

成体干细胞向肝细胞分化

董学君* 张国荣 陈 焯¹ 项黎新¹ 潘若浪¹ 邵健忠¹

(绍兴市人民医院, 绍兴 312000; ¹ 浙江大学生命科学学院, 杭州 310058)

摘要 成体干细胞跨越胚层限制分化为其他胚层来源的细胞, 对揭示不同胚层细胞间相互分化的生物学意义和机制具有重要学术价值, 并可以为临床细胞移植治疗开辟新的途径, 从而成为当前研究的热点之一。综述了近年来肝源性卵圆细胞、成肝细胞、骨髓源干细胞和其他成体干细胞跨越分化为肝细胞的研究现状与进展, 以及卵圆细胞、成肝细胞等的分离鉴定, 表面标志、生物学特征和跨越分化机制, 并对成体干细胞在肝脏疾病细胞治疗上的应用前景作了展望。

关键词 成体干细胞; 跨越分化; 肝细胞; 卵圆细胞; 成肝细胞

越来越多的研究显示, 成体干细胞可以跨越胚层限制, 分化为其他胚层来源的细胞, 如骨髓中的造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)、间充质干细胞(mesenchymal stem cells)和多潜能成体祖细胞(multipotent adult progenitor cells, MAPCs)不仅能分化成各种血细胞, 而且能分化为神经细胞、上皮细胞、胰岛细胞和肝细胞, 具有很高的可塑性^[1-4], 这种成体干细胞的跨越分化(transdifferentiation), 不仅对揭示不同胚层细胞间相互分化的机制具有重要理论价值, 而且为临床细胞移植治疗开辟了新的途径, 具有广阔的应用前景。目前对肝功能衰竭(如肝坏死、肝硬化等)的治疗主要依赖于原位肝移植, 但供体肝来源严重不足和移植排斥等问题限制了这一治疗手段的广泛应用, 肝细胞移植和生物人工肝作为肝移植的辅助方式, 可以缓解上述问题, 而合适的肝细胞来源未得到解决, 利用成体干细胞分化为肝细胞是解决这一问题的有效途径。

1 肝源性干细胞向肝细胞分化

1.1 卵圆细胞

当肝损伤后肝实质细胞分裂受到抑制时, 位于肝脏胆管分支或 Hering 小管处的细胞被激活, 移行出门脉汇管区并开始分化, 这些过渡型的胆管细胞被称为卵圆细胞, 由于其在门静脉周围的肝实质中呈分支管状排列, 故又称管状卵圆细胞(ductular oval cells)。研究表明, 卵圆细胞具有分化成胆管和肝细胞的双向分化潜能, 从损伤小鼠肝中分离培养的卵圆细胞, 可以在丁酸钠诱导下体外直接分化为肝细胞^[4], 若将卵圆细胞移植入小鼠损伤肝脏

内, 则可在损伤肝脏的微环境下, 体内分化为肝细胞和胆管上皮细胞^[5], 而且, 在 FAH 缺陷小鼠中, 移植的卵圆细胞具有修复和重建肝功能的作用^[6]。目前一般认为, 卵圆细胞只能从损伤肝脏分离获取, 至于能否从未受损的正常肝脏中获得卵圆细胞仍有不同见解, 曾有学者从 3~6 周的正常成体小鼠肝中分离出一类肝祖细胞, 经体外培养后, 检测到了这些细胞能表达卵圆细胞的早期表面标记物 A6, 并具有分化为成熟肝细胞和胆管细胞的潜能, 但对于这类细胞是否就是卵圆细胞尚不能最终确定^[7]。近年来, 还有少量研究认为, 卵圆细胞可能起源于骨髓, 而不是肝脏自身, 提示骨髓细胞可能参与肝脏的分化发育和损伤修复^[8-10]。

