

肌成纤维细胞促进小鼠胚胎肝干细胞的增殖和分化

谢 言 杜文俊 李德卫*

(重庆医科大学附属第一医院肝胆外科, 重庆 400016)

摘要 移植细胞的增殖和分化需要微环境支持。作为最重要的微环境成分, 肌成纤维细胞在肿瘤的生长过程中发挥着重要作用。该实验Hepa1-6肿瘤细胞上清液在体外激活成纤维细胞分化为肌成纤维细胞, 探讨肌成纤维细胞上清对小鼠胚胎肝干细胞(embryonic hepatic stem cells, EHSCs) HP14.5增殖和分化的影响。实验将EHSCs HP14.5分为三组: DMEM培养液处理组(DMEM组)、成纤维细胞上清液处理组(CMFb组)及肌成纤维细胞上清液处理组(CMAFb组)。MTT法绘制三组HP14.5细胞生长曲线图, 免疫荧光法及Real-time PCR法检测分别测白蛋白(albumin, ALB)、甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)、细胞角蛋白18(cytokeratin 18, CK18)的蛋白及mRNA表达情况, PAS染色法检测糖原合成状况。MTT法检测显示, CMAFb组胚胎肝干细胞增殖明显速度较其他两组快。免疫荧光染色及Real-time PCR结果显示, HP14.5培养5 d后, CMAFb组ALB和CK18的蛋白及mRNA表达水平以及糖原合成水平显著高于CMFb组及DMEM组, 而AFP蛋白和mRNA表达水平明显降低。该实验表明, Hepa1-6激活的成纤维细胞能促进胚胎肝干细胞的增殖以及分化为有功能的成熟肝细胞。

关键词 肌成纤维细胞; 胚胎肝干细胞; 白蛋白; 细胞角蛋白18; 甲胎蛋白

Myofibroblast Promotes the Proliferation and Differentiation of Mouse Embryonic Hepatic Stem Cells

Xie Yan, Du Wenjun, Li Dewei*

(Department of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract Microenvironment is very important to proliferation and differentiation of transplanted cells. As a crucial composition of the microenvironment in tumor, myofibroblast influence the development of tumor cells deeply. This study focuses on the effect of fibroblast and myofibroblast on the proliferation of embryonic hepatic stem cells (EHSCs) HP14.5. In this research, two sorts of conditioned medium were harvested from the supernate of fibroblast (CMFb) and the supernate of myofibroblast (CMAFb) which came from the Hepa1-6 induced differentiation of fibroblast *in vitro*. The EHSCs HP14.5 were divided in 3 groups: DMEM group, CMFb group and CMAFb group. MTT was used to draw the curves of cell growth. Immunofluorescence staining and real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) were performed for detecting the albumin (ALB), alpha-fetoprotein (AFP) and cytokeratin18 (CK18) in protein and mRNA expression level. And the PAS staining was used to detect Glycogen synthesis. In the results, MTT showed faster proliferation of liver stem cells in CMAFb group compared with other groups; The Real-time PCR showed that the mRNA expression of *ALB*, *AFP* and *CK18* in

收稿日期: 2014-03-21 接受日期: 2014-04-25

重庆市自然科学基金一般项目(批准号: cstc2012jjA0313)资助的课题

*通信作者。Tel: 023-89011191, E-mail: lidewei406@sina.com

Received: March 21, 2014 Accepted: April 25, 2014

This work was supported by the Foundation for Sci & Tech Research Project of Chongqing (Grant No. cstc2012jjA0313)

*Corresponding author. Tel: +86-23-89011191, E-mail: lidewei406@sina.com

网络出版时间: 2014-07-02 10:37 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0085.html>

CMAFb group were much higher than in CMFb group and DMEM group after 5 days culture, while the number alpha-fetoprotein and mRNA expression level declined remarkably. Also, the similar results were observed in immunofluorescence. And the result of PAS staining suggested that the Glycogen synthesis in CMAFb group was much higher than the other two groups. Therefore, this research highly suggests that the fibroblasts activated by Hepa1-6 are able to increase the proliferation of EHSCs and differentiate the functional mature liver cells.

