

· 论 著 ·

小鼠单纯肝切除后再生肝组织内大小核分裂相和卵圆细胞的观察

余宏宇¹,李文林²,谢东甫²,张 朵²,肖承志³,孙志勇¹,何 金¹,孙 静¹,苏 娟²,李建秀²,朱明华⁴,Joseph T Lau⁵,胡以平^{2*}

(1. 第二军医大学长征医院病理科,上海 200003; 2. 第二军医大学基础医学部细胞生物学教研室,上海 200433; 3. 西藏军区总医院神经烧伤科,拉萨 850003; 4. 第二军医大学长海医院病理科,上海 200433; 5. The Department of Molecular and Cellular Biology, Roswell Park Cancer Institute, Elm and Carlton Streets, Buffalo, NY 14263, USA)

[摘要] **目的:**探究 C57 小鼠单纯 2/3 肝切除后肝组织内与再生和肝干细胞有关的病理形态学变化及其意义。**方法:**在 4 个对照组(正常组、假手术组、倒千里光碱组和倒千里光碱 2/3 肝切除组)的参照下,观察实验组 C57 小鼠单纯 2/3 肝切除后不同时间肝脏病理形态变化(核分裂相和卵圆细胞等)和 CK19、AFP 免疫组化检测情况。**结果:**单纯 2/3 肝切除后小鼠均出现不同程度的成熟肝细胞通过大核分裂相分裂增生、轻重不等的小胆管/终末胆管增生反应和个别例中有类似于倒千里光碱肝切除模型组的卵圆细胞增生;尤其还有大小核分裂相分布等一些文献未提及的形态学改变。**结论:**本研究提出肝流域假说的初步设想:肝内成体干细胞存在于小胆管/终末胆管附近,是肝主质细胞的重要源头;在其向中央静脉方向的流向上产生各级分化程度不同的子代(自卵圆细胞到小肝细胞、成熟肝细胞),沿肝板形成该流域干流;而经由血流到达肝脏的过客性干细胞可不同程度地在不同区段作为该流域的支流汇入干流并转分化为肝系细胞。

[关键词] 肝切除术;肝再生;干细胞;肝;大小核分裂相;卵圆细胞

[中图分类号] R 657.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)03-0251-06

Observation of big and small mitosis and oval cell emergence in regenerated liver tissue after partial hepatectomy

YU Hong-yu¹, LI Wen-lin², XIE Dong-fu², ZHANG Duo², XIAO Cheng-zhi³, SUN Zhi-yong¹, HE Jin¹, SUN Jing¹, SU Juan², LI Jian-xiu¹, ZHU Ming-hua⁴, Joseph T Lau⁵, HU Yi-ping^{2*} (1. Department of Pathology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433; 3. Department of Neurology-Burns, General Hospital, PLA Xizang Military Area Command, Lhasa 850003, China; 4. Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433; 5. The Department of Molecular and Cellular Biology, Roswell Park Cancer Institute, Elm and Carlton Streets, Buffalo, NY 14263, USA)

[ABSTRACT] **Objective:** To observe pathologic changes of regenerated liver tissue in mice with 2/3 hepatectomy (PH). **Methods:** Liver oval cell (OC), big and small mitosis and immunohistochemical staining of CK19 and AFP were observed in C57 mice at several time points after PH, and the results were compared with those of 4 control groups: normal group, pseudo-operation group, retrorsine (RS) group and RS/PH group. **Results:** Proliferation of mature hepatocytes and evident or mild proliferative reaction were observed in the small bile duct/COH epithelia in all cases. Emergence of OC was observed in individual cases in PH group, which resembled that in RS/PH group. The distribution of small mitosis were observed for the first time. **Conclusion:** The present study proposes a new hypothesis-liver valley hypothesis-adult liver stem cells, mainly locate in and about the terminal bile duct, probably are the important source of hepatocyte lineage cells; they replicate themselves and produce their progeny from oval cells to small hepatocytes and to mature hepatocytes; and when moving from the portal area to the central vein, the cells form the mainstream of the valley. Meanwhile, some stem cells from other organs, bone marrow stem cells for example, pass the liver through blood way and some of them turn into hepatocyte lineage cells and converge into the mainstream at different sites as affluents.

[KEY WORDS] hepatectomy; liver regeneration; stem cell; liver; big and small mitosis; oval cell

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(3): 251-256]

目前,对公认的肝脏的成体干细胞——卵圆细胞的认识,主要是源于几十年来对各种大鼠的实验研究模型,例如:2-乙酰氟氨加 2/3 肝切除(AAF/

[基金项目] 国家自然科学基金(30470876, 30270668, 30270603, 30200138);上海市科委重大项目(03DJ14020).

[作者简介] 余宏宇(1962-),男(汉族),博士,教授.

