

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.04.0493

• 综述 •

肝干细胞研究进展

陆炼, 于兵, 胡以平*

第二军医大学基础部细胞生物学教研室, 上海 200433

[摘要] 肝干细胞是具有自我更新能力和分化为成熟肝细胞与胆管上皮细胞的双向分化潜能的原始细胞。肝干细胞不仅参与了肝脏的稳态维持、损伤修复和肝再生, 而且在肝脏疾病的细胞治疗、人工生物肝及肝导向基因治疗中有着巨大的应用潜能。本文对几种主要类型的肝干细胞及它们的来源、分子标志物等进行了综述。

[关键词] 干细胞; 胚胎肝干细胞; 成体肝干细胞; 肝再生

[中图分类号] R 329.29 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)04-0493-08

Research progress on liver stem cells

LU Lian, YU Bing, HU Yi-ping*

Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] Liver stem cells are primitive cells with self-renewing capacity and bidirectional differentiation potential to differentiate into mature hepatocytes or biliary epithelial cells. Liver stem cells not only play roles in the homeostasis maintenance, injury repair and regeneration of liver, but also have huge potential applications in cell therapy of liver diseases, construction of bioartificial liver and liver-oriented gene therapy. In this review, we summarized the major types of liver stem cells, as well as their origins and molecular markers.

[Key words] stem cells; embryonic liver stem cells; adult liver stem cells; liver regeneration

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(4): 493-500]

肝脏是体内最主要的代谢器官, 肝脏中的肝干细胞是指具有自我更新能力和双向分化潜能的不成熟细胞, 它可在体内或体外诱导分化为成熟肝细胞和胆管上皮细胞。肝干细胞的概念最早于 1958 年由 Wilson 和 Leduc^[1] 提出, 近年来随着研究的深入, 越来越多的证据证实肝脏中肝干细胞的存在。目前研究发现多种细胞符合肝干细胞的特征, 如胚胎肝脏中的干细胞、成体肝脏中的干细胞以及在体外通过谱系重编程获得的肝干细胞等。由于肝干细胞在肝脏疾病的细胞治疗、人工生物肝及肝导向基因治疗中有着巨大的应用潜能, 肝干细胞已成为肝脏疾病和组织干细胞研究领域的热点之一。本文对肝干细胞研究中普遍关注的肝干细胞的类型、来源及其分子标志物等方面的研究现状与进展展开

1 胚胎肝干细胞

胎肝中存在干细胞, 它们具有无限增殖和多向分化的能力。由于缺乏特异性标志物, 胚胎肝干细胞的分离一直是一大难题。有研究者利用分子标志物穿膜蛋白 1(delta-like 1 homologue, Dlk1) 从体外培养的胎肝细胞中分离得到胎肝前体细胞, 该细胞具有克隆形成能力且能够在层粘连蛋白上连续增殖, 在适当条件下还能分化成为肝细胞和胆管细胞^[2]。此外, 研究发现在长期体外培养的胎肝细胞中还能获得其他类似具有双向分化潜能的细胞, 如双潜能小鼠胚胎肝细胞(bipotential mouse embryonic liver cells, BMEL)^[3], 它表达肝细胞核因

[收稿日期] 2017-03-15 **[接受日期]** 2017-04-10

[基金项目] 国家自然科学基金(31401166), 国家重点基础研究发展计划(“973 计划”, 2010CB945602)。Supported by National Natural Science Foundation of China(31401166) and National Key Basic Research and Development Project of China(“973 Project”, 2010CB945602)。

[作者简介] 陆炼, 硕士生, E-mail: xy4601lu@126.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81870943, E-mail: yphu@smmu.edu.cn

子 1 α (hepatocyte nuclear factors 1 α , HNF1 α)、肝细胞核因子 4 α (hepatocyte nuclear factors 4 α , HNF4 α) 和 GATA 结合蛋白 4 (GATA-binding protein 4, GATA4), 但不表达白蛋白 (albumin, ALB), 是研究双向分化细胞分化机制的非常有用的模型。目前, 已有许多研究者通过体外培养胎肝细胞结合特殊分子标志物的方法来分离胎肝前体细胞。