Key words fibroblast; EHSC; ALB; CK18; AFP

原位肝移植是目前临床上唯一可以治疗良性终末期肝病的方法, 但供肝紧缺、费用较高等原因使得其应用受限。人们在细胞移植领域进行了新的研究和探索, 使得肝细胞移植成为一种具有良好应用前景的过渡性治疗方法^[1]。但单纯肝细胞移植后, 临床治疗效果不佳, 可能由于移植后肝细胞失去原有组织结构微环境支持, 而成熟肝细胞分化能力有限, 无法重建原有的组织结构, 从而使得细胞增殖困难、存活受限。因此, 如何促进移植后肝细胞的增殖及分化能力成为研究热点。大量研究证明, 肿瘤的无限增殖能力及不断分化的能力不仅取决于肿瘤细胞本身, 肿瘤微环境在其发生发展过程中也起着十分重要的支持作用^[2]。作为肿瘤微环境的重要组成部分, 肌成纤维细胞分泌的多种细胞因子对肿瘤的增殖和分化有着十分重要的影响^[3-4]。由此提示, 是否可以通过肌成纤维细胞来促进胚胎肝干细胞的增殖及分化, 从而解决移植肝干细胞存活率低的问题呢? 本研究通过Hepa1-6小鼠肝癌细胞上清液在体外将成纤维细胞激活成肌成纤维细胞, 探究肌成纤维细胞对胚胎肝干细胞增殖及分化的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

孕12~14 d昆明小鼠, 由重庆医科大学动物中心提供。

1.2 细胞

Hepa1-6小鼠肝癌细胞(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库), 小鼠胚胎肝干细胞HP14.5(美国芝加哥大学分子肿瘤实验室提供)。

1.3 主要试剂

DMEM/F12培养基(Hyclone公司), DMEM高糖培养基(Gibco公司), 胎牛血清FBS(Gibco公司), 0.25%胰酶(Hyclone公司), 青霉素/链霉素双抗(Hyclone公司), α -SMA兔抗鼠单克隆抗体(Santa Cruz公司), ALB兔抗鼠单克隆抗体(Bioss公司), CK18兔抗鼠单

克隆抗体(Proteintech公司), AFP兔抗鼠单克隆抗体(Global biotech公司), DAPI(Beyotime公司), TRIZOL Reagent(Ambion 公司), RNase Inhibitor(Fermentas公司), Dnase I(Fermentas公司), RT mix(Vazyme公司), qPCR Master Mix(Bioneer公司), DEPC(Sigma公司), SDS(Amresco公司)。

1.4 方法

1.4.1 制备胚胎成纤维细胞 取孕12~14 d昆明小鼠, 颈椎脱臼死亡, 碘伏消毒后置于无菌手术操作台, 于下腹部正中逐层打开腹部, 暴露子宫。将其取下, 置于混有青霉素链霉素双抗的PBS液中, 移至超净台中。取出小鼠胚胎。将背部皮肤剪成约1 mm²大小的组织块, 离心, 加入0.25%胰酶, 置于37 °C水浴箱中消化20 min, 每隔5 min震荡摇匀1次。加入含血清的培养液终止消化, 1 000 r/m离心5 min, 弃上清液, 加入含有10%胎牛血清的DMEM/F12培养液, 吹打重悬, 将细胞接种于含3 mL培养液的细胞瓶内。最后将培养瓶置于37 °C、5% CO₂培养箱培养24 h后, 待成纤维细胞贴壁后换液, 除去培养瓶中的其他杂质细胞。

1.4.2 激活成纤维细胞 收集Hepa1-6小鼠肝癌细胞上清液后, 与等体积含20% FBS的2×DMEM/F12培养基混合在一起, 形成激活成纤维细胞用的条件培养基(CMHepa1-6组)。将培养至第二代的成纤维细胞分成两组, 第一组用普通 DMEM/F12培养液培养(DMEM/F12组), 作为对照组; 第二组用CMHepa1-6培养液培养(CMHepa1-6组), 以激活成纤维细胞成为肌成纤维细胞。

1.4.3 免疫荧光法检测肌成纤维细胞 α -SMA的表达 上述两组成纤维细胞培养5 d后, 分别爬片处理, PBS清洗后, 95%酒精固定约45 min, PBS清洗, 加入0.75% Triton破膜15 min, 吸除后加入10%山羊血清封闭60 min, 清洗后加入1:100兔抗鼠 α -SMA抗体, 4 °C过夜, PBS清洗后, 1:100 FITC孵育2 h, PBS清洗后, 1:5的DAPI染核15 min, 清洗后用1:1的甘油