* Corresponding author. E-mail: yphu@smmu.edu.cn

PH)模型和倒千里光碱加 2/3 肝切除(RS/PH)模型^[1,2]。人们一直希望能在一定实验条件下诱导小鼠肝卵圆细胞的产生,以利成体肝干细胞的深入研究^[3]。本课题组先前成功地建立了 RS/PH 诱导小鼠卵圆细胞的产生的实验模型,并且首次成功地建立了 C57 小鼠成体肝干细胞系^[4]。本研究在单纯 2/3 肝切除(PH)小鼠肝组织中观察到了体积较大的肝细胞核分裂相(大核分裂相)、卵圆细胞和一种小核分裂相。本文依据研究中观察到的一系列病理形态,提出了关于肝损伤后肝再生与肝干细胞的“肝流域假设”。

1 材料和方法

1.1 实验动物 5~6 周龄、体质量 14~19 g 的 C57BL/6 品系雄性小鼠 133 只,由第二军医大学基础医学部细胞生物学教研室 SPF 级转基因动物实验室提供。

1.2 试剂和仪器 SPF 级恒温动物房设备,固鼠器,常规手术器械;倒千里光碱(Retrorsine, RS), Sigma 产品;常规病理组织取材、制片、H-E 染色试剂和免疫组织相关化学试剂与设备,其中,CK19 大鼠抗小鼠单抗(1:100 稀释)由德国 Dr Rolf Kemler, Max Planck Institute fur Immunobiologie 赠送,过氧化物酶标记的羊抗大鼠二抗购自 Santa Cruz 公司,AFP 单抗及二抗均购自 Santa Cruz 公司;光学显微镜(Nikon 产品);超净台(苏州净化设备厂)。

1.3 处理方法

1.3.1 假手术对照组 随机选用小鼠 23 只,正常饲养至 7~8 周龄,麻醉后无菌手术打开腹腔、暴露肝脏、然后手术关腹、保温苏醒;全部存活的 23 只鼠随机编号,分别在 PH 后第 0、3、7、9、11、14、17、30 天麻醉处死,除第 30 天处死 2 只外其余每个时间点上处死 3 只鼠,称取体质量和肝质量;肝组织用中性甲醛溶液固定,常规取材,石蜡包埋,连续切片 H-E 染色,光镜下观察有无卵圆细胞出现;若有则选取卵圆细胞出现最丰富者进行 CK19 与 AFP 免疫组化染色(分别按间接两步法和 EnVision 试剂盒改良操作),然后光学显微镜下观察。按被观察细胞内棕黄色强弱分为:+,±和-。

1.3.2 正常小鼠对照组 随机选用 8 只小鼠,常规饲养至 1.3.1 中手术后第 14、25 天和第 30 天分别麻醉处死 3 只、3 只和 2 只(第 0 天数据借用 1.3.1 组第 0 天数据),后续步骤同 1.3.1。

1.3.3 RS/PH 对照组 随机选用小鼠 30 只,腹

腔注射 RS 30 mg/kg,1 周后注射同剂量。第 3 周第 1 天进行 PH;麻醉后,无菌手术打开腹腔,结扎肝脏正中叶和左下叶根部并切除这些肝叶,缝合腹腔,保温苏醒。5 只术中死亡或术后未苏醒者按 PH 后第 0 天“处死”者看待。PH 后存活的 25 只小鼠随机编号分配,分别在 PH 后第 3、7、9、11、14、17、21、30 天处死 2、3、3、3、5、3、3、3 只小鼠。后续处理步骤同 1.3.1。

1.3.4 单纯 RS 对照组 随机选用小鼠 24 只,腹腔注射 RS 情况同 1.3.3 但不进行 PH,分别于相应的第 0、3、7、11、14、17、25、30 天麻醉处死各 3 只小鼠。后续处理步骤同 1.3.1。

1.3.5 单纯 PH 实验组 将其余 48 只正常饲养至 7~8 周龄小鼠按 1.3.2 PH 法切肝;有 3 只术中死亡或术后未苏醒者定为该组术后第 0 天“处死”者;其余 45 只全部苏醒存活,随机编号分配,于术后第 3、5、7、9、11、14、30 天分别处死 5、8、13、8、5、3、3 只小鼠;后续处理步骤同 1.3.1。

2 结果

2.1 各组小鼠体质量、肝质量变化及病理学大体改变 正常对照组体质量自然增长^[8];单纯 RS 对照组接近或略小于正常对照组但相差不显著;另 3 组动物术后体质量均一时性下降,然后以不同速度逐渐接近或恢复正常:假手术对照组体质量恢复最快;RS/PH 对照组恢复最慢,直到第 21 天才接近或略小于正常对照组但相差不显著;PH 实验组动物至第 14 天恢复至接近正常。然而,术后肝质量变化并不与体质量平行:假手术组肝脏质量无明显下降和明显上升过程,基本按正常规律肝质量缓慢增加^[8];RS/PH 对照组肝重先由正常肝质量的约 1/3 (本组小鼠手术时平均肝质量 0.95 g,术后平均肝质量为 0.35 g——由术中死亡和术后未苏醒小鼠的肝切除部分和残肝称取质量平均所得)小幅快速上升(3 d 时平均肝质量 0.58 g),同时可观察到肝脏先后发生充血、肿胀、大部分出现瘀点,肝颜色转淡黄,但直到第 21 天肝质量、颜色和质地才接近正常,第 30 天完全恢复正常;PH 实验组的肝质量至第 9 天已接近正常值,第 14 天颜色、质地已完全正常,之后按正常生长规律增加^[8]。

