

人胚胎发育过程中胚胎组织肝干细胞免疫表型的变化

徐 军¹, 胡 勇¹, 王 健¹, 周 继², 章太平¹, 余宏宇^{3*}

(1. 中国人民解放军第105医院病理科, 合肥 230031; 2. 合肥市瑶海区第二人民医院妇产科, 合肥 230011; 3. 第二军医大学长征医院病理科, 上海 200003)

[摘要] **目的:** 观察人胚胎发育不同时期胚胎肝组织中细胞免疫表型及其变化, 探讨人肝干细胞的来源、分化与迁移规律。 **方法:** 用常规病理 H-E 染色和免疫组织化学方法观察 30 例 4~35 周龄胚胎肝组织中几种细胞的肝胆标记 (AFP、GST- π 、CK7、CK19) 和造血干细胞标记 (CD34、c-kit) 的表达及变化。 **结果:** AFP 阳性表达始于 4 周龄胚胎肝, 至 16~24 周龄达到高峰, 之后表达逐渐减少, 仅部分胆管板和少数界板细胞阳性; GST- π 阳性表达始于 6 周龄后的胚胎肝肝索细胞和 8 周龄后胆管板细胞, 但 26 周龄后仅部分胆管板细胞及少数界板细胞阳性。 CK19 在 6~11 周龄肝索细胞内阳性表达达到最高峰, 之后表达逐渐减少但胆管板细胞始终阳性; CK7 仅限于 14 周龄之后的胆管板细胞和胆管上皮内表达。 8 周龄胚胎肝胆管板中开始可见 CD34 和 c-kit 阳性细胞, 肝索和门静脉附近间充质内也可见少数表达 CD34 和 c-kit 的单个核细胞; 但 21 周龄后 CD34 和 c-kit 阳性细胞仅见于胆管板及汇管区间充质内而肝索内少见。 **结论:** 4~16 周龄胚胎肝细胞主要由具有双向分化潜能的肝干细胞组成; 16 周龄胚胎肝内大部分肝索细胞开始表现出向肝细胞定向分化的特点, 而作为未来 Hering 管细胞来源的胆管板则仍含有肝干细胞; 胚胎肝内部分肝干细胞可能来源于造血系统; 这些与前期研究提出的“肝流域假设”中涉及肝干细胞所在及来源的假设相吻合。

[关键词] 胚胎; 肝干细胞; 免疫组织化学; 肝流域假设

[中图分类号] R 321 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)02-0117-05

Immunohistochemical characterization of hepatic stem cells in developing human liver

XU Jun¹, HU Yong¹, WANG Jian¹, ZHOU Ji², ZHANG Tai-ping¹, YU Hong-yu^{3*} (1. Department of Pathology, No. 105 Hospital of PLA, Hefei 230031, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Second People's Hospital of Yaohai District, Hefei 230011; 3. Department of Pathology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the immunohistochemical characterization of hepatic stem cells in the developing human liver, so as to study the origin, differentiation and migration of hepatic stem cells. **Methods:** H-E staining and immunohistochemical methods were used to observe the expression of hepatic/cholangiocellular differentiation markers (AFP, GST- π , CK7, CK19) and hematopoietic stem cell markers (CD34 and c-kit) in several kinds of cells obtained from thirty 4- to 35-week old fetal liver samples. **Results:** AFP expression appeared in fetal liver at 4 weeks' gestation, peaked during 16-24 weeks' gestation and decreased gradually afterwards; finally weak signals were only found in some ductal plate cells and a few limiting plate cells. GST- π was detected in hepatic cord cells from the 6th week and in the ductal plate cells from the 8th week; 26 weeks later, only some ductal plate cells and a few limiting plate cells showed positive signals. CK19 expression peaked during 6th to 11th week in hepatic cord cells and decreased gradually afterwards, except for that in the ductal plates. CK7 expression was limited in the ductal plate cells and bile duct cells from the 14th week. CD34 and c-kit were detected at the 8th week in some ductal plate cells and a few mononuclear cells in the hepatic cords/mesenchymal tissue of portal area; after 21 weeks, CD34 and c-kit were found only in ductal plate cells and a few mononuclear cells in the hepatic mesenchymal tissue of portal areas. **Conclusion:** Fetal hepatocytes at 4-16 weeks' gestation are mainly constituted by hepatic stem cells with bi-potential differentiation capacity. At 16 weeks' gestation, most hepatic cord cells begin to differentiate into hepatocytes and abundant hepatic stem cells remain in the ductal plate (the origin site of Hering canals). It is also indicated that the hematopoietic stem cells may give rise to some hepatic stem cells in embryonic liver. These indirectly support the hypothesis about the location and origin of liver stem cells in "liver valley hypothesis" reported previously.

