

肝干细胞的可塑性和分化机理的研究进展*

何祖平 张好建 汪 蘊 王建今 丰美福**

(中国科学院动物研究所, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100080)

摘要 对肝干细胞的可塑性、多向分化潜能、分化机理及其与肝癌发病机制的关系等方面进行综述。肝干细胞是一类具有自我更新能力和多向分化潜能的细胞。在不同的条件下, 肝干细胞可分化为肝细胞、胆上皮细胞、胰腺细胞和肠上皮细胞。肝干细胞的分化涉及微环境、细胞因子和细胞外基质等多种调控因素。肝干细胞分化为成熟肝细胞受多种转录因子和信号通路的调节, 其分化异常有可能诱发形成肝细胞癌。

关键词 肝干细胞, 可塑性, 分化机理, 肝细胞癌

学科分类号 Q28

肝干细胞的可塑性及其分化机理的研究在基础理论和临床应用等方面均有重要意义。一方面, 肝干细胞可能参与肝脏损伤的修复与重建, 研究肝干细胞的分化机理有助于阐明肝脏的发育机制; 另一方面, 肝干细胞分化为具有功能的成熟肝细胞, 将为肝细胞移植和生物型人工肝提供重要的细胞来源。据统计, 中国有慢性乙肝患者约 2 000 万人, 每年因肝硬化和肝癌死亡的人数超过 50 万。肝移植是解决晚期肝脏器质性病变的有效手段, 而肝移植面临的最大难题是器官来源短缺。肝干细胞可诱导分化为肝细胞, 肝细胞移植和生物型人工肝将可能缓解供体肝脏严重缺乏的矛盾。由于肝干细胞具有多种分化潜能, 其分化过程和机理较为复杂, 肝干细胞分化异常可能导致肝细胞癌的发生。在此, 本文根据肝干细胞的最新研究进展, 并结合自己的研究工作, 综述了肝干细胞的可塑性和分化机理, 及其与肝癌发病机制的关系。

1 干细胞的可塑性

分化是指全能性或多能性干细胞在形态、生理生化和功能上向专一或特异性方向变化的过程。对动物而言, 其实质是个体产生稳定性组织差异的过程。从分子生物学的角度说, 这一过程是细胞的特异基因在时间和空间上差次表达的结果。定向分化是指利用特定的培养条件诱导干细胞分化成为某种特定的功能细胞, 如肝干细胞可诱导分化为成熟的肝细胞。横向转化(trans-differentiation)指的是将一种组织的成体干细胞诱导分化为另一种组织的成体干细胞或功能细胞。经典发育生物学认为, 细胞分化是稳定的, 而且一般是不可逆的。但后来人们

发现, 一些组织干细胞在一定的条件下可跨胚层分化成为其他组织类型的干细胞, 如造血干细胞可分化为肝卵圆形细胞。近年来, 越来越多的实验证实, 成体干细胞确实具有分化为其他类型组织细胞的能力, 人们把这种现象称为干细胞的可塑性(plasticity), 也有人称之为干细胞的横向转化。

干细胞可塑性的证据之一来源于肝组织。Petersen 等^[1]将雄鼠的骨髓细胞移植到经致死性放射线照射的同系雌鼠, 发现从雌鼠骨髓分离的细胞可分化为肝卵圆形细胞和肝细胞。人的部分肝细胞也可能来源于骨髓细胞的跨胚层分化, Alison 等^[2]用男性患者的骨髓作为供体移植到女性病人, 运用 DNA 探针技术在受体女性病人的肝细胞中检测出 Y 染色体; 相反, Theise 等^[3]将女性的整个肝脏移植到男性患者, 尸检时发现移植的女性肝脏中含有 Y 染色体阳性的肝细胞, 其中一位患者 40% 的肝细胞和胆上皮细胞来源于男性患者的骨髓细胞。上述结果为骨髓造血干细胞向肝干细胞横向转化提供了重要佐证。成体干细胞具有可塑性, 这一研究成果如同人胚胎干细胞建系一样, 成为干细胞研究历程中的又一里程碑。

