

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.01378

• 短篇论著 •

上皮间质转化在人胚胎肝胆管板发育过程中的发生情况及其意义

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

- 1. 解放军 105 医院病理科, 合肥 230031
- 2. 安徽省妇幼保健院妇产科, 合肥 230000
- 3. 第二军医大学长征医院病理科, 上海 200003

[摘要] **目的** 观察上皮间质转化(EMT)标记物在人胚胎肝胆管板发育过程中的表达,探讨胆管板发育过程中 EMT 的发生和意义。**方法** 应用免疫组化法观察 EMT 相关标记物细胞角蛋白 19 (CK19)、波形蛋白(vimentin)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)在 31 例 8~40 周龄人胚胎肝胆管板发育过程中的表达和变化情况。**结果** 从 8 周龄开始,随着胆管板阶段、胆管板重新塑形阶段、胆管形成阶段的发展,汇管区内 CK19 染色阳性细胞百分率也逐渐增加,而 vimentin 和 α -SMA 阳性细胞百分率则逐渐减少,CK19 染色阳性细胞百分率分别与 vimentin 和 α -SMA 阳性细胞百分率呈负相关(CK19 与 vimentin: $r = -0.820, P < 0.001$; CK19 与 α -SMA: $r = -0.797, P < 0.001$)。9 周龄胚胎肝胆管板细胞开始表达 vimentin,13~19 周时达到高峰,之后减少,28 周时检测不到;14~32 周龄胚胎肝部分发育中的胆管细胞也表达 vimentin,观察到汇管区 vimentin 阳性的肌纤维母细胞(pMFs)向胆管(板)内整合、移行。通过连续切片观察到 9~32 周龄胚胎肝部分胆管板或胆管细胞共表达 vimentin 和 CK19。

结论 人胚胎肝胆管板发育过程中存在间质上皮转化,与胆管形成有关。

[关键词] 肝干细胞;胚胎肝;胆管板;上皮间质转化;免疫组织化学

[中图分类号] R 321.54 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)12-1378-04

Epithelial mesenchymal transition during the development of ductal plate in human liver and its significance

XU Jun^{1*}, ZHOU Ji², ZHANG Shi-fen², WANG Jian¹, HU Yong¹, YU Hong-yu³

- 1. Department of Pathology, No. 105 Hospital of PLA, Hefei 230031, Anhui, China
- 2. Department of Gynecology and Obstetrics, Anhui Provincial Maternity and Child-care Hospital, Hefei 230000, Anhui, China
- 3. Department of Pathology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of markers for epithelial-mesenchymal transition (EMT) during the development of ductal plate in human liver, so as to discuss the role of EMT during ductal plate development in the liver.

Methods Immunohistochemical method was used to examine the expression of EMT markers (CK19, vimentin, and α -SMA) in the liver tissues of 31 fetuses of 8-40 weeks old. **Results** From the 8th gestation week onwards (ductal plate phase, remodeling phase of ductal plate, and formation phase of bile ducts), the CK19-positive cells in the portal tract were gradually increased, vimentin/ α -SMA-positive portal mesenchymal cells were gradually decreased, and CK19-positive cells were negatively correlated with vimentin/ α -SMA expression ones (vimentin: $r = -0.820, P < 0.001$; α -SMA: $r = -0.797, P < 0.001$). The ductal plate cells began to express vimentin at the 9th week of gestation, the expression peaked in the fetal liver during 13-19 weeks of gestation, and then it was gradually declined and became undetectable at the 28th week. Some immature bile duct epithelial cells showed cytoplasmic immunostaining of vimentin from 14 to 32 weeks of gestation. Furthermore, integration and transition were observed between vimentin-positive portal myofibroblasts (pMFs) and ductal plate cells or bile ducts. In serial section of the developing human liver (9-32 weeks), we observed that ductal plate or bile ducts cells co-expressed vimentin and CK19.

Conclusion Our findings show the presence of mesenchymal-epithelial transition during the development of ductal plate in human liver, which is associated with the formation of bile ducts.

[Key words] hepatic stem cells; developing human liver; ductal plate; epithelial mesenchymal transition; immunohistochemistry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(12):1378-1381]

[收稿日期] 2014-04-09 **[接受日期]** 2014-05-23

[作者简介] 徐 军, 硕士, 主治医师.

