

• 综述 •

胚胎干细胞体外分化为肝细胞和心肌细胞的研究进展

张 兴¹, 申秀萍², 刘昌孝^{2,3*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津市新药安全评价研究中心, 天津 300193

3. 天津药物研究院 天津药代动力学与药效动力学省部共建国家重点实验室, 天津 300193

摘 要: 胚胎干细胞是从早期胚胎或原始性腺分离后能在体外长期传代培养的全能细胞系。胚胎干细胞体外可以诱导分化为各种体细胞, 并且用这些体细胞治疗相应的疾病, 一直以来是生物医药领域的研究焦点。目前, 在该领域用于诱导胚胎干细胞分化的方法很多, 其中的一些方法就用到化合物和部分中药提取物。整理近5年来胚胎干细胞体外通过拟胚体途径、细胞单层诱导分化为肝细胞和心肌细胞的有关文献, 做一简要综述。

关键词: 胚胎干细胞; 生物医药; 拟胚体; 定向分化

中图分类号: R967 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2014)06-0554-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.06.020

Advances in research on *in vitro* differentiation of embryonic stem cell into liver cells and myocardial cells

ZHANG Xing¹, SHEN Xiu-ping², LIU Chang-xiao^{2,3}

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Center for Drug Safety Assessment and Research, Tianjin 300193, China

3. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Embryonic stem cell, separated from the early embryo or the original gonad, is the all-around cell line, which can be well for long-term passages *in vitro*. Embryonic stem cells can be differentiated into all kinds of somatic cells *in vitro* and are used to heal relevant serious illnesses. It is a hot spot in the field of study on the embryonic stem cell. It is difficult to find the mechanism, although it is very important. Currently, there are a lot of methods used to induce embryonic stem cells, and some of which are used for the compounds and parts of traditional Chinese medicine extracts. The author has compiled the nearly five years' literature on embryonic stem cells differentiating into myocardial cells and liver cells and reviewed to provide the reference.

Key words: embryonic stem cells; biological medicine; embryoid body; differentiation

胚胎干细胞(embryonic stem cells)是从早期胚胎或原始性腺分离后, 能在体外长期传代培养并保持高度未分化的全能细胞系^[1]。胚胎干细胞最重要的特点是具有无限分化潜能, 即可分化为各种体细胞并形成组织和器官^[2]。通过对胚胎干细胞的深入研究, 有学者期望建立胚胎干细胞体外分化的模型, 用于药物临床前研究和新药的筛选。该模型可模拟体内胚胎发育过程, 替代生殖毒性实验, 操作便捷的同时还避免了伦理道德问题。该技术的成功实施

将极大地推动新药研发以及药物评价的进程。

1998年, 人的胚胎干细胞被成功分离并克隆^[3]。随即就有学者运用各种物质体外诱导胚胎干细胞分化为肝细胞和心肌细胞。体外诱导干细胞的物质很多, 其中就包括化学药物和部分中药提取物。体外分化可以通过加入化合物、基因修饰和共培养的方式诱导胚胎干细胞实现。现就胚胎干细胞体外分化为心肌细胞、肝细胞的研究进展做一综述, 以期为新药研发与治疗靶点发现提供依据。

收稿日期: 2014-08-02

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项(2012XZ09505); 973计划资助(2010CB735602); “十一五”国家科技支撑计划(2007BAI41B03)

作者简介: 张 兴(1985—), 男, 在读博士研究生, 研究方向为基于代谢组学的胚胎干细胞药物早期安全性评价。E-mail: zhangxing361@163.com

*通信作者 刘昌孝, 博士生导师, 中国工程院院士, 从事药理学及代谢组学研究。Tel: (022)23006860 E-mail: liuchangxiao@163.com

1 拟胚体途径诱导分化

拟胚体 (embryoid body) 是胚胎干细胞在体外重力条件下自发聚集而形成类似早期胚胎的球体结构, 它模拟了胚胎在体内早期发育中组织细胞的分化, 常作为胚胎发育理想的体外模型^[4]。因此, 大量胚胎干细胞的分化实验都是通过拟胚体来实现的, 这也是目前一个非常成熟的方法, 一般分为细胞因子或细胞外基质诱导分化、遗传修饰后诱导分化、化合物诱导分化等 3 个方面。

1.1 细胞因子或细胞外基质诱导分化

在诱导过程中, 加入与细胞分化发育相关的细胞因子优化诱导条件, 诱导胚胎干细胞向目标细胞进一步分化。Ao 等^[5]研究表明一种针对 dorsomorphin 的第二代小分子骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 抑制剂 dorsomorphin homologue 1 (DMH1) 能有效地诱导胚胎干细胞形成跳动的心肌细胞。Gouon-Evans 等^[6]研究并证实了骨形态发生蛋白-4 (BMP-4) 对于小鼠胚胎内胚层向肝系分化具有重要作用。Nakanishi 等^[7]研究证明 前列腺雄激素抑制信号-1 (prostatic androgen repressed message-1, PARM-1), 一种内质网分子, 能够提高胚胎干细胞分化为心肌细胞的转化率, 但没有改变中胚层标记的表达。