Dan 等^[4]通过长期培养人胎肝细胞建立了类似于小鼠多能干细胞的细胞系人胎肝多能干细胞 (human fetal liver multipotent progenitor cell, hFLMPCs), 该细胞系移植到肝脏受损的小鼠体内后能够增殖、自我更新并多向分化。hFLMPCs 能表达白细胞分化抗原 90 (cluster of differentiation 90, CD90)、受体酪氨酸激酶 c-Kit、淋巴细胞共同分化抗原 44h (lymphocyte common antigen-44h, CD44h) 和上皮细胞黏附分子 (epithelial cell adhesion molecule, EpCAM) 等常见的干细胞标志物, 但不表达肝细胞特异性标志物甲胎蛋白 (alpha fetoprotein, AFP) 和 ALB。Schmelzer 等^[5]发现, 从人胎肝细胞中分离出来的 EpCAM⁺ 细胞中含有成肝细胞的前体细胞, 这些细胞能表达干细胞标志物, 并且能够在体外培养和增殖。这些 EpCAM⁺ 细胞也被称为肝干细胞 (hepatic stem cells, hHpSCs), hHpSCs 少量表达 ALB 但不表达 AFP。将新鲜分离的 EpCAM⁺ 细胞或体外扩增培养的 hHpSCs 移植到 NOD/SCID 小鼠中能产生表达人特异性蛋白的成熟肝组织。Goldman 等^[6]发现, 小鼠和人胎肝细胞不同于内皮细胞的地方是它们能表达血管内皮细胞生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, KDR/VEGFR2/Flk1), 之后他们使用 Kdr-Cre 谱系示踪系统研究发现 KDR⁺ 细胞存在于 E8.0 胚胎的内胚层中并且能在肝脏发育过程中分化为肝细胞和胆管细胞, 表明 KDR⁺ ALB⁻ AFP⁻ 的细胞具有胎肝干细胞特性。成肝细胞表达 ALB 和 AFP, 而上述体外培养分离得到的胎肝干细胞样细胞都不表达或者少量表达 ALB 和 AFP, 因此可以推断胎肝干细胞是成肝细胞的前体细胞。

2 成体肝干细胞

成体肝脏中的干细胞比胎肝更加复杂, 在成体

器官和组织中干细胞的作用主要是在正常生理状态下维持组织更新和在损伤状态下进行组织修复。人体内表皮、肠道和造血系统等许多组织和器官的细胞生命周期非常短, 干细胞的增殖对于维持这些组织器官的结构和功能完整性至关重要; 而成体肝细胞的寿命非常长, 更新往往需要几个月的时间^[7]。因此, 在正常条件下肝细胞更新是否需要干细胞的参与值得怀疑, 目前普遍认为正常情况下肝脏的细胞更新是由肝细胞增殖来维持的。

由于肝细胞生命周期长, 使用标记滞留实验寻找肝脏中的肝细胞非常困难。目前许多研究都使用 Cre/loxP 介导的遗传标记和谱系示踪系统来研究成年小鼠肝脏的组织维持模式。关于肝脏细胞更新存在一个经典的“肝细胞流动学说 (streaming liver hypothesis)”, 这一学说由 Zajicek 等^[8]提出, 他们通过大鼠肝脏放射性核苷酸掺入实验发现, 新生的肝细胞首先出现在汇管区 (其中存在胆管) 并且沿着肝索流向周围区域以补充肝细胞, 因此他们推断汇管区可能存在维持肝细胞内稳态的干细胞巢, 这些干细胞能够分化成为肝细胞并沿着肝索迁移到肝小叶中补充肝细胞。此后研究者们提出了各种支持或反对该假设的证据。支持这一理论的最有说服力的证据是由一项基于胆管细胞标志物性别决定区 Y 框蛋白 9 (sex determining region Y box protein 9, Sox9) 的遗传谱系示踪研究提出的^[9]。通过转基因技术将重组酶 CreERT2 插入 Sox9 位点, 从而使胆管细胞带有 Cre 酶标记而肝细胞未被标记。之后观察发现带有标记的细胞逐渐从汇管区扩展到肝小叶内, 然后到达中心区, 在 1 年后几乎占据了整个肝实质。汇管区胆管内也一直有带标记的细胞存在, 表明表达 Sox9 的胆管细胞既可以连续分化为参与正常组织更新的成熟肝细胞, 也同时具有自我更新的能力。

然而, 一些采用不同类型遗传谱系示踪系统的研究却得到了与上述研究相矛盾的结果。无论是使用细菌人工染色体 (BAC) 法进行 Sox9-CreERT2 标记^[10]还是通过骨桥蛋白 (OPN)-CreERT2 来标记胆管细胞^[11], 都没有观察到标记细胞从胆管向肝脏迁移的现象。一项研究通过腺相关病毒用 Cre 酶标记肝细胞, 并观察肝细胞的更新情况, 结果也未观察到标记阴性的非肝细胞谱系细胞 (包括胆管细胞) 分化

