

李裕珍, 冯丽娟, 潘益巧, 等. 骨髓间充质干细胞诱导分化为肝细胞的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 130-135.

Li YZ, Feng LJ, Pan YQ, et al. Recent progress in the induction of bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocytes [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 130-135.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 020

骨髓间充质干细胞诱导分化为肝细胞的研究进展

李裕珍¹, 冯丽娟¹, 潘益巧¹, 阮博文¹, 周晓玲^{2*}

(1. 广西中医药大学, 南宁 530000; 2. 广西中医药大学第三附属医院, 广西 柳州 545000)

【摘要】 骨髓间充质干细胞(BMSCs)是骨髓内的非造血干细胞,具有多向分化、低免疫源性等优势。肝移植是目前终末期肝病的有效治疗方法,但因肝源短缺及免疫排斥等缺陷,其临床运用严重受限。BMSCs经过不同的诱导方法可以在体外分化为肝细胞,应用于晚期肝病的治疗,是目前治疗肝损伤的一种新兴治疗手段。本文主要将近年来BMSCs的分离培养及鉴定方案、诱导BMSCs向肝细胞分化的常用方法及分化机制进行综述,以期今后临床运用BMSCs治疗终末期肝病提供更加充分的理论依据。

【关键词】 骨髓间充质干细胞; 诱导分化; 肝细胞; 终末期肝病

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0130-06

Recent progress in the induction of bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocytes

LI Yuzhen¹, FENG Lijuan¹, PAN Yiqiao¹, RUAN Bowen¹, ZHOU Xiaoling^{2*}

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China.

2. the Third Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Liuzhou 545000)

【Abstract】 Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) are non-hematopoietic stem cells in the bone marrow that have the advantages of multidirectional differentiation and low immunogenicity. Although liver transplantation is an effective treatment for end-stage liver disease, its clinical application is severely limited by the shortage of donor liver sources and rate of immune rejection. The differentiation of BMSCs into hepatocytes in vitro using different induction method is applied in the treatment of advanced liver disease, and represents a new treatment method for liver injury. This article summarizes the isolation culture, and the common method and mechanisms for inducing BMSC differentiation into hepatocytes that have been described in the literature in recent years. A clear understanding of these processes will provide a strong theoretical basis for future clinical applications of BMSCs in the treatment of end-stage liver disease.

【Keywords】 bone marrow mesenchymal stem cells; induced differentiation; hepatocytes; end-stage liver disease

骨髓间充质干细胞(bone marrow stem cells, BMSCs)是属于中胚层的一类多能干细胞,存在于骨髓中的基质干细胞,为最早发现的多向分化潜能干细胞,具有自我增殖、多向分化、免疫调节、促进造血及修复损伤器官的作用^[1-2],且在不同诱导条件下可以向肝细胞、心肌细胞、神经细胞、成骨细胞等分化^[3-4]。由于BMSCs多向分化功能,且容易获

取、体外增殖快、传代基因稳定性良好、移植免疫排斥少等优点使其成为近年诱导分化研究的热点^[5]。大量动物研究表明,通过细胞移植技术将BMSCs移植进入受损肝中,对损伤的肝具有一定的修复作用,其主要是通过不同的诱导条件使BMSCs定向分化为有功能的肝细胞^[6-7];临床研究也发现,自体移植BMSCs可以改善肝病患者各项生化指标,减少晚

【基金项目】 国家自然科学基金(81760855);柳州市应用技术与开放计划项目(2018AF10503);广西中医药大学校级一般硕士研究生科研创新项目(YCSY2020057)。

【作者简介】 李裕珍(1993—),女,硕士研究生,研究方向:中医药防治肝病。E-mail: 1058537615@qq.com

【通信作者】 周晓玲(1977—),女,主任医师,博士,研究方向:中医药防治肝病。E-mail: zxl_lz@163.com

期肝病患者不良反应,有效提高其生活质量^[8-9]。然而,对于 BMSCs 的常用分离培养和鉴定方法,以及其向肝细胞分化的诱导方法及分化机制尚缺乏系统整理及总结。因此本文主要对此进行综述,为更好发挥 BMSCs 在肝损伤性疾病治疗中的应用提供思路。

