

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20220518

• 综述 •

肝细胞移植的研究进展

盛洁, 张文丽, 刘福晨, 王敏君, 刘辉*

海军军医大学(第二军医大学)第三附属医院肝外三科, 上海 200438

〔摘要〕 肝脏是维持人体代谢和解毒等功能的重要器官。当出现急慢性肝衰竭或基因缺陷, 肝功能受损无法满足机体所需时, 肝移植常作为治疗首选。然而, 由于肝源短缺等问题, 肝移植的应用受到限制, 人们开始发展与肝细胞移植相关的治疗方法。肝细胞移植的可行性已在多种动物模型中得到证实, 用于促进肝再生或减少肝脏纤维化的各种类型自体细胞移植的临床试验也已开始实践。本文重点回顾了肝细胞移植的主要临床适应证、移植细胞的来源选择及肝细胞移植的技术问题, 以期推进肝细胞移植相关研究, 使肝细胞移植在临床治疗中取得广泛收益, 为供体器官短缺提供切实可行的解决策略。

〔关键词〕 肝细胞; 细胞移植; 肝脏再生; 代谢性肝病; 肝衰竭

〔中图分类号〕 R 575; R 458

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 2097-1338(2023)01-0091-06

Hepatocyte transplantation: research progress

SHENG Jie, ZHANG Wen-li, LIU Fu-chen, WANG Min-jun, LIU Hui*

Department of Hepatic Surgery (III), The Third Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200438, China

〔Abstract〕 The liver is an important organ that helps to maintain metabolism and detoxification function in the human body. Orthotopic liver transplantation (OLT) is recognized as the first therapeutic option for patients with end-stage liver disease or liver failure caused by acute or chronic liver failure or genetic defect. Hepatocyte transplantation, however, gradually emerges as a possible strategy to overcome the limitations of OLT, especially the lack of organ donors. To date, the feasibility of hepatocyte transplantation has been confirmed in various animal models, and clinical observations have demonstrated encouraging results in promoting liver regeneration or reducing liver fibrosis by autologous cell transplantation. This paper reviews the main clinical indications of hepatocyte transplantation, and focuses on obstacles and breakthroughs in new cell sources and transplantation technique in order to boost related research in this field, leading to wider application in clinic and providing fundamental solutions for the shortage of donor organs.

〔Key words〕 hepatocyte; cell transplantation; liver regeneration; metabolic liver disease; hepatic failure

[Acad J Naval Med Univ, 2023, 44(1): 91-96]

原位肝移植是终末期肝病患者和部分肝脏代谢缺陷患者的首选治疗方案^[1], 但肝移植存在创伤大、免疫排斥高发、术后门静脉高压和胆道并发症发生风险高及费用昂贵等问题, 尤其是供体器官的短缺限制了肝移植的应用与发展。大量研究已经证明, 肝细胞是执行血清蛋白分泌、胆汁产生、解毒、代谢稳态维持及维生素和矿物质储存等肝脏功能的基本单位^[2]。同时, 临床上也有研究证实,

仅需移植正常个体肝脏细胞总量 5%~10% 的正常肝细胞就可以成功修复肝脏的缺陷和损伤^[3]。相比于传统的肝移植治疗, 肝细胞移植有诸多优点: (1) 治疗简单化。肝细胞移植可通过注射完成, 易于操作, 对受者的损害较小。(2) 方便取用。肝细胞可以冷冻保存以备紧急情况使用。(3) 可反复移植。为维持肝功能稳定, 可进行多次细胞输注。Nagata 等^[4]研究提示, 二次肝细胞移植操

〔收稿日期〕 2022-06-18 **〔接受日期〕** 2022-12-18

〔基金项目〕 国家自然科学基金(81970453, 82000483), 上海市卫生健康委员会卫生行业临床研究专项青年项目(20214Y0360)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81970453, 82000483) and Special Youth Program for Clinical Research in Health Industry of Shanghai Municipal Health Commission (20214Y0360).

