

肝外胆管组织中干性细胞的研究现状和应用潜能

王紫君 刘清桂 王敏君 胡以平 陈费*

(中国人民解放军海军军医大学基础医学院细胞生物学教研室, 上海 200433)

摘要 肝外胆管是肝脏胆管系统的组成部分, 包括胆囊、胆总管等组织。近年来研究发现肝外胆管组织中存在一群具有干性特征的细胞。这群细胞在体外可以扩增培养, 形成类器官结构, 改变培养条件可以使胆管上皮干性细胞分化为具有一定功能的肝细胞、胆管细胞以及胰腺 β 样细胞等。将分化后的功能细胞分别植入肝脏受损、胆管缺陷、胰腺受损的模型小鼠中, 功能细胞可以修复模型小鼠受损的肝脏或胆管, 分化后的功能细胞甚至可以在胰腺受损的模型小鼠中分泌胰岛素。该文描述了肝外胆管组织的发育过程, 阐明了干细胞的定位分布与具体特征, 介绍了肝外胆管组织干细胞治疗疾病的相关应用, 为后续研究启发思路并提供参考。

关键词 肝外胆管组织; 胆管发育; 肝脏损伤; 细胞治疗

Stem Cells in Extrahepatic Bile Ducts: Current Research Status and Potential Applications

WANG Zijun, LIU Qinggui, WANG Minjun, HU Yiping, CHEN Fei*

(Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract EHBDs (extrahepatic bile ducts) are parts of liver bile duct system, which include gallbladder, common bile duct, etc. Recently, a group of cells with stemness characteristics in EHBDs are identified. These cells could be expanded and grow into organoids *in vitro*. Also, they could differentiate into functional hepatocytes, cholangiocytes or pancreatic β -like cells, under the certain conditional medium. The differentiated functional cells could restore the liver function, repair the injured bile duct, and even secrete insulin when they were transplanted respectively into the model mice with liver damage, bile duct defect and pancreas damage. This review describes developmental progress of EHBDs, elucidates distribution and characteristics of EHBDs stem cells, and introduces clinical applications in treatments of diseases by EHBDs stem cells. These could inspire thoughts and provide references for further study of EHBDs.

Keywords extrahepatic bile ducts; bile duct development; liver injury; cell therapy

胆管系统(biliary tree system)是由不同大小、相互连接的胆管组成的三维网络组织结构, 包括肝内胆管(intrahepatic bile ducts, IHBDs)和肝外胆管(extrahepatic bile ducts, EHBDs)。肝内胆管一般被认为起始于肝脏内的毛细胆管(canalicular), 连接到赫

管(canal of herring's), 延伸至小胆管、小叶间胆管, 以及门管区胆管^[1-2]。肝脏组织以外的胆管结构(包括肝管、胆囊、胆囊管、胆总管和肝胰总管)被统称为肝外胆管, 是连接肝脏、胰腺与肠道的管道^[3]。肝内胆管和肝外胆管在空间、功能和发育上具有连续

收稿日期: 2022-09-15

接受日期: 2022-11-21

上海市自然科学基金(批准号: 21ZR1477400)和上海市人才发展资金(批准号: 2021080)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13020100779, E-mail: twinkky@163.com

Received: September 15, 2022

Accepted: November 21, 2022

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shanghai (Grant No.21ZR1477400) and the Shanghai Talent Development Fund (Grant No.2021080)

*Corresponding author. Tel: +86-13020100779, E-mail: twinkky@163.com

性。研究表明,肝内胆管主要是由胚胎期肝脏原基细胞(liver primordium)分化而来;肝外胆管则来自腹侧前肠的PDX1⁺/SOX17⁺祖细胞,二者均起源于内胚层细胞^[4-7]。

在成人的肝脏组织中发现有干/前体细胞的存在。肝干/前体细胞(hepatic stem/progenitor cells, HpSCs)一般位于赫令管或者小叶内胆管,可分化为成熟的肝细胞和胆管细胞^[8-10]。而在肝外胆管组织中的干细胞被称为胆管干/前体细胞(biliary tree stem/progenitor cells, BTSCs),是一种多潜能细胞,主要分布于胆管周围腺体(peribiliary glands, PBGs)内,能够分化为肝脏和胰腺细胞系,产生成熟的胆管细胞、肝细胞和胰岛细胞^[11-12]。PBGs主要存在于肝外胆管组织,在肝脏组织内少见。BTSCs位于PBGs底部,可通过特定干细胞标志物(如SOX17、PDX1、SOX9、EpCAM、SAL4和LGR5)进行识别,而它们通常缺乏成熟细胞的标志物(如SR、ALB、INS)^[13-14]。BTSCs还表达多能干细胞的标志物(如OCT4、SOX2和NANOG)。体外实验也证实了BTSCs具有干细胞特征:它们可在Kubota建立的肝干细胞生长培养基(Kubota's medium, KM)中生长数月,并保持未分化的细胞表型(如SOX9⁺/SOX17⁺/PDX1⁺和ALB⁻/SR⁻/INS⁻);更换为分化培养基时,BTSCs则能分化为成熟细胞,如具有功能的肝细胞、胆管细胞等^[15-16]。胆囊组织中没有检测到PBGs的存在,但在其上皮的隐窝部位发现了大量可以通过表面标志物EpCAM分选富集出来的具有内胚层干/前体细胞特性的胆囊干性细胞,它们可以被体外培养并具有分化能力^[17]。

