

# 终末期肝病细胞治疗供体细胞来源的研究进展

孙筱于兵 陈费 王敏君 何志颖 胡以平\*

(第二军医大学基础医学部细胞生物学教研室, 上海 200433)

**摘要** 许多因素所致的肝脏疾病都有可能发展为终末期肝病, 而终末期肝病目前唯一有效的治疗方法就是原位肝移植。然而, 由于受供体肝脏短缺等因素的限制, 细胞治疗方法一直被临床上所期待。近年来, 基于谱系重编程的诱导型肝干细胞和诱导型肝实质细胞的技术体系的出现, 为解决肝脏疾病细胞治疗中细胞来源匮乏的问题提供了新的思路, 也加速了肝脏疾病细胞治疗研究向临床转化的进程。该文介绍了肝脏疾病细胞治疗研究中供体细胞来源的现状, 并重点介绍了谱系重编程获取肝系细胞的研究进展。

**关键词** 终末期肝病; 细胞移植; 肝实质细胞; 肝脏干细胞; 谱系重编程

## Advances in Cell Sources for the Treatment of End Stage Liver Disease

Sun Xiao, Yu Bing, Chen Fei, Wang Minjun, He Zhiying, Hu Yiping\*

(Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**Abstract** Liver diseases caused by different factors can develop into end stage liver disease. Currently, orthotopic liver transplantation is considered to be the only effective treatment for end stage liver disease. However, it has been restricted by shortage of donor liver, immune rejection and other reasons. Cell therapy has emerged in recent decades as an alternative option for end stage liver disease. Especially, the lineage reprogramming technology, which was used to induce hepatic stem cells and hepatocyte-like cells, not only offers a new strategy to solve the shortage of liver cells, but also accelerates clinical transitional process of cell therapy. This review introduces the present situation on source of cells for liver disease treatment, and highlights the progress of hepatic cells obtained from lineage reprogramming.

**Keywords** end stage liver disease; cell transplantation; hepatocyte; hepatic stem cell; lineage reprogramming

我国是各种急慢性肝病、肝损伤以及终末期肝病的高发地区。终末期肝病(end stage liver disease, ESLD)常泛指急慢性肝损伤以及肝癌导致的、各种内外科手段无法治愈的肝病晚期阶段。在炎症因子的长期作用下, 该阶段的肝脏大多功能极度衰竭, 并往往伴有多种高危并发症, 严重威胁患者的生命<sup>[1]</sup>。目前公认的、治疗严重肝损伤的最有效方法是利用外科手术进行的原位肝移植(orthotopic liver

transplantation, OLT)<sup>[2]</sup>。但是由于肝脏供体来源极度短缺、异体器官免疫排斥等因素, 原位肝移植的临床应用受到了极大的阻碍<sup>[3]</sup>。在寻找新的替代疗法过程中, 以细胞移植为主的各种生物疗法被认为是代替肝脏移植的最有前景的途径。

### 1 终末期肝病细胞治疗的优势

肝细胞移植是在体外将活性细胞通过门静脉

收稿日期: 2014-12-25 接受日期: 2015-03-11

国家自然科学基金(批准号: 31401166、31271474)和中国博士后科学基金(批准号: 2013M542434)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 021-81870945, E-mail: yphu@smmu.edu.cn

Received: December 25, 2014 Accepted: March 11, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31401166, 31271474) and China Postdoctoral Science Foundation (Grant No.2013M542434)

\*Corresponding author. Tel: +86-21-81870945, E-mail: yphu@smmu.edu.cn

网络出版时间: 2015-05-04 18:27 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150504.1827.010.html>

或者其他途径直接注射入肝脏或者脾脏,使目的细胞在受体肝脏中定植,代偿患者缺失的部分肝功能来修补损伤肝脏的方法。相比原位肝移植,细胞移植的优点有:(1)移植操作简单;(2)目的细胞可以冻存,能够自由掌握移植的时机;(3)即使移植失败,也可以保留原器官的功能;(4)一块供体肝脏可以供多个病人使用。因而这种方法具有重要的研究价值<sup>[4-5]</sup>。细胞移植的技术不是难点,获取合适的、高质量的种子细胞是这种方法的关键。

## 2 目前移植用细胞的来源

目前,具有临床应用价值的细胞有来源于同种或异种供体的肝系细胞、胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)和诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)来源的肝系细胞以及谱系重编程来源的肝系细胞等。供体来源的肝实质细胞主要来自脑死亡的捐献者、心脏死亡40分钟以内的捐献者、年老的捐献者以及外科手术肝脏部分切除的捐献者等<sup>[6]</sup>。这些来源的肝实质细胞不仅数量有限,而且质量较差,经过冷冻存储后细胞活力和贴壁能力都有一定程度的损伤<sup>[7-8]</sup>。供体来源的胎肝能够表达肝干细胞的特异性标志,它体积小、免疫原性低、增殖力强,可以分化为肝实质细胞和胆管细胞,有利于移植后的扩散和定植<sup>[9-11]</sup>。但胎儿肝脏质量远小于成人的肝脏,获取一定数量的胎肝细胞往往需要多个胚胎<sup>[6]</sup>。且这种细胞多取自流产胎儿,涉及的伦理道德问题也使其临床应用受到阻碍。

