

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

對小鼠大部分肝臟血流阻斷後肝臟卵圓細胞的活化現象

**Activation of hepatic oval cell after ligation of major  
hepatic vascular inflow in mice**

計畫類別： 個別型計畫      整合型計畫

計畫編號： NSC 89- 2314- B- 002- 436

執行期間： 89 年 8 月 1 日 至 90 年 7 月 31 日

計畫主持人：袁瑞晃      國立台灣大學醫學院外科部

共同主持人：陳惠玲      國立台灣大學醫學院附設醫院肝炎中心

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立台灣大學醫學院外科部

中 華 民 國 89 年 10 月 24 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 對小鼠大部分肝臟血流阻斷後肝臟卵圓細胞的活化現象 Activation of hepatic oval cell after ligation of major hepatic vascular inflow in mice

計畫編號：NSC 89-2314-B-002-436

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：袁瑞晃 國立台灣大學醫學院外科部

共同主持人：陳惠玲 國立台灣大學醫學院附設醫院肝炎中心

### 一、中文摘要

肝臟是人體中極為重要的器官，但是肝臟的疾病如 B 型肝炎、C 型肝炎、肝硬化、肝癌等向來是東方人尤其是中國人健康極大的問題，肝臟疾病末期病人往往令人束手無策，近年來雖然可以進行肝臟移植，但由於捐贈者不多因此受益者有限，因此希望可發展出新的技術以照顧肝臟疾病末期病患。

在許多的研究發現肝臟有很強的再生作用，切除百分之七十左右的肝臟也可以再生，以往分離出肝細胞雖然可以加以培養，但數代之後肝細胞便呈現老化現象無法長期培養，因此尋找肝臟幹細胞也就是所謂的卵圓細胞便顯的非常重要。由於目前實驗所知對於肝臟的再生作用主要都是原本存在的成熟肝細胞分裂所產生，而 Acetylaminofluorene (AAF) 可以在肝臟中被肝細胞代謝成有毒性的 N-hydroxy 衍生物，抑制成熟肝細胞的生長分裂，因而本實驗希望探討除了阻斷大部分肝臟血流造成肝細胞大量喪失後（阻斷肝臟血流的方式是保留供給右葉之肝動脈及門靜脈，而將肝臟中葉以及左葉的血流完全阻斷，由先驅研究知道其相當於百分之七十左右的肝臟切除），再藉由此藥物抑制肝成熟細胞的再生作用，進而刺激肝臟卵圓細胞

的大量活化。

本實驗將小鼠任意分成四組，第一組 (V-group) 不給 AAF 而只經由手術綁掉血管；第二組 (AV-L-group) 術前五天開始餵低劑量 AAF (5mg/kg)，綁完血管後繼續餵食 AAF 直到犧牲；第三組 (AV-H-group) 術前五天開始餵高劑量 AAF (7.5mg/kg)，綁完血管後繼續餵食 AAF 直到犧牲；第四組 (C-group) 為控制組，只進行 Sham operation，不餵食 AAF 也不綁掉血管。各組小鼠在分別術後第三、五、七、九及十四天時犧牲，取其肝臟作分析。

至於肝臟細胞再生能力的分析是利用 BrdU incorporation 方式，而 cytokeratin18, cytokeratin19, cytokeratin7, Thy-1 的測定則用以分析肝臟卵圓細胞的活化現象。

關鍵詞：肝臟血流阻斷、肝臟卵圓細胞、cytokeratin、Thy-1

### Abstract

Liver is a very important visceral organ for the life. In the oriental country, especially in China and Taiwan, hepatic disease including hepatitis and liver cirrhosis is common and plays an important role in the health problem. For patients with end-staged liver disease, nothing can be done except liver transplantation. It's not easy to have a

donor suitable for the recipient from time to time and further new ways for this problem is required in the near future.

