

肝 疾 病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002404

肝窦内皮细胞免疫表型的研究进展

陈 睿¹, 洪茂林², 曾 仲¹

(1. 昆明医科大学第一附属医院器官移植中心, 昆明 650000; 2. 昆明医科大学第二附属医院肝胆外科, 昆明 650000)

【摘 要】分离、鉴定肝窦内皮细胞是研究其生理功能的基础,而免疫表型是分离、鉴定的关键。然而,肝窦内皮细胞缺乏特异性的免疫表型,成为其研究中的重大挑战。肝窦内皮细胞的免疫表型随不同阶段肝脏的功能转变而转换,并受肝小叶内代谢微环境的影响和细胞因子的调控,其免疫表型具有异质性。本文就肝窦内皮细胞免疫表型的表达、生理功能、异质性表现及成因进行综述,并简要分析目前其相对特异性的免疫表型研究进展。

【关键词】肝窦内皮细胞;免疫表型;异质性;肝腺泡

【中图分类号】R333.4

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-10-13

Research progress of liver sinusoidal endothelial cells' immunophenotype

Chen Rui¹, Hong Maolin², Zeng Zhong¹

(1. Department of Organ Transplantation, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University;

2. Department of Hepatobiliary Surgery, The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University)

【Abstract】Isolation and identification of liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) are the bases to study their physiological functions, and immunophenotype is the key to this work. However, the lack of specific immunophenotype on LSECs is the major challenge in their researches. The immunophenotype of LSECs is transformed with the functional changes of the liver at different stages, influenced by the metabolic microenvironment in hepatic lobules and regulated by cytokines, with the property of heterogeneity. This article reviewed the expression, physiological functions, heterogeneity and causes of LSECs' immunophenotype and briefly analyzed the research advances of the LSECs' immunophenotype.

【Key words】liver sinusoidal endothelial cells; immunophenotype; heterogeneity; liver acinus

肝窦内皮细胞(liver sinusoidal endothelial cells, LSECs)构成肝血窦有孔、不连续内壁,占肝内非实质细胞的 70%。LSECs 窗孔组成特殊的筛板样结构和缺乏基底膜的特点使其成为所有内皮细胞中特异性最大、通透性最高的细胞群。LSECs 是网状内皮细胞清除系统的成员之一,它以强大的内吞能力在清除肝血窦中负荷的脂质、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)代谢产物、可溶性抗原中发挥重要作用。此外, LSECs 还广泛参与肝内免疫应答、肝再生调控、肝内血流调节、肝纤维化及肿瘤转移等生理病理过程^[1-2]。特异性细胞的免疫表型作为细胞标志,是分离、鉴定细胞的关键。LSECs 缺乏特异性的免疫表型,其相对特异性的免疫表型具有异质性,这成为

LSECs 研究中最大的挑战,更阻碍了不同研究之间细胞分离、鉴定流程的标准化和结果比较。目前,联合应用多种相对特异性的免疫表型对于 LSECs 的研究是必要的。

1 LSECs 免疫表型的表达与功能

LSECs 免疫表型的表达是一个动态过程。自人胚胎发育的第 7 周起,造血器官逐渐从卵黄囊转移到胸腺、脾脏进而到肝脏,肝脏的造血功能在第 13 周达到顶峰。LSECs 是肝脏造血微环境的重要组成部分,对造血起支持作用。此阶段的 LSECs 广泛表达 CD34、CD105 等造血干细胞免疫表型^[3]。随着胚胎的发育, LSECs 逐渐低表达一些连续血管内皮细胞的免疫表型如血小板/内皮黏附分子-1 (platelet/endothelial cell adhesion molecule 1, PECAM-1),即 CD31、CD34,进而高表达相对特异性的 CD32b、细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)等。目前研究中涉及的 LSECs 免疫表型大多是其表面具有内吞功能的受体,它们的配体是透

作者介绍:陈 睿, Email: chenrui16568@163.com,

研究方向:肝移植与缺血再灌注损伤。

通信作者:曾 仲, Email: zzong9933@163.com。

基金项目:国家自然科学基金地区科学基金资助项目(编号:81960124、81960123)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200324.1446.040.html>

(2020-03-26)

