

# 胚胎肝干细胞的研究进展

张好建, 何祖平, 丰美福\*

(中国科学院动物研究所生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100080)

**摘要:**近年来的研究表明在胚胎肝脏中存在大量的肝干细胞, 它们在肝脏的发育中起着重要作用, 并且受到各种时序性表达基因的调控。几个研究组采用不同的方法, 分别从小鼠、大鼠和灵长类动物的胚胎肝脏分离并鉴定了具有双潜能的肝干细胞。就胚胎肝脏的发育、调控机制以及胚胎肝干细胞的分离、鉴定等方面的研究进展作一综述, 并对胚胎肝干细胞的应用前景和今后的研究方向作了展望。

**关键词:** 胚胎肝干细胞; 肝母细胞; 分离; 鉴定

**中图分类号:** Q28   **文献标识码:** A   **文章编号:** 0253-9977(2004) 01-01-05

基于人们对肝脏强大再生能力的认识, 以及对肝脏肿瘤发生学的研究, 很早就有人提出了肝干细胞存在的假说。经过几十年的研究, 人们逐渐接受并证实了这个假说<sup>[1-3]</sup>。由于肝干细胞在肝病的细胞治疗及组织工程应用等方面的潜在优越性, 使得肝干细胞成为当前的研究热点之一。现在一般认为成年肝脏中具有再生能力的细胞包括: (1) 肝细胞, 适当的刺激或者肝损伤可引起这种细胞的激活和增殖, 但它们只能向成熟肝细胞分化<sup>[4]</sup>; (2) 卵圆形细胞, 当肝脏受到损伤而肝细胞增殖受到抑制时就会激活这种细胞, 它们具有双潜能性, 能够分化为肝细胞和胆管上皮细胞<sup>[5,6]</sup>; (3) 多潜能干细胞, 这种细胞可能来自骨髓, 随血液循环进入肝脏<sup>[7, 8]</sup>。此外, 还有人认为来自胰腺的卵圆形细胞也具有向肝细胞分化的能力<sup>[9, 10]</sup>。

上述肝干细胞的研究, 多数是建立在对成年肝脏的损伤、切除或者癌变等模型的基础之上, 这类肝干/祖细胞存在的数量非常少。同时, 目前成年肝干细胞在体外大量扩增并保持未分化状态的问题仍然没有很好解决, 无法满足肝细胞移植的需求以及作为生物型人工肝的“种子”细胞, 所以许多研究者将目光投向了胚胎肝脏。一系列的研究证实了胎肝中存在着大量的干细胞<sup>[11, 12]</sup>。人们也在试图分离胎肝干细胞。我国苏娟等从小鼠胚胎肝脏中分离出肝干/祖细胞, 并进行了脾脏移植实验, 可形成肝细胞结节<sup>[13]</sup>。我们实验室也对人胎肝干/祖细胞作了初步研究。在此, 我们根据胚胎肝干细胞研究最新进展, 并结合自己的工作, 对胚胎肝干细胞

的研究作一综述。

## 1 胚胎肝脏发育中的干细胞

虽然目前对肝脏发育的机制知之甚少, 但可以肯定的是, 干细胞在整个肝脏的发育过程中起着重要作用。一般认为肝脏起源于腹侧前肠内胚层细胞, 这类细胞通常被看作是多潜能的干细胞。它们向肝脏特异分化的第一个标记是白蛋白 (albumin, ALB) 和甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)mRNA 的表达, 这两种基因的表达要先于细胞形态上的变化<sup>[14]</sup>。在小鼠胚胎第 8.5 - 9.5 天, 肝干/祖细胞迅速增殖。第 9.5 天后, 迁移到原始横膈, 并侵入周围的间充质组织, 形成肝原基 (liver diverticulum)。在胚胎第 10.5 天, 肝原基内开始形成血管, 这种血管的形成有助于促进肝细胞迅速增生<sup>[15]</sup>。在妊娠中期, 开始出现肝实质细胞和胆管上皮细胞的分化。对于它们准确的世系发展虽然尚未有报道, 但一般认为胆管上皮细胞和肝细胞来自共同的祖细胞, 即肝母细胞 (hepatoblast)。由于肝母细胞具有双向分化潜能和较强的增殖能力, 我们将其看作是胎肝来源的一种干细胞。肝母细胞是只有一种类型还是存在非均质性或一个发育梯度, 目前尚不清楚。除了表达 ALB 和 AFP 外, 还

