

技术与方法

牛肝干细胞的分离培养与鉴定

邵琦¹ 张才^{1,2*} 李鹏飞¹ 宋新茹¹ 李元晓² 王玉琴²¹河南科技大学环境与畜产品安全实验室, 洛阳 471000; ²河南省肉羊繁育工程技术研究中心, 洛阳 471000)

摘要 该实验旨在分离牛肝干细胞, 培养观察其生长特性, 为比较医学研究及开发牛肝脏体外研究工具提供实验基础。实验采用改良的离体两步胶原酶灌注法, 结合密度梯度离心分离牛肝干细胞, 观察细胞形态及生长特性, 并利用免疫荧光染色和PCR对牛肝干细胞相关标志物进行鉴定。实验分离的细胞接种48 h开始贴壁分裂, 随后呈集落样生长, 表现出干细胞的特性, 低密度下培养504 h后细胞呈肝细胞样分化。正常接种密度的细胞可传至P3代, HE染色可见细胞均为单核, 核浆比大, 呈幼稚低分化状态; 免疫荧光染色和PCR结果均显示, 该细胞表达甲胎蛋白AFP、上皮细胞黏附蛋白(EpCAM)、造血干/祖细胞表面标志CD34、干细胞因子受体蛋白(c-kit)、细胞角蛋白CK18、CK19。结果表明, 该研究分离了一种具有明显干细胞特征, 并表达成熟肝细胞和胆管上皮细胞表面标志物的牛肝干细胞。

关键词 牛; 肝脏干细胞; 密度梯度离心; 免疫荧光染色

Isolation, Culture and Identification of Cattle Liver Stem Cells

SHAO Qi¹, ZHANG Cai^{1,2*}, LI Pengfei¹, SONG Xinru¹, LI Yuanxiao², WANG Yuqin²¹Laboratory of Environment and Livestock Product Safety, Luoyang 471000, China;²Henan Sheep Breeding Engineering Research Center, Luoyang 471000, China)

Abstract The aim of this study was to explore the *in vitro* growth characteristics of live stem cells isolated from Holstein dairy cattle, which provided research tools for comparative medical science. The stem cells were isolated by the modified two-step collagenase perfusion method, then purified by percoll single density gradient centrifugation. The expression of liver stem cell surface markers was detected by immunofluorescence and PCR. The isolated cells were adherent and emerged active proliferation capacity after 48 h. Cells cultured in low growth density can differentiate into hepatocyte-like cells after cultured 504 h. Cells in normal growth density can be transmitted to the P3 generation, which had large cell cytoplasm ratio and was mononuclear, infantile and in low differentiation state, shown by HE staining. In addition, AFP (alpha-fetoprotein), EpCAM (epithelial cell adhesion protein), hematopoietic stem cell surface markers CD34, c-kit (stem cell factor receptor protein), cell keratin CK18, CK19 were expressed by the P3 generation cells. The results indicated that the isolated liver stem cells were well characterized and expressed the markers of mature hepatocytes and bile duct epithelial cells.

Keywords cattle; liver stem cells; density gradient centrifugation; immunofluorescence staining

肝脏是脊椎动物最大的消化器官, 承担机体能量储存代谢、氨基酸利用、解毒等多种重要生理功

收稿日期: 2019-11-29 接受日期: 2019-12-09

国家自然科学基金(批准号: 31402263、31872537)和河南省自然科学基金(批准号: 182300410087)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13700790157, E-mail: zhangcai@haust.edu.cn

Received: November 29, 2019 Accepted: December 9, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31402263, 31872537) and the Natural Science Foundation of Henan Province of China (Grant No.182300410087)

*Corresponding author. Tel: +86-13700790157, E-mail: zhangcai@haust.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5183>

能。肝脏干细胞(liver stem cell, LSC)是肝脏中一类具有自我复制能力的多潜能细胞,具有干细胞的一般属性,其在体内微环境下能维持增殖状态并进一步分化为不同的成熟细胞来维持组织更新,在肝脏强大自我稳态乃至整个机体系统性稳态的维持中发挥着关键作用^[1]。在成体动物肝脏中,干细胞数量很少,占总细胞数的0.5%~1.5%^[2-3]。肝脏干细胞根据起源不同可分为非肝源性LSC和肝源性LSC。非肝源性LSC包括胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)和骨髓来源的造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)、骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSC);肝源性干细胞包括肝祖细胞(hepatic progenitor cell, HPC)和小肝细胞(small hepatocyte-like progenitor cell, SHPC)^[4]。目前,通常将具有双向分化潜能的肝祖细胞HPC称为真正意义上的肝干细胞,研究最为广泛^[5-7],本文统一称作肝干细胞。