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0551-65966253, E-mail: doctorxujun@163.com

上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 在胚胎发育、组织重建、癌症转移过程中发挥着重要作用。研究表明,从小鼠胚胎肝中提取肝干细胞进行体外细胞培养可诱导出 EMT^[1-2],发育早期(8 周龄前)的人胚胎肝组织中的肝干细胞具有 EMT 表型,人肝芽来源的肝干细胞系(hLBSC)不仅具有肝干细胞特征,还表达间质标记物^[3],均说明 EMT 的产生和干细胞密切相关。我们前期研究证实 8 周龄后胚胎肝内出现的胆管板内含有丰富的肝干细胞,并且具有双向分化潜能^[4],由此设想胆管板干细胞及其所在的汇管区间质之间也可能存在 EMT。本研究用免疫组化方法观察 EMT 相关蛋白在 31 例 8~40 周龄人胚胎肝组织中的表达,探讨胆管板发育过程中 EMT 的发生和意义。

1 材料和方法

1.1 组织来源 31 例 8~40 周龄胚胎肝标本取自解放军 105 医院和安徽省妇幼保健院,其中 15 例为孕妇自愿流产(4 例行米非司酮流产,11 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,实验过程符合伦理标准,经解放军 105 医院医学伦理委员会批准;胎龄按 Jirasek(1983)制定的人体胚胎正常发育表、B 超测定胎儿双顶径与股骨径和孕妇的末次月经来确定。

1.2 免疫组化染色 采用 MaxVision 两步法,所有标本均用 10% 中性缓冲甲醛固定,常规石蜡包埋、连续切片,一张切片行 H-E 染色,其余脱蜡至水,柠檬酸高温高压抗原修复 20 min,滴加 0.3% H₂O₂ 室温孵育 20 min,阻断内源性过氧化物酶,滴加一抗鼠抗人细胞角蛋白 19(cytokeratin 19, CK19)、波形蛋白(vimentin)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)单克隆抗体(Abnova 公司),然后放置于 4℃ 过夜,滴加即用型 MaxVision™/HRP 试剂(福州迈新生物技术开发公司),室温孵育 15 min, DAB 显色,苏木精复染。分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。判定标准:背景清晰;细胞质或细胞膜出现棕黄色颗粒为阳性。每张切片均观察 5 个完整的汇管区,用 LOGENE-I PAS9000 图像分析系统分别计算 CK19、vimentin 和 α -SMA 阳性细胞百分比。

1.3 统计学处理 所有数据均用 SPSS16.0 统计软

件处理,CK19、vimentin 和 α -SMA 阳性细胞百分率之间的关系采用 Spearman 等级资料相关分析,各組间 CK19、vimentin 和 α -SMA 阳性率比较用单因素方差分析(One-Way ANOVA),检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 8 周龄后胚胎肝汇管区的特点 8 周龄后胚胎肝内在较大门静脉间质周围发现胆管板(图 1A),9 周龄胚胎肝内中央静脉及汇管区开始形成,11 周时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,肝索也逐渐演变成肝板,参考 Libbrecht 等^[5]胆管板发育可分为 3 个阶段:(1)胆管板阶段可见汇管区周围包绕单层或两层胆管板细胞;(2)胆管板重新塑形阶段除胆管板外还可见胆管形成;(3)胆管板塑形完成阶段,可见单个独立的胆管。

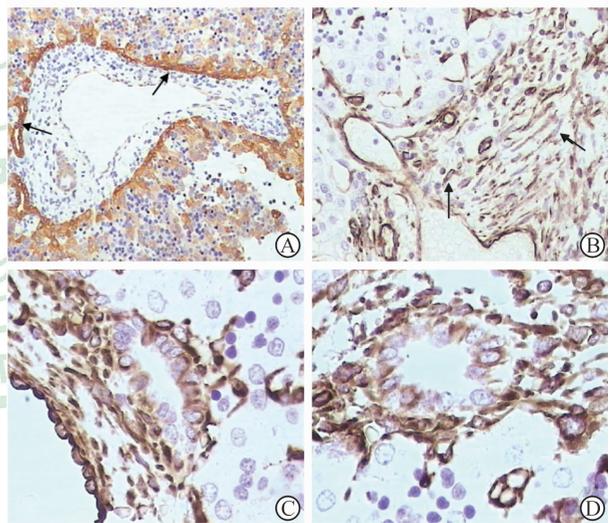


图 1 上皮、间质标记物在人胚胎肝组织中的表达(免疫组化 MaxVision 法)