随着对肝外胆管组织中细胞特性研究的深入,人们逐渐意识到这是一类丰富的细胞库,可以在获取后大量扩增并按照意愿改造或者定向分化,有望作为治疗相关疾病的细胞供体。本文对肝外胆管组织的发育、干细胞类型和特性以及相关应用案例作出描述和概括,以期后续研究奠定理论基础和提供思路。

1 肝外胆管组织的发育过程

人类胚胎第18天时,在第7体节(somite)部位,肝憩室(hepatic diverticulum)开始发育。肝憩室正是肝外胆管与肝脏的第一个连接位点。第22天,憩室形成。憩室是中空的结构,研究人员将肝憩室分为头部(pars hepatica)和尾部(pars cystic)。内胚层细胞从

憩室的腹侧表面衍生到横膈(septum transversum),形成最早的肝脏^[18-20]。肝内胆管由憩室的头部发育,而肝外胆管则从尾部发育。憩室的尾部有突出的芽状结构,芽逐渐延伸,成为早期的胆囊、胆囊管、胆总管的分支。妊娠期第4周开始,近端或者远端的胆总管和肝管开始向外延伸。第5周,胆囊管已清晰可见。肝总管的重构也发生在第5周,它变成一个宽阔的漏斗状结构,内胚层也快速增生,在肝门形成多个管道。在妊娠第4周到8周的期间,肝外胆道树通过肝憩室的尾芽持续发展延伸^[19]。妊娠期第8周,可见胰腺-十二指肠交界点,随后交界点逐渐迁移至十二指肠壁内。第11周,胆囊逐渐扩张膨大,其内部腺体向胆囊管和胆管延伸发育。胆总管从第12周开始具有活跃的功能。整个胚胎时期,肝外胆管并没有从肝脏或正在发育的肝内胆管中分离出来。出生后,肝外胆管则随着人体的发育而逐渐成熟^[19]。

调节肝外胆管发育的分子机制虽然还没有被完全熟知,然而有一些关键因子是必不可少的。SPENCE等^[5]和UEMURA等^[21]对调控肝外胆管发育过程的研究表明,构成胆管的上皮细胞起源于表达转录因子PDX1和SOX17的祖细胞。在人类胚胎发育28~32天(小鼠胚胎10.5天),憩室的尾部出现了共同表达SOX17和PDX1的胰/胆管干/前体细胞。缺乏SOX17时,肝外胆管树无法发育,并被胰腺组织细胞替代。在小鼠胚胎中敲除SOX17基因的实验结果显示,SOX17表达缺失的胚胎胆囊发育不全,同时伴随着胰腺组织异位,而肝内胆管组织却不受影响;相反,SOX17的过度表达促进了胆管的发育^[5]。对小鼠胚胎的研究进一步发现,ONECUT家族的转录因子HNF6从发育开始就在小鼠肝脏中表达,在肝外胆管组织尤其是胆囊中也可以检测到它的表达,它对胆管的分化和形态发生至关重要^[22-24]。小鼠胆囊的进一步发育需要Foxf1基因,Foxf1在胚胎横膈以及胆囊间质细胞中表达。Foxf1^{-/-}小鼠胆囊明显较小,结构异常,胆囊外部平滑肌细胞层不足,间充质细胞数量减少,以及在某些情况下缺乏可识别的胆管上皮细胞层^[25]。此外,研究发现,当胚胎缺失HNF-1 β 、HES1基因时,也会导致胆囊发育不全和肝外胆管发育不全^[26-28]。