2.2 各组小鼠肝组织中卵圆细胞及其相关基本组织病理学改变。

2.2.1 假手术对照组和正常对照组 各时间点上肝组织结构正常(图 1A)。

2.2.2 RS/HP 对照组 在 PH 后第 0 天即可见

肝细胞轻度水变性,出现较多巨大肝细胞和凋亡小体;PH后第3天肝组织充血、水肿,空泡变性,散在小灶凝固性坏死伴局灶出血;之后陆续出现部分汇管区小胆管(后面均简称胆管)的截面数增加伴少数胆管上皮细胞由扁平转为立方;第11天这种有增生倾向的胆管和终末小胆管(后者即 canal of herings, COH)细胞更多些;第14天5例中有3例出现了胆管/COH细胞的增生,部分细胞呈团束状排列或有围管现象,即卵圆细胞出现,还可见卵圆细胞核分裂相,汇管区及坏死灶附近有明显炎细胞浸润,另2例也有炎细胞、轻度胆管/COH增生及1例有个别卵圆细胞出现,前3例的小灶坏死明显多于后2例;第17天3例中1例汇管区及坏死灶附近有多量炎细胞浸润、胆管/COH增生伴多量卵圆细胞团束出现并向小叶内延伸(图1B),另2例也见少量炎细胞浸润、小胆管增生和少量卵圆细胞出现,前1例小灶坏死明显多于后2例。

2.2.3 单纯RS对照组 第0~14天仅见肝细胞和胆管细胞轻微固缩、部分轻度水变性和少数细胞轻微空泡变性,第17天部分小鼠肝个别汇管区胆管上皮由扁平变为矮立方伴附近少量炎细胞浸润且第

25天更明显;第30天3例小鼠均有胆管/COH细胞轻度增生,其中1例还似有个别卵圆细胞出现。

2.2.4 PH实验组 手术后第0天与假手术对照组处死的小鼠一样,肝组织结构正常;术后第3天见核分裂相明显增多,部分肝细胞轻度水变性,偶见个别轻度空泡变性,同时伴有小血管、部分中央静脉和肝窦充血,部分肝窦变窄;5例中有2例出现不同程度的肝组织内散在小灶凝固性坏死伴局部出血和少量炎细胞浸润;第5天8例均见部分肝汇管区胆管上皮由扁平变为矮立方伴附近少量炎细胞浸润,1例小坏死灶最多者其个别汇管区与小叶交界处出现了个别卵圆样细胞;第7天15例中2例坏死现象最显著者汇管区附近小叶边缘出现少量卵圆细胞增生伴局部胆管增生和炎细胞浸润;第9天8例中1例坏死灶改变最严重者出现了明显卵圆细胞增生(图1C),增生程度与RS/HP对照组相仿;第14天5例中仍可见胆管细胞增生迹象,但未找到明确的卵圆细胞;第30天肝组织结构完全正常。总体上看,实验组的肝胆细胞变性程度、灶性凝固坏死和炎细胞浸润都轻于RS/PH对照组,出现卵圆细胞的机会和数量也少于RS/PH对照组。