A: 胆管板阶段(11 周),肝索中肝母细胞、汇管区周围的双层胆管板细胞(箭头示)CK19 强阳性;B: 胆管板阶段(16 周),汇管区肌纤维母细胞(箭头示);C、D: 胆管板重塑阶段,胆管上皮和周围的间充质细胞表达 vimentin,可见 vimentin⁺肌纤维母细胞向胆管内整合、移行。C: 22⁺3 周;D: 24⁺1 周。Original magnification: $\times 100$ (A), $\times 200$ (B), $\times 400$ (C, D)

2.2 CK19、vimentin、 α -SMA 在人胚胎肝组织中的表达及相关性 8 周龄胚胎肝细胞已经表达 CK19,阳性染色位于胞质和胞膜,CK19 阳性程度在 8~11 周龄胚胎肝组织的肝索细胞中达到最高峰,胆管板 CK19 染色始终强于肝索细胞(图 1A),12 周龄胚胎

肝组织肝索细胞和 CK19 的表达逐渐减少,16 周龄胚胎肝索内几乎检测不到。

Vimentin、 α -SMA 在肝索中散在表达,可见于血窦内皮、星状细胞、吞噬细胞,在汇管区表达于血管内皮、平滑肌以及肌纤维母细胞(portal myofibroblasts, pMFs),后者位于汇管区间质内,长梭形、胞质稀少(图 1B)。CK19 染色阳性细胞百分率分别与 vimentin 和 α -SMA 阳性细胞百分率呈负相关(CK19 与 vimentin: $r = -0.820, P < 0.001$; CK19 与 α -SMA: $r = -0.797, P < 0.001$)。比较 3 个不同阶段的各指标表达水平,胆管板阶段、胆管板重新塑形阶段、胆管形成阶段的 CK19 阳性细胞百分率逐渐升高,vimentin 和 α -SMA 阳性细胞百分率逐渐降低(表 1、图 2)。9 周龄胚胎肝组织胆管板细胞开始表达 vimentin,13~19 周阳性达到高峰,之后不断减少,28 周后检测不到,而且部分发育中的胆管细胞(14~32 周)也表达 vimentin,胆管板、胆管细胞 vimentin 阳性部位均位于胞质,可观察到 vimentin 阳性的 pMFs 向胆管(板)内整合、移行(图 1C、1D)。连续切片可以观察到 9~32 周胚胎肝胆管板或胆管细胞共表达 vimentin 和 CK19(图 3)。

表 1 上皮间质转化标志物在胆管板发育 3 个阶段中的阳性率比较

阶段	例数	CK19 ⁺	Vimentin ⁺	α -SMA ⁺
胆管板阶段	13	37.44 ± 4.41	78.52 ± 4.36	77.56 ± 4.45
胆管板重塑阶段	9	46.89 ± 3.46	68.29 ± 5.20	61.80 ± 5.71
胆管形成阶段	9	51.20 ± 1.98	59.07 ± 2.51	52.16 ± 2.97