分离肝干细胞多以灌流消化为基础,再通过免疫磁珠分离、流式细胞分选、Percoll密度梯度离心或酶差速消化法纯化^[8-10]。流式细胞术、免疫磁珠分选虽然分离细胞纯度较高,但需要特殊仪器和抗体,费用高昂,在畜禽研究中应用较少。相较而言,Percoll密度梯度离心法成本较低,且操作过程简单、耗时短,可减少对细胞活性的损伤,为大多数研究人员所使用^[11-14]。在肝干/祖细胞鉴定方面,由于还缺乏特异性的标志物,可通过检测甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)、白蛋白(albumin, ALB)、转甲状腺素蛋白(transthyretin, TTR)、细胞角蛋白7(cytokeratin 7, CK7)、细胞角蛋白8(cytokeratin 8, CK8)、细胞角蛋白18(cytokeratin 18, CK18)、细胞角蛋白19(cytokeratin 19, CK19)、干细胞因子受体蛋白(stem cell factor receptor protein, c-kit)、CD34分子等与其来源及分化潜能相关的蛋白进行鉴定^[7,15-18]。目前,奶牛HPC的分离培养和鉴定等方面研究还未见报道,为获得奶牛HPC,本实验采用改良离体两步灌流法^[19]分离牛肝脏细胞,Percoll密度梯度离心法进一步纯化,对肝干细胞进行原代和传代培养,观察其生长特性,采用PCR技术和细胞免疫荧光法进行鉴定,以期为成体哺乳动物肝干细胞的研究及比较医学等后续应用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

1日龄荷斯坦公犊牛(45~50 kg),购自洛阳孟津

县某牛场,实验已通过河南科技大学学术伦理委员会许可。

1.2 主要试剂和仪器

主要试剂及耗材包括:DMEM高糖培养基、10%胎牛血清、胶原酶IV购自美国Gibco公司;地塞米松、胰岛素(终浓度 10^{-6} mol/L)购自Sigma公司;100×青链霉素(终浓度100 IU/mL)、锥虫蓝染液、胰蛋白酶、Percoll细胞分离液、糖原PAS染色试剂盒、TriQuick Reagent总RNA提取试剂购自北京索莱宝科技有限公司;PrimeScript™ RT Master Mix、Premix Taq™购自TaKaRa有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

一次性细菌滤器(0.22 μm, SLGV033RB)购自北京索莱宝科技有限公司;离心管购自无锡NEST生物科技有限公司;T25培养瓶、细胞培养板购自美国Corning公司。

主要仪器包括:CO₂培养箱(德国Thermo公司,Scientific forma 311型)、pH仪(上海仪电科学仪器股份有限公司,pHSJ-4F型)、生物型安全柜(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司,BSC-100II B2)、水平转子离心机(长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司)、倒置相差显微镜(德国ZEISS公司)和PCR仪(美国Bio-Rad公司)。

1.3 牛肝干细胞的灌流消化、分离

参照本课题组建立的分离犊牛肝细胞的方法^[19],无菌取犊牛肝脏尾状突,转移至超净台内,用预热的灌流液对肝组织冲洗、灌流。观察到肝脏逐渐失去血色,被膜下组织疏松呈龟裂状,流出的灌流液开始出现浑浊时停止灌流。将其迅速剪碎后加入50 mL预冷胎牛血清,终止消化,剔除组织血管、筋膜,依次使用80目、180目筛网过滤得到组织悬液。

将组织悬液离心(50 ×g, 5 min)收集上清,再将上清离心(200 ×g, 5 min)留取沉淀得到肝脏非实质细胞。PBS清洗2~3次,用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基重悬细胞,稀释至 1×10^6 个/mL细胞密度待下一步纯化。

1.4 牛肝干细胞的纯化

用胎牛血清润洗离心管壁后,依次将50% Percoll分离液、细胞悬液沿管壁缓慢注入管内,离心(4 °C, 600 ×g, 10 min)吸弃培养基及分离液,重悬管底细胞沉淀,PBS清洗2~3次。