1 BMSCs 的常用分离培养和鉴定方法

1.1 BMSCs 的常用分离培养方法

目前常用的 BMSCs 分离培养方法有全骨髓贴壁分离培养法、骨组织消化分离法、离心法、流式细胞仪分离法、免疫磁珠分选法等^[10-12],其中后两者因操作复杂、分离成本高且分离后细胞转化效果差等使其运用受限,目前大多数研究中使用的是操作更为方便且获得细胞数量较多、增殖能力较强的全骨髓贴壁分离法和密度梯度离心法^[13],但因其分离纯度欠佳,因此有学者在全骨髓贴壁分离法基础上进行创新优化,其中徐丽娟等^[14]创新性地使用小鼠 3 d 乳鼠骨片法,将乳鼠骨片直接进行培养,当梭形细胞在骨片周围密度大于 50% 时,按比例进行三次传代,此法获得了纯度较高的 BMSCs;向俊西等^[15]则在接种一定时间后将接种不满意的细胞进行重新接种,并按 12、24 h 更换一次培养液,经优化后的诱导方法更简便、快捷地获得了满意的大鼠 BMSCs;两者改良后的培养方法最后均可得到纯度较高的 BMSCs,有效解决因细胞分离纯度不佳影响实验结果的问题,更有利于实验的研究。

1.2 BMSCs 常用鉴定方法

在 BMSCs 鉴定方面,文献多报道 BMSCs 在形态上表现为纤维状或长梭形^[16-17],未发现其特异性的表面标志物,但因其不表达造血干细胞表面标志物,故常用阴性和阳性选择相结合的方法进行鉴定。现认为成熟且合格的 BMSCs 多表达阳性或强阳性的 CD29、CD90、CD73、CD105、CD49,不表达或弱表达 CD11、CD31、CD34、CD44、CD45 等^[18-20]。

2 BMSCs 诱导向肝细胞分化的常用方法

BMSCs 具有多向分化性,但其向肝细胞分化需要严格的分化条件及多种细胞因子的参与,因此如何提高及保证 BMSCs 向肝细胞分化的有效率并将其应用于临床治疗是目前研究的重点和难点。研究发现通过相应的物质诱导,如中药含药血清、细胞因子、模拟肝样微环境或其他物理干预等诱导的

方式,可促使 BMSCs 不同程度地向肝细胞分化。

2.1 中药含药血清诱导

目前中药被广泛应用于肝病的临床治疗中,特别是对于中晚期肝病,中药有明显改善患者临床症状且毒副作用小、不良反应少等特点,为中药方剂联合 BMSCs 移植治疗终末期肝病提供新思路,但由于中药复方成分多样且复杂,作用靶点广泛,同时也限制了对其机制的研究。因此探索利用中药含药血清促使 BMSCs 向肝细胞分化也是现今热点。

活血化瘀类中药复方是治疗气滞血瘀型肝硬化的经典方剂。研究表明鳖甲煎丸含药血清对 BMSCs 向肝细胞转化有促进作用,且有改善肝纤维化及调节免疫等作用,肯定了中药对 BMSCs 诱导分化的作用,但具体的作用机制尚未明确^[21]。韩海啸等^[22]研究发现,调肝益气通络汤药物血清不仅可以有效诱导 BMSCs 定向分化为肝细胞,且对 BMSCs 具有增殖作用,并随着药物浓度的增加及培养时间的延长,细胞数量就不断增多。另外,基于“肾主骨生髓”理论,Zhou 等^[23]通过评估不同干预办法移植 BMSCs 治疗肝硬化大鼠的疗效,选用 BMSCs 联合中药济生肾气汤(JSSQ 组)进行干预,结果证实了中药济生肾气汤联合 BMSCs 移植对改善肝硬化大鼠的治疗作用,其机制可能 JSSQ 具有滋补肝肾,促进骨髓再生的功能,其在体内发挥了类似于细胞归巢诱导剂的作用,促进了 BMSCs 的诱导分化及迁移,从而参与肝细胞的再生修复。瘀血阻络、肝肾阴虚型均是终末期肝病患者的主要证型之一^[24],在诱导 BMSCs 向肝细胞分化过程中,多数学者^[21-22]以活血化瘀、调肝通络功效的方药为主,诱导分化结果良好,而部分学者^[23,25]以补肾生髓、滋阴养血法也明显改善大鼠肝纤维化程度,详见表 1。因此活血化瘀法中药血清诱导是否适应于所有终末期肝病尚待进一步研究,针对不同证型的肝病所采用中药含药血清的可进行不断地探索。

