

文章编号:1000-5404(2012)15-1481-06

论著

## 重组腺病毒介导的骨形态发生蛋白-9对小鼠胚胎肝脏干细胞诱导分化的影响

陈聪, 罗庆, 毕扬, 陈肯, 田雯, 迭小红, 曹光彪, 周建武, 康权 (400014 重庆, 重庆医科大学附属儿童医院儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室, 儿科学重庆市重点实验室, 重庆市(儿童发育重大疾病诊治与预防)国际科技合作基地)

**[摘要]** **目的** 探讨重组腺病毒介导的骨形态发生蛋白-9(Adv-BMP-9)诱导小鼠胚胎肝干细胞向成熟肝细胞定向分化的影响。**方法** 将已构建的表达 BMP-9、肝细胞生长因子(HGF)和绿色荧光蛋白(GFP)的重组腺病毒,分别感染小鼠胚胎肝干细胞,诱导其分化,然后采用半定量 PCR、Real-time PCR、细胞免疫荧光、荧光素酶报告基因检测等方法检测甲胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)和细胞角蛋白18(CK18)等肝细胞标志物的表达。**结果** 半定量及 Real-time PCR 检测,诱导7 d后的 BMP-9组、HGF组 AFP的 mRNA 表达 $\Delta\Delta Ct$ 值分别为 $(0.027 \pm 0.003)$ 、 $(0.023 \pm 0.002)$ ,较 GFP 对照组 $(0.103 \pm 0.018)$ 显著下降,ALB的 mRNA 表达 $\Delta\Delta Ct$ 值分别 $(0.041 \pm 0.005)$ 、 $(0.031 \pm 0.001)$ ,较 GFP 对照组 $(0.013 \pm 0.002)$ 明显升高,CK18的 mRNA 表达 $\Delta\Delta Ct$ 值分别 $(0.094 \pm 0.003)$ 、 $(0.083 \pm 0.007)$ ,较 GFP 对照组 $(0.040 \pm 0.008)$ 明显升高( $P < 0.05$ );细胞免疫荧光染色,诱导7 d后的细胞胞浆内表达肝细胞特有的 ALB、CK18等蛋白,而对照组几乎无表达;荧光素酶报告基因检测,诱导1、4、7 d的 BMP-9组、HGF组的 ALB 表达荧光素酶 A 值分别 $[(5\ 509.35 \pm 213.08)$ ,  $(33\ 198.14 \pm 666.39)$ ,  $(50\ 815.03 \pm 1\ 730.75)]$ 、 $[(5\ 539.25 \pm 132.62)$ ,  $(31\ 400.71 \pm 2\ 622.39)$ ,  $(49\ 088.28 \pm 1\ 868.03)]$ ,较 GFP 对照组 $(4\ 732.49 \pm 68.22)$ ,  $(9\ 407.71 \pm 487.84)$ ,  $(20\ 894.83 \pm 1\ 100.54)$ 明显升高( $P < 0.05$ )。**结论** BMP-9有诱导小鼠胚胎肝脏干细胞向成熟肝细胞样细胞分化的作用,并且 BMP-9对小鼠胚胎肝干细胞的诱导分化作用甚至和传统的肝干细胞诱导分化因子 HGF 相当。

**[关键词]** 骨形态发生蛋白-9;小鼠胚胎肝干细胞;分化;重组腺病毒

**[中图分类号]** R329.21; R329.28; R394.2

**[文献标志码]** A

## Adenovirus-mediated mouse bone morphogenetic proteins-9 induces mouse fetal liver stem cells differentiation

Chen Cong, Luo Qing, Bi Yang, Chen Ken, Tian Wen, Die Xiaohong, Cao Guangbiao, Zhou Jianwu, Kang Quan (Key Laboratory of Child Development and Disorders Cofounded by Chongqing and Ministry of Education, Key Laboratory of Pediatrics of Chongqing, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 40014, China)

**[Abstract]** **Objective** To determine the effect of recombinant adenovirus-mediated mouse bone morphogenetic proteins-9 (Adv-mBMP-9) on the differential regulation of mouse fetal liver stem cells to mature hepatocytes. **Methods** The mouse fetal liver stem cells were infected respectively by the constructed recombinant adenoviruses expressing BMP-9, hepatocyte growth factor (HGF), and green fluorescent protein (GFP). Expression of alpha fetoprotein (AFP), albumin (ALB) and cell keratin 18 (CK18) were tested by half quantitative PCR, real-time PCR, cellular immune fluorescence staining and fluorescent element enzyme gene report to investigate the regulation of stem cells differentiation. **Results** In 7 d after transfection, the  $\Delta\Delta Ct$  for mRNA expression of AFP were  $0.027 \pm 0.003$  and  $0.023 \pm 0.002$  respectively in the cells induced with BMP-9 and HGF, obviously lower when compared to the cells induced by GFP ( $0.103 \pm 0.018$ ). For ALB, the  $\Delta\Delta Ct$  were  $0.041 \pm 0.005$  and  $0.031 \pm 0.001$  for the cells induced with BMP-9 and HGF, significantly higher than the GFP-induced cells ( $0.013 \pm 0.002$ ). And for CK18, the  $\Delta\Delta Ct$  were  $0.094 \pm 0.003$  and  $0.083 \pm 0.007$  for the cells after BMP-9 and HGF transfection, significantly higher than the GFP-induced cells ( $0.040 \pm 0.008$ ). Cellular immune fluorescence assay showed that the specific markers of mature hepatocyte, ALB and

