

骨髓源性肝干细胞的研究进展

钟晓琳, 李昌平

钟晓琳, 李昌平, 四川省泸州医学院附属医院消化内科
四川省泸州市 646000
四川省教育厅资助课题, No. 2003-A027
项目负责人: 李昌平, 646000, 四川省泸州市, 四川省泸州医学院附属医院
消化内科, lichangping88@hotmail.com
电话: 0830-2392753 传真: 0830-2392753
收稿日期: 2004-07-09 接受日期: 2004-08-25

摘要

骨髓干细胞的横向分化/转分化是近年来研究的热点, 骨髓源性肝干细胞是在一定条件下能向肝细胞横向分化/转分化的骨髓干细胞, 他的发现为肝病治疗带来了新的希望. 近年来对骨髓源性肝干细胞的分化机制、分化环境及条件、分离和培养的研究进一步深入, 使其在细胞移植、基因治疗等方面有广阔的前景. 现就骨髓源性肝干细胞的研究进展及其在临床治疗中应用前景综述如下.

钟晓琳, 李昌平. 骨髓源性肝干细胞的研究进展. 世界华人消化杂志 2004; 12(10):2435-2437
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2435.asp>

0 引言

干细胞是一种具有多向分化潜能和自我复制功能的早期未分化细胞, 其在医学领域应用是国内外研究的热点, 由于胚胎干细胞的应用存在伦理道德上的争议, 使得科研的方向转向了成体干细胞的研究. 骨髓干细胞是迄今研究最多、最易获得并已经用于临床治疗的成体干细胞之一. 骨髓干细胞在一定条件下能向肝细胞分化, 国内外对其分化的条件及其应用于肝病的治疗作了一些研究, 现综述如下.

1 骨髓源性肝干细胞的发现与证实

肝干细胞包括内源性和外源性肝干细胞. 卵圆形细胞 (oval cell, OC) 是内源性肝干细胞的主要成分, 在肝脏严重受损时, 能大量增生并分化为肝细胞和胆管上皮细胞, 但是这种细胞属于短期增生细胞, 其修复能力有一定限度, 对于慢性持续性刺激引起的肝损伤的价值不大, 自从 Petersen *et al*^[1] 提出了卵圆细胞可以由骨髓细胞分化而来的假设, 并用一系列骨髓移植和肝移植的研究以及激活卵圆细胞的方案研究证实了这一假设后, 骨髓作为外源性肝干细胞的来源备受关注.

Theise *et al*^[2] 将 δ 小鼠的骨髓移植到致死剂量 X 射线放射后的同系 ϕ 小鼠体内, 并在移植后通过荧光原位杂交 (FISH) 证明受体小鼠肝脏内存在即表达白蛋白也

表达 Y 染色体 *sry* 基因的供体来源细胞. 在人体, 也得出了相似的结论^[3]. 这些研究证实了肝脏中存在骨髓来源的肝样细胞. 但是, 仅根据形态学的研究并不能说明这种骨髓干细胞来源的肝样细胞是否是真正的肝实质细胞, 因此, 许多学者对骨髓细胞进行体外培养, 并检测其分化细胞的表面特异性标志物. Oh *et al*^[4] 最早将大量的肝细胞生长因子 (HGF) 的骨髓细胞在体外培养, 发现骨髓细胞可分化为表达白蛋白、AFP、CK8、CK18、c-Met 的一类细胞. Miyazaki *et al*^[5] 用加有 HGF、EGF 的 HGM 培养大鼠的骨髓细胞发现有肝细胞表型出现. Fiegel *et al*^[6] 用 CD34+Thy-1+ 骨髓细胞在体外培养表达白蛋白、CK19. 这些检测指标都具有肝系细胞特异性, 从而证实了骨髓干细胞向肝细胞的分化. 为明确骨髓干细胞转分化的肝细胞的功能, Lagasse *et al*^[7] 将正常小鼠骨髓干细胞移植到延胡索酰已酰乙酸羟化酶 (Fah) 基因缺陷 (即致死性遗传性高酪氨酸血症) 模型小鼠体内, 使得肝功能明显改善, 从而通过体内实验证实了由骨髓干细胞分化而来的肝细胞具有正常的功能.