2.2 细胞因子诱导

细胞因子是一类由免疫细胞和某些非免疫细胞经刺激而合成、分泌的具有广泛生物活性的小分子蛋白质,现多被应用于诱导 BMSCs 向肝细胞分化。潘兴南等^[26]研究发现肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)体外诱导 BMSCs 向肝细胞分化以质量浓度 $\geq 20 \mu\text{g/L}$ 且诱导时间 $\geq 6 \text{ h/d}$ 为宜,诱导效果与 HGF 浓度及每日诱导时间呈正相关性。Putra 等^[27]发现在血管内皮生长因子

表 1 常用中药含药血清分类及代表

Table 1 Classification and representation of commonly used Chinese medicine sera containing drugs

类别 Category	作者 Author	活血化瘀类 Invigorate the circulation of blood		补肾生髓类 Nourishing kidney to produce marrow	
		温智稀 ^[21] Wen Zhixi	韩海啸 ^[22] Han Haixiao	周晓玲 ^[23] Zhou Xiaoling	平键 ^[25] Ping jian
题目 Title		鳖甲煎丸含药血清诱导大鼠骨髓间充质干细胞转化为肝细胞的实验研究 Research on the transformation of hepatocyte from bone marrow mesenchymal stem cells by biejiajianwan (鳖甲煎丸) drug serum)	调肝益气通络方药物血清对骨髓间充质干细胞体外增殖的影响 Influence of Tiaogan Yiqi Tongluo formula serum on bone marrow mesenchymal stem cells proliferation <i>in vitro</i>	不同干预方法对肝硬化大鼠骨髓间充质干细胞移植效果的观察 Observation of the effect of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation by different interventions on cirrhotic rats	一贯煎诱导骨髓间充质干细胞分化为肝细胞样细胞的实验研究 Effect of yiguan decoction on differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocytelike cells; an experimental research
中药复方 Chinese herbal compound		鳖甲煎丸 Biejiajianwan	调肝益气通络汤 Tiaogan yiqi tongluo formula	济生肾气汤 Jisheng Shenqi decoction	一贯煎 Yiguan decoction

(vascular endothelial growth factor, VEGF) 的刺激下, BMSCs 可向损伤肝组织迁移并可进一步转化为原代肝细胞, 且发现静脉内给药途径是 BMSCs 移植的最佳途径。吴增城等^[28] 探讨半乳糖凝集素-3 (Gal-3) 联合 HGF 诱导大鼠 BMSCs 向肝细胞转化的可行性及最佳诱导剂量, 观察记录不同浓度及不同时间下 BMSCs 的细胞形态学改变, 结果发现各组 BMSCs 形态逐渐向肝细胞分化, 与阳性对照组细胞相似, 其中浓度 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的组别在第 28 天时间段与对照组 IAR20 细胞最为相似, 且甲胎蛋白、清蛋白荧光染色阳性率最高, mRNA 表达较其它各组明显增高。谭铭辉等^[29] 发现使用 galectin-3 诱导 BMSCs 分化为肝细胞会出现白蛋白 (albumin, ALB) mRNA 及角蛋白 18 (cytokeratin 18, CK-18) mRNA 及 AFP 蛋白表达增加, 与 HGF 联合进行诱导时可提高 BMSCs 向肝细胞诱导分化的效率。

2.3 中药含药血清联合细胞因子诱导

Fu 等^[30] 采用中药一贯煎含药血清联合 HGF 和基质细胞衍生因子 1 (stromal cell derived factor-1, SDF-1) 在体外诱导 BMSCs 向肝细胞分化, 结果表明含中药血清组 (YGJ 组) 经过一定的时间诱导后, BMSCs 的形态逐渐向肝细胞样转化, 其所含 ALB 和 CK-18 阳性细胞的比例均比其它组升高。由此说明一贯煎含药血清联合与 HGF 和 SDF-1 诱导小鼠 BMSCs 可以促进其定向分化为肝细胞, 较单纯的细胞因子诱导转化率高。陈艳等^[31] 从中药姜黄中提取姜黄素联合成纤维细胞生长因子-4 (FGF-4) 诱导 BMSCs 定向分化发现, 发现适当剂量的姜黄素可单独有效诱导 BMSCs 分化为肝细胞, 但联合 FGF-4 的时候可降低姜黄素的浓度, 且安全可靠, 值得进