[KEY WORDS] embryo; hepatic stem cells; immunohistochemistry; liver valley hypothesis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(2): 117-121]

肝干细胞是指具有自我复制潜能、同时又有向肝细胞和胆管细胞双向分化潜能的干细胞。肝干细胞移植可望成为治疗严重肝脏疾病的治疗方法之一^[1]。肝干细胞移植首要解决的问题是进一步阐明肝干细胞的所在及其来源并筛选肝干细胞, 利用分

[基金项目] 国家自然科学基金(30570836); 中国人民解放军第105医院科研基金(2006004-A)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30570836) and the Research Foundation of No. 105 Hospital of PLA (2006004-A)。

[作者简介] 徐 军, 硕士, 主治医师。E-mail: doctorxujun@yahoo.com.cn

* Corresponding author. E-mail: yuhongyu795@hotmail.com

子标记物对其进行识别研究是重要的方法之一。然而,相关研究主要集中在动物实验和体外细胞培养,对人胚胎肝干细胞分子表型进行原位研究的资料相对较少。

本研究应用常规病理和免疫组化方法观察 30 例 4~35 周龄人胚胎肝组织中几种细胞的肝胆标记(AFP、GST- π 、CK7、CK19)和原始造血干细胞标记(CD34、c-kit)的表达和变化,探讨胚胎肝发育过程中肝干细胞的来源、分化与迁移规律,以期为肝干细胞移植的基础研究和临床应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 组织来源 30 例 4~35 周龄胎肝标本取自本院和合肥市瑶海区第二人民医院,14 例为孕妇自愿流产(4 例行米非司酮流产,10 例行水囊引产),16 例意外流产(7 例因孕妇创伤、4 例因孕妇心脏疾病、5 例因孕妇合并子宫肌瘤)。所有标本收集均征得孕妇本人知情同意,实验过程符合伦理学要求。胎龄按 Jirasek(1983)、Moore(1988)的解剖学标志^[2]、B 超双顶径与股骨径和末次月经确定。2 例成人外伤性肝破裂肝组织作为对照。所有标本均用 4% 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,5 μ m 连续切片,H-E 染色,光镜观察。

1.2 免疫组化染色 采用 EliVision 两步法,选用的一抗分别有鼠抗人 AFP 单克隆抗体、鼠抗人 GST- π 单克隆抗体、鼠抗人 CK7 单克隆抗体、鼠抗人 CK19 单克隆抗体、鼠抗人 CD34 单克隆抗体和鼠抗人 c-kit 单克隆抗体;即用型第 2 代免疫组化 EliVision™ plus 广谱试剂盒购自福州迈新生物技术公司。针对不同抗原采用不同的抗原修复法(例如:CK7 预先用胰酶消化,CD34、CK19 采用柠檬酸高温高压抗原修复,c-kit 采用 EDTA 加热抗原修复);免疫组化染色步骤按产品说明书进行操作,分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。结果判定标准:背景清晰;所有指标均以细胞质或细胞膜出现棕黄色颗粒为阳性,阳性细胞数<30%为+;30%~60%为++;>60%为+++;无棕黄色颗粒为阴性。

2 结果

2.1 胚胎肝组织内细胞的组织学特点及分布 4 周龄胚胎肝组织内肝索排列较稀疏,其间散在分布原始血细胞(以红系祖细胞最常见)、内皮祖细胞,构成肝索的细胞较小,形态不规则,核质比大,核深染,

核分裂相多见;5 周龄胚胎肝内发现原始肝血窦(图 1A);6~7 周龄胚胎肝内见明显造血灶,肝索内细胞层数较多(4~6 层);8 周龄胚胎肝内在较大门静脉间充质周围发现胆管板(图 1B),此时肝索细胞体积较小但形态相对一致,而组成胆管板的两层细胞排列紧密、较肝索细胞体积更小、圆形、核卵圆形深染、核质比较大;10 周龄胚胎肝内中央静脉及汇管区开始形成,肝小叶初步形成,肝索开始沿着中央静脉呈放射状排列;14 周龄胚胎肝内胆管板旁门静脉间充质内出现单个完整的胆管,肝小叶结构易于辨认,数目增多,肝索也逐渐演变而形似成年肝的肝板,肝索内细胞排列成 2~4 层,肝血窦宽阔而不规则,所占比例增大;21~26 周龄胚胎肝血窦腔变小,造血成分减少,肝索由 1~3 层细胞构成;30 周龄以后的胚胎肝造血灶变得非常稀疏。

