

细胞谱系示踪技术在肝脏纤维化上皮-间质转化研究中的应用

王芳, 赵礼金

王芳, 赵礼金, 遵义医学院附属医院肝胆外科 贵州省遵义市 563003

王芳, 在读硕士, 住院医师, 主要从事肝胆管结石的基础与临床研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81260085

作者贡献分布: 本文综述由王芳完成; 赵礼金审校。

通讯作者: 赵礼金, 教授, 主任医师, 563003, 贵州省遵义市汇川区大连路149号, 遵义医学院附属医院肝胆外科。386421696@qq.com

电话: 0852-8608244

收稿日期: 2015-05-14 修回日期: 2015-06-08

接受日期: 2015-06-15 在线出版日期: 2015-07-18

Cell lineage tracing in study of epithelial-to-mesenchymal transition during hepatic fibrosis

Fang Wang, Li-Jin Zhao

Fang Wang, Li-Jin Zhao, Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81260085

Correspondence to: Li-Jin Zhao, Professor, Chief Physician, Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, 149 Dalian Road, Huichuan District, Zunyi 563003, Guizhou Province, China. 386421696@qq.com

Received: 2015-05-14 Revised: 2015-06-08

Accepted: 2015-06-15 Published online: 2015-07-18

Abstract

Hepatic fibrosis is the common pathologic process of chronic liver injury. Early studies mostly used immunohistochemistry to assess the role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human or animal liver repair, and several types of liver cells including

hepatocytes, cholangiocytes, hepatic stellate cells (HSCs) and liver progenitor cells have been shown to undergo EMT during hepatic fibrosis. However, this technique has several flaws. In recent years, with the rapid development of genetic engineering, especially the application of the recombinant enzyme Cre/loxP system, cell lineage tracing is becoming a popular and powerful tool to overcome the limitations of immunostaining for identifying EMT during hepatic fibrosis. Since this technique genetically labels cells, the marker will be present in any progeny of the labeled cells. Many groups have generated different lineages of double transgenic (DTG) mice and utilized different models of hepatic injury to investigate whether EMT contributes to hepatic injury or not. The purpose of this article is to summarize evidence, which is obtained using lineage cell tracing, for and against the possibility that EMT is involved in hepatic fibrosis.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Epithelial-to-mesenchymal transition; Hepatic fibrosis; Cell lineage tracing

Wang F, Zhao LJ. Cell lineage tracing in study of epithelial-to-mesenchymal transition during hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(20): 3235-3240 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/3235.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i20.3235>

摘要

肝脏纤维化是多种慢性肝脏损伤共同的病理过程。通过免疫组织化学技术研究人和

■背景资料

肝脏纤维化是多种慢性肝脏损伤共同的病理过程。通过免疫组织化学技术研究人和动物样本证实, 在慢性损伤肝脏纤维化过程中, 一些肝脏细胞可发生上皮-间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)促进肝脏纤维化。

■同行评议者

鲁玉辉, 副教授, 福建中医药大学中医学学院

■ 研发前沿

随着基因工程技术的飞速发展, 细胞谱系示踪技术也有所突破, 尤其是诱导性重组酶Cre/loxP系统的应用, 极大地拓宽了细胞谱系示踪技术的应用范围. 近年来, 细胞谱系示踪技术被应用于肝纤维化过程中的EMT研究, 但研究结果大不一致.

动物样本证实, 在慢性损伤肝脏纤维化过程中, 一些肝脏细胞可发生上皮-间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)促进肝脏纤维化. 然而免疫组织化学技术存在许多技术上的缺陷, 导致肝脏纤维化过程中存在EMT的观点饱受质疑. 细胞谱系示踪技术为研究器官发育、组织损伤修复以及单细胞的分化命运提供了重要的手段. 近些年, 随着基因工程技术的飞速发展, 细胞谱系示踪技术也有所突破, 尤其是诱导性重组酶Cre/loxP系统的应用, 极大地拓宽了细胞谱系示踪技术的应用范围. 目前, 该技术越来越多的应用于研究肝脏纤维化过程中的EMT. 本文将近来细胞谱系示踪技术在判断肝脏纤维化过程中是否发生EMT的实验研究作一综述.

