

肝卵圆细胞——肝干细胞研究进展

杨志云¹, 王宪波¹, 殷飞² (1. 首都医科大学北京地坛医院 传染病研究所, 北京 100015; 2. 河北医科大学附属第四医院 消化内科, 石家庄 050051)

近年来对干细胞的研究不断深入, 人们发现成年肝组织内存在具有干细胞特性的细胞, 在特定环境因素作用下可向肝细胞和胆管细胞分化, 甚至可向肝癌细胞方向分化, 该细胞被称为肝卵圆细胞或肝前体细胞, 是具有一定共性的干细胞群体, 与其分化的上下游细胞难以区分, 本文就肝干细胞的定位及其来源、表面标志、活化、分离培养和应用前景进行综述。

1 肝卵圆细胞的定位

1956年, Farber在研究肝癌的病理变化时, 观察到肝门管区有一些增生的小细胞, 呈卵圆形而称为卵圆细胞(oval cell)^[1]。Theise等^[2]研究证明正常肝组织内CK-19阳性细胞呈线性排列, 一端连于胆管, 另一端连于肝小叶内, 在肝坏死区域内, CK-19阳性细胞呈单独或簇状位于门脉周围, 沿Hering管呈放射状排列。Hering管是连接肝细胞微管系统与胆管树之间的腔性管道, 也称为微胆管、终末胆管, 是构成肝实质细胞与小叶间单位的连接。故目前公认肝卵圆细胞定位为胆管树的最小单位Hering管, 它是在肝实质细胞和胆管上皮细胞相结合的部位, 这与肝卵圆细胞双向分化潜能相符合。

2 肝卵圆细胞的来源

肝卵圆细胞的来源分为肝源性和非肝源性。肝源性的肝卵圆细胞直接由肝内终末胆管处的原始胚胎干细胞发育而来, 非肝源性肝卵圆细胞是指由骨髓、胰腺等肝外组织的干细胞迁入肝内发育而来。两种途径来源的肝卵圆细胞均可进一步

分化为成熟的肝细胞和胆管细胞^[3]。

2.1 胚胎肝细胞 有学者认为在肝脏发育中, 早期的胎肝细胞是所有成体肝细胞和胆管细胞的前体细胞。实验提示用亚甲蓝破坏胆管系统可阻止卵圆细胞的增殖, 支持卵圆细胞发育来自胆管的理论。Malhi等^[4]从人胎肝中分离出一种上皮细胞, 表达肝细胞和胆管细胞的特征, 表现出很强的集落形成能力并可在体外增殖数月仍保持正常核型。Haruna等^[5]研究发现CK19(胆管细胞表型)和Heparl(肝细胞表型)是未成熟肝细胞最先出现的标志, 随着向胆管细胞和肝细胞演变, 其特异性表型亦会相应变化, 这提示肝胚细胞至少是双能细胞。以上结论提示胎肝中存在大量具有双向分化潜能的肝干细胞, 而卵圆细胞与肝脏发育过程中的原始胚胎细胞具有相同的细胞表型及分化能力^[6], 故有学者认为肝卵圆细胞是由肝胚胎细胞发育而来。

2.2 小肝细胞 小肝细胞是一种独特的低分化的实质细胞, 其表型与卵圆细胞或已分化的肝细胞、胆管细胞不同。有人在用倒千星光碱和肝脏部分切除联合处理大鼠发现了这种细胞。倒千星光碱可阻断成熟肝细胞的分裂, 但不能使甲胎蛋白和OV6阳性的典型卵圆细胞出现, 相反会出现一些小型肝细胞样的细胞灶, 完成对损伤肝脏的修复与重建^[7]。小肝细胞是肝细胞的前体, 胚胎原始母细胞先分化为卵圆细胞, 再由卵圆细胞分化为小肝细胞, 后者在非实质细胞分泌的胞外基质作用下分化为成熟肝细胞。小肝细胞与卵圆细胞的分化能力不同, 小肝细胞只具有分化为肝细胞

基金项目: 国家自然科学基金(NO: 30873423) 河北省自然科学基金(NO: C2007001063)
通讯作者: 杨志云 Email: yangzhiyun@yahoo.com.cn

