

## 第八章：使用胚幹細胞於肝細胞之分化

### 前言

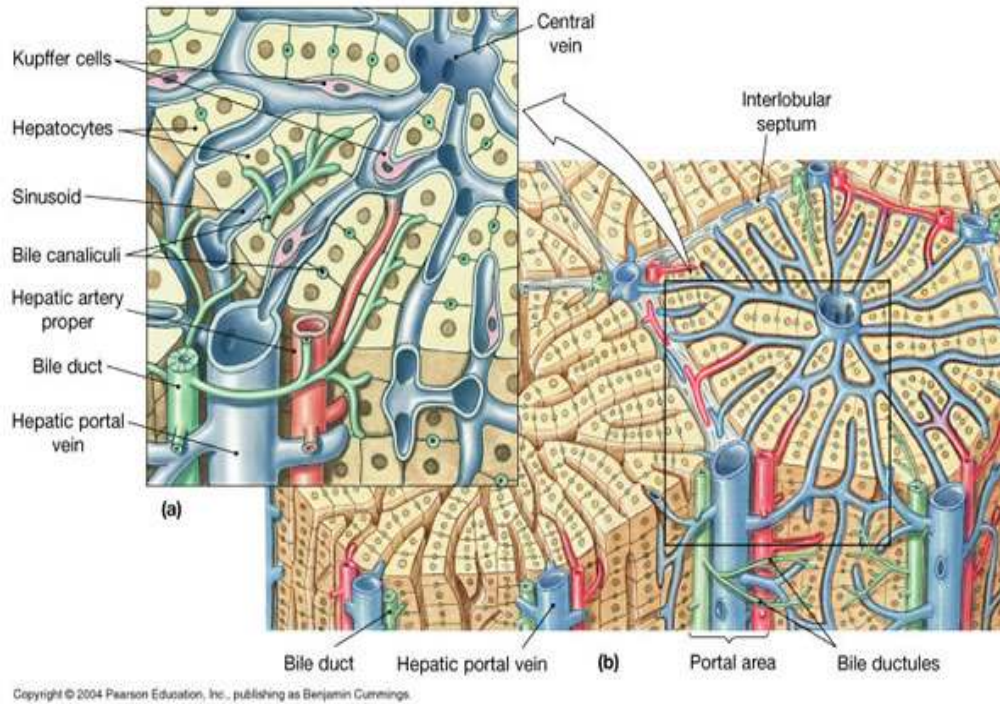
肝臟是哺乳類動物最大的器官，且具有多種生理功能。肝細胞是肝臟中的最重要細胞，進行食物分子代謝、去毒，且具有儲存肝糖的能力。肝臟也是內分泌和外分泌腺，分泌多種激素於血清中，分泌膽汁於膽管內。除了肝細胞外，肝臟亦包含膽管細胞 (cholangiocyte)、Kupffer 細胞、星形細胞 (stellate cells) 和一些內皮細胞。

肝臟的發育過程已在小鼠模式中被廣泛研究，在過去 20 年中，胚幹細胞也被用於研究早期肝臟發育，本章目標主要在於介紹過去的研究成果及近來的發展狀況。

### 肝臟結構及發育過程

成人人類的肝臟包含兩大葉，在細分為小葉，肝小葉為微細的六角形柱狀結構，約 2mm 高，直徑約 1mm (如圖 8-1)，每個小葉中間都有肝靜脈的分枝穿過，稱為中央靜脈，肝細胞即延著中央靜脈以放射狀排列，在每個肝小葉周邊皆可見數套管腺結構，含三種管腺，包括肝動脈的分枝，肝門靜脈於小葉間的分枝，以及肝管，用以分泌膽汁。肝細胞佔了肝臟總質量的 80%，其餘則由肝臟的膽管上皮和 Kupffer 細胞所構成。肝臟的特殊構造及其分泌產物使其得以進行巨分子合成、能量產生和儲存、代謝、毒性物質處理等功能。