收稿日期: 2003-04-28; 修回日期: 2003-06-12

国家“十五”高技术研究发展计划(863计划)基金(批准号: 2001AA216051)和北京市自然科学基金资助项目(批准号: 7022023)。

\* 通讯作者, E-mail: fengmf@panda.ioz.ac.cn

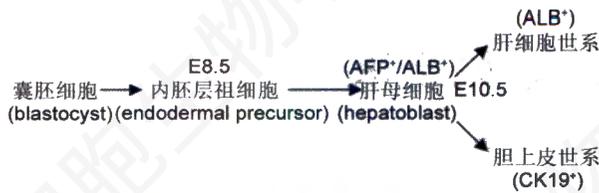


图1 胚胎肝脏发育示意图

表达 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶( $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, GGT),  $\alpha_1$ -抗胰蛋白酶( $\alpha_1$ -antitrypsin,  $\alpha_1$ -AT)等,并能根据周围微环境的变化出现表型的可逆性。综上所述,我们绘制了胚胎肝脏发育示意图(图1)。

肝脏发育中的信号及其调控机制引起了人们广泛兴趣。来自心肌中胚层的信号可以诱导ALB和AFP的mRNA表达水平的提高<sup>[14]</sup>。其中,成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors, FGFs) 1、2和8对于启动内胚层细胞肝特异基因的表达起着至关重要的作用<sup>[16]</sup>。胎肝同时肩负着造血功能,在胚胎第10天时造血细胞进入胎肝,而在此之前,可检测到血管生成细胞或内皮细胞,它们可能在肝原基形成之前就与内胚层细胞作用,提供一种器官形成因子,促进肝的形态发生,这要先于转录因子Hex、prox1的作用<sup>[15]</sup>。成年肝脏在病理状态下,内皮细胞分泌的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)通过肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)介导,能够促进肝细胞的增殖<sup>[17]</sup>。由此或许可以推断,在胎肝中内皮细胞很有可能也是通过VEGF来起作用的。肝细胞特异基因的表达主要是在转录水平上受到多种转录因子如肝细胞核因子(hepatocyte nuclear factor, HNF) 1、3、4、6和C/EBP的调控。利用基因剔除的小鼠模型,近来鉴定了一些在肝脏发育中的重要基因。第一个重要基因就是转录因子HNF-3 $\beta$ 和GATA4。它们是内胚层特化作用的必需基因。研究表明,HNF-3 $\beta$ 能提高HNF-4 $\alpha$ /HNF-1 $\alpha$ 及其下游靶基因的表达水平,起到正调控作用,而HNF-3 $\alpha$ 则与之竞争共同的DNA结合起点,起负调控作用<sup>[18]</sup>。骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)能够提高转录因子GATA4的表达水平,从而提高内胚层细胞对成纤维细胞生长因子的反应能力<sup>[19]</sup>,还有一些生长因子如c-jun、HGF和c-met也被证实肝原基形成过程中起重要作用<sup>[20~22]</sup>,而 $\beta$ -整合素( $\beta$ -integrins)则在肝脏发育后期起作用<sup>[23]</sup>。以上各种因子之间的关系,可简述如图2所示。