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 上皮-间质转化; 肝纤维化; 细胞谱系示踪技术

核心提示: 细胞谱系示踪技术越来越多被用于追踪肝脏细胞是否经历上皮-间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)/间质-上皮转化(mesenchymal-to-epithelial transition, MET), 促进肝纤维化病程. 尽管通过这种方式研究EMT/MET具有很强的说服力, 但其结果仍颇具争议. 本文将近来细胞谱系示踪技术在判断肝脏纤维化过程中是否发生EMT的实验研究作一综述.

王芳, 赵礼金. 细胞谱系示踪技术在肝脏纤维化上皮-间质转化研究中的应用. 世界华人消化杂志 2015; 23(20): 3235-3240
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/3235.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i20.3235>

0 引言

上皮-间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)是指相互毗邻、具有极性的上皮细胞转化成缺乏细胞间连接、具有自由移动能力的间充质细胞的过程. 其可逆过程称间质-上皮转化(mesenchymal-to-epithelial transition, MET). 在一个时间点, 逐渐间质化的上皮细胞仍保留一些上皮细胞特有的特征, 即共同表达上皮和间质标志物, 被认为是确定EMT的确切证据^[1-4]. 近年来通过免疫组织化学的技术研究人和动物样本证实, 在慢性损伤致肝脏纤维化过程中, 一些肝脏细胞如肝细胞、

胆管上皮细胞, 肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)等, 可发生EMT, 转化成肌纤维母细胞, 分泌大量细胞外基质, 促进肝脏纤维化^[5-11]. 深入研究EMT发生机制的文章也不少^[12-22].

而免疫组织化学技术存在以下几个弊端^[1,5]. 首先, 在任一时间点, 证明任一种细胞表达几种蛋白标志物具有技术上的挑战, 因此几乎不可能用这种方法获得单个细胞复杂的改变; 其次, 用共染的方法判断一个细胞是否同时表达上皮或间质标志物是很困难的. 有可能明显的共同表达两种标志物不过是反应了毗邻的细胞分别表达了一种标志物; 再者, EMT/MET不是静止的, 而是不断变化的, 因而就算是先进的免疫组织化学技术也不可能捕捉到一个细胞转变的整个过程, 而这正是一个细胞发生了EMT/MET的直接证据^[23-29]. 因而一些肝脏细胞能通过EMT/MET促进肝脏纤维化的观点仍备受质疑^[1,5].

为克服免疫共染技术的局限性, 近几年细胞谱系示踪技术越来越多被用于追踪肝脏细胞是否经历EMT/MET, 促进肝纤维化. 尽管通过这种方式研究EMT/MET具有很强的说服力, 但其结果仍颇具争议^[1]. 本文将近来细胞谱系示踪技术在判断肝脏纤维化过程中是否发生EMT的实验研究作一综述.

1 细胞谱系示踪技术

细胞谱系示踪是指利用各种方式标记细胞, 并对包括其后代所有细胞的增殖、分化以及迁移等活动进行追踪观察^[30]. 自20世纪以来, 谱系示踪技术为研究器官发育、组织损伤修复以及单细胞的分化命运提供了重要的手段. 近些年, 随着基因工程技术的飞速发展, 细胞谱系示踪技术也有所突破, 尤其是诱导性重组酶Cre/loxP系统的应用, 极大地拓宽了细胞谱系示踪技术的应用范围^[30-34].

