

干细胞与肝脏功能重建的研究现状与展望

潘兴华, 庞荣清, 张步振

潘兴华, 庞荣清, 张步振, 成都军区昆明总医院医学实验科
云南省昆明市 650032

潘兴华, 男, 1963-12-23 生, 云南宣威市人, 汉族, 原第一军医大学医学博士, 中山大学博士后, 现为成都军区昆明总医院副主任医师, 硕士生导师, 《世界华人消化杂志》编委, 主要从事成体干细胞的临床应用相关研究。

国家自然科学基金资助, No. 30270674

云南省自然科学基金重点项目资助, No. 2003C013Z

通讯作者: 潘兴华, 650032, 云南省昆明市大观路 212 号, 成都军区昆明总医院医学实验科, Xinghuapan@yahoo.com.cn

电话: 0871-5413564 传真: 0871-4074773

收稿日期: 2005-01-21 接受日期: 2005-02-26

摘要

肝细胞再生或替代是以肝细胞变性、坏死和慢性肝纤维化、肝硬化为代表的肝病治疗的根本出路。肝细胞本身有较强的再生修复能力, 在残存肝细胞功能正常时可以快速分裂增生并修复损伤, 但这一机制对临床常见的肝损伤修复难以达到理想目标。现有研究显示肝组织中存在干细胞并参与了肝细胞再生和肝损伤的修复, 骨髓、胚胎等多种来源的干细胞也具有向肝细胞分化的潜能, 这些结果显示了从干细胞的角度探讨肝细胞再生机制及再生肝脏功能的可行性和重要性。干细胞的研究将对肝脏的发育与再生、肝脏疾病的细胞治疗和人工肝组织工程等技术的发展起推动作用, 最终将为临床肝病治疗提供全新的措施。本文对肝细胞和不同来源干细胞与肝细胞再生的关系作简要综述和分析。

关键词: 肝细胞; 肝脏; 再生

潘兴华, 庞荣清, 张步振. 干细胞与肝脏功能重建的研究现状与展望. 世界华人消化杂志 2005;13(7):823-830

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/823.asp>

0 引言

肝脏是一个结构与功能相对复杂、再生能力极强的器官, 即使切除 2/3 的肝组织, 数周之内肝脏可再生并恢复到正常水平^[1-2]。肝脏的大小和体积也受到严格控制并与个体的大小相适应, 若将体积较小者的肝脏移植到体积较大者体内后, 其大小可长到与受者相适应的体积^[3-4]。估计正常肝脏可耐受 80-90% 肝组织切除, 一个正常肝脏的细胞至少具有再生 50 个相同大小的肝脏的能力^[5]。但是, 在临床上常见的肝损伤并不是创伤或肝组织切除, 而是病毒感染、中毒等因素导致的大量肝细胞(hepatic cells, HC)变性、坏死, 随后发展为慢性肝纤维化、肝硬化等, 最终导致 HC 的再生能力丧失, 病程难以逆转。对于这类肝病, 药

物治疗难以恢复肝脏的结构与功能, 只有肝脏移植是一种彻底解决方案。由于器官供源短缺、免疫排斥、伦理、治疗费用昂贵等问题, 只有极少数患者接受肝移植^[6]。最近几年, 关于干细胞(stem cells, SC)的研究发现肝组织中存在有肝再生的种子细胞, 即肝干细胞(hepatic stem cells, HSC), 这些细胞在一定的条件下, 可以增生分化为肝细胞^[7]。另外, 从骨髓、胰腺、胚胎等组织获得的 SC 也具有向 HC 转化的潜能^[8-9]。这些研究结果提示, 从 SC 的角度可能寻找到 HC 再生的理想途径。特别是从自体骨髓组织获得的 SC 有向 HC 转化的潜能, 移植到肝损伤的动物体内可以改善肝脏功能, 可能替代肝移植而使 HC 再生。从体细胞克隆途径培育胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC), 进而诱导向 HC 分化后用于肝病治疗, 可望为肝病治疗带来新的春天。

1 肝细胞与肝再生

肝脏最初起源于胚胎时期内胚层的腹侧前肠与原始横膈, 随后在生心中胚层及其分泌的成纤维细胞生长因子的作用下, 启动肝特异性基因表达, 分化形成表达肝特异性基因 AFP 与白蛋白的成肝细胞(hepatoblast)。这种细胞具有分化为 HC 与胆管上皮细胞的双向潜能, 认为是胚胎时期原始的肝干/祖细胞。随后, 成肝细胞增生并以索状方式穿入原始横膈, 形成肝原基。横膈组织中的间充质细胞对成肝细胞的直接支持和诱导作用决定着哪些细胞将分化成肝细胞或胆管上皮细胞和帘式内皮膜。胚胎肝脏开始形成时其内富含成簇的胎肝细胞, 到出生时 HC 的胚胎标志如 AFP 消失, 出生后肝脏的代谢功能区逐步呈现明显的区带化^[10]。HC 分化成熟后一般处于静止状态, 但 HC 也存在生理性凋亡和被激活增生机制^[11]。

成年肝脏中高度分化的 HC 仍具有生长、分裂、再分化及再生肝脏的潜能^[12]。正常肝组织大约每年更新一次, 认为这主要是通过成熟肝细胞的增生完成此更新过程的^[13]。诱导 HC 再生的因素包括部分肝组织切除或肝创伤等。HC 再生肝脏的前提是受损肝脏的残存 HC 处于静止状态且未受严重损害, 否则这一再生途径难以实现^[14]。肝脏的再生可分为数个阶段, 主要取决于众多的影响因素及其瀑布效应。成人或动物的 HC 很

少分裂,一般处于G0期,成人肝脏仅有千分之一的细胞会发生有丝分裂.部分肝组织切除后,几乎所有HC都进入G1期,12-15 h后进入S期(DNA合成期),再经6-8 h进入G2期和M期(有丝分裂期).大鼠的肝脏可以在肝切除后48 h倍增,非HC的复制可延迟在24 h后开始^[15].在再生起始阶段,大多数HC至少复制一次,当恢复到原肝大小后,HC即转入G0期.HC的分裂由一系列基因控制,在肝切除早期,一些原癌基因被激活,启动HC的分裂过程,这一阶段容易被逆转.启动数小时后,需要有蛋白合成的基因进行调控,如p53等^[16].一些细胞因子在HC分裂增生中起重要作用,部分肝切除数分钟内非肝实质细胞即释放TNF- α 、IL-1、IL-6等细胞因子^[17-20].TNF- α 可诱导多种细胞因子产生,IL-6可激发HC由G0期进入G1期并参与进一步的复制过程.肝切除后的再生依赖于有足够的残余肝,80%肝切除的再生比率低于70%肝切除^[21],暴发性肝炎患者HC体积少于12%者有较高的死亡率^[22].由于药物或病毒引起80%以上HC损害的患者若得以存活的话,可以达到完全的肝脏再生^[23].大鼠部分肝切除后2 wk,被切除的肝脏就通过HC的增生被修复,并且在术后的早期就在门脉周围出现了HC的增生^[24].小鼠的成熟肝细胞连续性的肝移植结果表明,这些细胞至少可被分裂69次,且保持其功能,说明成熟肝细胞具有高度再生潜能^[25].