〔作者简介〕 盛洁, 硕士生。E-mail: 1137701073@qq.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81875523, E-mail: liuhuigg@hotmail.com

作可使肝功能稳定时间延长至单次输注的3倍。

(4) 成本降低。细胞移植的成本相较于器官移植显著减少。(5) 供体多样性。动物实验证明,从不适宜器官移植的病肝或异种动物身上提取的肝细胞仍然可以移植^[5]。(6) 风险降低。可使用自体细胞进行移植,降低了免疫排斥的风险。

作为一种新的治疗手段,肝细胞移植用健康细胞替换受损细胞,既可以促进组织修复和再生,在发生不可逆损伤之前逆转肝病,又能解决肝脏再生能力耗尽或持续损伤不可逆的问题,成为等待肝移植患者的桥梁疗法。现就肝细胞移植领域近年来的研究进展作一综述。

1 肝细胞移植的主要临床适应证

尽管以肝细胞移植作为治疗手段的相关研究目前仅在部分肝脏疾病中开展,但理论上所有肝脏疾病都可能从中受益。大量临床和动物研究证实,肝细胞移植能够治疗多种遗传代谢障碍性肝病,其治疗思路是将正常肝细胞注入患病肝脏中,替代功能不全的肝细胞^[6]。Fox等^[7]采用同种异体肝细胞移植治疗了1例由葡萄糖醛酸转移酶缺乏导致的Crigler-Najjar综合征患儿,术后患儿的部分肝功能得到改善。Soltys等^[8]对由氨基甲酰磷酸合成酶和鸟氨酸转氨甲酰酶缺乏引起的尿素循环障碍患者进行肝细胞移植后,患者症状明显改善。肝细胞移植在尿素循环障碍新生儿和婴幼儿患者中也取得了满意的效果^[9]。近年来,人们针对 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶缺乏症、遗传性酪氨酸血症、家族性高胆固醇血症等常见肝脏代谢性疾病开展了动物实验和临床研究,证实可通过移植适量的健康肝细胞暂时替代肝移植手术^[10-12]。

急性肝衰竭患者也可以通过肝细胞移植手段进行治疗,其目的是暂时缓解肝功能受损,为肝脏再生留足时间窗。美国科罗拉多大学医学院首次使用肝细胞移植治疗菌类中毒导致的暴发性肝衰竭,经过30 h的原代肝细胞输注,患者肝功能得到改善,并且没有复发的迹象^[13]。Khan等^[14]和Schneider等^[15]分析了美国6个医疗中心共计18例因急性肝衰竭而行肝细胞移植的病例资料,所有患者的血氨、胆红素浓度均在治疗后明显下降,并且肝性脑病得到改善,进一步证实了肝细胞移植治疗急性肝衰竭的可行性。

在肝纤维化疾病的治疗上,除了肝移植外,目前尚无已获批的临床有效方法,因此,研究人员一直在探索促进肝脏再生和逆转纤维化的新方法。肝细胞移植治疗被认为是较有前景的替代策略,给慢性肝衰竭患者提供了新的选择。动物实验证实,使用体外诱导的肝祖细胞进行细胞移植可以改善四氯化碳诱导的慢性小鼠肝纤维化^[16]。Fisher和Strom^[17]总结分析了20例接受肝细胞移植治疗的慢性肝纤维化患者的预后情况,大部分患者的病情显著改善,其中10例患者的严重肝性脑病得到恢复;治疗未成功的患者可能源于肝窦周围的纤维化阻碍了细胞通过肝窦屏障植入肝实质。尽管患者的临床结局不同,但该研究依旧提示肝细胞移植在减轻慢性肝脏损害方面的潜力。

肝细胞移植治疗并不能完全弥补肝细胞的缺陷,但是该治疗手段对患者的益处已经在遗传代谢障碍性肝病和急性肝衰竭等肝脏疾病中得到证实,我们期待细胞移植在经过不断改进后可以拓宽应用范围,在诸如重症肝衰竭导致的顽固性腹水等暂时未能解决的困境中发挥作用,成为让大众受益的新兴疗法。