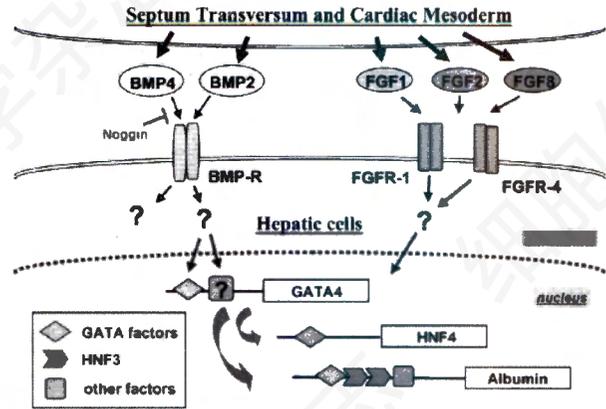


图2 胚胎肝脏发育调控示意图(引自: Biochimica et Biophysica Acta 1592(2002)303-312)

早期肝脏发育受到来自心肌中胚层的BMPs、FGFs等信号的调控,它们分别与各自的细胞表面受体作用,经过胞内的一些未知信使,传递到核内,通过转录因子GATA4、HNF4等,调控肝特异基因的表达。

值得注意的是,从分子水平了解肝脏发育的机制才刚刚开始,对这些因子的深入研究将有助于揭示肝干细胞增殖和分化的调控机理,而这些机理将很有可能应用到依赖干/祖细胞的肝再生医学和肝干细胞生物学。

## 2 胚胎肝干细胞的分离和鉴定

干细胞的分离和鉴定的理论基础是其生物学特性,包括细胞的形态和结构特征及生物学表型。肝干细胞生物学的研究也不例外,人们广泛地应用了不同细胞表面的特异标记物对肝干细胞进行分选和鉴定。一些标记物是基于酶组织化学方法的,但大多数则是依赖于可用抗体检测的细胞表面抗原的表达。但无论是成年肝脏干细胞,还是胚胎肝干细胞,都缺乏其特异的标记物,这给它们的分离和鉴定工作带来了极大的困难。就目前而言,研究人员主要依据干细胞所具有的两大大特性:自我更新能力和多向分化潜能来鉴定肝干细胞。几个研究组采用不同的方法,分别从小鼠、大鼠以及灵长类(包括人)的胚胎肝脏中分离并鉴定了肝干细胞<sup>[24~29]</sup>。

### 2.1 肝集落形成单位(H-CFU-C)

Suzuki等人根据胚胎肝脏发育中整合素(integrin)亚型随发育阶段不同在肝脏细胞的不同表达,采用单克隆抗体和荧光激活细胞筛选法(Fluorescence-activated cell sorting, FACS)从胎龄13.5天小鼠胚胎肝脏中分离出CD49f<sup>+</sup> CD29<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> c-kit<sup>-</sup> TER119<sup>-</sup>细胞。进行单细胞克隆,他

们将能在体外培养5天后形成多于100个细胞的集落称为H-CFU-C (Hepatic colony-forming unit in culture)。从形态上可将这些集落分成两种类型：①成纤维样细胞集落，它们无法呈上皮细胞团样生长；②多种形态混合的细胞集落，这种集落周边包围着铺展的成纤维样细胞，中心细胞紧密连接，形成不规则的鹅卵石状上皮层。这些细胞能沿着肝细胞和胆管上皮细胞的方向分化。培养3天时，免疫细胞化学很难检测到ALB和CK19的表达；而在5天时，则出现四种表型的集落：ALB<sup>+</sup>CK19<sup>-</sup>、ALB<sup>-</sup>CK19<sup>+</sup>、ALB<sup>+</sup>CK19<sup>+</sup>和ALB<sup>-</sup>CK19<sup>-</sup>；培养21天时，大多数集落都含有ALB<sup>+</sup>CK19<sup>+</sup>细胞。RT-PCR检测这些蛋白的表达以及体内的移植实验都说明这些细胞具有双潜能性。有趣的是，这些细胞刚分离时既不表达ALB也不表达CK19。进一步实验证实这些细胞中含有能向胰腺、肠上皮细胞分化的多潜能干细胞<sup>[24, 25]</sup>。

