

文章编号:1005-6947(2007)03-0269-03

· 专家讲座 ·

应用肝干细胞治疗难治性肝病的进展

陈积圣, 商昌珍

(中山大学附属第二医院 肝胆外科, 广东 广州 510120)

摘要: 由于肝干细胞具有多源性、增殖能力强等特性,使得肝干细胞移植有望成为治疗各种难治性肝病的一种高效手段;近年来,关于肝干细胞的基础研究已取得重大进展,但依然存在众多问题需要进一步探索。笔者对肝干细胞治疗难治性肝病的进展作一综述。

[中国普通外科杂志,2007,16(3):269-271]

关键词: 肝干细胞; 肝疾病/治疗; 综述文献

中图分类号: R333.4; R657.3

文献标识码: A

目前,应用细胞移植治疗人体各种难治性疾病研究取得了重大进展,其中最为成熟的当属运用造血干细胞移植治疗血液系统疾病。此外,运用自体骨髓干细胞治疗心肌梗死、帕金森氏病,构建组织工程骨亦有临床应用报道。而在各种难治性肝病的治疗领域,肝细胞移植因供体来源有限、保存扩增困难等制约因素的存在,难以得到广泛应用。近年来,由于肝干细胞移植研究的开展及进步,使得肝干细胞有望成为治疗难治性肝病的一种高效手段。同时,也应清醒的认识到,肝干细胞基础研究到广泛临床应用仍有诸多问题需要认识和解决。

1 肝干细胞的来源及分类

肝干细胞可分为肝源性和非肝源性两大类,目前较为明确的为前者,主要包括肝卵圆细胞;后者包括胚胎干细胞和成体干细胞两大类,而关于成体干细胞的研究主要聚焦于骨髓干细胞向肝细胞的分化研究。

1.1 肝卵圆细胞

目前对卵圆细胞起源仍缺乏明确的认识,但大量的相关研究已证实肝卵圆细胞的确存在,并定位于肝内胆管树和 Hering 管上,其中一部分肝

卵圆细胞由骨髓源前体细胞演变而来。卵圆细胞的形态学和免疫组化方面与胆管上皮细胞相似,形态呈卵圆形,体积较肝细胞小,有较高的核浆比例。研究发现当肝脏受到严重的损害,并且损伤后的肝再生功能受到抑制而导致肝细胞不能增生或受有丝分裂原抑制剂损伤时,肝细胞大量丢失,肝卵圆细胞则出现增殖,并分化为肝细胞和胆管细胞来完成肝脏结构与功能的重建。在人类肝脏中,卵圆细胞数量的变化随肝病严重程度加重而增加。

1.2 胚胎干细胞

胚胎干细胞是从哺乳动物的囊胚内细胞和原始生殖细胞经体外分化、抑制培养并分离克隆出来的一种原始、高度未分化细胞,具有自我复制、更新和发育全能性,并能产生后代的能力,在特定条件下可分化为人体 200 多种细胞类型,并可构建成心、肝、肾等各种组织和器官,最后能发展成一个完整的个体。关于定向诱导胚胎细胞分化为肝脏细胞的研究已有较多报道^[1-4],诱导方式尽相同,包括使用外源性诱导因子、共培养、转基因等,但多数研究尚处于探索阶段。

1.3 骨髓干细胞

骨髓干细胞是存在于骨髓中的具有高度自我更新和多向化潜能的干细胞群体。近年研究发现,机体除骨髓外,在脐血、脂肪、外周血及部分器官中也存在骨髓干细胞,但由于骨髓中骨髓干

收稿日期:2006-08-09; 修订日期:2006-11-09。

作者简介: 陈积圣,男,广东人,中山大学附属第二医院肝胆外科教授,博士生导师,主要从事肝干细胞方面的研究。

通讯作者: 陈积圣 E-mail: jishengchen1@163.com。

细胞的取材、分离、增殖培养方便及含量相对较高,故骨髓依然是骨髓干细胞的最主要来源。随着对肝干细胞研究的深入,目前已经证明骨髓中某些干细胞具有向肝系细胞分化的潜能,于是出现了“骨髓源性肝干细胞”这一概念。近年来的相关研究又发现骨髓中造血干细胞、间充质干细胞等均可作为肝细胞的起源细胞。因此,分离培养、诱导分化用于肝病治疗的骨髓源性肝干细胞研究受到广泛重视。