2 骨髓源性肝干细胞的治疗前研究

2.1 骨髓源性肝干细胞分化机制 骨髓干细胞的转分化已经得到证实^[8-10], 但是要将他应用于临床治疗, 首先要明确骨髓干细胞是通过细胞裂解还是通过细胞融合实现其分化的. Schwartz *et al*^[11] 从人、大鼠、小鼠的骨髓中提取出 CD44⁺, CD45⁺, HLA⁻ I⁻, HLA⁻ II⁻, cKit⁻ 的干细胞, 命名为多能成体祖细胞 (MAPCs), 发现他能直接分化为肝细胞. Wang *et al*^[12] 通过异性不同基因型小鼠的移植, 移植后通过 Southern 印迹杂交测定各基因型的比例、FISH 染色检测其核型证明骨髓干细胞产生肝细胞不是通过直接分化, 而是通过与宿主肝细胞进行细胞融合实现的. Vassilopoulos *et al*^[13] 也证实了这一结论. 融合后的细胞是具有骨髓干细胞和肝细胞的遗传学标志的杂种细胞, 肝脏是这类杂种细胞适宜的生存环境, 但只有该环境中的肝细胞发生变性坏死时才能发挥作用, 同时, 实验中发现肝细胞的再生不是骨髓干细胞移植后就立即出现, 而是发生在移植后 2 mo, 提示参与细胞融合的供体细胞不是骨髓干细胞本身, 而是其分化的后代, 这恰好解释 MAPCs 可以不通过与肝细胞融合而直接产生各种成熟细胞, 因为他可能是已经与受体细胞发生融合后才进入血液的细胞. 这一机制的提出为骨髓干细胞体外培养、移植时机、移植方式及部位提出了新的研究方向.

2.2 骨髓源性肝干细胞转分化的环境及条件 干细胞具有多向分化潜能和可塑性,骨髓干细胞只有在肝脏中才能分化为肝细胞.过去研究认为,骨髓干细胞的迁徙和成熟并不限于严重肝损伤时,在轻度肝损伤甚至正常的肝脏更新过程中也存在,但是近来的研究发现骨髓干细胞只有在特定的病理微环境中才能发生转分化. McTaggart *et al*^[14]将绿色荧光蛋白(GFP)标记的骨髓干细胞移植给正常组和 CCl₄ 诱导的肝纤维化组小鼠,再与未行骨髓移植的 CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠进行对比研究,结果证实只有持续性肝损伤的微环境能有效诱导骨髓干细胞来源的正常肝细胞产生,而正常肝脏则不能.骨髓源性肝干细胞向成熟肝细胞分化是一个非常复杂的过程,需要多种细胞因子和体液因子的协同作用, HGF, SCF, IFN, EGF, IL-6, 胰岛素等细胞因子都有促进肝脏干细胞的增生和分化的作用^[5, 15-16], TGF- β 等则有负性调节作用^[17]. 此外,一些药物通过对这些因子的调节影响肝干细胞的分化.

2.3 骨髓源性肝干细胞的分离和培养 通过全骨髓移植的肝干细胞数量太少,不能达到有效的治疗效果.因此,骨髓源性肝干细胞的分离和培养是临床应用细胞替代治疗的基础.目前对于骨髓源性肝干细胞的分离多采用荧光激活细胞筛选法(FACS)、免疫磁珠分离法等,而这些方法都需要较高特异性的细胞膜表面标志.因此,大量学者在这方面做了研究: Theise *et al*^[12]在小鼠实验中发现移植 CD34+lin- 的骨髓亚系出现 Y 染色体阳性肝细胞的效率是全骨髓移植的 100 倍. Fiegel *et al*^[6]在体外培养中发现 CD34+ 骨髓干细胞能表达 CK19、白蛋白等肝细胞特异性标志. Avital *et al*^[18]在人及鼠的骨髓中都证实了 β_{2m} -Thy+ 细胞在体内外均可分化为具有肝细胞表型和功能的细胞. Danet *et al*^[19]又认为 Lin-CD45+CD38-CD34+/- 细胞中表达的 C1qR_p 标志的可以作为从骨髓细胞中选择具有肝细胞分化潜能细胞的阳性标志. 以上众多研究表明,造血干细胞具有横向分化潜能.而 Fang *et al*^[20]发现 FLK1+ 间质干细胞可诱导自体肝组织再生,且前述 Schwartz *et al*^[11]发现的 MAPCs 也是一种基质干细胞.可见,骨髓中不同表型的造血干细胞和基质干细胞均可转化为肝细胞,究竟哪一种骨髓干细胞最具有治疗潜能至今都没有统一的认识.为此,又有学者设想在体外全骨髓细胞的培养体系中模拟体内肝脏损伤的病理微环境,提供特异的肝干细胞增生信号,使其中的肝干细胞选择性地扩增,从而避免亚群分选所造成的肝干细胞资源的损失.蔡云峰 *et al*^[21]就采用含淤胆血清的病理条件培养基培养全骨髓细胞,结果发现,在筛选培养的第 1-3 d,大部分细胞脱落凋亡,仅少量残留细胞呈克隆样生长,在 4 d 适时加入肝细胞生长因子,这些细胞快速增生,2 wk 时出现大量肝细胞样集落形成单位(H-CFU),并证实 H-CFU 即为肝干细胞集落.可见适宜的病理微环境能够提供骨髓源性肝干细胞选择性增生的信号,同时“删除”骨髓中的非肝干细胞,从