## 2.2 RT1A<sup>+</sup>OX18<sup>low/+</sup>ICAM-I<sup>+</sup>细胞

同样是采用FACS分选肝干细胞，但是与Suzuki等人不同的是，Kubota和Reid先是建立了三种不同的胚胎肝细胞系rhel4321、rter6和th1120-3，分析它们的生物学特征，特别是表面抗原，发现rhel4321细胞能在其子代细胞中仍然表达ALB和AFP，并能够形成形态单一的细胞集落，这些细胞不表达RT1A<sup>+</sup>(Fisher 344品系大鼠经典MHC-I分子)，低水平表达OX18(非多态性MHC-I分子)，而呈现ICAM-I(胞间黏附分子I)和integrin-β<sub>1</sub>阳性，利用这些表面特征采用FACS分离了胎龄13天大鼠的胚胎肝干细胞，发现具有RT1A<sup>+</sup>OX18<sup>low/+</sup>ICAM-I<sup>+</sup>特征的绝大多数细胞能形成ALB<sup>+</sup>AFP<sup>+</sup>集落，并且在一定的培养条件下，出现了CK19<sup>+</sup>细胞，即表明向胆上皮细胞分化，从而证实了这类细胞的双潜能性<sup>[26]</sup>。由于MHC-I在免疫耐受方面扮演着非常重要的角色，它呈递细胞表面内源性抗原到特异的CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞表面受体从而引起一系列免疫反应。肝母细胞中不表达经典的MHC-I分子，可能为肝干细胞同种异体移植的免疫逃逸提供了理论基础。

## 2.3 双潜能小鼠胚胎肝干细胞 (BMEL)

Weiss等采用“plate and wait”法，从胎龄14天小鼠胚胎肝脏分离出两种具有干细胞特性的细胞：上皮样细胞和形态混合型细胞。后者中包含有鹅掌状(palmate-like)细胞，这类细胞在低密度培养时为鹅掌状，而在高密度时，则呈现出上皮样。它们表达肝细胞核转录因子如HNF1α、HNF4α、

GATA4等，但是不表达一些功能蛋白如ALB、载脂蛋白(apolipoprotein, Apo)。这类细胞具有双潜能性，在特定的微环境下，它们能够表现出肝细胞或者胆管细胞的功能，被称为双潜能小鼠胚胎肝干(bipotential mouse embryonic liver, BMEL)细胞。另外，将其培养在Matrigel(一种人工构建的基底膜)环境下，能发生形态改变，形成胆管样结构<sup>[27]</sup>。由于BMEL细胞在无诱导刺激的体外培养过程中不能自发地分化，从而可以通过添加一些特定因子进行诱导分化，这使得它们成为体外研究肝干细胞定向分化的分子机制及信号转导的一种很好的模型。

## 2.4 永生化的灵长类胎肝干细胞 (IPFLS)

对于人类肝脏疾病的细胞治疗和基因治疗来说，分离与扩增灵长类甚至人类的胚胎肝干细胞才是最佳选择。Allain等从处于胎龄第89天的猕猴胎肝中分离细胞，它们大部分表达胎肝细胞标记物(如ALB、AFP)，只有少量细胞表达胆上皮标记物(如CK19、CK7)但具有较强的增殖能力。利用表达SV40大T抗原的逆转录病毒进行细胞转染，获得永生化的胎肝干细胞。这类细胞能同时表达ALB和CK19，表明它们具有双潜能性，并且经体内的移植试验证实无致瘤性。他们将这类细胞称为永生化的灵长类胎肝干细胞(IPFLS)。这给胚胎肝干细胞的临床应用带来无限生机<sup>[28]</sup>。后来，Malhi等人的研究表明大量的上皮干/祖细胞也可以从人胎肝中分离出来<sup>[29]</sup>。我们最近采用Weiss等人的“plate and wait”法，从处于妊娠中期的自然流产人胎儿肝脏中也分离出具有干细胞特性的细胞，它们同时表达AFP、ALB，仅少量细胞既表达ALB也表达CK19，并能够形成紧密聚集的细胞团。