2 肝干细胞研究现状

2.1 肝源性肝干细胞研究

目前对具有肝干细胞特性的肝卵圆细胞的研究重点,主要是致力于阐明卵圆细胞的增殖和调控分化的机制,同时建立一个优化的卵圆细胞增殖和分化的实验。

2.2 非肝源性肝干细胞

骨髓中的干细胞主要包括造血干细胞和间充质干细胞。研究表明,这两类细胞在特定的条件下均可向肝细胞方向分化,且具有强大的增殖能力、取材容易、损伤小、易于自体移植,无排斥反应等诸多特点,同时还便于外源性基因的转染和表达调控。造血干细胞移植技术已经逐渐成熟并且得到广泛的应用,已经成为治疗恶性血液病和实体瘤等疾病的可靠选择。但定向诱导骨髓干细胞分化为肝细胞目前还处于体外实验阶段,尤其是骨髓源性肝干细胞体内移植研究急待深入探索。

2001年,Hamazaki等^[1]报道首次在体外将小鼠胚胎干细胞定向分化为肝细胞样细胞,在未添加生长因子情况下能表达内胚层特异性基因,如甲胎蛋白(AFP)、 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶($\alpha 1$ -AT)及白蛋白(ALB);而在添加生长因子情况下则能表达肝细胞后期标志物,如酪氨酸氨基转移酶、葡萄糖-6-磷酸酶。其后相继出现利用不同诱导手段从胚胎干细胞中分化得到肝干细胞的报道。2005年开始,体内移植研究以及纯化技术研究也逐渐开展。Teratani等^[5]报道,胚胎干细胞不经过拟胚体阶段,在诱导因子作用下直接分化为有功能的成熟肝细胞,并移植到小鼠肝损伤模型体

内,采用荧光示踪剂发现移植细胞弥散分布到损伤肝脏内,并大量增殖。该研究认为,拟胚体中或多或少含有未完全分化的细胞,不适用于移植,而且拟胚体分化是一个不可监测的过程。Kumashiro等^[6]为获得可以安全供体内移植用的胚胎干细胞源性肝细胞,采用梯度离心、磁珠分选(MACS)和流式细胞仪分选(FACS)3种细胞分选方式纯化分化细胞。Teramoto等^[7]对胚胎干细胞分化为细胞的效率和安全性问题进行了目前为止最为系统的阐述。他们认为,为迎合未来胚胎干细胞治疗肝衰竭的需要,尤其是对于急性肝衰竭的细胞治疗,保证提供及时、足量的胚胎干细胞源性肝细胞是最基本的前提,而这就需要对目前的诱导、纯化方式进行改进。

3 肝干细胞研究存在的问题及解决策略

3.1 肝干细胞获得效率问题

目前,特别需要深入探索肝干细胞体外培养的最佳条件,以改进技术路线及诱导体系,从而提高肝干细胞获得效率。未来研究应重视诱导过程中肝干细胞关键分子标志物在基因、蛋白质水平的改变,并进一步发现这种改变与培养方式的相关性,从而选择改进最适合促进肝干细胞标志物高表达的培养环境和手段。在胚胎干细胞分化为肝干细胞研究领域,已有研究者通过改变培养手段来提高肝干细胞获得率。Rambhatla等^[8]为提高肝干细胞获得效率,利用丁酸钠诱导胚胎干细胞向肝干细胞方向分化,获得75%~80%纯度的白蛋白阳性细胞,比之前报道的肝干细胞获得效率提高了3倍左右。提高肝干细胞获得效率的另外一种手段就是由混杂细胞筛选出纯化的肝干细胞,主要纯化手段包括根据细胞表面标志分选、根据细胞功能分选,但技术均不成熟,且耗费大,效率低下。

3.2 细胞体内移植面临的问题

体外细胞实验的最终目的,是构建功能性的器官以替代宿主原有功能不全器官,或移植到宿主体内,通过移植细胞的不断增殖逐渐发挥框架器官功能。肝脏所提供的良好生长环境有利于移植细胞的生长,而其分泌的细胞因子更可以促使