2 肝干细胞的多向分化潜能

在肝干细胞的发育过程中, 存在一种中间类型的细胞被称为肝祖细胞(hepatic progenitor cells)。

* 国家“十五”高技术“863”计划资助项目(2001AA216051)和北京市自然科学基金资助项目(7022023)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-62571017, E-mail: fengmf@panda.ioz.ac.cn

收稿日期: 2003-05-16, 接受日期: 2003-06-28

肝祖细胞的增殖能力有限, 与肝干细胞不同的是, 肝祖细胞没有自我更新能力, 它经过几次细胞分裂后产生的两个子代细胞均为终末分化细胞. 肝干细胞、肝祖细胞和成熟肝细胞的关系示意如下: 肝干细胞 $\xrightarrow{\text{分化}}$ 肝祖细胞 $\xrightarrow{\text{分化}}$ 成熟肝细胞.

肝卵圆形细胞 (oval cells) 被认为是双潜能的肝干细胞, 研究表明, 它们还可跨胚层分化为其他组织的细胞类型, 肝卵圆形细胞的多向分化潜能见图 1. 丁酸钠和酸性成纤维细胞生长因子 (aFGF) 可支持肝干/祖细胞分化为肝细胞, 丁酸钠能抑制肝干/祖细胞的增殖, 这种抑制作用表现在肝干细胞的数量减少, 并且抗增殖细胞核抗原的抗体 (PCAN) 的表达降低^[4, 5]. Yao 等^[6]在基础培养液中添加肝细胞生长因子 (HGF)、表皮生长因子 (EGF)、胰岛素 (insulin) 和地塞米松, 诱导 WB-F344 肝干细胞系分化为肝细胞. 肝干细胞与肝星形细胞共培养, 可诱导肝干细胞分化为成熟肝细胞, 这种共培养体系类似于肝脏的微环境, 肝星形细胞既可产生细胞外基质, 又能分泌一些可溶性生长因子, 表明肝脏的微环境对肝细胞的分化起重要作用^[7]. 另一方面, Yang 等^[8]将肝卵圆形细胞置于高糖环境中培养, 证实肝卵圆形细胞能跨胚层分化为胰岛细胞, 这些细胞能聚集形成三维的胰岛细胞样集落, 用葡萄糖刺激该细胞, 它们能合成和分泌胰岛素. 上述工作提示, 利用肝干细胞的可塑性, 可以诱导肝干细胞分化为不同类型的细胞, 这将为内分泌系统和消化系统等疾病的细胞替代治疗奠定基础.

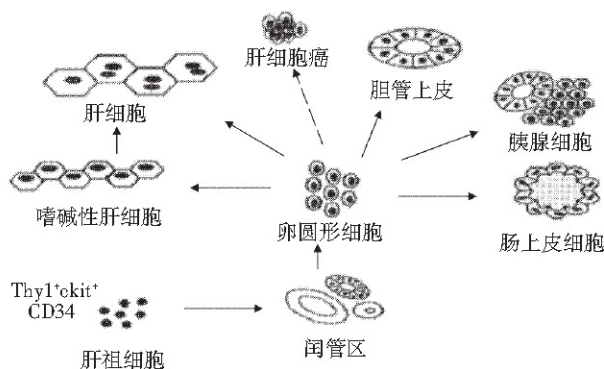


Fig. 1 The multi-potential differentiation of hepatic oval cells^[5]

图 1 肝卵圆形细胞的多向分化潜能示意图^[5]