一步研究其具体作用机制。

2.4 模拟肝微环境

微环境在 BMSCs 向肝细胞定向分化过程中有至关重要的作用, 通过模拟肝脏微环境可诱导干细胞向肝细胞分化, 但具体的机制尚待研究。彭琴等^[32] 发现肝衰竭组及中药含药组中的甲胎蛋白、肝组织蛋白、吡啶胺 2, 3-双加氧酶表达均高于正常组, 且中药含药组的蛋白表达量高于肝衰竭组, 证明了中药含药血清能增强 BMSCs 在肝衰竭微环境下的肝细胞分化趋势及免疫调节活性, 提高肝细胞分化率。Razban 等^[33] 选用硫酸乙酰肝素和 IV 型胶原模拟肝微环境对 BMSCs 进行诱导分化, 结果表明 CYP3A4 酶活性, AFP, ALB 和 c-MET 蛋白水平升高, 证明力 BMSCs 具有分化为肝样细胞、改善肝功能的功效。李伟等^[34] 认为胆汁淤积的病理状态下, 可以为 BMSCs 向肝细胞的分化提供良好的细胞微环境, 因此探讨瘀胆血清对大鼠 BMSCs 向肝细胞分化的影响, 结果证明瘀胆血清可诱导 BMSCs 向肝细胞的定向分化, 促进肝细胞的生长。

大量研究表明肝细胞和非肝实质细胞在体外共培养可通过异质细胞间的相互作用充分模拟肝细胞在体内的生存环境, 促进肝细胞增殖与分化, 并保持肝细胞特有的生物学功能。因此, 共培养是肝细胞大规模、高活性培养并最终推广运用的理想培养方式。Zhang 等^[35] 研究证明在共培养系统中, BMSCs 保持正常增殖和活力的同时, 强烈表达 ALB、AFP 和 cytokeratin-18 的 mRNA 蛋白水平, 对 BMSCs 分化为肝细胞起了决定性的作用。另外, 与传统的 2D 培养基相比, 3D 系统可高度模拟天然器官环境, 既保持 BMSCs 的分化能力, 也有利于维持

肝细胞的高复制能力。Liu 等^[36]利用 poly (lactic acid-glycolic acid) (PLGA) 支架模拟 3 D 系统,将 BMSCs 和肝细胞进行共培养,结果证明了 PLGA 支架中 BMSCs 诱导分化为肝细胞的能力,而且表明 1:5 (BMSCs: hepatocyte-like cells) 的比例最适合 BMSCs 支持 PLGA 支架中的肝细胞代谢和稳定。

2.5 其它诱导方法

此外,张玮等^[37]采用物理性的办法研究在针刺对治疗肝纤维化的体外作用机制,发现损伤及治疗均等物理刺激疗法可诱导 BMSCs 向肝细胞转化,提高大鼠血清中细胞因子水平和改善肝纤维化程度,其机制可能与自身修复代偿机制相关。孙婷^[38]基于无创的超声靶向微泡破坏技术探讨诱导 BMSCs 靶向归巢及分化为肝细胞的可行性,发现该技术可改善受损肝组织功能及抑制细胞凋亡,促进肝细胞的生长。Li 等^[39]研究发现超声辐照结合 HGF 可加速人骨髓间充质干细胞的肝分化。选择物理性干预方法进行诱导 BMSCs 分化为肝细胞具有创伤小,副作用少的特点,对于实验的研究可控及可操作性强。

随着肝疾病进展至终末期肝病,门脉阻塞及门脉高压情况越来越严重,进一步导致的血流动力学改变造成肝组织严重缺血缺氧,因此学者 Rehn 等^[40]探讨缺氧环境下 BMSCs 与肝细胞再生的关系,发现缺氧预处理可增强 BMSCs 和肝匀浆中的中 VEGF 的表达,提高细胞周期蛋白 D1 的表达并伴随血清白蛋白水平的提高,证明了缺氧情况下 BMSCs 可促进肝细胞的生长及转化,改善肝纤维化程度。许欣婷等^[41]也证明了低氧环境下可促进 BMSCs 的增殖,利用细胞的转化。