明质酸、胶原蛋白 α 链、乙酰化低密度脂蛋白、晚期糖基化终产物(advanced glycation end products, AGEs)、可溶性免疫球蛋白 G(immunoglobulin G, IgG)免疫复合物等。这些配体与其受体结合,经受体介导的内吞被摄取至 LSECs 的胞内溶酶体,继而从肝血窦中清除。因此,这些免疫表型的正常表达是 LSECs 发挥清除代谢产物功能的基础。研究发现,经分离后在体外培养的 LSECs 由于失去正常体内微环境支持和肝内其他细胞旁分泌信号的调控,在 48 h 内即会发生因免疫表型丢失引起的内吞能力下降和窗孔数减少导致的去窗孔化结构改变^[4]。

2 LSECs 免疫表型具有异质性

本文的异质性是指 LSECs 免疫表型的差异性和不均一性,即 LSECs 相对特异性的免疫表型存在多样性和空间表达差异性。异质性是所有血管内皮细胞的核心属性。作为肝血窦内壁的组成部分,LSECs 的异质性满足了其对肝血窦中复杂血管刺激信号结构性、非线性反应的需要。这一特性赋予 LSECs 细胞群具有远超单一细胞群的功能,成为理解肝脏复杂生理功能的基础^[5]。

肝小叶内的微解剖结构与 LSECs 的免疫表型异质性有密切关联。研究 LSECs 免疫表型异质性的本质,有必要从肝小叶的微解剖角度来认识肝小叶内结构和功能的差异。肝腺泡(liver acinus)的概念提出已久,它是肝小叶结构和功能的最小单位,描述了肝内微循环和肝小叶分区之间的对应关系^[6]。其定义为:门静脉管(portal tract, PT)发出的终末门静脉混合终末肝动脉内的血液进入肝血窦,肝腺泡以 PT 为中轴,两端以邻近的 2 支中央静脉(central vein, CV)为界,呈一个六边形区域,每个肝腺泡由相邻 2 个肝小叶的约 1/6 组成。在同一腺泡内,可依据血氧分压梯度和细胞代谢水平的差异分为 3 个区域:相邻 PT 之间的肝小叶区域为 Zone1(Z1);最接近 CV 的肝小叶区域为 Zone3(Z3);肝小叶中介于 Z1 和 Z3 之间的区域为 Zone2(Z2)。

最近, Strauss 等^[7]用免疫组织化学技术鉴定了人 LSECs 免疫表型的差异。研究发现, LSECs 在 Z1 区域呈 CD36 强阳性(hi), CD32 等阴性(-)其结果为 CD36^{hi}CD32⁻CD14⁻LYVE-1⁻(LYVE-1 即淋巴管内皮透明质酸受体-1), 称 1 型 LSECs; Z2 区域和 Z3 区域的 LSECs CD36 中到低表达(mid-low), 而 CD14 阳性(+), CD32 强阳性(hi), 其结果为 LYVE-1⁺CD32^{hi}CD14⁺CD54⁺CD3^{mid-low}, 称 2 型 LSECs。此外, Xie 等^[8]用免疫组织化学染色大鼠肝小叶 PT 周围、小叶中央、CV 周围的肝细胞后发现, CD45⁺的 LSECs 分布有明显的区域差异性, 即 Z1 区域阳性率最高, 且和 LSECs 细胞形态及窗孔数密切相关。以上研究结果解释了在众多涉及 LSECs 的研究中, 研究者选择作为 LSECs 标志的免疫表型不尽相同的现

象, 而这也恰好体现了 LSECs 免疫表型的异质性。

3 LSECs 免疫表型异质性的成因

3.1 肝脏内细胞基因表达的差异性

最近几年发展起来的单细胞测序技术从基因组学和转录组学层面揭示了细胞群体之间更加精细微妙的差异, 有助于更深刻地理解 LSECs 的异质性成因。研究发现, 在小鼠肝小叶内, 50% 的肝实质细胞基因表达呈明显的区带分布趋势, 基因丰度以小叶中央为高峰、PT 和 CV 为两极, 呈显著对称分布^[9]。最近, Halpern 等^[10]用配对细胞空间定位测序的方法揭示了小鼠肝脏非实质细胞 wingless/integrated(Wnt)信号通路相关基因及该通路负性调控基因 Dickkopf3(Dkk3)在 CV 周围 LSECs 内的空间差异表达, 进一步阐明了整个肝细胞群体基因表达的差异性。同时, 基因的空间差异表达也明显受环境影响。例如, 血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)在 LSECs 内的表达受噪声敏感相关基因的甲基化调控^[11]。综上, 这些研究从基因水平揭示了肝内细胞群体的空间差异性, 成为理解 LSECs 免疫表型异质性的分子基础。