2 肝细胞移植的细胞来源

移植到肝脏或肝外部位的健康肝(前体)细胞通常应具有如下特性:(1)在肝脏或其他部位可以进行定植和增殖;(2)具有正常的肝脏功能,如分解代谢,合成胆汁酸、白蛋白、 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶等血清蛋白等。(3)移植细胞具有超过受者肝细胞的竞争性增殖优势,但需要规避肿瘤的发生^[12]。原代肝细胞是用于细胞移植最合适的细胞类型。然而,原代肝细胞的应用存在诸多问题:首先,原代肝细胞的提取需要大量正常肝组织,该因素限制了细胞的来源。其次,由于肝巨噬细胞等免疫细胞的杀伤吞噬作用,导致移植后最终能定植并发挥治疗效果的细胞数量极少。此外,肝脏虽然在体内具有强大的再生能力,但在体外常规培养条件下,人原代肝细胞增殖能力不断降低,长期体外培养会导致肝细胞去分化而失去正常功能。为解决上述问题,学者们开展了大量肝脏细胞生物学方面的研究,并促进了肝(前体)细胞移植临床研究的发展。

为了逆转肝细胞长期体外培养时出现的去分化现象,目前常用的方法是通过小分子抑制剂的添

加在体外模拟天然的肝细胞微环境。北京大学邓宏魁团队筛选出5C复合物用于肝细胞的2D培养,其中SB431542(TGF- β 抑制剂)、forskolin(腺苷酸环化酶激活剂)、DAPT(Notch抑制剂)、IWP2(Wnt抑制剂)和LDN193189(骨形态发生蛋白抑制剂)联合应用可以阻断上皮间质转化标志基因的表达,在5C条件培养基中培养的肝细胞2个月后仍高表达肝细胞功能的相关基因^[18]。中国科学院惠利健团队将常用的人肝分离培养基去除Rspodin 1、Noggin和forskolin,在此培养基中培养的增殖性人肝细胞被鉴定为双表型细胞,不仅表达祖细胞相关的标志物,而且在一定程度上保持了肝细胞的成熟表型,并且能够在体内进一步分化,显示出类似于人原代肝细胞在体内整合再殖的能力^[19]。上海交通大学医学院鄢和新团队在肝脏成熟培养基中添加了SB431542、N-乙酰半胱氨酸(活性氧抑制剂)、CHIR-99021(糖原合成酶激酶3 α/β 抑制剂)和Y-27632(Rho激酶抑制剂),显示出比5C复合物更强的维持肝细胞功能的能力^[20]。已知细胞-细胞和细胞-细胞外基质相互作用对于维持肝细胞的特定功能至关重要,Ogawa等^[21]的研究证实3D培养能够延长肝细胞的体外培养时间,并维持其肝功能。目前的研究表明,使用共培养技术或类器官培养均可显著提高肝细胞的生存能力和代谢功能^[22]。然而,现有的原代肝细胞的长期培养方法只能在一定程度上延缓其去分化过程,尚无法稳定培养并应用于临床。

鉴于原代肝细胞培养困难的问题,研究人员开始探索替代细胞的来源。越来越多的研究者将目光投向了肝前体细胞。胆管细胞来源的具有双向分化潜能的细胞可在体外培养为肝脏类器官,能够长期扩增,但植入情况不佳^[23]。Katsuda等^[24]和Wu等^[25]的研究分别证实小鼠肝细胞可在体外扩增为祖细胞样细胞和导管样细胞,这些细胞移植后能在小鼠肝脏中广泛增殖,并重新表现出成熟肝细胞的特征。这或许可以作为大规模生产可移植肝细胞的一种手段。成纤维细胞具有良好的分裂增殖能力,可以在体外大量培养。通过将成纤维细胞重编程获得的增殖性肝脏祖细胞保持了扩增能力,进一步在体外诱导可转化为具备肝功能的成熟肝细胞^[26]。此外,人外周血来源的内皮细胞能够产生可扩增的人源诱导的肝祖细胞,该细胞同样具备双潜能,可以作为

