

文章编号:1005-6947(2008)01-0079-03

· 文献综述 ·

# 肝肿瘤干细胞的研究进展

谭岫 综述 陈积圣 审校

(中山大学附属第二医院 普通外科, 广东 广州 510120)

**摘要:**肿瘤干细胞是一群存在于某些肿瘤组织中的干细胞样细胞。笔者就肝肿瘤干细胞的来源、与肝癌的关系、分离鉴别等问题的研究进展作一综述。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(1): 79-81]

**关键词:** 肝肿瘤; 干细胞; 肝肿瘤干细胞; 肿瘤干细胞; 综述文献

**中图分类号:** R 735.7

**文献标识码:** A

肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)概念的提出和最早被证实起源于对白血病的研究。20世纪70年代 Nowell<sup>[1]</sup>发现在白血病组织中仅有极少数细胞能在体内进一步增殖,并在体内移植后形成集落,从而提出了白血病干细胞的概念。Bonnet等<sup>[2]</sup>从白血病患者分离出不同类型的白血病细胞,其中一种表面标志为CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>的亚型细胞移植到非肥胖型糖尿病/重症联合免疫缺陷(nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency disease, NOD/SCID)小鼠体内能形成克隆,而其他亚型则无此特性,证实了白血病干细胞的存在。另外在一些实体肿瘤如乳腺癌<sup>[3]</sup>、脑胶质瘤<sup>[4]</sup>也证实有CSCs。目前认为CSCs是一群数目极少的存在于一些肿瘤组织中的干细胞样细胞。它具有自我更新和无限增殖的能力,是肿瘤细胞的起始细胞,在肿瘤的发生、恶化、转移中起重要作用。原发性肝细胞癌(HCC)是否存在肝CSCs及HCC细胞的来源一直倍受关注。虽然迄今尚无直接肯定的证据证实

肝CSCs的存在,但越来越多的实验结果显示肝癌组织中存在干细胞样细胞,推测它们可能是肝CSCs。

## 1 肝癌与肝CSCs/肝干细胞

卵圆细胞被认为是具有双向分化潜能的肝干细胞,可分化为肝细胞和胆管上皮细胞,最早由Kinosita于1937年在受对二甲氨基偶氮苯处理的鼠肝脏中发现。这可能说明肝干细胞与肝癌有关。Robrechts等<sup>[5]</sup>报道1例原发性肝癌组织中的肿瘤细胞具有介于肝细胞及胆管细胞之间的表型,且病程发展迅速,患者入院9d即死于肝衰竭和肝性脑病。他们怀疑这一肿瘤细胞为肝祖细胞;其病情发展迅速可能与起源于这种未成熟的细胞有关。Lowes等<sup>[6]</sup>和Libbrecht等<sup>[7]</sup>利用免疫组化方法在慢性丙型肝炎、酒精性肝病、遗传性血红蛋白沉着病以及肝腺瘤等可使肝细胞癌发生几率提高的慢性肝病中,观察到卵圆细胞的存在。Lowes等<sup>[6]</sup>还观察到随着疾病严重程度的增加,卵圆细胞的数量也增加。Lee等<sup>[8]</sup>对乙型肝炎病毒相关肝硬化及肝硬化合并肝癌的病例标本进行c-kit(肝干细胞标志之一)免疫标记,发现50例肝癌标本中有40例存在c-kit+肿瘤细胞;同时发现在50例肝癌标本中有44例卵圆细胞在肿瘤周围组织中增多。他们认为卵圆细胞的增殖与乙型肝炎病毒相关肝癌的发生有关。Parent

等<sup>[9]</sup>从患肝细胞癌的肝脏中分离出具有分化潜能的肝干细胞系。免疫组化结果显示这些干细胞的数量在病变的肝脏中比正常肝脏多50%。这很可能是在病变过程中干细胞的增殖被激活所致。

