



单克隆来源的小鼠胎肝 HPP-CFC 肝上皮 分化潜能的研究 *

周军年^{1)**} 王韞芳^{1)**} 要晖宇^{2)**} 贺文艳²⁾ 陈海旭¹⁾ 李思霆¹⁾ 史 岩¹⁾
施双双¹⁾ 南 雪¹⁾ 白慈贤¹⁾ 刘 兵³⁾ 岳 文¹⁾ 毛 宁^{2)***} 裴雪涛^{1)***}

¹⁾军事医学科学院输血医学研究所干细胞与再生医学研究室, 北京 100850;

²⁾军事医学科学院基础医学研究所细胞生物学研究室, 北京 100850;

³⁾军事医学科学院附属 307 医院肿瘤学研究室, 北京 100071)

摘要 为研究胎肝中造血和肝上皮发育的关系, 建立了小鼠胎肝高增殖潜能集落形成细胞(HPP-CFC)培养体系, 并进行了单克隆培养以及诱导分化实验. 在造血和肝诱导因子的共同作用下, 对单克隆来源的 HPP 集落细胞向造血和肝上皮细胞进行诱导分化, 采用透射电镜(TEM)、巢式 RT-PCR、细胞免疫荧光检测, 从细胞形态、超微结构、上皮细胞分化标志等方面对分化后的细胞进行检测. 检测结果显示, 诱导后的部分细胞具有肝细胞特异性的超微结构, 并不同程度地表达白蛋白(ALB)、甲胎蛋白(AFP)、细胞角蛋白(CK8, CK18)等肝上皮分化标志, 同时还表达间质标志 α -SMA 和血管内皮细胞标志 Flk-1. 免疫磁珠分选表明: 胎肝来源的 HPP-CFC 主要来自于 CD45⁺ 细胞, CD45⁺ 细胞不具有形成造血细胞克隆的能力. 在肝上皮细胞分化潜能上, 流式分选获得的 CD49f⁺/Sca-1⁺ 细胞与未分选细胞无明显差异. 该模型的克隆源性通过细胞混合实验进行证明. 研究结果表明, 改进的胎肝来源的 HPP-CFC 可能代表了一个新的造血细胞向肝上皮细胞分化的单克隆模型, 为研究胎肝中造血和非造血细胞的发育关系提供了一个新的切入点.

关键词 胎肝, 高增殖潜能集落形成细胞, 肝上皮细胞, 造血, 发育

学科分类号 Q2, Q132.4

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00769

自 1999 年 Petersen 等^[1]发现骨髓可产生肝卵圆细胞以来, 关于各种来源的造血细胞或造血干 / 祖细胞向肝上皮细胞分化的研究层出不穷^[2~4]. 虽然目前认为细胞融合(cell fusion)是可能的机制之一^[5], 但并不能解释所有的分化现象^[6], 而转分化(transdifferentiation)、逆分化、体外重编程等假说都没有得到确切的实验支持^[7]. 近期, Danet 等^[8]采用 C1qRp 作为分选标志, 发现骨髓和脐血中的这群 C1qRp⁺ 细胞既具有重建骨髓的能力也具有向肝上皮细胞分化的潜能. 同样的, 我们的前期研究也表明人脐血中的 β 2m⁺/c-Met⁺ 细胞亚群也具有同样的双向分化潜能^[9]. 而在肝卵圆细胞的研究中也发现, 小鼠和大鼠的肝卵圆细胞同时还表达 Sca-1, CD34, CD45 等造血细胞的标志^[10]. 这些研究都提示造血干细胞和肝卵圆细胞在肝再生过程中存在着密切关系. 但是, 上述研究并不能排除包含着独立的两个干细胞群体的可能性, 即肝干细胞和造血干

细胞.

胚胎发育过程中, 肝和造血存在着密切的关系. 胎肝是胚胎期主要的造血器官. 小鼠胎肝造血开始于小鼠胚胎发育的第 10.5 天(E10.5), 由 AGM (主动脉 - 性腺 - 中肾)区和 YS(卵黄囊)产生的造血细胞迁移而来, 随后在胎肝微环境中进行扩增, 旺盛造血期始于 E11.5. 在 E13~E15 期间, 此时小鼠胎肝产生的造血干细胞(HSCs)数量显著增加^[11]. AGM 区和 YS 作为造血和内皮共同发育的位点,

* 国家高技术研究发展计划(863)(2006AA02A107), 国家重点基础研究发展规划(973) (2005CB522702), 国家自然科学基金重点项目(30730043)和国家自然科学基金(30671098)资助项目.

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

毛宁. Tel: 010-66931318, E-mail: maoning@nic.bmi.ac.cn

裴雪涛. Tel: 010-66932240, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2008-11-09, 接受日期: 2009-01-09

已有研究报道存在造血-内皮共祖细胞^[12,13]。与此类似,胎肝亦是一个上皮、间质和造血细胞共同发育的微环境,造血和上皮细胞之间是否也存在着某种密切的联系呢?

小鼠是研究造血发育的主要动物模型,因此本文以 E12.5~E14.5 的小鼠胎肝为对象,建立了小鼠胎肝高增殖潜能集落形成细胞(HPP-CFC)模型和单克隆 HPP-CFC 集落的肝上皮诱导体系及检测方法。与既往采用细胞群体向肝上皮细胞诱导的体系相比,可更客观地反映单个细胞的分化潜能,从而避免细胞群体异质性问题的困扰。本研究首次报道了胎肝来源的单克隆 HPP-CFC 在诱导后不同程度的表达肝上皮标志,建立了一个新的研究胚胎发育过程中肝上皮和造血发育关系的体外模型,为进一步研究跨胚层分化和胎肝微环境中不同胚层来源细胞的相互作用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

