

小鼠胚胎干细胞分化为肝细胞的基因芯片分析*

李岩 李雪飞 郭坤 高东梅 赵燕 刘银坤**

(复旦大学附属中山医院肝癌研究所, 上海 200032)

摘要 弄清胚胎肝脏发育的分化调节机制, 对指导干细胞在肝再生中的应用以及研究肝分化相关疾病分子机制具有重要意义. 胚胎干细胞的全能性使得体外建立肝向分化模型成为可能, 采用单层贴壁培养方式, 分阶段加入成纤维细胞生长因子(FGF)、肝细胞生长因子(HGF)、制瘤素(OSM)等因子, 诱导小鼠胚胎干细胞 D3(mESC-D3)的肝向分化. 分化细胞在光镜和电镜下呈现肝样细胞形态, RT-PCR、细胞免疫荧光检测以及 PAS 染色分析表明, 这些细胞具有肝细胞特征性的基因表达和生化功能. 采用干细胞分化相关基因芯片比较早期肝定向分化前后的基因表达差异, 结果显示, 48 个差异表达基因中(大于 2 倍), 20 个上调、28 个下调. 进一步的生物信息学分析发现, 它们集中体现在细胞外基质、细胞连接、FGF、BMP 分子及 Notch、Wnt 信号通路上, 提示这些改变可能与胚胎早期的肝向分化密切相关.

关键词 胚胎干细胞, 肝细胞, 细胞分化, 基因芯片

学科分类号 Q254

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00010

胚胎干细胞的无限自我更新能力及多向分化潜能使其可能成为一种良好的再生细胞资源. 尽管人们在胚胎干细胞的肝向分化方面已开展了大量研究工作^[1~8], 这个领域目前仍处在萌芽阶段, 分化率低、细胞不成熟是突出问题, 得到有完全功能的成熟肝细胞一直是所有研究者的努力目标^[9, 10]. 鉴于自然过程中肝脏发育的复杂性, 综合模拟其中涉及的各种信号对实现高效、可重复的分化是相当重要的. 另外, 随着近来“肿瘤干细胞”概念的提出, 肝癌细胞起源涉及的异常分化调节也开始引起人们的重视^[11~14]. 所以, 着眼于分化机制的研究, 对于将来干细胞在肝再生上的应用以及阐明肝癌发生的异常分化调节机制都具有重要意义. 基因芯片技术的应用使得同时分析生物过程中多个调节通路成为可能. 本研究参照小鼠胚胎肝脏早期发育的阶段, 采用 FGF、HGF、OSM 等因子, 体外建立了小鼠胚胎干细胞的肝向分化模型, 首次采用干细胞分化相关的功能分类基因芯片分析早期肝定向分化前后的基因表达差异, 为进一步寻找分化关键基因、阐明分化调节机制提供线索.

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 胚胎干细胞来源. mESC-D3 系由美国威斯

康星大学馈赠.

1.1.2 细胞培养基. mESC-D3 培养基: 高糖型 DMEM (Gibco-BRL 公司), 含 15% 胎牛血清、0.1 mmol/L β - 巯基乙醇、1% 非必需氨基酸、1% 丙酮酸钠、100 U/ml 青链霉素 (Gibco-BRL 公司) 和 1 000 U/ml 重组小鼠白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) (Chemicon 公司). 分化基本培养基: 不含 LIF 的 mESC-D3 培养基. 饲养层小鼠胚胎成纤维细胞 (mouse embryonic fibroblast, MEF) 培养基: 高糖型 DMEM, 含 10% 胎牛血清.

1.1.3 诱导因素. 碱性成纤维细胞生长因子 (aFGF, bFGF)、肝细胞生长因子 (HGF)、制瘤素 (OSM) (R&D 公司); 明胶、I 型胶原、维甲酸、地塞米松、牛血清白蛋白、维生素 C (Sigma 公司); ITS (Gibco-BRL 公司).

1.1.4 PCR 试剂. Trizol (Invitrogen 公司); 逆转录试剂盒、Taq DNA 聚合酶 (MBI 公司); Real-time PCR 试剂盒 (北京天根生物公司); 引物由上海生工生物公司合成, 引物序列见表 1 和表 2.

* 国家“十五”科技攻关资助项目(2004BA703B02).