圖 8-1: 肝小葉為微細的六角形柱狀結構，每個小葉中間都有肝靜脈的分枝穿過，稱為中央靜脈，肝細胞即延著中央靜脈以放射狀排列，在每個肝小葉周邊皆可見到數套管腺結構，包括肝動脈的分枝，肝門靜脈於小葉間的分枝，以及肝管。



資料來源: [www.harford.edu/.../WRappazzo/BIO104clshdt.html](http://www.harford.edu/.../WRappazzo/BIO104clshdt.html)

肝臟的發育過程，以小鼠胚胎為例，最早可見於內胚層細胞的特定片段中，以肝臟特性的基因表現顯現，而這種顯現有賴於中胚層細胞所分泌的物質刺激，包括兩種主要的誘發因子（induction factors），一種是 FGFs，由相鄰的心臟中胚層細胞所分泌，另一為 BMP2 和 BMP4，由橫隔（Septum transversum）間質細胞所分泌。

受到誘發因子的影響，內胚細胞開始增殖，並往橫隔間質細胞堆中生長，形

成一個細胞團塊，稱為「肝細胞團」(liver bud)，此時位於「肝細胞團」中的內胚細胞稱為肝臟母細胞 (hepatoblasts)，這些母細胞此時尚具有雙向分泌能力，可以選擇分化為肝細胞或是膽管細胞。之後，肝臟母細胞開始移動，形成桿狀排列，而且和周邊的內皮細胞連結，使內皮細胞形成微血管網狀結構，接下來造血幹細胞移入，並大量增殖於肝細胞團中，再接下來原始肝臟快速生長，在生長過程中有許多因子參與，避免生長中的肝細胞凋亡。

肝臟母細胞分化為肝細胞是一種漸進性的過程，剛開始呈現未分化的狀態，之後開始合成分泌性蛋白並堆積肝醣，最後在小鼠出生前才表現出多角結構，這個過程代表著肝細胞在分化過程中的每一個階段都各具特色，且可由其結構辨別出來。

上面所述的肝臟發育過程是以小鼠為研究模式所得到的知識，是否可完全顯示出人類肝臟的發育過程？大抵上應該說是，但是並不完全。舉例而言，雖然小鼠和人類的基因體大小類似，但仍有許多差異，約有 15% 的基因具有類似 DNA 序列，但不完全相同，而且 1% 的人類基因在小鼠體內是找不到相似基因的，也因為這些基因上的差異，導致生化反應路徑，組織和病理特徵不完全一致，雖然我們可以說，不管是人類或是小鼠，肝臟和胰臟都是由原腸發育而來，但其發育特徵仍有些許不同。

## 肝臟病理學和治療

因為肝臟具有如此多的生理功能，急性肝衰竭和末期肝疾病患者經常都需要肝臟移植，因此，肝臟移植已經成為末期肝病者可接受的治療方式，但是因為捐贈肝臟有限，器官來源是一大問題。

如果整個肝臟移植受到限制，那麼單單移植肝細胞是否可行呢？肝細胞移植曾被嘗試過，但是肝細胞的來源也是有限的，目前最大宗的來源還是從一些無法進行整個器官移植的肝臟中取得，因此除非肝細胞的來源不成問題，否則以器官或細胞移植的治療方式還是不能廣泛應用。

如果不需要仰賴捐贈，那麼肝細胞可從哪裡來，有三個來源可以考慮，第一是已經建立的肝細胞株，第二是由異種肝細胞來取代，第三則是肝臟幹細胞分化得到的肝細胞。上述的三種細胞都是需要考慮供應數量的問題，因為肝衰竭病人的需要是相對很大的。曾經有研究以 SV40 T-antigen 讓肝細胞不死，建立起穩定的細胞株，且植入動物模式中可以回覆肝功能，但是這種方式同時也增加腫瘤發生的機會。在最近被發表的一篇報告中也指出，以染色體端反錄酶(telomerase reverse transcriptase)處理肝兒肝細胞，可以使其分裂週期延長，將這種細胞移入小鼠肝臟後，可以發揮正常的肝功能，並且表現肝細胞特定的基因，且不管是移植到體內或是培養於體外，都沒有癌化現象產生，不過該研究並未說明這個肝細胞的分化特性 (Wege et al. , 2003)，可能這種方式所產生的肝細胞還是以胎兒期的肝細胞型式存在，而非成人的肝細胞，其功能可能受到某些限制。