1.5 牛肝干细胞的原代培养及形态学观察

用含10%胎牛血清、胰岛素(10^{-6} mol/L)、地塞

表1 PCR引物序列及参数

Table 1 Sequences and parameters of primers for PCR

基因 Gene	登录号 NCBI accession No.	长度/bp Length /bp	引物序列 Primer
<i>AFP</i>	NM_001034262.2	227	F 5'-GAC CAG GAA AAT GGC GAA CG-3' R 5'-ATG GTG GAG GCA CGT ATG TC-3'
<i>c-kit</i>	NM_001166484.1	255	F 5'-CGC CGT TGC TGA TTG GTT TT-3' R 5'-CGG TGG CCT CAA CAA CTT TC-3'
<i>CD34</i>	NM_174009.1	118	F 5'-AAG CAC CAG CCT CTA CGA TG-3' R 5'-TGG ACA GAA GAG TTC ACG GC-3'
<i>EpCAM</i>	NM_001035290.1	185	F 5'-GCA GAC CAG GAA GGA TGT GT-3' R 5'-TTC CCT CTT CTC CCG GAC TT-3'
<i>CK18</i>	NM_001192095.1	158	F 5'-GAT TGC CAA CTC TGG GCT GA-3' R 5'-TGG TGC TCT CCT CAA TCT GC-3'
<i>CK19</i>	NM_001015600.4	185	F 5'-GAG GCT GAC ATC AAT GGC CT-3' R 5'-GGA GCA GAA TCC ACC TCC AC-3'

米松(10^{-6} mol/L)的DMEM高糖培养基重悬细胞,并调整细胞密度为 2×10^4 个/mL,接种于T25培养瓶内进行原代培养,每隔24 h在倒置显微镜下拍照,观察其生长状态及形态变化,间隔48 h换液。按试剂盒说明书对培养至168 h和504 h的肝干细胞进行过碘酸雪夫染色(periodic acid-schiff stain, PAS染色)。

1.6 牛肝干细胞的传代培养

原代细胞培养10天后进行第1次传代,消化时弃培养基,加入0.25%胰蛋白酶孵育2.5 min,显微镜下观察大部分细胞开始变圆直至飘起时,立即加入等体积预冷的培养基终止消化。吹打吸取悬液离心($50 \times g$, 5 min),调整细胞密度 1×10^5 个/mL,接种于T25培养瓶继续培养,间隔1 h观察其贴壁情况。观察细胞增殖情况,间隔48 h换液,以后每5~7天传代1次。

1.7 HE染色

取24孔板爬片,用培养基浸湿后置于细胞培养板内,以 1×10^5 个/mL密度接种P3代细胞,取100 μ L悬液接种于细胞爬片上,显微镜下十字晃法将爬片上的细胞均匀分布于爬片上。将其放入培养箱中孵育30 min,观察细胞贴壁后再在每孔中加入900 μ L培养基继续培养。

爬片固定及染色:培养3天后,用1 mL注射器针头辅助勾取,用镊子取出爬片,PBS清洗1次,4%多聚甲醛固定,苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE染色)HE染色,显微镜下观察细胞形态。

1.8 聚合酶链式反应(PCR)扩增特异目的基因

严格参照Trizol试剂说明提取P3代细胞肝干细胞总RNA,经核酸浓度测定仪检测RNA浓度,用

0.8%琼脂糖凝胶电泳鉴定RNA完整性后反转录为cDNA储存;普通PCR扩增特异目的基因,将扩增产物经1%的琼脂糖电泳检测。用以扩增目的基因的引物序列见表1,委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR反应程序:95 $^{\circ}$ C预变性30 s;然后95 $^{\circ}$ C变性10 s,56 $^{\circ}$ C复性30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,共34个循环;最后72 $^{\circ}$ C总延伸5 min,4 $^{\circ}$ C保存。

1.9 细胞免疫荧光染色

取P3代细胞,制作爬片,参考步骤1.7,培养3天后用4%多聚甲醛4 $^{\circ}$ C固定过夜。加破膜工作液室温孵育20 min,PBS洗3次后滴加用3% BSA室温封闭30 min。一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜,加入兔抗牛的AFP、EpCAM、c-kit、CD34、CK18和CK19的单克隆抗体,室温孵育50 min。DAPI复染细胞核:爬片置于PBS中在脱色摇床上晃动洗涤3次,稍甩干后滴加DAPI染液,避光室温孵育10 min。加入抗荧光淬灭封片剂封片,镜检拍照。

2 结果

2.1 牛肝干细胞的原代培养及形态学观察

如图1所示,通过Percoll单密度梯度纯化的肝干细胞光镜下可见细胞形态大小均一,20~30 μ m,呈卵圆形紧密排列,折光率高。这与按照我们课题组同样分离方法^[9]得到的牛肝细胞有明显不同(图1B),肝细胞体外培养呈多边形、扁平状,铺路石样排列,大小80~120 μ m,体外不能增殖及传代,培养约14天后脱落死亡。