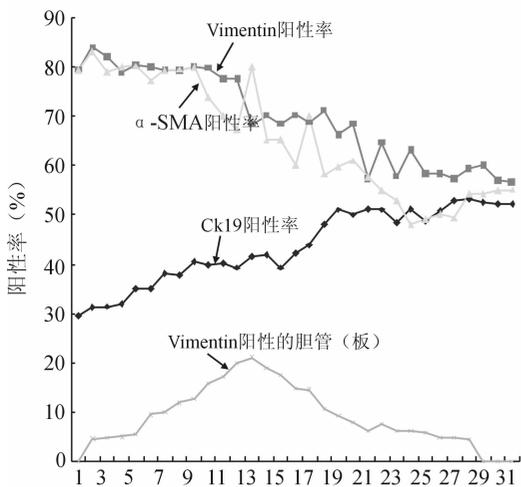


图 2 人胚胎肝胆管板发育过程中上皮间质转化相关蛋白的表达变化

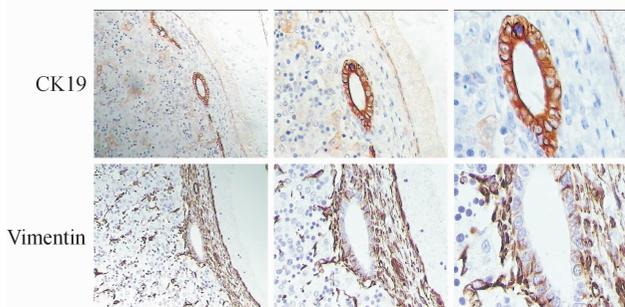


图 3 连续切片观察到 21 周胚胎肝组织胆管(板)细胞共表达 vimentin 和 CK19

Original magnification: ×100, ×200, ×400(从左到右)

3 讨论

研究证明,从胚胎肝中提取胚胎肝干细胞进行体外培养可诱导出 EMT^[1-2],Chagraoui 等^[6]在小鼠胚胎肝组织中用免疫荧光双标记检测 CK18 和 α -SMA 的表达,在造血期胚胎肝组织中(11.5~18.5dpc)观察到了具有 EMT 特征的间质细胞。苏娟等^[3]证实发育早期(8 周龄前)的人胚胎肝组织内肝干细胞具有 EMT 表型特征。本实验结果显示随着胆管板发育 3 个阶段的进行,汇管区内 CK19 阳性的胆管板和胆管细胞数目增加,vimentin 和 α -SMA 阳性的汇管区间质细胞数目逐渐减少,二者呈负相关,并且在 9~32 周胚胎肝内观察到部分胆管板和胆管细胞共表达 vimentin 和 CK19,随着胆管发育趋近成熟,vimentin 表达消失,说明在特定时间段内部分胆管板和胆管细胞共表达上皮和间质表型,还观察到 vimentin 阳性的汇管区 pMFs 向胆管(板)内整合、移行,说明人胚胎肝胆管板发育过程中存在间质上皮转化(MET),与胆管形成有关。胆管形成机制的一个关键的环节是需要胆管板和周围的间充质细胞发生相互作用^[5],MET 可能是参与这个环节的作用机制之一,这可以促进对 EMT 发生机制的深入认识,进而为合理干预病理性 EMT 及胆管发育畸形如小儿胆道闭锁^[7],提供理论依据。

Vimentin 是间质细胞表型,也是重要的 EMT 标记物。我们观察到 9~32 周胚胎肝部分胆管板干细胞和胆管细胞共表达 vimentin 和 CK19,这与其他的研究相符合:多种来源的干细胞可以具有间质表型,如乳腺干细胞^[8]、小鼠胚胎肝干细胞^[6]等,从侧面说明了 EMT 的产生与干细胞密切相关。Li 等^[9]分离培养小鼠胚胎肝内 vimentin 阳性的非造血细胞

可以诱导产生 AFP,通过双标记实验发现从 11.5 d 至出生前的小鼠胚胎肝组织中有不同比例的 AFP、vimentin 和 BrdU、vimentin 双阳性细胞存在,这种表型特点与本实验观察到的共表达 vimentin 和 CK19 的胆管板干细胞类似,不同之处是,从小鼠胚胎肝内分离出来的 vimentin 阳性细胞可能位于肝索内,表达 AFP 提示向肝系分化,而本研究中 vimentin 阳性的胆管(板)细胞表达 CK19,主要是向胆管系分化^[10]。

表达 vimentin 的胆管(板)细胞可能是 EMT/MET 发生过程中一种处于未分化状态的肝干细胞,具有自我更新和多向分化潜能,可以在胚胎发生的特定阶段通过激活 MET 产生,通过分泌细胞外基质和促进胆管游走迁移参与胆管发育成熟,随着胆管形成,vimentin 阳性细胞减少,最后转变成位于肝界板处的赫令管细胞,但因赫令管细胞难以观察到,所以无从知道其是否表达 vimentin^[11]。