功能性肝细胞和胆管细胞的理想来源^[27]。肝祖细胞通过离体基因编辑后可以迅速增殖,并可在一定条件下与肝细胞相互转化,为肝细胞移植提供了一个稳定的细胞来源。来源于个体本身的肝祖细胞经扩增诱导后可用于自体移植,避免了免疫排斥发生。同时,这种细胞也可满足体外毒理学研究等大型实验所需的细胞数量,成为研究肝脏疾病合适且可靠的工具。

干细胞具有自我更新能力,因此研究者长期致力于利用干细胞的复制与分化来修复受损细胞或组织。来自浙江大学的李军团队发现,植入猪体内的骨髓间充质干细胞可以通过抑制细胞因子风暴、改变受者对肝损伤的反应来挽救暴发性肝衰竭^[28]。但是,干细胞在小鼠肝脏中的植入能力极其有限^[29],而且干细胞的应用受限于伦理。目前,人们着重研究了诱导多能干细胞向肝细胞样细胞的分化,希望后者能够替代原代人肝细胞。肝细胞样细胞因细胞数量的无限性且能够避开免疫系统,使其更具移植优势,可以作为一种良好的替代肝细胞的来源。

对于某些遗传性肝脏疾病,可以使用经过基因编辑后的自体肝细胞进行移植。例如在遗传性酪氨酸血症1型猪模型中,利用过表达延胡索酰乙酸水解酶(fumarylacetoacetate hydrolase, FAH)基因的慢病毒载体感染肝细胞,然后再进行自体移植^[30]。这些过表达FAH基因的自体肝细胞不但易被受者接纳,还能逐渐取代有缺陷的细胞,从而使整个肝脏内的细胞重新增殖、更新,这种基因编辑后的细胞移植对个体化医疗意义重大。

针对可移植细胞来源的问题,异种细胞移植是另一个有吸引力的研究方向。猪与人体的生理特点相似,但猪没有供体数量的限制,且既往已有大量猪脏器移植入人体的经验。移植后的猪肝细胞不会出现急性体液排斥反应,可以迅速恢复肝功能,并且对HBV等人类病毒具有天然的免疫力。虽然猪肝细胞移植存在人感染猪内源性反转录病毒的风险,但目前猪仍然是异种细胞移植的最佳细胞供体^[31-32]。

综上所述,原代肝细胞、肝前体细胞、干细胞、诱导多能干细胞、基因编辑细胞甚至异种细胞等多种细胞被发掘作为肝细胞移植的细胞来源,虽然目前还存在许多问题,如体外培养的细胞无法保持复杂的代谢功能等,但现有的研究仍然为细胞来

源的选择提供了新的思路和启发。

3 肝细胞移植的技术问题

在动物实验中,肝细胞移植方法有多种。在小鼠中的研究已经确定,为了使移植的细胞成功输入并融合到肝实质中,最简洁明了的方法是直接将细胞输送到肝窦中,但将细胞直接注射到肝实质会导致细胞直接进入肝静脉流出道和肺毛细血管,造成植入效率低、细胞死亡或异位分布、栓塞、免疫排斥,以及移植细胞发挥效应短暂等后果^[33]。在临床实践中,门静脉注射是肝细胞移植的主要途径。因为输注的肝细胞在动脉血管高流速的条件下可能会被血流剪切力迅速破坏,相比而言,门静脉的低速血流更可能实现肝细胞在肝窦内迁移,并维持较长时间的存活^[34]。

然而,肝硬化患者经门静脉输注细胞更易导致门静脉高压,并且患者肝脏结构的改变会影响细胞植入,这种情况下将细胞注入脾脏是一个更安全的选择^[35]。脾红髓的网状结构有利于细胞间的相互作用和附着,使其更好地植入,同时,脾脏中丰富的血供也为细胞长期增殖提供了养分^[36]。最近,一项小鼠实验表明,通过腹腔注射移植的肝细胞能够进入脂肪相关淋巴簇,从而产生异位肝组织^[37]。腹部脂肪组织具有三级淋巴位点,腹腔注射可以激活相关的黏附分子,从而为移植后肝再生提供新的环境。这种有趣的方法也被研究人员用于急性肝衰竭患者的治疗中^[14,38]。近年也有研究尝试将分离的肝细胞移植于经部分肝切除处理小鼠的肾包膜下,因为肾包膜允许肝细胞植入而不需要预血管化,并且有足够的空间让肝细胞生长,成熟肝细胞能够通过自我复制,并从骨髓等受体组织中募集非实质细胞来诱导肝器官发生,最终形成一个复杂的、类似原器官大小的“新肝”,其结构与天然肝脏的特殊结构相似^[39]。