Cre重组酶由Sternberg等^[35]在P1噬菌体中发现, 是一种特异性重组酶, 能够介导由34 bp的“LoxP”铆定的基因序列特异性重组, 完成对同向“LoxP”序列所铆定基因片段的切除以及对向“LoxP”铆钉基因的倒位^[33]. Cre/loxP系统将两只小鼠杂交, 其中1只转基因小鼠含有在目的基因两端分别有1个loxP位点的基因序列, 另一只转基因小鼠中, Cre重组酶被置于某特定基因启动子的调控之下, 杂交后产生

的同时含有上述2种基因型的子代小鼠就会在某一特定类型的细胞中缺失目的基因^[35-38]。

2 细胞谱系技术肝纤维化EMT研究中的应用

遗传谱系示踪技术作为判断EMT的一种强有力的工具已经广受推崇。该技术通过遗传标记细胞,因此在任何经遗传标记的细胞后代中都可以检测到标志物。Zeisberg等^[39]作为第一个团队利用此技术表明肝细胞发生EMT可能是肌纤维母细胞的一个重要来源。他们通过杂交白蛋白(albumin, Alb)-Cre小鼠和Rosa26-floxstop-Lac小鼠构建双转基因小鼠, Alb-Cre小鼠在白蛋白启动子控制下表达Cre重组酶。Rosa26-floxstop-LacZ小鼠的LacZ报告基因只有在Cre介导flox外显子切除后被激活表达。因此,在双转基因小鼠中只有白蛋白表达阳性的细胞后代可以永久性的被 β 半乳糖苷酶标记。然后检测这些小鼠是否共同表达 β 半乳糖苷酶和公认的间质标志物成纤维特异性蛋白-1(fibroblast specific protein 1, FSP1)。结果发现:健康的双转基因小鼠,几乎没有检测到FSP1阳性细胞。然而,CCl₄诱导的小鼠肝细胞FSP1表达阳性,而且几乎一半的FSP1阳性细胞共同表达 β 半乳糖苷酶。因此该实验团队得出结论:肝细胞来源的肌纤维细胞,可促进肝脏纤维化进程^[39]。

第二个尝试利用细胞谱系示踪技术证明肝脏损伤中是否发生EMT的团队使神经胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)-Cre小鼠和floxStopRepressorflox-绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)小鼠杂交繁殖^[20]。合成的双转基因小鼠Cre重组酶仅仅在被HSCs标志物GFAP激活的细胞中表达。通过追踪转基因小鼠的HSCs判断其是否可以发生MET产生成熟的肝脏上皮细胞。饲喂蛋氨酸-胆碱缺乏、乙硫氨酸充足的食物后,这些转基因老鼠中大约1/3成熟的白蛋白阳性肝细胞和几乎所有的肝内胆管细胞都表达了GFP。这些数据进一步证明了来源于肝脏祖细胞的肝细胞、胆管细胞和HSCs在某种具体的肝脏损伤修复中具有EMT/MET的能力^[40,23]。

然而,这两个报道受到了另外几个细胞谱系示踪技术研究结果的挑战。第一个是Taura等^[41]杂交胶原蛋白1 α 1(collagen1 α 1)-GFP报告小鼠和Zeisberg等^[39]使用的Alb-Cre-Rosa26-floxstop-LacZ报告小鼠,同时鉴定肝脏损伤中

产生胶原蛋白的细胞和白蛋白阳性来源的细胞。与Zeisberg等^[39]不同,他们没有发现FSP1和 β 半乳糖苷酶共同表达。其次,在CCl₄诱导的肝脏纤维化的不同阶段,也没有检测到肝细胞来源的细胞表达胶原蛋白。

后来,同一实验团队构建了大量转基因小鼠研究在肝脏损伤中胆管细胞的EMT和HSCs的MET^[42]。首先, Scholten等^[42]杂交他莫昔芬诱导的Krt19-CreERT小鼠和Rosa26f/f-黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein, YFP)小鼠追踪胆管细胞的命运。结果发现在胆总管结扎(bile duct ligate, BDL)和CCl₄诱导的肝脏纤维化小鼠后代胆管细胞中,没有证据表明HSCs或者肌纤维母细胞表达YFP和Krt19。后来他们杂交在GFAP或胶原 α 2启动子控制下表达Cre重组酶的小鼠和Rosa26f/f-mT/GFP或者Rosa26f/f-YFP小鼠,其后代HSCs和肌纤维母细胞被永久标记,也没有在YFP+细胞中检测到表达E-钙黏蛋白或者胆管上皮特异性标志物泛角蛋白。因此,他们认为胆管细胞的EMT和HSCs的MET没有在肝脏纤维化或肝脏再生过程中发挥作用。