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30973062);重庆市自然科学基金(CSTC2008BB5390, CSTC2009BB5408);重庆医科大学重点课题(XBZD201015)

**[通信作者]** 康权,电话(023)63634092, E-mail:kq1028@yahoo.com

CK18 were strongly expressed in 7 d after induction, but no expression was observed in the GFP-induced cells. Luciferase assay indicated that the expression of ALB in 1, 4 and 7 d were  $5\,509.35 \pm 213.08$ ,  $33\,198.14 \pm 666.39$  and  $50\,815.03 \pm 1\,730.75$  respectively after BMP-9 induction, and  $5\,539.25 \pm 132.62$ ,  $31\,400.71 \pm 2\,622.39$ , and  $49\,088.28 \pm 1\,868.03$  respectively after HGF induction, all were significantly higher when correspondingly compared to the cells after GFP induction ( $4\,732.49 \pm 68.22$ ,  $9\,407.71 \pm 487.84$ ,  $20\,894.83 \pm 1\,100.54$ , all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** BMP-9 induces the mouse fetal liver stem cells to different into mature hepatocytes. This effect is even similar to that of HGF, a conventional liver cell differentiation factor.

[ **Key words** ] morphogenetic proteins 9; mouse fetal liver stem cells; differentiation; recombinant adenovirus

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30973062), the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2008BB5390, CSTC2009BB5408) and the Key Project of Chongqing Medical University (XBZD201015). Corresponding author: Kang Quan, Tel: 86-23-63634092, E-mail: kq1028@yahoo.com

肝细胞移植在先天性肝病、终末期肝硬化的治疗中具有广阔的应用前景,但由于肝细胞在体外不能大量扩增且传代后不能保持其原有特性而难以推广应用,相反肝脏干细胞具有长时间持续增生的能力,能在体外扩增获得足够数量肝干细胞,但如何优化稳定成熟诱导体系使肝干细胞向肝细胞定向分化,是目前国内外研究的难点。如能在获得足够数量肝脏干细胞的基础上,采用某种方法进行干细胞修饰,定向诱导肝脏干细胞分化为成熟肝细胞,则该修饰后的肝干细胞必将在治疗各种急慢性肝病所致肝硬化、肝衰竭中发挥巨大的作用。近年来有报道 BMP 在肝脏重建再生方面<sup>[1]</sup>及抗肝纤维化的作用<sup>[2]</sup>,本课题组<sup>[3]</sup>前期已经对 BMP 做了大量的基础工作,并通过对 BMP2-15 的筛选,发现 BMP-9 对骨髓间充质干细胞的定向诱导分化作用。本实验旨在探讨重组腺病毒介导的 BMP-9 对小鼠肝干细胞的诱导分化作用,以探讨小鼠胚胎肝干细胞体外培养的最佳诱导因素,从而建立有效的诱导肝干细胞定向分化为肝细胞的体外培养体系,为临床肝细胞移植打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料试剂

小鼠胚胎肝干细胞细胞株 HP14.5(美国芝加哥大学医学分子肿瘤实验室合作分离鉴定)、DMEM 培养基、胎牛血清(GBICO 公司)、Trizol 试剂(Invitrogen 公司)、RT-PCR 试剂(Promega 公司)、PCR 试剂(北京天根生物公司)、Real-time PCR 试剂(北京百泰克公司)、LumiFlex Gluc 检测试剂盒(NEB 公司)、Polybrene(SIGMA 公司)、白蛋白抗体、CK-18 抗体及二抗(Santa Cruz 公司)重组腺病毒介导的小鼠骨形态发生蛋白-9、重组腺病毒介导的小鼠肝细胞生长因子的构建由本课题组完成、保存、测序工作由芝加哥大学分子实验中心完成,Adv-BMP-9、Adv-HGF 和 Adv-GFP 带 GFP 标签蛋白,可以在荧光显微镜下观察病毒的感染情况。Primer3.0 软件设计引物,引物由深圳华大基因公司合成,引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	扩增片段(bp)
ALB	上游:CCAGACATTCCTCCCAATGC 下游:CAAGTTCGCGCCTGTTCAT	122
AFP	上游:ACGAGGAAAGCCCTCAG 下游:GCCATTCCTCACCACAG	125
CK18	上游:CTGGGCTCTGTCCGAACCT 下游:ACAGAGCCACCCAGACA	125
BMP-9	上游:CGCAGCCTTAACCTCAGC 下游:GTTGGAGGCAGGCTAGA	120
HGF	上游:TTCAGCTGGTCTATGGTC 下游:TGGTGTGACTGCATTCTC	237
GAPDH	上游:ACCCAGAAGACTGTGGATGG 下游:CACATTGGGGTAGGAACAC	171