** 通讯联系人.

Tel: 021-64041990-2501, E-mail: liu.yinkun@zs-hospital.sh.cn

收稿日期: 2008-05-30, 接受日期: 2008-09-11

Table 1 Primers for RT-PCR

	GenBank accession No.	Primer sequences	Annealing temperature/°C	Length of the amplified fragment/bp
Afp	NM007423	S: 5' TCACACCCGCTTCCCTCATCCT 3' A: 5' CATCCTGCAGACACTCCAG 3'	54	821
Alb	NM009654	S: 5' AGAAGACACCTGATTACTCT 3' A: 5' TCGAGAAGCAGGTGTCCTTGT 3'	54	705
Ttr	NM013697	S: 5' CTCACCACAGATGAGAAG 3' A: 5' GGCTGAGTCTCTCAATTC 3'	56	224
Sox17	NM011441	S: 5' AAGGCGAGGTGGTGGCGAGTAG 3' A: 5' CCTGGCAGTCCCGATAGTGG 3'	60	489
Foxa2	NM010446	S: 5' AAAGGAGCCTTTGGTCTCCTC 3' A: 5' TCTCCTGGTCCGGTACACC 3'	52	251
Cyp7a1	NM007824	S: 5' AGGACTTCACTCTACACC 3' A: 5' GCAGTCGTTACATCATCC 3'	56	453
Tat	NM146214	S: 5' ACCTCAATCCCATCCGA 3' A: 5' TCCCGACTGGATAGGTAG 3'	56	206
Tdo	NM019911	S: 5' TGCGCAAGAACTTCAGAGTGA 3' A: 5' AGCAACAGCTCATTGTAGTCT 3'	58	420
G6p	NM008061	S: 5' CTCTGAAACCCATTGTGAGGC 3' A: 5' CATTGTCCTGATCTCAGAG 3'	54	708
β-Actin	NM007393	S: 5' CACAGGCATTGTGATGGACTCC 3' A: 5' CATCTCCTGCTCGAAGTCTAGAG 3'	54	238

Table 2 Primers for Realtime PCR

	GenBank accession No.	Primer sequences
Foxa2	NM010446	S: 5' TGGAGACTTTGGGAGAGCTT 3' A: 5' GTGGCCCATCTATTTAGGGA 3'
Sox17	NM011441	S: 5' AGGCGAGGTGGTGGCGAGTA 3' A: 5' CCGCTTGCCTTCGTCTTTGG 3'
Hhex	NM008245	S: 5' TCCCGGTGTCTGTTCTTACA 3' A: 5' AATGAGTCAGTTCCCTGCC 3'
Afp	NM007423	S: 5' TGGCGATGGGTGTTAG 3' A: 5' AACTGGAAGGGTGGGAC 3'
Alb	NM009654	S: 5' AACCCAACCACCTTTATG 3' A: 5' GACGGACAGATGAGACCAAT 3'
Rhob	NM007483	S: 5' AGGTGGACGGCAAGC 3' A: 5' CCGAGAAGCACATAAGGAT 3'
Fgfr1	NM010206	S: 5' CTACAAGGTTTCGCTAT 3' A: 5' GATGCTCCATACTCATTCTC 3'
Fgfr4	NM008011	S: 5' GGGCAAGTGGTTCGT 3' A: 5' CCAGGTCTGCCAAATCC 3'
Gapdh	NM008084	S: 5' AGCAACTCCCACTCTTC 3' A: 5' GGTCAGGGTTCTTACTCC 3'

1.1.5 细胞免疫化学试剂. 山羊抗小鼠 ALB 抗体 (Bethyl 公司); 小鼠 CK18 单克隆抗体 (Abcam 公

司); Cy3 标记抗山羊 IgG, FITC 488 标记抗小鼠 IgG (Invitrogen 公司).

1.1.6 基因芯片. Oligo Stem Cell Microarray (美国 SuperArray 公司).

1.1.7 其他. 胰酶, 磷酸缓冲液 (PBS) (Gibco-BRL 公司); 丝裂霉素 C (Roche 公司).

1.2 实验方法

1.2.1 mESC-D3 的培养及体外肝向诱导分化.

a. 饲养层的制备. 取孕 13.5 天小鼠胚胎, 去四肢、头、内脏, 胰酶消化, 铺种于培养皿, 37°C 5% CO₂ 孵箱中贴壁 3~4 天后, 1:4 传代, 长至融合度 80% 左右消化冻存, 即 MEF. 取 0~5 代 MEF, 用 10 mg/L 丝裂霉素 C 处理 2.5 h, PBS 洗 5 遍, 消化后以合适密度铺种至 0.1% 明胶包被皿中, 孵箱中培养. b. mESC-D3 的培养. MEF 贴壁后即可用于复苏 mESC-D3, 加入 mESC-D3 培养液, 每天换液, 隔天 1:10 传代. c. 诱导分化. 取 10 代以内 mESC-D3, 1×10⁶ 每 100 mm 皿, 直接铺种在 0.1% 明胶上, 分三个阶段进行诱导: 加入 1 000 U/ml LIF, 10⁻⁷ mol/L 维甲酸, 培养 3 天; 加入 100 μg/L aFGF, 20 μg/L bFGF, 50 μg/L HGF, 培养 5 天;

基质换为 I 型胶原($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), $20 \mu\text{g}/\text{L}$ HGF, $10 \mu\text{g}/\text{L}$ OSM 处理 4 天后, 换成无血清 mESC-D3 培养基, 加入 $10^{-7} \text{ mol}/\text{L}$ 地塞米松、 $5 \text{ mg}/\text{L}$ ITS、 $0.5 \text{ g}/\text{L}$ 牛血清白蛋白、 $2 \text{ mmol}/\text{L}$ 维生素 C 培养 2 周。

1.2.2 形态学观察. 分化细胞直接在相差显微镜下拍照; 透射电镜标本制作及拍照由复旦大学医学院电镜室协助完成。

1.2.3 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR). 分化前后的细胞经胰酶消化后, PBS 洗 2 遍, 用 Trizol 抽提 mRNA, 经分光光度计定量后, 取 $3 \mu\text{g}$ mRNA 逆转录, 取 cDNA $1 \mu\text{l}$ 进行 PCR 扩增, 具体步骤参见各说明书。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 在生物电泳图像分析系统上拍照。

