

# 骨髓造血干细胞与肝再生的相关性研究

王鹤桦, 潘兴华, 庞荣清, 高士争

王鹤桦, 庞荣清, 高士争, 成都军区昆明总医院医学实验科  
云南省昆明市 650032  
潘兴华, 中山大学医学实验动物中心 广东省广州市 510089  
国家自然科学基金资助项目, No. 30270674  
云南省自然科学基金重点资助项目, No. 2003C013Z  
中国博士后基金资助项目, No. 200334431  
项目负责人: 潘兴华, 650032, 云南省昆明市, 成都军区昆明总医院医学实验科, xinghuapan@yahoo.com.cn  
电话: 0871-5413564 传真: 0871-4074773  
收稿日期: 2004-09-18 接受日期: 2004-09-30

## 摘要

感染、中毒等引起的急慢性肝损伤治疗是临床医学领域的世界性难题, 干细胞的研究为肝再生提供了全新的思路. 肝再生的细胞学机制涉及肝细胞、肝干细胞和骨髓干细胞等. 新近发现骨髓造血干细胞具有向肝细胞转化的潜能, 可以在体内外被诱导分化为肝样细胞, 移植到肝损伤动物体内可以修复肝组织损伤, 这为肝再生研究开辟了新的途径. 对骨髓造血干细胞参与肝细胞再生的深入研究, 有可能找到肝损伤治疗的有效措施.

王鹤桦, 潘兴华, 庞荣清, 高士争. 骨髓造血干细胞与肝再生的相关性研究. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2842-2844  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2842.asp>

## 0 引言

近年来, 有关干细胞(stem cells, SC)的研究是生物学上最有趣、最复杂、也最有吸引力的领域之一, 几乎涉及了所有的生命科学和生物医药领域. 肝脏疾病是危害人类健康的一类重要疾病, 全球有庞大的肝病人, 其中绝大多数未能得到有效治疗. 肝脏移植术由于供肝匮乏, 免疫排斥及费用昂贵等问题, 一直未能广泛应用. 如何促进肝细胞(liver cells)再生, 寻找有功能的肝细胞来源是亟需解决的医学问题, 而干细胞研究的进展为利用干细胞移植和不同来源干细胞向肝系细胞转化来治疗各种肝病提供了可能性<sup>[1]</sup>. 本文就骨髓造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSC)的生物学特性、肝脏再生及其机制、骨髓 HSC 与肝再生的联系及在肝病治疗中的应用作一综述.

## 1 骨髓 HSC 的生物学特性

SC 是具有自我更新、高度增生和多向分化潜能的细胞群体, 特定条件下可以分化为不同的功能细胞, 形成多种组织和器官<sup>[2]</sup>. 根据其发育阶段, SC 可分为胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)和成体干细胞(adult stem cells, ASC). 按分化潜能的大小, SC 可被分为三种类

型, 全能干细胞(totipotent stem cells)、多能干细胞(multipotent stem cells)和单能干细胞(monopotent stem cells). 这些干细胞在基础研究和临床应用中均具有重要价值, 但人类胚胎在研究中的应用一直倍受争议, 而 ASC 的受重视程度日益增加. 骨髓 HSC 是研究和临床应用最早的 ASC, 由于其具有可塑性即分化为其他类型组织的能力而成为近年来研究的热点, 且由于他来源丰富, 取材相对容易, 可来源于自身, 避免免疫排斥反应, 实现个体化治疗以及无伦理、法律问题而具有广阔的应用前景. 其可塑性不但为组织器官损伤的修复提供了新思路, 而且使其成为一种理想的基因治疗的载体细胞, 并有可能成为干细胞工程用来克隆器官的一种新型“种子”细胞.