### 1.2 细胞培养及实验分组

HP14.5 细胞常规培养于含 10% 的胎牛血清的 DMEM 中,37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 的条件下培养于培养箱中,间隔 48 h 左右,0.25% 胰酶消化传代,备用。本实验分 3 组: BMP-9 组, HGF 组, GFP 对照组, 每组设置复孔, 于腺病毒感染后不同时间段观察、检测各项指标。

### 1.3 病毒感染 HP14.5 细胞滴度的确定

将 HP14.5 细胞按细胞密度 20% 左右接种于 24 孔板中,待细胞贴壁后密度达到 40% 左右,在相同细胞培养条件下,各组分别加入不同浓度梯度的 Adv-BMP-9、Adv-HGF、Adv-GFP,并且同时加入 5 μl Polybrene 试剂,摇匀后放入培养箱培养,并于腺病毒感染 48 h 后,在荧光显微镜下通过感染细胞的荧光量来确定病毒的最合适感染滴度。

### 1.4 检测重组腺病毒介导的 BMP-9 在感染诱导 HP14.5 细胞后 BMP-9 的表达情况

确定出上述各组不同浓度梯度下感染腺病毒的最佳感染滴度后,按上述条件接种于 6 孔板后按相同条件感染 HP14.5 细胞,并于诱导分化后 7 d 提取细胞总 RNA 进行逆转录,按照试剂说明书操作,逆转录完成后分别以 cDNA 为模板扩增 BMP-9、HGF 基因,并设置 GAPDH 为内参对照。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RT-PCR 产物,分析条带,检测重组腺病毒感染 HP14.5 细胞后 BMP-9、HGF 基因是否成功表达。

### 1.5 RT-PCR、Real-time PCR 检测 ALB、AFP 等肝细胞特征性标志物

将 HP14.5 细胞接种于 6 孔板中,当细胞密度达到

40%左右后,每组分别加入适宜浓度的 Adv-BMP-9、Adv-HGF、Adv-GFP,同时加入 10  $\mu$ l Polybrene 试剂,感染 7 d 后,各组细胞分别加入 1 ml Trizol 试剂,按 RNA 提取试剂说明书提取细胞的总 RNA,检测提取的浓度以及  $D(260)/D(280)$  值,取 1  $\mu$ g 进行逆转录,逆转录后的 cDNA 进行 PCR 反应,检测 ALB、AFP 及 CK18 等肝细胞特征蛋白的 mRNA 表达水平,并设置 GAPDH 为内参对照。取扩增产物 8  $\mu$ l 于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,凝胶成像系统成像并对电泳条带进行观察并照相,设置复孔,实验重复 3 次。

### 1.6 细胞免疫荧光检测 ALB、CK-18 的表达

将状态良好的 HP14.5 细胞传代接种于 12 孔培养板中,至 40% 左右密度时按各组预设条件处理后继续培养 7 d。细胞用 PBS 清洗 2~3 次,4% 的多聚甲醛固定 20 min,含 TritonX-100 洗涤液漂洗 3 次后血清封闭,ALB 一抗 37  $^{\circ}$ C 孵育 4 h,漂洗 3 次后标记二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,DAPI 核染 10 min,相同条件孵育 CK-18 及其二抗,漂洗 3 次,抗荧光淬灭封片剂封片,倒置荧光显微镜下观察荧光染色情况。

### 1.7 荧光素酶报告基因检测 ALB-Gluc 表达情况

将携带 Alb-Gluc 报告基因的 HP14.5 细胞传代培养后,接种于 24 孔板中,接种密度约 30% 左右,待细胞贴壁后,各组分别加入适宜浓度的 Adv-BMP-9、Adv-HGF、Adv-GFP,同时加入 5  $\mu$ l Polybrene 试剂,摇匀后培养,分别在感染腺病毒后 1、4、7 d 天取上清液,通过荧光素酶的活性检测培养上清液中的 ALB 表达水平,设置复孔,实验重复 3 次,并进行比较分析。

