文章编号:1000-5404(2006)20-2074-03

论著

化学致癌剂3'-甲基-4-DAB影响SD大鼠肝干细胞的增殖与迁移

陈小艳,张丽华 (广东省佛山科学技术学院医学院组胚病理学教研室,佛山 528000)

提 要:目的 采用免疫组织化学技术标记SD大鼠肝干细胞中OV6、CD34的表达,探讨肝干细胞与造血干细胞之间的关系。**方法** 用化学致癌剂3'-甲基-4-二甲基氨偶氮苯(3'-methy-4-dimethylaminoazobenzen, 3'-me-DAB)喂养SD大鼠4周,取大鼠肝脏,用免疫组化法标记卵圆细胞的特异性标记物OV6与造血干细胞标记物CD34在大鼠肝干细胞中的表达。**结果** 汇管区靠近界板处卵圆细胞同时表达OV6与CD34,阳性细胞成簇状分布,主要集中在赫令氏管周围,并见OV6和CD34阳性细胞向肝小叶内迁移,散在分布于肝细胞索;在肝实质内还分布着大量的表达OV6与CD34阳性的单核样干细胞;在肝实质内还可见多个CD34阳性小集落,集落内或周围也可见少许单核样干细胞。**结论** 3'-me-DAB刺激大鼠肝内卵圆细胞大量增生的同时,还可刺激骨髓造血干细胞增生并向肝内迁移与分化。

关键词:肝干细胞;卵圆细胞;单核样干细胞;OV6;CD34;造血干细胞

中图法分类号:R322.47;R329.28;R994 **文献标识码**:A

Chemical carcinogen 3'-me-DAB affects proliferation and migration of rat hepatic stem cells

CHEN Xiao-yan, ZHANG Li-hua (Department of Embryology, Histology and Pathology, Medical College, Foshan University, Foshan 528000, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between hepatic stem cells and hematopoietic stem cells by detecting the expression of OV6 and CD34 in rat hepatic oval cells. Methods Healthy SD rat were fed with chemical carcinogen 3'-me-DAB for 4 weeks, then the rat hepatic tissue samples were obtained. The rats fed with normal forage served as normal controls. The expressions of OV6 and CD34, specific markers for oval cells and hematopoietic stem cells respectively, in rat hepatic stem cells were detected by immunocytochemical staining (ABC method). Results The oval cells positive for OV6 and CD34 were found in the limiting plate of portal area, mainly located around the Hering canal. In addition, some oval cells positive for OV6 and CD34 were found migrating to hepatic lobule, scattering in the hepatic cords. A great many mononuclear stem cells positive for OV6 and CD34 were also found in the hepatic parenchyma. Conclusion 3'-me-DAB could stimulate the proliferation of hepatic oval cells and hematopoietic stem cells and cause the hematopoietic stem cells derived from bone marrow to migrate to hepatic parenchyma and differentiate.

Key words: hepatic stem cells; oval cells; mononuclear stem cells; OV6; CD34; hematopoietic stem cells

卵圆细胞(oval cells)是最早发现于啮齿类动物肝脏中的潜能干细胞,起源于赫令(Hering)管附近,肝毒性药物刺激大鼠肝脏的动物实验中可见大量卵圆细胞增殖和分化为肝实质细胞。研究表明一部分卵圆细胞起源于骨髓[1],肝内存在有骨髓造血干细胞来源的干细胞[2],但是,骨髓造血干细胞怎样转移到肝脏并增殖分化为肝细胞和胆管细胞的情况还不清楚。本研究利用化学致癌剂3'-甲基-4-二甲基氨偶氮苯(3'-methy-4-dimethylaminoazobenzen, 3'-me-DAB)刺激大鼠肝内卵圆细胞的增殖,用免疫组织化学技术标记卵圆细胞特异性的表面标记OV6和造血干细胞的表面标记CD34在SD大鼠肝干细胞中的表达,研究肝干细胞与造血干细胞在肝脏中的分布与定位,探讨它们之间的关系,为研究造血干细胞在肝内的迁移、增殖与分化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 大鼠模型建立

健康SD大鼠20只,体质量100~120 g(购自南方医科大学实验动物中心),稳定饲养1周后,用含0.06% 3'-me-DAB的饲料喂养,4周后,将大鼠处死,取肝脏用100 ml/L的中性甲醛固定,取材大小为1 cm×1 cm×0.5 cm,Bouin液后固定