2.2 胚胎肝组织内细胞的免疫组化染色结果

2.2.1 AFP 和 GST- π 的表达 AFP 在 4 周龄胚胎肝原始细胞中已有微弱表达,8~16 周龄胚胎肝内肝索细胞的 AFP 表达逐渐增多,16~24 周龄胚胎肝大部分肝索细胞及胆管板都表达 AFP(图 2A),26 周龄以后的胚胎肝肝索细胞表达 AFP 逐渐减少,仅胆管板细胞和界板处少数细胞阳性(图 2B)。GST- π 在 6 周龄胚胎肝肝索细胞、8 周龄胚胎胆管板和胆管细胞中开始表达(图 2C),但至 26 周龄胚胎肝组织中仅胆管板及界板处少数细胞表达 GST- π 。正常成人肝细胞 AFP、GST- π 阴性。各因子表达强度见表 1。

2.2.2 CK19 和 CK7 的表达 4 周龄胚胎肝肝索细胞已经表达 CK19,阳性染色位于胞质和胞膜,CK19 阳性程度在 6~11 周龄胚胎肝组织肝索细胞中达最高峰,胆管板细胞 CK19 染色始终强于肝索细胞(图 2D),12 周龄胚胎肝肝索细胞 CK19 的表达逐渐减少,16 周龄时几乎检测不到,仅胆管板及胆管细胞阳性。CK7 仅限于 14 周龄之后胚胎肝的胆管板细胞和胆管上皮中表达(图 2E),胆管染色强于胆管板。成人肝脏仅胆管上皮表达 CK7 和 CK19;Hering 管细胞很难观察到,其是否表达 CK7 和 CK19 难以判断。各因子表达强度见表 1。

2.2.3 CD34 和 c-kit 的表达 CD34 强阳性染色主要见于 4 周龄以后的胚胎肝组织内皮细胞和造血祖细胞,8 周龄以后的胚胎肝组织部分胆管板细胞和门静脉附近间充质内以及肝索中极少数单个核细胞也

可见表达(图 2F)。8~21 周龄胚胎肝中肝索中和汇管区间充质内少数单个核细胞表达 CD34 和 c-kit, 其形态上有的和胆管板细胞相似, 有的类似于胚胎肝干细胞, 有的较胚胎肝干细胞体积大、核大呈圆形或肾形, 并可以三五成群的集落样排列(图 2G)。至 21 周龄后, CD34 和 c-kit 阳性细胞仅见于胆管板以及汇管区间充质内, 肝索内罕见。正常成人肝脏 CD34 阳性染色主要存在于汇管区血管内皮, 亦可见于汇管区附近的肝实质内血管内皮细胞; c-kit 阳性染色偶见于汇管区内单个核细胞, 肝细胞和胆管上皮均 CD34 和 c-kit 阴性; Hering 管细胞很难观察到, 其是否表达 CD34 和 c-kit 难以判断。各因子表达强度见表 1。

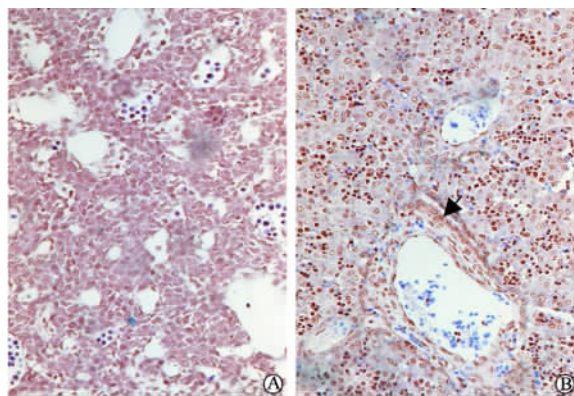


图 1 胚胎肝组织 H-E 染色结果

Fig 1 H-E staining showing location and structure of hepatic stem cells in developing human liver ($\times 200$)

