

## ● 综述与讲座

肝干细胞的研究进展<sup>▲</sup>

钟晓刚 综述 黄顺荣 审校

(广西壮族自治区人民医院普通外科, 南宁市 530021)

【关键词】 肝脏干细胞; 肝损伤; 肝肿瘤

【中图分类号】 R 318 【文献标识码】 A 【文章编号】 0253-4304(2008)10-1514-03

自 Wilson 和 Leduc 等在小鼠营养性肝损伤修复机制研究中提出肝内可能存在肝干细胞的假说以来,引起人们对肝干细胞研究的极大兴趣。近年,随着发育遗传学、细胞生物学等多学科发展和研究的深入,体内外实验均对肝干细胞的存在给予肯定结论。肝干细胞并非特指某一类型的细胞,而是与肝脏发育及再生有关的各类具有干细胞特性细胞类型的总称,为便于与胚胎干细胞区别,称之为成体肝干细胞。肝干细胞具有自我更新、高度增殖和多向分化潜能,同时很少涉及伦理问题,成为颇具临床应用价值的细胞来源,并取得了系列的研究进展<sup>[1]</sup>,本文对近年的相关进展作一综述。

## 1 肝干细胞的特性与起源

目前认为肝内源性肝干细胞大体包括三类:(1)肝卵圆细胞:Farber 等<sup>[2]</sup>在肝癌变机制研究中首次将肝内干细胞描述为“卵圆细胞”。在肝脏中数量极少,可以向肝细胞和胆管细胞双向分化,为卵圆型小细胞,细胞核也呈卵圆型,具有特殊的表面抗原标志。多数认为肝卵圆细胞定位于肝终末小胆管(Hering 管),在肝损伤而残存肝细胞再生受阻时,发生活化和增殖。(2)小肝细胞:Mitaka 等<sup>[3,4]</sup>在肝细胞原代培养的培养基中加入尼克酰胺和 EGF 时,出现单个核小细胞增生,并形成克隆,被称为小肝细胞。但当肝星形细胞长入小肝细胞克隆时,小肝细胞表现成熟肝细胞形态,并形成肝板样结构和微胆管。目前认为小肝细胞是肝细胞的前体细胞,在胚胎发育晚期,小肝细胞在肝非实质细胞分泌的细胞基质作用下分化成熟。在病毒性肝炎肝内、肝毒性药物的动物模型肝内也可观察到小肝细胞增生,其起源和肝内的定位尚不清楚。(3)胚胎源性肝干细胞:实验研究表明大鼠胚龄 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。苏娟等<sup>[5]</sup>从胚龄 13 d C57 小鼠胚胎肝脏中成功分离出干细胞样的肝原始细胞。人类肝脏发育过程中,孕期 20~24 周时,肝区细胞表达肝细胞标志和胆管细胞标记。Malhi 等<sup>[6]</sup>成功地分离出人胚胎肝上皮细胞,体外培养 2~4 周,细胞增殖并形成卵圆细胞的表型,继续培养分化为成熟肝细胞。

当前,对于肝外源性肝干细胞来源和特性尚存某些争议:(1)骨髓造血干细胞:长期以来人们认为骨髓造血干细胞(HSC)只能定向分化为各系血细胞,但近来研究提示 HSC 可

