

肝干细胞与肝再生、肝癌的关系

潘兴华, 陈系古, 庞荣清, 靳杭红

潘兴华, 庞荣清, 靳杭红, 成都军区昆明总医院医学实验科 云南省昆明市 650032

潘兴华, 陈系古, 中山大学实验动物中心 广东省广州市 510089

国家自然科学基金资助课题, No. 30270674

中国博士后基金资助课题, No. 2003033433

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: 2003-12-12 接受日期: 2004-02-01

摘要

肝干细胞是存在于肝脏组织中的一类具有自我更新和向前分化为成熟肝细胞、胆管细胞等的不成熟细胞, 这类细胞是生理性肝细胞更新和病理性肝损伤修复的起源细胞. 肝癌是人类常见的恶性肿瘤, 传统认为肝癌起源于肝细胞突变和异常增生, 新近研究提示, 肝癌起源于肝干细胞的异常分化和增生. 肝癌干细胞学说为肝癌发生机制研究和肝癌防治开辟了全新的思路.

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. 世界华人消化杂志 2004;12(8):1925-1927

http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1925.asp

0 引言

肝癌是最常见恶性肿瘤之一, 到目前为止, 肝癌发生的细胞学机制仍不十分清楚. 近几年, 成人干细胞的研究提示肝癌的发生与干细胞密切相关, 肝癌可能起源于肝组织中的干细胞, 因为肿瘤细胞与干细胞在生物学特性上有相似性, 肿瘤细胞具有异质性, 只有少数肿瘤细胞具有克隆扩增和无限增生能力^[1-2]. 若肝癌起源于干细胞这一学说得到证实, 将改变人们对肝癌发生机制的认识, 极大地促进肝癌相关研究进展, 有可能在起源细胞水平找到彻底治愈肝癌的措施.

1 肝干细胞生物学特性

1937 年, Kinoshita 首次提出肝脏中存在可分化为肝细胞的干细胞样细胞, 但成人肝脏中是否存在肝干细胞 (hepatic stem cell, HSC) 一直未被证实. 近几年, 科学家在多种组织中找到干细胞并对其生长调控和分化潜能有了新的认识, 并从啮齿类动物肝脏研究中得到了确切的证据, 肝干细胞的存在及其在肝细胞更新中的作用才被大多数学者接受^[3]. HSC 是存在于肝组织中具有自我更新和分化为肝细胞、胆管上皮细胞等多种细胞的不成熟细胞. 其生理功能是在生理条件下, 负责更新衰老死亡的肝组织细胞, 维持肝脏结构和功能的完整性; 在病理条件下, 如肝组织缺损、肝细胞坏死等, 肝

干细胞的功能可增生和分化, 修复肝组织.

肝组织中存在两种类型的干细胞, 即小肝细胞 (small hepatocyte-like progenitor cell, SHPCs) 和卵圆细胞 (hepatic oval cell, HOC). 小肝细胞的特点是体积小 (约 16-28 μm)、形态类似肝细胞, 在体外具有强大的克隆扩增能力, 单个克隆在 10 d 左右可扩增 100 倍. SHPCs 具有分化为肝细胞和胆管上皮细胞的双向潜能, 这类细胞表达成熟肝细胞的一些标志, 如白蛋白、CK8、CK18 和转铁蛋白等, 但不表达胆管上皮细胞标志, 如 CK7、CK19 和 BD1, 但体外进一步分化后可终止表达肝细胞抗原, 转而表达胆管上皮细胞标志^[4]. 研究发现, 这类细胞具有成肝细胞、卵圆细胞和成熟肝细胞的部分表型, 推测小肝细胞可能是肝细胞的专能定向祖细胞 (unipotential committed progenitor)^[5]. HOC 是一类分布于小叶胆管与 hering 之间, 表达部分肝细胞、胆管上皮细胞和造血干细胞标志的不成熟细胞. 其特点是: 呈卵圆形、核大而胞质少、细胞体积小、且具有特殊的表面标志, 如肝细胞标志 HepPar1、白蛋白和 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶; 胆管标志 (cytokeratins) CK1、CK8、CK18、CK19 和 HEA2 125; 神经内分泌标志嗜铬粒蛋白 2A、甲状腺激素相关肽等及造血干细胞标志 CD34、c-kit、Thy-1、Flt-3R 等 (见表 1). HOC 可在体外克隆化生长, 并具有分化为肝细胞和胆管上皮细胞的双向潜能. 新近还发现可转化为胰岛分泌细胞和肠上皮细胞等内胚层组织细胞, 表明 HOC 是一种多能干细胞^[4].