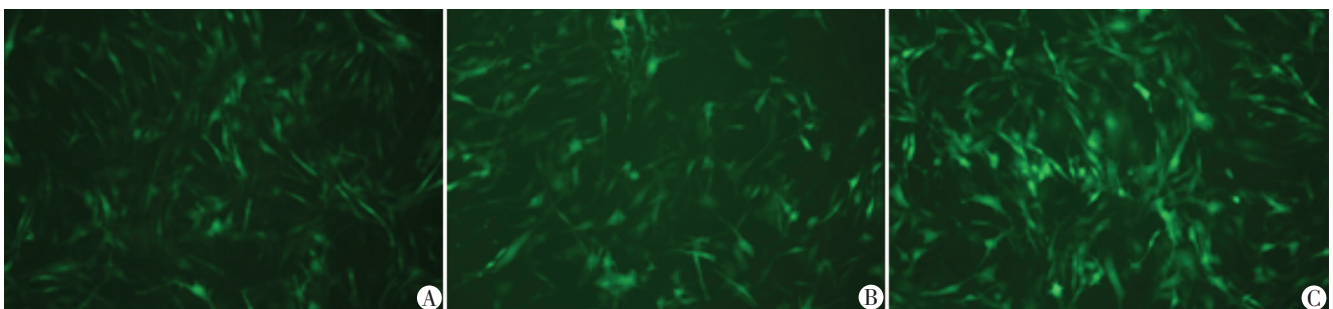
### 1.8 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件分析,计量数据以表示,组间比较运用单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 Adv-BMP-9、Adv-HGF、Adv-GFP 对 HP14.5 细胞的感染

Adv-BMP-9、Adv-HGF、Adv-GFP 经包装细胞 293 细胞扩增纯化后,再加入 5  $\mu$ l Polybrene 试剂,可以有效地感染 HP14.5 细胞。在倒置荧光显微镜下,通过观察病毒感染细胞后的荧光量的多少以及细胞形态变化,以确认病毒的最合适感染滴度。如图 1 所示:图为感染病毒 48 h 后荧光显微镜下感染细胞的荧光量对比,可以看出 3 组病毒感染滴度近似,为后续诱导分化实验病毒感染量的均一性和可比性做准备(图 1)。

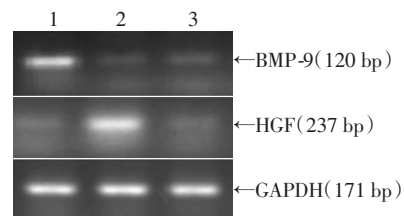


A: BMP-9 诱导组;B: HGF 诱导组;C: GFP 对照组

图 1 倒置荧光显微镜观察各组重组腺病毒有效感染 HP14.5 细胞 48 h 后的感染情况 ( $\times 100$ )

### 2.2 重组腺病毒感染诱导 HP14.5 细胞后 BMP-9 基因的表达情况

各组细胞分别加入 Adv-BMP-9、Adv-HGF、Adv-GFP 感染处理 7 d 后,取细胞提取总 mRNA,RT-PCR 检测结果见图 2。在相同条件的处理下,GFP 对照组 BMP-9、HGF 均呈弱表达甚至无表达,而 BMP-9 组、HGF 组诱导后 BMP-9、HGF 均有表达,说明在未加入表达 BMP-9 和 HGF 的病毒感染前,HP14.5 细胞中 BMP-9、HGF 均呈弱表达甚至无表达;在病毒成功感染后,BMP-9、HGF 基因在 HP14.5 细胞高表达,为实验的进一步进行提供依据。



1: BMP-9 组;2: HGF 组;3: GFP 对照组

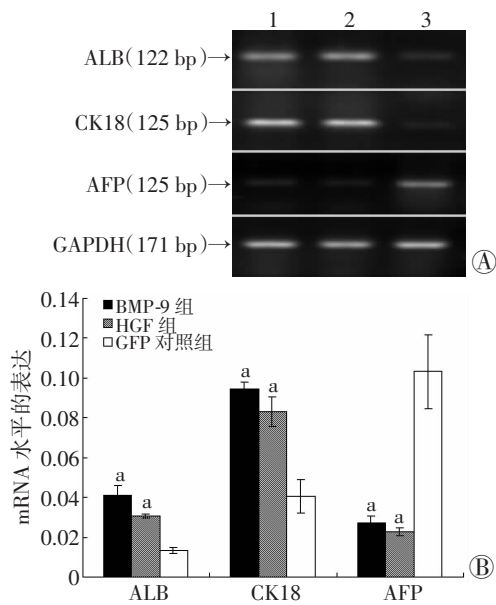
图 2 RT-PCR 检测各组重组腺病毒有效感染 HP14.5 细胞 7 d 后 BMP-9、HGF mRNA 表达