甲基纤维素(粘度 4000)、转铁蛋白、地塞米松、ITS(胰岛素-转铁蛋白-硒酸钠)、尼克酰胺、硫代甘油(MTG)、半乳糖、无水葡萄糖、鸟氨酸、脯氨酸、DAPI、多聚甲醛均购自 Sigma 公司。牛血清白蛋白(BSA)、谷氨酰胺、无蛋白杂交瘤培养基(PFHM II)、IMDM, D/F12 培养基均购自 GIBCO 公司。胎牛血清(FBS)、丙酮酸钠购自 Hyclone 公司。Matrigel 购自 BD 公司。胶原酶 NB4 购自 SERVA 公司。 $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 购自北京化学试剂公司。35 mm 细菌培养皿(Petri Dish)、96 孔板购自 Corning 公司。生长因子 SCF、IL-3、GM-CSF、HGF、FGF4 均购自 PeproTech 公司。TPO、IL-11、OSM 购自 R&D 公司。bFGF 购自 Chemicon 公司。反转录与 PCR 等分子生物学试剂购自大连宝生物公司。基因组 DNA 提取试剂盒购自 Promega 公司。大鼠抗小鼠 CD45 抗体购自 Biolegend 公司。FITC 直标的大鼠抗小鼠 CD49f 抗体、PE 直标的大鼠抗小鼠 Sca-1 抗体及相应的同型对照均购自 ebioscience 公司。抗小鼠甲胎蛋白抗体购自 R&D 公司、绵羊抗小鼠白蛋白(ALB)抗体、TRITC 标记的牛抗绵羊 IgG 抗体,购自 Biotools 公司。FITC 标记的山羊抗大鼠 IgG 抗体购自北京中杉金桥公司。磁珠标记的山羊抗大鼠 IgG 购自 Miltenyi 公司。C57Bl/6 小鼠购自军事医学科学院动物中心。

1.2 方法

1.2.1 胎肝单细胞悬液的制备。6~8 周的 C57Bl/6 小鼠,傍晚按 2:1 的雌雄比例合笼,次日早上发现阴道栓的雌鼠单笼饲养,中午胚胎发育 0.5 天记为 E0.5 或 0.5dpc。取 E12.5 的孕鼠处死,75%酒精浸泡 2~3 min,无菌操作取出胎鼠,并在解剖镜下用镊子小心分离胎肝,去除胎肝周围的结缔组织,用预冷 PBS 冲洗干净血液,然后用 0.1%的胶原酶在 37℃ 消化 0.5~1 h,过 1 ml 注射器针头 2~3 次制备成单细胞悬液,过 400 目筛网,4℃,300 g 离心 8 min,用含有 10% FBS 的 IMDM 培养液重悬细胞后,进行 0.4%台盼蓝活细胞计数。随后接种到半固体培养基中或者进行磁珠分选和流式分选。

1.2.2 HPP-CFC 集落培养。HPP-CFC 半固体培养基配置方法主要根据我们以前建立的方法进行一定的改进^[14],主要含 0.9%甲基纤维素、2 mmol/L 谷氨酰胺、2 mmol/L 青霉素/链霉素、5%PFHM II、200 mg/L 转铁蛋白、1%BSA、0.45 mmol/L MTG、15%FBS 以及肝和造血因子的组合。造血因子组合: SCF (50 $\mu\text{g/L}$)、Tpo (10 $\mu\text{g/L}$ 或 4 U/ml)、IL-3 (10 $\mu\text{g/L}$)、IL-11(10 $\mu\text{g/L}$)、GM-CSF(10 $\mu\text{g/L}$)。肝诱导因子组合: HGF(30 $\mu\text{g/L}$)、FGF4(30 $\mu\text{g/L}$)、bFGF(10 $\mu\text{g/L}$)、1% ITS、以 2×10^4 个/ml 种入 35 mm 细菌培养皿,每皿含 HPP-CFC 集落培养基 2 ml。在 37℃, 5% CO_2 , 饱和湿度下培养 14 天,在显微镜下观察,致密集落直径 ≥ 0.5 mm 或散在集落直径 ≥ 1 mm 均为典型的 HPP-CFC 集落。本实验一般取在第 7 天达到上述标准的 HPP-CFC 集落进行下一步诱导实验。

1.2.3 细胞诱导。肝基础诱导培养基配置方法主要根据我们以前建立的方法^[14],100 ml 体积的培养基主要含 0.2 g BSA、0.1 g 无水葡萄糖、100 mg/L 青霉素/链霉素、0.2 g 半乳糖、0.003 g 脯氨酸、0.01 g 鸟氨酸、0.073 g 谷氨酰胺、0.061 g 尼克酰胺、0.054 4 mg $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.075 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.003 27 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 10^{-7} mol/L 地塞米松、1%ITS、10%FBS、用 D/F12 培养基定容到 100 ml。在显微镜下选取典型的 HPP-CFC 集落,用口吸管挑取 30~100 个克隆,分别一一重悬到含有 SCF (25 $\mu\text{g/L}$)、IL-3 (10 $\mu\text{g/L}$)、GM-CSF (10 $\mu\text{g/L}$)、HGF (30 $\mu\text{g/L}$)、FGF4 (30 $\mu\text{g/L}$)、bFGF (10 $\mu\text{g/L}$)、1% ITS 的 200 μl 肝诱导培养基中,然后分别接种到铺有 matrigel 的 96 孔板中,每周半量换液 2~3 次,从第 2 周开始,在诱导体系中添加

OSM (20 $\mu\text{g/L}$)继续诱导 1 周. 为避免克隆之间的污染, 口吸管在挑取 2 个克隆之间要用 PBS 洗涤 1~2 次.

1.2.4 巢式 RT-PCR 检测. 首先配制反转录体系 (20 μl): DEPC 水 10 μl , 5 $\times$ AMV 缓冲液 4 μl , random primer (50 pmol/L) 1 μl , RNA 酶抑制剂 (40 U/ μl) 0.5 μl , dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μl , NP40 (4%) 2.0 μl . 放于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中. 将 96 孔板中的培养基吸去, 用 PBS 洗涤细胞 1~2 次, 然后用加样器枪头充分混匀, 将每孔中贴壁和悬浮的细胞重悬到适量的 PBS 中并在 4 $^{\circ}\text{C}$, 300 g 条件下离心 8 min, 小心吸去多余的 PBS, 每管细胞加入上述配制的 18.5 μl 体系,

室温 10 000 r/min 离心 1 min, 然后迅速置于冰浴上使细胞充分裂解 15 min, 随后在其中加入 1.5 μl AMV 逆转录酶 (5 U/ μl), 进行常规反转录反应. 反转录程序如下: 25 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 60 min, 99 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$. 然后以所得的每一个诱导 HPP 克隆的 cDNA 作为巢式 PCR 检测模板. 巢式 PCR 引物序列及片段大小见表 1, 所有引物均为跨外显子设计. 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 预变性, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 扩增 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min. PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳并分析结果.