1.2 成肝细胞

成肝细胞(hepatoblast)是胚胎发育早期存在于肝脏的一种具有胆管和肝细胞双向分化潜能的干细胞, 它能合成白蛋白(ALB)和甲胎蛋白(AFP), 但没有成熟肝细胞特有的尿素合成酶等标志^[11]。胚胎发育后期, 大部分成肝细胞逐步表达肝细胞标记, 分化为肝细胞, 少数成肝细胞表达 CK19 和 OV-6 等胆管细胞表面标记, 分化为胆管细胞^[12]。近年来, 对成肝细胞的性质与功能已进行了较深入的研究。利用流式细胞分选术, 可以从怀孕 10.5~16.5 天的小鼠胎肝中分离出成肝细胞, 对其特异性标志物的研究显示, 成肝细胞除了表达 ALB 和 AFP 外, 还表达 CD49f 和 CD29 等肝脏祖细胞标志, 而不表达

收稿日期: 2006-05-11 接受日期: 2006-09-05
绍兴市科技计划项目资助(No.2005141)

* 通讯作者。Tel: 0575-5228572, E-mail: dxj9666@163.com

造血细胞抗原 CD45、TER119 和 c-Kit, 将其植入同种小鼠脾脏后, 可检测到其移行入肝内, 并分化为功能性的肝实质细胞, 恢复部分肝脏功能^[13]。另有研究显示, 成肝细胞还表达肝细胞生长因子受体 c-Met 和 c-Kit^[14], 其中 c-Met 在小鼠和大鼠等不同动物的成肝细胞中都有表达, 因此认为其可以作为不同动物(包括人类)成肝细胞的一个共同标记物^[15]。最近, 还有报道认为成肝细胞表达 OX18、细胞间黏附分子 1(ICAM-1)^[16]和 Dlk^[17], 其中 Dlk 是一类膜蛋白, 胞外有 6 个 EGF 样重复区, 与果蝇中 Notch 配体相似, 但缺乏和 Notch 结合相关的 DSL 结构域。体外实验表明, 大部分 Dlk 阳性细胞克隆(Dlk⁺)中包含 ALB 和 CK19 阳性细胞, 将绿色荧光蛋白(GFP)转基因小鼠中分离到的 Dlk⁺细胞植入小鼠体内, 36 周后可发现受体肝组织切片中有较多表达 ALB 的 GFP 阳性肝细胞, 但表达 CK19 的 GFP 阳性细胞很少, 显示 Dlk⁺细胞具有较强分化为肝细胞的潜能, 而分化为胆管细胞的潜能较弱。与 Dlk⁺细胞相类似的还有一种被称为 c-Met⁺CD49f^{+/low}c-Kit⁻CD45⁻TER119⁻细胞, 虽然在这两类细胞群体中都包含了双分化潜能的成肝细胞, 但两者在分化程度和潜能上还是有一定差别, 表现在前者体外分化为肝细胞或胆管细胞的时间比后者快, 一般在 5 天左右就可见 ALB 和 CK19 表达的阳性细胞, 而 c-Met⁺CD49f^{+/low}c-Kit⁻CD45⁻TER119⁻细胞需要在培养 21 天后才出现 ALB 和 CK19 表达阳性细胞。目前认为, 相对于 Dlk⁺细胞而言, c-Met⁺CD49f^{+/low}c-Kit⁻CD45⁻TER119⁻细胞可能代表了一类较早期的成肝细胞。有趣的是, 从大鼠中分离的一种与 c-Met⁺CD49f^{+/low}c-Kit⁻CD45⁻TER119⁻相似的成肝细胞却与 Dlk⁺成肝细胞类似, 均可在培养 5 天后观察到 ALB 和 CK19 阳性细胞, 这似乎不能解释二者成熟度不同的观点。上述研究提示, 成肝细胞的表型标志和发育过程复杂, 对成肝细胞的分离鉴定及生物学功能还有待深入研究。

2 骨髓源干细胞向肝细胞的分化

2.1 骨髓源干细胞参与肝细胞的分化

由于骨髓源干细胞中的造血细胞和卵圆细胞存在许多相似的表型并表达共同的抗原, 如 c-kit、flt-3、Thy-1 和 CD34 等, 因此有学者推测卵圆细胞可能起源于骨髓源干细胞^[8]。Petersen 等^[18]通过一系列实验初步证实了该假说, 他们将同系雄鼠的骨髓