### 2.3 腺病毒介导的 BMP-9 感染诱导 HP14.5 细胞后 ALB、AFP 等 mRNA 的表达情况

PCR 凝胶电泳结果显示:3 组细胞分别加入 Adv-BMP-9、Adv-HGF 和 Adv-GFP 腺病毒诱导 7 d 后,在实验诱导条件相同的情况下,BMP-9 组、HGF 组的 ALB 和 CK18 mRNA 的表达明显高于 GFP 对照组,而 BMP-9 组和 HGF 组 AFP mRNA 的表达情况均低于 GFP 对照组。Real-time PCR 定量进一步检测,重复 3 次实验结果显示,组间对比可以看出,BMP-9 组和 CK18 组 mRNA 水平 ALB 的表达明显高于 GFP 对照组,而 BMP-9 组和 HGF 组 mRNA 水平 AFP 的表达情况均低于对照组( $P < 0.05$ , 图 3A、B)。

### 2.4 腺病毒介导的 BMP-9 感染诱导 HP14.5 细胞后免疫荧光染色 ALB、CK18 的表达情况

荧光显微镜下可见对照组 GFP 红色荧光几乎无表达;提示 GFP 对照组几乎无肝细胞特征性标志物 ALB、CK18 的表达;而在 BMP-9 组、HGF 组中,两组均出现了明显的红色荧光(图 4),显示 BMP-9 组、HGF 组均表达肝细胞特征性标志物 ALB、CK18,提示 BMP-9、HGF 均可诱导肝干细胞向肝细胞样细胞分化。



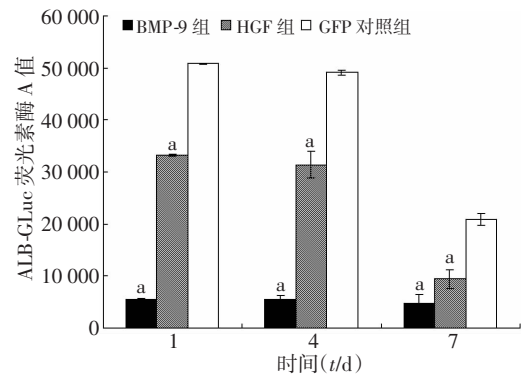
A: PCR 检测结果 1: BMP-9 组; 2: HGF 组; 3: GFP 对照组; B: Real time-PCR 检测结果 a:  $P < 0.05$ , 与 GFP 对照组比较

图3 重组腺病毒有效感染 HP14.5 细胞 7 d 后 ALB、CK18 和 AFP 的 mRNA 表达

### 2.5 荧光素酶报告基因检测感染诱导 HP14.5 细胞后 ALB 的表达情况

感染处理 1、4、7 d 后, 细胞荧光图片显示, 无大量细胞漂浮, 细胞生长状态好。荧光素酶报告基因检测, 重复 3 次实验结果见图 5, 随着诱导时间的延长, 诱导后的 3 组组内 HP14.5 细胞培养上清中 ALB-Gluc 表达水平都逐渐升高。3 组组间在第

1 天没有明显差异, 随着时间的延长, 到第 7 天, BMP-9 组 HGF 组差异性较对照组越来越明显, 存在明显差异性, 而 BMP-9 组荧光素酶 A 值读数接近 HGF 组读数, 提示 BMP-9 诱导 HP14.5 细胞 ALB 表达作用和传统的诱导因子 HGF 相当 ( $P < 0.05$ , 图 5、图 6)。



a:  $P < 0.05$ , 与 GFP 对照组比较

图5 重组腺病毒有效感染 HP14.5 细胞第 1、4、7 天 ALB-Gluc 荧光素酶 A 值的表达

### 3 讨论

自从 Urist<sup>[4]</sup> 1956 年首先发现骨形态发生蛋白以来, 其功能早已超越了早期人们所认识的功能作用, 骨形态发生蛋白为一包括多个基因的家族, 其功能从促进骨生成扩展为涉及胚胎发育、骨骼发生、神经发育和修复、造血发生、精子发生及胎盘形成、促进肝细胞的