为肝细胞的现象。这些研究结果均不支持“肝细胞流动学说”。鉴于胆管细胞能在某些类型的肝损伤条件下帮助肝实质再生,而在 OPN-CreERT2 示踪系统中也观察到这一现象^[11],推断 Furuyama 等^[9]发现的 Sox9-CreERT2 转基因小鼠中胆管细胞肝向分化可能是受转基因或外环境的影响,但其根本原因仍未可知,需要进一步的研究来解释这种差异,并阐明维持肝细胞更新的基本机制。

也有研究利用流式细胞分离技术寻找成体肝干细胞。与胎肝中干细胞的鉴定标准一样,分离所得的细胞如具有以下特征也可以被定义为“干细胞”:(1)具有克隆形成能力和高增殖能力;(2)在适当的培养条件下能够分化为肝细胞或胆管上皮细胞;(3)移植后能够修复肝组织。这些细胞可以被认为是“潜在的”肝脏干细胞,因为它们在外培养条件下满足干细胞的标准。但值得注意的是,这些“潜在的”肝脏干细胞都表达 EpCAM^[12]、CD133^[13] 和 MIC1-1C3 抗原^[14]等胆管细胞标志物,表明肝干细胞可能存在于胆管系统中。目前已有研究支持这一理论, Carpino 等^[15]在人肝外胆管树中独特的上皮结构胆管腺内找到了能够分化为肝细胞、胆管细胞和胰岛的多能干细胞/前体细胞。有人在小鼠肝脏中也找到了具有类似特征和解剖定位的相应干细胞/前体细胞^[16]。

虽然目前有关肝脏中具有干细胞特性的细胞(如肝前体细胞)的研究已取得很大进展,但对于肝脏中真正的肝干细胞仍然缺乏认识,成体肝干细胞的定位和特征尚不清楚,还需要进一步的研究。

3 肝再生过程中的干细胞/前体细胞

肝脏具有非常强大的再生能力,关于干细胞是否参与肝再生过程一直存在争议。长期以来通过手术切除肝脏特定叶的部分肝切除术(PHx)是肝再生的主要研究手段^[17]。PHx 方案不会对残余肝组织造成损伤,并且一般认为随后的再生过程是通过成熟肝细胞的增殖实现的^[18],尚无迹象表明干细胞参与这一过程。虽然也有研究发现肝再生过程中有一小部分新生肝细胞并不是来源于原有的肝细胞^[19],但是 PHx 后肝脏的再生能力相当惊人,因此普遍认为肝再生不需要任何干细胞/前体细胞参与^[20]。

虽然 PHx 是研究肝脏补偿性生长过程的优秀

模型,且现已提供了很多与活体供肝移植相关的信息,但这一模型并不能反映许多肝脏疾病中出现的病理状况。在慢性病毒性肝炎、酒精性肝病和非酒精性脂肪性肝病等许多病理条件下,肝脏中会出现独特的上皮细胞群;这些细胞通常不成熟,并且表现出介于肝细胞和胆管细胞之间的表型,根据形态学分析和分子标志物表达情况,它们被认为是具有双向分化潜能的细胞群体^[21]。这种细胞群已经有多个名称,如“非典型导管细胞”“中间肝胆细胞”或“肝脏前体细胞(HPC/LPC)”,而在啮齿动物模型中这些细胞通常被称为“卵圆细胞”^[22]。有研究者认为这些被肝脏疾病状态激活的多能细胞是肝干细胞,并且在一些研究中卵圆细胞也经常被当作肝干细胞的同义词^[23]。

自从 1956 年 Farber^[22]第 1 次提出卵圆细胞的概念以来,各种组织学研究均提示它们可能具有肝向和胆向分化能力。卵圆细胞通常出现在引起肝细胞增殖缺陷的肝损伤过程中^[23],目前用于诱导卵圆细胞的最成熟可靠的方案是大鼠 2-乙酰氨基苄(2-AAF)/PHx 模型,在这一模型中肝细胞的增殖被 2-AAF 阻断^[24]。由于在大鼠中缺乏谱系示踪手段(也没有准确的卵圆细胞标志物),学者们开始研究小鼠模型中的卵圆细胞是否具有干细胞活性;但 2-AAF/PHx 模型不适用于小鼠,因此一些其他的肝损伤模型也被用来诱导卵圆细胞增殖,其中 3,5-二乙酯基-1,4-二氢三甲基吡啶(DDC)饲料诱导的肝损伤模型^[25]和无胆碱乙硫氨酸饲料(CDE)诱导的肝损伤模型^[26]最为常用。但是这两种肝损伤模型抑制肝细胞增殖的能力均不如 2-AAF/PHx 模型,此外,这些小鼠模型的肝脏损伤机制与 2-AAF/PHx 大鼠模型也显著不同。DDC 诱导的损伤主要作用于胆管,是硬化性胆管炎和胆汁性纤维化的常用模型^[27];CDE 主要造成脂肪肝,有时也用作非酒精性脂肪性肝炎的模型。由于上述肝脏损伤模型的损伤机制和造成的肝损伤表型各不相同,并且随着对卵圆细胞增殖的进一步了解,目前普遍认为这些损伤模型诱导增殖的细胞并不完全相同。因此相对于“卵圆细胞”,将这些损伤模型诱导增殖的细胞统称为“LPC”可能更加合适。