虽然，上述各种类型细胞均被证实具有双潜能性，但它们所处的发育阶段以及体外的微环境，诸如HGF、EGF和干细胞生长因子(stem cell factor, SCF)等各种细胞因子、激素(如地塞米松)的添加与否，饲养层的差异等却有很大不同。这些差异可能导致不同细胞在其形态、特异标记物的表达及分化能力上表现出多样性。对此，我们总结如表1。

表1 不同胚胎肝干细胞的形态特征及其表型比较

名称	来源	形态	干细胞特征	分化潜能
H-CFU-C	E13.5 小鼠	混合型	ALB <sup>-</sup> CK19 <sup>-</sup>	双潜能
rhel4321	E15 大鼠	混合型	ALB <sup>+</sup> CK19 <sup>-</sup>	双潜能
BMEL	E14 小鼠	混合型	ALB <sup>-</sup> CK19 <sup>-</sup>	双潜能
IPFLS	E89 猕猴	上皮样	ALB <sup>+</sup> CK19 <sup>+</sup>	双潜能

上述这些不同的双潜能肝干细胞,可能来自于肝母细胞,也可能来自其他更原始的肝干细胞。H-CFU-C 中多潜能干细胞的存在为这一推断提供了有力的证据。

### 3 胚胎肝干细胞的应用前景与展望

#### 3.1 胚胎肝干细胞的应用前景

一直以来,由于对肝脏的发育机理缺乏足够认识,发育生物学家一直将肝脏视为神秘器官。肝干细胞生物学的研究有助于阐明肝脏发生、发展和成熟的发育规律。同时,正常干细胞和癌细胞都具有强大的自我更新能力,这很可能源于它们细胞分裂调控机制的相似性。Wnt, Notch 和 Sonic hedgehog (Shh)信号通路在调控干细胞自我更新的同时,也与许多肿瘤如结肠癌、成神经管细胞瘤和乳腺癌的发生有关<sup>[30,31]</sup>。凋亡抑制基因 Bcl-2 在造血干细胞的凋亡中起着重要作用<sup>[32]</sup>。Tanimizu 等证实 Dlk/Pref-1, Wnt 信号通路中的一个调控子,也表达于肝母细胞上,并随着肝脏发育而表达降低,甚至消失<sup>[33]</sup>。有人认为肝肿瘤可能起源于正常肝干细胞的转化,在肿瘤细胞中包含有肿瘤干细胞(tumor stem cell)。所以,胎肝干细胞的研究将有助于阐明肿瘤发生的机制。

目前,生物型人工肝和肝细胞移植的细胞来源主要有:高度分化的人肝细胞、C3A(HepG2 亚克隆)等人肝癌细胞系以及动物肝细胞<sup>[34]</sup>。考虑到来源、安全性能和种属差异性等方面的原因,上述三种细胞均不理想。肝干细胞由于其具有强大的增殖能力,并能分化为具有功能的成熟肝细胞,将会成为生物型人工肝最为理想的细胞来源。Sandhu 等人的实验表明,胎肝上皮祖细胞(FLEP)在持续增殖能力、集落形成能力以及分化潜能上都要大大强于成熟肝细胞,从而为胚胎肝干细胞在肝再生中的应用提供了理论支持<sup>[12]</sup>。来自胚胎特别是灵长类、人类胚胎的肝干细胞,将克服安全性能、种属差异以及成体肝干细胞数量少的缺陷,为肝病的细胞治疗和组织工程提供重要的细胞来源。同时,肝干细胞自身很有可能具有逃避免疫的能力,从而为其在临床上的应用奠定了基础。

#### 3.2 胚胎肝干细胞的未来研究展望

胚胎肝干细胞的研究才刚刚开始,有许多问题尚待解决。(1)高纯度肝干细胞的分离、纯化。FACS技术由于其诸多优势将成为当前干细胞分离技术的主流,但必须寻找胚胎肝干细胞特异性的表面