異種肝細胞的研究則已經有相當歷史，且於許多動物模式中嘗試過，例如

Nagata 及其同事於 2003 年發表了將豬的肝細胞植入大白鼠的實驗，大白鼠的末期肝臟壞死的現象因此被改善，在肝昏迷指數、血清膽紅素及白蛋白，及血中胺指數都有改善，而且比較自體細胞移植和異種細胞移植，兩者改善效果類似，不過異種肝細胞永遠都有免疫排斥和可能的病原體問題需要考慮。

第三個可能的肝細胞來源是幹細胞，而且成體幹細胞和胚幹細胞都有分化成肝細胞的能力，肝臟的卵形細胞和幹細胞於培養後再植回肝臟，都可長出成熟的肝細胞，最近的研究更顯示可以由非內胚層來源的幹細胞，例如骨髓幹細胞，作為肝細胞的來源，受到相當注目，許多研究者會考慮到這種轉分化

(transdifferentiation) 出來的肝細胞，功能及特性上是否會打折，也有一些報告指出轉分化可能並未發生，而是植入的骨髓細胞(中胚層來源)和肝細胞(內胚層來源)發生細胞融合。

另一個具有潛力的肝細胞來源是胚幹細胞，畢竟胚幹細胞是全能型的幹細胞，具有分化為外胚層、中胚層和內胚層中所有細胞的能力，而且最近的研究顯示出將胚幹細胞分化為肝細胞是可以於體外培養系統中調控的，更讓人覺得潛力無窮。

### **由胚幹細胞分化為肝細胞**

胚幹細胞的特性是具有分化為各種細胞的能力，可以經由自發分化，或於培養液中加入生長因子或化學藥品，也可以使用和其他細胞共同培養或者活化特定

轉錄因子的方式，於體外培養系統中達到調控分化的目的。一般而言，分化後的細胞仍具有多族群性，含有各式各樣的細胞族群，包括肝細胞族群，因此分化之後尚需要以細胞密度梯度、細胞分離，或是以遺傳標定方式，將肝細胞分離出來。

因為胚幹細胞分化的這種多族群特性，使用特地的標誌分子來辨認肝細胞及其分化過程是絕對必要的，例如僅限於肝細胞表現的基因，而不會於卵黃囊細胞或是胰臟細胞表現者，就是重要的標誌基因。其次是使用不同階段的分化標誌基因，因為在分化過程中，肝細胞的形成是漸進式的，使用不同階段的標誌基因來偵測其分化程度就格外重要。

小鼠胚幹細胞分化為內胚層細胞首先由 Abe 等人於 1996 年提出，之後有許多小鼠胚幹細胞或是人類胚幹細胞分化為類似肝細胞的文獻出現，這些文獻於誘發分化的方式上，或是使用的標誌分子、功能性分析，體內及體外系統的確立上，皆有些微差異。一般而言，可將分化大略區分為自發性和誘發性兩大類別。

以自發分化法取得肝細胞是將胚幹細胞培養成類胚幹細胞體，數天之後再將類胚幹細胞體的細胞鋪平於基質上，可將細胞打散，也可以細胞團塊培養。以誘發分化法取得肝細胞則是加入促進胚幹細胞分化為內胚層幹細胞的元素。

得到幹細胞的決定因素是抑制其他細胞之分化，同時促進內胚層細胞增加，一般可以三大方向操作：加入生長因子和內分泌，降低細胞暴露於血清中，或是持續活化肝細胞特異性的轉錄因子。