移植到免疫缺陷的雌鼠中, 术后雌鼠用四氯化碳处理, 使其肝脏损伤, 并用 2-乙酰氨基芴(aminofluorene, 2-AAF)抑制肝细胞分裂和促进卵圆细胞增殖, 肝损伤后第 9 天可见 Y 染色体阳性的卵圆细胞, 第 13 天可见部分 Y 染色体阳性的肝细胞。此外, 将二肽基肽酶 IV 阳性(DPPIV⁺)的雄鼠骨髓移植到 DPPIV⁻的雌鼠中, 受体鼠肝卵圆细胞中可检测到 DPPIV 阳性信号; 将表达 MHC II 家族抗原 L21-6 的 Lewis 鼠作为受体, 不表达 L21-6 抗原的 Brown-Norway 鼠作为供体, 进行整体肝脏移植后, 发现胆管中 L21-6 抗原表达和不表达的细胞同时出现, 表明一些胆管上皮细胞是来自于胆管, 而另一些可能来自循环的骨髓源细胞。

在人和小鼠中进行的许多试验均发现, 在正常肝脏细胞代谢或损伤肝脏修复中, 有很高比例的肝细胞来源于骨髓。有人曾对 6 例器官移植患者进行了研究, 其中 2 例是男性骨髓移植给女性患者, 4 例为女性肝脏移植给男性患者, 结果所有患者肝组织均可见 Y 染色体阳性肝细胞及 Y 染色体阳性胆管细胞, 其中 Y 染色体阳性肝细胞占 4%~43%, Y 染色体阳性胆管细胞占 4%~38%, 提示女性患者肝组织的 Y 染色体阳性细胞来源于男性供体的骨髓, 而男性患者肝组织 Y 染色体阳性细胞来源于自身骨髓干细胞^[19]。此外, 利用延胡索酰乙酰乙酸水解酶缺陷(FAH^{-/-})的小鼠模型, 可直接证实骨髓细胞分化为肝细胞并恢复肝功能。因为 FAH^{-/-}小鼠在肝毒性代谢产物延胡索酰乙酰乙酸酶及其前体马来酰醋酸酶的积累下会造成肝永久性损伤, 只有在分解肝毒性代谢产物相关药物 2-nitro-4-trifluoro-methylbenzylol-1, 3-cyclohexanedione (NTBC)存在的条件下才能存活。利用该原理, 曾有学者将代谢功能正常小鼠中分离出来的高度纯化的造血干细胞(c-kit^{hi}Thy^{low}Lin-Sca-1⁻)移植到 FAH^{-/-}小鼠中, 结果发现, 即使在去除 NTBC 的情况下, 仍有 30% 的小鼠在造血干细胞移植后存活, 且在這些小鼠体内检测到了 FAH 正常的肝细胞^[20]。另有一些研究也证明, 用 HGF 处理后的小鼠骨髓间充质细胞能有效参与 CCl₄ 损伤小鼠的肝脏修复, 骨髓造血干细胞在肝脏中可转化为肝细胞, 并具备正常肝细胞的功能^[10,21-24]。