肝干细胞接种后48 h开始贴壁,可见细胞体积

变大, 伸出伪足, 有的可以观察到正在分裂的细胞板; 96 h即可观察到细胞克隆样生长, 随后第120 h、第168 h观察拍照, 可见该群细胞增殖旺盛, 形成的集落样细胞群面积逐渐扩大。此后细胞增殖速度减缓, 培养至第240 h(10天)后细胞数量几乎不再变化。在不加任何细胞因子的条件下继续培养, 观察发现部分低密度区域细胞脱离集落, 体积变大变扁, 出现分化迹象。培养至504 h, 细胞分化形似肝细胞样, PAS染色自分化细胞显示存在双核(图1C中箭头所指), 但对比未分化细胞, 胞浆中糖原颗粒不明显。

2.2 牛肝干细胞的传代培养

如图2所示, P0代细胞增殖形成的集落样细胞群, 经消化传代后贴壁及增殖速度明显加快, 2~4 h可全部

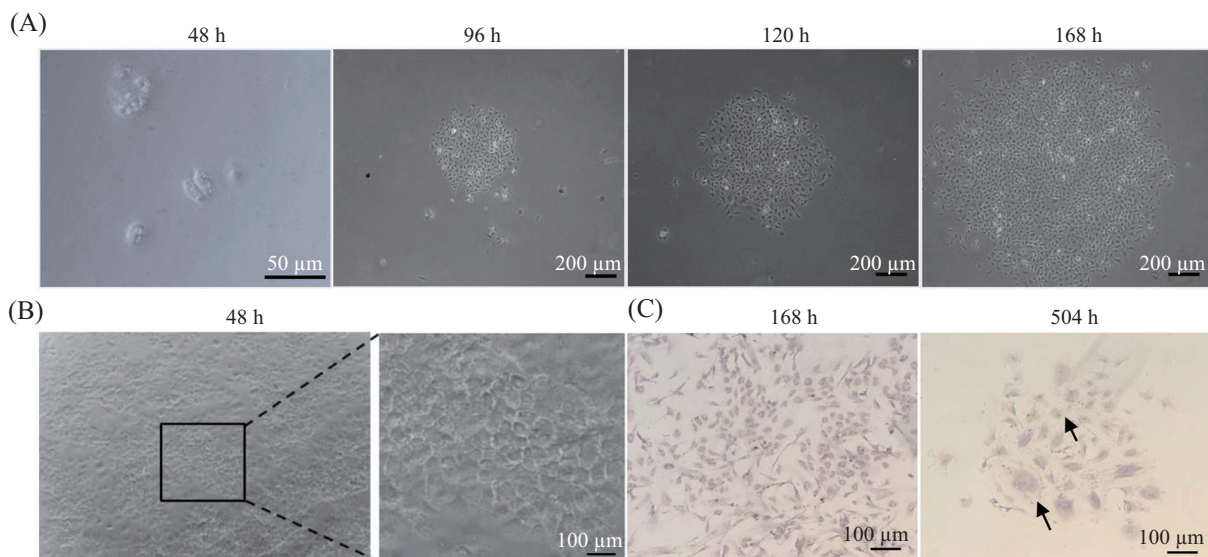
贴壁, 5~7天可传代1次; P1、P2代细胞的增殖活力最强, 但仍保持卵圆形态, 排列整齐且存在接触抑制。而传至P3代的细胞虽保持较强的分裂能力, 但开始出现新生细胞无法贴壁的现象, 细胞随之慢慢干枯或脱落死亡。

2.3 HE染色

如图3所示, 对P3代牛肝干细胞进行HE染色, 光镜下观察可见, 体外分离培养的P3代牛肝干细胞为单核的长梭形或多角形细胞, 细胞核占比大, 呈幼稚低分化状态。较稀的区域细胞会伸出长长的伪足相互连接, 呈长梭形; 细胞生长较密的区域, 细胞形态排列呈卵圆或多角形。

2.4 牛肝干细胞的鉴定

如图4所示, P3代的牛肝干细胞, 经细胞免疫荧



A: 肝干细胞培养48 h、96 h、120 h、168 h; B: 肝细胞培养48 h, 黑色框线内细胞为铺路石样排列的肝细胞; C: 肝干细胞培养168 h、504 h(PAS染色), “↑”箭头所指为双核肝样细胞。

A: liver stem cells cultured after 48 h, 96 h, 120 h, 168 h; B: hepatocytes cultured after 48 h, inside the black box is liver cells arranged like paving stones; C: PAS glucogen staining of liver stem cells cultured after 168 h and 504 h, “↑” points at hepatocyte like cells.