表 1 几种肝细胞的表型特征

| 标志物 | 成肝细胞 | 卵圆细胞 | 小肝细胞 | 肝实质细胞 | 胆管上皮细胞 |
|----------------|------|------|------|-------|--------|
| ALB | + | +/- | + | + | - |
| AFP | + | + | +/- | - | - |
| CK7 | - | + | - | - | + |
| CK8 | + | + | + | + | + |
| CK18 | + | + | + | + | + |
| CK19 | + | + | - | - | + |
| CK14 | +/- | +/- | - | - | - |
| GGT | + | + | - | - | + |
| $\alpha 1$ -AT | - | - | - | + | - |
| OV6 | +/- | + | - | - | + |
| BD1 | - | - | - | - | + |
| OC2 | + | + | +/- | - | + |
| OC3 | - | + | - | - | - |
| Vimentin | - | + | - | - | + |

2 肝干细胞与肝细胞再生

肝脏的再生能力极强,部分肝组织切除可以激活肝细胞再生.传统认为,肝细胞再生是成熟干细胞增生的结果,但新近研究证实,在严重肝损伤时,肝组织修复需要肝干细胞的参与.早在1985年Zajick就提出肝流动学说(streaming liver concept),认为肝板象轨道,肝细胞从门静脉产生并沿着肝板自门静脉周围向小叶中央迁移,在此发挥功能后凋亡.卵圆细胞、造血干细胞向肝细胞分化等现代干细胞理论支持这一学说.

在正常成年肝细胞更新过程中,主要有低水平、基础状态的肝干细胞分化,肝外循环的造血干细胞可直接分散地插入肝实质中分化为肝细胞/胆管细胞,但肝脏组织中的干细胞是肝再生的主要种子细胞^[6-7].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,胆管上皮细胞和肝窦细胞延迟性增生,肝脏能够精确地调节其生长和体积^[8].在肝组织受到严重损伤,如大部分肝组织切除、严重肝坏死等,肝细胞的再生则需要动员肝干细胞,激活干细胞并增生,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.在这一过程中,可能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^[9-10].在某些特殊情况下,如成熟肝细胞的增生受到抑制或肝脏受到严重损伤时,存在于肝组织内的为数不多的干细胞就会大量的增生和分化而进行肝脏的重建.比如在肝组织切除2/3并用DNA合成抑制剂(倒千里光碱)抑制成熟肝细胞生长的情况下,发现小肝细胞在肝板内大量增生,表明小肝细胞动员和参与肝细胞再生,而且这类细胞不受倒千里光的生长抑制影响.HSC具有强大的增生潜能,目前有许多动物模型研究表明,采用肝毒性药物,如富有余Dipin, furan(呋喃妥因)、FunionisinB1等抑制或消除肝实质细胞的再生能力,再行部分肝切除,可明显观察到HSC的增生.当肝脏暴露于肝毒剂或致癌剂而受到严重的损伤时,可观察到卵圆细胞大量增生,认为这是休眠的肝干细胞激活的结果.在临床和动物实验中也发现,在大面积肝坏死时,肝再生以卵圆细胞增生为特征.包括病毒性肝炎在内的肝损伤时容易出现胆小管增生,特点是在汇管区及其周围、纤维结缔组织间隔中出现大量卵圆细胞.国内胡中杰 *et al*发现^[11],在病毒性肝炎的再生过程中,普通型肝炎和轻度慢性肝炎时以肝细胞增生为主,在中重度肝炎时有肝前体细胞参与,而在重型肝炎时,肝细胞的增生受抑制,主要通过肝干细胞的活化和增生进行再生,肝干细胞可能先分化为一种或多种过渡细胞,主要是管状细胞和部分小肝细胞样细胞,然后再分化为成熟肝细胞.Yasni *et al*^[12]将大鼠的肝组织通过两步胶原酶灌流分离,离心细胞混悬液,再用胶原酶消化,蛋白酶除去残留肝细胞,可分离出卵圆细胞,温育60 min后,接种于含100 mL/

L胎牛血清的William's E培养基中培养.经过4 wk的培养,从超微结构和免疫组化方面证明了肝细胞是由卵圆细胞分化而来的.