作者简介:陈小艳(1968-),女,湖北省应城市人,硕士,副教授,主要从事肿瘤分子病理学方面的研究,发表论文10余篇。电话:(0757)82815344

收稿日期:2005-09-06;修回日期:2006-04-10

24 h，连续切片，厚 4 μm。同时以不含 3'-me-DAB 饲料喂养的健康 SD 大鼠作造模前对照。

1.2　主要试剂

兔抗小鼠 OV6（1∶1 000，博士德公司），小鼠抗大鼠 CD34（1∶1 000，IQ Products，USA），山羊血清封闭液、生物素标记羊抗鼠 IgG、辣根过氧化物酶标记链霉素卵白素、DAB 显色液均购自美国 LAB. Vision 公司。

1.3　免疫组织化学染色

连续石蜡切片脱蜡后，以 3% 过氧化氢溶液浸泡 10 min，灭活内源性过氧化物酶，正常山羊血清封闭 5 min，然后分别加第一抗体（兔抗小鼠 OV6 和小鼠抗大鼠 CD34）工作液，4 ℃ 冰箱过夜，加生物素标记的第二抗体（分别为羊抗兔和羊抗鼠 IgG），37 ℃ 30 min，加第三抗体结合过氧化物酶链霉素亲和素 37 ℃ 30 min，加新鲜配制的二氨基联苯胺（DAB），显微镜观察 5～10 min，棕黄色染色为阳性信号，以 PBS 代替第一抗体作阴性对照。苏木精复染核，盐酸-乙醇分化，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，树胶封片。

2　结果

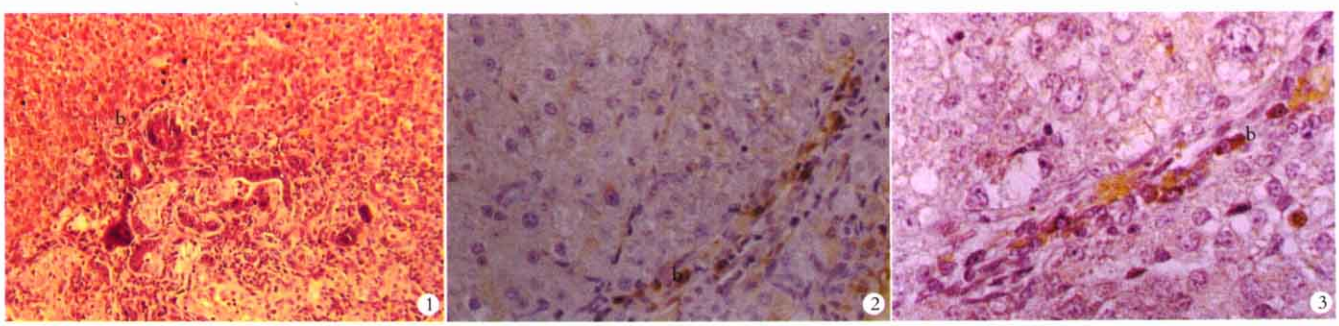
2.1　HE 染色结果

未用含 3'-me-DAB 饲料喂养的健康 SD 大鼠，肝小叶结构清晰，而用含 3'-me-DAB 饲料喂养的 SD 大鼠肝实质结构改变显著：汇管区内大量小叶间胆管和胆管上皮细胞增生，细胞质呈嗜碱性染色，大小不一，排列紊乱。汇管区内的结缔组织也大量增生，增生的结缔组织细胞的胞体为梭形，细胞核也为梭形，强嗜碱性染色，紧密地包绕在增生的小叶间胆管和胆管周围（图 1），同时，这些结缔组织细胞突破界板处细胞伸入到周边的肝小叶内，增生、延伸并且包绕肝细胞形成细胞团。

2.2　免疫组织化学染色结果

汇管区结缔组织细胞大量增生，突破界板浸润周围肝组织，破坏了界板细胞的连续性。汇管区靠近界板处断续排列着一些卵圆样细胞，细胞质内可见 OV6 阳性颗粒（图 2）。这些细胞比同组织内的肝细胞小，细胞体卵圆形，细胞核卵圆形，细胞核染色浅，细核质比大，细胞质呈强阳性染色。OV6 阳性细胞主要分布在赫令氏管周围，呈散在或簇状分布。CD34 也在界板处表达，阳性细胞的形态和分布与 OV6 阳性细胞相似。同时可见 OV6 和 CD34 表达阳性的卵圆样细胞向肝小叶内迁移，散在分布于肝细胞索。