图1 牛肝干细胞的原代培养及形态学观察

Fig.1 Primary culture and morphological observation of bovine liver stem cells

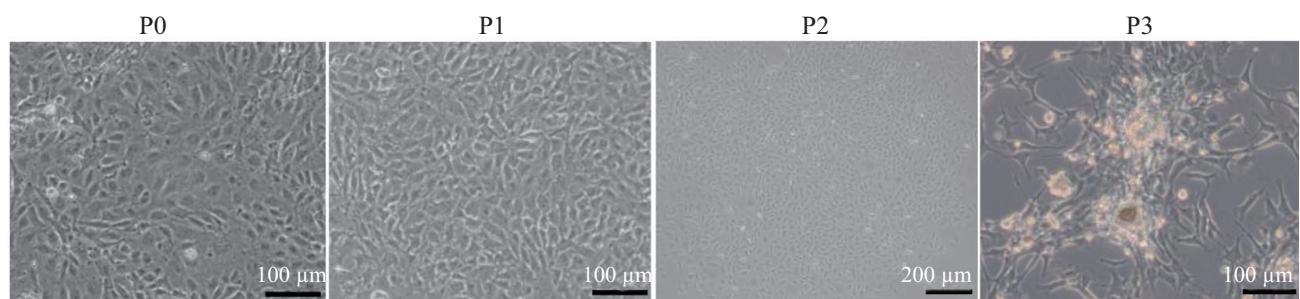


图2 倒置显微镜下不同代次牛肝干细胞生长特性

Fig.2 Subcultivation of cattle liver stem cells were observed under inverted microscope

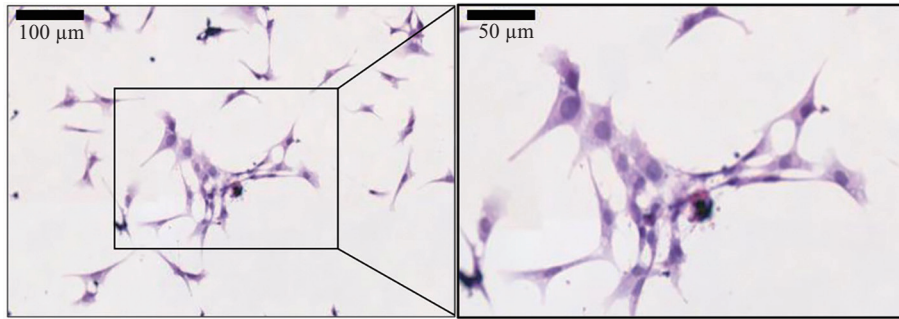
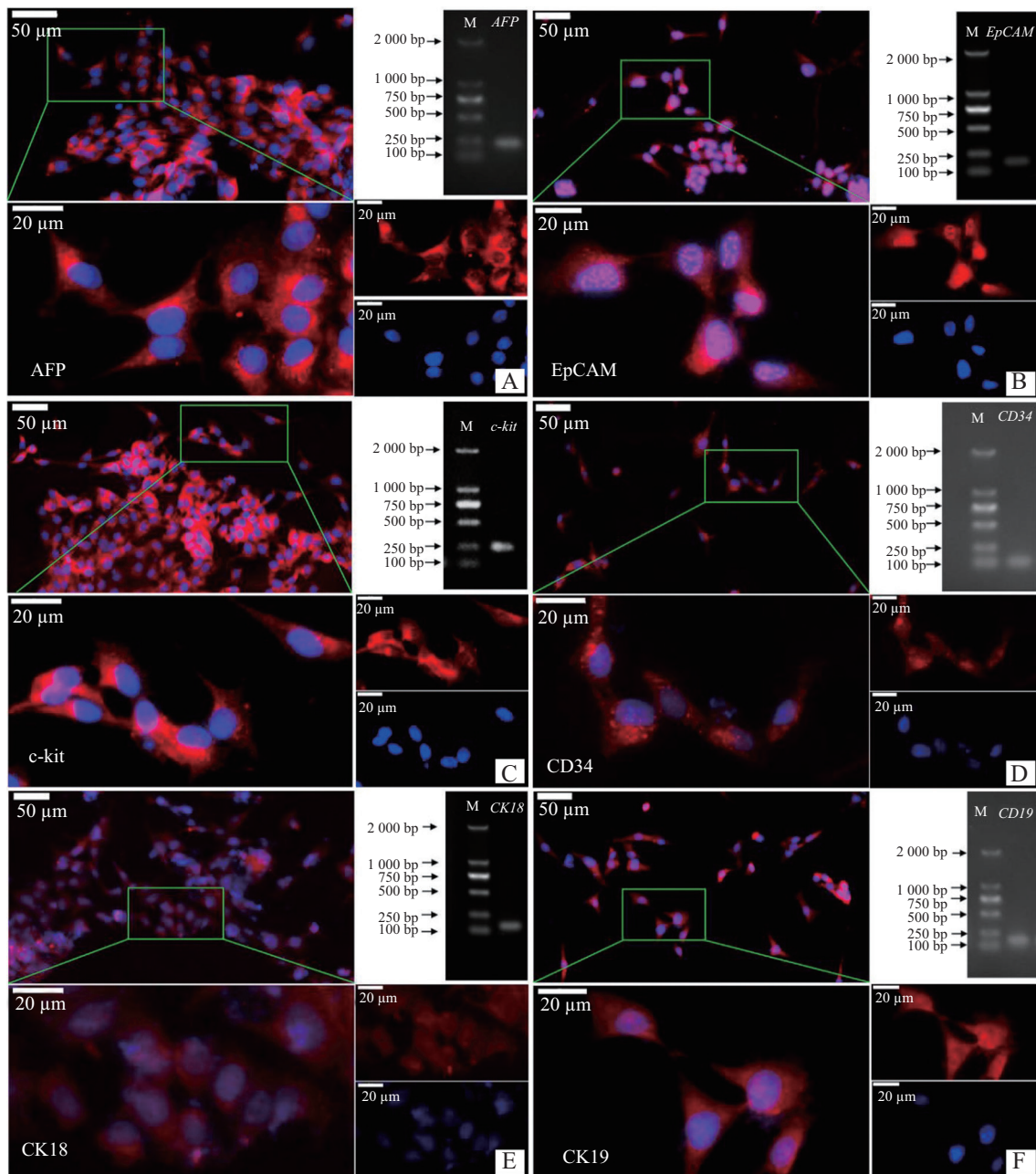