3.2 肝小叶内代谢微环境

根据门脉终末血管分布所定义的肝腺泡实质上反映了肝小叶中不同部位血液成分的差异。生理情况下, 约 30% 的富氧肝动脉血液混合约 70% 富营养的门静脉血液经 PT 进入 Z1 区, 依次流经 Z2、Z3 区, 最终经 CV 引流至体循环。从 Z1 向 Z3 过渡, 肝脏的甘油三酯合成、糖原合成、酮体生成逐渐增多; β 氧化、糖异生、尿素代谢依次减弱。因此, 营养物质、激素等沿肝小叶的放射状血窦形成各自的浓度梯度, 这就是肝脏所谓的代谢分区^[12]。尽管肝脏内代谢分区概念早已被提出并接受, 但造成这一现象的原因却一直未得到很好的解释。氧含量的变化通常被认为是造成代谢分区的重要原因, LSECs 处于从 Z1 氧分压约 60 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)逐渐降至 Z3 氧分压约 30 mmHg 的相对缺氧环境中, 其对氧分压变化十分敏感, 低氧诱导转录因子(hypoxia-inducible transcription factors, HIFs)诱导 LSECs 免疫表型表达随氧分压梯度而呈现区带性特征^[13]。最近的研究发现, HIFs 可调控 Wnt/ β -catenin 信号通路和 Hedgehog 信号通路, 在肝内微环境调节中发挥关键作用^[14]。由此可见, 生理情况下 LSECs 总是处于肝脏内差异性的代谢微环境中, 这可能是 LSECs 免疫表型异质性形成的重要因素。

3.3 肝脏内的旁分泌信号调节

除受代谢微环境影响外, 肝实质细胞、肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)旁分泌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、外泌体(exosomes)、骨形成蛋白-9(bone morphogenetic protein-9, BMP-9)等对维持 LSECs 的分化状态、正常表型和窗孔结构有重要作用。生理状态下,

LSECs 在肝实质细胞旁分泌的 VEGF 调控下保持分化状态,进而维持 HSCs 的静止,这是防止肝纤维化的主要机制^[15]。一旦 VEGF 过度表达,LSECs 则去分化激活 HSCs,该过程是肝脏纤维化进程的关键环节。最近 1 项研究发现,激活的 HSCs 可分泌外泌体进而通过糖酵解相关蛋白的传递机制导致 LSECs 代谢异常^[16]。BMP-9 是 HSCs 旁分泌的一种转化生长因子 β 超家族配体蛋白。BMP-9 对肝内血管扩张和肝脏纤维化有负调控作用。同时,Bmp9 基因敲除小鼠的 LSECs 窗孔数量明显减少,细胞通透性降低^[17]。以上旁分泌调节失衡导致 ECM 沉积、ECM 成分改变及硬度增加继而发生肝纤维化,这一系列改变又最终促使 LSECs 免疫表型进一步异常^[18]。

3.4 其他外源性因素

目前尚缺少标准化的 LSECs 分离或鉴定方法,因此诸如分离方法的不当、体外培养条件的差异、培养基成分不合理、电镜样品制备过程中的破坏等人为因素均可导致 LSECs 穿孔、去窗孔化或免疫表型的变化。

综上,LSECs 免疫表型的异质性由肝脏内基因差异性表达决定,受肝小叶代谢微环境影响,并由相邻细胞旁分泌细胞因子所调节,因而表现出免疫表型的差异性、不均一性,此即 LSECs 免疫表型异质性的本质。

4 相对特异性的 LSECs 免疫表型及特点

LSECs 缺乏特异性的免疫表型,分离、鉴定 LSECs 需联合使用几种相对特异性的表型。利用单一免疫表型仅能分离出某一表型阳性的 LSECs 亚群,即选择偏倚。现将常用的 LSECs 免疫表型简介如下。

4.1 CD32b

应用单克隆抗体识别 CD32b 首次报道于 1993 年,其抗原当时未被鉴定。随后,系列研究证明该抗原是 CD32b,即 LSECs 表面识别 IgG 可结晶片段(fragment crystallizable,Fc)的受体,又称 Fc γ R II b。CD32b 是一种在进化上高度保守的、对 IgG 介导的免疫应答起负性调控作用的受体,其在 LSECs 上的表达是 LSECs 诱导免疫耐受的机制之一^[19]。