骨髓 HSC 与其他多能干细胞相比, 还有一些不同的生物学特性<sup>[2]</sup>: 首先, 在个体发育过程中, HSC 历经多次迁移, 先由卵黄囊转移到胎肝, 再到达骨髓, 在其后的某些条件下又可出现髓外造血的情况, 而其他多能干细胞多在固定的场所发育成特定的组织; 其次, 由于生理需要, HSC 始终处于较为活跃的增生与分化状态, 能从骨髓源源不断地进入外周血而到达全身各处, 而成熟个体中的多能干细胞多局限于相应的组织器官中, 一般情况下处于类似休眠的状态.

随着干细胞技术的发展以及干细胞本身所具有的特性, 使得人类有可能在体外培养某些干细胞, 定向诱导分化为我们所需要的各种组织细胞以供临床所需, 使人类能够实现用干细胞进行治疗疾病和完美替代损伤组织器官的梦想.

## 2 肝脏再生及其生物学机制

肝脏含有多种类型的细胞, 如肝细胞、胆管上皮细胞、肝巨噬细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞等. 这些细胞不同程度地参与了肝的消化、代谢、分泌胆汁、合成血浆蛋白、解毒等功能.

正常肝细胞的分裂相是极少见的, 但是在肝脏损伤后(如肝部分切除、化学性或病毒性损伤), 尤其在肝部分切除术后, 残余肝细胞迅速出现快速活跃的分裂增生, 直至肝脏恢复正常体积和功能. 如在大鼠 3/4 肝脏切除术模型中, 术后 5-7 d 即恢复原有肝脏的重量、体积以及肝细胞数量. 肝脏如此惊人的再生潜能使得几十年前就有学者提出可能有肝脏干细胞的存在. 目前已经发现不止一种干细胞参与肝脏再生, 他们的来源与性状各不相同, 但是最终均可分化成为成熟的肝细

胞和/或胆管上皮细胞。

人们通常认为肝再生的细胞学机制涉及肝细胞、肝干细胞和骨髓干细胞等。其中肝干细胞包括卵圆细胞和小肝细胞<sup>[5]</sup>。卵圆细胞是肝脏中一种卵圆形的小的非实质细胞, 位于胆管系统的最小分支处, 鼠科动物的卵圆细胞沿较小的小叶间胆管和 Hering 管呈放射分布, 并且延伸至界板之上, 而在人类肝脏中, 卵圆细胞沿毛细胆管和 Hering 管分布, 可以扩展至最邻近的第三个小叶<sup>[4]</sup>, 卵圆细胞在体外可克隆化生长, 并且有分化为肝细胞、胆管上皮细胞、胰岛素分泌细胞和肠上皮细胞等的潜能<sup>[5]</sup>。小肝细胞的体积较小、形态类似肝细胞, 位于汇管区周围, 在体外具有很强的克隆扩增能力, 可表达成熟肝细胞及胆管上皮细胞的一些标志。

正常组织更新中的肝脏再生是靠原位肝细胞自身的分裂来介导的<sup>[2]</sup>; 在肝脏轻度受损如部分肝组织切除或轻度感染、物理化学损伤时, 在多种生长因子和转录因子参与调控下, 成熟肝细胞的生长激活, 经过1-2次有丝分裂, 或通过自身肥大的方式, 使肝脏体积与功能得以恢复<sup>[6]</sup>; 当肝脏损伤十分严重如大部分肝组织切除、严重肝坏死等, 或者由于某种原因如肝毒性物质等的作用阻止肝细胞活化进入分裂周期时, 肝细胞的再生则需要动员肝干细胞, 激活肝干细胞如卵圆细胞并增生, 进一步分化为肝细胞和胆管细胞, 从而达到再生肝脏组织结构和功能的目的, 且卵圆细胞的数量随肝脏受损伤严重程度的增加而增加<sup>[7]</sup>, 在这一过程中, 有肝外循环的造血干细胞进入门脉区域而后经卵圆细胞和胆管细胞进一步分化为肝细胞<sup>[8]</sup>。骨髓HSC也可能直接进入肝组织, 并被肝组织的特殊微环境诱导分化为肝细胞。在某些特殊情况下, 小肝细胞也动员和参与肝细胞再生, 比如在肝组织切除2/3并用一种肝特异的长效DNA合成抑制剂-Retorsine抑制成熟肝细胞、肝卵圆细胞生长的情况下, 发现小肝细胞在肝板内大量增生, 且这类细胞不受Retorsine的生长抑制影响<sup>[9]</sup>。