以转分化为肌肉、心肌、脑胶质、肝等多种非造血组织细胞。Petersen 等<sup>[7]</sup>进行实验证实大鼠骨髓干细胞能在受体肝脏分化成为卵圆细胞。Lagasse 等<sup>[8]</sup>将骨髓中分离得到的 C-Kit<sup>+</sup>、lin<sup>-</sup>、Thy<sup>+</sup>、Sca-1<sup>+</sup> 细胞植入受鼠,发现除了造血功能重建外,在肝脏中还发现了上述细胞来源的成熟肝细胞。而 Theise 等<sup>[9]</sup>报告女性病人接受男性供体的骨髓移植后,以及男性病人接受女性供体的肝移植后,受体的一些肝细胞和胆管上皮细胞核内含有 Y 染色体,提示 HSC 可以转分化为肝细胞。Blakolmer 等<sup>[10]</sup>也观察到肝卵圆细胞和造血干细胞有许多共同的细胞表面标记,如 CD34、C-Kit、Thy-1 等,也表明二者有一定的同源性。但骨髓中哪类细胞可以向肝干细胞转化,或者只是骨髓中某些造血干细胞与肝细胞融合才出现肝细胞的表型,目前尚无定论<sup>[11]</sup>。而 Wang 等<sup>[12]</sup>对肝干细胞的骨髓来源始终持怀疑态度,从他们的新近实验中发现肝内干细胞来源于肝非实质细胞,并不可逆地分化为成熟肝细胞,并非来源于骨髓干细胞。(2)胰腺上皮细胞:肝脏和胰腺均属消化腺,都具有内外分泌功能,在发生上密切联系,肝脏和胰腺不仅有相似的组织结构和相同起源,而且实验表明肝细胞和胰腺细胞可以相互转变。胰腺上皮细胞可横向分化成为肝干细胞的证据来源于 Dabeva 等<sup>[13]</sup>的实验,将从大鼠胰腺分离的上皮细胞移植给近亲大鼠肝脏,结果胰腺上皮细胞在肝内分化成肝细胞,并整合到肝小叶结构中,表达特异性蛋白。把标记蛋白为 IV 型胰二肽酶(DPP IV)的鼠胰腺上皮前体细胞移植到 Fisher 鼠肝脏中,移植后 6 周和 3 个月分别取材检验,发现胰腺上皮细胞前体细胞转变成了肝细胞,表达肝脏特异的蛋白,细胞完全融入了肝实质中。体外实验通过转基因和诱导的方法,也可促使胰岛上皮细胞分化成为肝细胞。

## 2 肝干细胞的分离与鉴定

肝干细胞的分离和鉴定是肝干细胞体外研究的基础,也是临床应用肝干细胞治疗肝病的前提。目前文献报告的肝干细胞分离方法主要包括:(1)直接从成体肝分离:正常的齿类动物体内,肝干细胞的数量极少,直接分离培养十分困难。但报告的部分肝干细胞是来源于正常的肝组织中,如 WB-F344 细胞<sup>[14]</sup>。(2)肝切除/药物阻止肝再生的诱导方法:该法目前应用较多,方法简单,但所需时间较长。正常情况下,肝细胞

处于静止期,在肝切除、病毒感染、化学药物等造成肝细胞坏死、损伤时,启动肝细胞增殖再生,如采用药物阻止残余肝细胞再生时,肝干细胞被激活,产生卵圆细胞,有利于其分离。(3)利用肝先天性疾病:某些先天性疾病的肝脏中,由于肝细胞受损,诱导肝干细胞增殖,而本身含有较高数量的肝干细胞,可提供干细胞源。如 LEC (long-evans cinnamon) 大鼠因 ATP7B 基因缺乏,为先天性 Wilson's 病,导致肝内铜的毒性积蓄,可进一步发展为肝炎、肝癌、胆管癌等,19~26 周龄 LEC 大鼠作为肝干细胞分离的供体较好。(4)直接从胚胎肝分离:实验研究表明,鼠的胚胎肝中卵圆细胞的含量相对较高,2%~5%,而大鼠胚龄 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。分离的技术手段多采用胶原酶灌注消化、梯度离心洗涤,获取细胞进行原代培养。而近年免疫磁珠法筛选、流式细胞仪分离法等技术的应用,提高了肝干细胞的分离效率和纯度,但需要特异的标志物和特殊仪器<sup>[15]</sup>。

目前尚未发现肝干细胞特异性标记物,人们主要通过肝干细胞的分化潜能对干细胞作深入鉴定,但目前已筛选出一些高度表达的标志物,可作为肝干细胞的初步筛选。研究表明,肝干细胞主要表达 OV6、CK7、CK8、CK18、CK19、AFP、CD34 等。部分肝干细胞与造血干细胞具有共同的标志,如: C-met、Thy-1、SCF-1、C-kit、CD34、Flt-3 等,这也为肝干细胞来源于造血干细胞的推论,提供又一佐证<sup>[16]</sup>。Karin 等<sup>[17]</sup>指出干细胞因子 SCF 可用作鉴定肝干细胞分化与否的重要标志,而 OV6 抗体被认为是齿类动物卵圆细胞较特异的标志,在正常人的胎肝和幼儿的肝脏中干细胞也有表达。

