

文章编号: 1004-0374(2009)05-0710-05

肝干细胞的几个生物学问题

向导, 胡以平*

(第二军医大学细胞生物学教研室, 上海200433)

摘要: 对肝干细胞的认识, 自卵圆细胞发现以来已经经历了五十多年。期间许多的研究提示和证明肝干细胞具有很好的生物医学应用前景。近年来, 肝干细胞的概念已被广泛接受和认可, 肝干细胞的生物学特性及其医学应用的探索也成为了研究的热点。目前在该领域中, 主要以肝干细胞存在的位置、与其所处微环境的相互作用、肝干细胞的分子标记以及其分化特性等方面备受关注。肝干细胞的研究为肝脏疾病及其他相关疾病的治疗带来了新希望。然而, 肝干细胞研究的过程中仍存在很多未解的问题, 因此将肝干细胞研究引入临床应用则还需要更加深入的探索。

关键词: 干细胞; 肝干细胞; 干性维持; 细胞分化; 细胞治疗

中图分类号: Q813; R657.3 **文献标识码:** A

Several aspects of liver stem cells biology

XIANG Dao, HU Yi-ping*

(Department of Cell Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: It is more than five decades since the oval cell has been found. During this period, marvelous bio-medical potential of the liver stem cells (LSCs) was implied and proved by many researches. The concept of LSCs has been accepted, and the investigation on LSCs has turned to be the hotspot in recent years. Most concentration in this territory is on the place where LSCs exist, the interaction between LSCs and the microenvironment, molecule markers of LSCs and its differentiation. The researches on LSCs have brought new hope for treatments for liver diseases and other disorders. However, because of the problems remained in the researches, more and further investigation on LSCs is needed in order to put LSCs from laboratory study to clinical therapy.

Key words: stem cell; liver stem cells; stemness maintenance; cell differentiation; cell therapy

对于肝干细胞的认识, 可追溯到20世纪50年代。Farber^[1]在使用致癌剂处理大鼠后, 发现其肝组织的门管区内出现体积较小的圆形非实质细胞, 并将其称为卵圆细胞(oval cell)。在随后的研究中, 有不少的实验室先后得到了一些支持卵圆细胞可参与肝脏损伤修复的证据, 例如, Wilson和Leduc^[2]通过对小鼠严重营养性肝损伤的研究发现, 末端胆小管的非实质细胞增殖分化成为肝细胞, 并能形成新的小叶间胆管; Evarts等^[3]采用肝损伤和放射性同位素标记示踪的方法, 在Farber的卵圆细胞模型中证明了卵圆细胞具有分化为肝细胞和胆管细胞的能力。特别是在近几年中, 通过原位分析、卵圆细胞的分离培养及其活体内移植等技术体系的综合

应用, 卵圆细胞是肝干细胞的概念已经得到认可。然而, 卵圆细胞只是成体肝脏在病理状态才出现的一种特殊细胞, 而对肝脏发育过程中以及成体肝脏在正常生理状态或不同病理状态下, 肝脏中肝干细胞的类型和存在, 以及其功能活动等方面的细节则知之甚少。本文仅就该领域中目前比较受关注的几个问题加以介绍。

收稿日期: 2009-08-17

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)
(2009CB941103)

*通讯作者: Tel: 021-81870943; E-mail: yphu@smmu.edu.cn

1 肝干细胞的存在

现在一般认为,在肝脏发生和发育的整个过程中都有干细胞样细胞的存在及其功能的活动。当小鼠胚胎发育至8 d时,其前肠内胚层腹壁定位于发育中的心脏附近,由心性中胚层(cardiac mesoderm)释放的信号,如成纤维生长因子(fibroblast growth factors, FGFs)诱导下面的内胚层,启动胎肝干细胞肝向分化^[4]。小鼠胚胎期8.5 d,相应人类胚胎期3周时,内胚层受诱导形成肝芽。肝芽中的主要细胞组分是成肝细胞(hepatoblast),它具有双向分化潜能,即能分化为肝细胞和胆管细胞^[5]。至小鼠胚胎期9.5 d,围绕着肝芽的基底膜消失,肝芽中细胞分层,并侵入原始横隔间充质中,形成成肝细胞索。原始横隔属于中胚层,能对肝向分化的进程起诱导作用,与心性中胚层共同形成了胚胎肝干细胞存在的微环境,影响和调控肝干细胞的增殖分化及干性维持。心性中胚层释放的FGF-1、2和8,以及原始横隔间充质释放的骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)协同诱导内胚层细胞发生肝向分化并抑制胰向分化。原始横膈中胚层中的星形细胞与窦状隙内皮细胞分泌很多细胞因子与生长因子如EGF、FGF、HGF、TGF β 、TNF α 和IL-6,对细胞的生长和分化起调控作用。在肝脏发生的后期(胚胎期14.5 d左右),胎肝中的血细胞产生白介素6(interleukin 6, IL6)家族的细胞因子制瘤素M(oncostatin M, OSM),通过旁分泌的机制促进肝细胞发育。而Notch信号通路在创造和调节成肝细胞肝向分化与胆向分化之间的平衡中起到重要作用。向胆系的分化可被Notch信号所促进,而被肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)所拮抗^[6]。伴随着肝芽的产生和发育,肝脏的脉管系统也逐渐发育完全。同时,肝脏血管发育不仅与成肝细胞发育相协调,同时血管内皮细胞在调控肝原基生长过程中起到不可或缺的作用。在胚胎期约17 d时,随着组织发生的继续,肝内胆管在大的门静脉分支附近形成,肝叶的基本结构也已经完成。