2 肝外胆管干性细胞的特征

2.1 胆管干性细胞

研究表明,肝外胆管组织中的干细胞主要位于

PBGs。PBGs是位于胆管壁内的管泡结构腺体,通过管道与胆管连接,并在胆管腔内开口^[29]。PBGs主要由腺体上皮细胞组成,具有转运胆汁成分和浓缩胆汁的功能,还有部分分泌能力^[30]。在人和小鼠的肝外胆管中,都发现有PBGs的存在,尤其是在胆管分支点可以发现存在较多的PBGs^[31]。这些腺体在胆管壁的深层组织中成簇排列,BTSCs就存在于这些PBGs里。CARDINALE等^[15]对肝外胆管不同部位的PBGs分布和数量进行分析发现,胆总管的PBGs密度和数量最高,胆囊管和肝门管的数目大致相同,胆管中发现较少,胆囊中没有。

PBGs中含有不同类型的细胞:原位染色结果显示PBGs中存在内胚层祖细胞样以及中间表型的细胞,它们表达CK7、CK19、NCAM、CD133、EpCAM、SOX9、SOX17和PDX1等标志物;双重免疫荧光染色表明,PBGs中还有一类表达干细胞/胆管标志物EpCAM⁺的细胞,同时表达成熟细胞的标志物,例如成熟胆管细胞的分泌素受体(secretin receptor, SR)、胰腺β细胞的胰岛素(insulin, INS)和成熟肝细胞标志物白蛋白(albumin, ALB)^[14]。肝外胆管靠近十二指肠部分的PBGs,可以观察到表达多能性(NANOG、OCT4和SOX2)、自我复制(SALL4)和增殖(Ki67)标志物的干细胞,同时也表达肝脏干/祖细胞(例如SOX9/17)、胰腺(例如PDX1)和内胚层(例如SOX17、EpCAM、NCAM、CXCR4、LGR5、OCT4)的标志物^[5,16]。肝外胆管靠近肝门的位置,PBGs则表达胆管和内胚层标志物(SOX17、SOX9)及少量肝细胞标志物ALB^[5,16]。有趣的是,PDX1很少在胆道上皮中表达,但经常在PBGs细胞中表达。相反,HES1经常在胆管上皮细胞中表达,但在PBGs中的表达有限。PDX1是对胰腺发育至关重要的转录因子,也是胰腺祖细胞的标志物;HES1则是抑制胰腺外分泌和内分泌分化的转录因子,对于胆道的发育和分化很重要;这表明PBGs保留了向胰腺分化的潜能,而上皮细胞的这种分化能力则比较有限^[13,27,32]。

目前已经从肝外胆管组织中成功分离出干性细胞,并且建立了体外培养体系。CARDINALE等^[15]从胆管的不同部位中分离出干/祖细胞,其在体外可生长数月并保持表型稳定。在不同的培养条件下,分离出的干/祖细胞则会分化形成功能肝细胞(表达ALB、CYP3A4和TRF),成熟胆管细胞(表达AE2和CFTR),或胰岛样细胞(表达GCG、INS)。RIM-

LAND等^[33]参考HUCH^[34]的方法,建立了由人胆囊、胆总管、胰管和肝外胆管来源的细胞生成类器官的培养模式。肝外胆管类器官(extrahepatic cholangiocyte organoids, ECOs)表达标志性干/祖细胞标志物(如LGR5和PROM1),而来自IHBDs的类器官则不表达这些标志物。RNA测序显示,ECOs表达与其起源位置相对应的特异性标志物。SEMERARO等^[35]对人胎儿的肝外胆管进行胶原酶消化,将分离出的细胞分别用向肝细胞(HDM-H)、胆管细胞(HDM-C)、胰岛细胞(HDM-P)方向分化的培养基培养。与在KM培养基中培养的细胞相比,经HDM-H分化7天后,大多数细胞直径增加且与成人肝细胞直径相当,可以合成并储存糖原,表达细胞角蛋白18(cytokeratin 18, CK18)和ALB。在HDM-C中分化7天后,细胞显示导管样分枝状结构,表达细胞角蛋白19(CK19)和SR。在HDM-P中分化14天后,细胞聚集成团状结构并且表达胰岛素、C肽和胰高血糖素;在不同浓度的葡萄糖刺激时,C肽分泌量也随之改变,说明这群细胞团应对葡萄糖行使功能。这些数据表明,肝外胆管分离培养的干性细胞有向肝细胞、胆管细胞和胰岛细胞分化的能力。