A; 5 weeks; B; 8 weeks; Arrow indicating ductal plate

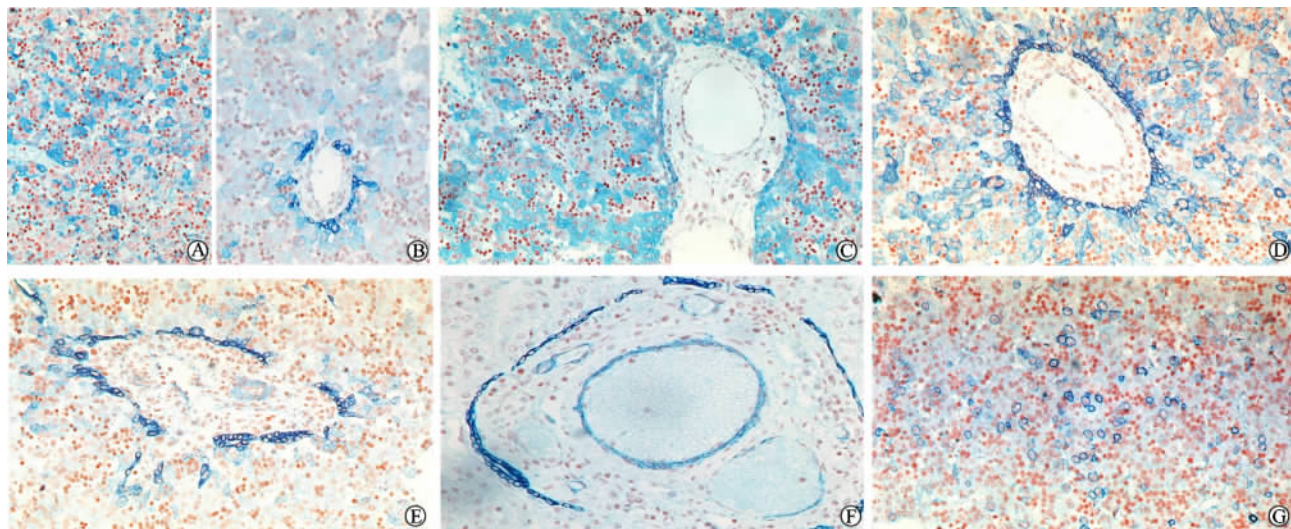


图 2 不同时期胚胎肝内细胞免疫组化染色结果

Fig 2 Immunohistochemical characterization of several kinds of cells in fetal liver (EliVision, $\times 200$)

A: AFP expression in hepatic cords in fetal liver at 16 weeks' gestation; B: Only ductal plate cells showed positive staining of AFP in fetal liver at 27 weeks' gestation; C: GST- π was detected in hepatic cord and ductal plate in fetal liver at 8 weeks' gestation; D: Both hepatic cords cells and ductal plate cells showed positive staining of CK19 at 8 weeks' gestation; E: CK7 was positive in bile ducts and ductal plate cells at 14th week; F: Expression of CD34 was observed in most of cells in ductal plate, vascular endothelium and a few mononuclear cells in portal area at 20 weeks' gestation; G: Some monoclear cells in the hepatic cords showed c-kit immunostaining at 14 weeks' gestation

3 讨论

近年来对啮齿类动物胚胎肝内肝干细胞的分离和体外培养研究取得了一定进展, 一些肝细胞和胆管上皮的分化标记(如 AFP、Alb、CK7、CK19、CK8、CK18)、卵圆细胞标记(如 OV-6、OV-1、GST- π 、Thy-1)等在实验研究中得到了广泛应用^[3-7], 尤其是 Petersen 等^[8]研究发现骨髓来源的造血干细胞可以

产生肝细胞, 给肝干细胞的来源和定位提供了一条全新的思路。近年来已有学者^[9-10]发现应用造血干细胞标记物 CD34、c-kit 从胚胎肝中分离出的干细胞可以分化形成 Alb⁺或 CK19⁺的细胞。但目前的研究主要集中在动物实验和体外细胞培养, 各种标记物在人胚胎肝组织中的确切定位尚不清楚。胚胎肝富于肝前体或肝干细胞的各种中间形态, 是研究肝干细胞的来源、增殖和分化规律的较好模型。本

表 1 不同时期胚胎肝组织内细胞的免疫表型特点

Tab 1 Immunohistochemical characterization of several kinds of cells in developing human liver