3 肝干细胞的分化机理

肝干细胞的分化是一个复杂的过程, Cantz 等^[9]将增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 转染到小鼠的胎肝干细胞, 然后将标记的胎肝干细胞移植到 α PA/RAG-2 小鼠. 采用实时定量 RT-PCR 的方法研究胎肝干细胞的分化过程, 发现移植的肝干细胞 2 周时增殖达到最高水平, 6 周恢复至正常水平, 甲胎蛋白 (AFP) 表达水平逐渐下降, 在 4 至 6 周几乎检测不到 AFP, 而白蛋白的表达逐步上升, 表明胎肝干细胞已分化为成熟肝细胞. 我们实验室采用二步诱导的方法, 发现成年大鼠肝卵圆形细胞首先分化为小肝细胞, 然后再分化成为成熟肝细胞, 细胞的形态变大拉长, 核/质比例变小, RT-PCR 检测显示, 分化后的细胞表达 α -1-抗胰蛋白酶 (α -1-AT) 和酪氨酸转氨酶 (TAT)^[10], α -1-AT 主要是由成熟肝细胞合成的糖蛋白组成, TAT 是终末分化肝细胞的一种标记物, 结果表明分化的细胞具有成熟肝细胞的遗传特征.

肝干细胞是维持自我复制还是分化为成熟的功能细胞依赖于微环境、细胞生长因子、基质细胞、细胞外基质等多种因素的相互作用与平衡. 具体来说, 肝干细胞分化与增殖的调控因素主要有:

- 时钟, 它通过改变细胞周期促进因子或抑制因子的水平, 决定干细胞的分裂次数. 如 Cul-1 蛋白是一种细胞周期促进因子, 它与细胞周期蛋白 G_1 的破坏有关. P_{27} 是一种抑制因子, 它促进干细胞分化并抑制其增殖.
- 微环境, Grisham 等^[11]将肝卵圆形细胞移植到大鼠肝组织时, 卵圆形细胞分化成为肝实质细胞, 而且, 大鼠肝组织的微环境能够显著降低已恶性转化的肝卵圆形细胞的致癌性. 卵圆形细胞经皮下移植时常形成易转移和分化程度低的肿瘤, 其原因可能是皮下基质抑制卵圆形细胞分化为肝细胞, 因而促进瘤生物的形成.
- 生长因子和细胞外基质, 它们在肝干细胞分化为肝实质细胞的过程中有重要作用. Suzuki 等^[12]报道, 肝细胞生长因子 (HGF) 可诱导白蛋白阴性的肝干细胞转变为白蛋白阳性的肝祖细胞, 在这种转变过程中, CCAAT/增强子结合蛋白 [CCAAT/enhancer binding protein, (C/EBP)] 的表达明显增加, 当肝干细胞 C/EBP 的功能被抑制时, 肝干细胞不再分化为肝细胞世系的细胞, 转而开始增殖. 白血病抑制因子 (LIF) 属于 IL-6 家族, 在肝卵圆形细胞的激活与增殖过程中, LIF 的表达上调而且一直保

持较高水平, 运用原位杂交的方法证实肝卵圆形细胞表达 LIF 受体的 mRNA, 而成熟的肝细胞低水平表达上述 mRNA, 提示 LIF 在卵圆形细胞的增殖和分化中起重要作用^[13].

肝干细胞分化机理的研究进展缓慢. Sautin 等^[14]报道, 溶血磷脂酸 (lysophosphatidic acid, LPA) 通过内源性分化基因编码的 G 蛋白耦联受体调控肝干细胞的增殖和分化, 他们在损伤肝组织门管区周围的细胞内检测出大量的 LPA 受体蛋白 1、2、3, 这些细胞表达 A6 抗原 (小鼠肝卵圆形细胞的标记物), 表明 LPA 调控再生肝组织的肝干细胞的增殖和分化. Plescia 等^[15]发现, 在二甲基亚砜 (DMSO) 诱导肝干细胞分化为肝细胞的过程中, 出现 Wnt/ β 链蛋白 (β -catenin) 通路的下调, 纤连蛋白和层粘连蛋白受体也下调, DMSO 还可使转录因子 Twist、GATA-4、HNF1a 和 GATA6 等上调. 此外, 肝细胞核因子 HNF1、HNF-4 α 、HNF-3 β 、HNF-6 等转录因子在肝干细胞的分化调控都可能起重要作用. HNF1 是许多肝特异性基因如白蛋白 (albumin)、 α 1-抗胰蛋白酶 (α 1-antitrypsin)、 α 和 β 纤维蛋白原 (α - and β -fibrinogen) 的转录激活子, HNF1 可能与维持肝干细胞处于分化状态有关, HNF1 基因剔除的小鼠因肝脏显著肿大和渐进消耗性综合症死亡, 白蛋白和 α 1-抗胰蛋白酶的转录水平降低^[16]. Li 等^[17]认为, HNF-4 α 对哺乳动物的肝干细胞分化为正常肝细胞和肝脏的代谢调节等功能起着至关重要的作用, HNF-4 α 基因的丢失将导致异常的肝细胞形成, 这种肝细胞不能表达成熟肝细胞功能基因如 apoA I、apoA II、apoB、apoC III、aldolase B、左旋脂肪酸粘附蛋白 (LFABP)、转铁蛋白 (transferrin) 和促红细胞生成素 (erythropoietin). 此外, 小鼠肝脏在发育过程中共表达转录因子 HNF-6 及其靶基因 HNF-3 β ^[18], 这表明 HNF-6 和 HNF-3 β 对肝脏的发育和肝干细胞的分化可能有重要作用.