4 LPC 的分子标志

在不同病理机制下大鼠、小鼠和人肝脏中激活

的 LPC 具有各自的特征,但是它们也表达一些共同的分子标志物,如 CK19、EpCAM 和 CD133^[12,28-29]。在小鼠中 Sox9、OPN 和 MIC1-1C3 抗原也被认为是 LPC 的标志物^[10,14,30-31]。通过流式细胞分选技术结合表面分子标志物(如 EpCAM、CD133 或 MIC1-1C3),可以将 LPC 分选出来并在体外培养,从而评估它们的增殖和分化能力。利用上述方法已经证明 LPC 中含有具有克隆形成能力的细胞,并且它们可以分化成肝细胞和胆管细胞;但使用相同的分子标志物分离出来的胆管细胞也具有双向分化潜能,因此需要寻找特定的分子标志物来区分胆管细胞和 LPC。有研究者发现 EpCAM 的旁系同源物 Trop2 (Tacstd2)在 DDC 诱导的损伤模型中仅在 LPC 中表达而在胆管细胞中不表达^[12],提示 Trop2 有可能作为 LPC 的特异性标志物,对 LPC 的进一步分离发挥重要作用。但是有关 Trop2⁺ 细胞的克隆形成能力、分化潜能和谱系示踪研究还未见报道。转录因子 Foxl1 被认为是另一种潜在的 LPC 特异性标志物,一项利用 Foxl1-Cre 示踪系统的研究发现在特定肝损伤情况下新生的肝细胞和胆管细胞都来源于 Foxl1⁺ 的 LPC^[32]。Lgr5 是肠道干细胞的特异性标志物,但是有研究者利用 Lgr5-LacZ 和 Lgr5-CreERT2 两种转基因小鼠构建肝脏损伤模型时发现肝损伤状态下激活的 LPC 也能表达 Lgr5,而且 Lgr5⁺ 细胞在体外 3D 培养条件下可以形成类器官^[33]。但 Lgr5⁺ 细胞与表达经典 LPC 标志物 CK19、EpCAM 的细胞之间是否有关联仍不清楚。此外,Foxl1 和 Lgr5 的相关研究都依赖于特定的转基因或基因敲入小鼠,且 Foxl1 和 Lgr5 在肝脏损伤前均不表达,因此不能用于预标记肝再生期间出现的细胞。

除了通过表型和分子标志物来寻找 LPC 外,有关 LPC 分子调节机制的研究发现一些关键信号分子也可能具有类似作用。与其他干细胞/前体细胞一样,LPC 也受 Wnt^[34]、Notch^[35] 和成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor,FGF)^[36] 等发育相关基因的调控;此外,肿瘤坏死因子 α (TNF- α),白介素 6(interleukin-6,IL-6)和 γ -干扰素(interferon- γ ,IFN- γ)等炎症细胞因子能够激活 LPC^[37-39],这与慢性肝损伤炎症反应激活 LPC 的现象一致。其中 TNF 相关的细胞凋亡诱导剂(TWEAK)和 FGF7

因能诱导激活 LPC 而最受关注。研究发现,不管肝脏损伤与否,在正常肝脏中强制表达上述任一种细胞因子都能引起 LPC 的激活和扩增^[36,40],表明 LPC 受这些胞外信号的调控。此外,肝细胞生长因子(HGF)和表皮细胞生长因子(EGF)等生长因子也参与调节 LPC 的增殖和分化^[41],这些因子可能通过增强器官内固有细胞的再生能力在肝脏疾病的治疗策略中发挥潜在的应用价值。综上,LPC 的相关研究尽管已经取得一定成效,仍需要更独特、更通用的特异性分子标志和遗传工具来进行进一步研究。

5 LPC 的起源位置

LPC 只有在肝脏损伤情况下才出现,因此其在肝脏中的来源备受关注。基于对大鼠卵圆细胞的组织学分析,长期以来一直认为连接胆小管与小叶间胆管的结构 Hering 管是 LPC 的起源位置^[42],这一理论也与 LPC 总是先在门管区出现的事实相符。此外,Hering 管的解剖学位置处于肝细胞和胆管细胞之间,因此此处存在有双向分化潜能的 LPC 也非常合理。目前,Hering 管是 LPC 起源位置的理论已被广泛认可,并且有不少研究者将 Hering 管称为“肝干细胞巢”,但是由于缺乏特异性标志物,这些理论并没有实验证据,有待进一步研究证实。