Table 1 Primers for nested RT-PCR

Genes	First set primers (5'→3')	Nested set primers (5'→3')	Length/bp
AFP	GAAGCAAGCCCTGTGAAGTC	TCGTATTCCAACAGGAGG	173
	GCTGCTCCTCTGTCAAGTTCA	AGGCTTTTGCTTCACCAG	
ALB	CCCTGTGTCTGAGACTTGCTA	GCTACGGCACAGTGCTTG	265
	TCACTCACTGGGTCTTCTCAT	CAGGATTGCAGACAGATAGTC	
α -SMA	ACCCAGATTATGTTTGAGACC	ACCCAGATTATGTTTGAGACC	107
	CCGTCAGGCAGGTCGTAG	AGAGTCCAGCACAAATACCA	
CD45	TGCAGAACCCAAAGACCT	TCACAAGCATGCATCCATCC	84
	GATAGATGCTGGCGATGA	TTCCAAGAGATTGAACAAGGCA	
CK8	CGTCTGTGGTGCTGTCTATG	GCCCAGTACGAGGACATTG	388
	TGGTCTTCGTATGAATGCTC	GCTTGCGGTAGGTGGTGAT	
Flk-1	AATTCAGAGCGATGTGTGGTC	AAAGAAGGAACTAGAATGCGG	246
	CTCTTCGCTTACTGTTCTGG	ACAGGAAACAGGTGAGGTAGG	
HPRT	GGGGGCTATAAGTTCTTTGC	GTTCTTTGCTGACCTGCTGG	247
	TCCAACACTTCGAGAGGTCC	TGGGGCTGTACTGCTTAACC	

AFP: α -Fetoprotein; ALB: Albumin; α -SMA: α -Smooth muscle actin; CK8: Cytokeratin 8; Flk-1: Fetal liver kinase-1; HPRT: Hypoxanthine phosphoribosyl transferase.

1.2.5 双色细胞免疫荧光检测. 将要检测的 96 孔中的细胞吸去培养基, 用 PBS 洗 2 次, 4% 多聚甲醛室温固定 10~15 min 后用 PBS 洗 2 次. 常温加 0.1% Triton X-100 破膜 5~15 min, PBS 洗 2 次, 用含 4% BSA 和 10% 山羊血清的封闭液室温封闭 30 min, 吸去封闭液后直接加入一抗混合物: 小鼠抗小鼠 AFP 抗体 (1:50), 绵羊抗小鼠 ALB 抗体 (1:100), 4 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜. 第 2 天, 吸去一抗混合液, 用含 0.05% Tween-20 的 PBS 洗 3 次, 每次 5 min. 然后加入 TRITC 标记的牛抗绵羊 IgG 抗体 (1:100) 和 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (1:50) 室温避光反应 30 min, 并再次用含 0.05% Tween-20 的 PBS 洗 3 次, 每次 5 min. 然后加入

DAPI 孵育 1~2 min, 洗 2 次后置于荧光显微镜下观察诱导的肝细胞特异性抗原表达情况.

1.2.6 胎肝细胞 CD45 磁珠分选. 将胎肝单细胞悬液计数后, 按 1 ml PBS 缓冲液含有 10^7 个细胞悬液, 4 $^{\circ}\text{C}$, 300 g 离心 8 min, 洗涤 2 次, 加入大鼠抗小鼠 CD45 抗体 0.5 μl , 使每 100 μl PBS 缓冲液中含有 10^6 个细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 旋转孵育 40 min. 随后同样的条件再洗 3 次. 将细胞重悬到 80 μl 含有 10^7 个细胞的 PBS 缓冲液中, 每 10^7 个细胞中加入 20 μl 磁珠标记的山羊抗大鼠 IgG 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 旋转孵育 15 min. 同样的条件洗 3 次后重悬到 500 μl PBS 缓冲液中. 磁珠分选柱先用 500 μl PBS 缓冲液洗 1 次, 然后加入细胞悬液, 使液体自然流下, 柱子

中液体快要流完时,再用 500 μ l PBS 缓冲液洗 3 次,收集流下来的 2 ml 液体即为 CD45⁻组分,去除磁场,用 500 μ l 含有 10% FBS 的培养基洗涤 2 次,并用活塞将液体全部打下来,即为 CD45⁺组分.将各组分离心浓缩,重悬到 1 ml 培养基中,计数. CD45⁻和未分选的胎肝细胞按照 2×10^4 个/ml 种入 35 mm 细菌培养皿, CD45⁺ 细胞按照 2×10^3 个/ml 种入 35 mm 细菌培养皿,每皿均含 HPP-CFC 集落培养基 2 ml.

1.2.7 胎肝细胞 CD49f/Sca-1 双标流式分选. 与上述步骤类似,在计数洗涤后,同时加入两种抗体,即 20 μ l CD49f-FITC 抗体和 1.25 μ l Sca-1-PE 抗体,使每 100 μ l PBS 缓冲液中含有 10^6 个细胞,并分出至少 10^6 个细胞加入同等浓度的同型对照中,4 $^{\circ}$ C 旋转孵育 40 min. 1 ml PBS 含 10^7 个细胞,4 $^{\circ}$ C 300 g 离心 8 min,洗涤 3 次,重悬到 200 μ l PBS 中,上流式细胞分选仪.分选后的 3 群细胞均按照 2×10^4 个/ml 种入 35 mm 细菌培养皿.