1.2.4 细胞免疫荧光检测. 细胞爬片后, 100% 甲醇 20°C 固定 5 min, 5% BSA 封闭 30 min, 加入抗 CK18 和 ALB 抗体(1:100), 4°C 摇床过夜, 再加入荧光二抗(1:2 000), 室温摇床 1 h, DAPI 染核, 75% 甘油封片, 每步之间用 PBS 洗 $3 \times 5 \text{ min}$, 荧光显微镜成像。

1.2.5 高碘酸希夫反应(PAS)染色. 弃细胞上清, 4% 多聚甲醛固定, 1% 过碘酸氧化 5 min, 双蒸水冲洗 3 次, 然后用希夫试剂反应 15 min, 双蒸水冲洗, 显微镜拍照。

1.2.6 基因芯片分析. 使用 Trizol 试剂从未分化 mESC-D3(去除饲养层细胞)和分化 8 天的肝样细胞(对照细胞免疫荧光结果, 用细胞刮刮取 ALB 阳性对应区细胞)中提取 mRNA, 经分光光度计测量 A_{260}/A_{280} 比值和甲醛变性胶电泳检测 RNA 质量, 经 TrueLabeling-AMP 法制备生物素标记的 cRNA 探针, 与芯片在合适条件下杂交, 漂洗后经化学发光检测, 台式扫描仪采集图像, 用 GEArray Expression Analysis Suite 软件读取数据, 按公式得出每点标准值, 即标准值=(原始值-背景值)/(内参平均原始值-背景值)。具体步骤可参见 SuperArray 公司的说明书。

1.2.7 定时定量 PCR. 取 mESC-D3 和分化细胞的 mRNA, 逆转录后与引物、SYBR GreenER RealmasterMix 混合, 做三复孔, 57°C 退火, 经 40 个循环, 作溶解曲线, 按 $\text{Ratio}=2^{C_T \text{ 胚胎干细胞}-C_T \text{ 分化细胞}}$ 计算基因表达量的差异倍数, C_T 值均经内参标化。

1.2.8 生物信息学分析. 利用 David 和 GeneOntology 数据库对差异 ≥ 2 或 ≤ 0.5 的基因进行功能归类。

2 结 果

2.1 mESC-D3 肝向分化过程中的形态学改变

在倒置相差显微镜下, 未分化的 mESC-D3 克隆样生长, 似“巢”状嵌在饲养层细胞之间, 克隆边界清晰但其中细胞界限不清(图 1a), 分化 8 天的细胞, 体积增大 3~4 倍, 呈立方形, 核大而圆, 有时可见到双核(图 1b)。电镜下见分化 26 天的细胞类型基本单一, 胞浆内线粒体、粗面内质网、糖原等细胞器含量丰富, 而且, 在相邻细胞膜之间已形成肝细胞特征性的毛细胆管样结构, 管腔内可见微绒毛的横断面(图 1c)。

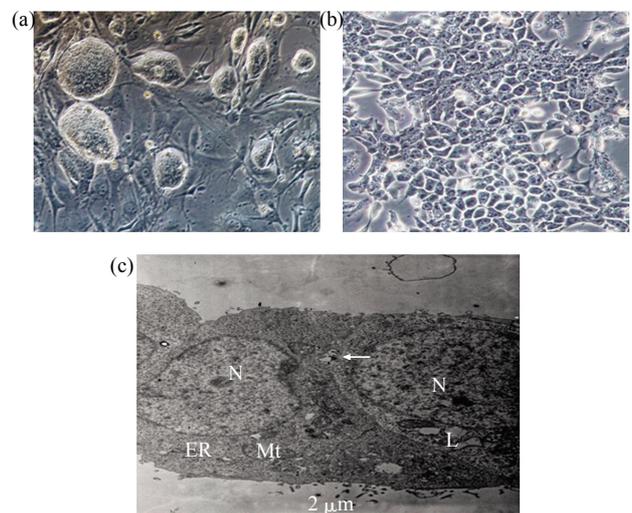


Fig. 1 The morphological characterization of mESC-D3 differentiation into hepatocyte-like cells

(a) Indicates mESC-D3 colonies with clear boundary maintained on the feeder cells in phase contrast($200\times$). (b) The differentiated cells after cultured for 8 days showed cuboidal morphology, with binucleate cells frequently observed($200\times$). (c) Electron microscopy of the differentiated cells after cultured for 26 days. Scale bar represents $2 \mu\text{m}$. N: Nuclear; Mt: Mitochondria; L: Lipid granule; ER: Rough endoplasmic reticulum; Arrow indicates bile canaliculi-like structure.

