

干细胞作为肝脏肿瘤治疗手段的机制研究进展

曾文^{1,2}, 肖佳^{2,3,4}, 侯焱², 刘映霞¹, 陈志英² (1. 南华大学深圳市第三人民医院 传染科, 广东 深圳 518112; 2. 中国科学院深圳先进技术研究院 基因与细胞治疗研究室, 广东 深圳 518055; 3. 暨南大学生命科学学院 免疫生物学系, 广州 510632; 4. 香港大学李嘉诚医学院 解剖学系, 中国香港 999077)

干细胞是一类具有自我更新及多向分化潜能的原始细胞, 可以分为全能干细胞和多能干细胞。全能干细胞如胚胎干细胞。多能干细胞如造血干细胞、间充质干细胞、神经干细胞等。多能干细胞, 尤其是间充质干细胞, 来源广泛, 在外周血、脐带、胎盘、脂肪等组织中均可获得, 其可在体外诱导成为理想的成体细胞, 运用于基础研究和临床治疗。不同来源的干细胞均可诱导为肝脏细胞, 因而被运用于肝脏肿瘤疾病的治疗。初期研究中其抑瘤作用和促瘤作用备受争议。深入研究其对肿瘤的影响机制有利于恰当地合理地运用干细胞治疗肝脏肿瘤疾病。

1 肝细胞肝癌及其治疗

HCC是人类第五大最常见的肿瘤, 也是第三大肿瘤致死原因。肝炎病毒感染、黄曲霉素暴露、酒精摄入、吸烟、铁代谢异常、代谢综合征和肝硬化等都是HCC的重要致病因素。全球每年新增HCC病例的数量大约是55万人, 占每年人类恶性肿瘤发病数量的5%以上。现在临床上最有效的HCC治疗方法是外科手术治疗(即手术切除或肝脏移植)。但由于大多数HCC病人被发现时已处于晚期, 不适合使用手术治疗, 只有采用姑息疗法^[1]。而姑息疗法对晚期HCC效果并不佳, 手术治疗也存在肝源不足、术后存活率低和复发率高等问题^[1]。新近出现的干细胞治疗肝细胞癌是当前肝细胞癌研究治疗的热点。由于干细胞本身具备多能性(或者全能性)、可自我更新以及免疫源性低等优点, 有望解除肝源短缺和术后排斥等临床上常见问题, 发展新的肝细胞癌治疗方法。同时, 在基础研究中发现, 干细胞具备肿瘤趋向性, 因此利用基因工程手段令干细胞作为载体携带全身系统性药物靶向治疗肝细胞癌似乎有一定的疗效, 但是其临床研究尚需拓展。总之, 深入了解干细胞影响肿瘤生长的机制, 抑制干细胞的潜在促瘤作用, 扩大其抑瘤效果将有望令其成为临床上治疗肝脏肿瘤的新方法。

2 干细胞影响和治疗肝细胞癌的进展

2.1 胚胎干细胞 人类胚胎干细胞(human embryonic stem

cells, hESCs)来源于人类胚胎发育早期的囊胚中未分化的内细胞团, 其具有自我更新和定向分化为特定细胞的能力。近年来, 尽管有少数研究报道利用ESCs治疗癌症的进展。但是, 由于其伦理学上的争议, 关于ESCs在癌症治疗中的研究进展缓慢。ESCs主要可以通过调控小分子RNA(micro-RNAs或miRNAs)在动物水平上来影响肿瘤的病理进程。miRNAs是长度在22个核苷酸左右的内源性非编码小分子RNA, 具有调节细胞发育、分化、增殖、凋亡和癌变等多种生物学功能, 尤其在基因表达调控方面充当关键角色。此外, miRNAs在干细胞的基因表达调控中亦起到重要作用。有研究发现, miR-145等多种miRNAs还与肿瘤干细胞的致癌性有关^[2,3]。成熟的miRNAs可以和4种Argonautes(Agos)尤其是Ago2通过形成RNA诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RICS)达到降解和抑制mRNA转录的功能^[4,5]。miRNAs在转录后既可作为致癌基因也可作为抑癌基因。例如Lin-41是一种来源于ESCs的促癌基因, 在HCC中其表达被调高^[6]。他可以导致miRNA通路蛋白Ago2的泛素化和降解, 从而抑制microRNA介导的基因沉默和解除原癌基因的抑制并上调原癌基因表达, 所以推测HCC组织可能利用ESCs的无限增殖的特点导致Lin-41的过度表达, 促进了肝细胞癌的发展^[7]。因为这些作用, Lin-41将来可以被应用为理想的HCC治疗靶点, 激活RICS和抑制部分致瘤途径。除了促进肿瘤发展的作用之外, 其抑制肿瘤的作用在人类结肠直肠癌和肺癌方面有所发现, 但在肝细胞癌方面暂无详细结果。最近的研究表明, EHCC miRNAs(embryonic and HCC miRNAs)在肝脏肿瘤组织中高表达并且促进原代肝细胞的增殖。其分子机制是通过控制抑癌基因PTEN(gene of phosphate and tension homology deleted on chromosome ten)和转化生长因子 β (transforming growth factor-beta, TGF- β)通路诱导肝细胞上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT), 促进肿瘤的病理进程, 而ESCs的自我更新可以进一步促进该过程的反复