不同的移植方法存在一个相似的问题,即移植的供体细胞的分布可变性较大,这使得通过活检诊断受体对供体肝细胞的排斥情况变得困难。此外,由移植细胞介导的肝功能变化指标(如胆红素、氨基酸或血氨水平)不够灵敏,难以在移植造成不可逆转的损害或丧失功能前发现供体细胞的排斥反应。如果未能及时诊断和处理,就会造成身体的免疫功能过剩或缺乏,从而使移植细胞的活性显著

降低^[8]。为了尽可能降低免疫排斥的概率,除了使用传统的免疫抑制剂外,研究人员开发了新型材料来降低免疫反应。例如,有研究者使用藻酸盐包埋肝细胞后将其输注到腹膜内治疗儿童急性肝衰竭,可以观察到肝功能的明显改善^[40]。该方法因为没有供体细胞在受体内的黏附,从而确保了生物相容性。水凝胶是一种新兴的生物材料,将细胞和生长因子等成分与水凝胶结合,通过直接注入或补片形式嫁接到目标部位,有助于移植细胞在受者组织中完全整合,从而促进其旁分泌作用和相关信号的协同作用^[41]。

在小鼠实验中,将健康肝细胞移植到急性毒性损伤肝脏模型后,移植的细胞增殖缓慢,且再增殖的数量非常有限^[42],提示患者中也可能存在移植细胞的增殖问题。为了使供体肝细胞尽快在患者体内发挥功能,需要在移植前使用预处理方案。动物实验发现,提前进行部分肝切除术可产生强烈的增殖刺激,使移植的肝细胞比内源性肝细胞具有选择性生长优势^[43]。准备性肝照射可抑制受者肝细胞增殖并发生过度有丝分裂,导致内源细胞死亡,同时可以短期破坏肝窦内皮细胞,增加肝窦的孔隙,促进移植细胞向肝实质的迁移,还可抑制肝巨噬细胞的吞噬活性,从而有利于植入肝细胞在大鼠和小鼠体内优先增殖和再生^[44]。Soltys等^[8]首次证实,用辐射预处理非人灵长类动物受者肝脏可以明显改善移植肝细胞在人体的植入。Barahman等^[12]研究发现,在载脂蛋白E缺陷型血脂异常小鼠模型中联合应用肝脏局灶性照射和肝脏有丝分裂原GC-1(一种甲状腺激素受体 β 激动剂模拟物)可以增强移植细胞的再生能力,接受治疗4周后的小鼠载脂蛋白E水平显著升高,并且血清胆固醇水平显著降低。

上述研究主要通过扩展移植途径、使用新材料或移植前预处理来促进移植细胞的增殖与再生,并减轻移植后的免疫反应,为临床上安全、高效地应用肝细胞移植奠定了基础。

4 小 结

虽然细胞移植有其局限性,但总的来说,肝细胞移植发展迅速,并且已经有了许多令人振奋的新发现。通过深入了解原代肝细胞复杂的表观遗传因素和基因表达情况,有助于对体外培养肝细胞进行严格的质量控制,以及对多能干细胞来源肝细胞的成

熟性和稳定性进行提升。肝细胞移植的潜力尚未被完全发掘出来,未来的研究应以患者为导向,克服当前细胞培养的局限性,明确安全性、生物分布、组织清除率、毒理学和致癌潜力等相关细节,完善法律法规,使肝细胞移植的应用范围更加广阔,真正成为能够提高患者生存质量的有效治疗手段。

[参考文献]