2.2 骨髓源干细胞跨越分化肝细胞的机制

骨髓源干细胞是如何实现肝细胞跨越分化的, 尚存在不同观点。早期的研究认为, 骨髓来源的肝细胞是供体造血干细胞和受体肝细胞融合产生的,

因为将 $FAH^{+/+}$ 和 Fanconi anaemia group C 基因缺陷 ($Fancc^{-/-}$) 的小鼠骨髓移植入一级受体小鼠 ($FAH^{-/-} Fancc^{+/+}$), 在撤去 NTBC 后, 能产生 $FAH^{+/+} Fancc^{+/+}$ 肝细胞, 再将这些肝细胞植入第二个受体小鼠, 该二级受体小鼠表型为 $FAH^{-/-} Rag^{-/-} Fancc^{+/+}$, 3 个月后检测二级受体小鼠中肝细胞的表型, 如果重建肝功能的肝细胞都来源于骨髓, 则应该是 $FAH^{+/+} Fancc^{-/-}$, 而经 Southern 杂交显示, 二级受体小鼠肝细胞中仅有 30% 是 $FAH^{+/+}$, 28% 是 $Fancc^{-/-}$, 说明重建小鼠肝功能的肝细胞不仅来自于骨髓干细胞的跨越分化, 可能还有供体造血干细胞和受体肝细胞的融合^[25]。另有研究显示, 供体造血干细胞和受体肝细胞融合后开始特异性地表达肝细胞标志物, 而不再表达造血干细胞的 CD45 标记等^[26]。

但是, 一些体外实验证明, 骨髓来源的成体干细胞在特定细胞因子的协同诱导下, 可以不通过融合方式, 直接向肝细胞分化。如在大鼠骨髓细胞培养液中添加 HGF 和 EGF 后, 可以观察到骨髓细胞逐步表达 ALB、CK8 和 CK18 等成熟肝细胞的标记^[27]; 在小鼠和人的骨髓细胞中添加 FGF-4、HGF 和 Matrigel 后, 第 7 天开始检测到细胞表达肝细胞核因子 3 β (HNF-3 β)、AFP、GATA4、CK19 和甲状腺运载蛋白, 第 14~28 天陆续表达 CK18、HNF-4、HNF- α 和 ALB 等成熟肝细胞标志, 第 21 天有 25% 的细胞呈现双核, 并能合成尿素和储存糖原^[2]。Jang 等^[28]设计了一种共培养装置, 更直接证明了骨髓干细胞向肝细胞的跨越分化不是通过细胞融合所致。他们将造血干细胞和损伤的肝细胞共同培养在一种所谓的 Transwell 装置上, 该装置使两种细胞被 0.4 μm 孔径的滤膜隔开, 从而避免了细胞之间接触而发生的融合, 但允许细胞因子透过。72 h 后收集造血干细胞, 检测到这些细胞开始分化, 表达 ALB、CK18 等成熟肝细胞标志, 将这些分化的细胞移植入肝损伤小鼠中, 发现能恢复部分肝功能。另有多项实验也证实骨髓干细胞在特定条件下能直接向肝细胞跨越分化^[28-30]。综上所述, 非肝源性干细胞可以直接跨越分化为肝细胞或与受体成熟肝细胞融合为肝细胞, 这两种途径可能都存在。

3 其他来源成体干细胞向肝细胞的分化

3.1 胰腺上皮祖细胞

胰腺和肝脏具有相似的组织结构及胚层起源, 近年来的一些研究表明, 胰腺上皮祖细胞也能分化

为肝细胞。Dabeva 等^[31]将 Fischer 大鼠胰腺中分离的上皮祖细胞移植至近亲大鼠肝脏, 以二肽二酰酶 IV (DPP IV) 及 ALB 基因的表达为鉴定指标, 发现来自胰腺的上皮祖细胞在肝脏内分化成肝细胞, 并可整合到肝小叶结构中表达特异性蛋白, 说明成年动物的胰腺中存在着多潜能祖细胞, 在体内适当的条件下, 可定向分化为肝细胞。此外, 一些体外诱导实验也得到了类似结果, 如将原代培养的大鼠胰腺外分泌细胞用地塞米松处理, 培养 5 天后, 发现细胞开始分化为肝样细胞, 甲胎蛋白表达明显升高, 肝细胞特异的基因开始表达, 并最终表达 ALB, 而在此过程中, 胰腺细胞的一些特异基因表达下调, 提示成体胰腺组织中的外分泌细胞也能跨越分化为肝细胞^[32]。