发生^[8]。另一方面,已有许多研究表明用肝细胞生长因子处理过的ESCs可以在体外分化为类肝细胞,这些细胞有趋向肝组织并分化为正常肝细胞的潜能,移植入体内可能有利于促进肝脏损伤组织的再生。基于ESCs强大的自我更新和分化能力,其为各种器官病变包括肝脏肿瘤带来了新的希望。但是由于其定向分化增殖能力难于控制以及其使用途径带来的伦理道德局限性,ESCs在再生医学上的应用普遍还处于临床前研究的阶段。

2.2 肝脏干细胞(liver stem cells, LSCs) 肝脏再生能力极强,他通过自身肝细胞的增殖迅速修复急性损伤,通过来自骨髓或者赫林管的肝脏卵圆细胞(hepatic oval cells, HOCs)修复慢性损伤。肝脏卵圆细胞因其能同时分化为肝细胞和胆管细胞而被认为是肝脏干细胞^[9]。很长一段时间内,研究者认为干细胞可以被移植入肝脏促进肝细胞增殖,起到治疗肝脏疾病甚至代替肝移植的效果。但随着研究的深入,大量的文献发现,许多种类的干细胞(包括LSCs)会参与肝脏疾病的病理生理过程,并促进HCC的发生发展。Bmi1是其中一种可由LSCs产生的转录抑制子,参与多种类型的干细胞或祖细胞的自我更新和增殖,并防止其衰老^[10]。同时,Bmi1也被证明是包括HCC在内的多种肿瘤的原癌基因,通过参与体内其他原癌基因信号表达,促进肿瘤细胞的扩增。Fan等^[11]发现HOCs通过产生的Bmi1解除对其起负调控作用的细胞周期调控基因Ink4a/Arf的控制,实现自身的无限扩增,而在Bmi1敲除后HCC的进程有所延缓,因此认为Bmi1将HOCs的扩增与HCC的发生联系在一起。

不过,近年来也有一些研究发现LSCs可以发挥抑制肿瘤的作用。Cavallari等^[12]发现人类LSCs可能可以通过调控Lefty蛋白抑制Nodal信号通路发挥其抑瘤性。同时,由LSCs产生的微泡(microvesicles, MVs)可能通过传递干扰肿瘤细胞的存活和增殖的遗传信息,从而抑制肝细胞癌肿瘤的生长^[13]。总之,虽然现在的研究对于LSCs在肝细胞癌的发生和发展中的作用存在争议,但是由于LSCs本身即存在于损伤肝脏中,有较其他需要迁移和诱导的干细胞更有力的原位和分化优势。所以深入研究LSCs对于肝脏疾病,尤其是肝细胞癌的作用机制对未来HCC的治疗非常关键。

2.3 内皮祖细胞 内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是在胚胎早期分化形成血管内皮细胞的前体细胞,也叫做成血管细胞(angioblast)^[14]。在病理因素刺激下,EPCs可从骨髓动员到外周血参与损伤血管的修复。骨髓产生的EPCs在缺氧的情况下富集,经脉管系统进入肿瘤中起到促进新生血管形成的作用。肿瘤早期外周血内EPCs含量不断增高,到终末阶段可能由于全身系统功能紊乱反而下降。Sun等^[15]发现在肿瘤生长过程中,与骨髓动员相关的因子,包括血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及脑脊液集落刺激因子(colony-stimulating factor, CSF)上调,导致EPCs被动员并进入外周血液循环系统,在肝血窦和肝静脉中分化为血管内皮细胞,促进肿瘤新生血管的形成,推动HCC的病理发展。肝细胞癌术后

或肝移植后,肝脏缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)损伤会导致EPCs富集而促进肿瘤发展和转移。Li等^[16]研究发现术后下腔静脉注射免疫调节剂FTY720可以通过减轻肝脏的缺血再灌注损伤和减少循环中的EPCs,达到抑制术后肿瘤转移的效果。因此,阻止EPCs在骨髓中的动员或者在肿瘤组织的富集是治疗HCC的一个新策略。同时,外周血中EPCs的浓度可作为抑制肿瘤血管新生药物用量的参考和肿瘤发生发展及预后估计的指标^[15]。