因此, 干细胞参与肝脏损伤的修复可能存在两种方式: 一是肝脏内固有的干细胞参与修复; 二是肝脏损伤动员骨髓释放HSC, 后者通过血液循环到达肝脏, 在特定的环境下增生、分化, 最终转化成为肝细胞, 以完成结构和功能的重建。

### 3 骨髓HSC与肝再生的联系及其在肝病治疗中的应用

最早研究骨髓HSC向肝细胞转分化的学者是Peterson。由于肝卵圆细胞表达HSC的标志物, 如CD34、Thy-1、c-kit mRNA及其蛋白、flt-3受体mRNA等, 因此Peterson *et al*<sup>[8]</sup>猜想卵圆细胞及其他肝细胞来源于骨髓或至少与骨髓有相关性, 并用两个著名的实验来证明他的观点: (1)骨髓移植实验: 将雄性大鼠的骨髓移植入经致死剂量放射线照射的雌性大鼠体内, 将DPPIV<sup>+</sup>的雄性大鼠的骨髓移植入同系DPPIV<sup>-</sup>的♀大鼠体内, 分别用Y染色体原位杂交和DPPIV组织化学染色方法

检测受体肝脏, 结果发现, 移植后第13 d分别有0.14%和0.16%肝细胞Y染色体及DPPIV<sup>+</sup>, 提示有 $9.9 \times 10^5$ 和 $1.0 \times 10^6$ 个肝细胞源于移植骨髓细胞, 二者的骨髓源性肝细胞在绝对数和比例上均十分接近; (2)肝移植与肝再生实验: 将表达L21-6抗原的Lewis大鼠作为受体, 不表达该抗原的同种异体Brown-Norway大鼠作为供体进行全肝移植, 检测移植后肝脏中L21-6抗原的表达, 结果肝外来源的L21-6<sup>+</sup>细胞可以在移植肝中找到。在实验前, 均以CCl<sub>4</sub>和2-AAF诱导药物性肝损害, 并阻断成熟肝细胞增生, 从而诱导卵圆细胞的增生。经实验发现, 部分再生的卵圆细胞及肝细胞来源于骨髓HSC。

Petersen的发现在其他学者的一些研究中被进一步证实。2000年Theise *et al*<sup>[10]</sup>在小鼠骨髓移植中发现, 转化肝细胞主要源于CD34<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup>骨髓HSC。Lagasse *et al*<sup>[11]</sup> (2000年)用正常成年小鼠骨髓细胞移植治疗模型小鼠I型酪氨酸蛋白血症, 观察模型小鼠的生长状况及其肝脏生化功能恢复情况, 另一组仅用纯化的HSC(c-kit<sup>high</sup>Thy<sup>low</sup>Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>)进行移植, 观察其疗效。结果发现, 正是骨髓中的HSC在体内转分化为肝细胞, 使小鼠产生供体源造血和肝细胞的再生, 使受体小鼠肝脏的生化功能得以恢复。

为了研究HSC在肝脏病理生理状态下是否能在肝脏再生过程中起重要作用, 也就是说, HSC是否能分化为肝细胞并且这种肝细胞能否扩增达到治疗意义, Mallet *et al*<sup>[12]</sup>利用转移人类Bcl-2基因小鼠模型进行了对比实验, 并发现在生理情况下, 小鼠骨髓HSC分化为肝细胞的频率低于1/10<sup>7</sup>, 但在不断的肝细胞损伤的情况下, 大约有不到1/100的骨髓来源干细胞分化为肝细胞, 且这部分肝细胞可以扩增到肝细胞总数的80%, 这一研究进一步为利用HSC治疗各种严重肝损害提供了可行性的实验依据。

动物实验的结论一致认为, 在有或无严重肝脏损害的条件下, 骨髓中的HSC均可以分化产生肝细胞/卵圆细胞, 参与肝脏的再生, 且此类细胞具有成熟肝细胞功能, 甚至可以缓解先天遗传缺陷所致的肝脏代谢疾病<sup>[13]</sup>。那么, 人类骨髓HSC是否也有此能力呢?

