论著

文章编号:1000-5404(2006)02-0114-03

原发性肝癌不同病理组织类型中肝干细胞的起源分析

王 阁[1],索金友[1,2],邓 婧[1],杨 进[1],郑继军[1],王红中[1],胡 庆[1],李增鹏[3],肖华亮[3],王 东[1,3] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]肿瘤中心,[2]肝胆科,[3]病理科,重庆 400042)

提 要:目的 观察原发性肝癌不同病理组织类型中肝干细胞的活化、分布、来源和免疫表达特征。**方法** 应用HE染色、免疫组化S-P方法观察94例肝细胞癌(HCC)和12例肝内胆管细胞癌(ICC)和10例混合型肝癌的肝干细胞情况,用5例肝硬化和4例正常肝组织为对照。**结果** 在原发性肝癌不同病理组织类型中干细胞免疫标志均有不同程度的表达,均可观察到肝干细胞向肝癌细胞的转化,以混合型肝细胞癌中肝干细胞免疫表型表达率最高($P<0.05$)。**结论** 不同病理组织类型的肝癌组织中均存在不同分化状态和不同来源的肝干细胞,可能由于肝干细胞(hepatic stem cell, HSC)分化不全或分化异常所致。

关键词:原发性肝癌;肝干细胞;癌发生;免疫组织化学

中图法分类号:R329.21;R730.2;R735.7 **文献标识码**:A

Origin of hepatic stem cells in human hepatocellular carcinoma

WANG Ge[1], SUO Jin-you[1,2], DENG Jing[1], YANG Jin[1], ZHENG Ji-jun[1], WANG Hong-zhong[1], HU Qing[1], LI Zeng-peng[3], XIAO Hua-liang[3], WANG Dong[1,3] ([1]Cancer Center, [2]Department of Hepatobiliary Surgery, [3]Department of Pathology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the activation, distribution, origin, and expression of hepatic stem cells(HSC) in different histological types of primary liver carcinomas. **Methods** The histological and immunohistochemical features of 94 cases of hepatocellular carcinoma (HCC), 12 cases of intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) and 10 cases of mixed hepatocarcinoma were examined by HE staining and immunohistochemistry SP method, with 5 cases of sclerotic liver and 4 cases of normal liver tissues as control. **Results** HSC expression was observed and the transfor mation from HSC to carcinoma cell was also noted in the liver. CK7, CK19, c-kit, Thy-1, and AFP were found expressed in different types of hepatic carcinomas and the greatest intensive expression was found in the mixed hepatocarcinoma ($P<0.05$). **Conclusion** There exist varied differentiations and origins of HSCs in different histological types of primary hepatic carcinoma tissues, which is presumably due to poor or abnormal differentiation of HSCs.

Key words: primary hepatic carcinoma; hepatic stem cell; carcinogenesis; immunohistochemistry

原发性肝癌的发生曾归因于成熟细胞的"去分化(dedifferentiation)",但是,近年来研究认为它可能由肝干细胞(HSC)分化不全或分化异常(disdifferentiation)所致[1]。肝干细胞是一类具有长期自我更新和多向分化能力的细胞,除了来源于以肝内卵圆细胞为代表的原始细胞外,还可以来源于骨髓或外周循环系统干细胞的转化。本研究对原发性肝癌不同病理组织类型中肝干细胞的活化、分布、来源和免疫表型特征进行初步探讨,旨在为原发性肝癌靶向治疗、诱导分化治疗和预后评估等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 组织标本

石蜡包埋组织来自病理科存档资料。以94例肝细胞癌(HCC)和12例肝内胆管细胞癌(ICC)和10例混合型肝癌作为研究对象,5例肝硬化和4例正常肝组织作为实验对照。肝癌组织均为患者首次肝癌切除手术时采取,包括肿瘤组织和癌旁组织。患者均无化疗和放射治疗史。

1.2 主要抗体

CK19(工作浓度1∶100),CK7(工作浓度1∶100),CK8-18(工作浓度1∶100),c-kit(工作浓度1∶50),Thy-1(工作浓度

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370341),全国优秀博士专项基金资助项目(200261)
National Natural Science Foundation of China(30370341) and the Academic Foundition for Authors of National Excellent Doctoral Dissertation of China (200261)

