, 使其悬浮生长发育为EB. EB发育5天后, 第6天转至0.1%明胶铺底的6孔培养板和24孔板上, 使其贴壁生长. 第7~11天, 加入 $20 \mu\text{g/L}$ TGF, $100 \mu\text{g/L}$ bFGF; 第7~19天, 加入 10^{-7}mol/L 地塞米松, 5mg/L 胰岛素, 5mg/L 转铁蛋白, 5mg/L 亚硒酸; 第11~19天, 加入 $20 \mu\text{g/L}$ HGF和 $10 \mu\text{g/L}$ OSM. 设立对照组, 只用EB培养液, 不加入HGF、bFGF、HGF和OSM等生长因子, 使EB细胞自然分化.

1.2.2 肝细胞鉴定

- a. RT-PCR检测: 第1天至第19天, 每隔1天, 即第1、3、5、7、9、11、13、15、17、19天收集诱导组和对照组细胞冻存于液氮中, 最后一起进行RT-PCR检测, 操作步骤按试剂盒说明.
- b. 培养液中AFP、ALB和尿素浓度的测定: 第1天至第19天, 每天收集生长因子组和对照组培养

上清液3 ml, 放射性免疫分析(RIA)测定AFP、ALB的浓度, 自动生化分析仪测定尿素浓度.

c. ICC检测: EB贴壁分化第2天开始, 即第7、9、11、13、15、17、19天在24孔板中对细胞进行间接免疫荧光和SABC法ICC检测, 观察肝细胞标记物AFP、ALB、CK8、CK18的表达.

1.2.3 测定肝细胞分化率: 分化第19天时, 在培养板中对ALB、CK8和CK183种蛋白质分子进行不同荧光标记抗体的免疫荧光检测, 并将荧光图像重叠, 得到3种蛋白质分子均表达的阳性细胞数, 计算阳性细胞数占总细胞数的比率, 即为肝细胞分化率.

1.2.4 统计学分析: 上清中AFP、ALB和尿素浓度值用($\bar{x} \pm s$)表示, 生长因子组和对照组的差异比较用t检验进行分析, 统计软件采用SPSS10.0 ($P < 0.05$ 为有意义).

2 结果

2.1 RT-PCR结果

诱导组AFP-mRNA在培养系统中于第3天出现, ALB-mRNA于第9天出现, G6P-mRNA于第11天出现, TAT-mRNA于第13天出现, 以上4种基因随培养时间延长而表达增强. 对照组细胞的AFP-mRNA在培养系统中于第3天出现, ALB-mRNA于第11天出现, TAT-mRNA和G6P-mRNA都于第15天出现. AFP是早期肝细胞标记物^[18], ALB是具备功能的肝细胞标记物^[18], G6P和TAT是肝细胞成熟分化的标记物^[19~21]. 本实验结果表明在ES细胞诱导分化系统中肝细胞可以自然出现并分化成熟, FGF、HGF和OSM等生长因子可以使其发生和成熟的时间提前(图1).

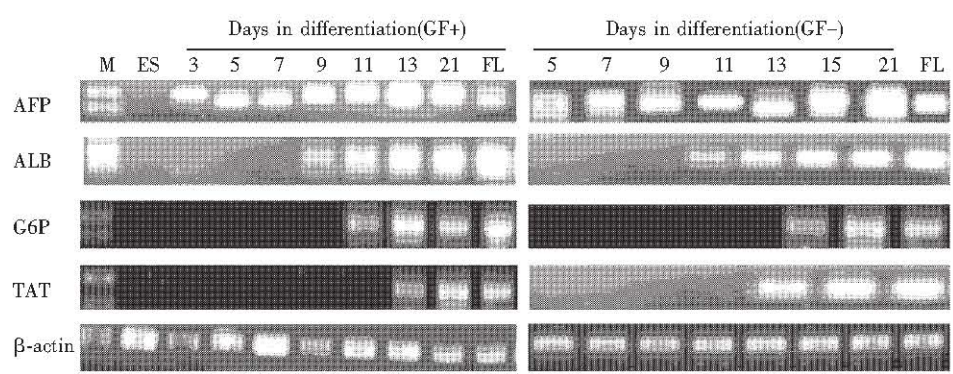


Fig. 1 Results of RT-PCR

RT-PCR analysis of hepatic genes expression in differentiating ES cells with and without growth factors. Cells were harvested and RT-PCR were performed at the indicate times (days). As a control, ES cells and mouse fetal liver (FL) were used. As a quality control of RNA, PCR primer for beta-actin was used. Results shown here were representative of five independent experiments. M: Molecular size marker for DNA; GF+: With growth factors; GF -: Without growth factors; FL: Mouse fetal liver at embryonic day12; AFP: Alpha-fetoprotein; ALB: Albumin; G6P: Glucose-6-phosphatase; TAT: Aminotransferase.