而在某些病理状态下,在人类或其他动物成体肝脏中会出现具有肝向分化和胆向分化双分化潜能的前体细胞。当肝脏受损并且肝细胞的分裂受阻或肝脏受到持续的大规模慢性损伤时,肝脏中的肝干细胞被激活,发生胆管反应(ductular reaction),分裂增殖并分化产生肝细胞和胆管细胞等不同类型的细胞,补充损失的细胞,恢复其功能^[7]。一般认

为这些细胞位于肝脏的Hering管(canals of Hering),也有资料表明肝脏组织干细胞位于胆管系统,包括终末胆管的所有胆上皮细胞及所谓胆管内基底细胞^[8],但这种观点仍存在着争议。

正常肝脏中的Hering管由肝细胞和胆管细胞组成,但一般没有处于中间状态的细胞。当发生胆管反应时,Hering管中出现呈中间状态的细胞,即直径大于6 μm (正常Hering管中最小胆管细胞的大小)且小于40 μm (典型肝细胞大小),并且同时表达胆管细胞和肝脏细胞的标记。Hering管是胆道系统中最小最末端的,它们连接着胆小管系统和小叶间胆管。这些小管由肝细胞产生,将肝细胞分泌产生的物质导入相互连接的肝细胞细胞膜之间的胆小管。在这个水平上,胆管系统的管腔部分内衬有肝细胞和胆管细胞。这样Hering管表现了肝管与胆管系统在解剖结构及生理上的连接^[9],而在成熟肝脏中,肝干细胞就存在于Hering管中。在Hering管中还有很多不同种类的细胞如:门管区成肌纤维细胞(myofibroblast, MF)、肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)、内皮细胞、肝细胞、胆管细胞、Kupffer细胞和炎症细胞等。这些细胞通过激素、信号分子及不同信号转导通路等相互作用,并影响和调控肝干细胞的增殖和分化,如T细胞能产生一种弱的肿瘤坏死因子(TNF)样凋亡诱导物质(TWEAK),通过与其特异性受体结合来刺激肝干细胞增殖^[10]。其他的炎症因子,如淋巴毒素(lymphotoxin)、免疫反应性纤维结合素(IFN)、肿瘤坏死因子和组胺(histamine)等都能激活肝干细胞。现已知肝星状细胞与肝干细胞存在密切联系,它能产生,如转化生长因子 α (transforming growth factor alpha, TGF α)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)和酸性成纤维细胞生长因子(acidic fibroblast growth factor)等,从而调节肝干细胞的活动。还有报道称,Wnt通路组分通过自分泌或旁分泌方式参与小鼠、大鼠及人类的肝干细胞动员^[11],而Hedgehog信号通路通过激活干细胞表达的特异性受体Patched(PTC)来维持肝干细胞的干性。

2 肝干细胞的分子标记

特异性的分子标记是识别、分离和纯化肝干细胞的依据和标准。成肝细胞特征性表达很多标记,如白蛋白(albumin, alb)、甲胎蛋白(α -fetoprotein, AFP)、甲状腺素运载蛋白(transferrin, TTR)、细胞角蛋白17(cytokeratin 17, CK17),以及CK19等^[12]。

也有报道胎肝干细胞表达诸如 c-kit、CD34 以及 Thy-1 等与造血干细胞相同的标记, 并且 Suzuki 等^[13]以 c-kit 和 $\alpha 6$ 、 $\beta 1$ 整合素为标记, 从发育中的小鼠肝脏中通过流式分选出了干细胞成分。