## 2 肝癌中肝CSCs的来源

虽然正常组织干细胞和CSCs有许多共同点<sup>[10]</sup>,但后者的来源仍不清楚。目前有两种观点:(1)来源于正常干细胞,包括已经存在的肝干细胞(HSC)被激活的自我更新机制。HSC获得较少突变即有可能恶性转化,而且干细胞的存活时间较长,形成CSCs的机会越多<sup>[10]</sup>。(2)一些原始细胞或成熟细胞发生基因突变,重新获得自我更新能力和分化潜能后形成CSCs<sup>[11]</sup>。

Dumble等<sup>[12]</sup>对敲除p53基因小鼠喂含乙硫氨酸而缺乏胆碱的饮食,诱导卵圆细胞大量增生,分离卵圆细胞进行培养,将有永生化特性的细胞接种入裸鼠皮下长出与肝细胞癌相似的肿瘤,检测肿瘤表面标志物,确定其由卵圆细胞分化而来,提示卵圆细胞可能参与肝癌的发生。朱言亮等<sup>[13]</sup>用化学致癌剂3'-甲基-4-二甲氨基偶氮苯(3'-Me-DAB)诱发大鼠肝癌,在大鼠诱癌过程中动态检测肝组织内卵圆细胞及p53基因表达的变化,发现诱癌4周大鼠肝门管区及坏死区内均见大量卵圆

收稿日期:2007-04-30;

修订日期:2007-08-17。

**作者简介:**谭岫,女,广州中山大学附属第二医院博士研究生,主要从事肝胆疾病方面的研究。

**通讯作者:**陈积圣 E-mail: chenjs@163.com

细胞,诱癌 16 周肝组织内可见癌结节形成,癌结节内外均有卵圆细胞聚集,部分增生的卵圆细胞 p53 阳性反应,两者的分布区域基本一致;诱癌 20 周后大鼠肝癌组织内的 p53 蛋白水平均显著升高。他们认为卵圆细胞贯穿于大鼠发生肝癌的全过程,与肝癌的发生有着密切的联系;其机制可能与 p53 基因的突变有关。Chiba 等<sup>[14]</sup>对 4 种不同的肝癌细胞株进行分析,发现在 Huh7 和 PLC/PRF/5 株中有侧群细胞(SP 细胞),而 HepG2 和 Huh6 株中无 SP 细胞,而且 SP 细胞较非 SP 细胞有较强的增殖潜能和抗凋亡能力。1x10<sup>3</sup>SP 细胞移植到 NOD/SCID 小鼠体内即有肿瘤形成,而 1x10<sup>6</sup>非 SP 细胞移植到 NOD/SCID 小鼠体内无肿瘤形成。另外他们对 SP 细胞形成的肿瘤组织进行分析发现该肿瘤组织包括 SP 细胞和非 SP 细胞,只有 SP 细胞保持继续形成肿瘤的能力。因此认为 SP 细胞有致癌能力,为肝 CSCs。Ho 等<sup>[15]</sup>研究发现循环的骨髓来源的内皮祖细胞形成的克隆集落在肝癌组织中多于肝硬化和健康肝脏,同时在不可切除肝癌中其克隆形成集落多于可切除的肝癌。他们还发现,有高克隆形成集落的肝癌患者术后 1 年的复发率增高。提示肝 CSCs 可能由正常组织干细胞突变而来。

Gournay 等<sup>[16]</sup>用逆转录病毒介导的体内标记方法获得 2-乙酰氨基芴(2-AFF)诱导的大鼠潜伏癌细胞可由成熟肝细胞去分化形成的结论。Pounder 等<sup>[17]</sup>认为出生后的正常肝脏中肝细胞可以产生新的肝细胞,并且子代细胞不迁移;当受到刺激后肝细胞可以大量的扩增,当有足够量的基因突变发生时,肝细胞和卵圆细胞都可以转变为肝细胞癌细胞或胆管癌细胞。