图3 牛肝干细胞形态观察

Fig.3 Morphology observation of cattle liver stem cells



A: AFP; B: c-kit; C: CD34; D: EpCAM; E: CK18; F: CK19; M: mark.

图4 P3代牛肝干细胞的鉴定(细胞免疫荧光及PCR电泳)

Fig. 4 The identification of P3 generation cattle liver stem cells (immunofluorescence and PCR)

光染色及聚合酶链式反应(PCR)鉴定,肝脏细胞标记 $AFP/CK18/CK19$;造血干/祖细胞表面标志 $c-kit/CD34$;肝卵圆细胞常见标志 $EpCAM$ 。上述基因在蛋白和mRNA水平验证结果均为阳性。结合DAPI核染结果计数统计,上述蛋白在该群细胞细胞阳性表达率可达95%以上。

3 讨论

3.1 肝干细胞的分离

肝脏细胞的分离条件对肝干细胞产量及后期培养活性有较大影响。本实验采用稍加改良的Selgen^[19]两步灌注法,在胶原酶消化前用含有 Ca^{2+} 的缓冲液冲洗,去除残留EDTA的干扰,并激活胶原酶的活性;而胶原酶的活性对温度和pH值敏感,控制IV型胶原酶的工作条件为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH值7.4, 0.02%浓度灌注肝组织15 min,该条件下能得到犊牛肝脏组织的最大的解离效率,肉眼可见消化成熟的肝组织呈粥状;选择 $50\times g$ 转速离心10 min,收集上清液中的肝非实质细胞,肝干细胞从肝非实质细胞中纯化可得^[9]。肝干细胞纯化方法有酶选择消化法、Percoll密度梯度离心、流式细胞术、免疫磁珠分选等^[8-10, 16]。酶选择消化法需要反复多次消化,本实验发现,多次消化对细胞损伤较大,得到的细胞纯度不高,在除去其他杂细胞的同时易大量丢失目的细胞,这与以往报道是相一致的^[16]。同时,肝干细胞在密度低时增殖缓慢,残留的成纤维样细胞很容易在肝干细胞增殖缓慢的环境下竞争生长,导致肝干细胞的纯度进一步降低。不同动物使用的Percoll分离条件略有不同,报道的小鼠和大鼠肝干细胞的分离多在30%~50%密度处^[10],猪肝干细胞在17.2%~28.7%^[20],人胎肝干细胞分离密度在64%~89%之间^[8]。刘卫辉等^[21]用Percoll离心法分离大鼠肝干细胞,先用50%~70%密度处得到有一定异质性的大鼠肝干细胞,又通过40%密度二次富集得到较为一致的细胞群。本实验尝试用50%和70%双密度梯度离心,得到细胞位于50%~70%之间,进一步尝试50%单密度得到与前者一致的结果。为提高肝干细胞纯化率,本实验还尝试将纯化的梯度分别设置为40%和45%,但都得到了异质性的肝干细胞。实验最终采用50% Percoll单密度梯度离心来纯化肝干细胞,获得的细胞形态大小均一,克隆样生长,排列紧密;细胞核浆比 $>1/2$,呈幼稚未分化状态。细胞接种后48 h细胞开始贴壁,72 h细胞显著增殖,