2.2 胆囊干性细胞

据报道,胆囊组织中未发现有PBGs结构,但是分离得到的胆囊上皮细胞(gallbladder epithelial cells, GBECs)可在体外扩增培养,具有部分干细胞特征。胆囊组织内侧黏膜细胞由单层柱状上皮细胞组成,具有类似小肠绒毛的皱褶和隐窝结构。一般认为在胆囊的隐窝中也有干/祖细胞存在。通过EpCAM从胆囊上皮细胞中分选出干/祖细胞,这些EpCAM⁺细胞在体外培养后具有干细胞特征。首先,它们表达典型内胚层干细胞标志物(LGR5、PDX1、SOX17)和多能干细胞标志物(SOX2、OCT4A、NANOG);其次,这些细胞可以在专为内胚层干细胞/祖细胞设计的培养基中生长和扩增;在不同的培养条件下具有多种分化能力,移植到体内可向成熟细胞类型分化^[36-37]。

早在2007年,KUVER等^[38]验证了GBECs可以被诱导分化为具有肝细胞表型特征的细胞,并证明肝细胞样细胞不是来自造血干细胞或卵圆细胞(oval cells)。KUVER等^[38]从肝细胞特异表达β-半乳糖苷酶(β-Gal)的转基因小鼠中取出胆囊并分离上皮细胞,在体外用两种条件培养:在普通条件下培养的

GBECs没有表现出 β -Gal活性;而在诱导条件下培养的约50%的细胞表达 β -Gal,表明细胞已分化进入肝细胞命运,并且肝细胞中特异性表达的一些基因也呈现出高表达的状态。LEE等^[39]证明分化良好的GBECs移植后可在小鼠肝脏中存活且具有肝细胞特征。他们将从表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的转基因小鼠中分离的GBECs移植到小鼠体内后1至4个月,在受体小鼠的肝脏中检测到GFP⁺细胞。GFP⁺细胞的亚群在形态学与肝细胞相似,并表达肝细胞特异性标志物CX-32和HNF-4 α 。因此,他们认为GBECs能够参与修复小鼠受损伤的肝脏。该研究表明,在没有外源基因重编程的情况下,受体肝脏的微环境足以使外源GBECs亚群分化为肝细胞样细胞。CARPINO等^[17]通过EpCAM分离出胆囊上皮细胞中干/祖细胞群,分选后的EpCAM⁺细胞表现出内胚层干细胞/祖细胞表型特征,具有单细胞克隆形成能力,并在3D培养下可形成类器官。在不同的分化条件下培养,胆囊类器官可形成导管样分支结构或胰岛样结构,或具有成熟肝细胞功能等其他能力。

存在于胆囊中的干/祖细胞易于分离和培养,未被发现致癌能力并且具有多向分化潜能^[40],有望作为细胞治疗中的供体细胞。

3 肝外胆管干细胞治疗疾病的应用潜能

3.1 肝外胆管干性细胞可修复胆管组织

SAMPAZIOTIS等^[41]从人肝外胆管组织中分离获得胆管细胞,用于胆管的修复与重构。他们首先建立了肝外胆管类器官培养体系,ECOs的转录组学特征和功能特性与原代胆管细胞非常相似。接着在动物体内验证了其功能特性。他们将ECOs细胞移植入NSG(NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl)小鼠的肾包膜下,发现它们可形成胆管样结构,表达胆管标志物。又尝试将ECOs消化成单细胞并接种在可降解的生物支架上,ECOs可形成管腔状结构,表达CK19等经典胆管标志物。之后,作者将NSG小鼠的胆囊壁纵向剖开三分之二的长度,建立了肝外胆管损伤(extrahepatic biliary injury, EHBI)模型。将填充了ECOs的生物支架连接至损伤小鼠的胆囊,使其得到重塑,形态与原生胆囊相似。对经ECOs重建的胆囊进行免疫荧光和qRT-PCR分析,结果表明ECOs表达人类细胞特异性抗原(Ku80)以及CK19、CK7、

HNF-1 β 、SOX9、CFTR等胆管标志物。

随后,SAMPAZIOTIS等^[40]又报道了ECOs可以修复人胆管组织。肝脏在离体后缺血条件下会引起胆道损伤。作者开发了新的肝脏体外常温灌注(normalthermic perfusion, NMP)模型,该模型通过给等待移植的肝脏在体外循环灌注含氧温热的血液来起到保护肝脏的作用并减少缺血再灌注带来的损伤。在NMP期间通过检测胆汁的pH值来监控模型是否维持正常。将体外扩增的胆管细胞移植到供体肝脏中,经过鉴定移植的细胞可以植入肝内胆管并稳定地结合在胆管壁上(表达报告基因红色荧光蛋白和胆管特异标志物CK17、CK19、CFTR等),没有出现胆管扩张或阻塞的情况,移植的细胞修复了40%~85%的肝内胆管。通过检测胆汁的生化指标发现,移植外源细胞的肝脏与未移植的肝脏比较,更趋于正常水平。这项研究推动了胆囊来源的细胞治疗肝胆相关疾病的临床进程。