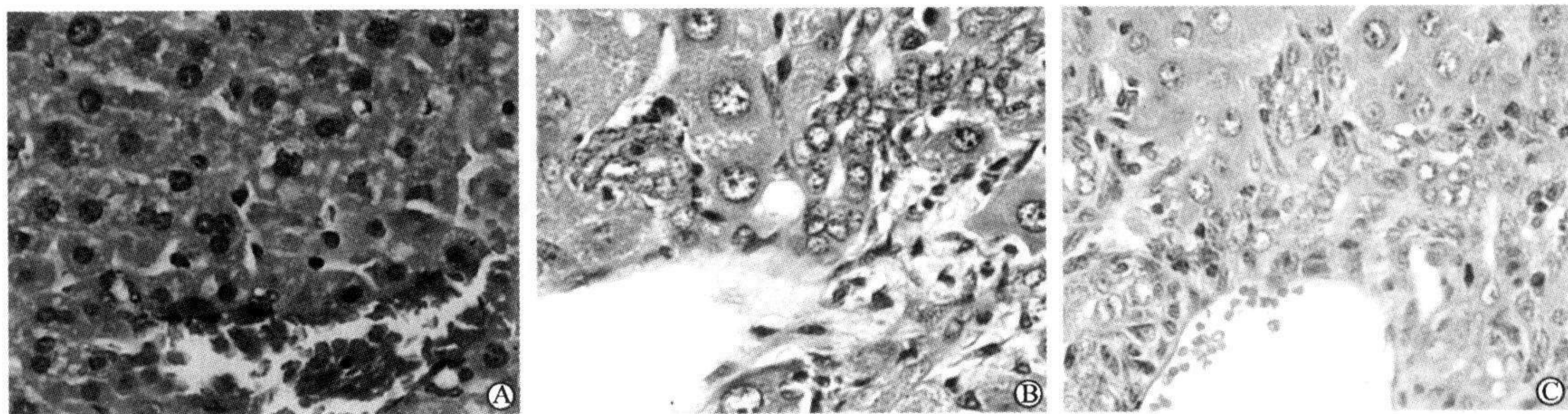


图1 各组C57小鼠光镜下肝组织及卵圆细胞形态

Fig 1 Liver tissue of C57 mice (H-E, ×200)

A: Normal control, an interlobular vein section and 2 small bile duct sections; B: RS/PH control (the 14th day), hypertrophic small bile duct/COH cells proliferate into lobule and form oval cell cord or small mass with a few adjacent small hepatocytes (the nucleus similar to oval cell nucleus, the abundant cytoplasm similar to mature hepatocyte) and some inflammatory cells nearby; some degenerated hepatocytes show megalocytosis; C: PH group (the 9th day), oval cell cord/mass and some small hepatocytes similar to that in RS/PH group; degeneration and megalocytosis of hepatocytes were less than those in RS/PH group

2.3 各组小鼠肝组织中核分裂相观察 在PH组的组织切片中可同时发现2种大小不同的核分裂相:一种是体积大的肝板内的肝细胞核分裂相(简称大核分裂相),拥有丰富宽广的红染胞质,在光镜下易于观察到;另一种是小核分裂相,分裂细胞因胞质稀少而体积小,通常只比小淋巴细胞略大,多出现于肝窦内,光镜下易被忽视;另外小核分裂相还可以出现在胆管/COH及卵圆细胞中,甚至有少数小核分裂相骑跨在肝板和肝窦交界处,个别小核分裂相似