The liver is usually able to mount a prompt proliferative response to parenchymal loss and other hyperplastic stimuli. Following 70% partial hepatectomy in the rat, hepatocyte proliferation is greatly accelerated for a relatively short period while the deficit in hepatocyte number is replaced. Even though primary culture of the hepatocytes had been done for years the proliferative ability and viability decreased after several generations. So further researches for the hepatic stem cells that can be cultured for a long period and have the ability to differentiate to mature hepatocytes become more and more important. The principle in animal model is that when majority of the hepatic parenchyma is damaged, the ability of surviving hepatocytes can be regenerated quickly without activation of hepatic stem cells (oval cells). Further hepatic insult that inhibits hepatocyte regeneration is required for activation of oval cells. Acetylaminofluorene (AAF), an aromatic amine, can be metabolized in hepatocytes and resulted in N-hydroxy derivatives which was cytotoxic and mitoinhibitory for hepatocytes but not biliary cells or oval cells. The purpose of this study is to evaluate the additional effect of major hepatic vascular ligation (ligation of the vascular inflow to the middle and left lobes and preserve the right lobe only, that equal to about 70% partial hepatectomy in our preliminary study) and hepatotoxic agent administration in activation of hepatic oval cells.

Animals were randomly assigned to four different groups. Mice receiving vascular

occlusion only (V-group); mice receiving low dose (5mg/kg) of AAF and vascular ligation (AV-L-group); mice receiving high dose (7.5mg/kg) of AAF and vascular ligation (AV-H-group); and control group (C-group). AAF was given continuously until the mouse was sacrificed in all groups. After various time intervals (3, 5, 7, 9, 14 days) postoperatively, the mice were sacrificed and the liver was taken for further studies.

BrdU incorporation with BrdU-FLUOS kit was used for regeneration evaluation and immunohistochemical studies about the cytokeratin18, cytokeratin19, cytokeratin7, Thy-1, were used to evaluate the activation of hepatic oval cell.

Keywords: hepatic vascular inflow ligation, hepatic oval cell, cytokeratin、Thy-1

## 二、緣由與目的

器官移植如腎臟移植、肝臟移植、心臟移植，一直是器官功能末期病人疾病存活所仰賴的主流，但是由於器官的來源非常有限，許多病人無法度過等待器官期而失去生命。腎臟衰竭病人可以利用洗腎機度過等待期，心臟衰竭病人則可暫時利用人工心臟輔助失去的功能，只有肝臟則因其功能複雜，困難度更高而無法完全克服，雖然有報告利用活體近親捐贈部分肝臟以克服肝臟器官來源不易的現象，但畢竟來源也有限，而且捐贈者仍須冒手術的危險，並非長久之計。近年來醫學界雖然致力於人工肝臟的製造，但是成果到目前還是不顯著，因此一些學者便導入細胞移植(Cell transplantation)以及肝臟細胞再殖民(Hepatocyte repopulation)<sup>1</sup>的觀念，希望以此概念可以克服肝臟器官移植捐贈者不足的缺點。

目前的報告有利用培養後的肝細胞進行細胞移植，因此要進行肝臟細胞移植首先要做的就是肝臟細胞的培養，但是目

前對於肝臟細胞培養最大的問題就在於培養的代數有限，且肝細胞經過數代分裂後便呈現老化現象，也就是說正常肝細胞無法如同肝癌細胞可以形成細胞株(Cell line)而長期培養，隨時可以得到需要的細胞。因此尋找肝細胞的前趨細胞(Progenitor cells)並進行培養便顯得很重要。

本實驗所使用的 Acetylaminofluorene (AAF)為芳香族胺類化學劑，可以經由肝臟細胞代謝成具有細胞毒性的分裂抑制劑 N-hydroxy derivative。由於肝臟細胞中所富含的 phase I metabolic enzyme 為代謝 AAF 的重要酵素，但在膽管細胞以及卵圓細胞中主要含的是 phase II enzymes，而 phase I enzyme 的含量很低，因此食物中加入 AAF 會造成肝臟細胞在肝臟受到其它損傷時喪失再生能力，而相對的卵圓細胞因沒被抑制而可以再生，因此理論上肝臟組織中的幹細胞就會被大量的活化，在所有肝臟內細胞所佔的百分比就會明顯增加。

設計此研究計畫的目的是：

1. 建立小鼠肝臟再生的實驗模式
2. 建立活化小鼠肝臟幹細胞(卵圓細胞)的研究模式
3. 評估肝臟大部分血流阻斷後肝臟卵圓細胞活化的情況
4. 評估不同劑量的 AAF 對肝臟幹細胞刺激作用的差別
5. 評估血流阻斷及藥物抑制對於小鼠肝臟卵圓細胞活化是否有加成作用
6. 探討小鼠肝臟卵圓細胞於肝臟再生組織中所在的位置
7. 評估各種因子表現與肝臟卵圓細胞以及肝臟再生間的相互關係