封片。荧光显微镜下观察照相,若 α -SMA呈黄绿色,则表达为阳性。

1.4.4 HP14.5细胞的培养 前述两组成纤维细胞(DMEM/F12组和CMHepa1-6组)于培养第5 d均改用含10% FBS的DMEM/F12培养液培养,再分别每隔3 d同步收集两组成纤维细胞上清液,并分别与等体积分含20% FBS的2×DMEM培养基混合,配置成含成纤维细胞上清的条件培养液(CMFb)及含肌成纤维细胞条件培养液(CMAFb)。HP14.5细胞的培养分成三组,第一组用DMEM培养液培养(DMEM组),第二组用CMFb培养液培养(CMFb组),第三组用CMAFb培养液培养(CMAFb组)。

1.4.5 MTT法检测细胞增殖情况 调整3组HP14.5细胞密度成 $4 \times 10^3/\text{mL}$,接种于96孔板中,每孔180 μL 细胞悬液,每组6个复孔,在培养箱分别培养0, 1, 3, 5, 7 d,在达到培养时间的孔板中分别加入20 μL MTT溶液(5 mg/mL),孵育4 h后吸弃孔内上清液终止培养。每孔加入200 μL 二甲基亚砜,在摇床上振荡30 min待结晶物充分溶解。最后用酶联免疫检测仪在570 nm处测量各孔的吸光度(D)值,并绘制细胞生长曲线。

1.4.6 免疫荧光法检测HP14.5细胞蛋白表达情况 三组HP14.5在培养第5 d时,分别爬片处理,吸去培养液,PBS清洗后,95%酒精固定45 min,10%山羊血清封闭60 min,清洗后,每组样本中分为三个小组,相对应分别加入1:100兔抗鼠AFP、ALB及CK18抗体,4 °C过夜,PBS清洗,加入1:100二抗FITC孵育2 h,PBS清洗后,1:5的DAPI染核15 min,最后1:1甘油封片。荧光显微镜下观察,若各抗体染色呈黄绿色,说明表达为阳性。

1.4.7 Real-time PCR检测HP14.5细胞mRNA的表达情况 采用Trizol(lambion)一步抽提法分别提取三组培养5 d的HP14.5细胞总RNA,采用分光光度计测定RNA的含量和纯度,并将总量为500 ng的RNA在

10 μL 的反应体系中逆转录成cDNA; qPCR反应体系: 2×qPCR Master Mix(Bioneer) 10 μL ,上游引物0.4 μL ,下游引物0.4 μL ,cDNA模板2 μL ,补足ddH₂O至总体积20 μL 。反应条件: 94 °C预变性5 min; 95 °C变性10 s, 60 °C退火15 s, 72 °C延伸15 s, 40个循环。延伸阶段收集荧光信号,测各组HP14.5细胞中AFP、ALB、CK18 mRNA的相对含量。结果采用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法进行相对表达量统计计算。引物由钟鼎生物公司设计(表1)。

1.4.8 PAS法检测HP14.5细胞糖原染色情况 0.25%胰酶分别消化三组HP14.5细胞后接种于孔板,在第5 d时,用4%多聚甲醛固定10 min,用双蒸水清洗2 min,加入5% PAS染色5 min,双蒸水清洗2 min,加入Schiff solution染色15 min,双蒸水清洗2 min后,加入Hepatoxylin处理2 min,双蒸水清洗2 min后加入1% NH₄ON处理1 min,在倒置显微镜下观察。

1.5 统计学分析

使用SPSS 19.0软件进行统计分析,实验数据以均数±标准差表示,对数据进行单因素方差分析,两两比较采用LSD(Least significant difference,最小显著差值法), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫荧光检测 α -SMA表达情况

成纤维细胞经Hepa1-6上清液培养5 d后进行 α -SMA的免疫荧光染色。其结果显示,经Hepa1-6上清液共培养的成纤维细胞可表达大量的 α -SMA蛋白,而DMEM/F12培养的成纤维细胞的 α -SMA表达为阴性。该结果提示,经Hepa1-6肿瘤上清液培养5 d后,成纤维细胞能成功激活成肌成纤维细胞(图1)。