乎完全在肝板内(与肝板内偶见小的造血细胞样细胞之情况吻合)(图2)。

在各组不同时间点上两种核分裂相出现的概率和小核分裂相出现的部位均有所不同。选择各组内肝组织核分裂相最多的鼠例之数据计数列表,结果见表1。

2.4 卵圆细胞与CK19和AFP免疫组化标记 选取实验组第9天卵圆细胞增生最明显者1例,以RS/PH组第14天卵圆细胞增生最明显者1例为参

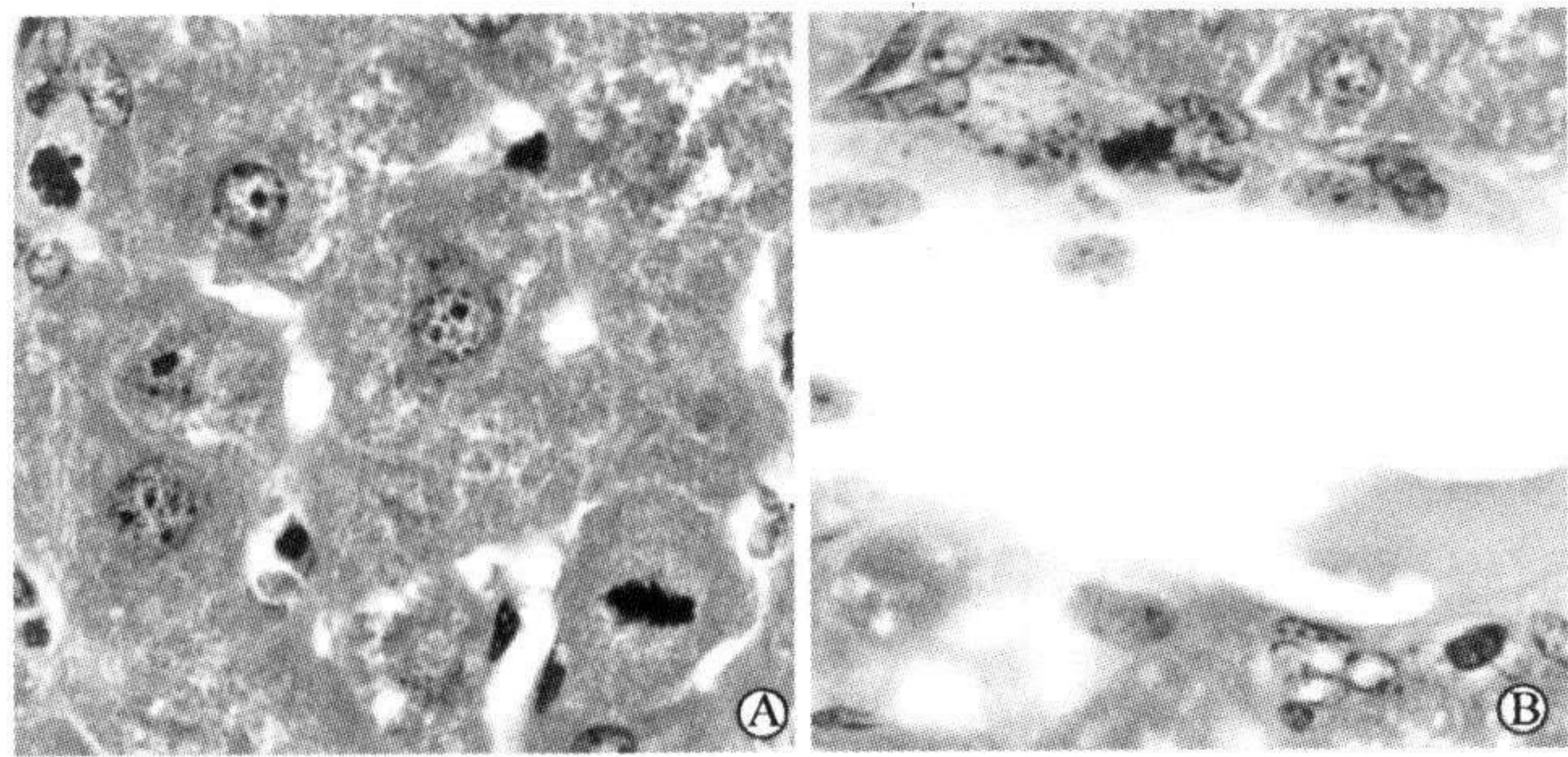


图2 光镜下大核分裂相与小核分裂相之形态与位置

Fig 2 Mitoses (H-E, ×400)

A: A big mitosis with abundant red granular cytoplasm at hepatic plate in the right corner; two small mitoses with little pale cytoplasm, one in the sinus in the left upper corner and another riding the border of the plate and the sinus in the middle upper corner; B: One small mitosis in the cord of slightly proliferative bile duct cells

表1 各组肝切片100个高倍视野核分裂数及其位置分布

Tab 1 The quantity and location of mitosis per 100 HPF

Group	Hepatic plate ^a	Hepatic sinus ^b	The border ^c	About bile duct ^d	Total
Normal					
14 d	1	2	1	1	5
Pseudo-operation					
3 d	1	4	0	1	6
RS/PH					
3 d	0	7	0	3	10
14 d	6	52	2	24	84
17 d	13	95	3	21	122
30 d	2	30	2	12	46
RS					
0 d	0	5	1	1	7
14 d	1	8	0	1	11
17 d	0	13	2	5	20
25 d	3	18	1	9	31
30 d	2	25	2	13	43
PH					
3 d	78	59	2	2	141
9 d	30	83	15	38	166
14 d	5	9	1	5	20
30 d	1	3	0	1	5

^a: The big mitoses at hepatic plate; ^b: The small mitoses in hepatic sinus; ^c: The small mitoses riding on the border of the plate and the sinus, including a few small mitoses within the plate; ^d: The small mitoses within the area about bile duct cells/HOC, including those within the oval cells

照,进行CK19和AFP免疫组化染色,结果如下:RS/PH对照组第14天(图3A)和PH组第9天(图3B)肝组织中汇管区胆管上皮细胞、汇管区附近肝小叶内增生的COH上皮细胞以及与增生肥大的胆管/COH细胞在位置上相延续且核形态相类似的卵圆细胞均CK19(±);偶见与增生的小胆管/COH相延续的卵圆细胞逐步转变为小肝细胞、其AFP标记也由-、±转变至+;当小肝细胞过渡到体积较大的成熟肝细胞处AFP标记又突然转变为(-)(图3C)。

3 讨论

3.1 胆管/COH、OC与肝再生和肝干细胞 1944年Opie首先在大鼠损伤肝模型中观察到小胆管(简称胆管)和终末小胆管(即后来所称的COH)细胞增生^[5];1956年Farber接着报道大鼠肝损伤模型中出现了与增生胆管/COH细胞极相似又相延续的OC^[6] 1958年Wilson和Leduc提出假说^[7]:肝干细胞可能存在于COH部位。1985年Zajicek等^[8]提出“流动肝”假说(streaming liver concept):肝板像轨道,肝细胞从门管区产生并沿肝板向小叶中央迁移,逐渐老化并最终凋亡。但多年来从未在正常肝中找到OC;大鼠单纯PH后肝细胞核分裂大量出现、肝体积恢复、结构重建,但也未见OC(例外:彩虹鳟鱼PH后可见OC^[9])。因此推论生理性肝细胞更新和病理性损伤肝再生均是由成熟肝细胞增生完成的^[4,5,10]。也有人利用大鼠肝损伤模型(例如2-AAF/PH模型和RS/PH模型)反复观察,但仍对是否存在肝成体干细胞,这种肝干细胞是否就是胆管/COH细胞,OC是否就是成体肝干细胞或是成体肝干细胞的子代,或者是否是骨髓源肝干细胞的后代等关键问题上存在着不完全一致的实验结果和不断的猜测和争论^[1,2,10,11]。但是基于对干细胞是有不同级别的认识,有双向分化潜能的OC可被认为是某些层次上的成体肝干细胞^[1,2,10,11]。