本實驗最終目的就是尋找能夠刺激小鼠肝臟產生多量肝臟幹細胞的方法，建立往後培養肝臟幹細胞的基礎，為將來進行肝臟的再殖民的研究建立基礎。

### 三、結果與討論

第一組 (V-group)不給 AAF,而只經由

手術綁掉血管，相當於切除百分之七十的肝臟，雖然可以見到明顯的肝細胞再生，但沒有膽管增生現象。第二組(AV-L-group)餵食低劑量 AAF (5mg/kg)從第三天即可以見到在 Periportal area 開始有膽管的增生現象，到第七天時膽管增生更加明顯，並且有朝向中央靜脈區域擴張的傾向。但到了第十四天此種現象反而較不明顯，殘餘的膽管增生分散在 periportal 以及中央靜脈區域之間。利用免疫組織化學染色可在這些膽管細胞發現 cytokeratin 7、18 及 19，而 Thy-1 則於九天後才開始較明顯。第三組 (AV-H-group)餵食高劑量 AAF (7.5mg/kg)第三天可以見到較明顯的膽管增生現象，到第七天時膽管增生且有分支並朝向中央靜脈區域明顯擴張。到了第十四天此種現象仍然持續，利用免疫組織化學染色同樣可在這些膽管細胞發現 cytokeratin 7、18 及 19。而 Thy-1 從五天起就可以見到，且到十四天仍然可以見到。此種膽管再生除了膽管數量增加外，由於增生方向會朝向中央靜脈區域，因此在切片中有時候會像膽管細胞週遭圍繞著肝細胞，此外此種膽管再生細胞可以明顯見到細胞核呈現卵圓形，和原有的膽管細胞有極大的差別。利用 BrdU incorporation 發現上兩組在七天時染色侷限於膽管細胞，都沒有肝臟細胞的再生。於十四天時第二組有一些肝細胞再生現象但第三組則仍然沒有明顯肝細胞再生。第四組 (C-group)為控制組，只進行 Sham operation 並沒有餵食 AAF 也沒有切除肝臟，在肝臟組織中並沒有見到膽管增生，也沒有肝臟細胞再生現象。

近年來醫學界的研究著重於肝臟器官移植以及人工肝臟的製造，肝臟器官移植雖然可以進行部分肝臟移植但仍侷限於捐贈者不足，人工肝臟的製造雖然也有進步但是成果到目前還是不顯著。因此一些學者便導入另一種新的細胞移植 (Cell transplantation) 以及肝臟細胞再殖民 (Hepatocyte repopulation)<sup>1</sup> 的觀念，希望以此概念可以克服肝臟器官移植中捐贈者不足的缺點。

正常肝臟中肝細胞的翻新主要是由成熟肝細胞所執行，肝臟具有很強的再生能力，根據研究，正常肝臟切除三分之二後

剩餘肝臟的成熟肝細胞在 15 小時後會離開 G0 期進入 S 期開始合成 DNA<sup>2,3,4</sup>，其中又以位於門脈周圍的肝臟細胞率先進入 S 期<sup>5</sup>，並在數天內加速分裂直到肝臟重量回到原先般大小<sup>6</sup>。同樣的膽管上皮細胞也可在肝臟切除後 18 到 24 小時開始分裂產生新生膽管<sup>7</sup>。肝臟再生除了由原先存在的成熟肝細胞分裂產生---稱為代償性增生 (compensatory hyperplasia) 外也可由幹細胞 (stem cell) 產生---稱為卵圓細胞反應 (oval cell reaction)<sup>8</sup>。此卵圓細胞直徑約 3-5  $\mu\text{m}$ ，比小膽管細胞更小(6  $\mu\text{m}$ )<sup>9</sup>。早在 1958 年就有報告卵圓細胞或稱小膽管細胞 (cholangioles)，可以分化成成熟肝細胞<sup>10</sup>，目前也有許多報告證實此觀點<sup>11, 12, 13</sup>。此外更有報告認為卵圓細胞可以分化成腸胃道幹細胞<sup>14</sup>、杯狀細胞(goblet cells)<sup>15</sup>、內分泌細胞及 Paneth 氏細胞<sup>16, 17</sup>、甚至心肌細胞<sup>18</sup>，且其具有及高的生長潛力<sup>19</sup>。至於卵圓細胞的來源則被認為是由膽管細胞分裂增生而來<sup>20</sup>，此外也有報告認為卵圓細胞和主細胞 (mast cell)、白血球細胞 (leukocyte) 及造血細胞 (hematopoietic cell) 都可表現 stem cell factor 的接受器 c-kit<sup>21</sup>。