此外，我们的研究显示，在肝实质内还分布着大量 OV6 和 CD34 分别染色阳性的单核样干细胞。这些细胞体积较卵圆细胞大，细胞核为圆形或肾形，类似血液系统来源的单核细胞，细胞质内均匀分布着粗大的强阳性颗粒。单核样干细胞分布在肝细胞索、肝血窦、肝内血管、增生的小叶间胆管和胆管之间（图 3），多见于汇管区的结缔组织内；单核样干细胞常常在汇管区内的小叶间血管周围相互聚集形成细胞群，有时可在小叶间静脉壁的内皮细胞之间和周围组织内见到变形游走的阳性单核样干细胞。此外，肝实质内还可见多个 CD34 阳性小集落，集落内或周围有时可以见到阳性单核样干细胞。



a：汇管区大量增生的小叶间胆管和胆管上皮细胞；b：胆管周围增生的纤维结缔组织细胞

图 1　3'-me-DAB 刺激后大鼠肝实质结构变化　（HE ×100）

图 2　汇管区断续排列的 OV6 阳性卵圆细胞　（ABC ×200）

图 3　汇管区及肝实质内 CD34 阳性的单核样干细胞　（ABC ×400）

3　讨论

卵圆细胞作为肝内的储备干细胞，在成体肝脏内含量很少，主要集中于胆管上皮与肝细胞相延续的部位，即 Hering 管周围[3]。正常成年肝脏是相对静止的器官，肝细胞的再生和受损保持平衡，肝脏受损能诱发其再生和修复，这由肝细胞的自我复制实现；如果肝脏受损严重或肝细胞增殖受阻，则肝卵圆细胞被激活、增殖，大量出现在肝小叶的外周区域；这些快速生长的卵圆细胞首先出现在胆管旁，然后迁移到肝脏实质，并进一步分化为肝细胞和胆管细胞，修复和重建肝脏[1,4]。1978 年，Shinozuka 等[5]首次发现致癌剂可以导致大鼠肝汇管区大量卵圆细胞增生。本研究采用含化学致癌剂 3'-me-DAB 的饲料喂食大鼠 4 周，刺激大鼠肝内卵圆细胞的增生，探究 3'-me-DAB 应激模型中卵圆细胞在肝脏内的增殖和分布。研究结果显示，用含 3'-me-DAB 的饲料喂食 SD 大鼠 4 周后，SD 大鼠肝脏实质结构显著改变：汇管区大量小叶间胆管和胆管上皮细胞增生，汇管区内的结缔组织也大量增生，突破界板浸润肝组织，破坏了界板细胞的连续性。在汇管区靠界板

处断续排列着分别表达 OV6 和 CD34 的卵圆样细胞，它们的形态和分布相似：位于界板处，比同组织内的肝细胞小，细胞体卵圆形，细胞核卵圆形，细胞核染色浅，细核质比大，细胞质呈强阳性染色，因此我们推测它们属于同一类型的干细胞即卵圆细胞，汇管区大量增生的小叶间胆管和胆管上皮细胞可能是由卵圆细胞分化而来。