当肝干细胞移植入宿主体内,由于微环境的影响,可发生增殖和分化,对这些移植细胞进行鉴定,研究者多采用某些特殊的标记方法,以利体内示踪<sup>[18]</sup>。(1)以 Y 染色体进行鉴定:雄性动物微肝干细胞的供体,雌性动物作为受体接受移植,表达 Y 染色体的细胞可以从雌性动物的体内分辨出来。(2)利用先天性缺陷的动物作为受体:DDP IV + 的肝干细胞移植入 DDP IV - 的缺陷动物体内。(3)化学标记:通过 3H-胸腺嘧啶或溴脱氧尿嘧啶进行体内跟踪的化学标记,以标记增生细胞的 DNA 的方法。(4)基因标记技术:如 LACZ、GFP 或 EGFP 系统等。而 EGFP 系统因标记直观,背景染色较清晰,便于体内体外观察追踪,已成为常用的标记技术。

### 3 肝干细胞的研究应用热点

3.1 肝干细胞与肝损伤修复 成体肝脏具有极强的再生能力,能保持肝细胞丧失与再生的平衡。Sell<sup>[19]</sup>根据肝干细胞的研究进展,提出了肝脏自身再生修复模式的假说。肝脏对损伤和丢失肝细胞的修复存在三个水平的细胞群:(1)成熟肝细胞:在一定条件下,成熟肝细胞快速分裂增殖使肝体积和功能得以恢复,但此类细胞分裂增殖能力有限,因而修复能力也有限。见于部分肝切除、小叶性肝损伤、二甲基亚硝胺(DEN)等诱导的肝癌变等过程中<sup>[20]</sup>。(2)肝内肝干细胞:当肝脏受到严重的损伤,而肝细胞增殖受到抑制时,肝内干细胞将被活

化,分裂增殖,参与肝修复。可见于 2-乙酰氨基苄(2-AAF)致肝癌的实验模型中<sup>[21]</sup>。(3)循环中的多能干细胞:这种细胞来源于骨髓的干细胞,数量少,但具有强大的自我更新能力,可定向分化为肝前体细胞,再成为成熟肝细胞<sup>[22]</sup>。见于门脉周围性肝损伤和 B 族维生素缺乏饮食致癌模型中。这一假说表明肝脏对于化学致癌、感染、损伤等不同的肝细胞丢失,动员参与修复的细胞种类不同,肝干细胞在这一病理过程中有重要的作用。进一步对肝干细胞在肝丢失修复过程中的作用及机制的研究,对肝各类损伤的治疗可提供有益的理论依据。通过对肝干细胞分化、发育的过程及组织损伤修复机理的阐明,也有助于洞悉肝脏发生、发展、成熟的规律,尤其对阐明肝纤维化、肝癌的发病机制有重要意义。

3.2 肝干细胞与生物型人工肝及肝细胞移植 生物型人工肝在急性肝衰、严重的肝坏死、或作为肝移植前期的过渡治疗有重要作用。而由于肝移植供肝的严重缺乏,肝细胞移植也成为一种有潜力的治疗设想<sup>[23]</sup>。既往用于人工肝及肝细胞移植的细胞,主要有高分化的人肝细胞、动物肝细胞、人肝肿瘤细胞株等,但成人肝细胞来源困难,胚肝细胞涉及伦理问题,同时这类细胞体外增殖、扩增能力有限。人肝肿瘤细胞株、动物肝细胞有潜在的生物危险,因而上述细胞来源均不理想。成体肝干细胞体外扩增能力强,可定向诱导向肝细胞分化,免疫排斥反应低,无致癌性,生物危险性小,作为人工肝或细胞移植的细胞来源相当重要,同时如与组织工程结合,可望制造出人造肝脏,将有效地解决肝移植供体紧缺的问题。如骨髓干细胞分化成为肝干细胞的机理的阐明及实验技术的成熟,将为成体肝干细胞应用提供更为丰富的细胞源。