4 肝干细胞的分化与肝癌发病机理的关系

2000 年国际癌症研究中心统计显示, 全球肝癌的发病人数有 56.4 万, 死亡 54.9 万, 其中, 中国有 30.6 万, 死亡 30.0 万. 从细胞水平看, 癌症的起因包括两方面: 其一是成熟细胞的去分化, 其二是干细胞的分化或成熟骤停. Sell 等^[19]认为肝细胞癌的发生并非由于成熟肝细胞的去分化, 而是由于肝干/祖细胞分化为成熟肝细胞的途径被阻断所

致. 肝卵圆形细胞在肝细胞癌和胆细胞癌的发生和发展中起重要作用, 在异常情况下, 它们有可能成为人的肝细胞癌的肿瘤干/祖细胞^[20]. 肝干细胞具有多种分化潜能, 选择适当的诱导剂, 确保肝干细胞定向分化为人们所需的功能细胞, 既可减少肝干细胞异常分化或恶性转化的可能性, 又可得到理想的“种子”细胞.

5 结 语

目前, 人们对肝干细胞的可塑性及其分化机理的研究虽然取得了许多进展, 但还存在一些有待解决的问题: a. 肝干细胞的分化具有两面性. 一方面, 肝干细胞可以分化为肝细胞; 另一方面, 肝干细胞分化异常可诱发产生肝细胞癌. 因此, 如何创建合适的培养体系, 诱导肝干细胞分化为既有功能又不具致癌性的肝细胞是今后的研究热点之一. b. 利用肝干细胞的可塑性, 寻找关键细胞因子或条件培养基, 诱导肝干细胞分化为分泌胰岛素的胰腺细胞, 将为糖尿病的治疗带来新的希望. c. 肝干细胞可能是肝脏肿瘤干细胞或肝癌前体细胞, 研究肝干细胞分化调控的靶基因, 将可能使人们追求的肝癌基因治疗的夙愿得以实现.

参 考 文 献

- Petersen B E, Bowen W C, Patrene K D, *et al.* Bone marrows a potential source of hepatic oval cells. *Science*, 1999, **284** (5417): 1168 ~ 1170
- Alison M R, Poulsom R, Jeffery R, *et al.* Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature*, 2000, **406** (6793): 257
- Theise N D, Nimmakayalu M, Gardner R, *et al.* Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*, 2000, **32** (1): 11 ~ 16
- Pienvichit P, Konkin T A, Faris R A. Effects of sodium butyrate and acidic fibroblast growth factor on TDC32300 cultured cells. *J Med Assoc Thai*, 2002, **85** (suppl 4): 1089 ~ 1095
- Lowes K N, Croager E J, Olynyk J K, *et al.* Oval cell-mediated liver regeneration: Role of cytokines and growth factors. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003, **18** (1): 4 ~ 12
- 姚 鹏, 詹轶群, 许望翔, 等. 细胞生长因子体外对大鼠肝干细胞的影响. *中华肝脏病杂志*, 2003, **11** (1): 33 ~ 36
- Yao P, Zhan Y Q, Xu W X, *et al.* Chinese Journal of Liver Diseases, 2003, **11** (1): 33 ~ 36
- Nagai H, Terada K, Watanabe G, *et al.* Differentiation of liver epithelial (stem-like) cells into hepatocytes induced by coculture with hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **293** (5): 1420 ~ 1425
- Yang L, Li S, Hatch H, *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 ~ 8083
- Cantz T, Zuckerman D M, Burda M R, *et al.* Quantitative gene expression analysis reveals transition of fetal liver progenitor cells to mature hepatocytes after transplantation in uPA/RAG-2 mice. *Am J Pathol*, 2003, **75** (1): 37 ~ 45