Theise 等[6]在性别交叉的骨髓移植及同种异基因原位肝移植研究中证明肝外循环的造血干细胞可以分化为肝细胞及胆管细胞，并且移入肝脏实质分化为肝细胞及胆管细胞的数量与肝脏损害的严重程度相关。在无明显损伤的肝干细胞增生分化为肝细胞及胆管细胞的过程中，无明显的卵圆细胞阶段，肝外循环的造血干细胞直接分散地扦插入肝脏实质分化为肝细胞及胆管细胞，而不进入门脉区域。但在严重损伤的肝脏，有明显的胆管炎症反应和大量卵圆细胞可见，肝外循环的造血干细胞首先进入门脉区域而后经卵圆细胞分化为肝细胞及胆管细胞[2,6]。在一般情况下，骨髓内的造血干细胞对于肝细胞的更新作用很小，但在严重创伤的情况下，它对肝细胞再生和功能恢复的作用却是非常重要的[7]。有研究表明，骨髓造血干细胞可有效地定植至硬化的肝组织并分化为能表达白蛋白 Albumin 的肝细胞，并能明显改善肝功能、肝纤维化及急性肝损伤模型鼠的成活率[8,9]。本研究结果显示：在 3'-me-DAB 应激模型的 SD 大鼠肝脏内分布着大量的单核样干细胞，它们均可表达 OV6 和 CD34。这些细胞体积较卵圆细胞大，细胞核为圆形或肾形，类似血液系统来源的单核细胞，细胞浆内均匀分布着粗大的强阳性颗粒。这些细胞分布在肝细胞索、肝血窦、肝内血管、增生的小叶间胆管和胆管之间，多见于汇管区的结缔组织内。单核样干细胞常常在汇管区内的小叶间血管周围相互聚集形成细胞群，有时可在小叶间静脉壁的内皮细胞之间和周围组织内见到变形游走的阳性单核样干细胞。此外，肝实质内还可见多个 CD34 阳性小集落，集落内或周围有时可以见到阳性单核样干细胞。孙晓艳等[10]在研究人胚胎肝干细胞时发现在胎肝实质中存在有类似造血系统来源的单个核样细胞，提示无论在胚胎发育时期还是在成体肝脏存在着至少两种来源的干细胞——赫令管周围功能干细胞域和肝外循环的造血干细胞[2]。3'-me-DAB 不仅刺激肝脏内源性干细胞——卵圆细胞的增殖，还可能是由之引起的损伤从而引发了大量的肝源性细胞因子及黏附分子配体的表达增强，创造出一个吸引骨髓等肝外来源的干细胞向受损肝脏趋化并利于定居及分化成熟的微环境[11]，这时骨髓造血系统内的干细胞大量增殖，成群的由肝内血管进入肝脏，穿越汇管区的结缔组织分散在肝实质内，部分干细胞经卵圆细胞而向成熟肝细胞分化，参与肝脏的再生和修复；部分干细胞经单核样干细胞在肝内形成集落，进一步增殖分化为成熟的血细胞。

综上所述：3'-me-DAB 可以刺激肝内卵圆细胞大量增生，同时可以刺激骨髓造血系统内的干细胞增生并向肝内迁移、增殖和分化。3'-me-DAB 作为化学致癌剂引起严重的肝脏损伤：一方面刺激肝内赫令管周围功能干细胞域的卵圆细胞增生；另一方面还可刺激肝外循环的造血干细胞进入肝脏门脉区域，一部分造血干细胞可能向卵圆细胞方向分化，然后再分化为肝细胞及胆管细胞，参与肝脏的修复和重建；另一部分造血干细胞可能向单核样干细胞方向分化，然后再分化为成熟的血细胞。卵圆细胞与单核样干细胞的关系、单核样干细胞与造血干细胞之间的关系，还有待进一步的深入研究。

参考文献：

[1] THEISE N D, BADVE S, SAXENA R, *et al*. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation [J]. Hepatology, 2000, 31(1): 235-240.

[2] 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(5417): 1168-1170.

[3] PAKU S, SCHNUR J, NAGY P, *et al*. Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver [J]. Am J Pathol, 2001, 158(4): 1313-1323.

[4] BRAUN K M, THOMPSON A W, SANDGREN E P. Hepatic microenvironment affects oval cell localization in albumin-urokinase-type plasminogen activator transgenic mice [J]. Am J Pathol, 2003, 162(1): 195-202.

[5] SHINOZUKA H, LOMBARDI B, SELL S, *et al*. Early histological and functional alterations of ethionine liver carcinogenesis in rats fed a choline-deficient diet[J]. Cancer Res, 1978, 38(4): 1092-1098.

[6] THEISE N D, NIMMAKAYALU M, GARDNER R, *et al*. Liver from bone marrow in humans[J]. Hepatology, 2000, 32(1): 11-16.

[7] FORBES S, VIG P, POULSOM R, *et al*. Hepatic stem cells[J]. J Pathol, 2002, 197(4): 510-518.

[8] TERAI S, SAKAIDA I, NISHINA H, *et al*. Lesson from the GFP/CCl_4 model—translational research project: the development of cell therapy using autologous bone marrow cells in patients with liver cirrhosis[J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2005, 12(3): 203-207.

[9] HONG S H, GANG E J, JEONG J A, *et al*. *In Vitro* differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 330(4): 1153-1161.

[10] 孙晓艳，安 靓. 神经中间丝蛋白 Nestin 在胎肝中的表达[J]. 第一军医大学学报，2004，24(2)：207-209.

[11] 南 雪，王韫芳，裴雪涛. 肝干细胞及其在肝再生医学中的应用[J]. 自然科学进展，2005，15(2)：129-133.

（编辑 栾 嘉）