Age(t/week)	AFP		GST- π		CK19		CK7		CD34		c-kit	
	Hepatic cords	Ductal plates	Hepatic cords	Ductal plates	Hepatic cords	Ductal plates	Hepatic cords	Ductal plates	Hepatic cords	Ductal plates	Hepatic cords	Ductal plates
4 Δ	+		-		++		-		-		-	
5	+		-		++		-		-		-	
6	+		+		+++		-		-		-	
7	+		+		+++		-		-		-	
8	++	+++	+	++	+++	+++	-	-	-	+	-	+
10	++	+++	++	++	+++	+++	-	-	+	+	+	+
11	++	+++	++	++	+++	+++	-	-	-	+	+	+
12	++	+++	+++	++	++	+++	-	-	+	+	+	+
13 Δ	++	+++	++	++	++	+++	-	-	-	+	-	+
14	++	+++	++	++	+	+++	-	++	+	+	+	+
16	+++	+++	++	++	+	+++	-	++	+	+	+	+
18	+++	+++	++	++	-	+++	-	++	-	+	-	+
20	+++	+++	++	++	-	+++	-	++	+	+	+	+
21	+++	+++	++	++	-	+++	-	++	+	-	-	+
23 Δ	+++	+++	++	++	-	+++	-	++	-	-	-	-
24	+++	+++	++	++	-	+++	-	++	-	+	-	+
26	++	++	+	+	-	+++	-	++	-	-	-	-
27	+	++	+	++	-	++	-	++	-	+	-	+
28	+		+		-		-		-		-	
29 Δ	+		+		-		-		-		-	
30 Δ	+		+		-		-		-		-	
32	+		-		-		-		-		-	
34	-		-		-		-		-		-	
35 Δ	-		-		-		-		-		-	

Δ : n=2, the other n=1

实验应用免疫组化方法,在不同发育时期的胚胎肝标本上连续观察胚胎肝内细胞肝胆相关标记物和造血干细胞标记物的表达,探讨肝干细胞的来源、分化和迁移规律,为肝干细胞移植的基础研究和临床应用研究提供实验依据。

本研究结果发现 4~16 周龄胚胎肝内细胞在组织形态学上表现出原始未分化细胞的特点:细胞较小,形态不规则,核质比大,核深染,核分裂相多见;免疫组化证实其表达肝细胞方向的分化标志 AFP 和 GST- π ,还表达胆管细胞方向的分化标记 CK19。这表明 4~16 周龄胚胎肝细胞具有双向分化潜能,即具备了肝干细胞的特性;理论上在此期间可以联合运用 AFP、GST- π 、CK19 为标记筛选具有双向分化潜能的肝干细胞。16 周龄以后胚胎肝进入发育的顶峰时期、大部分肝干细胞(即原始肝小叶内的肝索细胞)逐渐丧失表达 CK19 的能力,而 AFP 和 GST- π 的表达逐渐增强。Nava 等^[10]的研究也表明此期胎肝白蛋白和肝糖原合成增加,均提示此期肝

干细胞已经开始逐渐向肝细胞定向分化。24 周龄后的胚胎肝内这些细胞 AFP 和 GST- π 等幼稚肝细胞表型的表达又开始逐渐减少乃至逐渐丧失,说明肝细胞发育分化趋向成熟。

8 周龄胚胎肝内与较大门静脉周围的间充质交界处出现胆管板,胆管板在经历重新塑型后其上皮细胞迁入间叶细胞之间并形成肝内胆管^[11],表明胚胎肝胆管板细胞是胆管母细胞。本研究中 14 周龄胚胎肝胆管板附近间叶组织内出现单个完整的胆管,胆管板细胞还持续表达 CK19、CK7、AFP、GST- π 、CD34、c-kit(CK7 表达始于 14 周龄);还有文献^[4]报道胚胎肝胆管板还可表达 CK8、CK18、白蛋白和 OV-6。这说明胆管板上皮具有向肝细胞和向胆管细胞的双向分化潜能,胆管板内可能含有丰富的肝干细胞,其免疫表型和分布部位、形态特点类似于动物致癌、损伤模型及人慢性肝病中的卵圆细胞(由 Hering 管细胞增生形成)^[12-13]。这些内容提示:胆管板内可能含有丰富的肝干细胞,随着胚胎发育逐

渐减少并转变成位于肝界板处的 Hering 管细胞,出生后在一定条件下其可以活化、增殖形成卵圆细胞,对肝细胞的补充要求作出增生反应,这从一个侧面与先前提出的“肝流域假设”中涉及肝干细胞所在和来源的假设吻合^[14],为解释成体肝脏疾病中卵圆细胞的来源和分化提供了新的思路。