2 肝干细胞与肝再生

成熟HC的分裂增生能力有限,在严重肝损伤时,HC的更新换代需要SC参与.已经证实成年肝组织中有HSC的存在并参与了肝损伤的修复与再生.在生理条件下HSC更新HC及其调控机制尚不太清楚,但有证据显示,在正常成年HC更新过程中有低水平、基础状态的HSC参与分化.在胚胎发育过程中,HSC主要以成干细胞的形式存在,而在成年组织则以卵圆细胞(hepatic oval cell, HOC)和小肝细胞(small hepatocyte-like progenitor cells, SHPC)的形式存在.

2.1 肝卵圆细胞

Wilson *et al*于1958年最早提出肝脏中存在具有多向分化潜能和自我复制功能的未分化细胞^[26].之后,人们通过动物体内外实验证实了HOC存在的事实,并认定了SHC的存在部位、表型特征和向HC分化的部分机制.现在普遍认同HOC是肝祖细胞(hepatic progenitor cell)或SHC,其特点是直径较小(约10-12 μm),核浆比例高,核呈卵圆形,HOC沿整个肝胆管树分布,呈分枝管状排列,而到达肝实质后可单个或成簇存在,但主要分布于小叶间胆管与Hering小管,他表达许多HC与胆管上皮的标志(表1),此外还表达造血细胞的表面标志CD34、c-kit、Thy-

1、Flt-3R等.HOC在体外可克隆化生长,并具有分化为HC与胆管上皮的双向潜能^[27-28].HOC来源于肝脏发生、发育过程中保留下来的胚胎样细胞,也有报道认为骨髓干细胞经血液循环进入肝脏后分化为HOC^[29-30].根据HOC的形态与分布特征可将其分为3型:I型为原始细胞,位于肝窦和门管区周围,呈卵圆形,细胞间彼此相连;II型为胆管样细胞,主要位于胆管结构中,呈圆形或卵圆形,与相邻的胆管上皮细胞有桥粒连接;III型为HC样细胞,位于肝窦和肝索内,呈圆形或不规则形,与邻近的HC之间有紧密的桥粒连接.在接触致癌物质或门静脉旁损伤后1-2 d,门静脉内可出现更为原始的0型细胞,他可能是循环的多能干细胞.在多种损伤应答模型中,一般是0型与I型细胞最先出现,其后才见II型或III型细胞,推测后二者是由前二者产生.II型细胞分化成胆管细胞,III型细胞分化成HC.在重度肝损伤,特别是大量HC变性、坏死时,残存HC的分裂增生能力受挫,而定居在小叶间胆管周围和Hering管的未完全分化细胞大量增生和向HC分化,因此认为这类细胞是肝再生的种子细胞^[31].Coleman *et al*观察到HOC从汇管区增生并转入肝实质细胞中,在肝损伤的动物模型肝脏中发现HOC在体内分化为HC和胆管上皮细胞,体外培养也证实了HOC的双向分化潜能.

表1 几种肝细胞的表型特征

标志物	成肝细胞	卵圆细胞	小肝细胞	肝实质细胞	胆管上皮细胞
ALB	+	+/-	+	+	-
AFP	+	+	+/-	-	-
CK7	-	+	-	-	+
CK8	+	+	+	+	+
CK18	+	+	+	+	+
CK19	+	+	-	-	+
CK14	+/-	+/-	-	-	-
GGT	+	+	-	-	+
α 1-AT	-		-	+	-
OV6	+/-	+		-	+
BD1	-	-	-	-	+
OC2	+	+	+/-	-	+
OC3		+		-	-
Vimentin		+		-	+

2.2 小肝细胞

SHPC是在HC与非实质细胞混合培养时发现有一类体积较小的HC,其形态与成熟肝细胞类似,但体积较小,约16-28 μm .SHPC在体外有强大的克隆化增生能力,单个细胞克隆在10 d左右即可倍增100倍,其表达成熟肝细胞的一些标志如白蛋白、CK8、CK18和转铁蛋白,而不表达胆管上皮细胞标志如CK7、

CK19 和 BD1, 但体外进一步分化后可终止表达 HC 表型, 转而表达胆管上皮细胞表型, 表明 SHPC 在体外也具有分化为 HC 与胆管上皮细胞的双向潜能^[32-33]. 用肝特异的长效 DNA 合成抑制剂倒千里光碱(Retrorsine)抑制大鼠成熟 HC、HOC 的生长, 然后实施 2/3 肝切除术, 结果在肝板内发现大量增生的 SHPC, 表明 SHPC 不受倒千里光碱的生长抑制影响^[34]; 通过免疫组化和激光捕获显微切割系统(LCM)从切片中直接捕获 SHPC 进行 RT-PCR 鉴定, 结果显示 SHPC 同时具有成肝细胞、HOC 和 HC 的部分表型与核型(表 1), 是一种完全不同的细胞类型^[35]. 依据胚胎的肝细胞发育过程和 SHPC 的表型与核型特征推测, SHPC 的谱系定位可能介于成肝细胞与胎肝细胞之间. 在胚胎发育晚期, 成肝细胞首先分化为 SHPC, 然后在细胞外基质及相关因子作用下分化成熟, 而在成年肝脏中, 先分化为 SHPC 后再进一步分化为成熟的 HC. 因此, SHPC 可能是 HC 的专能定向祖细胞.