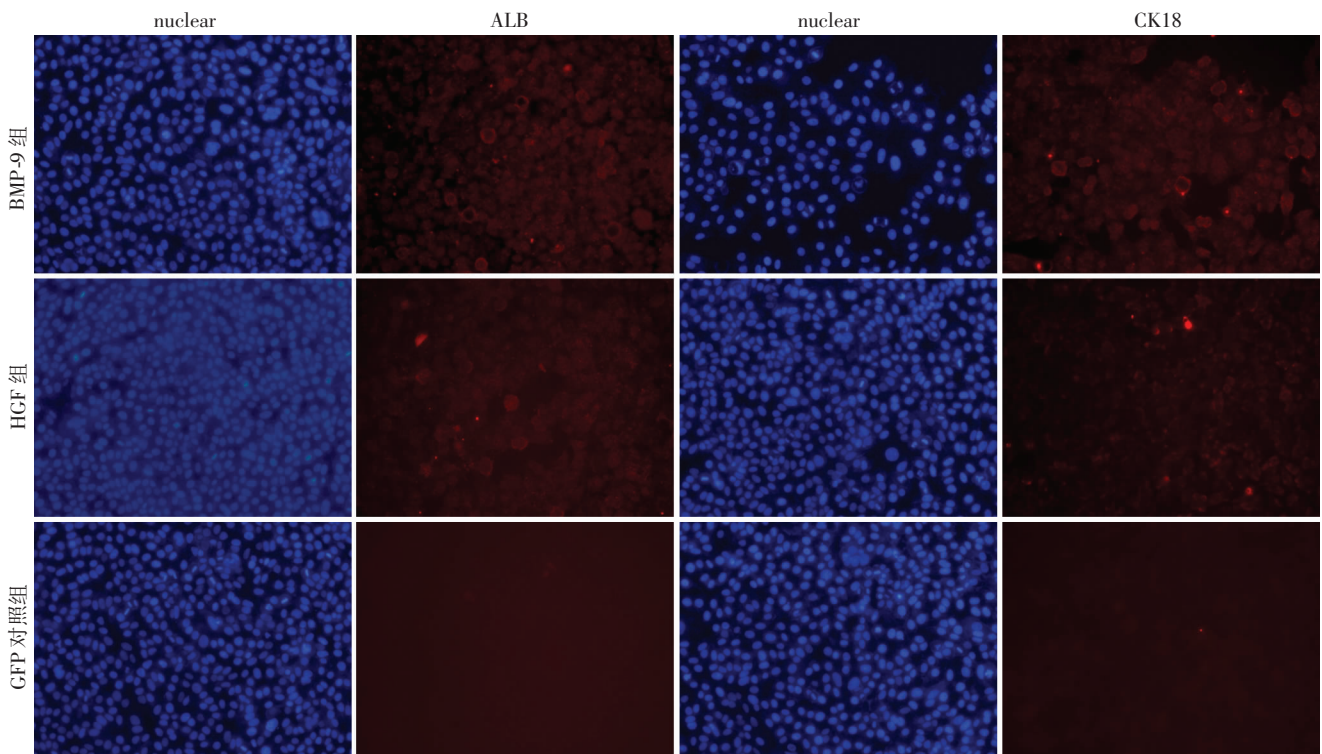


图4 倒置荧光显微镜观察各组重组腺病毒有效感染 HP14.5 细胞 7 d 后 ALB 和 CK18 的免疫荧光表达 (×200)