近期有研究发现,肝外胆管细胞可参与修复肝内损伤胆管,有望用于治疗Alagille综合征(Alagille syndrome, ALGS)^[42]。ALGS是一种肝内胆管疾病,由位于胆管细胞的Notch受体2(*NOTCH2*)或者其配体*JAG1*突变引起,其特征是肝内胆管发育缺失导致肝内胆胆汁淤积,其他临床症状表现为肺动脉狭窄、脊柱前弓分裂、智力发育迟缓等。对一些胆汁淤积的症状有缓解的患者的研究发现,肝脏内的胆管有再生现象。因此研究员们以恢复胆道系统作为治疗ALGS的切入点。美国Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute和中国四川大学的研究人员发现肝外胆管干细胞可用于治疗Alagille综合征。DONG团队^[43]通过突变、敲除或Notch抑制剂处理胚胎期的斑马鱼,模仿由Notch信号受损而肝内胆管发育受阻的现象,建立了ALGS斑马鱼模型。研究发现肝内胆管再生高度依赖于Notch信号通路;当Notch信号缺失时,肝外胆管细胞是肝内胆管前体细胞的主要来源,通过增殖迁移至肝脏内部,参与损伤后的胆管再生修复。进一步,抑制Fgf信号通路可促进肝外胆管细胞迁移并加速胆管的修复过程。

3.2 肝外胆管干性细胞可参与修复损伤肝脏

许多研究表明,移植具有功能的肝细胞进入患者体内,可有效缓解疾病引起的肝脏功能衰竭。体外获取具有功能的肝样细胞,有望作为细胞治疗的供体细胞来源。在2014年就有对晚期肝硬化患者通

过肝动脉移植人胎儿胆管干细胞的报道^[44]。CARDINALE等^[44]将肝外胆管组织(包括胆囊)温和分解消化后,分离出EpCAM⁺细胞。将EpCAM⁺细胞悬浮在10%葡萄糖溶液中,浓度为每毫升100万个细胞。将细胞悬液以200 mL/h的输注速度输入到肝动脉中。1号患者接受了4 200万个活的EpCAM⁺细胞。2号患者接受了6 000万个活的EpCAM⁺细胞。从临床来看,两位患者在6个月的随访中都表现出肝功能生化指标改善,并且2号患者在12个月内白蛋白值和凝血指标持续改善。在整个严格随访期间,没有观察到坏死指数(necrosis indexes)的升高,也没有观察到免疫排斥的迹象。遗憾的是,由于细胞并未带有标记,因而无法在体内追踪它们的去向和存活状态。

人肝外胆管上皮细胞移植到免疫缺陷小鼠体内后可以分化为肝细胞。CARDINALE等^[15]将分离的胆管干细胞/祖细胞移植到没有损伤的SCID小鼠的肝脏中,30天后检测显示,在注射部位周围存在人源细胞,部分细胞扩散到门静脉周围和肝窦中。统计结果表明,肝叶总面积 $6.52\% \pm 2.5\%$ 的区域被白蛋白呈阳性的成熟人肝细胞占据。KATOONIZADEH等^[45]研究人员对74例急性肝损伤患者的活检组织进行了组织学评估后发现,损伤持续时间<1周的患者,尽管胆管细胞有反应,但没有出现分化的肝细胞;而与损伤持续1~4周的患者对比,其中超过70%的患者出现了分化的肝细胞(分化的肝细胞表达CK7/CK19),这表明人类的胆管细胞可向肝细胞分化但需要至少1周的时间。

细胞疗法中的一个关键问题是移植细胞的大小。如果细胞很大或细胞形成聚集体,则通过血管途径移植可能产生血栓。如果细胞很小,移植效率可能非常低,并且细胞将有异位分布的倾向。NEVI等^[46]改进了细胞移植方式,用透明质酸包裹移植细胞。当包被的细胞通过脾脏移植到免疫缺陷小鼠的肝脏中时,移植效率提高到11%;通过肝动脉移植包被的细胞后,检测到小鼠肝脏中人白蛋白基因表达量增加了10倍,小鼠血清中人白蛋白水平增加了2倍。该研究为细胞治疗提供了新的研究方向,即可以通过包被细胞的方式来提高移植效率。