2.2 ICC 结果

诱导组细胞在第 7 天开始表达 AFP, 第 9 天开始表达 CK8、CK18^[22], 第 11 天开始表达 ALB. 对照组细胞在第 7 天开始表达 AFP, 第 11 天开始表达 CK8、CK18, 第 13 天开始表达 ALB. AFP 最早在卵黄囊细胞中表达, 出现最早, CK8、CK18 为肝细胞特异的骨架蛋白, 在肝细胞形成时即有表达^[22], 出现也较早, ALB 为肝细胞功能性蛋白, 出现较晚. 在空间分布方面, 阳性细胞分布在 EB 细胞群落的中心 1/4 区和边缘 1/4 区, 二者之间的中间区域几乎无阳性细胞分布, 对照组阳性细胞数量明显少于生长因子组. 另外, ICC 阳性细胞形态结构与小鼠肝细胞相比显示了相同的特点: 细胞直径为 20~30 μm , 多面型, 核大而圆, 位于细胞中央, 着色较深, 核型清楚, 核仁多个, 许多细胞双核或多核, 胞浆细胞器丰富 (图 2).

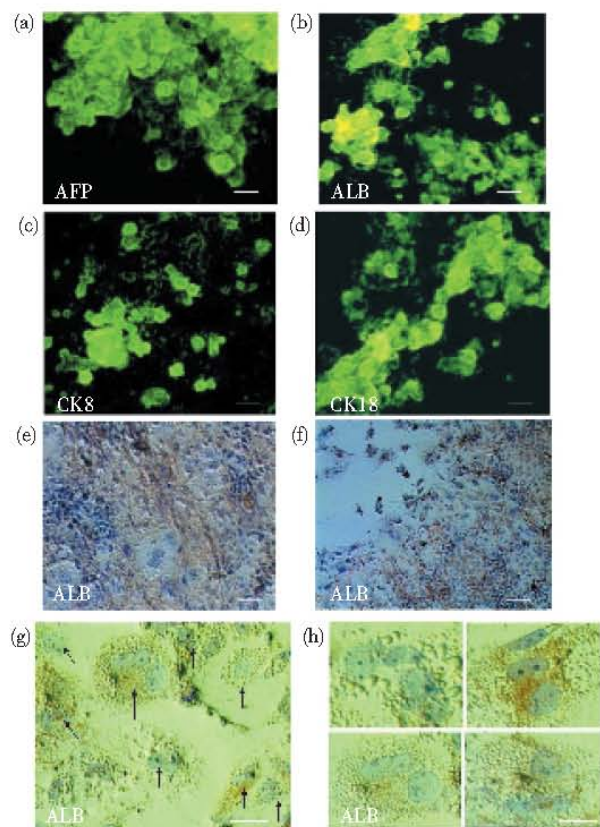


Fig. 2 Results of RT-PCR

(a) ~ (d): Immunocytochemistry (ICC/FITC) showing expressions of hepatic proteins in cytoplasm. Parts of day 19 EBs with previous growth factors were stained with antibodies to ALB and AFP, CK8, CK18 as indicated. (e), (f): ICC/DAB showing ICC-positive cells located in the innermost area and outmost area of every EBs cells cluster. (g), (h): ICC-positive cells were shown cell structures consistent with normal mouse hepatocytes in morphology. Scale bars (a) ~ (f): 40 μm ; (g): 30 μm ; (h): 15 μm .