6 肝细胞系编程和重编程

随着对肝脏发育机制的深入研究,细胞编程和重编程技术日益成熟,它们不仅能在体外诱导胚胎干细胞(ESC)肝向分化重现肝脏发育过程,也能将非干性细胞重编程为多能干细胞。

肝移植是目前终末期肝病唯一的有效治疗手段,供体肝脏缺乏是其面临的主要问题。肝细胞移植或者由功能性肝细胞组成的生物人工肝移植被认为是可行的替代方案,但这两种方案都需要大量的肝细胞。从成体肝脏中分离肝细胞是相对简单的肝细胞获取方法,但是分离出来的肝细胞在体外培养过程中会迅速失去功能活性;ESC 肝向分化也可用于获取肝细胞,但相对比较困难。随着对肝脏发育过程的深入了解,将 ESC 诱导分化成为肝细胞已经成为可能。在单层培养物中使用活化素 A(activin A)诱导 ESC 成为定形内胚层,加入骨形成蛋白 4(bone morphogenetic protein 4,BMP4)和 FGF2 诱

导其肝向分化,之后再加入 HGF 诱导分化成为未成熟肝细胞,最后加入抑瘤素 M (oncostatin-M, OSM) 生成成熟肝细胞^[43]。将人胚胎干细胞 (hESC) 分化得到的肝细胞与环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 聚合培养,能得到大量功能性的肝细胞^[44],这些细胞可用于肝细胞移植或者生物人工肝的建造。

通过与细胞因子孵育培养,非肝细胞谱系的细胞也能重编程产生肝细胞样的细胞。人骨髓中的间充质细胞^[45]和脂肪组织中的 CD105⁺ 间充质细胞^[46]与细胞因子 FGF、HGF、OSM 和地塞米松 (dexamethasone, Dex) 孵育培养均能重编程产生肝细胞样的细胞。通过组合表达转录因子 GATA4、HNF1A 和 FOXA3,小鼠成纤维细胞也能被重编程为肝细胞,这些重编程得到的细胞被称为 iHep 细胞,它们与肝细胞非常相似,并且能表达肝细胞特异基因,将 iHep 细胞移植到 Fah^{-/-} 小鼠中能够重建肝脏并且拯救致死表型^[47]。通过表达 FOXA3、HNF1A 和 HNF4A^[48] 或 HNF1A、HNF4A、HNF6、ATF1、PROX1 和 CEBPA^[49],人成纤维细胞均能重编程为具有代谢功能的肝细胞。而这些通过不同的重编程技术所得到的肝细胞也具有不同的特征,尚需要通过对重编程潜在机制的深入研究来进行进一步改进。直接重编程可通过诱导表达 HNF1B 和 FOXA3 将小鼠胚胎成纤维细胞重编程为肝母细胞样细胞,该细胞也被称为诱导肝干细胞 (iHepSC) ^[50]。iHepSC 在体内外都能进行胆向分化,也可用于生产功能性肝细胞。研究发现,诱导表达 OCT3/4、SOX2、KLF4 和 MYC 可将人尿液中的肾小管上皮脱落细胞重编程为诱导多能干细胞 (iPSC)^[51],并且在适当条件下能分化为肝细胞样细胞。虽然从多能干细胞中或通过重编程体细胞产生功能性肝细胞或前体细胞目前已有众多研究,但是临床上在使用这些细胞之前仍需对它们的终末分化情况进行深入研究。

随着诱导多能干细胞技术的发展,现已建立了多种遗传疾病模型。Rashid 等^[52]将 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶缺乏症、家族性高胆固醇血症和糖原贮积病患者的体细胞重编程为多能干细胞,并将得到的多能干细胞诱导分化为具有 iPSC 来源患者病理特征的肝细胞。此外,对 iPSC 中的 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶基因缺陷进

行校正后再诱导分化得到的肝细胞具有完整的 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶^[53]。这些模型的建立为遗传疾病的治疗提供了新思路。