在成体肝脏中卵圆细胞表达成肝细胞标记, 如甲胎蛋白(AFP), 也表达成熟造血干细胞标记, 如 Thy-1、c-kit、CD34 及 Sca-1 等; 还表达胆管内皮细胞标记, 如 CK7、CK8、CK18、CK19、OV-6 和间隙连接蛋白 43(connexin 43) 等, 同时也表达神经上皮细胞的一些标记, 如神经细胞黏附分子(neural cell adhesion molecule, N-CAM) 等^[14, 15]。最近报道了新的标记物, 如 Foxl1、Trop2 等都在肝干细胞/卵圆细胞上有表达, 而在肝脏其他实质细胞上不表达^[16, 17]。还有报道称 δ 样蛋白/前脂肪细胞因子1(delta-like protein/preadipocyte factor 1, Dlk/Pref-1) 是很好的干细胞标记^[18]。而上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM) 也作为卵圆细胞的标记物而被很多研究者使用^[19]。然而, 从组织中分离纯化肝干细胞依然是制约肝干细胞研究的一个重大障碍: (1) 报道过的标记并不具有严格的肝干细胞特异性, 在其他的组织器官中也可能有表达; (2) 已知的标记中只有极少数是适合分离活性细胞的表面标记蛋白; (3) 静息的正常肝脏中干细胞数量极少, 如果要大量分离就需要对肝脏进行损伤; (4) 肝干细胞呈现出动态变化, 形态和表型与其分化程度相协调, 在不同的分化状态下, 所表达的特异性标记也有所不同^[19]。所以迄今为止还没有找到具有肝干细胞特异性、适用于分离和鉴定理想的表达标记。

3 肝干细胞的分化特性

目前, 关于肝干细胞的分化及其调控机制已有一些很初步的认识, 它们主要是通过基因剔除小鼠和肝干细胞的体外诱导分化与体内移植追踪等研究体系获得的。先后有人发现, 在 Foxa1 和 Foxa2 双基因剔除小鼠的胚胎中, 没有肝芽的发生; 在 Hnf1B 基因剔除小鼠中, 肝芽的形成明显异常, 其主要表现为腹侧肝内胚层形态发生的异常(增厚)与对 FGF 信号反应的破坏, 而且发现这种小鼠还可由于胆囊和肝内胆管异常引发严重黄疸; Hhex 基因剔除小鼠可表现为肝芽形成的缺陷和胚胎致死; Tbx3 基因的剔除可明显抑制成肝细胞增殖, 并促进胆向分化, 进而引起肝脏发育异常; Prox1 可诱导在毗邻内胚层器官高表达转录因子的下调, 提示它可能具有参

与肝向分化的命运决定的作用; Sal14 可直接激活 Oct4 和 Bmi1 的转录, 在肝干细胞分化的命运决定中可以抑制肝向分化而促进胆向分化。在体外诱导分化体系的研究中, 也发现了一些与肝干细胞分化及其调控的相关分子, 如 HNF4、Sal14、PPAR α 、HNF6 及 PDX1 等, 但尚未发现真正具有分化决定功能的调控分子。从已有的认识来看, 肝干细胞的分化及其调控是非常复杂的, 尽管目前已经有了一些关于肝脏的形态发生、最早出现的肝芽(liver bud)的分子标志(如 AFP), 以及影响早期肝脏发育的相关基因(都是来自于基因剔除小鼠的结论)方面的认识, 但尚不知道在肝脏发育过程中的肝干细胞的类型是仅有一种还是有多种, 也不清楚这些干细胞的维持都是处于同一分化等级、还是处于不同的分化等级, 更不知道对其分化调控基因的“板块”或网络的细节。所以, 阐明肝干细胞的分化及其调控机制是肝干细胞领域中的一个重要的任务。

4 肝干细胞生物医学前景

肝细胞移植治疗研究已经开展了十多年, 并在急性肝功能衰竭的救治和肝脏代谢性疾病的治疗等肝脏疾病的治疗中取得了一定程度的成功。然而, 通过这些研究也发现了一些制约其应用的关键性问题, 如: 肝细胞的植入率很低; 成熟的肝细胞在冻融过程中容易受损; 肝细胞移植在很多情况下疗效有限, 在急性肝衰竭等情况下, 肝细胞移植仅能暂时改善重症患者的代谢情况, 从而作为肝移植的桥梁。同时, 肝细胞来源的缺乏也严重制约了肝细胞移植治疗的应用。