与ESCs和LSCs类似,新的研究发现EPCs也有抑制肿瘤的作用。例如, Li等^[17]发现移植骨髓源性EPCs可以改善四氯化碳引起的小鼠肝脏损伤。由于胞嘧啶脱氨酶(cytosine deaminase, CD)可以将无毒性的5-氟胞嘧啶(5-fluorocytosine, 5-FC)转化为高毒性的5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU), Torimura等^[18]通过研究发现EPCs被CD cDNA转染后得到的新CD/5-FC系统可能是抑制5-FU敏感的HCC肿瘤生长的安全有效治疗方法。EPCs还能改善小鼠肝硬化模型,其趋向损伤组织的特性和定向分化能力可被利用于作为细胞载体或者促进新生肝脏组织功能恢复,将是HCC治疗中一个新策略。

2.4 间充质干细胞 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是干细胞家族的重要成员,来源于发育早期的中胚层和外胚层。因其具有多向分化潜能、低免疫源性和免疫调控等特点而日益受到人们的关注。MSCs的一个重要职责是迁移到损伤组织中参与炎症下免疫调节、组织重构和伤口愈合。炎症微环境是恶性肿瘤生长环境中必不可少的组成部分,其产生大量趋化因子、细胞因子,引起白细胞浸润从而诱导骨髓产生大量MSCs富集到肿瘤组织^[19]。但是,利用富集和外源的MSCs治疗肿瘤的研究数量较少,且结果存在争议。

在一部分研究中, MSCs被发现具备促进肿瘤发生发展的能力,其主要机制是通过促进EMT导致上皮细胞失去极性,减少细胞间连接,进而改变细胞骨架,使上皮细胞表现出具有移行能力的间质细胞特征,致使肿瘤浸润转移^[20]。Syamal等^[21]发现将HCC上皮细胞系与人类MSCs混合可并引起肿瘤相关成纤维细胞的生长和EMT的发生。为了研究MSCs在HCC转移中的作用, Jing等通过模拟炎症环境,发现炎症微环境下MSCs可以通过上调TGF- β 诱发EMT,促进肝细胞癌的转移^[22]。MSCs还可能通过分化成为肌纤维母细胞和肿瘤相关巨噬细胞促进肝细胞癌发展^[23]。

除了对肿瘤的促进效应,一些研究也发现了MSCs对于肝脏疾病和肿瘤生长的抑制效应。例如,近期研究证实MSCs有抑制肝细胞凋亡、改善肝脏组织病理学、抑制白细胞浸润和促进肝脏再生等作用^[24]。相比造血干细胞, MSCs具备更强的分化为肝细胞的能力。van Poll等^[24]将MSCs植入用D-半乳糖胺诱导的暴发性肝衰竭小鼠模型中,发现MSCs能有效抑制全身系统性炎症反应,提高小鼠生存率。此外,携带特定组织自杀基因(如HSV-Tk和GCV)的转基因MSCs和携带肿瘤凋亡诱导配体(如TRAIL)的MSCs植入HCC肿瘤组织中能有效抑制肝细胞癌肿瘤的增长^[25]。经肿

瘤细胞分泌的外泌体处理过的小鼠MSCs也可以抑制肝细胞癌细胞的增殖^[26]。此外, MSCs可通过类似旁分泌的途径分泌可溶性肿瘤增殖抑制因子DKK-1抑制癌细胞增殖^[27]。一些研究显示手术前后或化疗结合MSCs移植亦是有效的HCC治疗手段^[28]。

MSCs作为多能干细胞,有来源广泛、容易获取、可体外增殖和能自体移植等优点,对肝脏损伤后的肝脏再生和功能复原有重要作用。由于MSCs诱导的EMT与肿瘤的短暂生存期和总存活率低有关,所以外周血MSCs的监测对HCC的预后判断有重要意义。深入研究MSCs移植后的分子机制,使其能够促进肝脏再生或逆转EMT以及合理的利用MSCs作为药物载体将是未来HCC治疗的新方向。