目前研究肝臟幹細胞的動物模式主要為餵食 furan<sup>22</sup>、或餵食 dipin<sup>23</sup>，主要目的是使存在的肝細胞喪失再生能力，此外餵食 choline-deficient ethionine-containing (CDE) 的食物也可以誘導出膽管細胞的增生<sup>24</sup>。本實驗所使用的 Acetylaminofluorene (AAF) 為芳香族胺類化學劑，可以經由肝臟細胞代謝成具有細胞毒性的分裂抑制劑 N-hydroxy derivative。由於肝臟細胞中所富含的 phase I metabolic enzyme 為代謝 AAF 的重要酵素，但在膽管細胞以及卵圓細胞中主要含的是 phase II enzymes，而 phase I enzyme 的含量很低，因此食物中加入 AAF 會造成肝臟細胞在肝臟受到其它損傷時喪失再生能力<sup>11</sup>，而相對的卵圓細胞因沒被

抑制而可以再生，因此理論上肝臟組織中的幹細胞就會被大量的活化，在所有肝臟內細胞所佔的百分比就會明顯增加。

在此研究中發現雖然阻斷百分之七十的肝臟血流，相當於切除百分之七十的肝臟組織，使肝臟喪失大部分的細胞仍然無法促使肝臟幹細胞(卵圓細胞)活化，而必須加上藥物的作用抑制原有肝臟成熟細胞的再生。此外，低劑量的 AAF 雖然可以刺激卵圓細胞的再生，但其作用較短無法持續則實用性相對較低。而高劑量的 AAF 所造成的卵圓細胞活化作用產生較早，所產生的卵圓細胞數量也比低劑量時多，且作用持續較久，因此適合將來要由小鼠中分離卵圓細胞進行肝臟幹細胞培養甚至肝細胞移植提供了新的方向。

#### 四、計畫成果自評

由此研究我們建立了小鼠肝臟幹細胞的實驗動物模式，經由大部分肝臟血流的阻斷加上藥物抑制肝臟細胞再生成功的活化了肝臟的幹細胞-卵圓細胞。此提供培養中的肝臟細胞老化問題另一解決的途徑。此研究較不足的是，進行大部分肝臟血流的阻斷後壞死的肝臟仍然留置在體內，雖然我們前驅實驗看到，只保留肝臟右葉血流而結紮中葉及左葉血流造成大部分的肝臟細胞壞死後的小鼠，不但可以存活而且剩餘肝臟有明顯再生現象，但壞死組織所造成的影響無法預料。小鼠的手術困難度雖然較高，但目前我們已經可以進行小鼠百分之七十以及百分之九十以上的肝臟切除手術，因此利用百分之七十的切除加上 AAF 抑制作用將是另一步的發展。百分之九十以上的肝臟切除雖然造成高的小鼠死亡率，但活化肝臟卵圓細胞的能力也是直得探討的。此外較不足的是，Cytokeratin 19 的免疫組織化學染色遭遇到較大的困難，原先生產者已經中斷生產，因此必須另謀來源，耗費許多。