3.3 肝外胆管干性细胞分化为胰腺β样细胞

糖尿病是因胰岛素分泌不足或不分泌以及对胰岛素敏感性降低而引起的代谢紊乱综合征,临床

表现是高血糖,常伴有糖尿病肾病、视网膜病变、神经病等并发症。移植具有功能的胰腺β细胞,为糖尿病的细胞治疗提供了新的思路。

胰岛β细胞只存在于胰腺组织中,然而DUTTON等^[47]证明小鼠肝门(hepatic portal)附近也存在β样细胞。肝门是肝脏面正中略有呈“H”形的三条沟,肝固有动脉、门静脉、神经和淋巴管等重要管道由此出入。在胚胎第18.5天至6个月龄的小鼠中,在肝门附近可以检测到少量胰岛素呈阳性的细胞。对这些细胞的谱系追踪发现,其确实从胆管上皮发育而来,不是由胰腺细胞迁徙过来。由此表明胆管细胞具有分化为β细胞的潜能。我们课题组报道了在体外利用小分子化合物组合可将小鼠胆囊干细胞诱导为产生胰岛素的细胞,其移植后在体内表现出功能特征^[48]。从CK19CreERT;Rosa26R-GFP小鼠胆囊中分离出具有干性的细胞,并用小分子化合物组合(Noggin蛋白、ERK和Hedgehog信号通路抑制剂)诱导细胞分化,分化后的细胞可表达胰腺β细胞的典型标志物,将诱导后的细胞移植到糖尿病模型小鼠的腹腔中,可以改善小鼠高血糖的症状。

WANG等^[49]在2016年报道了用携带小鼠PDX1、NGN3和MAFA基因的腺病毒和携带人PAX6基因的腺病毒感染小鼠胆囊细胞的方案,可在体外将超过20%的小鼠胆囊细胞重编程为β样细胞。重编程β样细胞(reprogrammed β-like cells, rGBC2)可合成和分泌胰岛素以响应葡萄糖刺激。对细胞进行转录组测序和分析表明,rGBC2表达谱接近胰腺β细胞,表达关键胰腺β细胞特异性标志物。2017年,GALIVO等^[50]再次报道了人胆囊细胞可以重编程为产生胰岛素的β样细胞。他们首先大规模扩增了人胆囊细胞(gallbladder and cystic duct cells, GBCs);接着利用腺病毒介导GBCs表达胰腺内分泌转录因子PDX1、MAFA、NEUROG3和PAX6,获得了可产生胰岛素的胰腺β样细胞。重编程的GBCs(rGBCs)高表达胰岛素和胰腺内分泌相关基因(如PDX1、MAFA、NEUROG3等),并且在体外对葡萄糖刺激有反应。rGBCs还表达胰岛特异性表面标记物,可用于富集β样细胞。更重要的是,mRNA和microRNA表达谱以及蛋白质免疫染色表明,rGBCs具有胰腺β细胞特征。

这些研究充分表明,肝外胆管细胞可分化为具有功能的胰腺β样细胞。

4 展望

肝外胆管与肝脏、胰腺均起源于内胚层, 这对再生医学以及理解、治疗相关器官的疾病具有重要意义。由于器官供体短缺, 体外获取成熟肝细胞、胆管细胞或功能性胰岛细胞具有重要的科学价值和前景。一直以来, 肝外胆管细胞的研究受到体外难以长期培养和大量扩增困难的技术限制。现有的胆管类器官(ECOs)模式不仅可以提供充足新的细胞来源, 而且为研究胆管的生理学特征和模型疾病提供了新方法。在今后的研究中, 如何通过肝外胆管干细胞获取足够量且具有功能的肝胆胰细胞用于治疗相关疾病, 是值得深入探索的方向。

参考文献 (References)