2.3 RIA 结果

诱导组细胞培养液中, 于第 8 天开始检测到 AFP, 浓度为 $(3.4 \pm 0.6) \mu\text{g/L}$, 在第 17 天达到最高值 $(27.2 \pm 4.9) \mu\text{g/L}$; 于第 11 天开始检测到 ALB, 浓度为 $(0.21 \pm 0.04) \text{mg/L}$, 在第 19 天达到最高值 $(3.9 \pm 0.56) \text{mg/L}$; 于第 12 天开始检测到尿素, 浓度为 $(8.3 \pm 1.4) \mu\text{mol/L}$, 在第 19 天达到最高值 $(62 \pm 9.0) \mu\text{mol/L}$. 对照组细胞培养液中, 于第 9 天开始检测到 AFP, 浓度为 $(3.2 \pm 0.5) \mu\text{g/L}$, 在第 19 天达到最高值 $(15.2 \pm 1.9) \mu\text{g/L}$; 于第 13 天开始检测到 ALB, 浓度为 $(0.20 \pm 0.03) \text{mg/L}$, 在第 19 天达到最高值 $(2.8 \pm 0.36) \text{mg/L}$; 于第 14 天开始检测到尿素, 浓度为 $(7.8 \pm 1.4) \mu\text{mol/L}$, 在第 19 天达到最高值 $(27.2 \pm 4.8) \mu\text{mol/L}$. 两组的 AFP, ALB 和尿素浓度值分别在 11~19 天、13~19 天和 14~19 天的时间段内相比有显著性差异 ($P < 0.05$) (图 3).

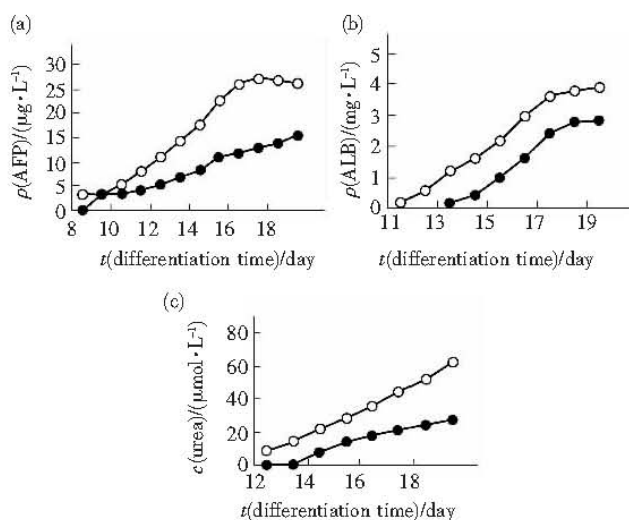


Fig. 3 Concentrations of AFP (a), ALB (b) and urea (c) in culture medium determined by RIA

Concentrations of AFP, ALB and urea in culture medium were analysed by RIA during the periods of hepatic differentiation (20 EBs and 1 ml medium in every well of 24-wells dishes). Values are the $(\bar{x} \pm s)$ of 5 experiments. The student's test was performed to compare the mean levels of AFP, ALB and urea respectively in GF+ groups with those in GF- groups. ○—○: GF+; ●—●: GF-.

2.4 肝细胞分化率

对分化第 19 天的肝细胞分化率测定共重复进行实验 5 次, 每次实验对 24 孔培养板中 10 个孔的肝细胞分化率进行测定, 诱导组的 5 次实验结果分别为: 30%、33%、30%、34% 和 33%, 取其均值得到诱导组肝细胞分化率为 32%. 对照组的 5

次实验结果分别为: 9%、10%、7%、6% 和 8%, 取其均值得到对照组肝细胞分化率为 8%。

3 讨 论

本实验进行了多种诱导因子对 ES 细胞向肝细胞定向分化的研究, 并从 mRNA 水平、胞浆蛋白质水平、胞外蛋白质水平对肝细胞进行鉴定, 最后测定了 ES 细胞分化系统中的肝细胞分化率。

在细胞因子的选择上, 本实验参考了体内胚胎肝脏发生分化中各种细胞因子的作用。小鼠胚胎发育至第 9 天时肝芽出现, 此时肝细胞受 TGF 和 FGF 的影响最大^[23], 2 天后, 肝芽粘附在内膜表面, 细胞基质的作用明显, 并开始受 HGF 的刺激。如缺乏 HGF, 胎肝体积发育会受影响而生长减慢。基于以上几点, 本实验选用 TGF、FGF、HGF 及胶原基质(白明胶)作为诱导因子来模拟肝细胞发生的内环境, 诱导 ES 细胞向肝细胞分化^[24~26]。在第 12~16 天, OSM 在肝细胞后期成熟过程中起到独特的作用并刺激肝细胞分化成熟, 因此选用 OSM 作为肝细胞进一步成熟分化的诱导因子^[27]。