- [1] PETROWSKY H, FRITSCH R, GUCKENBERGER M, DE OLIVEIRA M L, DUTKOWSKI P, CLAVIEN P A. Modern therapeutic approaches for the treatment of malignant liver tumours[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17: 755-772.
- [2] CHEN C, SOTO-GUTIERREZ A, BAPTISTA P M, SPEE B. Biotechnology challenges to *in vitro* maturation of hepatic stem cells[J]. *Gastroenterology*, 2018, 154: 1258-1272.
- [3] HANSEL M C, GRAMIGNOLI R, SKVORAK K J, DORKO K, MARONGIU F, BLAKE W, et al. The history and use of human hepatocytes for the treatment of liver diseases: the first 100 patients[J/OL]. *Curr Protoc Toxicol*, 2014, 62: 14.12.1-14.1223. DOI: 10.1002/0471140856.tx1412s62.
- [4] NAGATA H, NISHITAI R, SHIROTA C, ZHANG J L, KOCH C A, CAI J, et al. Prolonged survival of porcine hepatocytes in cynomolgus monkeys[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132: 321-329.
- [5] BELASCHK E, ROHN S, MUKIIBI R, REUTZEL-SELKE A, TANG P, SAWITZKI B, et al. Isolation, characterization and cold storage of cells isolated from diseased explanted livers[J]. *Int J Artif Organs*, 2017, 40: 294-306.
- [6] SOLTYS K A, SOTO-GUTIÉRREZ A, NAGAYA M, BASKIN K M, DEUTSCH M, ITO R, et al. Barriers to the successful treatment of liver disease by hepatocyte transplantation[J]. *J Hepatol*, 2010, 53: 769-774.
- [7] FOX I J, CHOWDHURY J R, KAUFMAN S S, GOERTZEN T C, CHOWDHURY N R, WARKENTIN P I, et al. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation[J]. *N Engl J Med*, 1998, 338: 1422-1426.
- [8] SOLTYS K A, SETOYAMA K, TAFALENG E N, GUTIÉRREZ A S, FONG J, FUKUMITSU K, et al. Host conditioning and rejection monitoring in hepatocyte transplantation in humans[J]. *J Hepatol*, 2017, 66: 987-1000.
- [9] MEYBURG J, DAS A M, HOERSTER F, LINDNER M, KRIEGBAUM H, ENGELMANN G, et al. One liver for four children: first clinical series of liver cell transplantation for severe neonatal urea cycle defects[J]. *Transplantation*, 2009, 87: 636-641.
- [10] BOREL F, TANG Q S, GERNOUX G, GREER C, WANG Z Q, BARZEL A, et al. Survival advantage of both human hepatocyte xenografts and genome-edited hepatocytes for treatment of α -1 antitrypsin deficiency[J]. *Mol Ther*, 2017, 25: 2477-2489.
- [11] KIM Y, HONG S A, YU J, EOM J, JANG K, YOON S, et al. Adenine base editing and prime editing of chemically derived hepatic progenitors rescue genetic liver disease[J/OL]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28: 1614-1624.e5. DOI: 10.1016/j.stem.2021.04.010.
- [12] BARAHMAN M, ZHANG W, HARRIS H Y, AIYER A, KABARRITI R, KINKHABWALA M, et al. Radiation-primed hepatocyte transplantation in murine monogenic dyslipidemia normalizes cholesterol and prevents atherosclerosis[J]. *J Hepatol*, 2019, 70: 1170-1179.
- [13] BILIR B, GUINETTE D, KARRER F, KUMPE D, KRYSL J, STEPHENS J, et al. Hepatocyte transplantation in acute liver failure[J]. *Liver Transplant*, 2000, 6: 32-40.
- [14] KHAN A A, HABEEB A, PARVEEN N, NASEEM B, BABU R P, CAPOOR A K, et al. Peritoneal transplantation of human fetal hepatocytes for the treatment of acute fatty liver of pregnancy: a case report[J]. *Trop Gastroenterol*, 2004, 25: 141-143.
- [15] SCHNEIDER A, ATTARAN M, MEIER P N, STRASSBURG C, MANNS M P, OTT M, et al. Hepatocyte transplantation in an acute liver failure due to mushroom poisoning[J]. *Transplantation*, 2006, 82: 1115-1116.
- [16] HUANG W J, ZHOU X, FU G B, DING M, WU H P, ZENG M, et al. The combined induction of liver progenitor cells and the suppression of stellate cells by small molecules reverts chronic hepatic dysfunction[J]. *Theranostics*, 2021, 11: 5539-5552.
- [17] FISHER R A, STROM S C. Human hepatocyte transplantation: worldwide results[J]. *Transplantation*, 2006, 82: 441-449.
- [18] XIANG C G, DU Y Y, MENG G F, YI L S, SUN S C, SONG N, et al. Long-term functional maintenance of primary human hepatocytes *in vitro*[J]. *Science*, 2019, 364: 399-402.
- [19] ZHANG K, ZHANG L, LIU W, MA X, CEN J, SUN Z, et al. *In vitro* expansion of primary human hepatocytes with efficient liver repopulation capacity[J/OL]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23: 806-819.e4. DOI: 10.1016/j.stem.2018.10.018.
- [20] CHEN Y, TANG D, WU H P, WU Y L, YUAN T J, ZHANG H D, et al. Assessment of long-term functional maintenance of primary human hepatocytes to predict drug-induced hepatotoxicity *in vitro*[J]. *Arch Toxicol*, 2021, 95: 2431-2442.
- [21] OGAWA S, SURAPISITCHAT J, VIRTANEN C, OGAWA M, NIAPOUR M, SUGAMORI K S, et al. Three-dimensional culture and cAMP signaling promote