而达到纯化肝干细胞的效果.这不仅为骨髓源性肝干细胞的分离与纯化提供了一条新的有效途径,而且为解决临床肝细胞替代治疗的种子细胞来源问题提供了新思路.

3 骨髓干细胞移植在肝病治疗中的应用前景

骨髓干细胞移植在肝病的治疗作用,已有部分报道. Kumar *et al*^[22]报道,1 例 AL 淀粉样变患者在肝移植后复发,并出现肝功能衰竭,之后的肝干细胞移植使病情得以控制. Lagasse *et al*^[7]利用正常小鼠骨髓干细胞治疗 Fah 基因缺陷小鼠,使受体小鼠产生供体源造血和肝细胞的再生,肝脏的生化功能得以恢复.同时,其对现在尚无确切治疗方法的终末期肝病如肝纤维化、肝癌等也有良好的治疗前景.

3.1 肝纤维化的治疗 McTaggart *et al*^[14]发现肝纤维化的环境是骨髓干细胞适宜的分化环境,使通过骨髓干细胞移植治疗肝纤维化成为可能. Yasukane *et al* 又通过骨髓干细胞移植到小鼠肝纤维化模型证实骨髓干细胞移植能明显的减轻肝纤维化.其可能的机制为:一方面,骨髓源性肝干细胞具有强大的增生分裂能力,能够在肝纤维化的环境中转分化为肝实质细胞,补充肝纤维化时减少的肝细胞.另一方面,骨髓干细胞移植还很好地解决了肝再生时 ECM 的堆积造成的肝纤维化加重的问题.展玉涛 *et al*^[23]通过移植 Thy+CD3-CD45RA- 的骨髓干细胞到 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化模型未发现体外标记的骨髓干细胞在肝纤维化形成的肝脏中表达肌成纤维样细胞的检测标志 α -SMA,结果提示移植的骨髓干细胞在肝纤维化形成过程中不分为肌成纤维样细胞,避免了 ECM 堆积,逆转肝纤维化的进程.可见,利用自体骨髓干细胞进行移植,可以避免用肝移植造成的供体的紧缺、移植后免疫排斥反应、来源于供体的病毒感染、高额的治疗费用限制.同时他有强大的分化潜能,提供良好的细胞来源,是治疗肝纤维化最有前景的治疗方法.此外,骨髓源性肝干细胞是转基因治疗较为理想的靶细胞^[24],导入了抗纤维化、抗病毒基因^[25-27]的自体骨髓源性肝干细胞既可以避免免疫排斥反应,又有增生潜能,在补充正常的肝细胞的同时发挥其抗纤维化、抗病毒等作用,具有较好的应用前景.

3.2 肝癌的病因研究与治疗 在肝脏再生过程中,由肝脏干细胞增生分化而成的上皮细胞,他们的寿命很长,存在于从癌细胞最初形成到其发展为肝癌的全过程,因此极有可能就是致癌的靶目标.目前原发性肝癌的细胞起源学说认为他由肝卵圆细胞成熟受阻、异常分化而来,其间有多个癌基因和(或)抑癌基因共同调控使肝卵圆细胞向肝癌细胞转化^[28].对骨髓源性肝干细胞的分化研究有助于我们明确肝癌的病因.骨髓源性肝干细胞对肝癌的治疗不仅在于可以提供肝细胞的来源,也可以通过基因导入技术,导入抑癌基因、抗肿瘤的的生长因子等进行基因治疗.是临床细胞移植最佳的细胞来源,在