2.2 mESC-D3 肝向分化前后肝标记基因的表达

RT-PCR(重复 3 次以上)分析可见分化 3 天的细胞开始有 Ttr、Sox17、Foxa2 和 Hhex 的表达, 分化 8 天时明显增强, 并开始有 Afp、Alb 和 Cyp7a1 的表达, 分化 12 天、26 天可见 G6p、Tat 和 Tdo 的表达(图 2)。进一步的实时定量 PCR 分析结果(重复 3 次)显示: 分化细胞 3 天的 Sox17、Hhex、Foxa2 表达量分别为未分化胚胎干细胞的 (5.22 ± 1.34)、(2.92 ± 0.08)、(2.68 ± 0.85)倍, 分化 6

天时分别为(39.72 ± 6.33)、(2.16 ± 0.15)、(40.73 ± 8.55)倍, 分化 8 天时分别为(37.49 ± 11.01)、(6.01 ± 0.68)、(43.74 ± 9.35)倍; 分化标记 Afp 的表达量在分化 3 天时无明显增强, 分化 6 天时为未分化胚胎干细胞的(2.77 ± 0.37)倍, 分化 8 天时明显增强为(475.54 ± 39.58)倍, 12 天时则下降为(118.89 ± 9.90)倍; Alb 的表达量在 3 天和 6 天均无明显增强, 分化 8 天时明显增强为(14.55 ± 3.38)倍, 12 天时又增加为(40.3 ± 20.3)倍($P < 0.05$). 这些结果与图 2 所反映的趋势基本一致.

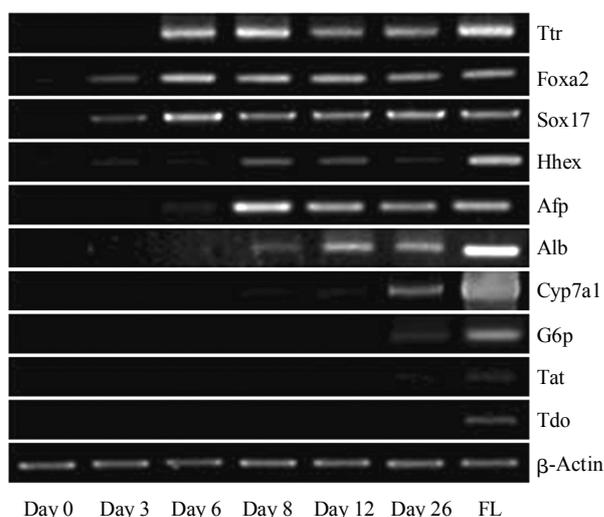


Fig. 2 Expression of hepatic-specific genes during hepatic differentiation of mESC-D3

Hepatic-specific gene expression of undifferentiated and differentiated cells was examined by RT-PCR analysis at the indicated days. Fetal liver was used as a positive control.

2.3 mESC-D3 肝向分化 8 天细胞 ALB 和 CK18 抗原的表达

细胞免疫荧光检测(重复 3 次以上)表明, 分化 8 天细胞的胞浆内有 CK18 和 ALB 的合成(图 3a, b, c), 不加一抗的空白对照(图 3d)和未分化的 mESC-D3(图 3e)均不表达这两种蛋白质. ALB 阳性率为(46.5 ± 9.1)%, 这些阳性细胞呈集落样分布, 多角形或圆形, 核大而圆.

2.4 mESC-D3 肝向分化 26 天细胞糖原合成能力的检测

与未分化的 mESC-D3 相比, 分化 26 天的细胞呈 PAS 染色阳性(重复 3 次以上), 阳性率为(74.6 ± 8.5)%, 表明大多数细胞已具有糖原合成能力(图 4).

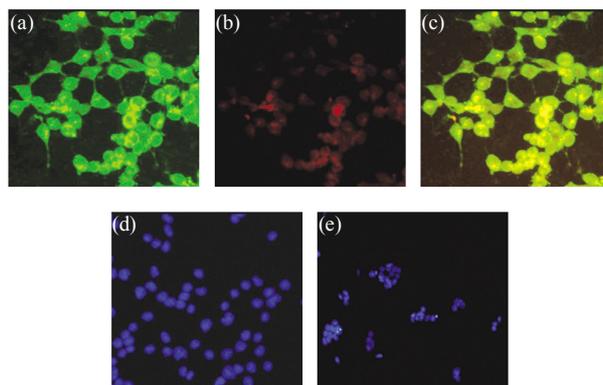


Fig. 3 Immunocytochemical analysis of mESC-D3 derived hepatocyte-like cells for CK18 and ALB antigens after induced for 8 days

(a) Indicates positive expression of CK18. (b) Indicates positive expression of ALB. (c) Merged image of (a) and (b). (d) Control without addition of the first antibodies. (e) Control of mESC-D3 indicates negative expression of CK18 and ALB. (a)~(e) 200x .

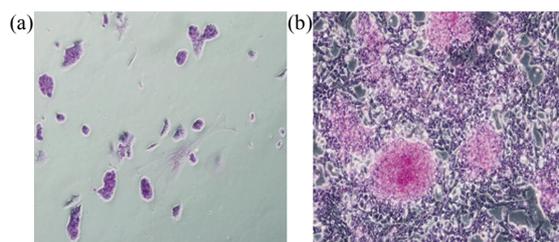


Fig. 4 Periodic acid-Shiff staining of mESC-D3 derived hepatocyte-like cells after induced for 26 days

(a) Indicates negative periodic acid-Shiff staining of mESC-D3. (b) Indicates positive staining of glycogen granules in mESC-D3 derived hepatocyte-like cells. Red piled-up colonies are positive for PAS staining(100x).