3.3 肝干细胞与先天性代谢性肝病的基因治疗 对于遗传性肝脏代谢障碍疾病(如 Wilson's 病),可通过转基因技术将缺陷基因导入肝干细胞,筛选出阳性细胞后移植入患者肝脏,导入基因产物可纠正肝脏代谢紊乱。最近, Song 等<sup>[24]</sup>也报告利用腺相关病毒技术对鼠源性肝前体细胞进行基因修饰,将修饰后的前体细胞移植入部分肝切除大鼠体内,18 周后检测观察到,40%~50%的再生肝细胞表达绿色荧光蛋白,同时表达人的  $\alpha 1$ -AAT 蛋白也可持续到 18 周。认为利用基因修饰的肝干细胞可作为治疗  $\alpha 1$ -AAT 缺乏等肝病的独特途径。

3.4 肝干细胞与肿瘤发生和治疗 (1)从分子水平看,肿瘤发生的机制可能包括两个方面:一是成熟细胞的去分化;二是干细胞的异常分化或成熟受阻。近来提出了肿瘤干细胞理论,该理论认为:肿瘤中只有少量具有干细胞性质的细胞群体对肿瘤的发生和发展起着决定作用,肿瘤是由干细胞突变积累而形成的无限增殖的异常组织,使人类对肿瘤的发生机制有了新的认识<sup>[25]</sup>。肝癌作为常见的恶性肿瘤,其细胞起源一直以来都存有争议,目前研究表明肝癌中可能存在肿瘤干细胞,这对肝癌的发病机制提供了新的研究领域,但目前研究结论尚不一致。(2)研究为认为肝干细胞为极具优势和潜力的治疗载体细胞,近年其在肝癌治疗中的潜力也尤受人关注。动物实验研究表明,肝卵圆细胞对药物损伤的肝脏有选择性趋向性<sup>[26]</sup>,而新近也有初步研究表明外源性肝干细胞对于肝细胞癌的病灶有追踪靶向作用,肝干细胞可望成为靶向治疗

肝癌的良好基因载体,但其机理与 SDF-1 等趋化因子作用是否有关,虽尚无肯定结论<sup>[27]</sup>,但为肝癌治疗展示一个新方向,肝干细胞可望成为靶向治疗肝癌的良好基因载体。同时,随着肿瘤干细胞研究的深入,利用肝癌发生机制的研究成果,针对肝干细胞癌变或致癌作用研制相应的抑制剂或阻断剂也可能成为肝癌治疗新方向。

#### 4 肝干细胞研究的前景展望

目前,对于肝干细胞的研究尚存较多的问题,是限制其应用前景的瓶颈:怎样分离、筛选高纯度、高特异性的肝干细胞?如何建立肝干细胞稳定的体外培养系统?肝干细胞特异分化、横向分化条件及机理?肝干细胞与肝脏疾病病理的关系也是研究的重点问题。虽然肝干细胞研究多数仅限于实验研究,但从目前的研究表明不论何种来源的肝干细胞作为肝脏疾病治疗,都是良好的细胞源,其强大的增殖、双重或多向分化的能力、低免疫源性的特点,必将为解决临床移植供体缺乏提供重要的途径。基因修饰的肝干细胞治疗代谢性疾病能有效的改善肝的代谢问题,已经证明肝干细胞也是肝病基因治疗的良好载体,并可解决其他生物载体涉及的危险性和伦理问题。而对于肝癌基因治疗,肝干细胞也具有潜在的价值,有进一步研究的前景。我们相信,随着研究的不断深入,肝成体干细胞的研究应用将有更广阔的领域,这方面的研究成果将为人类疾病的认识和治疗提供全新的思路。

#### 参 考 文 献

[1] Dan YY, Yeoh GC. Liver stem cells: a scientific and clinical perspective[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, 23(5): 687-698.