这与郭静^[9]实验中观察的结果相吻合。

3.2 肝干细胞的体外培养条件

在体内,肝干细胞受到细胞外基质包绕和与周围细胞的直接接触,共同构成了肝干细胞的三维立体微环境,在这种复杂的微环境的调控下肝干细胞缓慢增殖,维持组织更新^[1]。在体外,肝干细胞的培养同样需要特殊的环境。不同实验中,研究人员常用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基直接对肝干细胞进行培养,或添加生长因子如表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、白血病分化抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)来抑制其衰老分化^[9-10, 16]。由于细胞来源和培养条件不同,肝干细胞的体外维持周期不尽相同。本实验中,我们对初生犊牛肝干/祖细胞进行体外培养,在未包被胶原蛋白及添加生长因子的条件下,细胞的增殖贴壁情况良好,但细胞低密度时出现向肝细胞样自分化。正常密度下肝干细胞传至P3代仍保持较强的增殖活力,但出现子代细胞无法贴壁的现象,细胞随传代迅速丢失,这也提示我们实验下一步可尝试三维立体培养或添加粘附性蛋白等保证其贴壁效率,延长肝干/祖细胞的体外培养周期。

3.3 肝干细胞的表面标志

特异性的表面标志是识别、分离和纯化肝干/祖细胞的依据和标准,但由于肝干细胞在体内所处生理阶段不同,其表面标志也处于动态变化的过程,迄今为止还没有找到具有肝干细胞特异性、适用于分离和鉴定理想的表达标记,多根据其来源及分化潜能相关的蛋白进行鉴定。SUZUKI^[17]从孕13.5天的小鼠胚肝细胞中用流式细胞仪纯化了 $c\text{-met}^+$ 、 $CD49^{f/low}$ 、 $CD45^-$ 、 $c\text{-kit}^-$ 干性表型的细胞,在体外培养可保持肝干细胞特性,移植体内可分化为肝细胞、胆管细胞、小肠上皮细胞等;郭静^[9]报道了正常成年大鼠肝祖细胞表达肝细胞表面标志白蛋白 $+$ / $AFP^+/CK18^+/HNF-1a^+/HNF-4a^+$,胆管上皮表面标志 $CK19^+$,和造血干细胞表面标志 $Thy-1^+$ 、 $CD45^+$ 和卵圆细胞表面标志 $OV-6^+$; YANG等^[15]从肝损伤大鼠肝中用流式分离了 $Thy-1^+$ 细胞,表达 $AFP^+/CD34^+/c\text{-kit}^+$, Matrigel基质胶上培养可形成管状结构; HAO^[16]等从纤维化肝脏样本分离的肝干/祖细胞表达肝干细胞表面标志 $EpCAM^+$,肝脏细胞标记 $CK7^+/CK19^+/AFP^+$,造血干细胞标志 $Thy1^+/CD133^{-/low}$,该细胞经丁酸钠诱导后白蛋白分泌和尿素合成能力均有提高。本实验选用初生犊牛,分离其肝干细胞,经体外扩增培养

呈卵圆形克隆样生长,与肝细胞形态明显不同,且符合已报道的肝干细胞特征。经鉴定,该群细胞表达成熟肝细胞表面标志AFP、CK18,胆管上皮细胞表面标志CK19;同时表达造血干细胞表面标志c-kit、CD34和肝干卵圆细胞表面标志EpCAM,这表明,我们分离得到了一种类似于卵圆细胞的肝干/祖细胞,是否具有分化为肝细胞和胆管上皮细胞的潜能还需要进一步验证。