3 BMSCs 的体内诱导分化为肝细胞的途径

BMSCs 不仅能在体外诱导分化为肝细胞,在体内也具有分化为肝样细胞的途径。Hwang 等^[42]将 BMSCs 植入肝硬化大鼠中,发现归巢至肝组织中的 BMSCs,可经诱导分化为肝细胞样细胞,改善肝硬化的纤维化程度。Jang 等^[43]也证实了证实了 BMSCs 在体内被诱导分化为肝细胞,并发现 TGF- β 1 信号通路的下游效应子 P-Smad3/Smad3,且 BMSCs 移植抑制了 Smad3 的磷酸化。

4 BMSCs 分化为肝细胞的相关机制

已有的研究表明,运用不同的诱导方法无论是在体内还是体外均可诱导 BMSCs 成功定向分化为

肝细胞,但具体的分子机制尚未明确^[44-45]。目前大部分学者认为,BMSCs 定向分化为肝细胞是基于部分基因被选择性激活或出现差异性表达,从而使某些特异性蛋白合成及其空间分布。

4.1 Notch 信号通路

Notch 信号影响细胞正常形态发生的多个过程,包括细胞的分化、凋亡、增殖及细胞边界的形成。柳柯等^[46]发现 BMSCs 向肝细胞定向分化过程中其关键基因 mRNA 表达也会下降,在第 11 天的时候以 Jagged-2、Delta-1、Delta-3、Notch-1、Notch-2、Notch-3 和 Presenilin-1 的 mRNA 下降最为明显;利用 Jagged 与 BMSCs 共同培养上调 Notch 信号通路其发现至 21 d BMSCs 才表达其表面标志物 M2-PK 和 GST-P,明显晚于对照组,且分化至 26 d 时仍未见白蛋白表达,证明了下调 Notch 信号通路有助于 BMSCs 定向分化为肝细胞。徐洪雨等^[47]在研究者发现随着细胞生长因子诱导 BMSCs 分化为肝细胞的分化率的增高,Notch-1 蛋白表达及 Notch-1 mRNA 呈逐渐下降趋势。

4.2 NF- κ B 信号通路

NF- κ B 信号通路是控制许多细胞类型中细胞增殖,分化和凋亡的主要因素。Yang 等^[48]研究表明当阻断了 NF- κ B 信号后 HGF 诱导 BMSCs 分化为肝细胞效果下降,表明了 HGF 通过 NF- κ B 信号传导诱导 BMSC 向肝样细胞的分化,其中机制可能与 NF- κ B 信号的激活对于肝细胞的增殖和微管形成相关。王怡等^[49]探讨 NF- κ B 在 HGF 和肝组织液 (LTF) 诱导 BMSCs 分化为肝细胞的影响中发现,经两种细胞因子诱导下,细胞内 NF- κ B 蛋白及 AAT 蛋白表达量显著增加,但予 NF- κ B 抑制剂干预后,两者蛋白表达量随时间延长而明显下降。表明了 NF- κ B 信号通路对定向分化诱导的积极作用。

4.3 Wnt/ β -catenin 信号通路

Wnt/ β -catenin 信号通路是 Wnt 途径中的经典信号通路之一,在 BMSCs 分化为肝细胞中发挥重要的作用。Xiang 等^[50]在研究中发现使用中药一贯煎可促进 BMSCs 向肝细胞分化,在机制方面,当下调 Wnt 信号通路的同时会抑制干细胞的增殖转而分化为有功能的肝细胞。吉杨丹等^[51]发现 miR-26b 可通过调节 Wnt/ β -catenin 信号通路促进 BMSCs 向肝样细胞分化;曾令锋等^[52]发现 17 β -E2 作用于 BMSCs 时,除影响其生长激素的分泌量,还降低在氧化应激时的凋亡率,最后证明 17 β -E2 对 BMSCs 分化为肝样细胞的促进作用,其机制可能与 17 β -E2 下调 Wnt/ β -catenin 信号蛋白 Wnt3a 和 β -Catenin 有关。

4.4 钙离子对诱导分化的影响

钙离子是机体各项生理活动不可缺少的离子,在细胞的发生、生长及凋亡过程有着重要作用。焦淑贤等^[53]发现钙离子参与了 BMSCs 分化为肝细胞的过程,当加入钙拮抗剂后 BMSCs 分化率明显降低,但是具体的作用机制及过程仍待进一步研究。