由细胞外基质构成的三维支架可以模拟体内分化的微环境, 诱导胚胎干细胞向心肌细胞、肝细胞分化。Higuchi 等^[8]研究发现在由心脏细胞外基质培养的胚胎干细胞心肌球蛋白重链和心肌钙蛋白 I 的表达量高于肝脏细胞外基质, 蛋白表达量也高于肝脏细胞外基质。Eremeev 等^[9]报道胚胎干细胞在含有外源性生长因子 3D 胶原培养系统中能够向肝细胞分化, 并且该分化细胞能够表达各类肝细胞所具有的标志物。

1.2 遗传修饰后诱导分化

遗传修饰法是一种新发展的胚胎干细胞分化方法。它是通过在培养系统内或细胞内转入某些基因来促进胚胎干细胞向目标细胞分化, 该方法关键在于选择合适的基因和筛选标记, 同时其安全性也需要注意。Xiang 等^[10]研究证明, 由慢病毒介导 Wnt11 转入骨骼肌源性干细胞 (Skeletal muscle-derived stem cells, SMDSCs), 能够显著提高 MDSCs 分化为心肌细胞的效率, 诱导的心肌细胞有更好的活性, 将来有可能用于心肌梗死的治疗。2002 年, Kanda 等^[11]研究证明: 强制表达肝细胞核因子 3 β 的胚胎

干细胞在含有成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor, FGF2) 等诱导剂的培养系统中能诱导分化为肝细胞。

1.3 化合物诱导分化

已有研究显示丁酸钠可通过影响组蛋白去乙酰化酶抑制剂的活性介导多种胚胎干细胞分化^[12-13]。Oh 等^[14]研究证明一些 β 转角小分子拟肽物, 如 CW209E, 能够提高胚胎干细胞分化为心肌细胞的分化效率。之前的研究发现, DNA 甲基化修饰和组蛋白乙酰化在胚胎干细胞分化过程中有一定作用, 如 5-氮胞苷可诱导间充质细胞分化为心肌细胞^[15], 而 5-氮胞苷-2'-脱氧胞苷和曲古抑菌素 (trichostatin) A 则可以影响脂肪细胞的命运^[16]。

2 细胞单层诱导分化

目前对于胚胎干细胞分化研究, 大多数研究者都采用了拟胚体的方法, 该方法充分利用了拟胚体在胚胎早期分化中的作用, 为进一步的定向分化奠定了基础^[17-19]。尽管拟胚体的形成有利于后续的定向分化, 但拟胚体的分化具有不确定性, 这样就影响诱导分化率。研究还发现拟胚体并不是胚胎干细胞分化的必经阶段。随着对胚胎发育过程的深入研究, 对早期胚胎分化的分子机制逐步掌握, 胚胎干细胞单层定向诱导分化已具备可行性, 而且该方法操作简单, 只要诱导分化条件合适就会获得非常高的分化率, 因而逐渐成为当前胚胎干细胞细胞分化研究的重要方式。

2.1 细胞因子或化合物诱导分化

Dong 等^[20]利用丙戊酸和细胞因子 (肝细胞生长因子、表皮生长因子和胰岛素) 先将小鼠胚胎干细胞分化为肝祖细胞, 再继续诱导为有功能的成熟肝细胞。Lian 等^[21]研究发现胰岛素能够抑制单层人胚胎干细胞向心肌细胞分化, 但是当加入小分子经典 Wnt 信号调节剂后, 胰岛素不能抑制单层人胚胎干细胞向心肌细胞的分化。

2.2 共培养系统诱导分化

共培养系统诱导方法是通过共培养的方式诱导胚胎干细胞分化为心肌细胞、肝细胞的方法。Yue 等^[22]研究表明骨髓基质干细胞在与拟胚体共培养的过程中, 能够诱导胚胎干细胞向心肌细胞分化, 同时能够提高 BMP-4 和视黄酸的诱导作用。Soto-Gutierrez 等^[23]将小鼠胚胎干细胞与人肝脏非实质细胞共培养, 并添加成纤维细胞生长因子 2、活化素-A (activin-A) 及肝细胞生长因子, 发现诱

导细胞可以表达肝特异性基因,并分泌血清白蛋白,形成了功能性肝细胞。将其灌输入人工肝,可以缓解肝切除所致的肝损伤,与原代肝细胞作为种子细胞的人工肝比较具有相似的功能。