4.2 CD31

CD31 即 PECAM-1,它构成内皮细胞间的细胞连接,并参与白细胞迁移、血管生成过程。CD31 曾被认为是 LSECs 特异性的免疫表型,广泛用于 LSECs 分离、鉴定。后经 Deleve 等^[20]研究发现,正常 LSECs 表面 CD31⁺,同时用 CD31 单克隆抗体分离出的大鼠 LSECs 缺乏典型的“窗孔”样结构。此外,有研究发现肝血窦汇合成 CV 区域周围的内皮细胞 CD31⁺,但缺乏典型的“窗孔”结构,这与前述研究结果一致。目前多认为 CD31 是 CV 内皮细胞及淋巴管内皮细胞的标志,常作为 LSECs 鉴定的阴性对照^[21]。

4.3 CD105

CD105 即内皮素(endoglin),通过改变血管内皮细胞形状从而调节血管内径,参与 LSECs 调节肝内血流的过程。仅有少量文献报道其特异性表达于 LSECs,目前的研究倾向于 CD105 在所有内皮细胞普遍表达^[22]。

4.4 Stabilin-1/2

Stabilin-1 和 Stabilin-2 都是多功能清道夫受体稳定蛋白(scavenger receptor stabilizing protein,SR),又称透明质酸内吞受体(hyaluronan receptor for endocytosis,HARE),二者从编码基因到分子结构都很相似。它们是 LSECs 重要的功能受体。其配体有 ECM 代谢物、I 型和 III 型胶原蛋白 N 端前肽、透明质酸、凝血过程产物、硫酸软骨素、AGEs 以及寡核苷酸片段等,是参与组织自我更新过程的主要受体^[23]。

4.5 LYVE-1

淋巴管内皮透明质酸受体-1(lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1,LYVE-1)属 LSECs 和淋巴管内皮细胞表面的 I 型整合糖蛋白。LYVE-1 是 LSECs 清除透明质酸的功能受体,其在肝小叶中除 PT 周围 LSECs 低表达外,其余 LSECs 均高表达,因此是联合鉴定 LSECs 的重要分子。

4.6 CD146

CD146 又名内皮细胞间黏附分子,属免疫球蛋白超家族成员,广泛表达于人和鼠类的静脉内皮细胞、黑色素瘤细胞。其在 LSECs 上相对特异性不强,但阳性率高、表达稳定,所以也被用于 LSECs 的分离、鉴定^[24]。

4.7 CD45

CD45 即蛋白酪氨酸磷酸酶 C 型受体,组成多条细胞内信号转导通路。CD45 除是造血干细胞的表型标志之一外,也被广泛认为是 LSECs 的标志表型,因为目前研究认为这 2 种细胞在发生上有共同的起源^[25-26]。值得注意的是,有研究报道 CD45⁻是正常 LSECs 的表型;也有研究发现 CD45⁺是正常 LSECs 表型,这可能与 LSECs 处于不同发育阶段有关^[27]。所以,CD45 作为 LSECs 的免疫表型还有待更深入的研究。

5 结 语

免疫表型是细胞表达的具有生理功能的 CD 分子或表面蛋白,特异性的免疫表型常作为某种细胞的标志,对于细胞的分离或鉴定具有重要意义。LSECs 缺乏特异性的免疫表型,其免疫表型异质性由肝内细胞基因的差异性表达决定,也受肝小叶内代谢微环境的影响和邻近细胞旁分泌的细胞因子调节。更加深入地研究 LSECs 免疫表型的转换、区带分布差异及与肝脏疾病的关系可能需要三维细胞培养、基因组学、生物信息学等技术的综合运用。基于 LSECs 免疫表型的异质性,LSECs 亚群的研究可能是揭示其生理功能及与微环境作用关系的重要方法。目前,无论选择何种免疫表型,对于