1.2.8 HPP-CFC 克隆源性鉴定. 首先将获取的小鼠胚胎在荧光显微镜下将 GFP⁺ 和 GFP⁻ 区分开来,随后将各个胚胎的胎肝和非胎肝组织编号,将胎肝置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存,快速提取非胎肝组织的 DNA 并对 Sry 基因进行 PCR 检测,以区分 Sry⁺ 和 Sry⁻ 小鼠胚胎.最后只将 Sry⁺GFP⁻ 和 Sry⁻GFP⁺ 2 种基因型的胎肝混合制备成单细胞悬液,接种后培养 7 天以获得典型的 HPP-CFC 集落.在荧光显微镜下分别挑取若干 GFP⁺ 和 GFP⁻ 集落,做好编号后进行 Sry 基因的巢式 PCR 扩增.如果一个克隆是双阳性的,则说明集落之间存在着不同基因型细胞污染.所用基因组巢式 PCR 引物序列: HPRT 第一轮, 5' GAGGGAGAAAAATGCGGAGT 3', 5' CGGA-AAGCAGTGAGGTAAGC 3', 片段长度 302 bp,退火温度 52 $^{\circ}$ C. HPRT 第二轮, 5' GAATCCTCTG-

GGAGACGACA 3', 5' CAGCAATGGCTCAGAA-ACG 3', 片段长度 230 bp,退火温度 57 $^{\circ}$ C. Sry 第一轮, 5' TGTGGTCCCGTGGTGAGA 3', 5' CA-ACAGGCTGCCAATAAA 3', 片段长度 369 bp,退火温度 52 $^{\circ}$ C. Sry 第二轮, 5' CAACAGGCTGCCAATAAA 3', 5' CATCGGAGGGCTAAAGTG 3', 片段长度 181 bp,退火温度 54 $^{\circ}$ C.

2 结 果

2.1 胎肝来源细胞半固体 HPP 培养体系的建立

本研究在 Yao 等^[12]的 HPP 培养体系基础上进行了一定的改进,即,去掉诱导红细胞分化成熟的 EPO,添加促进肝上皮细胞发育的细胞因子等(bFGF、HGF、FGF4 以及 ITS),后者和造血因子有较好的协同作用,不影响克隆的正常发育.而尼克酰胺对克隆则具有显著的生长抑制.半固体体系中加入尼克酰胺后无任何克隆产生,因此只在 HPP 克隆向肝上皮细胞的诱导体系中添加.胎肝来源的 HPP 集落可粗略分为两种类型,一种为致密型集落(图 1a),直径 ≥ 0.5 mm,另外一种为散在型集落,直径 ≥ 1 mm.一般的研究通常是在第 14 天进行典型的 HPP 集落分析.我们的研究发现,在第 7 天即有典型的 HPP 集落出现,在第 14 天时 HPP 集落底部出现较多的贴壁细胞(图 1b),这时的克隆已经开始分化,而且贴壁细胞无法用吸管挑取.因此我们挑取的 7 天集落特征是:细胞较致密,折光性好,边缘齐整.在液体诱导 3~7 天后即可见到贴壁的上皮样细胞和悬浮的造血细胞出现(图 1c).为尽可能避免不同 HPP 集落之间的交叉污染,在保证 HPP 正常生长的基础上, HPP 克隆密度要适当,通常全胎肝细胞在 35 mm 皿中的接种密度为 $3 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ 个细胞.

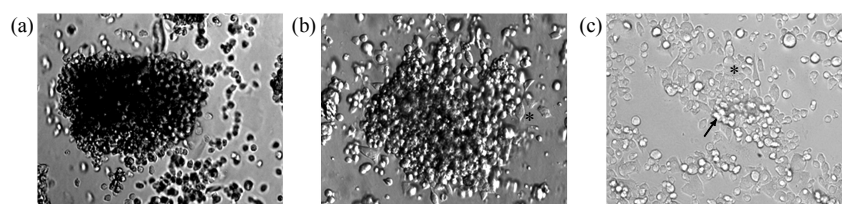


Fig. 1 Phase contrast image of a single HPP colony and induced cells

(a) Representative day 7 and (b) day 14 HPP-CFC colonies. (c) Individual HPP colony was induced at day 7 with hepatocyte-induced basal medium supplemented with a combination of hepatic and hematopoietic cytokines. Adherent cells are indicated with asterisk and arrowhead shows the nonadherent hematopoietic cells. Original magnification: 100 $\times$.

2.2 单个 HPP 克隆的液体诱导及肝上皮标志的检测

挑取的单个 HPP 克隆其分化特性也是不同的. 在同时含有造血因子和肝上皮诱导因子的液体诱导体系中, 所有的克隆均可以产生大量的悬浮的造血细胞. 部分克隆一直没有产生贴壁细胞; 部分虽然产生贴壁细胞, 但随着诱导的进行, 贴壁细胞逐渐死亡; 而相当一部分克隆的贴壁细胞可以维持到诱导结束(图 1c). 随后对诱导后的不同克隆进行了肝上皮超微结构和特异性标志的分析. 透射电镜结果表明, 诱导后的细胞出现了肝上皮细胞特有的超微结构, 如细胞表面的微绒毛、胞浆内大量的圆形线粒体和较多的糖原颗粒(图 2). 由于单个克隆的细胞较少(约 1 000~10 000 个), 无法直接提取 mRNA, 因此只能直接进行全细胞反转录, 并进行连续两轮 PCR 扩增, 结果显示, 诱导后细胞不同程度地表达肝上皮标志细胞角蛋白 8(CK8, 45.1%), 甲胎蛋白(AFP, 18.0%), 白蛋白(ALB, 4.9%)(表 2). 图 3 显示的是部分克隆的电泳结果(图 3a). 细胞免

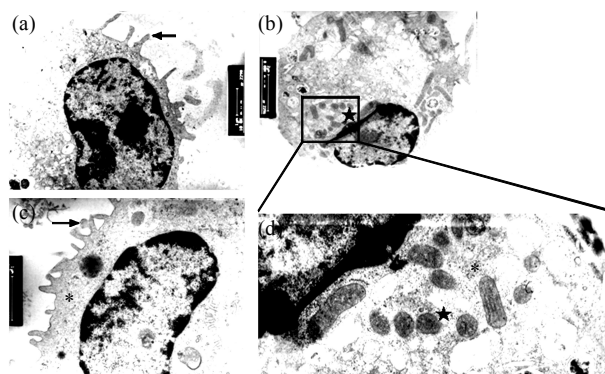


Fig. 2 Electron microscopic analysis of individual HPP colonies-derived cells after induced for 2 weeks

A typical type of hepatocyte-like cells is shown. There are many microvilli (arrowhead indicated) on the surface (a, c), large nucleolus (a), and many round-shaped mitochondria (pentagon indicated in b, d), lots of glycogen granule (asterisk indicated) in the cytoplasm (c, d). Figure 2d is magnification of Figure 2b.