作者简介:王 阁(1968-),男,重庆市人,博士,副教授,主要从事肝细胞肝癌的分子机制方面的研究。电话:(023)68757759

收稿日期:2005-07-21;**修回日期**:2005-11-04

1∶100),AFP(工作浓度 1∶100)均购于 Santa Cruz 公司。

1.3　免疫组织化学

对所有石蜡包埋组织进行了 S-P 法 CK19、CK7、CK8/18、AFP、c-kit 和 Thy-1 抗原的免疫组化检测。每次试验均以 PBS 代替一抗设立阴性对照,c-kit 和 Thy-1 分别按照试剂说明使用乳腺癌和胸腺组织作为阳性对照。

1.4　实验结果处理

免疫组化强度评定:根据阳性染色的癌细胞占光镜下全部肿瘤细胞的比例和染色强弱分为 4 级:"－",表示阴性,切片上无阳性染色癌细胞;"＋",弱阳性,阳性癌细胞≤10%,稀落分布,浅棕色弱染;"＋＋",阳性,占 10% ~ 50%,片灶状分布,呈棕黄色;"＋＋＋",强阳性,>50%,分布广,深褐色强染。

1.5　统计学处理

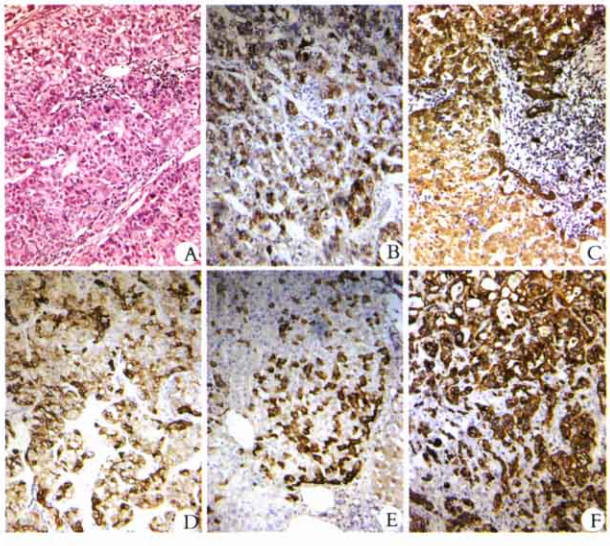
采用 SPSS 12.0 软件进行 χ^2 检验。

2　结果

CK19、CK7、c-kit、Thy-1 和 AFP 阳性表达率在 4 例正常肝组织表达均较低,c-kit、Thy-1 和 AFP 阳性表达率在 5 例肝硬化组织表达较低,而在原发性肝癌不同病理组织类型中干细胞免疫标志均有不同程度和类型的表达。

2.1　肝细胞肝癌中肝干细胞的分布

CK19、CK7、c-kit、Thy-1 和 AFP 阳性染色的表达率分别为 51.1%(48/94)、44.7%(42/94)、24.6%(23/94)、19.1%(18/94)、48.9%(46/94)。在不同的分化肝细胞癌中均可见不同分化程度肝干细胞增殖,向肝细胞样细胞分化、实质内迁移和肝细胞板内整合(图 1)。



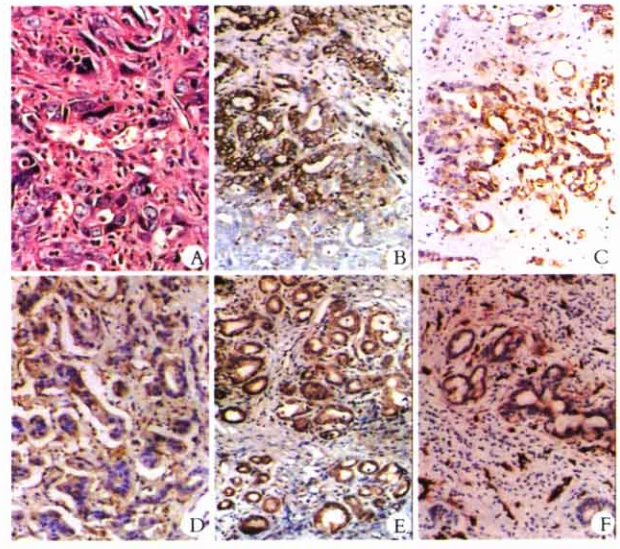
A: HE; B: AFP; C: CK7; D: c-kit; E: CD90; F:CK19