3.2 神经干细胞和脂肪组织来源的间充质干细胞向肝细胞分化

目前的初步研究显示, 神经干细胞和脂肪组织来源的间充质干细胞可以向肝细胞分化。用 LacZ 基因和新霉素抗性基因修饰的神经干细胞注射鸡胚或鼠胚, 发现这些干细胞会随着胚胎发育, 分布于胚胎的各个胚层, 并最终分化为多种类型的细胞, 包括肝细胞、心肌细胞和表皮细胞等^[33]。从人脂肪组织分离的间充质干细胞 (hADSC), 在体外通过 HGF 和 OSM 的联合处理, 可以促使其向肝细胞分化, 而且发现在诱导后期添加 DMSO, 可以大大增加分化效率。将 hADSC 移植到 CCl_4 损伤的 NOD/SCID 小鼠模型后, 则可以在体内分化为肝实质细胞, 表达 ALB 等成熟肝细胞标志^[34]。

3.3 脐带血来源干细胞向肝细胞的分化

许多体内实验显示, 人脐带血来源的干细胞能在小鼠肝内跨越分化为肝细胞。如将人脐带血单个核细胞注入 NOD/SCID 小鼠中, 发现脐带血细胞能整合入小鼠肝中并分化为成熟肝细胞, 利用荧光原位杂交技术, 分析小鼠肝内的人源细胞 DNA, 发现整合和分化的人源细胞并没有与小鼠细胞发生融合^[35]。同样, 将转有 GFP 质粒的人脐血 $\text{CD}34^+ \text{Lin}^-$ 细胞植入发育至 45~55 天的胎羊中, 结果在胎羊肝脏中检测到了表达人肝细胞特征抗原、白蛋白、肝细胞核因子及 GFP 的细胞, DNA 定量分析同样发现这些细胞没有发生融合^[36]。将人脐带血中分离的 $\text{CD}34^+ \text{CD}38^- \text{CD}7^-$ 造血干细胞移植入免疫缺陷小鼠肝损伤模型, 在移植的一个月后用 CCl_4 诱导肝损伤, 结果在移植了脐带血造血干细胞的小鼠肝中检测到

人特异的 ALB mRNA, 并在小鼠血清中检测到人 ALB, 而在未移植造血干细胞的损伤小鼠或者移植了造血干细胞的未损伤小鼠中均未检测到人 ALB 的表达, 提示肝损伤微环境是造血干细胞体内分化为肝细胞的重要条件^[37]。另有一些体外实验也证明脐带血来源的干细胞能在特定细胞因子的组合诱导下分化为肝细胞, 目前已报道的细胞因子组合包括 FGF-1、FGF-2、SCF、LIF、HGF 和 OSM, 在这些因子的诱导下, 脐带血干细胞于 21 天后开始表达 CK19、ALB 和 CK18 等肝细胞特异性标志^[38]。最近, 有人采用 HGF、Dex、ITS 和 OSM 组合, 成功诱导了人脐带血间充质干细胞体外分化为肝细胞^[39]。

4 肝脏疾病与干细胞治疗

肝脏是体内最重要和最复杂的器官之一, 具有生物转化和排泌胆汁等重要功能。就肝脏疾病的细胞治疗而言, 成熟肝细胞是较理想的细胞来源; 但是动物模型中进行的肝细胞移植治疗发现, 只有不到 1% 的肝细胞被替代, 治疗效果不佳。肝细胞移植要求细胞数量大, 而常规从肝脏分离的高度分化的成熟肝细胞增殖十分缓慢, 影响了移植治疗效果, 因此, 寻找新的细胞来源对肝脏疾病的细胞治疗十分重要。近年来, 胚胎干细胞、成体干细胞和治疗性克隆等的发展, 为临床修复重建肝脏的治疗开创了全新的领域。相对于胚胎干细胞, 成体干细胞来源丰富, 尤其可以来源于患者自身, 不存在社会伦理和免疫排斥等问题, 在临床应用方面显示出巨大的前景。

参考文献 (References)