通过HSC的表面特殊标准、细胞位置和形态方面来推理,HSC是沿着胆系向肝细胞途经进行分化的.许多学者对多种HSC系进行了体内研究,发现在一定培养条件下,这些细胞会逐渐失去原有形态,并表现出典型的肝细胞或胆管细胞形态学特征.

3 肝干细胞与肝癌的关系

肿瘤起源于干细胞,肿瘤细胞有异质性,肿瘤组织中只含有少量可以无限克隆增生的肿瘤干细胞是最近几年提出来的新理论,这一理论已在实验研究中初步得到证实.传统认为,所有表型不同的癌细胞均有无限增生和转移的潜能,但新近关于血液肿瘤和乳腺癌的研究发现,肿瘤组织中只有少数细胞具有克隆扩增和形成肿瘤的能力,大多数细胞只有有限克隆扩增能力,因此认为肿瘤组织中存在肿瘤干细胞.最近Bonnet *et al*^[13]分离出人急性粒细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML)中肿瘤干细胞,为CD34⁺CD38⁻细胞,他们只占AML细胞总数的0.2%,是惟一能将AML从人传给免疫缺陷鼠的细胞,具有成瘤性.多数的白血病可能来源于造血干细胞中突变的累积,导致在干细胞及其后代中发生恶性转化.Al-Hajj *et al*^[14]最近也在乳腺癌组织中发现启动乳腺癌形成的肿瘤干细胞.该研究指出,乳腺癌细胞具有异质性,只有约占2%的乳腺癌细胞具有克隆扩增和在SCID鼠体内形成肿瘤的能力,这类细胞的标志为Lin⁻ESA⁺CD44⁺CD⁻⁴⁴,而大部分乳腺癌细胞只有有限增生能力.人肺癌、卵巢癌、神经母细胞瘤等肿瘤细胞体外培养也仅1/5 000-1/1 000能形成集落.从小鼠腹水中分离骨髓瘤细胞,体外集落培养,仅1/10 000-1/1 000的癌细胞形成集落.这个数值可能代表了肿瘤细胞中肿瘤干细胞的数量.最近,Singh *et al*^[15]还在脑肿瘤组织中发现具有无限增生能力、自我更新和分化潜能的干细胞.另外,可以从远离肿瘤初始发生部位而无明确转移癌的患者中检测到肿瘤细胞的存在,这类细胞具有干细胞的生长特性和游走性,因此认为肿瘤细胞是一种突变的干细胞^[2].其依据是肿瘤细胞具有与干细胞相似的生长特性,即克隆扩增和无限增值,二者具有相同的生长调控机制,Wnt、SHH、Notch等参与细胞生长分化调控的信号传导途径,参与了肿瘤细胞的生长调控,这些调节机制异常可能是肿瘤发生的重要原因.这些研究表明,肿瘤组织中含有干细胞,可能是肿瘤发生发展的种子细胞.

肝癌起源于干细胞的学说尚未得到证实,但较多研究资料显示,肝干细胞是肝细胞癌和胆管细胞癌的祖细胞.在实验性肝癌中,肝组织出现HOC增生,转化后的HOC可形成未分化肝细胞癌、胆管细胞癌和混合性肝癌^[16].由于肝干细胞更新迅速,生命期长,极易

成为致癌因子的靶细胞. 肝癌既可以发生于干细胞, 也可能起源于其后代, 当然也可能发生于去分化的成熟肝细胞或胆管上皮细胞. 动物原发性肝癌有介于肝细胞癌与胆管细胞癌的中间类型. 已在用化学物质诱发大鼠肝癌早期阶段的模型中观察到卵圆细胞的存在, 当卵圆细胞在体外转化后注射给裸鼠, 使这些裸鼠发生原发性肝细胞癌. 外源性药物干预体外培养的肝胆管癌细胞株, 可诱导其分化, 并具有卵圆细胞表型. 用卵圆细胞表达或水平上调的分子标志(如 OV-6、C-kit、CD34、AFP 等), 已从人的肝胚细胞瘤、肝细胞瘤及硬化肝中发现卵圆细胞. 龚加庆 *et al*^[17] 发现, 大鼠肝癌模型首先于汇管区发现卵圆细胞沿胆管上皮依次排列增生, 这些卵圆细胞呈 C-kit 和 PCNA 阳性表达, 随后, 卵圆细胞以汇管区为中心向肝小叶穿插生长. 肝癌形成时, 癌结节内外均见有卵圆细胞聚集, 此期 C-kit 阳性细胞仍以汇管区为主, 而 PCNA 阳性细胞遍布癌结节内外. 卵圆细胞起源于汇管区的胆管上皮. 卵圆细胞与肝癌的发生密切相关. 肖家诚 *et al*^[18] 发现人肝细胞肝癌和肝硬化肝组织中存在卵圆细胞, 其形态和免疫表型特点与动物致癌模型肝中卵圆细胞一致, 结果进一步支持肝癌可能起源于干细胞样细胞的假设. 我们的研究也发现, 肝癌组织中的细胞具有异质性, 只有少数细胞具有大量克隆扩增能力, 大多数细胞对抗肿瘤药物顺铂等敏感, 而具有克隆扩增能力的肿瘤细胞相对具有抗药性, 肝肿瘤细胞经顺铂处理后, 进行体外扩增, 然后接种到 SCID 小鼠皮下, 发现比接种相同数量未经处理的混合肿瘤细胞生长迅速, 这类细胞具有肝干细胞的相似表面标志.