而肝干细胞由于能持续产生肝细胞, 并且能产生胆管细胞并形成胆管系统, 从而在植入后能有更好的长效修复能力, 保持稳定的代谢能力, 因此在很大程度上, 肝干细胞比肝细胞具有更好的医学前景。尽管尚未达到临床应用的阶段, 但在动物模型中肝干细胞移植已经取得了一些进展。同时, 肝干细胞的诱导分化研究提示, 可以通过诱导, 控制其活化及分化方向和程度, 从而对疾病达到一定的治疗效果。在实验中通过诱导, 促进肝干细胞向胰向分化, 并产生了胰岛 β 细胞, 这给糖尿病的细胞治疗也带来了新的思路和希望^[20, 21]。

不仅如此, 肝干细胞向成熟肝实质细胞分化的分子信号调控机制, 以及信号转导通路等方面的研究, 也将为新的临床应用带来可能: 因为这些信息可能会有助于发展细胞靶向性的药物来刺激和控制

肝干细胞的增殖与分化的技术体系。然而,肝干细胞与其巢(niche)中其他细胞以及与胆管细胞等之间的相互作用和信号通路的分子基础等方面的细节还缺乏认识,所以更深入的研究工作还需继续进行。同时还需要注意,由于原发性肝细胞癌与卵圆细胞有共同的特异标记表达(如OV-6、OC-2及OC-3等),肝干细胞与肝细胞癌的关系等也需要更进一步地研究。

为了进行对肝组织干细胞的研究,已经建立了各种肝损伤模型,主要通过诱导胆管反应的动物模型来研究和分离成体肝干细胞。现在使用的引起胆管反应的方法主要有两大类:(1)通过药物抑制肝细胞分裂增殖(如双吡啶丙啉氧磷哌嗪[dipin]、烟曲霉素B1[fumonisinB1]、呋喃妥因[furan]、2-乙酰氟胺[2-acetylaminofluorene, 2-AAF]、倒千里光碱[retrosine, Rs]等),再进行肝损伤如肝切(partial hepatectomy, PH)或药物损伤(四氯化碳 carbon tetrachloride [CCl₄]、丙烯醇allyl alcohol [AA]等);(2)通过药物如1,4-二氢-3,5-吡啶二甲酸二乙酯(DDC)、左旋半乳糖胺(D-galactosamine, D-gal)、胆碱缺乏喂养并补充乙硫氨酸等,或手术如胆管结扎造成肝脏广泛的慢性损伤。利用这些动物模型,可以加深对肝干细胞生物学特性的认识,并可分离出肝干细胞,从而对其进行分子标记、分化潜能、分化调控,以及临床应用潜力等一系列的探索和研究。

肝干细胞的分离和体外培养对于肝干细胞治疗的研究具有重要意义,然而目前成功培养的肝干细胞系十分有限,而且主要来自大鼠。作者实验室曾报道了从小鼠成体肝中分离培养的肝干细胞系^[22],该细胞系表达AFP、白蛋白、CK18、CK19等肝系标志和Oct4、Nanog等干细胞标志,能够在体外长期稳定增殖,在特殊的诱导条件下可以分化为内胚层的成熟肝细胞(表达成熟肝细胞特有的白蛋白、 α 1抗胰蛋白酶等功能蛋白)和胰 β 细胞(在体外条件下可以表达胰岛素,而且对培养液中葡萄糖浓度的变化发生反应)^[20]。在活体移植实验中,我们所建立的肝干细胞系可以参与肝损伤的结构修复,成为肝板结构的组成部分,并能分化为成熟肝细胞。在此基础上,我们还对肝干细胞分化调控的分子机制进行了研究,通过基因芯片方法发现了一批分化相关基因,而且开始对其中几个候选的关键基因作进一步的机制研究^[23]。

当然,要将肝干细胞应用于临床实践还有很多障碍。首先,为了标记、分离并纯化肝干细胞,需要有更适合的肝干细胞特异性标记;同时,我们要弄清在静息状态下肝干细胞干性维持的原理和分子基础,信号分子之间以及与干细胞之间的相互作用,从而了解并调控其分化程度和方向;我们需要通过建立肝干细胞的遗传谱系,并找到很好的分化示踪方法,全面了解肝干细胞在某些病理状态下的动员、分化情况;更进一步,哪些因素控制移植的细胞植入肝脏并引导其正确的归巢(homing),哪些因素调控植入细胞的增殖与分化成为所需功能特定的表型,不同状态(如分化程度)的外源肝干细胞或其他细胞进行肝损伤修复的效率有何差别,以及差别产生的分子基础或原因,所有这些问题都还有待解决。我们也需要建立发展更为理想的再植模型,以评价肝干细胞的分化再殖效率,以及其用于肝脏疾病治疗的有效性,而且能为更深入的研究,甚至临床应用提供依据和标准。