未来, 利用骨髓源性肝干细胞制造出供移植使用的肝脏也是有可能的。

总之, 骨髓源性肝干细胞在肝脏疾病治疗中有广阔的应用前景, 但是, 要将其应用于临床仍然存在很多问题, (1)骨髓源性肝干细胞的提纯是通过继续寻找特异性表面标志, 还是通过在体外病理微环境中培养, 使其选择性扩增更好; (2)进行体外培养及诱导分化时, 培养基质的组成、接种的细胞密度、加入的生长因子种类及培养时间长短都还不确切; (3)移植的时机、方式、部位的选择; (4)进行移植治疗时, 对移植细胞生长的调控等。因此, 对骨髓源性肝干细胞的研究还需要进一步深入。

4 参考文献

- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284:1168-1170
- Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000;31:235-240
- Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000;32:11-16
- Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsuji T, Shima N, Higashio K, Namba M. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:500-504
- Miyazaki M, Akiyama I, Sakaguchi M, Nakashima E, Okada M, Kataoka K, Huh NH. Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298:24-30
- Fiegel HC, Lioznov MV, Cortes-Dericks L, Lange C, Kluth D, Fehse B, Zander AR. Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 2003;21:98-104
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000;6:1229-1234
- Almeida-Porada G, Porada CD, Tran N, Zanjani ED. Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation. *Blood* 2000;95:3620-3627
- Davies JC, Potter M, Bush A, Rosenthal M, Geddes DM, Alton EW. Bone marrow stem cells do not repopulate the healthy upper respiratory tract. *Pediatr Pulmonol* 2002;34:251-256
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279:1528-1530
- Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cell from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002;109:1291-1302
- Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003;422:897-901
- Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003;422:901-904
- McTaggart RA, Feng S. An uncomfortable silence em leader while we all search for a better reporter gene in adult stem cell biology. *Hepatology* 2004;39:1143-1146
- Okumoto K, Saito T, Hattori E, Ito JI, Adachi T, Takeda T, Sugahara K, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S. Differentiation of bone marrow cells into cells that express liver-specific genes in vitro: implication of the Notch signals in differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304:691-695
- Li CY, Baek JY. Mastocytosis and fibrosis: role of cytokines. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;127:123-126
- 刘芳, 刘金星. 转化生长因子 β_1 在肝纤维化中的作用. 世界华人消化杂志 2000;8:86-88
- Avital I, Inderbitzin D, Aoki T, Tyan DB, Cohen AH, Ferraresso C, Rozga J, Arnaout WS, Demetriou AA. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:156-164
- Danet GH, Luongo JL, Butler G, Lu MM, Tenner AJ, Simon MC, Bonnet DA. ClqRp defines a new human stem cell population with hematopoietic and hepatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:10441-10445
- Fang B, Shi M, Liao L, Yang S, Liu Y, Zhao RC. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation* 2004;78:83-88
- 蔡云峰, 闵军, 何劲松, 魏菁, 莫隽全, 陈积圣. 骨髓源性肝干细胞的确认及定向分化的实验研究. 中国普通外科杂志 2003;12:287-290
- Kumar KS, Lefkowitz J, Russo MW, Hesdorffer C, Kinkhabwala M, Kapur S, Emond JC, Brown RS Jr. Successful sequential liver and stem cell transplantation for hepatic failure due to primary AL amyloidosis. *Gastroenterology* 2002;122:2026-2031
- 展玉涛, 魏来, 陈红松, 丛旭, 费然, 王宇. 骨髓干细胞在大鼠肝纤维化形成环境中的分化. 中华肝脏病杂志 2003;11:673-675
- Elwood NJ, Smith CA. Current status of retroviral vector mediated gene transfer into human hematopoietic stem cells. *Leuk Lymphoma* 2001;41:1-18
- Iimuro Y, Fujimoto J. Strategy of gene therapy for liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003;10:45-47
- Song E, Chen J, Wang K, Zhang H, Su F, Wang M, Heemann U. Intrasplenic transplantation of syngenic hepatocytes modified by IFN-gamma gene ameliorates hepatic fibrosis in rats. *Transpl Int* 2002;15:472-478
- Abriss B, Hollweg G, Gressner AM, Weiskirchen R. Adenoviral-mediated transfer of p53 or retinoblastoma protein blocks cell proliferation and induces apoptosis in culture-activated hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2003;38:169-178
- 马俊勋, 方驰华. 卵圆细胞及其与原发性肝癌关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2002;10:448-451