Table 2 Number of induced HPP colonies assayed in nested RT-PCR

	Total	HPRT ⁺	CK8 ⁺	AFP ⁺	ALB ⁺
No. of colonies	122	81	55	22	6
Percentage/%	100	66.4	45.1	18.0	4.9

n = 6. HPRT⁺ indicated the clones with a successful reverse transcription reaction.

疫荧光的结果也显示诱导后的细胞在蛋白质水平上有 ALB 和 AFP 的表达(图 3b).

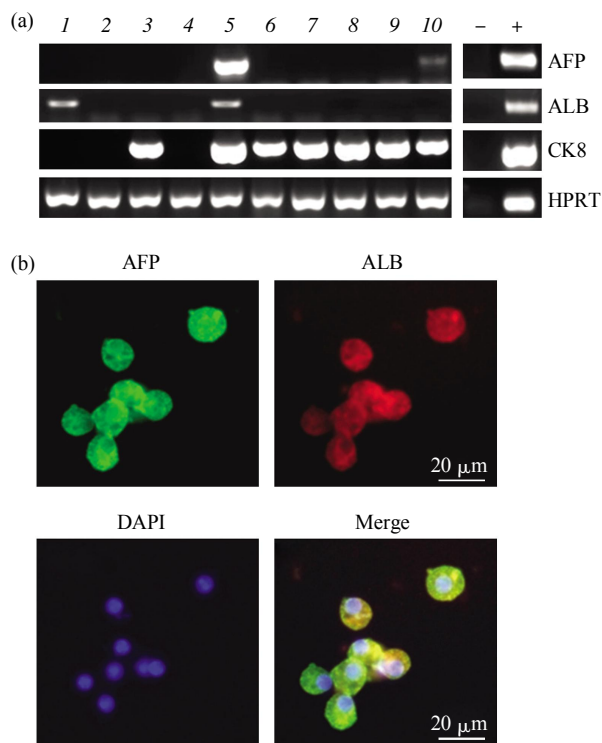


Fig. 3 Nested RT-PCR and immunocytochemistry analysis of individual induced HPP colonies

(a) Ten of individual HPP colonies analyzed by nested RT-PCR in one experiment. HPRT was used as an internal control. Total and PCR positive number of colonies was listed in Table 2. (b) Double immunostaining of a single HPP colony-derived cells induced for 2 weeks. Bars, 20 μ m.

2.3 胎肝来源 HPP 集落全部来自于 CD45⁺细胞

为对胎肝中具有形成 HPP 克隆能力的细胞进行分析, 我们进行了 CD45 的磁珠分选. 胎肝细胞中 CD45⁺ 细胞含量约为 10% 左右. 对磁珠分选后的 CD45⁺ 细胞和 CD45⁻ 细胞分别进行了流式细胞术检测, 阳性率和阴性率分别为 96.04% 和 0.26% (图 4b), 说明磁珠分选获得的 CD45 细胞亚群纯度较高, 因此接种时按未分选细胞的 1/10 进行接种, 即 4×10^3 个 / 皿, 结果显示, CD45⁻ 细胞无任何克隆产生, 而 CD45⁺ 细胞组产生的 HPP 克隆数与未分选细胞组产生的克隆数基本相同(图 4a), 由此说明胎肝细胞中具有产生 HPP 克隆能力的细胞全部集中在 CD45⁺ 细胞亚群中.

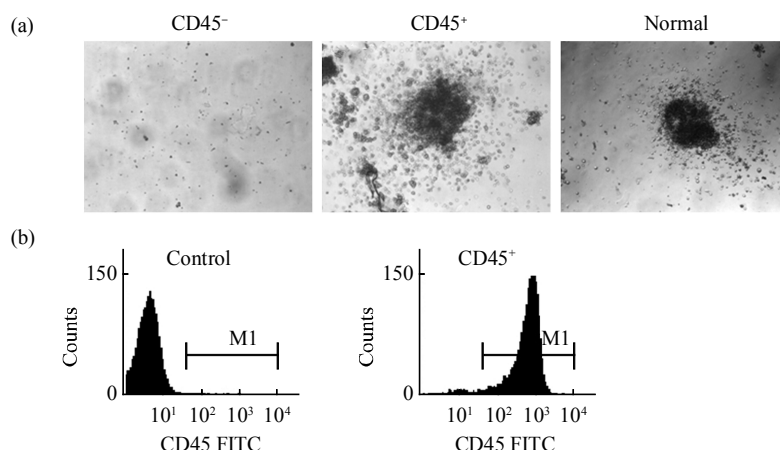


Fig. 4 HPP-CFC is only derived from CD45⁺ cells in mouse fetal liver

(a) Phase contrast image of HPP colony after CD45 MACS. After CD45 MACS, fetal liver cells were divided into two groups, 4×10^4 cells/2ml medium/dish for CD45⁻ group and normal group, 4×10^3 cells/2ml medium/dish for CD45⁺ group. No colonies were observed in CD45⁻, while the number of CD45⁺ colony is equal to that of normal group (40 $\times$). (b) Flow cytometric analysis of the purity of CD45 MACS cells. CD45⁻ (left) and CD45⁺ (right) MACS cells were both incubated with CD45 primary antibody followed by FITC-secondary antibody.

2.4 胎肝来源的 CD49f⁺/Sca-1⁺细胞亚群双向诱导初探

为进一步对具有上皮和造血双向分化能力的 HPP 克隆进行富集, 我们进行了 CD49f/Sca-1 流式细胞术分选 (fluorescence-activated cell sorting, FACS). 分选结果显示, 胎肝中分别含有 3.97% 的 CD49f⁺/Sca-1⁻细胞, 1.40% 的 CD49f⁻/Sca-1⁺细胞, 4.97% 的 CD49f⁺/Sca-1⁺细胞(图 5a). 按常规接种密度即 4×10^3 个/皿接种后, 在第 7 天观察不同亚群产生的 HPP 克隆发现, CD49f⁻/Sca-1⁺细胞形成的 HPP 克隆大部分为散在分布的边缘扩散的克隆, 而

CD49f⁺/Sca-1⁻细胞形成的克隆虽然致密但是克隆相对较小, 只有双阳性的 CD49f⁺/Sca-1⁺细胞形成的克隆较致密, 边缘齐整, 细胞折光性较好(图 5b), 说明细胞分化潜能保持较好, 所以我们对双阳性细胞形成 HPP 进一步进行了肝和造血双向诱导的研究, 诱导方法与之前未分选的细胞相同, 可以看到同一克隆来源的细胞诱导后具有贴壁的上皮样细胞和悬浮的造血细胞(图 5c). 巢式 RT-PCR 结果虽然显示 CK8, CK18, AFP 等上皮标志有较高的表达, 但本次实验进行分析的 9 个克隆中无 ALB 表达(图 6).