图 1　肝细胞肝癌病理学特征和肝干细胞免疫表型的表达

(A: HE×100, B－F: S-P×200)

2.2　胆管细胞癌中肝干细胞的分布

细胞角蛋白 CK19、CK7 在胆管细胞癌中全部呈强阳性表达,阳性率均为 100%,而 c-kit、Thy-1 和 AFP 在 12 例胆管细胞癌中分别有 41.7%(5/12)、33.3%(4/12)和 33.3%(4/12)。胆管细胞癌中癌细胞核大而嗜碱染,细胞质少,核质比增高,癌细胞排列成管腔样结构或管壁增厚呈片状生长,癌周纤维结缔组织增生包绕;在汇管区均可见不同分化程度肝干细胞分布(图 2)。



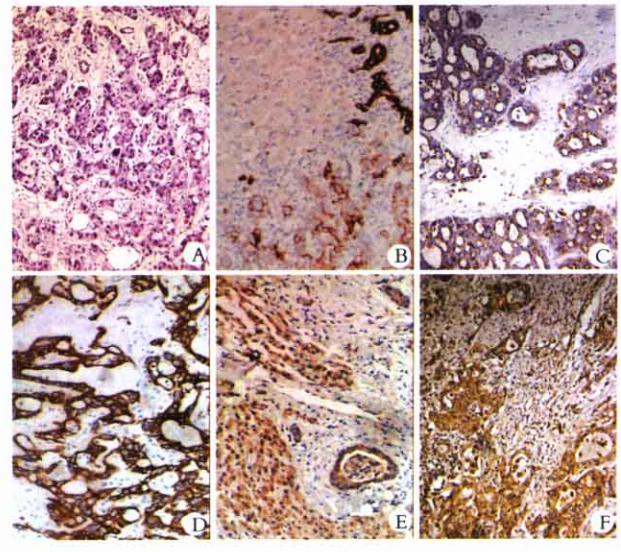
A: HE; B: AFP; C: CK7; D: c-kit; E: CD90; F: CK19

图 2　胆管细胞癌病理学特征和肝干细胞免疫表型的表达

(A: HE×100, B－F: S-P×200)

2.3　混合型肝细胞肝癌中肝干细胞的分布

CK19、CK7、c-kit、Thy-1 和 AFP 阳性染色的表达率分别为 90.0%(9/10)、80.0%(8/10)、60.0%(6/10)、50.0%(5/10)、70.0%(7/10)。可见肝细胞癌和胆管细胞癌相互混杂,并可见移行过渡,癌细胞呈分化程度的差异较大 $P<0.05$,可见大量不同分化程度和不同来源的肝干细胞增殖(图 3)。



A: HE; B: AFP; C: CK7; D: c-kit; E: CD90; F: CK19

图 3　混合型肝细胞肝癌病理学特征和肝干细胞免疫表型的表达

(A: HE×100, B－F: S-P×200)

总体上，在原发性肝癌不同病理组织类型中干细胞免疫标志均有不同程度的表达，均可观察到肝干细胞向肝癌细胞的转化，以混合型肝细胞癌中肝干细胞免疫表型表达率最高（$P<0.05$），肝细胞肝癌和胆管细胞癌中肝干细胞可能是不同来源干细胞分化受阻的阶段较晚，而混合型肝细胞癌中的肝干细胞分化受阻的阶段可能较早，从而保留干细胞免疫表型较多有关。

3 讨论

目前筛选出的肝干细胞高度表达且特异性较好的标志物主要有 CK7、CK19、OV6（CK14）、AFP、SCF/c-kit、Thy-1、CD34、实质中间丝波形蛋白（vimentin）等[1-3]。目前研究表明 CK7 和 CK19 在正常成体肝脏中只表达于胆管上皮细胞而不表达于肝细胞，CK7 和 CK19 表达阳性肝细胞被认为是来源于肝内或已初步分化的肝干细胞[3-7]，而表达骨髓造血干细胞表面特异性标志如 c-kit、Thy-1 的肝干细胞可能来源骨髓或外周循环系统具有横向分化能力的造血干细胞[8,9]。本研究采用 CK7、CK19、c-kit、Thy-1 及 AFP 等抗体作为肝干细胞的鉴定指标，观察原发性肝癌不同病理组织类型中肝干细胞的活化、分布、来源和免疫表达特征，结合细胞形态学改变和分化特征，取得了较好效果。