- the maturation of human pluripotent stem cell-derived hepatocytes[J]. *Development*, 2013, 140: 3285-3296.
- [22] LI Y, WU Q, WANG Y J, WENG C X, HE Y T, GAO M Y, et al. Novel spheroid reservoir bioartificial liver improves survival of nonhuman primates in a toxin-induced model of acute liver failure[J]. *Theranostics*, 2018, 8: 5562-5574.
- [23] HUCH M, GEHART H, VAN BOXTEL R, HAMER K, BLOKZIJL F, VERSTEGEN M M A, et al. Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver[J]. *Cell*, 2015, 160: 299-312.
- [24] KATSUDA T, KAWAMATA M, HAGIWARA K, TAKAHASHI R U, YAMAMOTO Y, CAMARGO F D, et al. Conversion of terminally committed hepatocytes to culturable bipotent progenitor cells with regenerative capacity[J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 20: 41-55.
- [25] WU H, ZHOU X, FU G B, HE Z Y, WU H P, YOU P, et al. Reversible transition between hepatocytes and liver progenitors for *in vitro* hepatocyte expansion[J]. *Cell Res*, 2017, 27: 709-712.
- [26] XIE B Q, SUN D, DU Y Y, JIA J, SUN S C, XU J, et al. A two-step lineage reprogramming strategy to generate functionally competent human hepatocytes from fibroblasts[J]. *Cell Res*, 2019, 29: 696-710.
- [27] INADA H, UDONO M, MATSUDA-ITO K, HORISAWA K, OHKAWA Y, MIURA S, et al. Direct reprogramming of human umbilical vein- and peripheral blood-derived endothelial cells into hepatic progenitor cells[J/OL]. *Nat Commun*, 2020, 11: 5292. DOI: 10.1038/s41467-020-19041-z.
- [28] SHI D Y, ZHANG J N, ZHOU Q, XIN J J, JIANG J, JIANG L Y, et al. Quantitative evaluation of human bone mesenchymal stem cells rescuing fulminant hepatic failure in pigs[J]. *Gut*, 2017, 66: 955-964.
- [29] GAO Y, ZHANG X, ZHANG L, CEN J, NI X, LIAO X, et al. Distinct gene expression and epigenetic signatures in hepatocyte-like cells produced by different strategies from the same donor[J]. *Stem Cell Rep*, 2017, 9: 1813-1824.
- [30] HICKEY R D, NICOLAS C T, ALLEN K, MAO S N, ELGILANI F, GLORIOSO J, et al. Autologous gene and cell therapy provides safe and long-term curative therapy in a large pig model of hereditary tyrosinemia type 1[J]. *Cell Transplant*, 2019, 28: 79-88.
- [31] LI X X, WANG Y, YANG H Y, DAI Y F. Liver and hepatocyte transplantation: what can pigs contribute?[J/OL]. *Front Immunol*, 2022, 12: 802692. DOI: 10.3389/fimmu.2021.802692.
- [32] EKSER B, EZZELARAB M, HARA H, VAN DER WINDT D J, WIJKSTROM M, BOTTINO R, et al. Clinical xenotransplantation: the next medical revolution?[J]. *Lancet*, 2012, 379: 672-683.