来自同一个实验团队的Asterreicher等通过第三个实验证明了HSCs或者产生I型胶原蛋白的纤维母细胞不能表达FSP1^[42]。而且,他们发现FSP1阳性的肝脏细胞表达巨噬细胞标志物,由此得出结论传统的肝脏肌纤维母细胞不表达FSP1。与此观点一致的是,当FSP1-Cre小鼠和Rosa26-YFP小鼠杂交后,通过BDL或者CCl₄诱导肝脏纤维化,未能检测表达YFP的细胞同时表达连接蛋白或者 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)。这项研究结果向利用FSP1作为特异性间质标志物研究肝脏EMT提出了巨大的质疑。

不支持肝脏纤维化过程中发生EMT的第四项研究来自于Chu等^[43]的实验。他们通过杂交甲胎蛋白(alpha fetal protein, AFP)-Cre小鼠和Rosa26-YFP小鼠, YFP标记所有的肝脏上皮细胞,包括肝细胞、胆管细胞和卵圆细胞。尽管在体外培养过程中检测到了EMT,但在3种不同的体内肝脏损伤模型中,没有表达YFP的细胞表达各种公认的间质标志物,包括FSP1、波形蛋白、 α -SMA。因此,他们得出结论在体内不存在肝细胞或者胆管细胞的EMT发生。因此, Kisseleva等^[2]认为在体内未发生EMT,而且

■ 相关报道

肝纤维化过程中,可能伴随有肝细胞的上皮-间质转化,即有EMT的发生,近年来通过EMT研究肝纤维化机制成为热点。

应用要点

本文能较好的反映现阶段细胞谱系示踪技术在肝脏纤维化EMT研究中的应用概况, 可为相关研究提供一些参考.

提出“肝脏上皮细胞无促进实验性的肝脏纤维化的能力”. 后来, Troeger等^[44]报道vimentin-CreER肌纤维母细胞未能发生MET也支持了上述言论.

最近, Michelotti等^[45]用上述相同类型的细胞谱系示踪技术发现HSCs可转分化成肝细胞和胆管细胞. 他们构建 α -SMA-Cre-ERT2或者GFAP-Cre-ERTM小鼠和Rosa-Stop-flox-YFP杂交的双转基因小鼠. 经BDL处理, 在纤维化的肝脏中可观察到3种类型的YFP阳性细胞: 基质细胞、肝细胞、胆管细胞. 为了验证上述结果, 经BDL后分离这些转基因小鼠的肝细胞, 通过流式细胞学技术检测YFP表达情况. 与先前肝脏损伤中来源于HSCs的肝细胞百分比一致, 他们发现大约24%-34%肝细胞YFP表达阳性^[40]. 此外, 他们通过PCR技术分析肝细胞DNA, 检测Rosa26基因座的重组情况, 发现在他莫昔芬组处理组没有发现Cre介导的重组, 这是一条关于转基因重组的直接证据, 而在之前否定肝脏损伤存在EMT的研究中从未提过. 同一实验组, 在肝脏部分切除模型中, 也发现了EMT/MET的证据^[46]. 这项研究发现, 他莫昔芬诱导 α -SMA-YFP小鼠后, 经肝叶部分切除后48-72 h, 部分祖细胞、胆管细胞和25%的肝细胞YFP表达阳性, 这显示肝脏上皮细胞来源 α -SMA-YFP. 这两项研究最吸引人的地方是他们认为HSCs是肝脏常驻细胞类型, 具有内在可塑性, 能发生MET-EMT取代成人肝脏上皮细胞. 这和Guo等^[47]提出的“转化乳腺细胞”相似, 共同表达上皮和间质标志物, 假设其能在乳腺癌中补充干细胞数量^[47,48].

3 细胞谱系示踪技术存在的问题

要调和如前所述的支持和反对在体内肝细胞发生EMT的观点是相当困难的, 实际上研究相同的纤维化模型产生不一致甚至相反的数据使得理解起来更加的困难. 我们将尝试寻找一些解释这种差异的可能性.