2.3 肝干细胞的动员与活化 HSC 的活化需要有肝实质性的损害、肝再生需求和残存肝细胞的分裂增生受阻. 诱导 HSC 动员与活化的常见动物模型是用部分肝切除、化学药物、肝切除 + 化学药物以及肝组织置换等方法造成肝损伤模型. 在啮齿类动物模型研究中, 这些诱导肝损伤的方式均能增强 SHC 的应答与增生反应. 常用的化学药物有: D- 半乳糖胺(D-Ga1N)、CCl₄、2-乙酰氨基苄(2-AAF)、呋喃(furan)、丙基乙醇、甲基亚硝基氨(DEN)、倒千里光碱等^[36-37]. 这些模型各有其特点, 2/3 肝组织切除后, 残余的肝组织未受损害, 剩余 HC 仍保持旺盛的分裂增生能力, 细胞的增生反应以 HC 为主, HC 可快速分裂增生可以在无 SHC 动员的情况下恢复^[38]. 肝组织切除并用化学药物抑制 HC 增生或严重化学药物损伤模型, 则需要动员肝的增生分化. 在肝炎或 CCl₄ 损害的 HC 是弥漫性的, 若肝脏的结构被破坏, 则容易导致肝纤维化^[39]. 如果用化学药物抑制全 HC 生长, 则诱导以 SHPC 的增生反应为主^[40].

多种细胞因子参与 SHC 的调控, 其中包括肝细胞生长因子(HGF), 转化生长因子- α (TGF- α)、表皮生长因子(EGF)、酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)、转化生长因子 β (TGF- β)、干细胞因子(SCF)、尿激酶纤溶酶原活化因子(uPA)、白血病抑制因子(LIF)、溶血磷脂酸(PLA)等^[41-43]. HGF, TGF- α , EGF, aFGF 是一组参与正常肝再生的细胞因子, 在活化、增生及分化的全过程中持续高表达, 在体外实验中有促 HC 增生的作用. HGF 是一种促 HC 有丝分裂因子, 通过自分泌及旁分泌机制发挥效应, 能激活肝脏干细胞, 促进有丝分裂及增生及迁移. EGF, TGF- α 也是促有丝分

裂因子, 能促进 SHC 的增生与分化. TGF- β 在 HC 再生中抑制小鼠系的有丝分裂, 当肝脏干细胞代偿的肝再生完成时, TGF- β 则发挥抑制 HC 过度增生的作用. SCF 在 HSC 活化及增生过程中的表达, 促进的增生及分化, 但促 HOC 增生的作用甚微. SCF 可使 HGF 活化和降解胆小管周围的基膜, 促进胆小管上的 HOC 进入 DNA 合成期, 并产生其活化产物. LIF 的作用是抑制 SHC 的分化且维持其增生能力, SCF 与 LIF 对 HOC 的活化、增生具有协同增效作用. PLA 对 HSC 的活化、迁移、增生及分化也具有调节作用. 在 HOC 增生及分化过程中特异表达的基因还有 γ 干扰素受体 α (IFN- γ R α)、IL-1 β 、淋巴细胞功能相关抗原 1(LFA-1)、真核启动因子-2 相关蛋白、AFP 等.

3 非肝源性干细胞与肝再生

3.1 胚胎干细胞向肝细胞分化 体外分离培养的 ESC 可以被诱导分化为包括 HC 在内的所有类型的功能细胞. 在体外培养条件下, ESC 在未添加生长因子情况下能表达内胚层特异性基因, 如 AFP、甲状腺转运蛋白、 α 1-抗胰蛋白酶(α 1-AT)及白蛋白; 而在添加生长因子情况下能表达 HC 后期分化标志, 如酪氨酸转氨酶(TAT)及葡萄糖-6-磷酸酶(G6P)等^[44]. 将核因子 HNF-3 β 基因转入 ESC 并在含 FGF-2 的三维培养系统中可诱导 ESC 细胞定向分化为 HC^[45]. 体内实验也显示了 ESC 分化为 HC 的潜能. Yamada *et al* 和 Yin *et al* 分别从胚胎体(embryoid bodies, EBs)中分离 AFP 阳性细胞, 移植入肝再生模型小鼠肝内, 结果均分化出 ESC 来源的 HC^[46-47]. Chinzei *et al* 和 Choi *et al* 则直接将 EB 细胞移植入肝再生模型小鼠的肝内和脾内, 也成功分化出 HC^[48]. Rambhatla *et al* 用含丁酸盐、HGF、EGF、DMSO 等因子的培养体系可诱导 ESC 高效地向 HC 定向分化. 还有人采用含 HGF、FGF-2、EGF 等的培养体系获得 ESC 来源的类 HC. 这些研究表明, 在体外条件下, 某些化学物质、细胞因子以及 HC 相关基因转移均可诱导 ESC 分化为 HC 样细胞, 而体内肝组织中的微环境则可直接诱导 ESC 向 HC 分化.

3.2 骨髓干细胞向肝细胞分化 目前认为, 骨髓是成体中干细胞含量最丰富的组织, 其中包括造血干细胞和间充质干细胞(marrow mesenchymal stem cell, MMSC), 最近还发现了多种不同表型、分化潜能更大的骨髓干细胞(marrow stem cell, MSC). 通过体外诱导培养和体内肝移植、骨髓移植等系列方法, 证明骨髓组织中的多种干细胞均具有向 HC 转化的潜能, 虽然还不十分了解 MSC 向 HC 转化的详细机制, 但这类干细胞对肝再生具有重大意义.