AFP 因最早在卵黄囊中表达而作为幼稚肝细胞的标记物^[18], ALB 作为已具备功能的肝细胞标记物^[18], TAT, G6P 为后期肝细胞具备成熟功能的标记^[19~21], 在 RT-PCR 结果中, 它们的表达不但证明肝细胞在 ES 细胞分化系统中出现而且其表达时间符合肝细胞从幼稚到成熟的规律。在 4 种 mRNA 表达的时间方面, 本实验结果要早于 Jones 等^[12]的实验结果, 这可能与后者的培养体系中未用生长因子进行诱导有关。对照组在无外源性细胞因子的情况下仍能表达 4 种标记物的 mRNA, 这与 Jones 等^[12]和 Chinzei 等^[13]的结果一致, 但是 Hamazaki 等^[10]在同样情况下却未检测到各种肝细胞标记物的 mRNA 表达, 可能与后者 ES 细胞培养基中各种非生长因子添加物和 RT-PCR 操作有关。

AFP、ALB、CK8 和 CK18 4 种蛋白质在第 11 天时在同样一群细胞胞浆中表达, 在胞浆蛋白水平上进一步证明肝细胞在 ES 细胞分化体系中出现。Chinzei 等^[13]和 Yamada 等^[8]观察到 ALB 在 ES 细胞分化体系中出现, 但是未对它在分化体系中表达的时间规律进行观测, 本实验是第一次对 4 种蛋白质的表达进行动态观测并发现它们不同的表达时间规律。

肝细胞的一个重要功能就是尿素合成, 氨类经过肝脏的解毒合成功能变为尿素, 是肝脏解毒功能

的体现。第 12 天开始检测到尿素出现, 说明此时肝细胞可能已分化到成熟阶段并具备了尿素合成的功能, 这个时间在 ALB 出现以后, 可能说明肝脏尿素合成的功能晚于 ALB 产生的时间。

总之, ES 细胞在 FGF、HGF 和 OSM 等细胞因子的定向诱导下, 可以明显提高肝细胞的分化率, 在基因水平和蛋白质水平分别表达 AFP、ALB、CK8、CK18 等肝细胞标记物, 具备了 TAT, G6P 和尿素合成功能, 并最终获得 32% 的分化率。说明本实验中的肝细胞定向诱导系统可以提供数量充足的肝细胞, 从而为肝细胞移植和肝脏组织工程学带来新的希望。但是, 各种细胞因子在细胞诱导过程中的具体分子机理, 寻找特异高效肝细胞标记物, 提高肝细胞的分化率, 降低其免疫原性和致瘤性, 以及解决细胞分选问题, 仍有待于进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, **292** (5819): 154~156
- 2 Thomson J A, Itskovitz-Elder J, Shapiro S S, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, **282** (5391): 1145~1148
- 3 O'Shea K S. Embryonic stem cell Models of Development. *The Anatomical Record*, 1999, **257** (1): 32~41
- 4 Keller G M. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol*, 1995, **7** (6): 862~869
- 5 Klug M G, Soonpaa M H, Koh G Y, *et al.* Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest*, 1996, **98** (1): 216~224
- 6 Ng W A, Doetschman T, Robbins J, *et al.* Muscle isoactin expression during *in vitro* differentiation of murine embryonic stem cells. *Pediatr Res*, 1997, **41** (3): 285~292
- 7 Drab M, Haller H, Bychkov R, *et al.* From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting smooth muscle cells: a retinoic acid and db-cAMP *in vitro* differentiation model. *FASEB J*, 1997, **11** (20): 905~915
- 8 Yamada T, Yoshikawa M, Takaki M, *et al.* *In vitro* functional gut-like organ formation from mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2002, **20** (1): 41~49
- 9 Bain G, Kitchens D, Yao M, *et al.* Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*. *Dev Biol*, 1995, **168** (3): 342~357
- 10 Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, *et al.* Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells *in vitro*. *FEBS*, 2001, **497** (7): 15~19
- 11 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
- 12 Jones E A, Toshi D, Wilson D I, *et al.* Hepatic differentiation of murine embryonic stem cells. *Exp Cell Research*, 2002, **272** (1): 15~22
- 13 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
- 14 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 Cell*, 2002, **20** (2): 146 ~ 154
- 15 Choi D, Oh H J, Chang U J, *et al.* *In vitro* differentiation of mouse embryonic stem cells into hepacytes. *Cell Transplant*, 2002, **11** (4): 359 ~ 368
- 16 Ishizaka S, Shiroy A, Kanda S. Development of hepatocytes from ES cells after transfection with the HNF-3beta gene. *FASEB J*, 2002, **16** (11): 1444 ~ 1446
- 17 黄冰, 陈系古, 邓新燕, 等. BALB/c 小鼠胚胎干细胞系的建立及其嵌合体小鼠的获得. *细胞生物学杂志*, 2001, **23** (1): 28 ~ 32
- Huang B, Chen X G, Deng X Y, *et al.* *J Cell Biol*, 2001, **23** (1): 28 ~ 32
- 18 Sellem CH, Frain M, Erdos T, *et al.* Pattern of serum protein gene expression in mouse visceral yolk sac and fetal liver. *EMBO J*, 1984, **3** (6): 1881 ~ 1885
- 19 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
- 20 Chou J Y. Regulators of fetal liver differentiation *in vitro*. *Arch Biochem Biophys*, 1988, **263** (2): 378 ~ 386
- 21 Shelly L L, Tynan W, Schmid W, *et al.* Hepatocyte differentiation