标记物,这仍将是一项艰辛的任务。(2)体外培养体系的建立。建立既能促进肝干细胞增殖又可以保持其未分化状态的体外培养体系,这种培养体系尽可能模拟肝干细胞体内微环境。这就涉及到肝干细胞与肝非实质细胞如肝星形细胞或成纤维细胞的共培养,或者提供饲养层细胞如小鼠胚胎成纤维细胞饲养层(STO),此外,还有必要添加一些促生长因子(如 SCF)和抑分化因子(如白血病抑制因子, LIF)。这些因子的作用机制将是未来研究的重点之一。(3)肝干细胞分化机制的研究。干细胞发育与分化机制研究将有助于调控干细胞的分化和增殖,从而为其在医学等方面应用提供理论基础,为肝干细胞的临床应用扫清障碍。

### 4 结 语

总之,从成体肝干细胞到胚胎肝干细胞,虽然人们对肝干细胞的认识已经有了长足的进步,但胚胎肝干细胞的分离与纯化、全面鉴定、体外培养与扩增、定向诱导分化以及临床应用,仍存在很多问题有待于人们进一步探索。人们希望能够寻找最佳肝干细胞来源,为各种肝病的细胞治疗和组织工程带来新的希望。

### 参 考 文 献

- [1] SELL S. Is there a liver stem cell[J]. *Cancer Res*, 1990, **50** (13): 3811 - 3815.
- [2] SELL S. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells[J]. *Hepatology*, 2001, **33**(3): 738 - 750.
- [3] FORBE S, VIG P, POULSOM R, et al. Hepatic stem cells[J]. *J Pathol*, 2002, **197**(4): 510 - 518.
- [4] OVERTURF K, AI DHALIMY M, OU CN, et al. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes[J]. *Am J Pathol*, 1997, **151**(5): 1273 - 1280.
- [5] ALISON M R, GOLDIN M H, SARRAF C E, et al. Pluripotential liver stem cells: facultative stem cells located in the biliary tree[J]. *Cell Prolif*, 1996, **29**(7): 373 - 402.
- [6] PAKU S, SCHNUR J, NAGY P, et al. Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver[J]. *Am J Pathol*, 2001, **158**(4): 1313 - 1323.
- [7] PETERSEN B E, BOWEN W C, PATRENE K D, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells[J]. *Science*, 1999, **284**(5417): 1168 - 1170.
- [8] ALISON M R, POULSOM R, JEFFERY R, et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells[J]. *Nature*, 2000, **406** (6793): 257.
- [9] DAVEVA M D, HWANG S G, VASA S R, et al. Differentiation of pancreatic epithelial progenitor cells into hepatocytes following transplantation into rat liver[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(14): 7356 - 7361.
- [10] SHEN C N, HORB M E, SLACK J M, et al. Transdifferentiation of pancreas to liver[J]. *Mech Dev*, 2003, **120**(1): 107 - 116.
- [11] DAVEVA M D, PETKOV P M, SANDHU J, et al. Proliferation and differentiation of fetal liver epithelial progenitor cells after transplantation into adult rat liver[J]. *Am J Pathol*, 2000, **156**(6): 2017 - 2031.