2.5 mESC-D3 肝向分化前后的基因表达差异分析

表 3 显示, 差异大于 2 倍以上的基因有 48 个, 20 个上调、28 个下调(重复 3 次以上). 从中选取 *Afp*、*Rhob*、*Fgfr1* 和 *Fgfr4* 基因作定量 PCR 验证, 变化趋势与芯片保持一致, 另外还可以看出, 分化 8 天细胞的 *Fgfr1* 表达量比 *Fgfr4* 高(图 5). 经 David 和 GeneOntology 数据库进一步分析, 对这些差异基因作了初步的功能归类(表 4), 可以看出, 变化集中在细胞外基质、细胞间连接、黏附以及 FGF、BMP 信号上, Wnt/beta-catenin 通路显示多层次下调, Notch2 信号下调, 另外, 细胞周期呈现阻滞调节, 一些参与分化的转录因子也出现变化, *Afp* 等分化标记上调表达.

Table 3 Genes expressed differentially in the differentiated cells after induced for 8 days compared with those in mESC-D3

Gene	GenBank accession No.	Difference fold	Description
<i>Actc1</i>	NM_009608	2.9275	Actin, alpha, cardiac
<i>Afp</i>	NM_007423	11.027	Alpha fetoprotein
<i>Agc1</i>	NM_007424	4.9663	Aggrecan 1
<i>Bmp1</i>	NM_009755	22.396	Bone morphogenetic protein 1
<i>Cdh1</i>	NM_009864	7.2522	Cadherin 1
<i>Cdkn2b</i>	NM_007670	5.8294	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)
<i>Fgf10</i>	NM_008002	4.2693	Fibroblast growth factor 10
<i>Fgfr1</i>	NM_010206	8.6065	Fibroblast growth factor receptor 1
<i>Fgfr4</i>	NM_008011	7.6829	Fibroblast growth factor receptor 4
<i>Gsk3b</i>	NM_019827	2.6665	Glycogen synthase kinase 3 beta
<i>Hes5</i>	NM_010419	4.1668	Hairy and enhancer of split 5 (<i>Drosophila</i>)
<i>Notch3</i>	NM_008716	5.5974	Notch gene homolog 3 (<i>Drosophila</i>)
<i>Pard6g</i>	NM_053117	2.4734	Par-6 partitioning defective 6 homolog gamma (<i>C. elegans</i>)
<i>Pdgfra</i>	NM_011058	8.9656	Platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide
<i>Piwi2</i>	NM_021308	2.1659	Piwi like homolog 2 (<i>Drosophila</i>)
<i>Prom1</i>	NM_008935	11.588	Prominin 1
<i>Psen2</i>	NM_011183	2.6913	Presenilin 2
<i>Rhob</i>	NM_007483	6.0722	Ras homolog gene family, member B
<i>Rhod</i>	NM_007485	5.2141	Ras homolog gene family, member D
<i>Snai1</i>	NM_011427	5.6401	Snail homolog 1 (<i>Drosophila</i>)
<i>Aldh2</i>	NM_009656	0.45841	Aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial
<i>Bmp4</i>	NM_007554	0.40554	Bone morphogenetic protein 4
<i>Cend1</i>	NM_007631	0.29247	Cyclin D1
<i>Cd3g</i>	NM_009850	0.43478	CD3 antigen, gamma polypeptide
<i>Cd3z</i>	NM_031162	0.29025	CD3 antigen, zeta polypeptide
<i>Cdh4</i>	NM_009867	0.36566	Cadherin 4
<i>Cdh8</i>	NM_007667	0.36735	Cadherin 8
<i>Col10a1</i>	NM_009925	0.39806	Procollagen, type X, alpha 1
<i>Col1a1</i>	NM_007742	0.22502	Procollagen, type I, alpha 1
<i>Des</i>	NM_010043	0.40996	Desmin
<i>Fgf11</i>	NM_010198	0.37161	Fibroblast growth factor 11
<i>Fgf18</i>	NM_008005	0.36511	Fibroblast growth factor 18
<i>Fgf23</i>	NM_022657	0.087273	Fibroblast growth factor 23
<i>Fgf3</i>	NM_008007	0.080430	Fibroblast growth factor 3
<i>Fgf6</i>	XM_485825	0.48129	Fibroblast growth factor 6
<i>Fzd1</i>	NM_021457	0.46809	Frizzled homolog 1 (<i>Drosophila</i>)
<i>Gdf10</i>	NM_145741	0.36445	Growth differentiation factor 10
<i>Gdf3</i>	NM_008108	0.39789	Growth differentiation factor 3
<i>Gjb1</i>	NM_008124	0.49212	Gap junction membrane channel protein beta 1
<i>Gjb4</i>	NM_008127	0.29048	Gap junction membrane channel protein beta 4
<i>Gjb6</i>	NM_008128	0.43670	Gap junction membrane channel protein beta 6
<i>Gje1</i>	NM_080450	0.47829	Gap junction membrane channel protein epsilon 1
<i>Krt1-15</i>	NM_008469	0.49418	Keratin complex 1, acidic, gene 15
<i>Myf5</i>	NM_008656	0.41648	Myogenic factor 5
<i>Myf6</i>	NM_008657	0.25736	Myogenic factor 6
<i>Notch2</i>	NM_010928	0.40201	Notch gene homolog 2 (<i>Drosophila</i>)
<i>Pdgfa</i>	NM_008808	0.48661	Platelet derived growth factor, alpha
<i>T</i>	NM_009309	0.19915	Brachyury