- in vitro*: initiation of tyrosine aminotransferase expression in cultured fetal rat hepatocytes. *J Cell Biol*, 1989, **109** (23): 3403 ~ 3410
- 22 Moll R, Frank W W, Schiler D L, *et al.* The catalog of human cytokeratin polypeptides: patterns of expression of specific cytokeratins in normal epithelia, tumors and cultures cells. *Cell*, 1982, **31** (1): 11 ~ 24
- 23 Jung J, Zheng M, Goldfarb M, *et al.* Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science*, 1999, **284** (5422): 1998 ~ 2003
- 24 Cascio S, Zaret K S. Hepatocyte differentiation initiates during endodermal-mesenchymal interactions prior to liver formation. *Development*, 1991, **113** (1): 217 ~ 225
- 25 Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, *et al.* Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature*, 1995, **373** (6516): 699 ~ 702
- 26 Uehara Y, Minowa O, Mori C, *et al.* Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature*, 1995, **373** (6516): 702 ~ 705
- 27 Kamiya A, Kinoshita T, Ito Y, *et al.* Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *EMBO J*, 1999, **18** (8): 2127 ~ 2136

Mature Hepatocytes Obtained in ES Cells Directional Differentiation System *In vitro**

HU An-Bin^{1,2)}, CAI Ji-Ye^{1)*}, ZHENG Qi-Chang²⁾, HONG An¹⁾,
HE Xiao-Qing¹⁾, DAI Yun¹⁾, SHAN Yu³⁾, PAN Yun-Long¹⁾, LI Ling-Song^{1,4)}

(¹⁾ College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

(²⁾ Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China;

(³⁾ Medical College of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China;

(⁴⁾ Stem Cell Research Center, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract The mature differentiation of ES cells into hepatocytes and its differentiation ratio were studied *in vitro*. First, the BALB/c mouse ES cells were cultured for 5 days to develop into EBs in EBs culture medium. Then, the cell growth factors such as transform growth factor (TGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) and hepatocyte growth factor (HGF) were added into the medium to induce the differentiation of EBs cells into hepatocytes. During the culture medium, the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), immunocytochemistry (ICC) and radioimmunoassay (RIA) were used to determine the expression of hepatic genes and proteins, such as α -fetoprotein (AFP), albumin (ALB), glucose-6-phosphatase (G6P), tyrosineaminotransferase (TAT), cytokeratin 8 (CK8), cytokeratin 18 (CK18) and urea, to analyse the hepatic differentiation. At last, the hepatic differentiation ratio was also determined by counting the ICC-positive cells. In results, the mRNA of AFP, ALB, G6P and TAT didn't respectively expressed till at day3, day9, day11 and day13. AFP, ALB and urea in culture medium were not detected till at day8, day11 and day12 with a concentration of $(3.4 \pm 0.6) \mu\text{g/L}$, $(0.21 \pm 0.04) \text{mg/L}$ and $(8.3 \pm 1.4) \mu\text{mol/L}$. Hepatic proteins such as AFP, ALB, CK8, CK18 didn't respectively expressed in cytoplasm till at day7, day9, day9, day11 and ICC-positive cells had morphological structures consistent with mouse primary hepatocytes. Hepatic differentiation ratio was determined at day19 with ratio of 32%. In conclusions, hepatocytes could be obtained in ES cells differentiation system and get matured with differentiation ratio of 32% when growth factors such as TGF, bFGF and HGF added into culture medium. This may produce a new resource of hepatocytes in liver engineering and hepatocytes transplantation for treating hepatic failure.

Key words ES cells, hepatocytes, differentiation

* This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (2001CB510101) and The National Natural Sciences Foundation of China (30230350 and 60278014).

** Corresponding author. Tel: 86-20-85223569, E-mail: tjycal@jnu.edu.cn

Received: November 24, 2003 Accepted: February 25, 2004