有研究表明在将小鼠与受损肝细胞和胚胎干细胞共培养的过程中,胚胎干细胞能够抑制肝细胞的凋亡,促进肝细胞的增殖,而且胚胎干细胞在肝细胞存在的条件下分化为肝细胞,参与受损肝细胞的修复^[24]。欧念文等^[25]发现利用心肌干细胞(cardiac stem cells, CSCs)与心肌细胞共同培养可以促进CSCs向心肌细胞分化。有报道表明将胚胎肝细胞与小鼠骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)在体外共同培养,使得小鼠骨髓MSCs分化为类肝细胞^[26]。

3 结语

本文阐述了胚胎干细胞在体外诱导分化为心肌细胞和肝细胞的主要方法。随着研究的深入,已经有研究者在体内分化出心肌细胞和肝细胞^[27-29]。这对于胚胎干细胞诱导心肌细胞和肝细胞,并将其应用于临床又迈进了一大步。

在药理学方面,有学者研究在胚胎干细胞分化为体细胞的过程中,向培养系统内加入药物观察对胚胎干细胞分化的影响,以期建立体外研究模型。该模型可用于新药的临床前研究,用于前期的药物筛选。该模型还可模仿体内胚胎发育过程,作为生殖毒性的替代实验。这样会更加方便,且成本较体内研究低,同时避免了伦理道德问题。

由于胚胎干细胞面临的伦理学困境和免疫排斥问题限制了其应用,而一种类似胚胎干细胞的特殊细胞的发现,给解决这个问题带来了一线曙光,这就是体细胞获得的诱导性多能干细胞。这种细胞在自然界是不存在的,但是它具有和胚胎干细胞几乎相同的生物学属性,这为医学新时代揭开了新的一页^[30-31]。同样,体细胞获得的诱导性多能干细胞也可以根据胚胎干细胞的诱导方法进行分化。

作为再生医学研究的重要种子细胞,胚胎干细胞具有无限增殖和多向分化潜能,可以进行体外基因操作和长期保存。但是试验表明胚胎干细胞进入机体后,很容易增生形成肿瘤,这也是目前需要解决的难题之一。目前,用于诱导胚胎干细胞分化的方法很多,但分化的效率不高亦是亟待解决的难题。尽管胚胎干细胞定向分化的技术仍然处于初级阶段,但是通过深入的研究和与相关学科的联合攻关,

其在细胞移植、组织再生与修复等方面仍具有非常广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Ding X, Zhang X, Mu Y, *et al.* Effects of BMP4/SMAD signaling pathway on mouse primordial follicle growth and survival via up-regulation of *Sohlh2* and *c-kit* [J]. *Mol Reprod Dev*, 2013, 80(1): 70-78.
- [2] Leavitt A D, Hamlett I. Homologous recombination in human embryonic stem cells: a tool for advancing cell therapy and understanding and treating human disease [J]. *Clin Transl Sci*, 2011, 4(4): 298-305.
- [3] 单连慧, 安新颖, 钟 华, 等. 人类胚胎干细胞科技论文产出与研发策略研究 [J]. 中华细胞与干细胞杂志: 电子版, 2012;2(1): 61-64.
- [4] 李 晴, 刘 靖, 徐秀琴. 人类多能干细胞源心肌细胞的研究进展与应用前景 [J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(3): 251-261.
- [5] Ao A, Hao J, Hopkins CR, *et al.* DMH1, a novel BMP small molecule inhibitor, increases cardiomyocyte progenitors and promotes cardiac differentiation in mouse embryonic stem cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41627.
- [6] Gouon-Evans V, Boussemart L, Gadue P, *et al.* BMP-4 is required for hepatic specification of mouse embryonic stem cell-derived definitive endoderm [J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(11): 1402-1411.
- [7] Nakanishi N, Takahashi T, Ogata T, *et al.* PARM-1 promotes cardiomyogenic differentiation through regulating the BMP/Smad signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 428(4): 500-505.
- [8] Higuchi S, Lin Q, Wang J, *et al.* Heart extracellular matrix supports cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells [J]. *J Biosci Bioeng*, 2013, 115(3): 320-325.
- [9] Ereemeev A V, Svetlakov A V, Bolshakov I N, *et al.* Mouse hepatocytes retain the expression of the main differentiation markers during culturing on collagen-chitosan matrices [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2011, 151(5): 642-645.
- [10] Xiang G, Yang Q, Wang B, *et al.* Lentivirus-mediated *Wnt11* gene transfer enhances cardiomyogenic differentiation of skeletal muscle-derived stem cells [J]. *Mol Ther*, 2011, 19(4): 790-796.
- [11] Kanda S, Shiroy A, Ouji Y, *et al.* *In vitro* differentiation of hepatocyte-like cells from embryonic stem cells promoted by gene transfer of hepatocyte nuclear factor 3 beta [J]. *Hepatol Res*, 2003, 26(3): 225-231.
- [12] Ren M, Yan L, Shang C Z, *et al.* Effects of sodium