首先, 和其他技术一样, 细胞谱系示踪技术也有一些缺点. Cre介导的重组效率不可能百分百成功. 例如, Scholten等^[42]报道在他们的试验中, Krt19-Cre/YFP小鼠的Cre重组效率仅达到40%, 因此, 极有可能未标记的Krt19+细胞发生了EMT. 实际上, Taura等^[41]在早期的研究中利用双转基因 α -SMA/collagen1 α 1报告小鼠确

定在肝脏损伤中 α -SMA表达细胞和产生胶原蛋白之间的关系, 大约50%HSCs没有表达任何的转基因, 仅仅7%表达 α -SMA荧光蛋白, 14%表达胶原蛋白, 30%在培养5 d后表达两种转基因; 其次, 一些用于构建双转基因公认的细胞特异性标志物其实缺乏特异性. 例如, 有报道^[40]称传统的HSCs标志物GFAP在胆管细胞中也有表达; 再者, 不同的实验肝脏损伤模型的检测的时间点不同, 且检测时间点有限. 由于EMT/MET是一个转化过程, 没有检测到EMT/MET的研究者可能已经错过了细胞发生表型转化的时间窗, 或者说细胞已经完成了EMT, 甚至又逆转成最初的情况; 最后, 细胞谱系示踪技术仍然在一定程度上依靠免疫组织化学技术确定细胞是否共同表达一定的标志物, 从而确定是否发生了EMT. 因此, 免疫组织化学技术的局限性仍然存在.

事实上, 仅仅使用几个上皮和间质标志物决定是否发生EMT是不够的. 一些标志物可能信号太弱, 或者可能表达其他类型标志物的细胞反而不表达被检测的标志物, 以至于目前的技术没有能力检测. 最后在动物模型中得到的数据可能不能准确的反应人肝脏疾病的病理生理过程. 考虑到这些和所有目前可用的动物实验数据的局限性, 认为人肝脏损伤中未发生EMT/MET还为时过早.

4 结论

为了更好地判断体内是否发生了EMT/MET, 我们建议在将来进行细胞谱系示踪技术研究时注意以下几个问题: (1)保证足够的动物数量, 检测不同的损伤模型及在损伤中或损伤后不同的时间点; (2)应使用不同的方法检测以弥补各种方法的不足, 如直接的免疫荧光技术、抗体介导的免疫组织化学技术、不同肝脏细胞的分离技术、Cre重组酶的重组效率检测、PCR检测荧光蛋白表达、流式细胞学技术等^[49,50]; (3)确保阳性和阴性的对照试验. 总之, 细胞谱系示踪技术作为一种直观有力的研究方法, 随着基因打靶技术及各种光学显微观察技术的不断发展, 将有望开启研究肝脏纤维化相关疾病中EMT的新篇章.

5 参考文献

- Xie G, Diehl AM. Evidence for and against epithelial-to-mesenchymal transition in the liver.

- Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013; 305: G881-G890 [PMID: 24157970 DOI: 10.1152/ajpgi.00289.2013]
- 2 Kisseleva T, Brenner DA. Is it the end of the line for the EMT? *Hepatology* 2011; 53: 1433-1435 [PMID: 21433040 DOI: 10.1002/hep.24312]
 - 3 Pinzani M. Epithelial-mesenchymal transition in chronic liver disease: fibrogenesis or escape from death? *J Hepatol* 2011; 55: 459-465 [PMID: 21320559 DOI: 10.1016/j.jhep.2011.02.001]
 - 4 Choi SS, Diehl AM. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. *Hepatology* 2009; 50: 2007-2013 [PMID: 19824076 DOI: 10.1002/hep.23196]
 - 5 李旭, 齐明华. 肝内细胞上皮-间质转化: 肝纤维化发生的新机制. *世界华人消化杂志* 2012; 20: 811-817
 - 6 Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119: 1420-1428 [PMID: 19487818 DOI: 10.1172/JCI39104]
 - 7 Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 2009; 119: 1429-1437 [PMID: 19487819 DOI: 10.1172/JCI36183]
 - 8 Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1655-1669 [PMID: 18471545 DOI: 10.1053/j.gastro.2008.03.003]
 - 9 Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139: 871-890 [PMID: 19945376 DOI: 10.1016/j.cell.2009.11.007]
 - 10 Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 131-142 [PMID: 16493418 DOI: 10.1038/nrm1835]
 - 11 Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest* 2009; 119: 1438-1449 [PMID: 19487820 DOI: 10.1172/JCI38019]
 - 12 Meindl-Beinker NM, Dooley S. Transforming growth factor-beta and hepatocyte transdifferentiation in liver fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23 Suppl 1: S122-S127 [PMID: 18336655 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2007.05297]
 - 13 Dooley S, Hamzavi J, Ciucan L, Godoy P, Ilkavets I, Ehnert S, Ueberham E, Gebhardt R, Kanzler S, Geier A, Breitkopf K, Weng H, Mertens PR. Hepatocyte-specific Smad7 expression attenuates TGF-beta-mediated fibrogenesis and protects against liver damage. *Gastroenterology* 2008; 135: 642-659 [PMID: 18602923 DOI: 10.1053/j.gastro.2008.04.038]
 - 14 Choi SS, Omenetti A, Syn WK, Diehl AM. The role of Hedgehog signaling in fibrogenic liver repair. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43: 238-244 [PMID: 21056686 DOI: 10.1016/j.biocel.2010.10.015]
 - 15 Omenetti A, Choi S, Michelotti G, Diehl AM. Hedgehog signaling in the liver. *J Hepatol* 2011; 54: 366-373 [PMID: 21093090 DOI: 10.1016/j.jhep.2010.10.003]
 - 16 Yang JJ, Tao H, Li J. Hedgehog signaling pathway as key player in liver fibrosis: new insights and perspectives. *Expert Opin Ther Targets* 2014; 18: 1011-1021 [PMID: 24935558 DOI: 10.1517/1472822.2014.927443]
 - 17 Kordes C, Sawitz A, Müller-Marbach A, Ale-Agha N, Keitel V, Klonowski-Stumpe H, Häussinger D. CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 352: 410-417 [PMID: 17118341 DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.11.029]