在临床研究中, 有多例报道关于性别错配的骨髓移植与肝移植的检测结果, 其中骨髓移植供体为男性受体为女性, 肝移植则相反, 结果所有患者肝组织均见Y染色体阳性肝细胞。实验表明, 人和动物一样, 在一定条件下, HSC能分化为肝细胞。

从动物实验到人体的病理标本研究均表明, 骨髓HSC可以分化为肝细胞, 但由于这些实验均为间接检测, 受到诸多条件的制约, 实验可能存在较大的误差, 为了进一步证实这一可能性并进一步研究HSC定向分化为肝细胞的条件, Avital *et al*<sup>[14]</sup>通过两步磁式分离的方法从人和大鼠的骨髓中分离出β2m<sup>+</sup>Thy-1<sup>+</sup>的细胞, 发现这种细胞能持续表达肝脏特异性基因和功能, 从

大鼠门静脉注入这种细胞,发现这种细胞和肝板结合并分化成为成熟的肝细胞,用肝细胞生长因子 HGF 和淤胆血清进行体外培养(一种模拟肝再生的培养体系),可以扩增并分化为肝细胞,且这种细胞具有代谢  $\text{NH}_3$  等功能,免疫组化检测出他们表达白蛋白、c/EBP $\alpha$  等肝脏特异性表面标志.这些证据说明骨髓中的  $\beta 2\text{m}^+ \text{Thy-1}^+ \text{HSC}$  在体内外均可分化为具有肝细胞表型和功能的细胞. Jang *et al*<sup>[15]</sup>报道,把来自雄性小鼠的 HSC 与 CCL<sub>4</sub> 损伤的雌性小鼠的肝组织共培养,其中 HSC 置于培养盒的上层,损伤的肝组织置于培养盒的下层,上下层由一层孔径为 0.4  $\mu\text{m}$  的隔膜隔开,经性染色体原位杂交、RT-PCR 检测及免疫组化方法证实, HSC 可转化为肝细胞;把 HSC 移植给肝损伤的小鼠,观察到 HSC 转化为肝细胞的数量随肝脏受损伤严重程度的增加而增加.

2001 年 Theise *et al*<sup>[16]</sup>分离纯化非常原始且数量极少的 HSC 亚群,移植至小鼠体内,发现其可分化为十余种组织细胞. 2002 年, Korbiling *et al*<sup>[17]</sup>报道,在性别错配的骨髓移植患者的肝脏、皮肤、肠上皮等多种组织中均发现来源于供体的组织细胞.表明骨髓干细胞具有强大的多向分化潜能. Theise 认为, HSC 在体内的横向分化需要一个微环境,如分化为肝细胞则需要一个肝损伤与肝再生的微环境刺激,才会引起相应的干细胞应答.

总之,多项研究证实:骨髓中确实存在能分化为肝细胞的干细胞,直接将其移植到肝脏,在肝脏微环境调节下可分化为肝细胞;将骨髓干细胞作为肝细胞移植的细胞来源有重要的临床意义,从患者体内分离获取骨髓 HSC 比获取肝干细胞相对要容易得多<sup>[4]</sup>,而且具有免疫耐受性,不必进行免疫抑制.