自發分化的過程是將胚幹細胞培養於懸浮液中，自然形成類胚體，之後為了

將細胞往內胚層方向分化，會加入生長因子。通常膠原蛋白被用作培養基質，準備於培養盤底部，這是用來仿照胚胎發育過程中，肝臟增生後埋於橫膈實質細胞中，內含有膠原蛋白。所以加入的生長因子包括 aFGF、HGF(肝細胞生長因子)、oncostatin(OSM)、以及 dexamethasone。其中 aFGF 被加入的原因是其可於中胚層釋出，而且和 bFGF 聯合作用，促使原內胚層細胞分化為原始肝臟。HGF 於正常肝臟發育過程中會支援肝細胞生長，在缺乏 HGF 的小鼠中，肝臟會嚴重縮小，至於 OSM 則是由造血細胞所分泌，會促使胎兒的肝細胞成熟。Dexamethasone 是人工合成的類固醇賀爾蒙，和肝臟內的醣類新生作用相關的酵素誘發有關，因此通常是最後加入培養液中，且在一定時間的血清作用之後，和 activin A 一起使用，或是單獨加入 dexamethasone，以促進內胚層細胞的族群增生。

也有研究者利用持續活化的肝細胞特異性的轉錄因子，使分化過程中往內胚細胞方向，所用的轉錄因子包括 FOX(forkhead box)，含 FOXA1 和 FOXA2，這兩個轉錄因子以前被稱作肝細胞核因子(hepatocyte nuclear factor)，且被證明和內胚細胞之分化有關。

在實際操作層面上，如何測定肝細胞的分化程度呢？有分析內胚細胞表現基因、功能性的代謝特性分析、型態分析、或是體內系統分析等方法。

以內胚細胞分化的標誌基因來偵測分化的程度，可以用的基因包括 TCF1 和 TCF2、FOXA1、FOXA2、HNF4 以及 HNF6，也可以使用 AFP 和 albumin，或是特定的酵素，例如 TDO、TAT 或是細胞色素 P450(CYP)，其中甲型胎兒蛋白(AFP)和白

蛋白(albumin)通常也作免疫定量分析，用免疫染色法和西方墨點法來定量，功能性的肝細胞特性分析則包括尿素及白蛋白的生成定量，型態分析常用者為電子顯微鏡觀察及使用 PAS 等觀察肝醣顯粒的形成。以體內系統檢測肝細胞的分化則常用細胞移植進入肝中，觀察其合併進入肝臟的程度及分泌白蛋白的能力。

人類的胚幹細胞可分化為三個胚層細胞，分化為內胚層細胞的重要標誌為 AFP 和 albumin，也因為這兩種標誌分子被表現出，才讓研究者繼續探討胚幹細胞分化為肝細胞的可行性。研究者將標誌分子，例如綠色螢光蛋白(GFP)標定於肝細胞，然後可將肝細胞作純化分離。剛開始時，aFGF 被發現於胚幹細胞分化為肝細胞過程中，扮演重要角色，之後陸續有研究者發現將 insulin 和 dexamethasone 加入類胚胎體，並且培養於膠原蛋白基質上，可讓胚幹細胞開始表現內胚層細胞的標誌基因。

如前所述，有許多方法皆可使胚幹細胞分化為類似肝細胞，但是這些被分析出的所謂的「類肝細胞」必需要嚴格界定其特性，而且界定時要很小心，有數個要項是必需要考慮的：

(1)大部分表現於肝臟組織的基因，同時也會表現於胚胎外的卵黃囊，例如 AFP、TTR(transthyretin)和 FOXA2，都會於兩種組織中表現，因此，可能所謂的類似肝細胞的分化，其實是卵黃囊細胞，而非肝細胞，因此使用可以區分兩者的標誌分子是必需的。在小鼠中，CYP7A1 僅表現於肝臟，而非卵黃囊，同樣的，尿素僅於肝細胞合成，所以兩者可作為肝細胞分化的辨別分子。