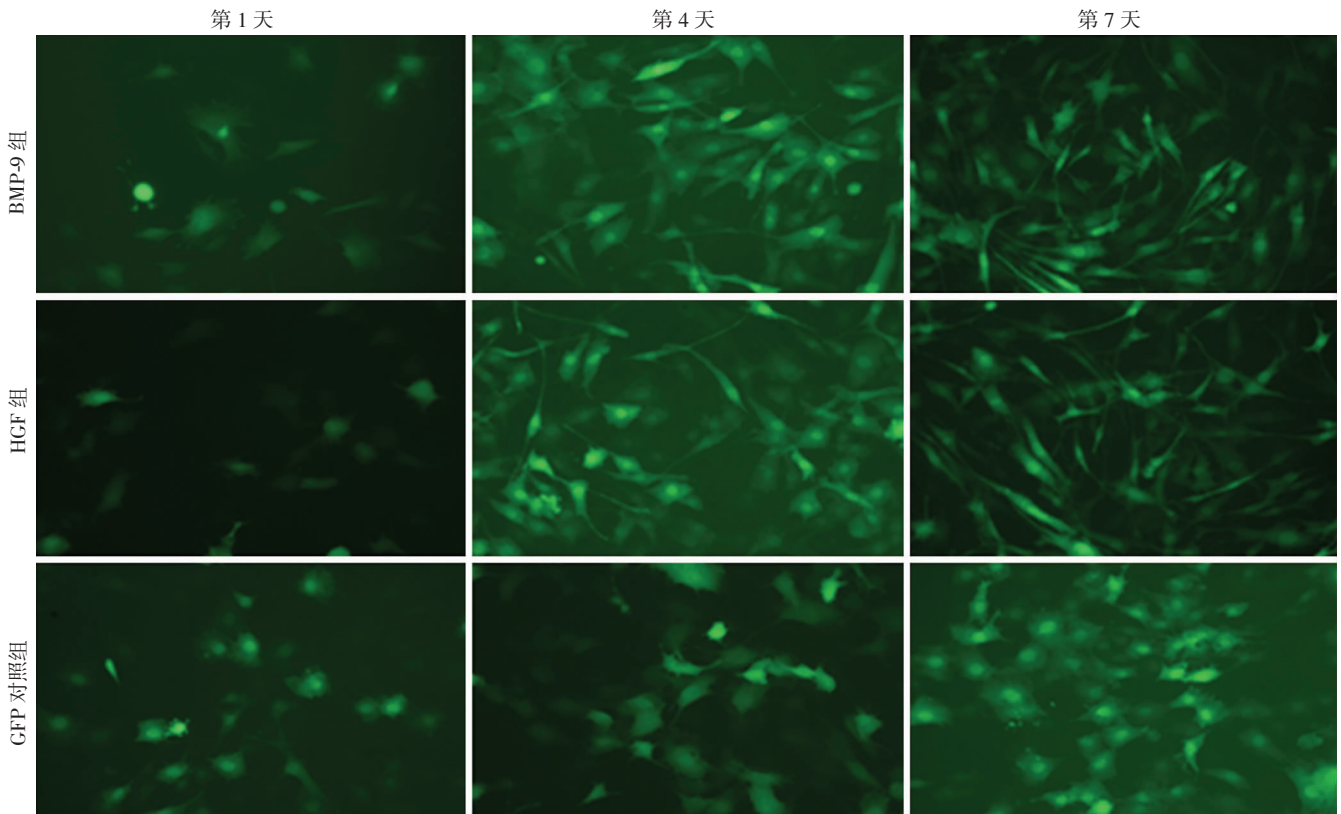


图6 荧光显微镜观察各组重组腺病毒有效感染HP14.5细胞第1、4、7天ALB-Gluc的荧光表达(×200)

增殖分化<sup>[5-6]</sup>等多个重要领域。课题组<sup>[7]</sup>前期构建了腺病毒载体,并成功将BMP-9基因克隆并构建入重组腺病毒载体中,获得了重组腺病毒高滴度的病毒表达,BMP-9为骨形态发生蛋白家族的一员,我们前期实验<sup>[8-9]</sup>已经发现BMP-9在成骨方面的巨大作用,对于其在肝干细胞的诱导分化作用,Sosa等<sup>[10]</sup>研究肝损伤后肝再生机制时,提出BMP-9可能在肝脏的再生方面有一定的作用,成为了我们研究的兴趣点,并且由于BMP-9为重组腺病毒载体介导,该基因不会整合入宿主染色体中,因此BMP-9促进肝细胞的增生分化作用不会长期存在,避免了肝脏干细胞无限增生导致肿瘤形成等可能,使用上具有安全性。

肝干细胞因为其分化潜能,一直是科研工作者的研究热点。而近年来的研究显示,肝脏干细胞对肝病的治疗具有重要的临床应用价值,为肝脏疾病如终末期肝硬化等的治疗提供了新的思路。目前对于肝脏干细胞来源的界定还比较有争议,但较为一致的观点是肝卵圆细胞<sup>[11-12]</sup>、小肝细胞<sup>[13]</sup>、胚胎源性肝干细胞<sup>[14]</sup>等是被比较认可的肝干细胞。已有研究<sup>[14]</sup>证明大鼠胚龄9.5~15 d、小鼠胚龄8.5~15 d间的肝脏细胞,大部分被认为是肝干细胞。本实验采用的是胶原酶消化法从胎龄14 d左右的小鼠胚胎肝脏中分离提

取的细胞,经鉴定为小鼠胚胎肝干细胞<sup>[15-16]</sup>,作为我们实验研究的细胞。

HGF由Cooper等于80年代一经发现就引起广泛关注,至今它仍被认为是最强有力的致分裂增殖因子<sup>[17]</sup>,HGF能有效诱导肝细胞的成熟分化,是最早被认识在肝再生过程中起重要作用的细胞因子之一,其作用机制是通过与受体C2-met相互作用而对多种细胞产生促有丝分裂作用及促形态形成作用,在肝脏的发育成熟和再生过程中发挥重要作用<sup>[18]</sup>。

AFP为目前反映小鼠胚胎肝干细胞增殖分化的良好指标之一,在细胞增殖分化期AFP合成量多,而在成熟的肝细胞中合成量减少。而ALB、CK18为反映小鼠胚胎肝干细胞向成熟肝细胞样细胞分化的活性和功能的良好指标,成熟的肝细胞表达ALB、CK18。研究<sup>[19]</sup>报道BMP-9在肝脏中大量表达,具有刺激肝细胞增殖的作用,本实验选取了重组腺病毒介导的BMP-9作为细胞诱导剂,去感染诱导小鼠胚胎肝干细胞,通过RT-PCR、细胞免疫荧光和ALB-GLuc报告基因荧光素酶检测等方法,检测ALB、AFP和CK18等和成熟肝细胞相关的特征性标志物的表达情况,发现BMP-9可以定向诱导小鼠胚胎肝干细胞分化为肝细胞样细胞,与之前文献<sup>[10]</sup>报道存在相关性,丰富了BMP-9