的能力,不能分化为胆管上皮细胞。卵圆细胞和小肝细胞是肝细胞分化不同阶段的原始细胞,目前对小肝细胞的起源、定位及表面标志等尚不清楚。

2.3 骨髓干细胞 肝卵圆细胞来源于骨髓干细胞是由Peterson等首先提出来的,他认为骨髓干细胞在肝内可以转化为卵圆细胞、肝细胞和胆管细胞,在一定因素作用下,骨髓细胞可能在不同信号调节作用下分别分化为肝细胞或胆管细胞。此后有许多实验证明了此说法,如有人将雄性大鼠的骨髓移植至被致死量射线照射的雄性大鼠体内,原位杂交技术发现了表达Y染色体的肝细胞,提示骨髓细胞向肝细胞转化。Lagasse等^[8]研究为骨髓细胞与肝脏细胞之间的关系提供了更为直接的证据,实验结果显示可以已转化的细胞表达c-kit、Thy、Sca,与骨髓细胞表型相一致。骨髓多能干细胞在维持机体自身的稳定性方面具有重要意义,可能是许多组织细胞的祖细胞。目前认为骨髓干细胞可经过两种途径帮助肝组织更新及修复:①循环途径:骨髓源性细胞经门脉血管入肝,以干细胞的形式随机插入肝索;②经卵圆细胞途径:骨髓多能干细胞通过血液循环入肝,首先定位于汇管区附近,穿过基底膜定位于胆管树终末分支旁,然后分化为小胆管上皮样细胞,即卵圆细胞。卵圆细胞在不同环境作用下分化为肝细胞或胆管上皮细胞^[9]。

2.4 胰腺上皮细胞 胰腺细胞是由位于腹侧前肠处的内胚层前化细胞发育而来,肝细胞和胆管上皮细胞也是来源于前肠内胚层的同一部位。在解剖学上,胰腺的腹侧小叶与肝脏的关系非常密切,这为肝干细胞来源于胰腺上皮细胞理论提供了可能性。有学者为了探讨正常胰腺中是否存在肝细胞的前体细胞进行了FAH敲除小鼠模型的重构实验,结果发现可以在10%移植受体中观察到有50%的肝脏重构,证明正常胰腺组织中存在着肝细胞的前体细胞^[10]。

3 肝卵圆细胞的特征

3.1 形态特征及分型 光镜下,卵圆细胞较小,直

径约为肝细胞的1/3~1/2,圆形或卵圆形,核大而呈圆形或卵圆形,色淡、核仁清晰、胞浆少、核质比高。电镜下,细胞器少,可见少量粗面内质网和小的线粒体。可分为3型:I型细胞体积最小,直径约在7 μm左右,分布于门静脉周边肝细胞索内,胞质内含少量细胞器,与邻近细胞存在紧密连接;II型细胞,体积略大,直径约8 μm左右,分布于胆管上皮细胞间,具有一些胆管细胞结构特征,与邻近的胆管细胞侧膜有镶嵌的交叉结构;III型分布于肝血窦或汇管区周围的肝细胞索内,细胞直径约10 μm,内含细胞器较多,可见有高尔基体和溶酶体,胞浆内有张力微丝,细胞间存在桥粒连接,此二者被认为是卵圆细胞的特征性结构^[11]。从I型到III型细胞是由原始向成熟细胞发育的过程。肝损伤后,首先是I型卵圆细胞出现于毛细胆管旁,随后分化为II型和III型细胞,II型细胞多分化成胆管细胞,III型细胞多分化成肝细胞。

3.2 表面标志 卵圆细胞表达一系列的表面标志物,但仍未发现特异性的标志物,目前利用免疫组织化学等技术已经筛选出一些高度表达的标志物,如胆管上皮角蛋白CK7、CK8、CK18、CK19、CK14、波形蛋白,干细胞因子SCF及其受体c-kit,与造血干细胞共有的标志有Thy-1、CD34、SCF、c-kit,这也提示肝卵圆细胞来源于造血干细胞,其他还有c-met、AFP、OV6、HepParl、CD29、CD38、CD43、CD69。有趣的是肝卵圆细胞表面的标志可随分化不同而不同,当肝卵圆细胞向肝细胞系演变时,可出现ALB、HepParl、G-6-P,当向胆管细胞系演变时,出现CK7、CK19、α-GTP等^[12]。虽然尚未确定肝卵圆细胞特异表面标志物,但其表面标志物的研究十分重要,为鉴定和分离纯化提供依据。

3.3 卵圆细胞的干细胞特性 成年肝脏中卵圆细胞数目少,处于休眠或静止状态,肝脏轻度受损时,成熟肝细胞或胆管细胞经过1~2次有丝分裂,恢复肝脏体积与功能。当肝脏实质受到严重破坏或由于病毒、药物、肝毒素、致癌物作用