- [1] SAXENA R, THEISE N. Canals of Hering: recent insights and current knowledge [J]. *Semin Liver Dis*, 2004, 24(1): 43-8.
- [2] CRAWFORD J M. Development of the intrahepatic biliary tree [J]. *Semin Liver Dis*, 2002, 22(3): 213-26.
- [3] ROSKAMS T A, THEISE N D, BALABAUD C, et al. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers [J]. *Hepatology*, 2004, 39(6): 1739-45.
- [4] ZONG Y, STANGER B Z. Molecular mechanisms of liver and bile duct development [J]. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2012, 1(5): 643-55.
- [5] SPENCE J R, LANGE A W, LIN S C, et al. Sox17 regulates organ lineage segregation of ventral foregut progenitor cells [J]. *Dev Cell*, 2009, 17(1): 62-74.
- [6] OFFIELD M F, JETTON T L, LABOSKY P A, et al. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum [J]. *Development*, 1996, 122(3): 983-95.
- [7] CARPENTIER R, SUNER R E, HUL N V, et al. Embryonic ductal plate cells give rise to cholangiocytes, periportal hepatocytes, and adult liver progenitor cells [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(4): 1432-8.
- [8] KUWAHARA R, KOFMAN A V, LANDIS C S, et al. The hepatic stem cell niche: identification by label-retaining cell assay [J]. *Hepatology*, 2008, 47(6): 1994-2002.
- [9] GOUW A S, CLOUSTON A D, THEISE N D. Ductular reactions in human liver: diversity at the interface [J]. *Hepatology*, 2011, 54(5): 1853-63.
- [10] ZHANG L, THEISE N, CHUA M, et al. The stem cell niche of human livers: symmetry between development and regeneration [J]. *Hepatology*, 2008, 48(5): 1598-607.
- [11] LANZONI G, CARDINALE V, CARPINO G. The hepatic, biliary, and pancreatic network of stem/progenitor cell niches in humans: a new reference frame for disease and regeneration [J]. *Hepatology*, 2016, 64(1): 277-86.
- [12] ALVARO D, GAUDIO E. Liver capsule: biliary tree stem cell subpopulations [J]. *Hepatology*, 2016, 64(2): 644.
- [13] IGARASHI S, SATO Y, REN X S, et al. Participation of peribiliary glands in biliary tract pathophysiologies [J]. *World J Hepatol*, 2013, 5(8): 425-32.
- [14] CARPINO G, CARDINALE V, ONORI P, et al. Biliary tree stem/progenitor cells in glands of extrahepatic and intrahepatic bile ducts: an anatomical in situ study yielding evidence of maturational lineages [J]. *J Anat*, 2012, 220(2): 186-99.
- [15] CARDINALE V, WANG Y, CARPINO G, et al. Multipotent stem/progenitor cells in human biliary tree give rise to hepatocytes, cholangiocytes, and pancreatic islets [J]. *Hepatology*, 2011, 54(6): 2159-72.
- [16] WANG Y, LANZONI G, CARPINO G, et al. Biliary tree stem cells, precursors to pancreatic committed progenitors: evidence for possible life-long pancreatic organogenesis [J]. *Stem Cells*, 2013, 31(9): 1966-79.
- [17] CARPINO G, CARDINALE V, GENTILE R, et al. Evidence for multipotent endodermal stem/progenitor cell populations in human gallbladder [J]. *J Hepatol*, 2014, 60(6): 1194-202.
- [18] SEVERN C B. A morphological study of the development of the human liver. II. Establishment of liver parenchyma, extrahepatic ducts and associated venous channels [J]. *Am J Anat*, 1972, 133(1): 85-107.
- [19] TAN C E, MOSCOSO G J. The developing human biliary system at the porta hepatis level between 29 days and 8 weeks of gestation: a way to understanding biliary atresia. Part 1 [J]. *Pathol Int*, 1994, 44(8): 587-99.
- [20] TAN C E, MOSCOSO G J. The developing human biliary system at the porta hepatis level between 11 and 25 weeks of gestation: a way to understanding biliary atresia. Part 2 [J]. *Pathol Int*, 1994, 44(8): 600-10.
- [21] UEMURA M, HARA K, SHITARA H, et al. Expression and function of mouse Sox17 gene in the specification of gallbladder/bile-duct progenitors during early foregut morphogenesis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(1): 357-63.
- [22] LANDRY C, CLOTMAN F, HIOKI T, et al. HNF-6 is expressed in endoderm derivatives and nervous system of the mouse embryo and participates to the cross-regulatory network of liver-enriched transcription factors [J]. *Dev Biol*, 1997, 192(2): 247-57.
- [23] RAUSA F, SAMADANI U, 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 [J]. *Dev Biol*, 1997, 192(2): 228-46.
- [24] CLOTMAN F, LANNOY V J, REBER M, et al. The onecut transcription factor HNF6 is required for normal development of the biliary tract [J]. *Development*, 2002, 129(8): 1819-28.
- [25] KALINICHENKO V V, ZHOU Y, BHATTACHARYYA D, et al. Haploinsufficiency of the mouse Forkhead Box f1 gene causes defects in gall bladder development [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(14): 12369-74.
- [26] COFFINIER C, GRESH L, FIETTE L, et al. Bile system morphogenesis defects and liver dysfunction upon targeted deletion of HNF1beta [J]. *Development*, 2002, 129(8): 1829-38.
- [27] SUMAZAKI R, SHIOJIRI N, ISOYAMA S, et al. Conversion of biliary system to pancreatic tissue in Hes1-deficient mice [J]. *Nat Genet*, 2004, 36(1): 83-7.
- [28] ISHIBASHI M, ANG S L, SHIOTA K, et al. Targeted disruption of mammalian hairy and enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects [J]. *Genes Dev*,