研究证实,EMT 还是恶性肿瘤侵袭转移的始动环节,EMT 使癌细胞失去上皮特征,获得间质细胞特征,增加了肿瘤细胞的转移和侵袭潜能^[12],EMT 的产生与癌干细胞密切相关,高表达干细胞基因的肝癌细胞株可诱导产生 EMT^[13]。胚胎肝富于肝干细胞的各种中间形态,胚胎肝发育与肝癌的发生、发展有相似性,如细胞可塑性、动力学、形态学、信号转导通路等,因此越来越多的学者从胚胎发育时的胚胎植入、细胞增殖、分化和迁移等正常生理过程来寻求肿瘤发生及侵袭转移等方面的机制。本研究从细胞和分子水平对 EMT 参与调控人胚胎肝胆管发育的相关机制进行研究,这对于理解和研究肝癌的发生发展机制有一定的借鉴意义。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Inada M, Follenzi A, Cheng K, Surana M, Joseph B, Benten D, et al. Phenotype reversion in fetal human liver epithelial cells identifies the role of an intermediate meso-endodermal stage before hepatic maturation [J]. *J Cell Sci*, 2008, 121: 1002-1013.

[2] Choi S S, Diehl A M. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver[J]. *Hepatology*, 2009, 50: 2007-2013.

[3] Su J, You P, Li W L, Tao X R, Zhu H Y, Yao Y C, et al. The existence of multipotent stem cells with epithelial-mesenchymal transition features in the human liver bud[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42: 2047-2055.

[4] 徐军,胡勇,王健,周继,章太平,余宏宇. 人胚胎发育过程中胚胎组织肝干细胞免疫表型的变化[J]. *第二军医大学学报*, 2007, 28: 117-121.

Xu J, Hu Y, Wang J, Zhou J, Zhang T P, Yu H Y. Immunohistochemical characterization of hepatic stem cells in developing human liver [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2007, 28: 117-121.

[5] Libbrecht L, Cassiman D, Desmet V, Roskams T. The correlation between portal myofibroblasts and development of intrahepatic bile ducts and arterial branches in human liver[J]. *Liver*, 2002, 22: 252-258.

[6] Chagraoui J, Lepage-Noll A, Anjo A, Uzan G, Charbord P. Fetal liver stroma consists of cells in epithelial-mesenchymal transition[J]. *Blood*, 2003, 101: 2973-2982.

[7] 张志波,胡婷嫣,何峰,高红. 胆道闭锁肝脏组织中 SHH 信号与上皮间充质转化关系的研究[J]. *中国医科大学学报*, 2010, 39: 305-307.

[8] Mani S A, Guo W, Liao M J, Eaton E N, Ayyanan A, Zhou A Y, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells[J]. *Cell*, 2008, 133: 704-715.

[9] Li B, Zheng Y W, Sano Y, Taniguchi H. Evidence for mesenchymal-epithelial transition associated with mouse hepatic stem cell differentiation[J]. *PLoS One*, 2011, 6: e17092.

[10] Carpentier R, Suñer R E, van Hul N, Kopp J L, Beaudry J B, Cordi S, et al. Embryonic ductal plate cells give rise to cholangiocytes, periportal hepatocytes, and adult liver progenitor cells[J]. *Gastroenterology*, 2011, 141: 1432-1438.

[11] Deng H, Wang H F, Gao Y B, Jin X L, Xiao J C. Hepatic progenitor cell represents a transitioning cell population between liver epithelium and stroma[J]. *Med Hypotheses*, 2011, 76: 809-812.

[12] Ding W, You H, Dang H, LeBlanc F, Galicia V, Lu S C, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition of murine liver tumor cells promotes invasion [J]. *Hepatology*, 2010, 52: 945-953.

[13] Na D C, Lee J E, Yoo J E, Oh B K, Choi G H, Park Y N. Invasion and EMT-associated genes are up-regulated in B viral hepatocellular carcinoma with high expression of CD133—human and cell culture study[J]. *Exp Mol Pathol*, 2011, 90: 66-73.