肝细胞的发育和分化需要内皮细胞、间充质细胞等各种非实质细胞的支持,ESC/iPSC 肝向分化得到的肝细胞与这些细胞共培养可使其功能更完善。Takebe 等^[54]将人 iPSC 衍生的肝特异性定形内胚层细胞与人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 和间充质细胞共同培养形成 3D 细胞团,结果发现细胞团中的肝细胞能表达多种肝脏酶类;细胞团被移植到毒素损伤小鼠模型中后能够发生血管化并表达肝蛋白,提高了小鼠的存活率,表明体外发育的细胞团可以被认为是肝脏类器官。然而,细胞团并不能重建完整的肝脏或表现出长期肝脏功能,它们分化为胆管细胞形成胆汁结构的能力也有待证明。Goldman 等^[6]报道了一个有趣的现象,他们发现 hESC 分化而来的内胚层细胞不表达 KDR,但在支持肝向分化的培养基中培养后能产生 KDR⁺ 的肝前体细胞和 KDR⁻ 的肝细胞。总之,上述研究表明在 iPSC 肝向分化过程中加入支持细胞能够得到功能更加全面的肝细胞。

7 小 结

肝细胞和胆管细胞都起源于肝干细胞,在胎肝、成体肝脏和病理条件下的肝脏中都发现了干性细胞存在。但是,若以能够在体内持续自我更新和双向分化为标准,这些干性细胞能否被称为干细胞仍有待商榷。在正常成人肝脏中,是否存在自我更新的肝干细胞也有待证明。在损伤或部分切除后再生的肝脏中,门管区增殖的细胞定义为前体细胞更为合适,因为缺乏它们在体内双向分化的证据。肝干细胞的定义和鉴定策略之间目前仍存在巨大差异,在阅读“肝干细胞”相关文献结果时,应该极其小心并仔细考虑,分析在不同研究中这些细胞因定义不同而产生的变化特征。

[参 考 文 献]

- [1] WILSON J W, LEDUC E H. Role of cholangioles in restoration of the liver of the mouse after dietary injury [J]. J Pathol Bacteriol, 1958, 76: 441-449.
- [2] TANIMIZU N, MIYAJIMA A. Notch signaling

- controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117: 3165-3174.
- [3] STRICK-MARCHAND H, WEISS M C. Inducible differentiation and morphogenesis of bipotential liver cell lines from wild-type mouse embryos [J]. *Hepatology*, 2002, 36: 794-804.
- [4] DAN Y Y, RIEHLE K J, LAZARO C, TEOH N, HAQUE J, CAMPBELL J S, et al. Isolation of multipotent progenitor cells from human fetal liver capable of differentiating into liver and mesenchymal lineages[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 9912-9917.
- [5] SCHMELZER E, ZHANG L, BRUCE A, WAUTHIER E, LUDLOW J, YAO H L, et al. Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors[J]. *J Exp Med*, 2007, 204: 1973-1987.
- [6] GOLDMAN O, HAN S, SOURISSEAU M, DZIEDZIC N, HAMOU W, CORNEO B, et al. KDR identifies a conserved human and murine hepatic progenitor and instructs early liver development[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 12: 748-760.
- [7] MAGAMI Y, AZUMA T, INOKUCHI H, KOKUNO S, MORIYASU F, KAWAI K, et al. Cell proliferation and renewal of normal hepatocytes and bile duct cells in adult mouse liver[J]. *Liver*, 2002, 22: 419-425.
- [8] ZAJICEK G, OREN R, WEINREB M Jr. The streaming liver[J]. *Liver*, 1985, 5: 293-300.
- [9] FURUYAMA K, KAWAGUCHI Y, AKIYAMA H, HORIGUCHI M, KODAMA S, KUHARA T, et al. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine[J]. *Nat Genet*, 2011, 43: 34-41.
- [10] CARPENTIER R, SUÑER R E, VAN HUL N, KOPP J L, BEAUDRY J B, CORDI S, et al. Embryonic ductal plate cells give rise to cholangiocytes, periportal hepatocytes, and adult liver progenitor cells [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141: 1432-1438.
- [11] ESPANOL-SUÑER R, CARPENTIER R, VAN HUL N, LEGRY V, ACHOURI Y, CORDI S, et al. Liver progenitor cells yield functional hepatocytes in response to chronic liver injury in mice[J]. *Gastroenterology*, 2012, 143: 1564-1575.
- [12] OKABE M, TSUKAHARA Y, TANAKA M, SUZUKI K, SAITO S, KAMIYA Y, et al. Potential hepatic stem cells reside in EpCAM⁺ cells of normal and injured mouse liver[J]. *Development*, 2009, 136: 1951-1960.
- [13] KAMIYA A, KAKINUMA S, YAMAZAKI Y, NAKAUCHI H. Enrichment and clonal culture of progenitor cells during mouse postnatal liver development in mice [J]. *Gastroenterology*, 2009, 137: 1114-1126.
- [14] DORRELL C, ERKER L, SCHUG J, KOPP J L, CANADAY P S, FOX A J, et al. Prospective isolation of a bipotential clonogenic liver progenitor cell in adult mice[J]. *Genes Dev*, 2011, 25: 1193-1203.
- [15] CARPINO G, CARDINALE V, ONORI P, FRANCHITTO A, BERLOCO P B, ROSSI M, et al. Biliary tree stem/progenitor cells in glands of extrahepatic and intrahepatic bile ducts: an anatomical *in situ* study yielding evidence of maturational lineages [J]. *J Anat*, 2012, 220: 186-199.
- [16] DIPAOLO F, SHIVAKUMAR P, PFISTER J, WALTERS S, SABL A G, BEZERRA J A. Identification of intramural epithelial networks linked to peribiliary glands that express progenitor cell markers and proliferate after injury in mice [J]. *Hepatology*, 2013, 58: 1486-1496.
- [17] ALISON M R, LIN W R. Diverse routes to liver regeneration[J]. *J Pathol*, 2016, 238: 371-374.
- [18] MIYAOKA Y, EBATO K, KATO H, ARAKAWA S, SHIMIZU S, MIYAJIMA A. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration [J]. *Curr Biol*, 2012, 22: 1166-1175.
- [19] IVERSON S V, COMSTOCK K M, KUNDERT J A, SCHMIDT E E. Contributions of new hepatocyte lineages to liver growth, maintenance, and regeneration in mice[J]. *Hepatology*, 2011, 54: 655-663.
- [20] YANGER K, KNIGIN D, ZONG Y, MAGGS L, GU G, AKIYAMA H, et al. Adult hepatocytes are generated by self-duplication rather than stem cell differentiation[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15: 340-349.
- [21] ROSKAMS T A, LIBBRECHT L, DESMET V J. Progenitor cells in diseased human liver [J]. *Semin Liver Dis*, 2003, 23: 385-396.