3.2.1 骨髓移植 造血和成肝过程有许多相似的特征,

胚胎造血干细胞最早出现于卵黄囊, 先移行于肝脏, 最后才定居于骨髓, 造血干细胞和HSC之间有许多共同的特性, 例如共同表达C-kit, CD34, Thy-1, Flt-3 和 C-met 等, HGF 也可促进造血细胞生长, 因此推测HSC可能来源于造血干细胞. 动物实验中将雄性大鼠的骨髓植入经致死剂量照射的同系雌性大鼠及将DPPIV⁺ 雌性大鼠骨髓植入DPPIV⁻ 同系雌性大鼠, 发现了受者肝组织中有Y染色体及DPPIV⁺ 细胞^[49-50]. 在女性患者接受男性骨髓移植的肝组织中发现患者肝组织均见Y染色体阳性HC^[51]. 同样在骨髓移植患者的肝脏、皮肤、肠上皮等多种组织中均发现来源于供体的组织细胞^[52-53]. 在肝组织切除术后患者外周血中, CD34⁺ 细胞比例明显上升, 表明肝切除手术有动员MSC的作用, 其意义可能是补充肝源性干细胞的不足^[54]. 上述结果表明MSC具有强大的多向分化潜能, 可能在肝脏的微环境中诱导分化为HC. Lagasse *et al* 分选纯化骨髓多种表型细胞进行移植, 发现仅50-1000个纯化的c-kit^{high} Thy^{low} Lin⁻Sca-1⁺ 表型MSC (缩写为KTLS) 移植即可见肝再生结节, 表明KTLS是一种原始的HSC亚群^[55]. Theise *et al* 分离纯化非常原始且数量极少的HSC亚群, 移植至小鼠体内, 发现其可分化为十余种组织细胞^[56-57]. 在大多数骨髓移植与肝移植模型与患者中, 肝内异源性的HC一般不超过2-7%, 但Lagasse采用KTLS细胞和FAD⁻ 小鼠模型, 最多可达40%. 这说明细胞类型(越原始越好)与微环境对HSC在体内的分化效率是至关重要的. 有人用流式细胞仪分选富集Thy⁺CD3⁺CD45RA⁻ 的骨髓干细胞进行自体移植, 发现这种细胞在纤维化肝脏中表达白蛋白和ck8, 表明骨髓干细胞在肝纤维化形成环境中可以向HC定向分化^[56-58]. 还有人把从骨髓和脐血中分离出的C1qR(p)表型(CD45⁺CD38⁺CD34⁺)细胞移植入裸鼠, 其在肝脏内可分化为成熟肝细胞, 认为他可能是一种较为原始HSC亚群^[59-60].

3.2.2 肝移植 将不表达L21-6抗原的大鼠全肝植入表达L21-6抗原的Lewis大鼠, 并给予2-AAF和CCl₄活化并启动肝再生, 结果在受体肝内检测到了来源于供体的成熟肝细胞^[61]. 进一步研究发现, 转化HC主要源于lin⁻CD34⁺骨髓造血干细胞^[62]. 在接受女性肝脏移植的男性患者肝组织中均见Y染色体阳性HC^[51]. 这些研究表明有肝外循环干细胞向HC转化. Kleeberger *et al* 进行了肝移植患者HC及胆管细胞的嵌合分析, 发现肝移植后早期以胆管细胞嵌合体为主, 而后期以HC嵌合体为主, 提示肝外组细胞进入肝脏增多^[63].

3.2.3 体外诱导及移植 目前有在体外将骨髓来源的CD34⁺ 细胞、MMSC及更早期的干细胞亚群细胞诱导分化为肝细胞样细胞的报道, 部分实验还将诱导后的

细胞移植到体内认为具有HC的生物学功能. 主要报道有: (1)CD34⁺细胞: 脐血SC在体外可被诱导分化为表达白蛋白的肝样细胞, 移植到肝损伤的模型鼠体内, 可转变为功能性HC并分泌白蛋白. 纯化的骨髓造血干细胞与CCl₄损伤的肝组织共培养, 同样可以诱导向HC分化, 移植到肝损伤的小鼠体内后具有HC功能并修复肝脏损伤^[64]. Miyazaki *et al* 用HGF及EGF体外诱导培养骨髓干细胞并得到转化的肝细胞样细胞^[65]. 上述结果说明CD34⁺细胞通过转变为功能HC参与损伤肝的再生. 这些研究所培养出类肝系细胞可能不完全具备HC功能, 但对于进一步研究肝再生的调控机制具有重要意义. (2)ESC样细胞: Verfaillie发现骨髓中存在一种表达ESC表面标记Oct-4的多能成体祖细胞(multipotent adult progenitor cell, MAPC), 他可能是MSC和血管母细胞的共同谱系祖先^[66]. MAPC具有强大的自我更新能力, 在体外培养至第80-100代时, 仍具有很高的端粒酶活性. MAPC注入小鼠早期胚胎中可发育成嵌合体小鼠, 发现其可分化机体的大多数组织细胞, 说明MAPC的特征与ESC非常相似. 目前, 已在体外成功将MAPC诱导分化为HC、血管母细胞、内皮细胞、神经细胞、心肌细胞、骨与软骨细胞等. 采用FGF-4、HGF和细胞基质构成的培养体系已成功将人、小鼠和大鼠MAPC诱导分化为HC. (3) β_2 -m⁻/Thy-1⁺细胞: 在鼠的胎肝和淤胆肝脏及人增生肝组织和肝癌组织中发现有 β_2 -m⁻/Thy-1⁺细胞, 这种细胞能持续表达肝脏特异性基因和功能^[65]. 胆总管结扎大鼠骨髓中 β_2 -m⁻/Thy-1⁺细胞比例明显增多, 表明 β_2 -m⁻/Thy-1⁺细胞是骨髓对肝损伤发生应答的产物. 在淤胆血清、HGF、EGF和细胞外基质构成的培养体系中, β_2 -m⁻/Thy-1⁺细胞呈克隆化生长, 呈现肝细胞样形态, 表达白蛋白、AFP、CK8、CK18和P450, 糖原染色阳性, 并能够代谢尿素和氨. Aital *et al* 用HGF体外诱导培养由骨髓分离出来的 β_2 -m⁻/Thy-1⁺的细胞, 培养后的细胞具备HC表面标志Albumin, AFP, CK18, 并具备合成尿素、分泌白蛋白等, 电镜下显示HC特有的超微结构^[66]. 将 β_2 -m⁻/Thy-1⁺移植入肝切除大鼠模型脾内, 发现其在脾内呈HC形态, 表达白蛋白、AFP、CK8、CK18等. (4)MMSC: MMSC具有多向分化潜能, 目前至少有向10余种类型的功能细胞分化的报道. 将体外分离培养的小鼠MMSC, 在特定HC培养液中用HGF和EGF定向诱导7d后变为HC样圆形; 2wk后可见分化后细胞表达HC标志物CK18和白蛋白, 表明MMSC在特定条件诱导下可以向HC分化^[67].