 - 18 刘忠涛, 熊力, 文宇, 苗雄. TGF-β介导的上皮间质转化. *中国普通外科杂志* 2013; 22: 211-217
 - 19 Caiado F, Carvalho T, Rosa I, Remédio L, Costa A, Matos J, Heissig B, Yagita H, Hattori K, da Silva JP, Fidalgo P, Pereira AD, Dias S. Bone marrow-derived CD11b+Jagged2+ cells promote epithelial-to-mesenchymal transition and metastasization in colorectal cancer. *Cancer Res* 2013; 73: 4233-4246 [PMID: 23722542 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0085]
 - 20 Xie G, Karaca G, Swiderska-Syn M, Michelotti GA, Krüger L, Chen Y, Premont RT, Choi SS, Diehl AM. Cross-talk between Notch and Hedgehog regulates hepatic stellate cell fate in mice. *Hepatology* 2013; 58: 1801-1813 [PMID: 23703657 DOI: 10.1002/hep.26511]
 - 21 Saad S, Stanners SR, Yong R, Tang O, Pollock CA. Notch mediated epithelial to mesenchymal transformation is associated with increased expression of the Snail transcription factor. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42: 1115-1122 [PMID: 20348013 DOI: 10.1016/j.biocel.2010.03.016]
 - 22 Chen Y, Zheng S, Qi D, Zheng S, Guo J, Zhang S, Weng Z. Inhibition of Notch signaling by a γ-secretase inhibitor attenuates hepatic fibrosis in rats. *PLoS One* 2012; 7: e46512 [PMID: 23056328 DOI: 10.1371/journal.pone.0046512]
 - 23 曾帅丹, 刘磊. 上皮间质转化与肝胆系统纤维化的研究进展. *临床肝胆病杂志* 2014; 30: 695-699
 - 24 Omenetti A, Porrello A, Jung Y, Yang L, Popov Y, Choi SS, Witek RP, Alpini G, Venter J, Vandongen HM, Syn WK, Baroni GS, Benedetti A, Schuppan D, Diehl AM. Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans. *J Clin Invest* 2008; 118: 3331-3342 [PMID: 18802480 DOI: 10.1172/JCI35875]
 - 25 Robertson H, Kirby JA, Yip WW, Jones DE, Burt AD. Biliary epithelial-mesenchymal transition in posttransplantation recurrence of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2007; 45: 977-981 [PMID: 17393507 DOI: 10.1002/hep.21624]
 - 26 Syn WK, Jung Y, Omenetti A, Abdelmalek M, Guy CD, Yang L, Wang J, Witek RP, Fearing CM, Pereira TA, Teaberry V, Choi SS, Conde-Vancells J, Karaca GF, Diehl AM. Hedgehog-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and fibrogenic repair in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2009; 137: 1478-1488.e8 [PMID: 19577569 DOI: 10.1053/j.gastro.2009.06.051]
 - 27 Yang MC, Wang CJ, Liao PC, Yen CJ, Shan YS. Hepatic stellate cells secrete type I collagen to trigger epithelial mesenchymal transition of hepatoma cells. *Am J Cancer Res* 2014; 4: 751-763 [PMID: 25520865]
 - 28 Liu Z, Wang J, Guo C, Fan X. microRNA-21 mediates epithelial-mesenchymal transition of human hepatocytes via PTEN/Akt pathway. *Biomed Pharmacother* 2015; 69: 24-28 [PMID: 25661333 DOI: 10.1016/j.biopha.2014.10.028]