4 结论

实验结果表明,采用改良的离体两步胶原酶灌注法,结合50% Percoll密度梯度离心法分离肝干细胞,成功从犊牛肝脏中分离得到了可体外增殖的肝干细胞。肝干细胞可传至P3代,推测该细胞具有分化为肝细胞和胆管细胞的潜能,能否体外诱导分化成熟肝细胞还需要进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] WANG B, ZHAO L, FISH M, et al. Self-renewing diploid Axin2⁺ cells fuel homeostatic renewal of the liver [J]. *Nature*, 2015, 524(7564): 180-5.
- [2] ROUNTREE C B, DING W, DANG H, et al. Isolation of cd133⁺ liver stem cells for clonal expansion [J]. *J Visualized Exp*, 2011, 56(10): 3138.
- [3] TURNER R, LOZOYA O, WANG Y, et al. Human hepatic stem cell and maturational liver lineage biology [J]. *Hepatology*, 2011, 53(3): 1035-45.
- [4] GORDON G J, COLEMAN W B, HIXSON D C, et al. Liver regeneration in rats with retrorsine-induced hepatocellular injury proceeds through a novel cellular response [J]. *Am J Pathol*, 2000, 156(2): 607-19.
- [5] SHAFRITZ D A, OERTEL M, MENTHENA A, et al. Liver stem cells and prospects for liver reconstitution by transplanted cells [J]. *Hepatology*, 2006, 43: 2.
- [6] SANCHEZ A, FACTOR V M, SCHROEDER I S, et al. Activation of NF- κ B and STAT3 in rat oval cells during 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy-induced liver regeneration [J]. *Hepatology*, 2004, 39(2): 376-85.
- [7] CHEN J M, CHEN L, ZERN M A, et al. The diversity and plasticity of adult hepatic progenitor cells and their niche [J]. *Liver Int*, 2017, 37(9): 1260-71.
- [8] 张晔, 杜智, 张金卷, 等. 胎儿肝干细胞的分离、鉴定及培养[J]. 继续医学教育(ZHANG Y, DU Z, ZHANG J J, et al. Isolation, identification and culture of fetal liver stem cells [J]. *Continuing medical education*), 2009; 23(4): 36-9.
- [9] 郭静. 一种分离正常成年大鼠肝脏祖细胞新方法的研究. 浙江大学(硕士论文), 2011.
- [10] 于黎明, 陈姝, 何松. 具有双向分化潜能的鼠胎肝干细胞的分离、培养及鉴定[J]. 重庆医学(YU L M, CHEN Y, HE S. Isolation, culture and identification of rat fetal liver stem cells with bidirectional differentiation potential [J]. *Chongqing Medical*), 2016; 45: 1666-9.
- [11] HORNER R, KLUGE M, GASSNER J, et al. Hepatocyte isolation after laparoscopic liver resection [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2016, 22(9): 839-46.
- [12] MUSARO A, CAROSIO S. Isolation and culture of satellite cells from mouse skeletal muscle [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1553: 155-67.
- [13] SHIONO H, ITO Y. Novel method for continuous cell separation by density gradient centrifugation: evaluation of a miniature separation column [J]. *Prep Biochem Biotechnol*, 2003, 33(2): 87-100.
- [14] OISHI I. Improvement of transfection efficiency in cultured chicken primordial germ cells by percoll density gradient centrifugation [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, 74(12): 2426-30.
- [15] YANG L, LI S, HATCH H M, et al. *In vitro* trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells [J]. *PANS*, 2002, 99(12): 8078-83.
- [16] HAO P, LEE M, YU G, et al. Isolation of EpCAM⁺/CD133⁻ hepatic progenitor cells [J]. *Mol Cells*, 2013, 36(5): 424-31.
- [17] SUZUKI A, ZHENG Y W, KANEKO S, et al. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver [J]. *J Cell Biol*, 2002, 156(1): 173-84.
- [18] KUBOTA H, REID L M. Clonogenic hepatoblasts, common precursors for hepatocytic and biliary lineages, are lacking classical major histocompatibility complex class I antigen [J]. *PANS*, 2000, 97(22): 12132-7.
- [19] 张才, 王利民, 刘国文, 等. 犊牛肝细胞的分离与原代培养[J]. 细胞生物学杂志(ZHANG C, WANG L M, LIU G W, et al. The isolation and primary culture of calf hepatocytes [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2007; 29(6): 880-4.
- [20] HE Z, FENG M. Activation, isolation, identification and culture of hepatic stem cells from porcine liver tissues [J]. *Cell Proliferation*, 2011, 44(6): 558-66.
- [21] 刘卫辉. 大鼠胎肝干/祖细胞的离心富集和绿色荧光蛋白转染——利用Percoll离心技术富集移植种子细胞. 第四军医大学(硕士论文), 2009.