3.3 胰腺细胞向肝细胞转化 肝脏和胰腺均起源于胚胎时期的内胚层腹侧前肠, 由生心中胚层分泌的FGF-1和FGF-2可以抑制内胚层细胞自动向胰腺分化转而行

成肝脏. 胰腺上皮祖细胞在肝内可分化成HC并整合到肝小叶结构中表达肝特异性蛋白^[68]. 将正常大鼠的全胰腺细胞和富集的胰腺导管上皮细胞(被认为是胰腺干细胞)分别移植到延胡索乙酰乙酸水解酶(FAD)缺陷鼠的肝内, 结果在肝内检测到FAD⁺HC, 因此认为胰腺中存在肝祖细胞. 用地塞米松培养来源于胚胎胰腺原基的细胞株AR42J-B13发现, 在胰腺细胞中不表达的HC富有的核因子C/EBP β 增强子结合蛋白被激活并诱导该细胞横向分化为HC; 将C/EBP β 基因直接转导该细胞也获得了同样结果. 胰腺细胞来源的HC表达AST、G6P、P450、葡萄糖激酶、谷氨酰合成酶等, 具有HC特有的代谢与解毒功能^[69].

4 干细胞与肝再生研究的特点、问题及前景

4.1 干细胞与肝再生研究的特点和问题 综合各家研究结果, 至少有HC、HSC和循环SC参与成体肝脏的更新与修复. 肝损伤后如果残余的HC功能正常, 他们可被活化而进入细胞周期, 通过有丝分裂, 或自身肥大的方式, 使肝脏的结构与功能得以恢复, 但其分裂增生能力极为有限. 在严重肝损伤时, HOC大量增生并分化为SHPC, 然后进一步分化为HC与胆管上皮细胞, 从而参与肝脏的修复. HOC属于短暂扩充细胞, 其修复能力仍然有一定限度, 需要肝外来源的SC参与. 循环SC细胞可能源于骨髓, 他们的数量稀少, 但自我更新能力强, 肝外循环的SC可首先进入门脉区域, 分化为HOC和SHC, 然后进一步分化为HC和胆管上皮细胞, 也可以直接插入肝组织中直接分化为成熟HC.

目前对SC再生肝脏功能的认识主要来自对实验动物的研究, 这些结果并不能说明植入异源性干细胞可以实现真正意义上的肝再生. 关于人类SC再生肝脏功能的研究较少, 但人SC的研究对从肝脏生理与病理生理到肝病及肝脏相关疾病的治疗至关重要. 目前的研究只是发现了干细胞存在、可能组成和再生肝脏功能的现象, 认为他有强大再生能力和分化潜能, 但其动员、增生、分化的条件、过程及分子调控机制并不清楚. 已发现了一些有别于HC的HSC抗原标志, 但这些标志缺乏特异性, 再加上体内HSC的生存微环境及调控机制还不十分清楚, 因此还不能高效分离、培养、诱导和鉴定HSC. HC、HOC和SHPC可能是来源于同一祖先细胞而处于不同分化阶段的细胞, 但各自的作用和相互关系尚未明确. 既然存在HC、HOC、SHPC并且都具有再生肝脏的功能, 但为什么肝损伤后会发肝再生、纤维化甚至肝癌的不同结果, 是否能够设法进行定向引导其向正常的HC再生等问题还值得探讨.

骨髓组织中具有向HC转化的潜能干细胞包括造血干细胞、MMSC和更早期的多能干细胞, 这些细胞可

能来源于骨髓中分化潜能更大的ESC样细胞, 这种干细胞向HC转化的能力更强^[70]. MSC向HC分化的事实和机制均还存在争议, 主要观点有: (1) 横向分化^[71]: MSC本身具有多向分化潜能, 可以分化为HC. (2) 细胞融合: MSC首先与HC胞融合, 然后进一步分化为HC. 其理由是ES细胞与MSC在体外培养条件下具有融合倾向, MSC进入肝组织后也有与HC融合的现象, 融合现象误导人们认为MSC横向分化为HC^[72]. 其次是部分(36%)正常妊娠男胎的妇女的肝组织中存在Y染色体阳性细胞, 也许目前报道的骨髓和肝移植患者肝组织中的Y染色体阳性细胞本来就已存在^[73]. (3) 吞噬细胞学说^[74]: 骨髓来源的单核细胞, 如巨噬细胞(bone marrow-derived macrophages, BMMs)或其前体细胞(granulocyte-macrophage progenitors, GMPs)进入肝脏后, 可吞噬HC, 然后在肝特定的微环境中被诱导分化为HC, 提示BMMs或GMPs足以通过融合方式再生肝脏功能. (4) ESC样细胞学说^[65, 75]: 骨髓组织中残留有ESC样细胞, 可在肝组织的微环境中被诱导分化为HC. MSC和HSC之间的关系以及在肝损伤修复中如何协调增生和代偿, 不同因素所激发的肝再生中SC增生及演变的差异尚不清楚. 根据MSC的分化潜能及再生心、肝、肾、肺、神经功能的研究结果推测, 骨髓组织可能是全身各组织更新和修复的共同种子细胞库^[76], 各种损伤诱发的体内调控因素可动员MSC进入血液循环, 然后随血液循环进入受损伤的组织器官, 以补充其干细胞及自我修复能力的不足. MSC再生肝脏功能的学说在MSC细胞类型、分化潜能及相关机制方面还存在争议. 最近, Mariana *et al*将F344⁺的雄性大鼠的骨髓细胞移植到经致死量发射线照射的DPP4⁻突变的雌性大鼠体内, 发现F344⁺细胞在受者肝组织中单个或成簇分布, 进一步用部分肝切除和化学毒物造成肝损伤模型后, 发现有大量HOC增生和分化, 但这些细胞并非来源于供者, 而是来源于自体^[77]. MSC由于供源广泛, 可从自体获得, 从而避免移植排斥反应, 所以在肝脏的细胞替代治疗方面具有广阔的应用前景.

由于成体干细胞的数量与分化能力受多种因素的影响, 如疾病、衰老等, 所以成体干细胞尚不能完全代替ESC的地位, ESC向HC分化机制的探讨及应用技术研究同样值得关注. 从治疗性克隆的路线获取ESC, 然后进一步诱导分化为HC并用于肝再生治疗是肝再生研究的重点之一. 现已从囊胚内群细胞、胚胎生殖脊和畸胎瘤组织中分离获得ESC样干细胞^[78-80], 体内外研究结果均显示了ESC向HC分化的潜能性, 但涉及临床应用还存技术和伦理等问题. 我们还不知道ESC向HC分化的分子机制, 还不能准确无误地调控

ESC 转化为 HC, 更不知道如何让 ESC 或其衍生的肝样细胞在体内形成具有正常肝组织的三维空间结构及与体内细胞整合和发挥生物功能. 其次是免疫排斥和安全性问题, 随着 ES 细胞向成熟细胞分化, 相应的成熟细胞抗原就会显现出来, 从而引发免疫排斥反应. 最值得关注的问题是 ESC 其在体内具有致癌性和不可控性, 直接将 ESC 移植到体内去可能异常增生和分化, 甚至恶性增长, 而诱导分化后的成熟细胞又存在难以更新换代和与体内组织良好整合. 再就是伦理问题, 因为 ES 细胞需要从可以发育为整个体的早期胚胎中分离获得, 有破坏生命之嫌疑.