上述是关于大鼠和人肝的研究^[10]。小鼠生物学和遗传学资料积累丰厚,若能成为肝干细胞(比如OC)的研究模型将对该领域的深入拓展非常有意义。1993年有人报道了小鼠Dipin/PH或化学损伤模型的少数肝中见到OC^[3,12]。

RS经成熟肝细胞的P450酶系代谢为长期肝毒物质,抑制成熟肝细胞分裂增生;而肝干细胞/OC缺乏P450酶系或含量极低,不受RS影响而能够被激活增生;大鼠只有经RS处理后,肝内成体肝干细胞才对HP或化学损伤作出反应,经OC增生分化补充肝实质细胞^[2,13,14]。但本研究病理切片中确实发现单纯PH后有胆管/COH增生及OC出现,为此我们有必要调整长期以来对于OC的出现、对于RS的作用及肝干细胞在什么情况下起增生补充作用等问题调整认识。

3.2 核分裂相与肝再生和肝干细胞 本研究注意到了文献中的成熟肝细胞大核分裂相和体积小得多的胆管细胞核分裂相^[15~18],还观察到了胆管附近小细胞、胆管/COH细胞和OC中及肝窦内骨髓源细胞样细胞中的核分裂相,它们与胆管细胞核分裂相

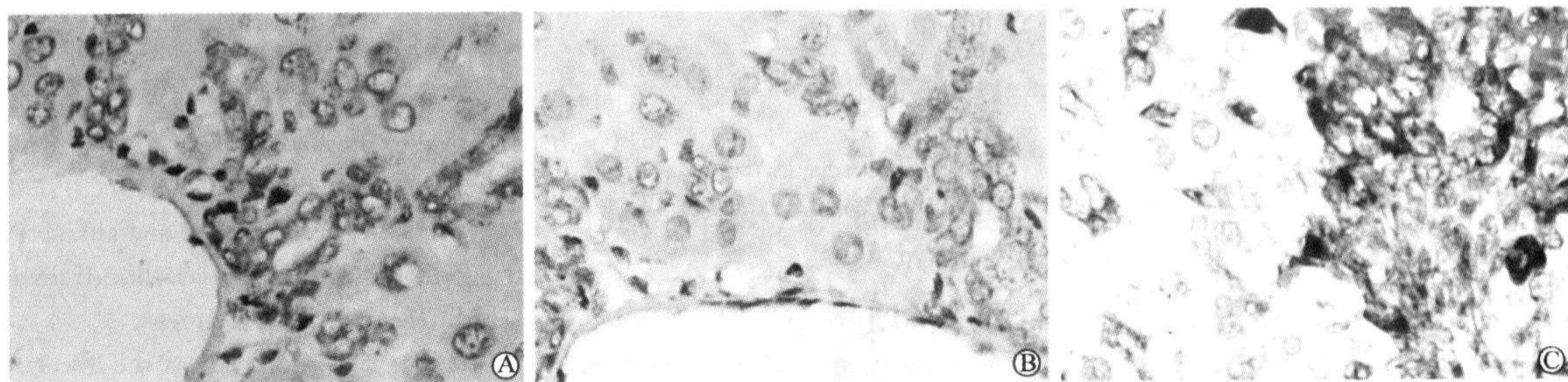


图3 C57小鼠肝组织及其中卵圆细胞免疫组化(CK19和AFP)染色结果

Fig 3 Results of immunohistochemical staining(CK19 and AFP)of oval cells in C57 mouse liver tissues($\times 200$)

A: RS/PH control, CK19(\pm) for oval cells; B: PH group, CK19(\pm) for oval cells; C: PH group, the transition from oval cells to small hepatocyte and then to mature hepatocytes, in which AFP(\pm) for oval cells, AFP(+) for small hepatocytes and AFP(-) for mature hepatocytes