- [1] Cogle CR *et al. Lancet*, 2004, **363**: 1432
- [2] Schwartz RE *et al. J Clin Invest*, 2002, **109**: 1291
- [3] Spees JL *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 2397
- [4] 王 萍等. *中华肝病杂志*, 2004, **12**: 718
- [5] Suzuki A *et al. J Cell Biol*, 2002, **156**: 173
- [6] Wang X *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100 Suppl 1**: 11881
- [7] Wang J *et al. Cells Tissues Organs*, 2003, **173**: 193
- [8] Petersen BE *et al. Hepatology*, 1998, **27**: 433
- [9] Theise ND *et al. Hepatology*, 2000, **32**: 11
- [10] Alison MR *et al. Nature*, 2000, **406**: 257
- [11] Nitou M *et al. Exp Cell Res*, 2002, **279**: 330
- [12] Holic N *et al. Am J Pathol*, 2000, **157**: 537
- [13] Suzuki A *et al. Hepatology*, 2000, **32**: 1230
- [14] Minguet S *et al. J Clin Invest*, 2003, **112**: 1152
- [15] Suzuki A *et al. Hepatogastroenterology*, 2004, **51**: 423
- [16] Kubota H *et al. Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, **97**: 12132
- [17] Tanimizu N *et al. J Cell Sci*, 2003, **116**: 1775
- [18] Petersen BE *et al. Science*, 1999, **284**: 1168
- [19] Theise ND *et al. Hepatology*, 2000, **31**: 235
- [20] Lagasse E *et al. Nat Med*, 2000, **6**: 1229
- [21] Oyagi S *et al. J Hepatol*, 2006, **44**: 742
- [22] Gupta S. *Semin Cancer Biol*, 2000, **10**: 161
- [23] Terada N *et al. Nature*, 2002, **416**: 542
- [24] Ying Q L *et al. Nature*, 2002, **416**: 545
- [25] Wang X *et al. Nature*, 2003, **422**: 897
- [26] Vassilopoulos G *et al. Nature*, 2003, **422**: 901
- [27] Miyazaki M *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **298**: 24
- [28] Jang YY *et al. Nat Cell Biol*, 2004, **6**: 532
- [29] Almeida-Porada G *et al. Blood*, 2004, **104**: 2582
- [30] Okumoto K *et al. J Hepatol*, 2005, **43**: 110
- [31] Dabeva MD *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 7356
- [32] Lardon J *et al. Hepatology*, 2004, **39**: 1499
- [33] Clarke DL *et al. Science*, 2000, **288**: 1660
- [34] Seo M J *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **328**: 258
- [35] Newsome PN *et al. Gastroenterology*, 2003, **124**: 1891
- [36] Zeng F *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**: 7801
- [37] Wang X *et al. Blood*, 2003, **101**: 4201
- [38] Kakinuma S *et al. Stem Cells*, 2003, **21**: 217
- [39] Hong SH *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **330**: 1153

Differentiation of Adult Stem Cells into Hepatocytes

Xue-Jun Dong*, Guo-Rong Zhang, Ye Chen¹, Li-Xin Xiang¹, Ruo-Lang Pan¹, Jian-Zhong Shao¹

(*Shaoxing People's Hospital, Shaoxing 312000, China; ¹College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China*)

Abstract The ability of adult stem cells to transdifferentiate into other embryonal layers-derived cells crossing lineage boundaries has now been demonstrated, which plays an important role in understanding the mechanism of interdifferentiation among different embryonal layers cells. And besides, it also provides new cell sources for clinic cell transplantation. Thus, transdifferentiation is currently causing heated debate in the scientific press. This article focuses on the development of adult stem cells transdifferentiate into hepatocytes in recent years. We summarize the isolation, identification, surface makers, biological characteristics and the transdifferentiation mechanism of hepatic oval cells, hepatoblast and extrahepatic stem cells like bone marrow-derived stem cells, pancreatic epithelial progenitor cells, adult neural stem cells, adipose stromal cells and human cord blood-derived stem cells. Their contributions to cell-based therapy for liver diseases have also been anticipated.

Key words adult stem cell; transdifferentiation; hepatocytes; oval cell; hepatoblast

Received: May 11, 2006 Accepted: September 5, 2006

This work is supported by the Science and Technology Program of Shaoxing (No.2005141)

*Corresponding author. Tel: 86-575-5228572, E-mail: dxj9666@163.com