- [22] FARBER E. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene[J]. *Cancer Res*, 1956, 16: 142-148.
- [23] FAUSTO N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells [J]. *Hepatology*, 2004, 39: 1477-1487.
- [24] EVARTS R P, NAGY P, MARSDEN E, THORGEIRSSON S S. A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver[J]. *Carcinogenesis*, 1987, 8: 1737-1740.
- [25] PREISEGGER K H, FACTOR V M, FUCHSBICHLER A, STUMPTNER C, DENK H, THORGEIRSSON S S. Atypical ductular proliferation and its inhibition by transforming growth factor beta1 in the 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine mouse model for chronic alcoholic liver disease [J]. *Lab Invest*, 1999, 79: 103-109.
- [26] AKHURST B, CROAGER E J, FARLEY-ROCHE C A, ONG J K, DUMBLE M L, KNIGHT B, et al. A modified choline-deficient, ethionine-supplemented diet protocol effectively induces oval cells in mouse liver [J]. *Hepatology*, 2001, 34: 519-522.
- [27] FICKERT P, STÖGER U, FUCHSBICHLER A, MOUSTAFA T, MARSCHALL H U, WEIGLEIN A H, et al. A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis [J]. *Am J Pathol*, 2007, 171: 525-536.
- [28] SUZUKI A, SEKIYA S, ONISHI M, OSHIMA N, KIYONARI H, NAKAUCHI H, et al. Flow cytometric isolation and clonal identification of self-renewing bipotent hepatic progenitor cells in adult mouse liver [J]. *Hepatology*, 2008, 48: 1964-1978.
- [29] YOVCHEV M I, GROZDANOV P N, JOSEPH B, GUPTA S, DABEVA M D. Novel hepatic progenitor cell surface markers in the adult rat liver [J]. *Hepatology*, 2007, 45: 139-149.
- [30] DORRELL C, ERKER L, LANXON-COOKSON K M, ABRAHAM S L, VICTOROFF T, RO S, et al. Surface markers for the murine oval cell response [J]. *Hepatology*, 2008, 48: 1282-1291.
- [31] MATSUO A, YOSHIDA T, YASUKAWA T, MIKI R, KUME K, KUME S. Epiplakin1 is expressed in the cholangiocyte lineage cells in normal liver and adult progenitor cells in injured liver [J]. *Gene Expr Patterns*, 2011, 11(3/4): 255-262.
- [32] SACKETT S D, LI Z, HURTT R, GAO Y, WELLS R G, BRONDELL K, et al. Foxl1 is a marker of bipotent hepatic progenitor cells in mice [J]. *Hepatology*, 2009, 49: 920-929.
- [33] HUCH M, DORRELL C, BOJ S F, VAN ES J H, LI V S, VAN DE WETERING M, et al. *In vitro* expansion of single Lgr5⁺ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration [J]. *Nature*, 2013, 494: 247-250.
- [34] APTE U, THOMPSON M D, CUI S, LIU B, CIEPLY B, MONGA S P. Wnt/ β -catenin signaling mediates oval cell response in rodents [J]. *Hepatology*, 2008, 47: 288-295.
- [35] KITADE M, FACTOR V M, ANDERSEN J B, TOMOKUNI A, KAJI K, AKITA H, et al. Specific fate decisions in adult hepatic progenitor cells driven by MET and EGFR signaling [J]. *Genes Dev*, 2013, 27: 1706-1717.
- [36] TAKASE H M, ITOH T, INO S, WANG T, KOJI T, AKIRA S, et al. FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration [J]. *Genes Dev*, 2013, 27: 169-181.
- [37] AKHURST B, MATTHEWS V, HUSK K, SMYTH M J, ABRAHAM L J, YEOH G C. Differential lymphotoxin- β and interferon γ signaling during mouse liver regeneration induced by chronic and acute injury [J]. *Hepatology*, 2005, 41: 327-335.
- [38] KNIGHT B, YEOH G C, HUSK K L, LY T, ABRAHAM L J, YU C, et al. Impaired preneoplastic changes and liver tumor formation in tumor necrosis factor receptor type 1 knockout mice [J]. *J Exp Med*, 2000, 192: 1809-1818.
- [39] YEOH G C, ERNST M, ROSE-JOHN S, AKHURST B, PAYNE C, LONG S, et al. Opposing roles of gp130-mediated STAT-3 and ERK-1/2 signaling in liver progenitor cell migration and proliferation [J]. *Hepatology*, 2007, 45: 486-494.
- [40] JAKUBOWSKI A, AMBROSE C, PARR M, LINCECUM J M, WANG M Z, ZHENG T S, et al. TWEAK induces liver progenitor cell proliferation [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115: 2330-2340.
- [41] ISHIKAWA T, FACTOR V M, MARQUARDT J U,