LSECs细胞的分离或鉴定,多种免疫表型联合应用都是必要的。

参 考 文 献

- [1] DeLeve LD, Maretta-Mira AC. Liver sinusoidal endothelial cell: an update[J]. *Semin Liver Dis*, 2017, 37(4): 377–387.
- [2] Poisson J, Lemoine S, Boulanger C, et al. Liver sinusoidal endothelial cells: physiology and role in liver diseases[J]. *J Hepatol*, 2017, 66(1): 212–227.
- [3] Giancotti A, Monti M, Nevi L, et al. Functions and the emerging role of the foetal liver into regenerative medicine[J]. *Cells*, 2019, 8(8): E914.
- [4] Sorensen KK, Simon-Santamaria J, McCuskey RS, et al. Liver sinusoidal endothelial cells[J]. *Compr Physiol*, 2015, 5(4): 1751–1774.
- [5] McCarron JG, Wilson C, Heathcote HR, et al. Heterogeneity and emergent behaviour in the vascular endothelium[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2019, 45: 23–32.
- [6] Lamers WH, Hilberts A, Furt E, et al. Hepatic enzymic zonation: a reevaluation of the concept of the liver acinus[J]. *Hepatology*, 1989, 10(1): 72–76.
- [7] Strauss O, Phillips A, Ruggiero K, et al. Immunofluorescence identifies distinct subsets of endothelial cells in the human liver[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 44356.
- [8] Xie G, Wang L, Wang X, et al. Isolation of periportal, midlobular, and centrilobular rat liver sinusoidal endothelial cells enables study of zoned drug toxicity[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010, 299(5): G1204–1210.
- [9] Ben-Moshe S, Shapira Y, Moor AE, et al. Spatial sorting enables comprehensive characterization of liver zonation[J]. *Nat Metab*, 2019, 1(9): 899–911.
- [10] Halpern KB, Shenhav R, Massalha H, et al. Paired-cell sequencing enables spatial gene expression mapping of liver endothelial cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(10): 962–970.
- [11] Yuan L, Chan GC, Beeler D, et al. A role of stochastic phenotype switching in generating mosaic endothelial cell heterogeneity[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10160.
- [12] Lee-Montiel FT, George SM, Gough AH, et al. Control of oxygen tension recapitulates zone-specific functions in human liver microphysiology systems[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2017, 242(16): 1617–1632.
- [13] Kietzmann T. Metabolic zonation of the liver: the oxygen gradient revisited[J]. *Redox Biol*, 2017, 11: 622–630.
- [14] Machado MV, Diehl AM. Hedgehog signalling in liver pathophysiology[J]. *J Hepatol*, 2018, 68(3): 550–562.
- [15] DeLeve LD. Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis[J]. *Hepatology*, 2015, 61(5): 1740–1746.
- [16] Wan L, Xia T, Du Y, et al. Exosomes from activated hepatic stellate cells contain GLUT1 and PKM2: a role for exosomes in metabolic switch of liver nonparenchymal cells[J]. *FASEB J*, 2019, 33(7): 8530–8542.
- [17] Desroches-Castan A, Tillet E, Ricard N, et al. Bone morphogenetic protein 9 is a paracrine factor controlling liver sinusoidal endothelial cell fenestration and protecting against hepatic fibrosis[J]. *Hepatology*, 2019, 70(4): 1392–1408.
- [18] Hammoutene A, Rautou PE. Role of liver sinusoidal endothelial cells in non-alcoholic fatty liver disease[J]. *J Hepatol*, 2019, 70(6): 1278–1291.
- [19] Roghanian A, Stopforth RJ, Dahal LN, et al. New revelations from an old receptor: immunoregulatory functions of the inhibitory Fc gamma receptor, FcγRIIB(CD32B)[J]. *J Leukoc Biol*, 2018, 103(6): 1077–1088.
- [20] DeLeve LD, Wang X, McCuskey MK, et al. Rat liver endothelial cells isolated by anti-CD31 immunomagnetic separation lack fenestrae and sieve plates[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 291(6): G1187–1189.
- [21] Dingle AM, Yap KK, Gerrard YW, et al. Characterization of isolated liver sinusoidal endothelial cells for liver bioengineering[J]. *Angiogenesis*, 2018, 21(3): 581–597.
- [22] Sugden WW, Meissner R, Aegerter-Wilmsen T, et al. Endoglin controls blood vessel diameter through endothelial cell shape changes in response to haemodynamic cues[J]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(6): 653–665.
- [23] Miller CM, Donner AJ, Blank EE, et al. Stabilin-1 and Stabilin-2 are specific receptors for the cellular internalization of phosphorothioate-modified antisense oligonucleotides (ASOs) in the liver[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(6): 2782–2794.
- [24] Meyer J, Lacotte S, Morel P, et al. An optimized method for mouse liver sinusoidal endothelial cell isolation[J]. *Exp Cell Res*, 2016, 349(2): 291–301.
- [25] Zhang H, Pu W, Tian X, et al. Genetic lineage tracing identifies endocardial origin of liver vasculature[J]. *Nat Genet*, 2016, 48(5): 537–543.
- [26] Martinez-Corral I, Makinen T. Genetic lineage tracing of lymphatic endothelial cells in mice[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1846: 37–53.
- [27] Fomin ME, Beyer AI, Muench MO. Human fetal liver cultures support multiple cell lineages that can engraft immunodeficient mice[J]. *Open Biol*, 2017, 7(12): 170108.

(责任编辑:冉明会)