随着肝干细胞生物学研究的发展,我们相信在不久的将来,肝干细胞一定能成为终末期慢性肝病、急性肝衰竭及肝脏代谢异常等肝脏疾病的治疗手段研究的一个重要的靶标。

[参 考 文 献]

- [1] Farber E. Similarities in the sequence of early histologic changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3-methyl-4-dimethylaminoazbenzene. *Cancer Res*, 1956, 16: 142-51
- [2] Wilson JW, Leduc EH. Roles of cholangioles in restoration of the liver of the mouse after dietary injury. *J Pathol Bacteriol*, 1958, 76(2): 441-9
- [3] Evarts RP, Nagy P, Marsden E, et al. A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. *Carcinogenesis*, 1987, 8(11): 1737-40
- [4] Zaret KS. Hepatocyte differentiation: from the endoderm and beyond. *Curr Opin Genet Dev*, 2001, 11: 568-74
- [5] Strick-Marchand H, Weiss MC. Inducible differentiation and morphogenesis of bipotential liver cell lines from wild-type mouse embryos. *Hepatology*, 2002, 36: 794-804
- [6] Tanimizu N, Miyajima. Notch signaling controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors. *J Cell Sci*, 2004, 117(15): 3165-74
- [7] Zaret KS, Grompe M. Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas. *Science*, 2008, 322(5907): 1490-4
- [8] Golding M, Sarraf CE, Lalani EN, et al. Oval cell differentiation into hepatocytes in the acetylaminofluorene-treated regenerating rat liver. *Hepatology*, 1995, 22: 1243-53
- [9] Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, et al. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and

- ductular reactions in human livers. *Hepatology*, 2004, 39(6): 1739-45
- [10] Jakubowski A, Ambrose C, Parr M, et al. TWEAK induces liver progenitor cell proliferation. *J Clin Invest*, 2005, 115: 2330-40
- [11] Apte U, Thompson MD, Cui S, et al. Wnt/ β -catenin signaling mediates oval cell response in rodents. *Hepatology*, 2008, 47: 288-95
- [12] Zaret KS. Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons for stem-cell differentiation. *Nat Rev Gene*, 2008, 9(5): 329-40
- [13] Suzuki A, Zheng YW, Kondo R, et al. Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver. *Hepatology*, 2000, 32: 1230-9
- [14] Hixson DC, Allison JP. Monoclonal antibodies recognizing oval cells induced in the liver of rats by N-2-fluorenylacetamide or ethionine in a choline-deficient diet. *Cancer Res*, 1985, 45: 3750-60
- [15] Shafritz DA, Oertel M, Menthen A, et al. Liver stem cells and prospects for liver reconstitution by transplanted cells. *Hepatology*, 2006, 43: S89-98
- [16] Sackett SD, Li ZD, Hurr R, et al. Foxl1 is a marker of bipotential hepatic progenitor cells in mice. *Hepatology*, 2009, 49(3): 920-9
- [17] Okabe M, Tsukahara Y, Tanaka M, et al. Potential hepatic stem cells reside in EpCAM⁺ cells of normal and injured mouse liver. *Development*, 2009, 136: 1951-60
- [18] Tanimizu N, Tsujimura T, Takahide K, et al. Expression of Dlk/Pref-1 defines a subpopulation in the oval cell compartment of rat liver. *Gene Expr Patterns*, 2004, 5: 209-18
- [19] Yovchev MI, Grozdanov PN, Joseph B, et al. Novel hepatic progenitor cell surface markers in the adult rat liver. *Hepatology*, 2007, 45: 139-49
- [20] Jin CX, Li WL, Xu F, et al. Conversion of immortal liver progenitor cells into pancreatic endocrine progenitor cells by persistent expression of Pdx 1. *J Cell Biochem*, 2008, 104(1): 224-36
- [21] Yang LJ, Li SW, Hatch HR, et al. *In vitro* trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(12): 8078-83
- [22] Li WL, Su J, Yao YC, et al. Isolation and characterization of bipotent liver progenitor cells from adult mouse. *Stem Cells*, 2006, 24(2): 322-32
- [23] Li WL, You P, Wei Q, et al. Hepatic differentiation and transcriptional profile of the mouse liver epithelial progenitor cells (LEPCs) under the induction of sodium butyrate. *Front Biosci*, 2007, 12: 1691-8