总之, 肝组织中存在干细胞, 肝干细胞与肿瘤的发生密切, 突变的肝干细胞可能是肝癌发生的种子细胞, 但肝癌干细胞学说的提出主要基于理论推测和现象观察. 目前的研究重点仍需要找到肝癌干细胞, 建立分离培养和鉴定肝癌干细胞的方法, 弄清他的特殊分子标记, 分析其生理和病理机制. 肿瘤发生发展是一个多基因、多因素、多阶段的复杂病理过程, 细胞微环境、致癌剂和遗传因素相互作用于干细胞引起生长调控途径中某些分子发生遗传或表观遗传学改变, 导致表达异常, 进而引起细胞过度增生, 这可能是肿瘤发生的始动因素, 也可能是肿瘤治疗的靶.

肿瘤干细胞的研究进展, 为肿瘤研究开辟了全新的思路, 将推动肿瘤学的诊治. 如果肿瘤起源于干细胞

的学说得到证实, 同时在分子调控水平弄清肿瘤干细胞向肿瘤发展的分子机制, 有可能找到早期诊断和彻底治疗肿瘤的新办法.

4 参考文献

- 1 Magli MC, Levantini E, Giorgetti A. Developmental potential of somatic stem cells in mammalian adults. *J Hematother Stem Cell Res* 2000;9:961-969
- 2 Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414:105-111
- 3 Werlich T, Stiller KJ, Machnik G. Experimental studies on the stem cell concept of liver regeneration. II. *Exp Toxicol Pathol* 1999;51:93-98
- 4 Vessey CJ, de la Hall PM. Hepatic stem cells: a review. *Pathology* 2001;33:130-141
- 5 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
- 6 Thorgeirsson SS, Grisham JW. Overview of recent experimental studies on liver stem cells. *Semin Liver Dis* 2003;23:303-312
- 7 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
- 8 Braun KM, Sandgren EP. Cellular origin of regenerating parenchyma in a mouse model of severe hepatic injury. *Am J Pathol* 2000;157:561-569
- 9 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
- 10 Thorgeirsson SS. Hepatic stem cells in liver regeneration. *FASEB J* 1996;10:1249-1256
- 11 胡中杰, 朗振为, 宋晨朝, 张世杰. 重型肝炎中肝前体细胞的检测及分布. *中华肝病杂志* 2003;11:394-397
- 12 Yasui O, Miura N, Terada K, Kawarada Y, Koyama K, Sugiyama T. Isolation of oval cells from Long-Evans Cinnamon rats and their transformation into hepatocytes in vivo in the rat liver. *Hepatology* 1997;25:329-334
- 13 Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997;13:730-737
- 14 Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:3983-3988
- 15 Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003;63:5821-5828
- 16 Germain L, Noel M, Gourdeau H, Marceau N. Promotion of growth and differentiation of rat ductular oval cells in primary culture. *Cancer Research* 1998;48:368-378
- 17 龚加庆, 方驰华, 李雅, 田伏洲. 卵圆细胞参与实验性肝癌形成过程的研究. *中华外科杂志* 2004;42:291-295
- 18 肖家诚, 金晓龙, 曾晓颖, Ruck P, Adam A, Kaiserling E. 肝细胞肝癌和肝硬化组织中的卵圆细胞: 电镜与免疫电镜研究. *检验医学* 2004;19:47-50