均体积明显小于大核分裂相,胞质特点也与大核分裂相不同,在此统称为小核分裂相。根据小核分裂相分布的不同,本研究将之分为:(1)胆管附近小核分裂相,包括胆管/COH细胞、OC和胆管附近小细胞中的核分裂相;(2)肝窦内小核分裂相;(3)窦板交界处小核分裂相,包括似从肝窦来的小核分裂相横跨在窦板交界处或个别已经进入肝板者。如果说大核分裂相反映了成熟肝细胞在肝再生中的增殖,那么本研究作者推测:(除了部分胆管细胞小核分裂相代表了小胆管自身生理性更新或损伤后再生的需要外)小胆管附近小核分裂相至少部分代表了成体肝内源肝干细胞的增殖(当然,也可能有部分骨髓源干细胞进入小胆管附近参与分裂增殖);肝窦内小核分裂相可能反映了骨髓源性干细胞途经肝小叶受到较强的分裂增生信号影响而增殖的现象,其既可能随血流离开肝脏,也可能有机会作为干细胞转分化为肝系细胞;而窦板交界处小核分裂相不仅反映了途经肝小叶的骨髓源细胞从肝窦进入肝板的形态,而且还反映了这些干细胞样小细胞在局部能够分裂增殖,极可能参与到肝再生中;其进入肝板的过程可能较短或很快转分化为肝细胞样细胞,能够在形态上观察到的窦板交界处小核分裂相就相对较少。

3.3 肝再生和肝干细胞的肝流域假说 本实验正常对照组提供了正常体/肝质量变化和组织学情况;假手术对照组排除单纯开腹诱导OC产生和大小核分裂相增多的可能;RS/PH对照组为PH组肝OC产生和大小核分裂相增多的观察和分析提供了另一参照系;RS对照组则可观察在成熟肝细胞不能分裂情况下肝内外源干细胞的反应情况。前3个对照组的結果正如所料,假手术组未出现OC增生和大小核分裂相明显增多的现象,RS/PH组术后第14天和第17天多数小鼠出现了OC显著增生和小核分裂相明显

增多,之后随着肝质量渐趋于恢复而OC渐消失、小核分裂相渐减少至RS组小核分裂相增多的水平;而RS组结果(17d开始有个别胆管/COH肥大增生迹象,同时小核分裂相渐增多,至30d变得明显),提示肝成体干细胞和外源干细胞均加快了分裂增殖以适应RS处理后对肝细胞补充的需求。

PH实验组的结果则让人激动又不得不慎重分析:一方面,至术后第3天大核分裂相迅速增多并到达峰值;小核分裂相也较快增多并于第9天达到峰值;随后大小核分裂相均迅速下降、恢复到正常水平,与术后第9天之前肝质量增加速度较快而第9天后肝质量增加速度趋于正常水平的现象吻合;在第3天,成熟肝细胞大核分裂相明显高于代表肝干细胞分裂增生的小胆管附近与窦板交界处小核分裂相之和,到第9天情况正好颠倒过来,提示:PH组手术后肝再生可能是由率先启动的成熟肝细胞增殖和随后启动的肝干细胞增殖分化来共同完成的。另一方面,胆管/COH和OC增生稍迟于核分裂相出现,PH组术后第5、7、9天几乎所有小鼠肝内出现不同程度的胆管上皮由扁平向矮立方转变、伴胆管/COH增生和炎细胞浸润,第7、9天都有个别小鼠肝内有不同程度的OC增生,第9天的OC增生最显著的那例中OC增生的程度几乎可与RS/PH对照组中第14天和第17天OC增生程度相比。另外还注意到一个有趣的现象,PH实验组中OC出现之小鼠往往是肝组织小灶坏死散布最多最明显的小鼠,同时也是肝组织炎细胞浸润最明显的小鼠。PH实验组OC的形态和免疫组化标记与RS/PH对照组OC一致。

PH组肝再生明显快于RS/PH组。需反复思考的是这种肝再生是如何完成的:PH组和RS/PH组那些出现或不出现OC增生的小鼠均完成了肝再

生,说明 OC 并非肝再生所必备;无论出现 OC 增生与否,PH 组、RS 组和 RS/PH 组均随着时间的延长而先后在一定的时段里出现了胆管/COH 的增生;OC 一端与增生的胆管/COH 细胞位置上相移行、形态上如此相似以至于有时难以划定两者间的绝对界线,另一端又可以移行为小肝细胞和肝细胞;单纯 RS 组随着观察期延长,不仅可出现小胆管/COH 增生、小胆管附近核分裂相增多,而且小叶内小核分裂相也明显增多(以肝窦内为主,还包括窦板交界处);RS/PH 组至观察期第 30 天肝组织已完全重建时其小核分裂相的数量仍维持在一定水平上,其分布也与 RS 组基本趋于一致;肝组织结构完全没有受到损害的正常对照组和假手术组仍然能够发现极少量的小胆管附近小核分裂相、窦板交界处小核分裂相和极少量 AFP 阳性的小肝细胞。国外原有假说(流肝说)^[8]无法全面解释这些“存有矛盾”的研究结果,需要站在前人之肩,在小心分析的基础上大胆设想。在此拟提出关于肝流域假说(liver valley hypothesis)的猜想:

肝内成体干细胞存在于汇管区小胆管/COH 附近,是肝内主质细胞的源头;在生理情况下,能有序地自我复制并逐级分化产生不同等级的子代(从 OC、小肝细胞到成熟肝细胞)、途经肝板汇向中央静脉,形成该流域干流;由血循环路过的外源性干细胞在干流不同的部位分裂增殖、部分转分化为肝系细胞,作为支流汇入干流;当肝部分切除或其他肝损伤时,随着再生信号的增强,干流和支流中的细胞增生分化速度也进一步增强;当成熟肝细胞的增殖潜能被抑制或肝细胞的损失量过大时,再生信号达到足够大而使更大量的肝干细胞以更快速度增殖分化,使我们能够从病理形态上观察到 OVC 团索或者小肝细胞样前体细胞结节。肝细胞更新与损伤后再生是肝流域中肝内源和肝外源肝干细胞及成熟肝细胞共同作用的结果,而且从机体漫长生命历程的角度衡量,只有肝干细胞才是肝实质细胞生理更新和病理再生的根本基础。

结语:肝流域假说能解释本组和国内外已有报道中出现的、用原有假说无法完全诠释的诸多现象,已有的本组和国内外研究结果支持关于此假说的猜想,但尚远远不足以支撑之;进行更全面更深入的工作对之进行科学论证。

[参考文献]

- [1] He ZP, Tang YF, Liu YB, *et al.* Advances in studies on hepatic stem cells[J]. *Prog in Nat Sci*, 2003,13(3):166-172.
[2] Gordon GJ, Coleman WB, Hixson DC, *et al.* Liver regenera-

tion in rats with retrorsine-induced hepatocellular injury proceeds through a novel cellular response[J]. *Am J Pathol*, 2000, 156(2): 607-619.

- [3] Petersen BE, Grossbard B, Hatch H, *et al.* Mouse A6-positive hepatic oval cells also express several hematopoietic stem cell markers[J]. *Hepatology*, 2003,37(3):632-640.
[4] Li WL, Su J, Yu HY, *et al.* Isolation and characterization of mouse hepatic epithelial progenitor cell line from retrorsine-treated mouse[J]. *Hepatol*, 2004, in press.
[5] Opie EL. The pathogenesis of tumors of the liver produced by butter yellow[J]. *J Exp Med*, 1994,80:231-246.
[6] FARBER E. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetyl-amino-fluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene[J]. *Cancer Res*, 1956, 16(2):142-148.
[7] Wilson JW, Leduc EH. Role of cholangioles in restoration of the liver of the mouse after dietary injury[J]. *J Pathol Bacteriol*, 1958,76(2):441-449.
[8] Zajicek G, Oren R, Weinreb MJ. The streaming liver[J]. *Liver*, 1985, 5(6):293-300.
[9] Okihiro MS, Hinton DE. Partial hepatectomy and bile duct ligation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): histologic, immunohistochemical and enzyme histochemical characterization of hepatic regeneration and biliary hyperplasia[J]. *Toxicol Pathol*, 2000, 28(2): 342-356.
[10] Baumann U, Crosby HA, Ramani P, *et al.* Expression of the stem cell factor receptor c-kit in normal and diseased pediatric liver; identification of a human hepatic progenitor cell [J]? *Hepatology*, 1999,30(1):112-117.
[11] Gordon GJ, Coleman WB, Grisham JW. Temporal analysis of hepatocyte differentiation by small hepatocyte-like progenitor cells during liver regeneration in retrorsine-exposed rats[J]. *Am J Pathol*, 2000,157(3):771-786.
[12] Factor VM, Radaeva SA. Oval cells-hepatocytes relationships in Dipin-induced hepatocarcinogenesis in mice[J]. *Exp Toxicol Pathol*, 1993, 45(4):239-244.
[13] Fu PP, Xia QS, Lin G, *et al.* Genotoxic pyrrolizidine alkaloids-Mechanisms leading to DNA adduct formation and tumorigenicity[J]. *Int J Mol Sci*, 2002,3:948-964.
[14] Mathis GA, Walls SA, D'Amico P, *et al.* Enzyme profile of rat bile ductular epithelial cells in reference to the resistant phenotype in hepatocarcinogenesis[J]. *Hepatology*, 1989, 9: 477-485.
[15] Gerhard H, Schultze B, Maurer W. [Proliferation kinetics of bile duct epithelia in the regenerating mouse liver after CCl₄-poisoning][J]. *Virchows Arch B Cell Pathol*, 1975, 17(3): 213-227.
[16] Romanov IuA, Savchenko TV. [Topographic distribution of dividing hepatocytes in the regenerating liver lobule in the period of maximum mitotic activity][J]. *Biull Eksp Biol Med*, 1986, 102(11): 597-598.
[17] Romanova LK, Grushetskaia OO. [Kinetics of cell proliferation in regenerating rat liver following subtotal resection][J]. *Biull Eksp Biol Med*, 1978, 86(12): 723-726.
[18] Petrovichev NN. [Distribution of mitoses within a lobule of the rat liver in recovery after various types of injuries][J]. *Tsitologiya*, 1975, 17(10):1221-1223.

[收稿日期] 2004-07-05

[修回日期] 2005-01-24

[本文编辑] 曹 静