2.2 MTT法检测三组HP14.5的增殖情况

与DMEM组相比较,CMFb组和CMAFb组各个时间点细胞数均显著增多($P < 0.01$),提示成纤维细胞和肌成纤维细胞能促进HP14.5的增殖。其中,

表1 实时荧光定量PCR检测引物
Table 1 Primer sequences of Real-time PCR

基因 Gene	上游引物(5'→3') Forward primers (5'→3')	下游引物(3'→5') Reverse primers (3'→5')
AFP	ACG AGG AAA GCC CCT CAG	GCC ATT CCC TCA CCA CAG
ALB	CCA GAC ATT CCC CAA TGC	CAA GTT CCG CCC TGT CAT
CK-18	CTG GGC TCT GTG CGA ACT	ACA GAG CCA CCC CAG ACA
Actin	ATG TGG ATC AGC AAG CAG GA	AAG GGT GTA AAA CGC AGC TA

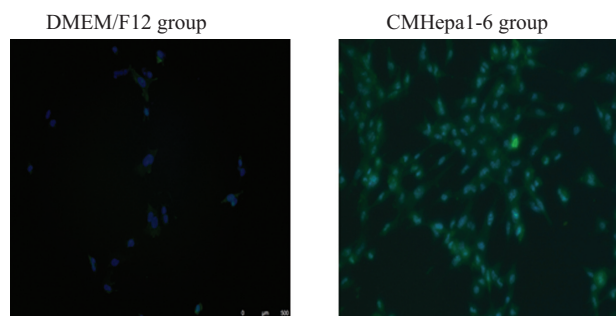


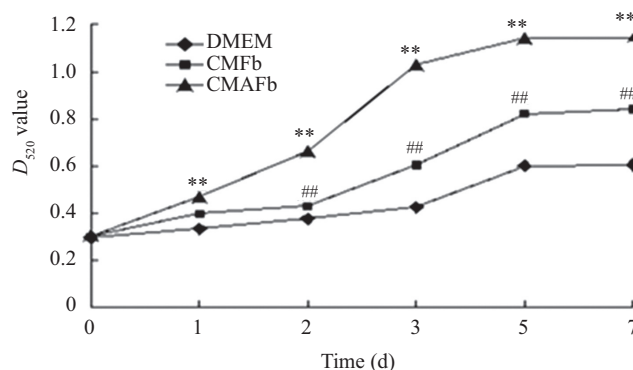
图1 免疫荧光检测 α -SMA的表达情况(200 $\times$)

Fig.1 Expressions of α -SMA detected by immunofluorescence staining (200 $\times$)

CMAFb组HP14.5细胞增殖速度明显快于CMFb组和DMEM组HP14.5细胞, 各时间点比较均有统计学意义($P < 0.01$)。CMAFb组HP14.5细胞在第3 d时达到增殖高峰, 在此之后进入平台期; 而CMFb组和DMEM组HP14.5细胞在第5 d时达到增殖高峰, 之后进入平台期(图2)。

2.3 免疫荧光法检测ALB、AFP及CK18的表达情况

细胞培养5 d后, DMEM组HP14.5细胞中AFP染



** $P < 0.01$, CMAFb组与CMFb组和DMEM组在同一时间点的比较; # $P < 0.01$, CMFb组和DMEM组在同一时间点比较。

** $P < 0.01$ CMAFb compared with CMFb and DMEM at the same time points; # $P < 0.01$ CMFb compared with DMEM at the same time points.

图2 HP14.5细胞在三组培养液培养下的增殖曲线

Fig.2 Proliferation curves of HP14.5 cultured in different mediums

色强阳性, ALB及CK18基本为阴性; CMAFb组细胞中ALB及CK18染色为强阳性, AFP染色阴性; CMFb组细胞中, AFP染色为阳性, 其荧光强度弱于DMEM组, 个别细胞呈阴性, 而ALB及CK18表达为阳性, 但荧光强度弱于CMAFb组。提示激活后的成纤维细