### 3 肝 CSCs 的分离鉴别

由于肝 CSCs 可能由正常肝干细胞突变而来,研究者希望利用肝干细胞的表面标志物来分离鉴别肝 CSCs。周思朗等<sup>[18]</sup>利用二乙基亚硝

胺为诱癌剂制造大鼠肝癌模型,分离培养肿瘤细胞,按照卵圆细胞表面标志物[CD34, c-Kit, Thy-1, 甲胎蛋白(AFP), 细胞角蛋白(CK)7, CK8, CK14, CK18, CK19 和  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶]分选肿瘤细胞,比较各个表面标志物阳性肿瘤细胞亚群与阴性肿瘤细胞亚群移植裸鼠后成瘤能力的差异,发现 Thy-1 阳性细胞、CK7 阴性细胞与 AFP 阳性细胞成瘤能力明显大于对应细胞亚群,具备初步的肝癌干细胞特征。Durnez 等<sup>[19]</sup>通过对 109 例肝癌标本进行分析发现 CK7 或 CK19 阳性的细胞可能为肝 CSCs,且存在 CK19 阳性肝癌的患者肝移植后复发率高,预后较差的特点。

CD133 为造血干细胞的表面标志。但有研究发现其在神经上皮细胞、不成熟的其他正常组织细胞中表达<sup>[20-21]</sup>。有研究<sup>[22-23]</sup>发现,CD133 在有些肿瘤组织特别是脑肿瘤、前列腺癌的 CSCs 中表达。有学者对 CD133 是否在肝癌中表达及能否通过 CD133 找到肝 CSCs 进行了研究。Suetsugu 等<sup>[24]</sup>对 Huh-7, HepG2, He3 株肝肿瘤细胞系研究发现,CD133 只在 Huh-7 细胞系中有表达,且从 Huh-7 细胞系中分离的 CD133<sup>+</sup>细胞较 CD133<sup>-</sup>细胞有较高的增殖能力和较低的成熟肝细胞表面标志、细胞色素 P450 和谷氨酰胺合成酶的表达。他们还将 CD133<sup>+</sup>和 CD133<sup>-</sup>细胞分别接种于 SCID 小鼠皮下,发现 CD133<sup>+</sup>细胞形成肿瘤,而 CD133<sup>-</sup>细胞几乎没有肿瘤形成。Yin 等<sup>[25]</sup>通过实验证实有小部分 CD133<sup>+</sup>细胞在肝肿瘤细胞株和肝癌组织中存在。同时发现从 SMMC-7721 细胞株中分离出的 CD133<sup>+</sup>细胞较 CD133<sup>-</sup>细胞有较高的致瘤性和增殖能力,他们认为 CD133<sup>+</sup>细胞可能为肝 CSCs。

Grozdanov 等<sup>[26]</sup>实验发现癌胚蛋白 glypican-3 (Gpc3)在胚胎肝组织、2-AFF 损伤肝组织激活的肝祖细胞中高表达,而在正常成熟肝组织中不表达;认为 Gpc3 可能是肝祖细胞的标志。这为寻找肝 CSCs 提供了新的线索。

### 4 肝 CSCs 研究中存在的问题

目前仅在动物实验和已建系的肝癌细胞株中观察到可能有肝 CSCs 的存在,但还没有直接在人肝癌细胞原代培养中找到肝 CSCs 的报道。

目前对于肝 CSCs 来源于干细胞的突变,还是成熟细胞的去分化,还是有其他途径尚不甚明确,肝 CSCs 的产生过程和诱发机制也不清楚。

目前分离鉴别肝 CSCs 的方法主要有荧光活化细胞分选系统(fluorescence activated cell sorting, FACS)及磁性活化细胞分选系统(magnetic activated cell sorting, MACS)。这两种分离技术均有赖于对 CSCs 表面标志物的识别。寻找肝 CSCs 主要依靠肝干细胞的表面标志。迄今仍未找到肝干细胞特异性的表面标志物,故认为寻找肝干细胞及肝 CSCs 的特异性表面标志物对分离鉴别肝 CSCs 有十分重要的意义。

总之,目前普遍认为肝 CSCs 是存在的,并认为它虽然只占肝肿瘤的一小部分细胞,但对肝肿瘤的生长、复发、转移等起关键作用。肝 CSCs 的研究丰富了人们对肝脏肿瘤的认识,通过明确肝 CSCs 的来源,并加以分离鉴别对研究肝肿瘤特别是肝癌的发生机制,以及确定肿瘤的分化调控、基因治疗及预防癌变的靶细胞等有十分重要的意义。

### 参考文献:

- [1] Nowell P D. The clonal evolution of tumor cell population [J]. Science, 1976, 194 (4260): 23 - 28.
- [2] Bonnet D, Dick J E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hemopoietic cell [J]. Nature Med, 1997, 3 (7): 730 - 737.
- [3] Al-Hajj M, Wicha M S, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100 (7): 3983 - 3988.