肝干细胞移植的首选部位。但尚需解决的问题有:(1)移植“时机”问题。由卵圆细胞、骨髓干细胞或胚胎干细胞获得的肝干细胞,在其发育成熟的哪一个阶段进行体内移植可以达到最佳效果?目前尚无明确定论。在细胞分化早期移植,细胞未具备肝干细胞重要标志或功能;在细胞分化晚期移植,其增殖能力已大为降低,移植入肝内难以改善肝脏功能。(2)移植数量问题。在动物实验中,肝干细胞移植数量级别一般在 $10^6 \sim 10^7$,数量太少,在肝内难以发挥作用;移植数量太大,又面临肝内血管阻塞等危险(如细胞通过门静脉移植,则存在造成肝内门静脉管道阻塞可能)。而适合人体肝内移植的细胞数量尚无报道,需要大量临床前研究来摸索最适合人类肝内移植的细胞数量。(3)细胞移植后肝内定位跟踪。目前,最为常用的体内移植细胞示踪剂多为荧光物质(如:GFP报告基因、CFDA-SE等),国外也有报道将携带Y染色体的肝干细胞移植到雌性动物肝内,通过Y染色体示踪。上述方法存在的问题是了解移植细胞体内定居、增殖情况时,均需取得肝脏组织做病理切片检查,这就失去了动态观察移植细胞在宿主体内连续性变化的机会,同时不适合临床应用。活体示踪剂可以动态连续的观察移植细胞在受体肝内的定居、增殖情况,成为近年来细胞移植研究领域的热点技术,但活体示踪剂标记效率不高的问题尚未解决。所以,一种良好示踪剂的寻找成为细胞移植必须攻克的难题。

4 应用前景

虽然应用于干细胞治疗难治性肝病的研究尚处于初始阶段,但其未来的应用前景十分广阔:如运用生物人工肝技术治疗常见的慢性重型肝炎所致肝功能不全、肝功能衰竭;且肝干细胞也正在成为生物人工肝技术最重要的细胞来源。一种基于人肝干细胞工程的体外人工肝辅助装置,已经由美国VT生物技术公司研制成功并将进入我国临床研究。我国病毒性肝炎发病率达113.2/10万人,

乙型肝炎病毒感染约1.2亿,丙型肝炎及戊型肝炎发病也在增加,约30%肝炎最终因肝功能衰竭而死亡,5年内有12%~20%慢性肝炎转变为肝硬化,有6%~15%肝硬化转变为肝细胞癌并终发展为肝功能衰竭,而急性肝衰竭病死率高达60%~80%。肝移植由于供肝缺乏等难题仅在美国每年就有1131名患者在等待移植过程中死亡。此外,肝干细胞还可以作为基因治疗的载体或靶细胞用以治疗肝硬化、肝癌、遗传性代谢性肝病、Wilson氏病等难治性肝病。

总之,肝细胞及肝干细胞移植为上述难治性肝病的治疗提供了一个新思路,相信随着对肝干细胞研究的不断深入,各种难治性肝病治疗中的许多问题将逐步得到解决。

参考文献:

- [1] Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, *et al.* Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro [J]. *FEBS Lett.* 2001, 497(1): 15-19.
- [2] Chinzei R, Tanaka Y, Shimizu-Saito K, *et al.* Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic Stem cell line show differentiation into functional hepatocytes [J]. *Hepatology.* 2002, 36(1): 22-29.
- [3] Yamamoto H, Quinn G, Asari A, *et al.* Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes: biological functions and therapeutic application [J]. *Hepatology.* 2003, 37(5): 983-993.
- [4] Kanda S, Shiroy A, Ouji Y, *et al.* In vitro differentiation of hepatocyte-like cells from embryonic stem cells promoted by gene transfer of hepatocyte nuclear factor 3 beta [J]. *Hepatol Res.* 2003, 26(3): 225-231.
- [5] Teratani T, Yamamoto H, Aoyagi K, *et al.* Direct hepatic fate specification from mouse embryonic stem cells [J]. *Hepatology.* 2005, 41(4): 836-846.
- [6] Kumashiro Y, Teramoto K, Shimizu-Saito K, *et al.* Isolation of Hepatocyte-like Cells From Mouse Embryoid Body Cells [J]. *Transplant Proc.* 2005, 37(1): 299-300.
- [7] Teramoto K, Asahina K, Kumashiro Y, *et al.* Hepatocyte differentiation from embryonic stem cells and umbilical cord blood cells [J]. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2005, 12(3): 196-202.
- [8] Rambhatla L, Chiu CP, Kundu P, *et al.* Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells [J]. *Cell Transplant.* 2003, 12(1): 1-11.