另外,本研究从8周龄胚胎肝开始检测到部分胆管板细胞表达骨髓造血干细胞标记 CD34 和 c-kit,提示可能有少数造血干细胞可以分化成胆管板细胞,再进一步分化成成熟肝细胞或胆管上皮,支持 Petersen 等^[8]骨髓源性肝干细胞的理论。同时研究还发现8~21周龄胚胎肝中除胆管板外,还可见肝索(板)中和汇管区间充质内少数单个核细胞表达 CD34 或 c-kit,这些阳性细胞在形态上可有些差异,有可能是造血干细胞分化而来的肝干细胞处于不同的分化状态,这从另一个侧面与先前提出的“肝流域假设”中涉及肝干细胞所在和来源的假设吻合^[14]。但这些细胞单从形态上难以和内皮祖细胞、造血干细胞绝对地区分开来,还需免疫双标记来进一步鉴别和证实。

综上所述,4~16周龄之间的胚胎肝主要由具有双向分化潜能的肝干细胞组成,免疫表型一般为 AFP⁺ GST- π ⁺ CK19⁺;大于16周龄胚胎中大部分肝索细胞开始具有向肝细胞定向分化的特点,其免疫表型为 AFP⁺ GST- π ⁺ CK19⁻ CK7⁻;而胆管板内可能含有丰富的具有双向分化潜能的肝干细胞,其免疫表型为 AFP⁺ GST- π ⁺ CK19⁺ CK7⁺ CD34⁺ c-kit⁺;胚胎肝内的部分肝干细胞可能来源于造血干细胞。上述结果在一定程度上也间接地与前期工作中提出的“肝流域假设”中涉及肝干细胞所在和来源的假设相吻合。

[参考文献]

- [1] Shafritz D A, Oertel M, Menthen A, et al. Liver stem cells and prospects for liver reconstitution by transplanted cells[J]. *Hepatology*, 2006, 43(2 Suppl 1): S89-S98.
- [2] 邹仲之 主编. 组织学与胚胎学[M]. 5版. 北京:人民卫生出版社, 2001: 243.
- [3] Petkov P M, Zavadil J, Goetz D, et al. Gene expression pattern in hepatic stem/progenitor cells during rat fetal development using complementary DNA microarrays[J]. *Hepatology*, 2004, 39: 617-627.
- [4] Crosby H A, Hubscher S G, Joplin R E, et al. Immunolocalization of OV-6, a putative progenitor cell marker in human fetal and diseased pediatric liver[J]. *Hepatology*, 1998, 28: 980-985.
- [5] Masson N M, Currie I S, Terrace J D, et al. Hepatic progenitor cells in human fetal liver express the oval cell marker Thy-1[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 291: G45-G54.
- [6] Schmelzer E, Wauthier E, Reid L M. The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors[J]. *Stem Cells*, 2006, 24: 1852-1858.
- [7] Pan Y L, Cai J Y, Hu A B. Differentiation of hepatocytes from mouse embryonic stem cells and its significance[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2005, 4: 291-294.
- [8] Petersen B E, Bowen W C, Patrene K D, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells[J]. *Science*, 1999, 284: 1168-1170.
- [9] Grompe M. The role of bone marrow stem cells in liver regeneration[J]. *Semin Liver Dis*, 2003, 23: 363-372.
- [10] Nava S, Westgren M, Jaksch M, et al. Characterization of cells in the developing human liver[J]. *Differentiation*, 2005, 73: 249-260.
- [11] Awasthi A, Das A, Srinivasan R, et al. Morphological and immunohistochemical analysis of ductal plate malformation: correlation with fetal liver[J]. *Histopathology*, 2004, 45: 260-267.
- [12] Xiao J C, Jin X L, Ruck P, et al. Hepatic progenitor cells in human liver cirrhosis: immunohistochemical, electron microscopic and immunofluorescence confocal microscopic findings[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10: 1208-1211.
- [13] Sun C, Jin X L, Xiao J C. Oval cells in hepatitis B virus-positive and hepatitis C virus-positive liver cirrhosis: histological and ultrastructural study[J]. *Histopathology*, 2006, 48: 546-555.
- [14] 余宏宇,李文林,谢东甫,等. 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[J]. *第二军医大学学报*, 2005, 26: 251-256.

[收稿日期] 2006-09-12

[修回日期] 2007-01-15

[本文编辑] 贾泽军