- [4] Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(3):781-786.
- [5] Robrechts C, De Vos R, Van den Heuvel M, *et al.* Primary liver tumour of intermediate (hepatocyte-bile duct cell) phenotype: a progenitor cell tumour? [J]. *Liver*, 1998, 18(4):288-293.
- [6] Lowes K N, Brennan B A, Yeoh G C, *et al.* Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity [J]. *Am J Pathol*, 1999, 154(2):537-541.
- [7] Libbrecht L, De Vos R, Cassiman D, *et al.* Cassiman D hepatic progenitor cells in hepatocellular adenomas [J]. *Am J Surg Pathol*, 2001, 25(11):1388-1396.
- [8] Lee E S, Han E M, Kim Y S, *et al.* Occurrence of c-kit + tumor cells in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma [J]. *Am J Clin Pathol*, 2005, 124(1):31-36.
- [9] Parent R, Marion M J, Furio L, *et al.* Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line [J]. *Gastroenterology*, 2004, 126(4):1147-1156.
- [10] Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah W M, *et al.* Stem cells in normal breast development and breast cancer [J]. *Cell Prolif*, 2003, 36(Suppl 1):59-72.
- [11] Perez-Losada J, Balmain A. Stem-cell hierarchy in skin cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(6):434-443.
- [12] Dumble M L, Croager E J, Yeoh G C, *et al.* Generation and characterization of p53 null transformed hepatic progenitor cells: oval cells give rise to hepatocellular carcinoma [J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23(3):435-445.
- [13] 朱言亮, 陈孝平, 张万广, 等. 大鼠实验性肝癌发生中卵圆细胞的变化 [J]. *世界华人消化杂志*, 2006, 14(29):2830-2833.
- [14] Chiba T, Kita K, Zheng Y W, *et al.* Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties [J]. *Hepatology*, 2006, 44(1):240-251.
- [15] Ho JW, Pang RW, Lau C, *et al.* Significance of circulating endothelial progenitor cells in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2006, 44(4):836-843.
- [16] Gournay J, Auvigne I, Pichard V, *et al.* In vivo cell lineage analysis during chemical hepatocarcinogenesis in rats using retroviral-mediated gene transfer: evidence for dedifferentiation of mature hepatocytes [J]. *Lab Invest*, 2002, 82(6):781-788.
- [17] Ponder K P. Analysis of liver development, regeneration, and carcinogenesis by genetic marking studies [J]. *FASEB J*, 1996, 10(7):673-682.
- [18] 周思朗, 李鹏, 曹漫明, 等. 大鼠肝癌干细胞生物学行为研究 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2006, 14(5):364-366.
- [19] Burnez A, Verslype C, Nevens F, *et al.* The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin [J]. *Histopathology*, 2006, 49(2):138-151.
- [20] Richardson G D, Robson C N, Lang S H, *et al.* CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells [J]. *Cell Sci*, 2004 (pt 16), 117:3539-3545.
- [21] Shmelkov S V, St Clair R, Lyden D, *et al.* AC133/CD133/Prominin-1 [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37(4):715-719.
- [22] Singh S K, Hawkins C, Clarke I D, *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells [J]. *Nature*, 2004, 432(7015):396-401.
- [23] Collins A T, Berry P A, Hyde C, *et al.* Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(23):10946-10951.
- [24] Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, *et al.* Characterization of CD133<sup>+</sup> hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351(4):820-824.
- [25] Yin S, Li J, Hu C, *et al.* CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity [J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(7):1444-1450.
- [26] Grozdanov PN, Yovchev MI, Dabeva MD. The oncofetal protein glypican-3 is a novel marker of hepatic progenitor/oval cells [J]. *Lab Invest*, 2006, 86(12):1272-1284.