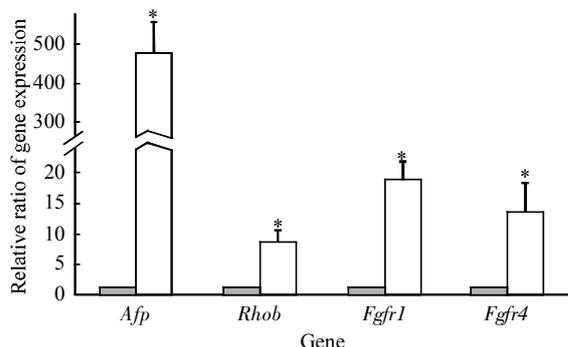


Fig. 5 Real-time PCR analysis of mESC-D3 and the differentiated cells after induced for 8 days for *Afp*, *Rhob*, *Fgfr1* and *Fgfr4* expression

ESC, ESC8 corresponding to the undifferentiated mESC-D3 and the differentiated cells after induced for 8 days respectively. The relative ratio of gene expression of *Afp*, *Rhob*, *Fgfr1* and *Fgfr4* are (480 ± 82) , (9 ± 2) , (19 ± 3) and (14 ± 5) ($n=3$), respectively in ESC8 compared to ESC. * indicates $P < 0.01$. ■: ESC; □: ESC8.

Table 4 Bioinformatics classification of differentially expressed genes during hepatic differentiation of mESC-D3

Biological function term	Gene
Cytoskeleton	Actc1, Des, Krt1-15
Signaling pathway	Fgf10, Fgfr1, Fgfr4, Fgf11, Fgf18, Fgf23, Fgf3, Fgf6 (FGF); Bmp1, Bmp4(BMP); Notch3, Notch2, Psen2 (Notch); Myf5, Myf6, T, Fzd1 (Wnt/beta-catenin); Gsk3b, Rhob, Rhod(PI3K/Akt); Piwil2; Pdgfra
Extracellular matrix, cell junction, cell adhesion	Agc1, Col10a1, Coll1a1, Gjb1, Gjb4, Gjb6, Gje1, Pard6g, Cdh1, Cdh4, Cdh8
Regulation of cell cycle	Ccnd1, Cdkn2b, Gdf10, Gdf3, Pdgfra
Regulation of transcription	Hes5, Snai1
Others(enzyme, lineage marker)	Aldh2, Cd3g, Cd3z, Afp, Prom1

Gray represents up-regulated genes; black represents down-regulated genes.

3 讨 论

目前,大多数致力于胚胎干细胞肝向分化研究的实验室都面临一个共同难题:如何才能高效、可重复地从胚胎干细胞中诱导出有完全功能的成熟肝细胞,这也是关系到将来干细胞临床应用的关键。自然发育过程中,由囊胚期、三胚层阶段到胎肝形成涉及多方面复杂的分子调节机制。在小鼠,肝向分化大约始于孕 8.5 天,由前肠腹侧的一段定形内胚层受到邻近心源中胚层及横膈间充质分泌的信号

诱导,定向为肝,形成肝憩室,随着增殖迁移到间充质中,接受由胶原等基质成分介导的进一步的信号刺激,并与其中的内皮细胞及随即迁入的造血细胞相互作用,形成肝芽,出现肝母细胞, HGF、OSM、糖皮质激素等多种信号分子再作用于胎肝的进一步发育成熟^[15]。胚胎干细胞是由囊胚期内细胞团分离出的、具有分化形成三胚层所有类型细胞潜能的原始干细胞,综合模拟生理过程的发育阶段及各种信号是解决上述分化难题的最佳办法。以往已有很多关于肝脏分化机制的研究,但多是着眼于单个或几个通路,近些年来,基因芯片技术的应用给研究者平行研究生物过程中的多个调节通路提供了可能,有助于人们在更深的水平上认识生理或病理现象。本研究采用的干细胞基因芯片是一种功能分类基因芯片,这类芯片将微阵列技术与特定生物学通路有机结合,剔除了表达谱芯片上对研究毫无意义的冗余信息,有助于我们更好地理解复杂的生物学过程。该芯片含 263 个基因,主要编码干细胞不同分化阶段相关标记、调节干细胞生长的生长因子和细胞因子、维持干细胞稳定的信号通路分子等,最早用于神经干细胞发育研究,后来也被用于胚胎干细胞、造血干细胞等的鉴定和分化研究。本实验采用该芯片的目的是为了观察在使用 FGF、HGF 等常用因子对胚胎干细胞进行体外肝诱导条件下,这些调节干细胞生长和维持其稳定的信号通路分子首先会发生怎样的变化,并对干细胞的分化状态和分化方向作出初步判断。当然,要详细研究胚胎干细胞肝定向分化过程中精细调控的全部信息,进一步的全基因组芯片分析是必需的,该研究只能提供一些初步信息。

本研究参考 Teratani 等^[16]的诱导方法,采用维甲酸、FGF、HGF、OSM 等常用的诱导因子,模拟自然发育的阶段,分步诱导胚胎干细胞的肝向分化,分化细胞第 3 天开始有内胚层基因 *Ttr*、*Foxa2* 等的表达,8 天时 *Sox17*、*Hhex*、*Foxa2* 关键基因表达明显增强,并开始有肝特异性分化基因 *Afp*、*Alb*、*Cyp7a1* 的表达,其中 *Cyp7a1* 又是区分肝细胞与胚外内胚层的一个重要标记。此时的 ALB 阳性细胞分布上呈集落样特点,多角形或圆形,核大而圆,此后继续给予 OSM、Dex 等促成熟因子刺激则开始表达 *G6p*、*Tat*、*Tdo* 较成熟分化基因,并形成肝细胞特异性的毛细胆管样结构和具有一定的糖原合成能力,补充证实了 8 天的肝系分化。以往研究表明,维甲酸可以通过削弱