雖然在此研究中我們成功的活化了肝臟卵圓細胞，但將來必須對於此細胞的特性加以研究，對此細胞的分離以及培養也需繼續進行，期望不久的將來可以進行肝

## 臟幹細胞的移植。

### 五、參考文獻

1. Ilan Y, Chowdhury NR, Prakash R et al. Massive repopulation of rat liver by transplantation of hepatocytes into specific lobes or the liver and ligation of portal vein branches to other lobes. *Transplantation* 1997; 64: 8-13.
2. Wright N, Alison M. The liver. In: *The biology of epithelial cell populations*, vol 2. Oxford: Clarendon Press; 1984. P.873-980.
3. Alison MR. Regeneration of liver growth. *Physiol Rev* 1986; 66: 499-541.
4. Gerlach C, Sakkab DY, Scholzen T, Dassler R, Alison MR, Gerdes J. Ki-67 expression during rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology* 1997; 26: 573-8.
5. Rabes HM, Wirsching R, Tuzek H-V, Iseler G. Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy. *Cell Tissue Kinet.* 1976; 9: 517-32.
6. Fabrikant JI. The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver. *J Cell Biology.* 1968; 36(3):551-65.
7. Polimeno L, Azzarone A, Zeng QH et al. Cell proliferation and oncogene expression after bile duct ligation in the rat: evidence of a specific growth effect on bile duct cells. *Hepatology* 1995; 21: 1070-8.
8. Farber E. Similarities in the sequences of early histological changes induced in the liver of rat by ethionine, 2-acetyl-aminofluorene, and 3-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res* 1955; 16: 142-8.
9. Alpini G, Roberts S, Kuntz SM, Ueno Y, Gubba S, Podila PV, et al. Morphological, molecular, and functional heterogeneity of cholangiocytes from normal rat liver. *Gastroenterology* 1996; 110: 1636-43.
10. Wilson J, Leduc EH. Role of cholangioles in restoration of the liver of the mouse after dietary injury. *J Pathol Bact* 1958; 76: 441-9.
11. Alison M, Golding M, Lalani E-N, Nagy P, Thorgeirsson S, Sarraf C. Wholesale hepatocytic differentiation in the rat from ductular oval cells, the progeny of biliary stem cells. *J Hepatol* 1997; 26: 343-52.
12. Alison MR, Golding M, Sarraf CE, Edwards RJ, Lalani E-N. Liver damage in the rat induces hepatocytes stem cells from biliary epithelial cells. *Gastroenterology* 1996; 110: 1182-90.
13. Yasui O, Miura N, Terada K, Kawarada Y, Koyama K, Sugiyama T. Isolation of oval cells from Long-Evans Cinnamon rats and their transformation into hepatocytes in vivo in the rat liver. *Hepatology* 1997; 25: 329-34.
14. Tatematsu M, Katu T, Medline A, Farber E. Intestinal metaplasia as a common option of oval cells in relation to cholangiofibrosis in liver of rats exposed to 2-acetylaminofluorene. *Lab Invest* 1985; 52: 354-62.
15. Golding M, Sarraf CE, Lalani E-N, Anilkumar TV, Edwards RJ, Nagy P et al. Oval cell differentiation into hepatocytes in the acetylaminofluorene-treated regenerating rat liver. *Hepatology* 1995; 22: 1243-53.
16. Elmore LW, Sirica AE. "Intestinal-type" of adenocarcinoma preferentially induced in right/caudate liver lobes of rats treated with furan. *Cancer Res* 1993; 53: 254-9.
17. Karaki Y, Munakata S, Saeki T, Hirota S, Fujimaki M. Appearance of a carcinoid-like pattern in rat hepatic tumors induced by 3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene. *Jpn J Cancer Res* 1991; 82: 397-402.
18. Maluof NN, Coleman WB, Grisham JW, et al. Adult-derived stem cells from the liver become myocytes in the heart in vivo. *Am J Pathol* 2001; 158(6):1929-35.
19. Suzuki a, Zheng YW, Fukao K, Nakauchi H, Taniguchi H. Hepatic stem/progenitor cells with high proliferative potential in liver organ formation. *Transplant proceed* 2001; 33:585-6.
20. Petersen BE, Zajac VF, Michalopoulos GK. Bile ductular damage induced by methylene dianiline inhibits oval cell activation. *Am J Pathol* 1997; 151: 905-9.
21. Baumann U, Crosby HA, Ramani P, Kelly DA, Strain AJ. Expression of the stem cell factor receptor *c-kit* in normal and diseased pediatric liver: identification of a human hepatic progenitor cell? *Hepatology* 1999; 30: 112-7.
22. Sirica AE, Gainey TW, Mumaw VR. Ductular hepatocytes. Evidence for a bile ductular cell origin in furan-treated rats. *Am J Pathol* 1994; 145: 375-83.
23. Factor VM, Radaeva SA, Thorgeirsson SS. Origin and fate of oval cells in dipin-induced hepatocarcinogenesis in the mouse. *AM J Pathol* 1994; 145: 409-22.
24. Hiruma M, Seki A, Ono A, Kurihara T. Early hepatic lesions with marked glandular structures induced in rats by 0.1% ethionine in a choline deficient diet. *Jikken Dobutsu* 1993; 42: 197-201.