5 总结

运用 BMSCs 移植诱导分化为肝细胞技术治疗终末期肝病在动物实验方面取得了广泛的认可,通过中药含药血清、细胞生长因子和物理刺激等诱导方法均使 BMSCs 定向诱导分化肝细胞,都不同程度地改善了大鼠肝纤维化情况,为在临床上运用 BMSCs 移植治疗终末期肝病提供了重要的借鉴意义,也为重症肝病患者带来希望的曙光。但是即使 BMSCs 移植技术在动物实验方面取得了一定的疗效,而真正将该技术运用于临床仍是困难重重。首先从取材上来讲,20 岁以后,人体 BMSCs 的分化能力明显下降,并且随着年龄的增长 BMSCs 的增殖能力也会逐渐下降,极有可能限制由 BMSCs 所分化得到的肝细胞的临床应用;其次对于 BMSCs 鉴定仍未能确定其特异性的表面标志物,最后 BMSCs 分化为肝细胞的调控机制尚未明确,对移植后会出现的不良反应及是否会进一步加重肝纤维化或加速疾病的进展尚待研究等。但 BMSCs 是具有巨大分化潜能及广阔临床应用前景的多功能干细胞之一,积极探索最佳的、能够定向诱导 BMSCs 向肝细胞分化的诱导方法或诱导剂、移植途径等,促进 BMSCs 的增值分化,发挥 BMSCs 对肝疾病的积极作用,提高 BMSCs 移植的临床运用率仍然是现今肝病领域研究的重点内容。

参考文献:

- [1] Srijaya TC, Ramasamy TS, Kasim NH. Advancing stem cell therapy from bench to bedside: lessons from drug therapies [J]. J Transl Med, 2014, 12(1): 243-260.
- [2] Alfai M, Eom YW, Newsome PN, et al. Mesenchymal stromal cell therapy for liver diseases [J]. J Hepatol, 2018, 68(6): 1272-1285.
- [3] 张齐好, 郑炜炜, 高丽莲, 等. 悬滴培养诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为肝样细胞 [J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(11): 2207-2211.
- [4] 杨莉, 王冬梅, 洪欣, 等. 成人骨髓间充质干细胞体外扩增和定向诱导分化为骨和软骨细胞的研究 [J]. 自然科学进展, 2001, 11(10): 1062-1067.
- [5] 于海生, 王宁. 促进骨髓间充质干细胞增殖方法的研究进展 [J]. 中国药房, 2014, 25(37): 3532-3534.
- [6] 郑雪, 李静, 黄俊凯, 等. 骨髓间充质干细胞移植治疗四氯化碳大鼠肝纤维化的实验研究 [J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2019, 37(5): 636-641.
- [7] 袁淑芳, 刘志英, 阿依夏木古丽, 等. 骨髓间充质干细胞移植对急性肝衰竭大鼠基质细胞衍化生长因子-1 α 、血管内皮生长因子表达的影响 [J]. 中华肝脏病杂志, 2018, 26(10): 750-755.
- [8] Yan L, Sha L, Feng Y, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell treatment for end stage liver disease: a case report [J]. Asian J Surg, 2020, 43(2): 454-455.
- [9] Zhang D. A clinical study of bone mesenchymal stem cells for the treatment of hepatic fibrosis induced by hepatolenticular degeneration [J]. Genet Mol Res, 2017, 16(1): gmr16019352.
- [10] 杨雷, 朱烁基, 刘健, 等. 两种骨髓间充质干细胞分离方法的对比研究 [J]. 岭南心血管病杂志, 2020, 26(2): 225-229.
- [11] 罗靖莹, 贺宏丽, 郭阳, 等. 差速离心、密度梯度离心、超滤离心技术在骨髓间充质干细胞外泌体提取中的应用对比观察 [J]. 山东医药, 2019, 59(12): 48-52.
- [12] 王珊珊, 徐国兴. 骨髓间充质干细胞治疗视网膜疾病的实验进展 [J]. 海峡科学, 2010, 5: 60-62.
- [13] 栾海燕, 李广文, 李卉, 等. SD 大鼠骨髓间充质干细胞培养、纯化与鉴定 [J]. 西南国防医药, 2016, 26(2): 117-120.
- [14] 徐丽娟, 张云巍, 王淑芳, 等. 小鼠骨髓间充质干细胞的分离、培养新方法 [J]. 肝脏, 2017, 22(3): 252-255.
- [15] 向俊西, 郑幸龙, 祝旭龙, 等. 骨髓间充质干细胞体外培养及肝向分化方案的优化 [J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(8): 1090-1096.
- [16] 李小云, 杨丽, 张荣华. 雌激素受体信号通路介导的褪黑素调控骨髓间充质干细胞成骨及成脂分化研究 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(12): 6011-6014.
- [17] 张飞, 党源, 薛来恩, 等. 过表达骨形态发生蛋白 4 对兔骨髓间充质干细胞增殖与成软骨的影响 [J]. 实验动物与比较医学, 2020, 40(2): 87-94.
- [18] 沈序, 陆英杰, 路冬冬, 等. 大鼠关节软骨来源祖细胞的分离鉴定及成软骨分化 [J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(21): 3364-3370.
- [19] 谢晶晶, 李博, 姚兵, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的分离、鉴定与冻存及对细胞活性的影响 [J]. 解放军医药杂志, 2018, 30(5): 1-4.
- [20] Kumar B, Madabushi SS. Identification and isolation of mice and human hematopoietic stem cells [J]. Methods Mol Biol, 2018, 1842: 55-68.
- [21] 温智稀, 黄晶晶, 王振常. 鳖甲煎丸含药血清诱导大鼠骨髓间充质干细胞转化为肝细胞的实验研究 [J]. 中医药导报, 2019, 25(1): 35-38.
- [22] 韩海啸, 李军祥, 孟捷, 等. 调肝益气通络方药物血清对骨髓间充质干细胞体外增殖的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(1): 172-173.
- [23] Zhou XL, Yang JQ, Liu Y, et al. Observation of the effect of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation by different interventions on cirrhotic rats [J]. Braz J Med Biol Res, 2019, 52(3): e7879.