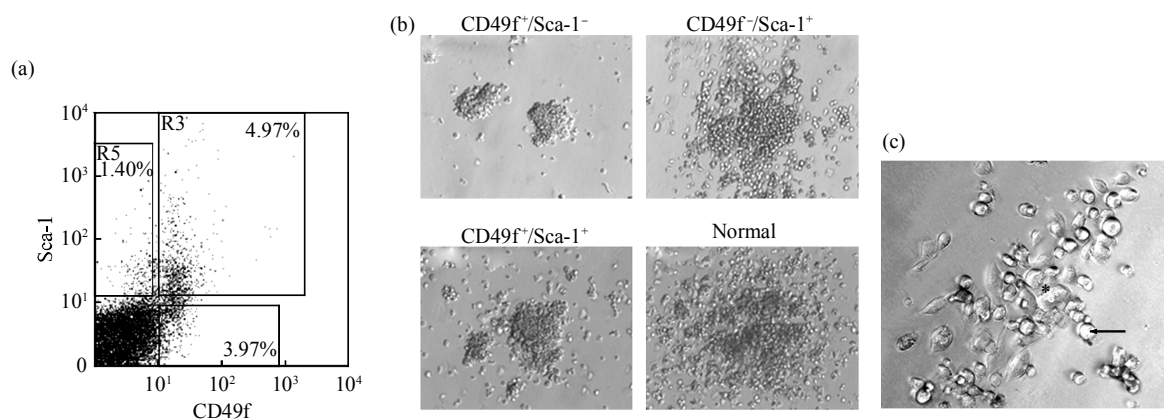


Fig. 5 Fluorescence activated cell sorting of mouse fetal liver cells

(a) Percentage number of 3 subpopulations by CD49f and Sca-1. (b) HPP colonies derived from 3 subset and non-sorting cells(40 $\times$). (c) Hepatic and hematopoietic induced cells of double positive subpopulation. Adherent cells are indicated with asterisk and arrowhead shows the nonadherent hematopoietic cells(100 $\times$).

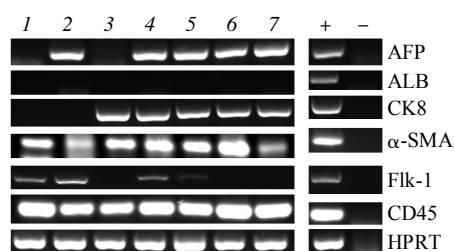


Fig. 6 Nested RT-PCR analysis of CD49f⁺/Sca-1⁺-derived individual induced HPP colonies

In the left lane, arabic numbers indicated the different individual colonies. In the right lane, "+" indicated samples of mouse liver cDNA respectively, as a positive control. And "-" indicated that water was substituted for template as a negative control.

2.5 胎肝来源的单个 HPP 集落的克隆源性鉴定

为避免不同克隆细胞之间的污染, 本研究采取双基因型克隆分析, 进行了 HPP-CFC 克隆源性的鉴定. 首先通过荧光显微镜和 Sry PCR 鉴定出不同胚胎的基因型(图 7a), 然后只选取两类单阳性胎肝制备成单细胞悬液, Sry⁺GFP⁻和 Sry⁻GFP⁺ 胎肝细胞混合接种后, 均可产生健康、典型的 HPP 克隆(图 7b), 在荧光显微镜下, HPP 克隆或者是 GFP⁺ 或者是 GFP⁻, 不存在二者的混合克隆. 同样的, 对挑取的克隆进行 Sry 的巢式 PCR 检测也未检测到 GFP 和 Sry 双阳性克隆的存在(图 7c), 从而表明本研究采用的体系是可靠的单克隆源性的.

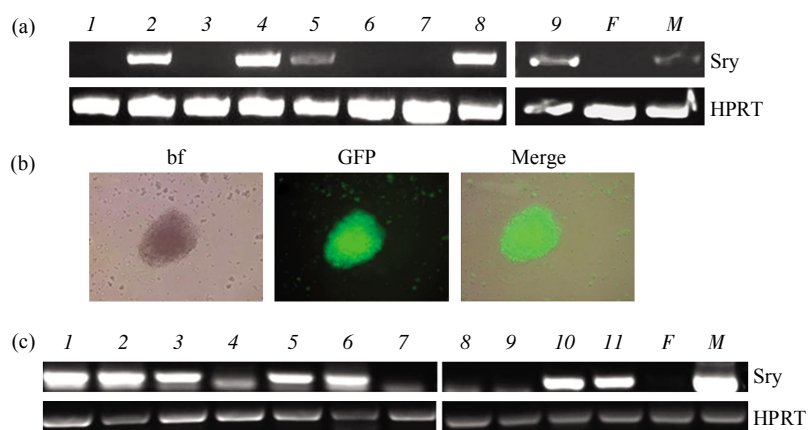


Fig. 7 Determination of individual HPP colonies clonality

(a) Sry PCR of mouse embryo genomic DNA for determination of sex. (b) Two different genotypes of cells (Sry⁺/GFP⁺ and Sry⁻/GFP⁻) were mixed in HPP culture medium. The photos indicated a Sry⁻/GFP⁺ HPP colony. (c) Sry nested PCR of individual GFP⁺ and GFP⁻ HPP colonies for clonality. Each of GFP⁺ colonies was Sry⁻, vice versa. Colony 4, 7, 8, 9 was all GFP⁺ and the others were GFP⁻ identified with fluorescence microscope.