LIFR/gp130 到 Stat3 之间的信号通路诱导胚胎干细胞出现类似早期胚胎的分化^[17], 而来自心源中胚层的 FGF 信号对定形内胚层的肝定向具有早期决定性作用, HGF 维持胎肝细胞的生长, OSM 促进它们的成熟. 鉴于以上原因, 推测分化第 3 天为三胚层阶段, 第 8 天为肝定向阶段, 但处于未成熟状态, 8 天以后则属于促成熟阶段, 本研究的重点是观察胚胎干细胞早期出现肝定向分化时的分子变化, 所以只选取第 8 天的肝样细胞为研究对象. 至于 8 天前后是否存在更细微的分化阶段则有待今后进一步的探讨^[18, 19].

基因芯片检测出的差异体现在多个方面, 反映了胚胎干细胞发生肝向分化时复杂广泛的调节模式, 通过数据库的生物信息分析, 这些变化可归类集中在几个层面: FGF、BMP 分子的广泛变化表明了这类信号对肝向分化的重要性, 这在以往许多研究中得到了证实, 这两大家族中不同成员的升高和降低也反映了它们的精细调节, 可能作用于肝发育的不同方面^[20~23]; 受体 *Fgfr1*、*Fgfr4* 在肝样细胞中的表达上调, 反映了外加的 FGF 作用, 而这两类受体上调幅度的差异, 反映了它们所介导信号的微妙调节, 可能正是决定内胚层肝向还是肺向分化的关键环节^[24]; *Gsk3b* 等基因的上调可能是 HGF 激活 PI3K/Akt 信号途径所致, 该通路的活化有助于肝卵圆细胞的增殖^[18]; Tanimizu 等^[25]的研究表明, Notch 通路通过调节不同的肝富集转录因子控制肝母细胞的分化, 激活 Notch2 信号促进胆管分化, 反之则促进肝细胞分化, 本研究中 Notch2、Notch3 及 *Psen2* 的变化再次验证了该通路的意义; *Myl5*、*T*、*Fzd1* 等基因的下调代表 Wnt/beta-catenin 通路多个层面的调节, 上述这些通路不同层面的变化反映了它们在胚胎早期肝分化中的重要性, 具体如何发挥作用及它们之间的联系均需要进一步地验证和细化研究; *Col10a1*、*Gjb1*、*Cdh1* 等细胞外基质、细胞连接、黏附的变化体现了细胞表面广泛的改变, 以上两方面以及 *Snai1* 等转录因子的变化与 Plescia 等^[26]在肝干细胞向肝细胞分化中发现的变化存在共性, *Cdkn2b* 的上调、*Ccnd1* 及 *Gdf*、*Fgf* 等生长因子的下调均显示细胞周期阻滞, 这可能与 DMSO 诱导肝向分化存在相同机制; 另外 *Afp* 分化标记的上调也辅助指示了胚胎干细胞的分化状态和方向.

上述这些信号的变化提示, 它们可能与胚胎干细胞早期发生肝定向分化密切相关, 从它们作用的

网络关系推导候选的分化关键靶点和通路, 以及进一步的全基因组学分析是今后研究的方向.

致谢 本文作者对复旦大学医学院的俞彰教授及解剖和组织胚胎学教研室致以衷心的感谢, 他们分别在电镜制作和提供细胞培养平台上给予了很大的帮助.

参 考 文 献

- 1 Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, *et al.* Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells *in vitro*. *FEBS Lett*, 2001, **497** (1): 15~19
- 2 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 Cells*, 2002, **20**(2): 146~154
- 3 Jones E A, Tosh D, Wilson D I, *et al.* Hepatic differentiation of murine embryonic stem cells. *Exp Cell Res*, 2002, **272**(1): 15~22
- 4 Kuai X L, Cong X Q, Li X L, *et al.* Generation of hepatocytes from cultured mouse embryonic stem cells. *Liver Transpl*, 2003, **9**(10): 1094~1099
- 5 Lavon N, Yanuka O, Benvenisty N. Differentiation and isolation of hepatic-like cells from human embryonic stem cells. *Differentiation*, 2004, **72**(5): 230~238
- 6 胡安斌, 蔡继业, 郑启昌, 等. ES 细胞体外定向分化为成熟肝细胞的实验研究. *生物化学与生物物理进展*, 2004, **31**(6): 518~522
Hu A B, Cai J Y, Zhang Q C, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2004, **31** (6): 518~522
- 7 Saito K, Yoshikawa M, Ouji Y, *et al.* Promoted differentiation of cynomolgus monkey ES cells into hepatocyte-like cells by co-culture with mouse fetal liver-derived cells. *World J Gastroenterol*, 2006, **12**(42): 6818~6827
- 8 Zhou Q J, Huang Y D, Xiang L X, *et al.* *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes induced by fibroblast growth factors and bone morphological protein-4. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, **39**(9): 1714~1721
- 9 Lavon N, Benvenisty N. Study of hepatocyte differentiation using embryonic stem cells. *J Cell Biochem*, 2005, **96**(6): 1193~1202
- 10 Watt A J, Forrester L M. Deriving and identifying hepatocytes from embryonic stem cells. *Stem Cell Rev*, 2006, **2**(1): 19~22
- 11 Sell S. Cellular origin of cancer: dedifferentiation or stem cell maturation arrest?. *Environ Health Perspect*, 1993, **101** (Suppl 5): 15~26
- 12 Guo W, Lasky J L, Wu H. Cancer stem cells. *Pediatr Res*, 2006, **59** (4 Pt 2): 59~64
- 13 Alison M R, Lovell M J. Liver cancer: the role of stem cells. *Cell Prolif*, 2005, **38**(6): 407~421
- 14 Trosko J E. From adult stem cells to cancer stem cells: Oct-4 Gene, cell-cell communication, and hormones during tumor promotion. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, **1089**: 36~58
- 15 周庆军, 邵健忠, 项黎新, 等. 胚胎干细胞分化为肝细胞的研究进展. *生物工程学报*, 2005, **21**(2): 171~176
Zhou Q J, Shao J Z, Xiang L X, *et al.* *Chin J Biotech*, 2005, **21**(2): 171~176