- butyrate on the differentiation of pancreatic and hepatic progenitor cells from mouse embryonic stem cells [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 109(1): 236-244.
- [13] Kallas A, Pook M, Trei A, *et al.* SOX2 is regulated differently from NANOG and OCT4 in human embryonic stem cells during early differentiation initiated with sodium butyrate [J]. *Stem Cells Int*, 2014, 2014: 298163.
- [14] Oh S W, Lee J B, Kim B, *et al.* Peptidomimetic small-molecule compounds promoting cardiogenesis of stem cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(11): 1979-1988.
- [15] Qian Q, Qian H, Zhang X, *et al.* 5-Azacytidine induces cardiac differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells by activating extracellular regulated kinase [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(1): 67-75.
- [16] Zych J, Stimamiglio M A, Senegaglia A C, *et al.* The epigenetic modifiers 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A influence adipocyte differentiation in human mesenchymal stem cells [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2013, 46(5): 405-416.
- [17] Li P, Hu H, Yang S, *et al.* Differentiation of induced pluripotent stem cells into male germ cells *in vitro* through embryoid body formation and retinoic acid or testosterone induction [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 608728.
- [18] Johan Stenberg, Maria Elovsson, Raimund Strehl, *et al.* Sustained embryoid body formation and culture in a non-laborious three dimensional culture system for human embryonic stem cells [J]. *Cytotechnology*, 2011, 63(3): 227-237.
- [19] Kim Peter T W Hoffman Brad G, Plesner A, *et al.* Differentiation of mouse embryonic stem cells into endoderm without embryoid body formation [J]. *PLoS One*, 2010, 5(11): e14146.
- [20] Dong X J, Zhang G R, Zhou Q J, *et al.* Direct hepatic differentiation of mouse embryonic stem cells induced by valproic acid and cytokines [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(41): 5165-5175.
- [21] Lian X, Zhang J, Zhu K, *et al.* Insulin inhibits cardiac mesoderm, not mesendoderm, formation during cardiac differentiation of human pluripotent stem cells and modulation of canonical Wnt signaling can rescue this inhibition [J]. *Stem Cells*, 2013, 31(3): 447-457.
- [22] Yue F, Johkura K, Tomotsune D, *et al.* Bone marrow stromal cells as an inducer for cardiomyocyte differentiation from mouse embryonic stem cells [J]. *Ann Anat*, 2010, 192(5): 314-321.
- [23] Soto-Gutierrez A, Kobayashi N, Rivas-Carrillo J D, *et al.* Reversal of mouse hepatic failure using an implanted liver-assist device containing ES cell-derived hepatocytes [J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(11): 1412-1419.
- [24] Xu D, Wang F, Pan Z, *et al.* Coculturing embryonic stem cells with damaged hepatocytes leads to restoration of damage and high frequency of fusion [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2009, 55(Suppl): OL1186-1199.
- [25] 欧念文, 陆东风, 杨镇军, 等. 新生小鼠心肌干细胞与心肌细胞共培养诱导分化试验 [J]. 血栓与止血学, 2010, (1): 5-9.
- [26] 张涛, 赵振国, 高辉. 大鼠骨髓间充质干细胞体外诱导为肝细胞样细胞 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, (6): 6669-6672.
- [27] Bondue A, Tännler S, Chiapparo G, *et al.* Defining the earliest step of cardiovascular progenitor specification during embryonic stem cell differentiation [J]. *J Cell Biol*, 2011, 192(5): 751-765.
- [28] Yamamoto H, Quinn G, Asari A, *et al.* Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes: biological functions and therapeutic application [J]. *Hepatology*, 2003, 37(5): 983-993.
- [29] 汪涛, 林晓波, 杨丽娜, 等. 人脐带间充质干细胞向心肌细胞诱导分化并体内移植的研究 [J]. 中国现代医生, 2013, (11): 1-4.
- [30] 闫益波, 齐巍巍, 钟部帅, 等. 肝细胞治疗的新型种子细胞-诱导性多能干细胞 [J]. 生物技术通报, 2010, (11): 25-29.
- [31] Kwon J, Lee N, Jeon I, *et al.* Neuronal differentiation of a human induced pluripotent stem cell line (FS-1) derived from newborn foreskin fibroblasts [J]. *Int J Stem Cells*, 2012, 5(2): 140-145.