3 讨 论

造血系统是一个遍布于全身各器官、各组织的循环系统, 因此它和其他组织在发育过程中的关系历来受到关注. 目前已经有足够多的证据证实造血-内皮共祖细胞的存在^[12, 13], 而造血和间质细胞是否具有共同的起源, 仍然存在争议^[14]. 自发现 HSCs 可横向分化为肝上皮样细胞的现象后, 人们提出了诸多假说来解释跨胚层分化的现象, 但目前只有细胞融合学说得到确切实验支持. 实际上, 发育过程中三胚层之间的关系不是完全割裂的, 目前已经确认在低等的脊椎动物如非洲爪蟾和斑马鱼发育过程中存在着中-内胚层祖细胞, 那这种祖细胞

是否会产生造血-上皮共祖细胞呢? 即造血和上皮细胞具有一个共同的起源. 但是证明这个假说和证明 HSCs 具有多向分化潜能一样, 需要在单细胞水平上进行验证. 体内移植单个 HSCs 虽然能够有效地向各系细胞分化^[15], 但是并不能排除其子代细胞中的巨噬细胞和宿主细胞发生融合的可能性. 而体外进行的单个造血细胞的多向分化潜能评估工作量较大, 培养时间过长, 有发生体外重编程的可能性^[16]. 受到造血-内皮共祖细胞研究模型的启发, 我们采用了改进的单克隆 HPP-CFC 模型来研究发育的胎肝中造血细胞和上皮细胞的关系.

HPP-CFC 是体外不需要基质支持的最早期的多潜能造血前体细胞. 在 E8.5 小鼠血液循环启动

后,在卵黄囊,循环血和胚体中均能检测到 HPP-CFC 的存在^[17]。而且 AGM 区的 HPP-CFC 具有成血-成血管潜能^[12],表明 HPP-CFC 并不仅仅局限于造血细胞的分化。鉴于造血因子和肝诱导因子具有较好的协同诱导作用^[18,19],我们在 HPP 克隆的产生和诱导过程中均同时加入造血因子和肝诱导因子,而事实上只有同时加入这两类生长因子才会在液体诱导过程中产生大量的贴壁细胞。我们的结果表明,诱导后的 HPP 细胞在较高比例上表达 CK8, CK18, AFP 等广谱的上皮标志,而表达 ALB 等相对特异性肝上皮标志的比例较低,由此表明这种具有向肝上皮分化潜能的 HPP 克隆的含量较低。虽然 Wulf 等^[20]在成体小鼠肝脏中分到的侧群(side population, SP)细胞在含有造血因子和肝诱导因子的半固体体系里也可以形成具有贴壁细胞和悬浮细胞的克隆,且免疫组化染色显示贴壁细胞 ALB 为阳性,但是,这项研究没有进行严格的单克隆实验和大样本的单克隆诱导结果统计,所以不能排除造血细胞形成的克隆“漂浮”到肝干细胞形成的贴壁克隆上的可能性,而且这群 SP 细胞体内虽然能够向肝系分化但没有造血重建能力。由于 ALB 阳性的 HPP 比例较低,我们尝试着对胎肝细胞进行分选后接种 HPP 克隆以富集具有肝上皮分化潜能的 HPP。有文献报道^[21,22], Sca-1 和 CD49f 都同时表达在胎肝的造血细胞和上皮细胞上,因此我们进行了胎肝细胞的双色分选,重点研究了 CD49f⁺/Sca-1⁺ 来源的 HPP 向肝上皮细胞分化的潜能,但是与未分选胎肝细胞的实验结果相比,并没有显著提高诱导后 ALB 的阳性率。

Yao 等^[12]发现,小鼠 AGM 区中的 HPP-CFC 既可以来自于 CD45⁻细胞,也可以来自于 CD45⁺细胞,但是具有造血内皮分化潜能的 HPP 集中于 CD45⁻中。我们研究表明,胎肝来源的 HPP-CFC 无一例外地均来自于 CD45⁺细胞,而且不仅表达上皮的标志 CK8、CK18、AFP、ALB,出乎意料的是这些克隆还以较高比例表达间质标志 α -SMA 和内皮标志 Flk-1。而最近也有关于肝上皮、内皮、造血之间密切关系的报道。有研究显示^[23],肝细胞系的条件培养基可以显著促进造血-内皮共祖细胞向内皮分化,但是机制不明。Suskind 等^[24]认为,人胎肝中存在的一群 CD34⁺/CK7/8⁺ 细胞可能是肝和造血系统共同的干细胞,但是检测后发现这群细胞并不具有向肝细胞诱导分化的能力,从细胞形态和表达的部分标志推测,他们认为这群细胞更可能

是一群肝星状细胞。我们根据文献报道^[25,26]推测,本研究中胎肝 HPP-CFC 来源的这群 CK8⁺/ α -SMA⁺ 细胞可能是起源于胎肝中的表皮-间质转换细胞,这群细胞被认为是中内胚层祖细胞的后代,具有多向分化潜能,但是尚需要进一步具体验证,这部分研究正在进行之中。

总之,我们的研究表明,胎肝来源的单克隆 HPP-CFC 在肝和造血双向诱导条件下,除具有造血分化潜能外,还表达肝上皮分化标志和间质、内皮标志,可能为研究胎肝微环境中造血、上皮发育关系以及表皮间质转换提供了新的线索和模型。

致谢 感谢北京大学生命科学学院杜立颖老师,军事医学科学院国家生物医学分析中心杨怡老师分别在细胞流式分选和透射电镜实验中的辛勤工作。

参 考 文 献

- Petersen B E, Bowen W C, Patrene K D, *et al.* Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, 1999, **284** (5417): 1168~1170
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, *et al.* Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med*, 2000, **6**(11): 1229~1234
- Almeida-Porada G, Porada C D, Chamberlain J, *et al.* Formation of human hepatocytes by human hematopoietic cells in sheep. *Blood*, 2004, **104**(8): 2582~2590
- Jang Y, Collector M I, Baylin S B, *et al.* Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nature Cell Biol*, 2004, **6**(6): 532~539
- Wang X, Willenberg H, Akkari Y, *et al.* Cell fusion is the principal source of bone marrow derived hepatocytes. *Nature*, 2003, **422** (6934): 897~901
- Harris R G, Herzog E L, Bruscia E M, *et al.* Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science*, 2004, **305**(5680): 90~93
- Thorgeirsson S S, Grisham J W. Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: a critical review of the evidence. *Hepatology*, 2006, **43** (1):2~8
- Danet G H, Luongo J L, Butler G, *et al.* C1qRp defines a new human stem cell population with hematopoietic and hepatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(16): 10441~10445
- Wang Y F, Nan X, Li Y H, *et al.* Induction of umbilical cord blood-derived β 2m⁺-c-Met⁺ cells into hepatocyte-like cells by coculture with CFSC/HGF cells. *Liver Transplantation*, 2005,**11**(6): 635~643
- Petersen B E, Grossbard B, Hatch H, *et al.* Mouse A6-positive hepatic oval cells also express several hematopoietic stem cell markers. *Hepatology*, 2003, **37**(3):632~640
- Morrison S J, Hemmati H D, Wandycz A M *et al.* The purification