[2] Pi L, Ding X, Jorgensen 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.

[3] Mitaka T. Reconstruction of hepatic organoid by hepatic stem cells[J]. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2002, 9(6): 697-703.

[4] 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.

[5] 苏娟,姚玉成,王中华,等. 干细胞样肝原始细胞的分离与鉴定[J]. *癌变畸变突变*, 2000, 12(4): 200-201.

[6] Malhi H, Irani AN, Gagandeep S, et al. Isolation of human progenitor liver epithelial cells with extensive replication capacity and differentiation into mature hepatocytes[J]. *J Cell Sci*, 2002, 115(Pt 13): 2679-2688.

[7] Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells[J]. *Science*, 1999, 284(5417): 1168-1170.

[8] Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo[J]. *Nat Med*, 2000, 6(11): 1229-1234.

[9] Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. Liver from bone marrow in humans[J]. *Hepatology*, 2000, 32(1): 11-16.

[10] Blakolmer K, Jaskiewicz K, Dunsford HA, et al. Hematopoietic stem

cell markers are expressed by ductal plate and bile duct cells in developing human live[J]. *Hepatology*, 1995, 21(6): 1510-1516.

[11] Wang X, Willenbring H, Akkari Y, et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes[J]. *Nature*, 2003, 422(6934): 897-901.

[12] Wang X, Foster M, Al-Dhalimy M, et al. The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(Suppl 1): 11881-11888.

[13] Dabeva MD, Hwang SG, Vasa SR, et al. Differentiation of pancreatic epithelial progenitor cells into hepatocytes following transplantation into rat liver[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(14): 7356-7361.

[14] Chramostova K, Vondracek J, Sindlerova L, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons modulate cell proliferation in rat hepatic epithelial stem-like WB-F344 cells[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, 196(2): 136-148.

[15] Oertel M, Menthen A, Chen YQ, et al. Purification of fetal liver stem/progenitor cells containing all the repopulation potential for normal adult rat liver[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(3): 823-832.

[16] Guettier C. Which stem cells for adult liver? [J]. *Ann Pathol*, 2005, 25(1): 33-44.

[17] Crosby HA, Hubscher SG, Joplin RE, et al. Immunolocalization of ov 6, a putative progenitor cell marker on human fetal and diseased pediatric liver[J]. *Hepatology*, 1998, 29(3): 1193-1198.

[18] Yan L, Han Y, He Y, et al. Cell tracing techniques in stem cell transplantation[J]. *Stem Cell Rev*, 2007, 3(4): 265-269.

[19] Sell S. The hepatocyte: heterogeneity and plasticity of liver cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003, 35(3): 267-271.

[20] Styles JA, Kelly M, Elcombe CR. A cytological comparison between regeneration, hyperplasia and early neoplasia in the rat liver[J]. *Carcinogenesis*, 1987, 8(3): 391-399.

[21] Zheng D, Oh SH, Jung Y, et al. Oval cell response in 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy rat is attenuated by short interfering RNA targeted to stromal cell-derived factor-1[J]. *Am J Pathol*, 2006, 169(6): 2066-2074.

[22] Kronenwett R, Haas R. Differentiation potential of stem cells from bone marrow[J]. *Med Klin (Munich)*, 2006, 101(Suppl 1): 182-185.

[23] Lysy PA, Campard D, Smets F, et al. Stem cells for liver tissue repair: current knowledge and perspectives[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(6): 864-875.

[24] Song S, Wittek RP, Lu Y, et al. Ex vivo transduced liver progenitor cells as a platform for gene therapy in mice[J]. *Hepatology*, 2004, 40(4): 918-924.

[25] Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis[J]. *Nature*, 2004, 432(7015): 324-331.

[26] Chen JZ, Hong H, Xiang J, et al. A selective tropism of transfused oval cells for liver[J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(3): 544-546.

[27] Zhong XG, He S, Yin W, et al. Selective tropism of liver stem cells to hepatocellular carcinoma in vivo[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(28): 3886-3891.

(收稿日期:2008-06-15 修回日期:2008-07-18)