2.5 其他干细胞 目前,从小鼠胎肝中分离的上皮祖细胞,经过细胞培养后可以表达肝脏细胞和胆管细胞特定的标志(如白蛋白、CK18和甲胎蛋白)。移植入动物体内2周后,可表现出类似肝细胞的特征。在一些人类疾病包括肝脏疾病中发现,移植的上皮祖细胞可以逆转肝脏上皮细胞的EMT,并分化为肝脏细胞和胆管细胞修复肝脏损伤^[29,30]。人类骨髓中的造血干细胞也有在体内或体外分化为肝脏细胞的潜能,有利于肝脏的修复再生。此外,脂肪组织、羊膜组织等获得的干细胞和人工诱导的多功能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS)都可以分化为类肝细胞,在小鼠体内表达部分正常肝脏细胞功能。

3 结论

肿瘤的形成是一个极其复杂的过程,在其各种特殊的微环境下,多种细胞和分子参与各种信号通路扩大其致癌作用。充分了解其发生机制极为重要,一方面可以发现新的无创性诊断生物学标志,另一方面可以预测肿瘤预后及转移并期待新治疗方法的发现。此外,体外经过基因工程改造的干细胞的发展也为靶向治疗HCC提供了新思路。现在关于干细胞治疗包括肝细胞癌在内的癌症的疗效还有争议。一部分结果表明干细胞对癌症有正面的治疗作用,相反也有很多研究发现干细胞可以促进癌症的生成和转移。未来的研究应着重探索在不同条件下干细胞与促进和抑制癌症发展的分子机制,为包括肝细胞癌在内的癌症寻找更有效的临床治疗方法。

参考文献

- [1] Szkolnicka D, Zhou W, Lucendo-Villarin B, et al. Pluripotent stem cell-derived hepatocytes: potential and challenges in pharmacology[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*,2013,53:147-159.
- [2] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*,2006,6:259-269.
- [3] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*,2004,116:281-297.
- [4] Liu J, Carmell MA, Rivas FV, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi[J]. *Science*,2004,305:1437-1441.
- [5] Rivas FV, Tolia NH, Song JJ, et al. Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC[J]. *Nat Struct Mol Biol*,2005,12:340-349.
- [6] Rybak A, Fuchs H, Hadian K, et al. The let-7 target gene mouse lin-41 is a stem cell specific E3 ubiquitin ligase for the miRNA pathway protein Ago2[J]. *Nat Cell Biol*,2009,11:1411-1420.
- [7] Chen YL, Yuan RH, Yang WC, et al. The stem cell E3-ligase Lin-41 promotes liver cancer progression through inhibition of microRNA-mediated gene silencing[J]. *J Pathol*,2013,3:486-496.
- [8] Jung CJ, Iyengar S, Blahnik KR, et al. Human ESC self-renewal promoting microRNAs induce epithelial-mesenchymal transition in hepatocytes by controlling the PTEN and TGF- β tumor suppressor signaling pathways[J]. *Mol Cancer Res*,2012,10:979-991.
- [9] Fausto N, Campbell JS. Campbell. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation[J]. *Mech Dev*,2003,120:117-130.
- [10] Park IK, Morrison SJ, Clarke MF. Bmi1, stem cells, and senescence regulation[J]. *J Clin Invest*,2004,113:175-179.
- [11] Fan L, Xu C, Wang C, et al. Bmi1 Is required for hepatic progenitor cell expansion and liver tumor development[J]. *PLoS ONE*,2012,7:e46472.
- [12] Cavallari C, Fonsato V, Herrera MB, et al. Role of Lefty in the anti tumor activity of human adult liver stem cells[J]. *Oncogene*,2013,32:819-826.
- [13] Fonsato V, Collino F, Herrera MB, et al. Human liver stem cell-derived microvesicles inhibit hepatoma growth in SCID mice by delivering antitumor microRNAs[J]. *Stem Cells*,2012,9:1985-1998.
- [14] Risau W. Mechanisms of angiogenesis[J]. *Nature*,1997,386:671-674.
- [15] Sun XT, Yuan XW, Zhu HT, et al. Endothelial precursor cells promote angiogenesis in hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*,2012,18:4925-4933.
- [16] Li CX, Shao Y, Ng KT, et al. FTY720 suppresses liver tumor metastasis by reducing the population of circulating endothelial progenitor cells[J]. *PLoS One*,2012,7:e32380.
- [17] Li Y, Wan DF, Su JJ, et al. Differential expression of genes during aflatoxin B(1)-induced hepatocarcinogenesis in tree shrews[J]. *World J Gastroenterol*,2005,10:497-504.
- [18] Torimura T, Ueno T, Taniguchi E, et al. Interaction of endothelial progenitor cells expressing cytosine deaminase in tumor tissues and 5-fluorocytosine administration suppresses growth of 5-fluorouracil-sensitive liver cancer in mice[J]. *Cancer Sci*,2012,103:542-548.
- [19] Ren G, Chen X, Dong F, et al. Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues[J]. *Stem Cells Transl Med*,2012,1:51-58.
- [20] Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: Role of phosphatidylinositol 39 kinase/akt pathways[J]. *Oncogene*,2005,24:7443-7454.
- [21] Syamal D, Bhattacharya MD, Mi ZY, et al. Human mesenchymal stem cell and epithelial hepatic carcinoma cell lines in admixture: Concurrent stimulation of cancer-associated fibroblasts and epithelial-to-mesenchymal transition markers[J]. *Surgery*,2012,152:449-454.
- [22] Jing Y, Han Z, Liu Y, et al. Mesenchymal stem cells in inflammation