(2)有些表現於肝細胞的基因也表現於其他體細胞，例如肺、腸、胰或是腎臟，例如代謝酵素 TAT 和 PEPCK 並不全然僅表現於肝臟，所以並不適合作為肝細胞的標誌分子，也有些研究者以 FOXA2 和 HNF4 作為胚幹細胞分化為內胚層細胞之證據，但是其實這兩個基因於中胚層和外胚層細胞也有表現，其實並不適用。

(3)胚胎期、胎兒期和成年期的肝細胞不同點在於基因表現，因此，當一個分化出的細胞被稱作肝細胞，同時也必需說明是哪一個階段的肝細胞。胚胎時期的肝細胞因為缺乏許多生理功能，轉殖於成年的肝臟時無法取代正常的成年肝細胞功能，另外，也有些基因在胚胎期、胎兒期和成年期的肝臟中皆有表現，例如 albumin 和 TTR，因此這些基因無法用以作為分化階段的辨別基因；相反的，AFP 表現於早期的胚胎和胎兒，成年期則無 AFP 之表現，因此當一個肝細胞停止 AFP 表現時，可當作其已經分化為成年期的肝細胞。另外，有許多代謝的解毒酵素雖然於胎兒期表現，但是僅於出生後才開始作用，因此針對某些特定酵素的功能分析也可以用來界定肝細胞的分化階段。

### **未來的研究及展望**

前面我們稍微介紹了許多研究者對小鼠或是人類胚幹細胞分化為肝細胞的實驗成果，但是因為不同的實驗室所用的標誌基因不同，為了達到有意義的比較，更多的分析可能是必需的。在體外系統中，因為分化的細胞族群是多元性的，鑑別肝細胞的分化方法的特異性要求很高，可能可以用多重染色方法同時偵測多

個標誌分子，才能達到理想的特異性。另外，分離單純的肝細胞株也是技術上的挑戰，因為肝細胞特異表現的分子很少，需要導入特定的報導基因(reporter gene)來幫助分離。

利用肝細胞特異性基因的促進子(promotor)，可將報導基因導入，一旦肝細胞分化成功，報導基因就會被表現，我們再利用報導基因來分離及純化肝細胞株；也可以逆向操作，將非肝細胞特異性的促進子後接上細胞毒殺序列，一旦胚幹細胞不是往肝細胞方向分化，就會被自行製作出的細胞毒殺蛋白殺掉。無論如何，最後的確定還是在於針對肝細胞的功能分析，而且必需在體內進行，這樣才符合將胚幹細胞分化為肝細胞最後的目的。

### 參考資料

1. Chen Y, Soto-Gutierrez A, Navarro-Alvarez N, Rivas-Carrillo JD, Yamatsuji T, Shirakawa Y, Tanaka N, Kobayashi N. Instant hepatic differentiation of human embryonic stem cells using activin A and a deleted variant of HGF. *Cell Transplant.* 2006;15(10):865-71.
2. Roggia C, Ukena C, Bohm M, Kilter H. Hepatocyte growth factor (HGF) enhances cardiac commitment of differentiating embryonic stem cells by activating PI3 kinase. *Exp Cell Res.* 2006 Dec 23; [Epub ahead of print]
3. Sharma AD, Cantz T, Manns MP, Ott M. The role of stem cells in physiology,

pathophysiology, and therapy of the liver. *Stem Cell Rev.* 2006;2(1):51-8.

4. Watt AJ, Forrester LM. Deriving and identifying hepatocytes from embryonic stem cells. *Stem Cell Rev.* 2006;2(1):19-22.
5. Heo J, Factor VM, Uren T, Takahama Y, Lee JS, Major M, Feinstone SM, Thorgeirsson SS. Hepatic precursors derived from murine embryonic stem cells contribute to regeneration of injured liver. *Hepatology.* 2006 Dec;44(6):1478-86.
6. Saito K, Yoshikawa M, O uji Y, Moriya K, Nishiofuku M, Ueda S, Hayashi N, Ishizaka S, Fukui H. Promoted differentiation of cynomolgus monkey ES cells into hepatocyte-like cells by co-culture with mouse fetal liver-derived cells. *World J Gastroenterol.* 2006 Nov 14;12(42):6818-27.