时,卵圆细胞被激活大量增殖,这些细胞首先出现在胆管旁,然后迁移到肝脏实质,分化为肝细胞和胆管细胞,修复和重建肝脏^[13]。卵圆细胞具有强大的分化潜能,除分化为肝细胞外,还具有向胰腺细胞、神经细胞横向分化的潜能。如高糖环境下肝卵圆细胞可诱导分化为能分泌胰岛素、胰高血糖素的胰岛样细胞。肝卵圆细胞移植入新生小鼠大脑内,可分化为大脑神经胶质细胞,并表达一些神经元的表面标志。

4 肝卵圆细胞的研究方法

4.1 活化 正常肝脏内卵圆细胞含量较少,处于静止期,为得到较多的卵圆细胞进行研究,故采用一些人为干预措施使其活化。目前最常用的卵圆细胞活化模型是SoltFarber^[14]模型,即2/3肝切除致肝实质细胞损害,并服用2-乙酰氨基苄阻止肝细胞再生,也有选用千里光碱和转基因动物模型的。

4.2 分离培养 肝卵圆细胞多采用两步胶原酶灌注法分离肝脏细胞,再用胶原酶和蛋白酶消化收集非实质细胞,用Percoll密度梯度离心法获得底层的卵圆细胞。还有选用免疫亲和法、免疫磁珠分选法和荧光活化分选法,这些方法也都在不断尝试和改进,优点是卵圆细胞收获量大、产量高、不需外科切除;不足之处是纯度不够,有的可影响后续鉴定和培养。

4.3 鉴定 常用的鉴定方法有:①检测细胞表面标志物蛋白的基因表达;②用放射性同位素或基因标记技术跟踪卵圆细胞在体内的演变、分布、最终命运;③移植入肝损伤动物模型体内观察其分布、演变、再生及修复肝脏的潜能。

5 肝卵圆细胞的分化调控

成体肝卵圆细胞处于安静状态,只有在一定因素刺激下才激活分化为肝细胞、胆管细胞,甚至肝癌细胞,此过程是一系列因素共同作用的结果,其中包括卵圆细胞与肝窦内皮细胞、肝星状细胞、枯否细胞等细胞之间及细胞与基质之间的协调作用,其中多种细胞因子及信号转导途径发挥了重要作用,但具体是哪些因素调控了卵圆细胞的分化发育仍不十分清楚。目前研究较多

的有肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、转化生长因子- α (transforming growth factor- α , TGF- α)等,结果显示HGF激活PI3K/AKT信号转导途径促进卵圆细胞增殖。Svetov等^[14]研究证明LPA在控制肝星状细胞和肝癌细胞的增殖和迁移方面发挥重要作用。Oben等^[15]发现抑制交感神经能增加卵圆细胞的数量,减少肝细胞坏死,降低转氨酶。有人认为胰岛素对肝脏的再生起重要作用,研究认为胰岛素与其位于肝细胞表面的受体结合,产生信号转导促进肝细胞DNA的合成、增殖。Yang等^[16]分离培养的大鼠肝卵圆细胞在高糖环境中能定向分化成胰腺内分泌细胞。虽然目前对肝卵圆细胞的分化调控机制研究尚不十分深入,但此领域研究意义深远,为肝卵圆细胞移植治疗慢性肝脏疾病提供了理论依据。

6 肝卵圆细胞与肝脏疾病

肝卵圆细胞与肝脏疾病的关系十分复杂,在多种肝脏疾病(包括肝癌)中均发现了卵圆细胞的参与,其增殖分化修复肝组织的同时受到相应信号分子的调控,其分化异常可能诱导原发性肝癌的发生。如Roskamas等^[17]研究结果显示脂肪肝患者卵圆细胞显著增加,肝纤维化与卵圆细胞的数量有很强的相关性,在脂肪肝中卵圆细胞的激活与成熟肝细胞的增殖受到抑制相关,同时也增加肝细胞癌形成的风险。Gorunary等^[18]应用卵圆细胞增殖模型,观察其在化学诱导的肝癌形成早期的作用,发现癌前病灶来自于卵圆细胞分化而形成的成熟肝细胞,肿瘤是由成熟肝细胞去分化而形成。综上所述,在酒精性肝病、脂肪肝、慢性病毒性肝炎、肝硬化及肝癌等肝组织中均发现卵圆细胞,并且卵圆细胞数目与病情的严重程度密切相关^[19]。