- [33] TURNER R A, WAUTHIER E, LOZOYA O, MCCLELLAND R, BOWSHER J E, BARBIER C, et al. Successful transplantation of human hepatic stem cells with restricted localization to liver using hyaluronan grafts[J]. *Hepatology*, 2013, 57: 775-784.
- [34] RAJVANSHI P, KERR A, BHARGAVA K K, BURK R D, GUPTA S. Studies of liver repopulation using the dipeptidyl peptidase IV-deficient rat and other rodent recipients: cell size and structure relationships regulate capacity for increased transplanted hepatocyte mass in the liver lobule[J]. *Hepatology*, 1996, 23: 482-496.
- [35] STROM S C, CHOWDHURY J R, FOX I J. Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease[J]. *Semin Liver Dis*, 1999, 19: 39-48.
- [36] NICOLAS C T, HICKEY R D, CHEN H S, MAO S A, LOPERA HIGUITA M, WANG Y J, et al. Concise review: liver regenerative medicine: from hepatocyte transplantation to bioartificial livers and bioengineered grafts[J]. *Stem Cells*, 2017, 35: 42-50.
- [37] HAN B, FRANCIPANE M G, CHEIKHI A, JOHNSON J, CHEN F, CHEN R Y, et al. Fat-associated lymphoid clusters as expandable niches for ectopic liver development[J]. *Hepatology*, 2022, 76: 357-371.
- [38] HABIBULLAH C M, SYED I H, QAMAR A, TAHER-UZ Z. Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure[J]. *Transplantation*, 1994, 58: 951-952.
- [39] UTOH R, KOMORI J, KUGE H, TATSUMI K, YAMADA M, HIROHASHI S, et al. Adult hepatocytes direct liver organogenesis through non-parenchymal cell recruitment in the kidney[J]. *J Hepatol*, 2018, 68: 744-753.
- [40] DHAWAN A, CHAIJITRARUCH N, FITZPATRICK E, BANSAL S, FILIPPI C, LEHEC S C, et al. Alginate microencapsulated human hepatocytes for the treatment of acute liver failure in children[J]. *J Hepatol*, 2020, 72: 877-884.
- [41] ZHANG W, LANZONI G, HANI H, OVERI D, CARDINALE V, SIMPSON S, et al. Patch grafting, strategies for transplantation of organoids into solid organs such as liver[J/OL]. *Biomaterials*, 2021, 277: 121067. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021.121067.
- [42] ZHU S Y, REZVANI M, HARBELL J, MATTIS A N, WOLFE A R, BENET L Z, et al. Mouse liver repopulation with hepatocytes generated from human fibroblasts[J]. *Nature*, 2014, 508: 93-97.
- [43] GUPTA S, JOHNSTONE R, DARBY H, SELDEN C, PRICE Y, HODGSON H J, et al. Transplanted isolated hepatocytes: effect of partial hepatectomy on proliferation of long-term syngeneic implants in rat spleen[J]. *Pathology*, 1987, 19: 28-30.
- [44] ZHOU H C, DONG X Y, KABARRITI R, CHEN Y, AVSAR Y, WANG X, et al. Single liver lobe repopulation with wildtype hepatocytes using regional hepatic irradiation cures jaundice in Gunn rats[J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7: e46775. DOI: 10.1371/journal.pone.0046775.