对成体肝脏的研究表明，CROSBY 等[3,10]证实肝干细胞主要在损伤修复过程中从汇管区活化，高表达细胞角蛋白；其中部分细胞表达 c-kit 和 Thy-1，可能为骨髓造血干细胞来源。在胆小管基底部或外周有表达 Thy-1 卵圆形细胞，提示该部位可能是骨髓或外周循环系统的造血干细胞在肝脏中的一个重要停留部位[8]。骨髓或外周循环系统内各种干细胞可分化为肝细胞和胆管细胞等，骨髓/造血干细胞来源的肝细胞在 0.2% 左右，骨髓造血干细胞不仅参与肝脏损伤修复，也可能与正常生理过程有关[9]。而我们发现原发性肝癌各病理组织类型均可以表达 CK7、CK19、AFP、c-kit 和 Thy-1 多种肝干细胞标志，这可能与肝干细胞的多源性有关，既有肝内来源，又有骨髓或外周循环系统来源，而肝内终末胆小管细胞的活化可能是肝干细胞的主要来源，而外周循环或骨髓的造血干细胞为肝干细胞提供补充。

与国外报道相似，本研究中的大部分原发性肝癌患者有慢性病毒性肝炎、肝硬化病史，而此类肝病组织中已有肝干细胞的活化，在肝硬化中尤为明显[11]，如果把分裂增殖能力很强的成熟肝细胞定义为只能向肝细胞分化的单能成体干细胞，而其他具有多向横向分化能力的肝干细胞定义为多能成体干细胞，那么原发性肝癌的发生就可以完全解释为“肝干细胞分化不全或分化异常”，而组织微环境决定着肝干细胞的激活、增殖和分化方向，不同的组织微环境造成原发性肝癌组织的异质性，从而表现为不同分化程度和不同的病理组织细胞表型[1,2,11]。

原发性肝癌中混合型胆管肝细胞癌以往较为少见，通常具有肝细胞癌和胆管细胞癌两种成分和特点，它的组织来源尚不清楚，随着肿瘤“干细胞起源”学说的发展，如果从“干细胞起源”角度理解它的发生机制就十分清楚，混合型胆管肝细胞癌可以被认为来源于肝干细胞的“中间型肝癌”或一种“过渡型肝癌”，此型肝癌有呈中间分化的区域，表现肝细胞癌和胆管细胞癌的双重特征，因此它的肝干细胞免疫表型表达最高。

参考文献：

[1] SELL S. Cellular origin of hepatocellular carcinomas[J]. Semin Cell Dev Biol, 2002, 13(6): 419-424.

[2] SELL S, PIERCE G B. Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers[J]. Lab Invest, 1994, 70(1): 6-22.

[3] CROSBY H A, HUBSCHER S, FABRIS L, *et al*. Immunolocalization of putative human liver progenitor cells in livers from patients with end-stage primary biliary cirrhosis and sclerosing cholangitis using the monoclonal antibody OV-6[J]. Am J Pathol, 1998, 152(3): 771-779.

[4] FIEGEL H C, PARK J H, LIOZNOV M V, *et al*. Characterization of cell types during rat liver development[J]. Hepatology, 2003, 37(1): 148-154.

[5] LIU C, WANG J, OU Q J. Possible stem cell origin of human cholangiocarcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(22): 3374-3376.

[6] THEISE N D, SAXENA R, PORTMANN B C, *et al*. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans[J]. Hepatology, 1999, 30(6): 1425-1433.

[7] 索金友，顾红光，王 阁. 原发性肝癌中 CK7 的表达及其意义[J]. 消化外科，2005，4(2)：128-131.

[8] ALISON M R, POULSOM R, JEFFERY R, *et al*. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells[J]. Nature, 2000, 406(6793): 257.

[9] KORBLING M, KATZ R L, KHANNA A, *et al*. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells[J]. N Engl J Med, 2002, 346(10): 738-746.

[10] KIM H, PARK C, HAN K H, *et al*. Primary liver carcinoma of intermediate (hepatocyte-cholangiocyte) phenotype[J]. J Hepatol, 2004, 40(2): 298-304.

[11] UENISHI T, KUBO S, HIROHASHI K, *et al*. Expression of bile duct-type cytokeratin in noncancerous hepatocytes in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. Hepatogastroenterology, 2003, 50(52): 1101-1104.

（编辑 薛国文）