- 16 Teratani T, Yamamoto H, Aoyagi K, *et al.* Direct hepatic fate specification from mouse embryonic stem cells. *Hepatology*, 2005, **41**(4): 836~846
- 17 Tighe A P, Gudas L J. Retinoic acid inhibits leukemia inhibitory factor signaling pathways in mouse embryonic stem cells. *J Cell Physiol*, 2004, **198**(2): 223~229
- 18 银东智, 蔡继业, 郑启昌, 等. 胚胎干细胞向肝实质细胞体外定向诱导分化过程中的肝卵圆细胞. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32**(10): 959~968
Yin D Z, Cai J Y, Zheng Q C, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32**(10): 959~968
- 19 Zhou Q J, Xiang L X, Shao J Z, *et al.* *In vitro* differentiation of hepatic progenitor cells from mouse embryonic stem cells induced by sodium butyrate. *J Cell Biochem*, 2007, **100**(1): 29~42
- 20 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
- 21 Rossi J M, Dunn N R, Hogan B L, *et al.* Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev*, 2001, **15**(15): 1998~2009
- 22 Calmont A, Wandzioch E, Tremblay K D, *et al.* An FGF response pathway that mediates hepatic gene induction in embryonic endoderm cells. *Dev Cell*, 2006, **11**(3): 339~348
- 23 Gouon-Evans V, Boussemaert L, Gadue P, *et al.* BMP-4 is required for hepatic specification of mouse embryonic stem cell-derived definitive endoderm. *Nat Biotechnol*, 2006, **24**(11): 1402~1411
- 24 Serls A E, Doherty S, Parvatiyar P, *et al.* Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung. *Development*, 2005, **132**(1): 35~47
- 25 Tanimizu N, Miyajima A. Notch signaling controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors. *J Cell Sci*, 2004, **117**(Pt 15): 3165~3174
- 26 Plescia C, Rogler C, Rogler L. Genomic expression analysis implicates Wnt signaling pathway and extracellular matrix alterations in hepatic specification and differentiation of murine hepatic stem cells. *Differentiation*, 2001, **68**(4~5): 254~269

Microarray Analysis of Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells Into Hepatocyte-like Cells*

LI Yan, LI Xue-Fei, GUO Kun, GAO Dong-Mei, ZHAO Yan, LIU Yin-Kun**

(Liver Cancer Institute, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract Elucidating the complex molecular regulatory mechanisms underlying hepatic differentiation at early stage contributes both to fully harness embryonic stem cells in liver regeneration, and to understand the differentiation-related liver diseases. Pluripotent embryonic stem cells can be induced into hepatocytes *in vitro*. mESC-D3, maintained in adherent monolayer culture condition, were induced to differentiate along hepatic lineage with addition of some factors to the medium at different time. The factors included FGF, HGF, OSM and so on. The differentiated cells showed a hepatocyte-like morphology, expressed hepatic marker genes and have also produced and stored glycogen by phase contrast and transmission electron microscopy, reverse transcription-polymerase chain reaction, immunocytochemistry, and periodic acid-Schiff staining respectively. Stem cell differentiation-related microarray was used to analyze the differential gene expression profiling during hepatic differentiation of mESC-D3 at early stage. Quantitative PCR was performed to verify the microarray data. Microarray analysis presented 48 genes expressed differentially (2 fold), including 20 genes up-regulated and 28 genes down-regulated. Further bioinformatics analysis showed the majority of these genes were extracellular matrix, intercellular junction and FGF, BMP, Notch and Wnt signaling pathways molecules, which suggests these alterations may be closely associated with the hepatic differentiation of embryonic stem cells at early stage.

Key words embryonic stem cell, hepatocyte, cell differentiation, microarray

*This work was supported by a grant from The National Science and Technique Foundation during The 10th Five-Year Plan Period (2004BA703B02).

**Corresponding author.

Tel: 86-21-64041990-2501, E-mail: liu.yinkun@zs-hospital.sh.cn

Received: May 30, 2008 Accepted: September 11, 2008