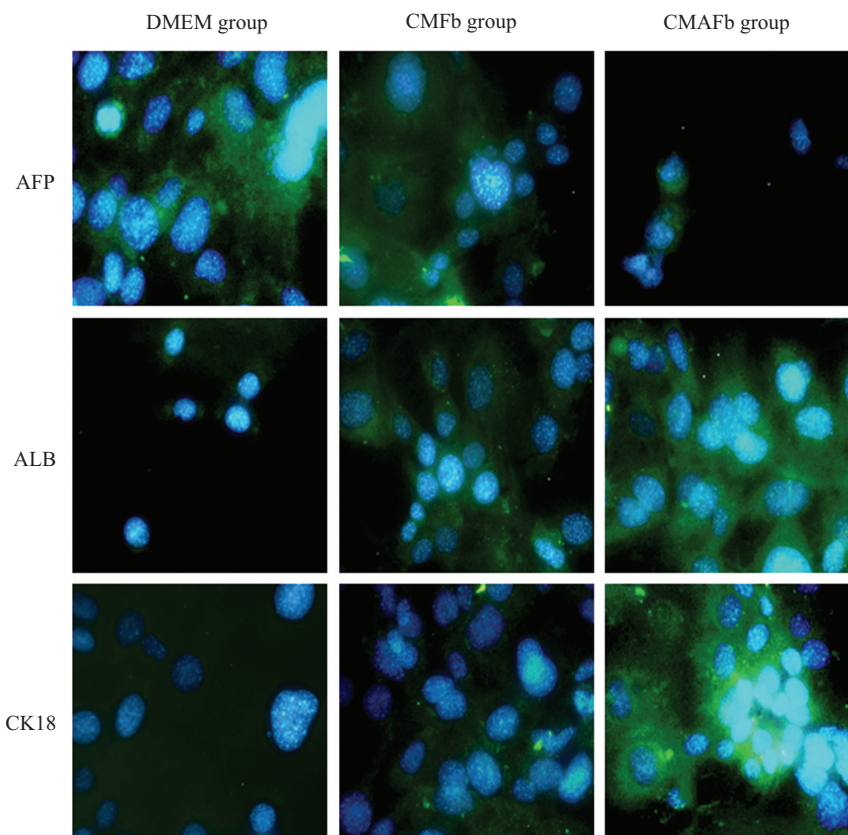


图3 免疫荧光法检测三组细胞AFP、ALB及CK18的表达情况(400 $\times$)

Fig.3 Immunofluorescence staining of AFP, ALB and CK18 in three groups (400 $\times$)

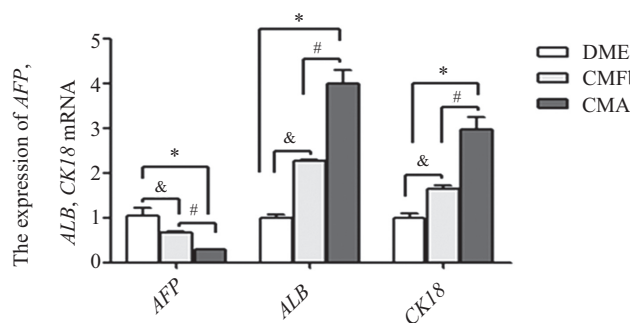
胞上清能促进胚胎肝细胞向成熟肝细胞的方向分化(图3)。

2.4 AFP、ALB及CK18 mRNA的表达

HP14.5细胞在不同培养基中培养5 d后进行ALB、CK18和AFP的RT-PCR检测。ALB和CK18检测结果为: CMAFb组>CMFb组>DMEM组($P<0.05$); 而AFP检测结果为: CMAFb组<CMFb组<DMEM组($P<0.05$)(图4)。

2.5 肝糖原的染色结果

三组HP14.5细胞培养5 d后, CMAFb组细胞中紫红色颗粒染色最深, 呈阳性反应, 而CMFb和DMEM组HP14.5细胞中紫红色颗粒染色较弱, 尤其是DMEM组细胞PAS染色几乎为阴性, 无糖原合成功能(图5)。



* $P<0.05$, DMEM组与CMAFb组间mRNA表达量比较; * $P<0.05$, DMEM与CMFb组间mRNA表达量比较; # $P<0.05$, CMAFb组与CMFb组mRNA表达量比较。

* $P<0.05$, DMEM compared with CMAFb; * $P<0.05$, DMEM compared with CMFb; # $P<0.05$, CMAFb compared with CMFb.