7 问题与展望

肝卵圆细胞尚处于起步阶段,研究还不十分深入,有许多问题亟待解决。如何获得高纯度大量的肝卵圆细胞用于实验,卵圆细胞的生物学特性还有哪些?卵圆细胞可进一步分化为小肝细胞,小肝细胞的特征性标志物是什么,其分化程

度如何?与卵圆细胞与哪些异同点?卵圆细胞作为肝脏干细胞在各种肝脏疾病中的具体作用机制如何?卵圆细胞与其他干细胞的关系?诱导卵圆细胞增殖、定向分化、凋亡的细胞因子及信号转导途径是研究的重点,尽管此方面的报道已不少,但实验结果存在较多分歧,尚未形成共识。

虽然目前关于卵圆细胞的研究尚处于基础研究阶段,但其广泛的应用前景已越来越受到关注,目前已作为细胞移植和基因治疗的理想细胞,可以通过卵圆细胞的移植治疗各种重症肝病和先天性肝病,避免了肝移植的供体不足、免疫排斥等棘手问题,同时将基因修饰的卵圆细胞移植入患基因缺陷肝脏患者体内,可用来治疗遗传性及代谢性肝脏疾病。肝卵圆细胞具有多向分化潜能,可将卵圆细胞移植入其他受损脏器中,通过卵圆细胞在特定环境中的定向分化来完成对其他组织器官的修复作用。相信随着对卵圆细胞研究的不断深入,我们对各种急慢性肝脏疾病以及肝癌的病机、发病机理、演变过程会有更深入的了解,尤其是卵圆细胞的移植治疗和基因修饰治疗将对肝脏疾病的治疗是一个质的飞跃。

参考文献

- [1] Farber E. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene[J]. *Cancer Res*,1956,16:142-148.
- [2] Theise ND, Saxena R, Portmann BC, et al. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans[J]. *Hepatology*,1999,30:1425-1433.
- [3] Strom S, Fisher R. Hepatocyte transplantation: new possibilities for therapy[J]. *Gastroenterology*,2003,124:568-571.
- [4] 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*,2002,115:2679-2688.
- [5] Haque S, Haruna Y, Saito K, et al. Identification of bipotential progenitor cells in human liver regeneration[J]. *Lab Invest*,1996,75:699-705.
- [6] Vessey CJ, de la Hall PM. Hepatic stem cells: a review[J]. *Pathology*,2001,33:130-141.
- [7] 张好建, 何祖润, 丰美福. 胚胎肝干细胞研究进展[J]. *生物细胞学杂志*,2004,26:1-4.
- [8] Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo[J]. *Nat Med*,2000,6:1229-1234.
- [9] 张颖. 肝干细胞的存在和起源[J]. *国外医学·消化系统疾病分册*,2004,22:224-226.
- [10] Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, et al. Generalized potential of adult neural stem cells[J]. *Science*,2000,288:1660-1663.
- [11] De Vos R, Desmet V. Ultrastructural characteristics of novel epithelial cell types identified in human pathologic liver specimens with chronic ductular reaction[J]. *Am J Pathol*,1992,140:1441-1450.
- [12] Runge D, Runge DM, Jager D, et al. Serum-free, long-term cultures of human hepatocytes: maintenance of cell morphology, transcription factors, and liver-specific functions[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2000,269:46-53.
- [13] Deng J, Steindler DA, Laywell ED, et al. Neural trans-differentiation potential of hepatic oval cells in the neonatal mouse brain[J]. *Exp Neurol*,2003,182:373-382.
- [14] Svetlov SI, Sautinyy, Crawford JM. EDG receptors and hepatic pathophysiology of LPA and S1P: EDG-ology of liver injury[J]. *Biochim Biophys Acta*,2002,1582:251-256.
- [15] Oben JA, Roskams T, Yang S, et al. Sympathetic nervous system inhibition increases hepatic progenitors and reduces liver injury[J]. *Hepatology*,2003,38:664-673.
- [16] Yang L, Li S, Hatch H, et al. In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2002,99:8078-8083.
- [17] Roskams T, Yang SQ, Koteish A, et al. Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Am J Pathol*,2003,163:1301-1311.
- [18] Gournay J, Auvigne I, Pichard V, et al. In vivo cell lineage analysis during chemical hepatocarcinogenesis in rats using retroviral-mediated gene transfer: evidence for dedifferentiation of mature hepatocytes[J]. *Lab Invest*,2002,82:781-788.
- [19] Fotiadu A, Tzioufa V, Vrettou E, et al. Progenitor cell activation in chronic viral hepatitis[J]. *Liver Int*,2004,24:268-274.

收稿日期: 2009-01-28