- and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**(22): 10302~10306
- 12 Yao H Y, Liu B, Wang X Y, *et al.* Identification of high proliferative potential precursors with hemangioblastic activity in the mouse aorta-gonad-mesonephros region. *Stem Cells*, 2007, **25**(6):1423~1430
 - 13 Orkin S H, Zon L I. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, 2008, **132**(4): 631~644
 - 14 Waller E K, Olweus J, Lund-Johansen F, *et al.* The "common stem cell" hypothesis reevaluated: human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors. *Blood*, 1995, **85**(9): 2422~2435
 - 15 Krause D S, Theise N D, Collector M I, *et al.* Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 2001, **105**(3): 369~377
 - 16 Rogers I, Yamanaka N, Bielecki R, *et al.* Identification and analysis of *in vitro* cultured CD45-positive cells capable of multi-lineage differentiation. *Exp Cell Res*, 2007, **313**(9): 1839~1852
 - 17 Palis J, Chan R J, Koniski A, *et al.* Spatial and temporal emergence of high proliferative potential hematopoietic precursors during murine embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(8): 4528~4533
 - 18 nderbitzin D, Avital I, Keogh A, *et al.* Interleukin-3 induces hepatocyte-specific metabolic activity in bone marrow-derived liver stem cells. *J Gastrointest Surg*, 2005, **9**(1): 69~74
 - 19 Nishino T, Hisha H, Nishino N, *et al.* Hepatocyte growth factor as a hematopoietic regulator. *Blood*, 1995, **85**(11): 3093~3100
 - 20 Wulf G G, Luo K L, Jackson K A, *et al.* Cells of the hepatic side population contribute to liver regeneration and can be replenished with bone marrow stem cells. *Haematologica*, 2003, **88**(4): 368~378
 - 21 Nierhoff D, Ogawa A, Oertel M, *et al.* Purification and characterization of mouse fetal liver epithelial cells with high *in vivo* repopulation capacity. *Hepatology*, 2005, **42**(1): 130~139
 - 22 Suzuki A, Zheng Y W, Kaneko S, *et al.* Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *J Cell Biol*, 2002, **156**(1): 173~184
 - 23 Bordoni V, Alonzi T, Zanetta L, *et al.* Hepatocyte-conditioned medium sustains endothelial differentiation of human hematopoietic-endothelial progenitors. *Hepatology*, 2007, **45**(5): 1218~1228
 - 24 Suskind D L, Muench M O. Searching for common stem cells of the hepatic and hematopoietic systems in the human fetal liver: CD34⁺ cytokeratin 7/8⁺ cells express markers for stellate cells. *J Hepatol*, 2004, **40**(2): 261~268
 - 25 Chagraoui J, Lepage-Noll A, Anjo A, *et al.* Fetal liver stroma consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition. *Blood*, 2003, **101**(8): 2973~2982
 - 26 Dan Y Y, Riehle K J, Lazaro C, *et al.* Isolation of multipotent progenitor cells from human fetal liver capable of differentiating into liver and mesenchymal lineages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(26): 9912~9917

Differentiation Potential of Clonal HPP-CFC Into Hepatic Lineage in Developing Mouse Fetal Liver*

ZHOU Jun-Nian^{1)**}, WANG Yun-Fang^{1)**}, YAO Hui-Yu^{2)**}, HE Wen-Yan²⁾, CHEN Hai-Xu¹⁾,
LI Si-Ting¹⁾, SHI Yan¹⁾, SHI Shuang-Shuang¹⁾, NAN Xue¹⁾, BAI Ci-Xian¹⁾, LIU Bing³⁾,
YUE Wen¹⁾, MAO Ning^{2)***}, PEI Xue-Tao^{1)***}

¹⁾*Stem Cell and Regenerative Medicine Laboratory, Beijing Institute of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China;*

²⁾*Department of Cell Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Beijing 100850, China;*

³⁾*Department of Oncology, 307 Hospital, Beijing 100071, China)*

Abstract To investigate the hepatic development association with hematopoiesis, a high proliferative potential colony forming cells (HPP-CFC) model of mouse fetal liver was set up. Some differentiation assays based on individual HPP colonies were performed. Under the condition of combinations of hematopoietic and hepatic factors, some individual HPP colonies were induced into hematopoietic and hepatic cells, which were examined with transmission electron microscope (TEM), nested RT-PCR and immunofluorescence staining. The results showed that induced HPP colonies cells with a specific ultrastructure similar to hepatic epithelial cells, expressed hepatic markers including albumin (ALB), α -fetoprotein (AFP), cytokeratins (CK8, CK18) at different extent of percentage. These cells also expressed mesenchymal marker α -SMA and primary endothelial cell marker Flk-1. The MACS results suggested that the fetal liver-derived HPP-CFCs are all from CD45⁺ cells, while CD45⁻ cells have no capacity to form hematopoietic colony at all. The FACS sorted CD49f⁺/Sca-1⁺ cells have no difference of hepatic differentiation potential compared with whole fetal liver cells. The clonality was confirmed by cell mixing assay. Taken together, the HPP-CFC may represent a novel clonal model for hepatic differentiation from the blood cells in the mouse fetal liver and will shed light on the associations underlying the hepatic and hematopoietic development.

Key words fetal liver, high proliferative potential colony-forming cells, hepatic epithelial cells, hematopoiesis, development

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00769

*This work was supported by grants from Hi-Tech Research and Development Program of China (2006AA02A107), National Basic Research Program of China (2005CB522702), The Key Project of National Natural Science Foundation (30730043) and The National Nature Science Foundation of China (30671098).

**These authors are equally contributed to this work.

***Corresponding author.

MAO Ning. Tel: 86-10-66931318, E-mail: maoning@nic.bmi.ac.cn

PEI Xue-Tao. Tel: 86-10-66932240, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

Received: November 9, 2008 Accepted: January 9, 2009