4.2 干细胞重建肝脏功能的前景 从 SC 的角度探讨肝脏的发育机制及肝损伤修复原理和技术是未来肝再生医学研究的重点方向^[81]. 不同来源干细胞向 HC 分化及再生肝脏功能的研究尚处于起步阶段, 从基础理论到临床应用还有诸多关键技术问题和理论没有解决, 但现有研究结果已经展示了深入研究的必要性、可行性和肝再生前景. 严重肝损伤治疗的理想办法是以功能性 HC 为基础, 进行再生或替代性修复. 可以设法促进残余 HC 分裂增生, 活化动员 HSC 增生与分化, 动员肝外源性干细胞向肝组织归巢并诱导其向 HC 分化, 植入正常 HC 或肝组织替代、全肝移植等, 其中以下几方面值得关注: (1) 辅助性移植: 以自体、同种异体或异种干细胞或诱导分化获得的 HC 为基础, 为急、慢肝功能衰竭的患者提供暂时性辅助肝功能支持治疗, 使这些患者渡过危险期而无需肝移植或为等待肝移植的终末期肝病患者提供暂时性肝功能支持. (2) 治疗性移植: 在控制原发性疾病的前提下, 对慢性肝炎或肝纤维化等患者, 采用干细胞或其衍生的 HC 移植, 可使病肝细胞完全替换. 对于肝遗传代谢性疾病、血友病等, 可采用异体干细胞治疗性肝再生技术纠正遗传缺陷; 也可以自体 HC 或干细胞为基因载体的体外法肝基因治疗. 这些方案将最终取代肝移植而成为该类患者的首选治疗方法. (3) 肝组织工程: 目前的人工肝主要采用异体或异种 HC 与生物材料结合, 组装成体外装置, 用于肝衰竭患者的辅助治疗^[82-83]. 干细胞可用于免疫缺陷动物体内构建人源化肝脏, 也可与生物材料、细胞因子、诱导物质等结合, 体外模拟构建人工肝. 也可用于“肝化脾”和腹腔内肝组织结构重建, 为肝病患者得供“第二肝脏”.

从 SC 的角度寻找肝再生的出路, 首先需要进一步弄清 SC 向 HC 分化的分子调控机制和诱导分化条件, 其次是要建立 SC 分离、扩增、诱导、鉴定、组织构建、移植等关键技术. 进一步的研究重点包括: (1) 以不同来源的 SC 为靶点, 建立体内外 SC 扩增、诱导分化系和鉴定技术体系, 利用基因芯片、

蛋白组学、差异显示等技术弄清 SC 向 HC 分化的关键调控基因及分化不同时期的基因调控与表达机制, 找出肝相关 SC 的特异性抗原标志, 建立简便可行的分离培养及鉴定方法. (2) 以 SC 为模型, 充分模拟体内 SC 生存与活化的微环境条件, 寻找诱导原位 HC 分裂增生、激活原位 SC 增生、诱导 SC 分化的关键因子及药物, 建立原位 HC 再生的技术方法. (3) 建立标准化、规模化干细胞体外扩增、诱导分化技术, 以获得足够数量、满足临床治疗需要的种子细胞及移植材料. (4) 涉及临床治疗还需要探讨移植技术、疗效、安全性及伦理等问题, 如适用于不同肝病的移植方法, 植入干细胞还是分化成熟的功能细胞, 移植途径、部位、植入细胞数量以及疗效和安全性评价方法等. (5) 基于 SC 的人工肝组织器官工程研究, 包括 SC、生物材料、细胞因子与生物信息、工程技术相结合的人工肝组织构建和辅助治疗装置研究以及异种动物体内人源化肝脏培育等. (6) 把体细胞核移植、ES 细胞、组织工程技术相结合, 研究自体 ESC 向 HC 转化及再生肝脏功能的新技术. 从应用的角度分析, HSC 是最理想的肝再生种子细胞, 但自体 HSC 的来源困难, 而异体 HSC 存在免疫排斥等问题, 临床应用受到一定限制. 肝脏组织中的 HOC 和 SHPC 及一些具有强大增生能力的成年细胞亚群是二倍体, 而成熟的 HC 中多倍体细胞占有相当的比例, 选择性地分离二倍体 HC 作为肝脏的细胞替代治疗或基因治疗的种子细胞可能比有目的地纯化 HOC 或 SHPC 更具有可行性.

还有一个值得关注的问题是肝肿瘤干细胞的研究. 目前已在血液肿瘤、乳腺癌、脑瘤等恶性肿瘤组织中发现可克隆性增长和无限增生的肿瘤干细胞^[84-86], 同时也初步证实了肝癌的发生、发展与 SC 密切相关, 在肝癌动物模型和人类肝癌组织中均发现有 HSC 的大量增生. 我们的研究结果也初步证实, 人原发性肝癌细胞具有异质性, 存在少数具有无限增生和克隆性生长的肿瘤细胞. 从肝癌干细胞的角度, 可能找到更为准确、可靠的早期诊断方法和根治措施. 因为现在的肿瘤诊断和治疗措施可能瞄错了靶, 现行的放、化疗方法可能杀灭大部分肿瘤细胞, 但肿瘤干细胞对这些治疗并不敏感, 肿瘤再生和复发的种子仍然存在, 因此极易复发.

肝脏是一个结构复杂、功能繁多、具有三维结构的器官, HC 的再生受体内神经、内分泌、免疫、代谢及其他各种体液因素的调节, 同时也受细胞与细胞、细胞与细胞外基质之间的信号调节. 要从干细胞的角度实现真正意义上的肝脏结构与功能再生, 需要从单个细胞水平的研究向整体水平发展, 充分向体内学习, 从干细胞向 HC 分化过程的基因时空表

达、微环境调节、细胞的有序排列组合和组织器官的三维结构等方面弄清其机制, 才有可能建立切实可行的技术方法. 因此, 干细胞再生肝脏功能的研究对肝病患者来讲是一种新的希望, 而对相关研究者则是一种挑战, 还需要进行大量艰苦细致的探索.