- microenvironment accelerates hepatocellular carcinoma metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition[J]. PLoS ONE,2012,7:e43272.
- [23] Hu M, Polyak K. Molecular characterisation of the tumour microenvironment in breast cancer[J]. Eur J Cancer,2008,44:2760-2765.
- [24] van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo[J]. Hepatology,2008,47:1634-1643.
- [25] Zhang B, Shan H, Li D, et al. The inhibitory effect of MSCs expressing TRAIL as a cellular delivery vehicle in combination with cisplatin on hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Biol Ther,2012,13:1175-1184.
- [26] Ma B, Jiang H, Jia J, et al. Murine bone marrow stromal cells pulsed with homologous tumor-derived exosomes inhibit proliferation of liver cancer cells[J]. Clin Transl Oncol,2012,14:764-773.
- [27] Zhu Y, Sun Z, Han Q, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1[J]. Leukemia,2009,23:925-933.
- [28] 智建生, 赵秀娟, 乔振华. 肝动脉化疗栓塞结合骨髓间充质干细胞输注治疗原发性肝癌疗效观察[J]. 肿瘤研究与临床,2007,19:1006-9801.
- [29] Choi SS, Diehl AM. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver[J]. Hepatology,2009,50:2007-2013.
- [30] Aravalli RN. Progress in stem cell-derived technologies for hepatocellular carcinoma[J]. Stem Cells and Cloning,2010,3:81-92.
- 收稿日期: 2013-11-20

· 消息 ·

北京亚太肝病诊疗技术联盟成立

经过近一年的筹备,在北京市民政局、中关村管委会等政府部门的组织协调和大力支持下,以及相关医院、大学、研究院所和企业的共同努力配合下,2014年3月28日,由首都医科大学附属北京地坛医院、北京大学第一医院、复旦大学附属华山医院和四川大学华西医院等国内数十家医院,北京市理化分析测试中心、森隆药业有限公司等数十家科研院所及企业自愿联合发起,经市民政局核准登记的北京亚太肝病诊疗技术联盟正式成立,这是一家集产、学、研为一体的非营利性社会团体组织。旨在整合各方资源,协调多方力量,搭建肝病临床诊疗产业技术领域的创新平台,以实现肝病诊疗技术的规范、创新和推广为目标,达到“政、产、学、研、用、资”的互补与互动,提升我国肝病产业技术的整体水平与竞争力。

北京亚太肝病诊疗技术联盟集合了国内众多知名肝病专家,进行肝病诊疗指南撰写、基层医院巡讲、联盟成员单位远程会诊、建立慢性肝病患者俱乐部等各种学术交流活动。除此之外,联盟成员中的医疗、科研院所、企业将紧密结合,开展肝病诊疗医疗器械、药物和诊断试剂的创新研究与开发和市场推广,建立新型非公立肝病专科医院,积极探索新的医疗模式。造福慢性肝病患者、推动肝病诊疗技术水平的提高。

当天,北京亚太肝病诊疗技术联盟进行了第一届理事会、监事会的选举。首都医科大学附属北京地坛医院副院长、感染病领军人才成军教授当选理事长。近年来,成军教授带领医院肝病专家针对肝病领域的难点和热点问题,组织起草了21部相关共识并组织全国部分专家进行研讨、修订并最终发表;自2011年始,组织在全国近100个城市进行指南和共识巡讲,近30 000名基层医生得到培训,提高了基层医务工作者的规范化诊疗水平,促进了肝病领域的协同发展。

首先,联盟会制作相关网站,整合联盟中的一大批著名肝病专家,为患者选择医生提供一个独特的渠道。其次,联盟将成立百家传染病医院协作网,网内每家医院都加入了远程会诊系统,今后,患者只需要在他们自己的城市,通过远程会诊就能享受到首都的优质医疗资源及服务,而无需奔波到北京。最后,联盟的成立宗旨是促进产学研和学术的交流,这也能缩短研究机构将技术变成产品的转化周期,让有效的产品尽快走向市场,服务于患者。