图4 Real-time PCR检测三组HP14.5细胞第5 d时肝细胞标志物的mRNA表达水平

Fig.4 The mRNA expression of markers in hepatic cell of three groups detected by Real-time PCR

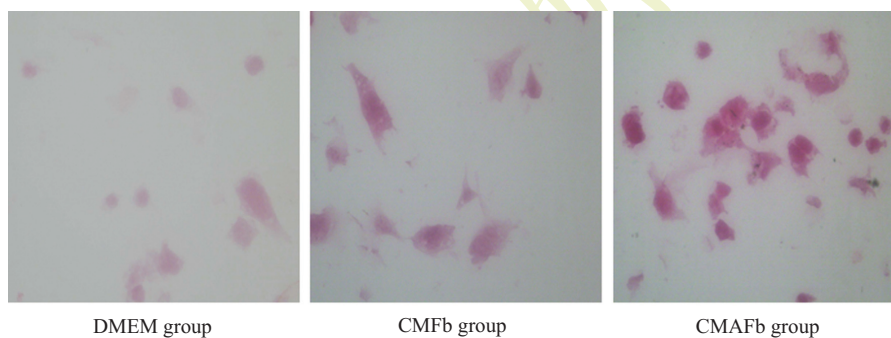


图5 不同培养组处理5 d后HP14.5细胞PAS染色(400×)

Fig.5 PAS stain of HP14.5 in different culture mediums after 5 d (400×)

3 讨论

我国是肝病大国, 每年因终末期肝病而死亡的人数高达30万~50万, 然而, 目前唯一有效的治疗手段——肝移植, 却因供肝的短缺, 使得开展受限。在不断的研究中发现, 肝细胞移植是一种很有前景的治疗方法^[5], 而移植后细胞的增殖和分化能力受限等问题却是细胞移植的主要障碍, 因此如何提高移植后细胞的增殖能力和分化能力成为本研究的主要目的。

目前, 已发现多种干细胞或祖细胞均具有分化为肝细胞的能力, 其中包括肝源性的卵圆细胞、胚胎肝干细胞、小肝细胞以及肝外源性的造血干细胞、骨髓间充质干细胞和胚胎干细胞等^[6]。胚胎肝干细胞作为肝干细胞的一类, 具有自我复制和自我更新的能力, 在适当的条件下可在宿主内长期增殖

和分化为特殊细胞, 与成熟肝细胞比较起来更具细胞移植的优势。本研究选取从孕14.5 d胎鼠肝脏中提取的胚胎肝干细胞细胞株HP14.5^[7], 作为本研究的种子细胞。胚胎肝干细胞的增殖及分化能力受多种因素的调控^[8], 而细胞因子的作用十分重要, 其中: HGF作为最强的有丝分裂剂, 与其受体C-met结合后能在早期有效的诱导肝干细胞成熟与分化, 并刺激其增殖^[9]; EGF是肝细胞增殖与分化的另一重要细胞因子, 可与受体(EGFR)结合, 刺激肝细胞增殖^[10]。SGF、FGF、PDGF等在调控肝细胞的增殖及促进其分化上也有很重要的作用。

有研究表明, 肿瘤细胞强大的增殖能力及分化能力不仅取决于其自身, 微环境中的肌成纤维细胞亦有很重要的作用。成纤维细胞在肿瘤细胞所产生的各种细胞因子如TGF- β 、PDGF、FGF- β 等的作用

下而分化为肌成纤维细胞,该细胞分泌的多种细胞因子和细胞外基质,在促进肿瘤细胞的增殖分化上起到了非常重要的作用^[11]。肝脏在受到损伤时,作为肝脏主要间质细胞之一的星状细胞会被活化,而激活的星状细胞实质为肌成纤维细胞^[12],该细胞能合成大量的ECM,并降低ECM的降解,同时能分泌HGF等细胞因子促进肝干细胞增殖并分化为成熟肝细胞,从而修复受损肝脏^[13]。