5 参考文献

- Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997;276:60-66
- Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 2004;39:1477-1487
- Van Thiel DH, Gavalier JS, Kam L, Francavilla A, Polimeno L, Schade PR, Smith J, Diven W, Penkmt RJ, Staral TE. Hapid growth of an intact human liver transplanted into a recipient larger than the donor. *Castroenterology* 1989;93:1414-1419
- Mangnall D, Nigel CB, Ali WM. The molecular physiology of liver regeneration following partial hepatectomy. *Liver International* 2003;23:124-138
- Rebecca T. Liver regeneration: From myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:837-843
- 蔡宏波, Stephen SR, 吕新生. 临床肝细胞移植的现状和前景. *中国普通外科杂志* 2003;12:705-706
- Gennady TS, Alexander AS. Stem cell transplantation for treatment of liver diseases: From biological foundations to clinical experience(Review). *Int Mole Med J* 2003;11:395-400
- Robin LB. The future for stem cell research. *Nature* 2001;414:88-91
- Markus G. Adult versus embryonic stem cells: It's still a tie. *Molecular Therapy* 2002;6:303-306
- 闵军. 肝干细胞的研究进展及其应用前景. 广东省人体组织工程学会出版培训教材 2003:81-91
- Alison MR, Poulson R, Forbes SJ. Update on hepatic stem cells. *Liver* 2001;21:367-373
- Wakabayashi G, Shimazu M, Ueda M, Tanabe M, Kawachi S, Kitajima M. Liver regeneration after resection: molecular and cellular mechanism. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 2004;105:650-653
- Sandgren EP, Palmiter RD, Heckel JL. Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator. transgene. *Cell* 1991;66:245-256
- Overturf K, Al-Dhalimy M, Finegold M, Grompe M. The repopulation potential of hepatocyte populations differing in size and prior mitotic expansion. *Am J Pathol* 1999;155:2135-2143
- Sigal SH. Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. *Am J Physiol* 1999;276:G1260-1272
- Arthur Z. Regulation of liver regeneration. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:IV6-10
- Borowiak M, Alistair NG, Torsten WS, Strehle M, Trautwein C, Birchmeier C. Met provides essential signals for liver regeneration. *PNAS* 2004;101:10608-10613
- Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *PNAS* 1997;94:1441-1446
- Cressman DE, Greenbaum LE, Deangelis RA. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6 deficient mice. *Science* 1996;274:1379-1383
- Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A. Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Ann Rev Immunol* 2000;18:143-146
- 徐存拴, 李永辉, 段瑞峰, 卢爱灵, 夏民, 吉爱玲. 短间隔连续部分肝切除对大鼠生存和肝组织结构的影响. *动物学报* 2001;47:659-665
- Taub R. Liver regeneration in health and disease. *Clin Lab Med* 1996;16:341-360
- Dabeva MD, Shafritz DA. Hepatic stem cells and liver repopulation. *Semin Liver Dis* 2003;23:349-362
- Koniaris LG, McKillop IH, Schwartz SI, Zimmers TA. Liver regeneration. *J Am Coll Surg* 2003;197:634-659
- Sigal SH, Rajvanshi P, Gorla GR, Sokhi RP, Saxena R, Gebhard DR, Reid LM, Gupta S. Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. *Am J Physiol* 1997;276:1260-1272
- Wilson JW, Leduc EH. Role of cholangioles in restoration of the liver of the mouse after dietary injury. *J Pathol Bacteriol* 1958;76:441-449
- Vessey CJ, de la Hall PM. Hepatic stem cells: a review. *Pathology* 2001;33:130-141
- Laurson J, Selden C, Hodgson HJ. Hepatocyte progenitors in man and in rodents-multiple pathways, multiple candidates. *Int J Exp Pathol* 2005;86:1-18
- Lorenti AS. Hepatic stem cells. *Medicina(B Aires)* 2001;61:614-620
- Jackson KA, Majka SM, Wulf GG, Goodell MA. Stem cells: a minireview. *J Cell Biochem Suppl* 2002;38:1-6
- Fausto N. Liver regeneration. From laboratory to clinic. *Liver Transpl* 2001;7:835-844
- Xu CS, Zhao LF, Yang KJ, Zhang JB. The origination and action of the hepatic stems cells. *Shiyan Shengwu Xuebao* 2004;37:72-77
- Malcolm RA. Liver regeneration with reference to stem cells. *Cell Devel Bio* 2002;13:385-387
- Overturf K, Al-Dhalimy M, Finegold M, Grompe M. The repopulation potential of hepatocyte populations differing in size and prior mitotic expansion. *Am J Pathol* 1999;155:2135-2143
- Rudolph KL, Chang S, Millard M, Schreiber-Agus N, DePinho RA. Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. *Science* 2000;287:1253-1258
- Braun KM, Sandgren EP. Cellular origin of regenerating parenchyma in a mouse model of severe hepatic injury. *Am J Pathol* 2000;157:561-569
- 龚加庆, 方驰华, 李雅, 田伏洲. 卵圆细胞参与实验性肝癌形成过程的研究. *中华外科杂志* 2004;42:291-295
- Roskams T, De Vos R, Van EP, Myazaki H, Van DB, Desmet V. Hepatic OV-6 expression in human liver disease and rat experiments: evidence for hepatic progenitor cells in man. *J Hepatol* 1998;29:455-463
- Dabeva MD, Shafritz DA. Hepatic stem cells and liver repopulation. *Semin Liver Dis* 2003;23:349-362
- Alison M. Liver stem cells: a two compartment system. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:710-715
- Grisham JW, Gordon GJ, Coleman WB, Hixson DC. Liver regeneration in rats with retrorsine-induced hepatocellular injury proceeds through a novel cellular response. *Am J Pathol* 2000;156:607-619
- Zimmermann A. Regulation of liver regeneration. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19(Suppl 4):iv6-10
- Michalopoulos GK, Khan Z. Liver regeneration, growth factors, and amphiregulin. *Gastroenterology* 2005;128:503-506
- Akatsugu Y, Masahide Y, Seiji K, Yoko K, Yoshiyuki N, Shigeaki I, Yukio T. In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. *Stem Cells* 2002;20:146-154
- Hu A, Cai J, Zheng Q, He X, Pan Y, Li L. Hepatic differentiation from embryonic stem cells in vitro. *Chin Med J* 2003;116:1893-1897
- Yin J, Yew KL, Manuel ST, Soon CN, Lin CS, Lim SK. AFP⁺, ESC-derived cells engraft and differentiate into hepatocytes in Vivo. *Stem Cells* 2002;20:338-346
- Yamada T, Yoshikawa M, Kanda S, Kato Y, Nakajima Y, Ishizaka S, Tsunoda Y. In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. *Stem Cells* 2002;20:146-154
- Ruhnke M, Ungefroren H, Zehle M, Bader M, Kremer B, Fandrich F. Long-term culture and differentiation of rat em-