- [24] 张寅, 王新月, 江宇泳. 乙肝后肝硬化中医证型与终末期肝病模型评分及肝功能 Child-Turcotte-Pugh 分级的相关性探讨 [J]. 国际中医中药杂志, 2013, 35(4): 292-294.
- [25] 平键, 陈红云, 周扬, 等. 一贯煎诱导骨髓间充质干细胞分化为肝细胞样细胞的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(3): 348-354.
- [26] 潘兴南, 魏开鹏. 肝细胞生长因子的浓度和诱导时间对人骨髓间充质干细胞向肝细胞分化的影响 [J]. 肝脏, 2013, 18(6): 382-385.
- [27] Putra A, Rosdiana I, Darlan DM, et al. Intravenous administration is the best route of Mesenchymal Stem Cells Migration in improving liver function enzyme of acute liver failure [J]. Folia Med (Plovdiv), 2020, 62(1): 52-58.
- [28] 吴增城, 康利民, 李阳, 等. 半乳糖凝集素-3 联合 HGF 诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为肝样细胞 [J]. 重庆医学, 2016, 45(15): 2043-2047.
- [29] 谭铭辉, 梁宇灵, 黄文斌, 等. Galectin-3 诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为肝样细胞 [J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(9): 1076-1082.
- [30] Fu LL, Pang BY, Zhu Y, et al. *Ex vivo* stromal cell-derived factor 1-mediated differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocytes is enhanced by chinese medicine yiguanjian drug-containing serum [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 2016: 7380439.
- [31] 陈艳, 邹文静, 王盛丰, 等. 姜黄素诱导骨髓间充质干细胞分化成肝细胞 [J]. 中成药, 2014, 36(6): 1124-1128.
- [32] 彭琴, 赵丹, 马浩轩, 等. 茵陈四苓颗粒对肝衰竭环境下骨髓间充质干细胞分化及 IDO 蛋白表达的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(8): 1455-1458, 1493.
- [33] Razban, Vahid, Khajeh, et al. Engineered heparan sulfate-collagen IV surfaces improve Human Mesenchymal Stem Cells differentiation to functional hepatocyte-like cells [J]. J Biomater Tissue Eng, 2014, 4(10): 811-822.
- [34] 李伟, 汪林, 曾杰, 等. 瘀胆血清诱导骨髓间充质干细胞向肝细胞的分化 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(6): 771-776.
- [35] Zhang QH, Chen XG, Cui GH, et al. Spheroid formation and differentiation into hepatocyte-like cells of rat mesenchymal stem cell induced by co-culture with liver cells [J]. DNA Cell Biol, 2007, 26(7): 497-503.
- [36] Liu MY, Yang JC, Hu WJ, et al. Superior performance of co-cultured mesenchymal stem cells and hepatocytes in poly(lactic acid-glycolic acid) scaffolds for the treatment of acute liver failure [J]. Biomed Mater, 2016, 11(1): 15008.
- [37] 张玮, 郑志忠, 赵福建, 等. 针刺穴位与筋膜对骨髓间充质干细胞定向分化的体外机制研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16(11): 2400-2405.
- [38] 孙婷. 超声靶向微泡破坏介导 BMSCs 修复大鼠急性肝损伤的实验研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2019.