■名词解释

上皮-间质转化 (EMT): 相互毗邻、具有极性的上皮细胞转化成缺乏细胞间连接、具有自由移动能力的间充质细胞的过程; 细胞谱系示踪: 利用各种方式标记细胞, 并对包括其后代所有细胞的增殖、分化以及迁移等活动进行追踪观察。

同行评价

本文综述了细胞谱系示踪技术在肝脏纤维化EMT研究中的应用, 分析了细胞谱系示踪技术可能存在的问题, 并且提出了改进的方法, 有一定的科学性和新颖性.

- 29 李裕明, 韩克强, 郑璐, 李靖, 许商成, 田野望, 李洪艳, 皮会, 丰钱鹏, 梁平. 上皮间质转化标志物 E-cadherin和Vimentin在原发性肝癌中的表达及其临床意义. *中华肝脏病杂志* 2013; 21: 279-284
- 30 Kretzschmar K, Watt FM. Lineage tracing. *Cell* 2012; 148: 33-45 [PMID: 22265400 DOI: 10.1016/j.cell.2012.01.002]
- 31 van Amerongen R. Lineage Tracing in the Mammary Gland Using Cre/lox Technology and Fluorescent Reporter Alleles. *Methods Mol Biol* 2015; 1293: 187-211 [PMID: 26040689 DOI: 10.1007/978-1-4939-2519-3_11]
- 32 李晓刚, 苏楠, 杜晓兰, 陈林. 细胞谱系示踪技术. *生理科学进展* 2014; 45: 379-384
- 33 Humphreys BD, DiRocco DP. Lineage-tracing methods and the kidney. *Kidney Int* 2014; 86: 481-488 [PMID: 24088959 DOI: 10.1038/ki.2013.368.24088959]
- 34 Li XG, Su N, Du XL, Chen L. [Cell lineage tracing]. *Shengli Kexue Jinzhan* 2014; 45: 379-384 [PMID: 25764799]
- 35 Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol* 1981; 150: 467-486 [PMID: 6276557]
- 36 Nagy A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 2000; 26: 99-109 [PMID: 10686599 DOI: 10.1002/(SICI)1526-968X(200002)26:2<99::AID-GENE1>3.0.CO;2-B]
- 37 Hoess RH, Wierzbicki A, Abremski K. The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination. *Nucleic Acids Res* 1986; 14: 2287-2300 [PMID: 3457367 DOI: 10.1093/nar/14.5.2287]
- 38 Kos CH. Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models. *Nutr Rev* 2004; 62: 243-246 [PMID: 15291397 DOI: 10.1111/j.1753-4887.2004.tb00046.x]
- 39 Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2007; 282: 23337-23347 [PMID: 17562716 DOI: 10.1074/jbc.M700194200]
- 40 Yang L, Jung Y, Omenetti A, Witek RP, Choi S, Vandongen HM, Huang J, Alpini GD, Diehl AM. Fate-mapping evidence that hepatic stellate cells are epithelial progenitors in adult mouse livers. *Stem Cells* 2008; 26: 2104-2113 [PMID: 18511600 DOI: 10.1634/stemcells.2008-0115]
- 41 Taura K, Miura K, Iwaisako K, Osterreicher CH, Kodama Y, Penz-Osterreicher M, Brenner DA. Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2010; 51: 1027-1036 [PMID: 20052656 DOI: 10.1002/hep.23368]
- 42 Scholten D, Osterreicher CH, Scholten A, Iwaisako K, Gu G, Brenner DA, Kisseleva T. Genetic labeling does not detect epithelial-to-mesenchymal transition of cholangiocytes in liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 2010; 139: 987-998 [PMID: 20546735 DOI: 10.1053/j.gastro.2010.05.005]
- 43 Chu AS, Diaz R, Hui JJ, Yanger K, Zong Y, Alpini G, Stanger BZ, Wells RG. Lineage tracing demonstrates no evidence of cholangiocyte epithelial-to-mesenchymal transition in murine models of hepatic fibrosis. *Hepatology* 2011; 53: 1685-1695 [PMID: 21520179 DOI: 10.1002/hep.24206]
- 44 Troeger JS, Mederacke I, Gwak GY, Dapito DH, Mu X, Hsu CC, Pradere JP, Friedman RA, Schwabe RF. Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis resolution in mice. *Gastroenterology* 2012; 143: 1073-1083.e22 [PMID: 22750464 DOI: 10.1053/j.gastro.2012.06.036]
- 45 Michelotti GA, Xie G, Swiderska M, Choi SS, Karaca G, Krüger L, Premont R, Yang L, Syn WK, Metzger D, Diehl AM. Smoothed is a master regulator of adult liver repair. *J Clin Invest* 2013; 123: 2380-2394 [PMID: 23563311]
- 46 Swiderska-Syn M, Syn WK, Xie G, Krüger L, Machado MV, Karaca G, Michelotti GA, Choi SS, Premont RT, Diehl AM. Myofibroblastic cells function as progenitors to regenerate murine livers after partial hepatectomy. *Gut* 2014; 63: 1333-1344 [PMID: 24173292 DOI: 10.1136/gutjnl-2013-305962]
- 47 Guo W, Keckesova Z, Donaher JL, Shibue T, Tischler V, Reinhardt F, Itzkovitz S, Noske A, Zürrer-Härdi U, Bell G, Tam WL, Mani SA, van Oudenaarden A, Weinberg RA. Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell* 2012; 148: 1015-1028 [PMID: 22385965 DOI: 10.1016/j.cell.2012.02.008]
- 48 Scheel C, Eaton EN, Li SH, Chaffer CL, Reinhardt F, Kah KJ, Bell G, Guo W, Rubin J, Richardson AL, Weinberg RA. Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell* 2011; 145: 926-940 [PMID: 21663795 DOI: 10.1016/j.cell.2011.04.029]
- 49 Feil S, Krauss J, Thunemann M, Feil R. Genetic inducible fate mapping in adult mice using tamoxifen-dependent Cre recombinases. *Methods Mol Biol* 2014; 1194: 113-139 [PMID: 25064100 DOI: 10.1007/978-1-4939-1215-56]
- 50 Romagnani P, Rinkevich Y, Dekel B. The use of lineage tracing to study kidney injury and regeneration. *Nat Rev Nephrol* 2015; 11: 420-431 [PMID: 25963592 DOI: 10.1038/nrneph.2015.67]

编辑: 韦元涛 电编: 闫晋利