- bryonic stem cell-like cells into neuronal, glial, endothelial, and hepatic lineages. *Stem Cells* 2003;21:428-436
- 49 Avital I, Inderbitzin D, Aoki T. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:156-164
 - 50 Theise ND, Krause DS. Bone marrow to liver: the blood of Prometheus. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:411-417
 - 51 Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000;32:11-16
 - 52 Idilman R, Erden E, Kuzu I, Ersoz S, Karasu Z, Karayalcin K, Yuce G, Tokat Y, Sahin Y, Tukun A, Akarca US, Karayalcin S. Recipient-derived hepatocytes in sex-mismatched liver allografts after liver transplantation: early versus late transplant biopsies. *Transplantation* 2004;78:1647-1652
 - 53 De SG, Vicarioto M, Donadel C, Menegazzo M, Marson P, Corsini A. Mobilization of peripheral blood hematopoietic stem cells following liver resection surgery. *Hepatogastroenterology* 2004;51:805-810
 - 54 Yuehua J, Balkrishnan J, Reinhardt RL, Robert ES, Dirk KC, Xilmar OG, Morayma R, Todd L, Troy L, Mark B, Jingbo D, Saraaldrich AL, Walter CL. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418:41-49
 - 55 Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000;6:1229-1234
 - 56 Theise ND, Badve S, Saxena R. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000;31:235-240
 - 57 展玉涛, 魏来, 陈红松, 丛旭, 费然, 王宇. 骨髓干细胞在大鼠肝纤维化形成环境中的分化. *中华肝脏病杂志* 2003;11:673-675
 - 58 Henning CF, Michael VL, Lourdes CD, Claudia L, Dietrich K, Boris F, Axel RZ. Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 2003;21:98-104
 - 59 Peterson BE, Bowen WC, Patrene KD. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284:1168-1170
 - 60 Steven M, David JH, John NP, Philip NN. Potential of hematopoietic stem cell therapy in hepatology: A critical review. *Stem Cells* 2004;22:897-907
 - 61 Edwards RG. Stem cells today: B1. Bone marrow stem cells. *Reprod Biomed Online* 2004;9:541-583
 - 62 Kleeberger W, Rothamel T, Glockner S, Flemming P, Lehmann U, Kreipe H. High frequency of epithelial chimerism in liver transplants demonstrated by microdissection and STR-analysis. *Hepatology* 2002;35:110-116
 - 63 Jang YY, Stephen BB, Anna MD. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nature Cell Biol* 2004;6:532-539
 - 64 Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:500-504
 - 65 Schwartz RE, Reyes M, Koodie L. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002;109:1291-1302
 - 66 Avital I, Inderbitzin D. Isolation, characterization and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:156-164
 - 67 周一鸣, 胡大荣, 姚鹏, 范公忍. 小鼠骨髓干细胞诱导分化为肝细胞的实验研究. *中华肝脏病杂志* 2004;12:722-725
 - 68 Lardon J, De Breuck S, Rooman I, Van Lommel L, Kruhofer M, Orntoft T, Schuit F, Bouwens L. Plasticity in the adult rat pancreas: transdifferentiation of exocrine to hepatocyte-like cells in primary culture. *Hepatology* 2004;39:1499-1507
 - 69 Marek CJ, Cameron GA, Elrick LJ, Hawksworth GM, Wright MC. Generation of hepatocytes expressing functional cytochromes P450 from a pancreatic progenitor cell line in vitro. *Biochem J* 2003;370(Pt 3):763-763
 - 70 Jose JM, Alejandro E, Paulette C. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 2001;226:507-520
 - 71 Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002;416:542-545
 - 72 Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003;422:897-901
 - 73 Stevens AM, McDonnell WM, Mullarkey ME, Pang JM, Leisenring W, Nelson JL. Liver biopsies from human females contain male hepatocytes in the absence of transplantation. *Lab Invest* 2004;84:1603-1609
 - 74 Forbes SJ. Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in the liver. *J Hepatol* 2005;42:285-286
 - 75 Scott EW. Stem cell plasticity or fusion: two approaches to targeted cell therapy. *Blood Cells Mol Dis* 2004;32:65-67
 - 76 Krause DS, Theise ND, Collector MI. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001;105:369-377
 - 77 Anuradha M, Niloyjyoti D, Michael O, Petar NG, Jaswinder S, Shalin S, Chandan G, David AS, Mariana DD. Bone marrow progenitors are not the source of expanding oval cells in injured liver. *Stem Cells* 2004;22:1049-1061
 - 78 Pera MF, Reubinoff B, Trounson A. Human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 2000;113(Pt 1):5-10
 - 79 Andrews PW. Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC cell lines. *APMIS* 1998;106:158-167
 - 80 Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 1992;359:550-551
 - 81 Min AD, Theise ND. Prospects for cell-based therapies for liver disease. *Panminerva Med* 2004;46:43-48
 - 82 Alison MR, Poulson R, Jeffery R. Hepatocyte from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000;406:257
 - 83 Lee LA. Advances in hepatocyte transplantation: a myth becomes reality. *J Clin Invest* 2001;108:367-369
 - 84 Dick JE. Breast cancer stem cells revealed. *PNAS* 2003;100:3547-3549
 - 85 Houtman DH, Ichiro N, Jorge AL, Michael MS, Daniel H. Geschwind T, Marianne BF, Harley IK. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *PNAS* 2003;100:15178-15183
 - 86 Lessard J, Sauvageau G. *Bmi-1* determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 2003;423:255-260