在在肝脏再生方面的理论,同时选择了国内外目前认为诱导作用最强的 HGF 作为参照,发现 BMP-9 的诱导作用甚至和传统的肝细胞诱导因子 HGF 相当,这一点目前国内外尚少见相关报道,但从我们研究发现 BMP-9 为诱导肝脏干细胞分化的重要信号分子,至于 BMP-9 与 HGF 的协同作用及其在诱导过程中的是否通过是经典 Smad 信号通路传递途径发挥作用将是们下一步实验的研究重点。

### 参考文献:

[1] Kan N G, Junghans D, Izpisua-Belmonte J C. Compensatory growth mechanisms regulated by BMP and FGF signaling mediate liver regeneration in zebrafish after partial hepatectomy[J]. *FASEB J*, 2009, 23(10): 3516 - 3525.

[2] 武鹏宇, 戴立里, 唐静, 等. 骨形态发生蛋白-7 对人肝星状细胞转化生长因子  $\beta$  信号转导的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(13): 1433 - 1437.

[3] Kang Q, Sun M H, Cheng H, *et al.* Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery[J]. *Gene Ther*, 2004, 11(17): 1312 - 1320.

[4] Urist M R. Bone: formation by autoinduction[J]. *Science*, 1965, 150(3698): 893 - 839.

[5] Sanchez A, Fabregat I. Growth factor- and cytokine-driven pathways governing liver stemness and differentiation[J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(41): 5148 - 5161.

[6] Thenappan A, Li Y, Kitisin K, *et al.* Role of transforming growth factor beta signaling and expansion of progenitor cells in regenerating liver[J]. *Hepatology*, 2010, 51(4): 1373 - 1382.

[7] He T C, Zhou S, da-Costa L T, *et al.* A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(5): 2509 - 2514.

[8] Peng Y, Kang Q, Cheng H, *et al.* Transcriptional characterization of bone morphogenetic proteins (BMPs)-mediated osteogenic signaling[J]. *J Cell Biochem*, 2003, 90(6): 1149 - 1165.

[9] Luther G, Wagner E R, Zhu G, *et al.* BMP-9 induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: molecular mechanism and therapeutic potential[J]. *Curr Gene Ther*, 2011, 11(3): 229 - 240.

[10] Sosa I, Cvijanovic O, Celic T, *et al.* Hepatoprotective role of bone morphogenetic protein-9[J]. *Med Sci Monit*, 2011, 17(12): HY33 - HY35.

[11] Pi L, Ding X, Jorgenson M, *et al.* Connective tissue growth factor with a novel fibronectin binding site promotes cell adhesion and migration during rat oval cell activation[J]. *Hepatology*, 2008, 47(3): 996 - 1004.

[12] 金世龙, 刘宝华, 刘宏鸣, 等. 大鼠成体肝卵圆细胞分离培养及诱导分化的初步研究[J]. *第三军医大学学报*, 2006, 28(22): 2259 - 2262.

[13] Chen Q, Kon J, Ooe H, *et al.* Selective proliferation of rat hepatocyte progenitor cells in serum-free culture[J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(5): 1197 - 1205.

[14] 苏娟, 姚玉成, 王忠华, 等. 干细胞样肝原始细胞的分离和鉴定[J]. *癌变畸变突变*, 2000, 12(4): 200 - 201.

[15] Bi Y, Huang J, He Y, *et al.* Wnt antagonist SFRP3 inhibits the differentiation of mouse hepatic progenitor cells[J]. *J Cell Biochem*, 2009, 108(1): 295 - 303.

[16] Huang J, Bi Y, Zhu G H, *et al.* Retinoic acid signalling induces the differentiation of mouse fetal liver-derived hepatic progenitor cells[J]. *Liver Int*, 2009, 29(10): 1569 - 1581.

[17] Forte G, Minieri M, Cossa P, *et al.* Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: proliferation, migration, and differentiation[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(1): 23 - 33.

[18] Lee B S, Park M, Cha H Y, *et al.* Hepatocyte growth factor induces delayed STAT3 phosphorylation through interleukin-6 expression[J]. *Cell Signal*, 2009, 21(3): 419 - 427.

[19] Miller A F, Harvey S A, Thies R S, *et al.* Bone morphogenetic protein-9. An autocrine/paracrine cytokine in the liver[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(24): 17937 - 17945.

(收稿:2011-12-23;修回:2012-03-05)

(编辑 王红)

## 声 明

本刊已入编中国知网(包括优先数字出版)和《中国学术期刊》(光盘版)。作者稿件一经录用,将同时被中国知网和《中国学术期刊》(光盘版)等数据库收录;已被本刊录用并经编辑加工的部分稿件,编辑部审查符合条件者将在印刷版期刊出版前以单篇或整期定稿的形式在中国知网平台上优先数字出版。如作者不同意收录或发布,请在投稿本刊时提出声明,否则将视为同意。

本刊编辑部