- [39] Li F, Liu Y, Cai YY, et al. Ultrasound irradiation combined with hepatocyte growth factor accelerate the hepatic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Ultrasound Med Biol, 2018, 44(5): 1044-1052.
- [40] Rehn M, Kertész Z, Cammenga J. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor regulates erythropoiesis but not hematopoietic stem cell function in the fetal liver [J]. Exp Hematol, 2014, 42(11): 941-944.
- [41] 许欣婷, 吴昌归. 骨髓间充质干细胞的培养及低氧条件对其影响 [J]. 国际呼吸杂志, 2017, 37(15): 1132-1136.
- [42] Hwang S, Hong HN, Kim HS, et al. Hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a rat model of thioacetamide-induced liver cirrhosis [J]. Cell Biol Int, 2012, 36(3): 279-288.
- [43] Jang YO, Kim MY, Cho MY, et al. Effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic fibrosis in a thioacetamide-induced cirrhotic rat model [J]. BMC Gastroenterol, 2014, 14(1): 198-210.
- [44] 杨超, 李卓, 康炜, 等. 曲古霉素 A 促进 ICR 小鼠骨髓间充质干细胞体外分化为肝细胞 [J]. 华中科技大学学报(医学版), 2017, 46(2): 139-144.
- [45] Zhang GZ, Sun HC, Zheng LB, et al. *In vivo* hepatic differentiation potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Therapeutic effect on liver fibrosis/cirrhosis [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(46): 8152-8168.
- [46] 柳柯, 刘桂英, 杨洋, 等. Notch 信号通路在骨髓间充质干细胞向肝细胞分化过程中的动态表达特征 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2013, 31(3): 308-313.
- [47] 徐洪雨, 王瑞峰, 李宝杰. Notch-1 蛋白在诱导骨髓间充质干细胞向肝细胞分化中的表达 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2009, 43(2): 122-125.
- [48] Yang TX, Wang Y, Jiang SS, et al. Hepatocyte growth factor-induced differentiation of bone mesenchymal stem cells toward hepatocyte-like cells occurs through nuclear factor-kappa B signaling *in vitro* [J]. Cell Biol Int, 2016, 9(40): 1017-1023.
- [49] 王怡, 姜莎莎, 杨童茜, 等. NF- κ B 和 P38MAPK 在 BMSCs 肝向分化中的作用 [J]. 青岛大学医学院学报, 2017, 53(2): 181-185.
- [50] Xiang Y, Pang BY, Zhang Y, et al. Effect of Yi Guan Jian decoction on differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells in dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis in mice [J]. Mol Med Rep, 2017, 15(2): 613-626.
- [51] 吉杨丹, 罗红阳, 王丹, 等. miR-26b 调控 Wnt/ β -catenin 信号通路促进成肝样分化 MSCs 迁移研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(12): 1850-1857.
- [52] 曾令锋, 黄俊宇, 熊瑶, 等. 17 β -雌二醇对 rBMSCs 肝祖细胞定向分化及 Wnt 信号通路的调控作用 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(4): 459-463, 482.
- [53] 焦淑贤, 胡彬, 赵林, 等. Ca²⁺ 参与骨髓间充质干细胞存活增殖及向肝细胞的诱导分化 [J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(40): 7028-7033.

[收稿日期] 2020-09-15