- 10 He Z P, Tan W Q, Feng M F, *et al.* Differentiation of putative hepatic stem cells from adult rats into mature hepatocytes in the presence of EGF and HGF. *Differentiation*, **71** (4~5): 281~290
- 11 Grisham J W, Coleman W B, Smith G J. Isolation, culture, and transplantation of rat hepatocytic precursor (stem-like) cells. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1993, **204** (3): 270~279
- 12 Suzuki A, Iwama A, Miyashita H, *et al.* Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development*, 2003, **130** (11): 2513~2524
- 13 Omori N, Evarts R P, Omori M, *et al.* Expression of leukemia inhibitory factor and its receptor during liver regeneration in the adult rat. *Lab Invest*, 1996, **75**: 15~24
- 14 Sautin Y Y, Jorgensen M, Petersen B E, *et al.* Hepatic oval (stem) cell expression of endothelial differentiation gene receptors for lysophosphatidic acid in mouse chronic liver injury. *J Hematother Stem Cell Res*, 2002, **11** (4): 643~649
- 15 Plescia C, Rogler C, Rogler L. Genomic expression analysis implicates Wnt signaling pathway and extracellular matrix alterations in hepatic specification and differentiation of murine hepatic stem cells. *Differentiation*, 2001, **68** (4~5): 254~269
- 16 Pontoglio M, Barra J, Hadchouel M, *et al.* Hepatocyte nuclear factor-1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal fanconi syndrome. *Cell*, 1996, **84** (4): 575~585
- 17 Li J, Ning G, Duncan S A. Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4 α . *Genes Development*, 2000, **14** (4): 464~474
- 18 Rausa F, Samadani V, Ye H, *et al.* The cut-homeodomain transcriptional activator HNF-6 is coexpressed with its target gene HNF-3 beta in the developing murine liver and pancreas. *Developmental Biology*, 1997, **192** (2): 228~246
- 19 Sell S, Pierce G B. Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. *Lab Invest*, 1994, **70** (1): 6~21
- 20 Dumble M L, Croager E J, Yeoh G C, *et al.* Generation and characterization of p53 null transformed hepatic progenitor cells: oval cells give rise to hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, 2002, **23** (3): 435~445

Progress in Plasticity of Hepatic Stem Cells and The Mechanisms Governing Their Differentiation *

HE Zu-Ping, ZHNAG Hao-Jian, WANG Yun, WANG Jian-Jin, FENG Mei-Fu **

(State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract Hepatic stem cells have an ability of self-renewal and can differentiate into a wide range of cell types including hepatocytes, bile epithelial cells, pancreatic cells and intestinal epithelial cells under various conditions. There are many factors such as microenvironment, cytokines and extracellular matrix that control hepatic stem cell differentiation. Differentiation of hepatic stem cells into hepatocytes is regulated by transcription factors and signal pathways, and hepatocellular carcinoma may result from the abnormal differentiation of hepatic stem cells. The plasticity, multi-potential differentiation, the mechanisms governing hepatic stem cell differentiation, and the relationship between hepatocellular carcinoma and the differentiation of hepatic stem cells are discussed.

Key words hepatic stem cells, plasticity, mechanisms of differentiation, hepatocellular carcinoma

* This work was supported by grants from The High-Tech Project of The Chinese Ministry of Science and Technology (2001AA216051) and The Natural Science Foundation of Beijing (7022023).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62628740, E-mail: fengmf@panda.ioz.ac.cn

Received: May 16, 2003 Accepted: June 28, 2003