- [12] SANDHU J S, PETKOV P M, DABEVA M D, *et al.* Stem cell properties and repopulation of the rat liver by fetal liver epithelial progenitor cells[J]. *Am J Pathol*, 2001, **159**(4): 1323 — 1334.
- [13] 苏娟, 姚玉成, 余宏宇等. 肝干细胞在小鼠脾脏中集落样生长[J]. *科学通报*, 2001, **46**(19): 1625 — 1627.
- [14] GUALDI R, BOSSARD P, ZHENG M, *et al.* Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control[J]. *Genes Dev*, 1996, **10**(13): 1670 — 1682.
- [15] MATSUMOTO K, YOSHITOMI H, ROSSANT J, *et al.* Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function[J]. *Science*, 2001, **294**(5542): 559 — 563.
- [16] JUNG J, ZHENG M, GOLDFARB M, *et al.* Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors[J]. *Science*, 1999, **284**(5422): 1998 — 2003.
- [17] LECOUDER J, MORITZ D R, LI B, *et al.* Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1[J]. *Science*, 2003, **299**(5608): 890 — 893.
- [18] DUNCAN S A, NAVAS M A, DUFORT D, *et al.* Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism[J]. *Science*, 1998, **281**(5377): 692 — 695.
- [19] ZARET K S. Hepatocyte differentiation: from the endoderm and beyond[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2001, **11**(5): 568 — 574.
- [20] EFERL R, SIBILIA M, HILBERG F, *et al.* Functions of c-Jun in liver and heart development[J]. *J Cell Biol*, 1999, **145**(5): 1049 — 1061.
- [21] SCHMIDT C, BLADT F, GOEDECKE S, *et al.* Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development[J]. *Nature*, 1995, **373**(6516): 699 — 702.
- [22] BLADT F, RIETHMACHER D, ISENMANN S, *et al.* Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud[J]. *Nature*, 1995, **376**(6543): 768 — 771.
- [23] FASSLER R, MEYER M. Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice[J]. *Genes Dev*, 1995, **9**(15): 1896 — 1908.
- [24] SUZUKI A, ZHENG Y W, KONDOR R, *et al.* Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver[J]. *Hepatology*, 2000, **32**(6): 1230 — 1239.
- [25] 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 — 184.
- [26] KUBOTA H, REID L M. Clonogenic hepatoblasts, common precursors for hepatocytic and biliary lineages, are lacking classical major histocompatibility complex class I antigen [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(22): 12132 — 12137.
- [27] STRICK-MARCHAND H, WEISS M C. Inducible differentiation and morphogenesis of bipotential liver cell lines from wild-type mouse embryos[J]. *Hepatology*, 2002, **36**(4 Pt 1): 794 — 804.
- [28] ALLAIN J E, DAGHER I, MAHIEU-CAPUTO D, *et al.* Immortalization of a primate bipotent epithelial liver stem cell[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(6): 3639 — 3644.
- [29] MALHI H, IRANI A N, GAGANDEEP S, *et al.* Isolation of human progenitor liver epithelial cells with extensive replication capacity and differentiation into mature hepatocytes [J]. *J Cell Sci*, 2002, **115**(Pt 13): 2679 — 2688.
- [30] TAIPALE J, BEACHY P A. The Hedgehog and Wnt signaling pathways in cancer[J]. *Nature*, 2001, **411**: 349 — 354.
- [31] REYA T, DUNCAN A W, AILLES L, *et al.* A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells[J]. *Nature*, 2003, **423**: 409 — 414.
- [32] DOMEN J, WEISSMAN I L. Hematopoietic stem cells need two signals to prevent apoptosis: BCL-2 can provide one of these, Kit/c-Kit signaling the other[J]. *J Exp Med*, 2000, **192**(12): 1707 — 1718.
- [33] TANIMIZU N, NISHIKAWA M, SAITO H, *et al.* Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1 [J]. *J Cell Sci*, 2003, **116**(Pt 9): 1775 — 1786.
- [34] STRAIN A J, NEUBERGER J M. A bioartificial liver-tate of the art[J]. *Science*, 2002, **295**(5557): 1005 — 1009.

## Advances in Studies on Embryonic Hepatic Stem Cells

ZHANG Hao Jian, HE Zu Ping, FENG Mei Fu \*

(State Key Lab of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract:** Current researches suggest that there exist hepatic stem cells in the embryonic liver and, they play an important role in the development of liver. Different genes controlled distinct phases of liver development during mammalian organogenesis. Several groups have isolated and identified bipotential hepatic stem cells from mouse, rat and primate embryos through different methods. This will provide a promising approach of cell transplantation, tissue engineering and gene therapy. In this review, the liver development and its mechanisms, isolation and identification of hepatic stem cells, application prospects and future directions for the field are discussed.

**Key words:** embryonic hepatic stem cell; hepatoblast; isolation; identification

Supported by the 863 Program (No: 2001AA216051) and Natural Science Foundation of Beijing (No. 7022023)

\*Corresponding author, E-mail: fengmf@panda.ioz.ac.cn