- RAGGI C, SEO D, KITADE M, et al. Hepatocyte growth factor/c-met signaling is required for stem-cell-mediated liver regeneration in mice[J]. *Hepatology*, 2012, 55: 1215-1226.
- [42] PAKU S, SCHNUR J, NAGY P, THORGEIRSSON S S. Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver[J]. *Am J Pathol*, 2001, 158: 1313-1323.
- [43] SI-TAYEB K, NOTO F K, NAGAOKA M, LI J, BATTLE M A, DURIS C, et al. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells[J]. *Hepatology*, 2010, 51: 297-305.
- [44] 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.
- [45] LEE K D, KUO T K, WHANG-PENG J, CHUNG Y F, LIN C T, CHOU S H, et al. *In vitro* hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. *Hepatology*, 2004, 40: 1275-1284.
- [46] BANAS A, TERATANI T, YAMAMOTO Y, TOKUHARA M, TAKESHITA F, QUINN G, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes[J]. *Hepatology*, 2007, 46: 219-228.
- [47] HUANG P, HE Z, JI S, SUN H, XIANG D, LIU C, et al. Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors [J]. *Nature*, 2011, 475: 386-389.
- [48] HUANG P, ZHANG L, GAO Y, HE Z, YAO D, WU Z, et al. Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable hepatocytes [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 370-384.
- [49] DU Y, WANG J, JIA J, SONG N, XIANG C, XU J, et al. Human hepatocytes with drug metabolic function induced from fibroblasts by lineage reprogramming[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 394-403.
- [50] YU B, HE Z Y, YOU P, HAN Q W, XIANG D, CHEN F, et al. Reprogramming fibroblasts into bipotential hepatic stem cells by defined factors [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13: 328-340.
- [51] SAUER V, TCHAIKOVSKAYA T, WANG X, LI Y, ZHANG W, TAR K, et al. Human urinary epithelial cells as a source of engraftable hepatocyte-like cells using stem cell technology[J]. *Cell Transplant*, 2016, 25: 2221-2243.
- [52] RASHID S T, CORBINEAU S, HANNAN N, MARCINIAK S J, MIRANDA E, ALEXANDER G, et al. Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120: 3127-3136.
- [53] YUSA K, RASHID S T, STRICK-MARCHAND H, VARELA I, LIU P Q, PASCHON D E, et al. Targeted gene correction of α 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2011, 478: 391-394.
- [54] TAKEBE T, SEKINE K, ENOMURA M, KOIKE H, KIMURA M, OGAERI T, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant[J]. *Nature*, 2013, 499: 481-484.

[本文编辑] 曾奇峰