#### 4 应用前景及存在的问题

目前的动物实验、人类骨髓移植和肝移植研究及干细胞体外培养结果均提示 HSC 是肝细胞来源之一,表明 HSC 可用于肝损伤的修复. HSC 的潜在应用范围有: (1)利用 HSC 在一定条件下能在体内分化为有功能肝细胞,用以治疗急/慢性肝衰竭; (2)通过体外扩增和诱导 HSC 分化为肝细胞,获得用于人工肝的肝细胞来源; (3)用修饰过基因的 HSC 进行移植,如先天性单基因缺损的疾病、糖尿病、高血压病、自身免疫病和恶性肿瘤的基因治疗都可以用 HSC 做宿主细胞,在患者体内长期表达所转导的治疗基因.然而,目前的研究仍存在许多问题: (1)虽已明确肝细胞的再生途径并非单一,但其具体途径仍不完全清楚; (2)HSC 向肝细胞分化的过程受到哪些体内外条件的调控,其分子机制有待进一步研究; (3)肝干细胞和骨髓 HSC 之间的关系如何,肝损伤一旦发生,二者如何协调进行增生和代偿; (4)既然大块或亚大块肝坏死时已有肝干细胞再生,为何常常未能

实现再生; (5)同样存在肝干细胞,为何会发生肝再生、纤维化或/和癌变等截然不同的转归; (6)肝损伤类型很多,不同因素所激发的肝再生中肝干细胞增生及演变的差异尚不清楚; (7)骨髓 HSC 用于肝细胞移植具有广阔的前景,但移植后细胞功能如何,是否达到完全意义上的转化尚需进一步研究.

如何促进干细胞向肝细胞完全意义上的转化,以便更有效改善病变肝组织的结构和功能将成为今后相关研究的重点,这具有不可估量的医学价值.

#### 5 参考文献

- 1 孙嫣,段芳龄.不同来源干细胞向肝系细胞转化的研究进展及应用前景.胃肠病学和肝病杂志 2003;12:1-4
- 2 裴雪涛.干细胞生物学.第1版.北京:科学出版社,2003:3-60
- 3 潘兴华,陈系古,庞荣清,靳杭红.肝干细胞与肝再生、肝癌的关系.世界华人杂志 2004;12:1925-1927
- 4 刘天会,贾继东,阎钟钰.肝脏干细胞研究进展与治疗前景.临床和实验医学杂志 2002;1:166-169
- 5 Vessey CJ, De la Hall PM. Hepatic stem cells: a review. *Pathology* 2001;33:130-141
- 6 闵军.肝干细胞的研究进展及其应用前景.广州:广东省人体生物组织工程 2003:81-91
- 7 Baumann U, Crosby HA, Ramani P, Kelly DA, Strain AJ. Expression of the stem cell factor receptor c-kit in normal and diseased pediatric liver: identification of a human hepatic progenitor cell? *Hepatology* 1999;30:112-117
- 8 Peterson 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
- 9 Gordon GJ, Coleman WB, Grisham JW. Temporal analysis of hepatocyte differentiation by small hepatocyte-like progenitor cells during liver regeneration in retrorsine-exposed rats. *Am J Pathol* 2000;157:771-786
- 10 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
- 11 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
- 12 Mallet VO, Mitchell C, Mezey E, Fabre M, Guidotti JE, Renia L, Coulombel L, Kahn A, Gilgenkrantz H. Bone marrow transplantation in mice leads to a minor population of hepatocytes that can be selectively amplified in vivo. *Hepatology* 2002;35: 799-804
- 13 张旻,唐晓鹏,杨旭.造血干细胞-肝病治疗新希望.国外医学·流行病学传染病学分册 2003;30:91-93
- 14 Avital I, Inderbitzin D, Aoki T, Tyan DB, Cohen AH, Ferraresso C, Rozga J, Arnaout WS, Demetris AA. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288:156-164
- 15 Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nature Cell Biol* 2004;6:532-539
- 16 Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001;105:367-377
- 17 Korbiling M, Katz RL, Khanna A, Ruifrok AC, Rondon G, Albitar M, Champlin RE, Estrov Z. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 2002;346:738-746