因此,根据肌成纤维细胞的作用,本研究采用激活的胎鼠肌成纤维细胞来刺激HP14.5胚胎肝干细胞的增殖与分化。虽然成纤维细胞于普通培养液中能在一定程度上能转化为肌成纤维细胞,但由于其表型不稳定,分化后的肌成纤维细胞易逆向分化为成纤维细胞;而在肿瘤上清的刺激后,它不仅能有效地分化为肌成纤维细胞,而且表型更为稳定^[14],因此本实验采用肿瘤上清激活成纤维细胞,使其成为稳定的肌成纤维细胞。

本研究用公认的肌成纤维细胞特殊标志物—— α -SMA来鉴别肌成纤维细胞^[15]。免疫荧光法检测显示CMHepa1-6组成纤维细胞 α -SMA蛋白表达明显高于DMEM/F12组,表明肿瘤细胞Hepa1-6上清液能够体外激活成纤维细胞。

在胚胎肝干细胞增殖影响的实验中,生长曲线图显示,CMAFb组的胚胎肝细胞增殖速度明显快于CMFb组及DMEM组($P<0.01$),CMFb组细胞增殖速度较DMEM组快($P<0.01$)。这说明,成纤维细胞对胚胎肝干细胞增殖有明显的促进作用,而肌成纤维细胞比成纤维细胞作用的效果更为显著,这可能与肌成纤维细胞合成更多的细胞因子相关。具体原因有待进一步研究。

胚胎肝干细胞的分化过程中,AFP是未成熟肝细胞的特殊标记物,仅在胚胎组织或细胞中表达,随着肝细胞的分化成熟,表达量逐渐下降^[16];ALB是成熟肝细胞合成的特殊蛋白,随着细胞的分化,其表达增多^[17],CK18作为构成肝细胞骨架的成分,通常被认为是成熟肝细胞的特异性表面抗原^[18],因此ALB及CK18被认为是成熟肝细胞的特殊标志物;成熟肝细胞内因为具有糖原储备功能,PAS染色后胞浆内有紫红色颗粒,因此可以根据颜色的变化来判断功能情况。

胚胎肝干细胞分化实验中,培养第5 d时,免疫荧光法显示,ALB及CK18的蛋白表达水平在CMAFb

组胚HP14.5细胞中呈阳性,而在CMFb组和DMEM组中为弱阳性和阴性;AFP的蛋白表达在DMEM组合CMFb组中分别呈强阳性和弱阳性,而于CMAFb组中,该蛋白几乎转为阴性。Real-time PCR结果显示,三个指标在三组中分别呈倍数关系:CMFAb组ALB及CK18的mRNA表达量分别是DMEM组的3.99与2.97倍、CMFb组的1.51与1.80倍(三组间各组mRNA表达水平差异具有显著性, $P<0.05$);AFP的mRNA表达量在DMEM组中最高,是CMFAb组的3.67倍,CMFb组的1.51倍(各组比较差异具有显著性, $P<0.05$)。PAS染色结果中,CMAFb组细胞紫红色颗粒最多,为强阳性;DMEM组细胞几乎无紫红色颗粒为阴性;CMFb组细胞糖原染色为弱阳性。上述结果提示,肌成纤维细胞能促进胚胎肝干细胞的分化为以ALB和CK18为特殊标志物的成熟肝细胞,且分化成的成熟肝细胞具有一定的功能。这可能是因为肌成纤维细胞能分泌一些细胞因子,如:TGF- β 、HGF、EGF及SGF等,而这些细胞因子在胚胎肝干细胞分化为成熟肝细胞的过程中起着不可或缺的作用^[19-20]。但肌成纤维细胞分泌的各种细胞因子是通过何种信号途径来促进胚胎肝干细胞增殖及分化,有待进一步研究。

以上实验证明了在体外环境下,肌成纤维细胞能在一定程度上促进胚胎肝干细胞的增殖和分化,这为如何提高胚胎肝干细胞的增殖及分化率提供了理论基础。

参考文献 (References)