- 1995, 9(24): 3136-48.
- [29] NAKANUMA Y, HOSO M, SANZEN T, et al. Microstructure and development of the normal and pathologic biliary tract in humans, including blood supply [J]. *Microsc Res Tech*, 1997, 38(6): 552-70.
- [30] TERADA T, KIDA T, NAKANUMA Y. Extrahepatic peribiliary glands express alpha-amylase isozymes, trypsin and pancreatic lipase: an immunohistochemical analysis [J]. *Hepatology*, 1993, 18(4): 803-8.
- [31] TERADA T, NAKANUMA Y. Development of human intrahepatic peribiliary glands. Histological, keratin immunohistochemical, and mucus histochemical analyses [J]. *Lab Invest*, 1993, 68(3): 261-9.
- [32] FUKUDA A, KAWAGUCHI Y, FURUYAMA K, et al. Ectopic pancreas formation in Hes1-knockout mice reveals plasticity of endodermal progenitors of the gut, bile duct, and pancreas [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(6): 1484-93.
- [33] RIMLAND C A, TILSON S G, MORELL C M, et al. Regional differences in human biliary tissues and corresponding *in vitro*-derived organoids [J]. *Hepatology*, 2021, 73(1): 247-67.
- [34] HUCH M, GEHART H, VAN BOXTEL R, et al. Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver [J]. *Cell*, 2015, 160(1/2): 299-312.
- [35] SEMERARO R, CARPINO G, CARDINALE V, et al. Multipotent stem/progenitor cells in the human foetal biliary tree [J]. *J Hepatol*, 2012, 57(5): 987-94.
- [36] SANCHO-BRU P, NAJIMI M, CARUSO M, et al. Stem and progenitor cells for liver repopulation: can we standardise the process from bench to bedside [J]? *Gut*, 2009, 58(4): 594-603.
- [37] FORBES S J, NEWSOME P N. New horizons for stem cell therapy in liver disease [J]. *J Hepatol*, 2012, 56(2): 496-9.
- [38] KUIVER R, SAVARD C E, LEE S K, et al. Murine gallbladder epithelial cells can differentiate into hepatocyte-like cells *in vitro* [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 293(5): G944-55.
- [39] LEE S P, SAVARD C E, KUIVER R. Gallbladder epithelial cells that engraft in mouse liver can differentiate into hepatocyte-like cells [J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(3): 842-53.
- [40] SAMPAZIOTIS F, MURARO D, TYSOE O C, et al. Cholangiocyte organoids can repair bile ducts after transplantation in the human liver [J]. *Science*, 2021, 371(6531): 839-46.
- [41] SAMPAZIOTIS F, JUSTIN A W, TYSOE O C, et al. Reconstruction of the mouse extrahepatic biliary tree using primary human extrahepatic cholangiocyte organoids [J]. *Nat Med*, 2017, 23(8): 954-63.
- [42] KOHUT T J, GILBERT M A, LOOMES K M. Alagille syndrome: a focused review on clinical features, genetics, and treatment [J]. *Semin Liver Dis*, 2021, 41(4): 525-37.
- [43] ZHAO C, LANCMAN J J, YANG Y, et al. Intrahepatic cholangiocyte regeneration from an Fgf-dependent extrahepatic progenitor niche in a zebrafish model of Alagille syndrome [J]. *Hepatology*, 2022, 75(3): 567-83.
- [44] CARDINALE V, CARPINO G, GENTILE R, et al. Transplantation of human fetal biliary tree stem/progenitor cells into two patients with advanced liver cirrhosis [J]. *BMC Gastroenterol*, 2014, 14: 204.
- [45] KATOONIZADEH A, NEVENS F, VERSLYPE C, et al. Liver regeneration in acute severe liver impairment: a clinicopathological correlation study [J]. *Liver Int*, 2006, 26(10): 1225-33.
- [46] NEVI L, CARPINO G, COSTANTINI D, et al. Hyaluronan coating improves liver engraftment of transplanted human biliary tree stem/progenitor cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 68.
- [47] DUTTON J R, CHILLINGWORTH N L, EBERHARD D, et al. Beta cells occur naturally in extrahepatic bile ducts of mice [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 2): 239-45.
- [48] CHEN F, LI T, SUN Y, et al. Generation of insulin-secreting cells from mouse gallbladder stem cells by small molecules *in vitro* [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 289.
- [49] WANG Y, GALIVO F, PELZ C, et al. Efficient generation of pancreatic beta-like cells from the mouse gallbladder [J]. *Stem Cell Res*, 2016, 17(3): 587-96.
- [50] GALIVO F, BENEDETTI E, WANG Y, et al. Reprogramming human gallbladder cells into insulin-producing beta-like cells [J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e181812.