- 1 Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A. Current status of hepatocyte transplantation. *Transplantation* 2012; 93(4): 342-7.
- 2 Swartz MA, Iida N, Roberts EW, Sangaletti S, Wong MH, Yull FE, *et al.* Tumor microenvironment complexity: Emerging roles in cancer therapy. *Cancer Res* 2012; 72: 2473-80.
- 3 Sirica AE. The role of cancer-associated myofibroblasts in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 9(1): 44-54.
- 4 Fuyuhiko Y, Yashiro M, Noda S, Matsuoka J, Hasegawa T, Kato Y, *et al.* Cancer-associated orthotopic myofibroblasts stimulates the motility of gastric carcinoma cells. *Cancer Sci* 2012; 103(4): 797-805.
- 5 Jorns C, Ellis EC, Nowak G, Fischler B, Nemeth A, Strom SC, *et al.* Hepatocyte transplantation for inherited metabolic diseases of the liver. *J Intern Med* 2012; 272(3): 201-23.
- 6 Vig P, Russo FP, Edwards RJ, Tadrous PJ, Wright NA, Thomas HC, *et al.* The sources of parenchymal regeneration after chronic hepatocellular liver injury in mice. *Hepatology* 2006; 43(2): 316-24.

- 7 Huang J, Bi Y, Zhu GH, He Y, Su Y, He BC, *et al.* Retinoic acid signalling induces the differentiation of mouse fetal liver-derived hepatic progenitor cells. *Liver Int* 2009; 29(10): 1569-81.
- 8 Ishii T, Yasuchika K, Ikai I. Hepatic differentiation of embryonic stem cells by murine fetal liver mesenchymal cells. *Methods Mol Biol* 2013; 946: 469-78.
- 9 Chen YF, Tseng CY, Wang HW, Kuo HC, Yang VW, Lee OK. Rapid generation of mature hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells by an efficient three-step protocol. *Hepatology* 2012; 55(4): 1193-203.
- 10 Collin de L'hortet A, Gilgenkrantz H, Guidotti JE. EGFR: A master piece in G₁/S phase transition of liver regeneration. *Int J Hepatol* 2012; 2012: 476910.
- 11 Marsh T, Pietras K, McAllister SS. Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832(7): 1070-8.
- 12 Friedman SL. Molecular mechanisms of hepatic fibrosis and principles of therapy. *J Gastroenterol* 1997; 32(3): 424-30.
- 13 Watanabe T1, Shibata N, Westerman KA, Okitsu T, Allain JE, Sakaguchi M, *et al.* Establishment of immortalized human hepatic stellate scavenger cells to develop bioartificial livers. *Transplantation* 2003; 75(11): 1873-80.
- 14 肖 衡, 杜成友, 罗诗樵. 不同浓度肿瘤细胞上清液对成纤维细胞生长及表型转化的影响. 第三军医大学学报(Xiao Heng, Du Chengyou, Luo Shiqiao. Effect of different concentrationsof tumorcell supernatant ongrowthandphenotypic transitionof fibroblasts. *Journal of Third Military Medical University*) 2011; 33(23): 2454-8.
- 15 Yang L, Chang N, Liu X, Han Z, Zhu T, Li C, *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiate to hepatic myofibroblasts by transforming growth factor- β 1 via sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P receptor axis. *Am J Pathol* 2012; 181(1): 85-97.
- 16 Sellamuthu S, Manikandan R, Thiagarajan R, Babu G, Dinesh D, Prabhu D, *et al.* *In vitro* trans-differentiation of human umbilical cord derived hematopoietic stem cells into hepatocyte like cellsusing combination of growth factors for cell based therapy. *Cytotechnology* 2011; 63(3): 259-68.
- 17 Piryaee A, Valojerdi MR, Shahsavani M, Baharvand H. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells on nanofibers and their transplantation into a carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model. *Stem Cell Rev* 2011; 7(1): 103-18.
- 18 Iacob R, Rüdrieh U, Rothe M, Kirsch S, Maasoumy B, Narain N, *et al.* Induction of a mature hepatocyte phenotype in adult liver derived progenitor cells by ectopic expression of transcription factors. *Stem Cell Res* 2011; 6(3): 251-61.
- 19 Ishikawa T, Factor VM, Marquardt JU, Raggi C, Seo D, Kitade M, *et al.* Hepatocyte growth factor/c-met signaling is required for stem-cell-mediated liver regeneration in mice. *Hepatology* 2012; 55(4): 1215-26.
- 20 Zhang L, Ye JS, Decot V, Stoltz JF, de Isla N. Research on stem cells as candidates to be differentiated into hepatocytes. *Biomed Mater Eng* 2012; 22(1/2/3): 105-11.