异种来源的肝实质细胞是从其他物种获取的可用于治疗的细胞。由于异种来源所造成的超急性免疫排斥反应以及和灵长类动物生理功能的不完全兼容,这种细胞目前主要用于生物人工肝的研究。骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cell, BM-MSC)来源比较充足,增殖能力较强,临床试验的肿瘤发生率几乎为零,能够改善腹水,延长病人的生存时间<sup>[12-15]</sup>。但是BM-MSC在植入肝脏后,真正分化为肝实质细胞的比例是很小的,相比起来,BM-MSC更多的是通过分泌一系列的生长因子和细胞因子,对肝脏损伤部位的微环境进行调节<sup>[16-18]</sup>,从而发挥促进细胞增殖以及抗炎的作用。由于缺乏有效的移植细胞体内监测机制,尚不能确定BM-MSC能否在体内分化为其他类型的细胞,BM-MSC对肝纤维化的进展究竟是阻断还是

促进以及其对肝硬化的影响还有待进一步研究。

ESC是可分化为内、中、外三个胚层的不同细胞类型的全能干细胞,具有很强的自我更新和增殖能力。iPSC具有与ESC相似的细胞形态、多能性、基因表达谱以及分子标志。这两种细胞都可以在体外被诱导分化为肝系细胞。目前,ESC的诱导效率可以达到70%~80%<sup>[19]</sup>,但是这种来源的肝系细胞功能不成熟,如缺乏CYP450(cytochrome P450)酶表达等,且植入体内后效果并不理想。iPSC的诱导效率也提高了近90%,并有研究培育出了有肝功能的人工肝芽组织<sup>[20]</sup>。总体来说,目前的ESC和iPSC诱导的肝样细胞(hepatocyte-like cells)并不能完全替代原代肝实质细胞发挥作用,且其体外诱导分化的条件复杂、步骤繁琐。ESC主要取自流产胚胎,其研究一直受到伦理上的广泛争议,并且诱导过程中残留的ESC和iPSC注入体内后具有很大的致癌隐患<sup>[21-26]</sup>。

## 3 基于谱系重编程技术的肝系细胞的制备

在胚胎发育的不同阶段,细胞根据所处的微环境以及信号分子的调控差异表达某些基因,从而产生不同的表型和功能,并分化为特定类型的细胞,而这些细胞的细胞核仍然保留有完整的遗传信息。理论上,若能改变基因的表达,就能改变细胞的分化命运。成熟的体细胞直接转变为另一种类型的体细胞或者祖细胞的方法称为谱系重编程(lineage reprogramming),也叫做转分化。谱系重编程的方法避免了诱导分化过程中复杂繁琐的步骤,细胞可以取自接受者自体,避免了免疫排斥反应和伦理学的争议;同时还跳过了细胞的多能状态,降低了致癌的可能性和危险性。因此,谱系重编程技术在基础医学和再生医学领域越来越受到关注。

由于特异性基因的表达是细胞分化的关键,谱系重编程大多通过对基因的调控来实现,如利用表观遗传抑制剂、核受体、化学小分子、转录因子以及microRNA等方法改变基因表达状况<sup>[27-28]</sup>。亲缘较近的细胞来源于相同的胚层甚至相同的祖细胞,往往具有相近的基因表达谱,因而互相之间的转化更容易实现,例如胰腺细胞和肝实质细胞都来源于内胚层的前肠细胞,表达大量相同的转录因子。早期的研究中,就有在胰腺癌细胞中发现肝样细胞的报道<sup>[29-30]</sup>。这表明了在特定条件下,胰腺细胞和肝系细胞可以在体内自发转化。而Shen等<sup>[31]</sup>使用地塞

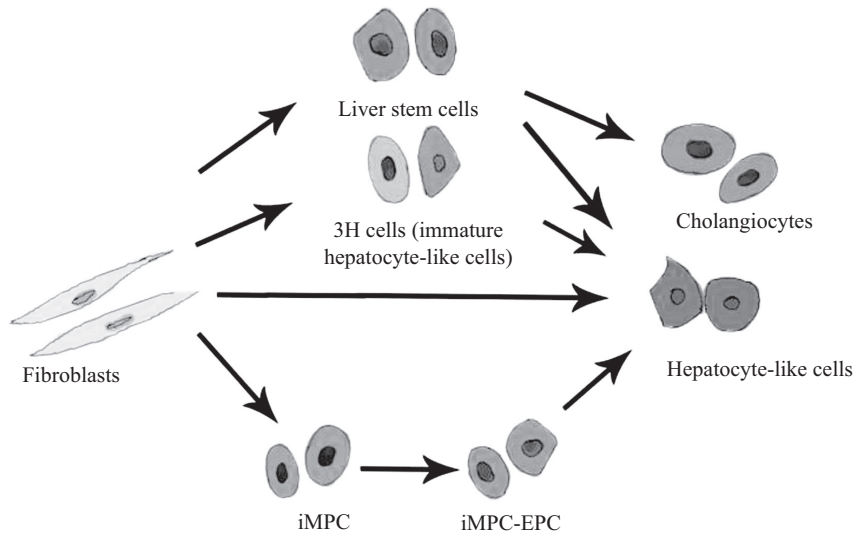


图1 成纤维细胞向肝系细胞重编程示意图

Fig.1 Reprogramming fibroblasts to generate hepatocyte-like cells

米松处理小鼠胰腺细胞系AR42J-B13, 诱导转录因子Cebpb(CCAAT/enhancer binding protein beta)的表达, 也将其在体外转化为肝样细胞, 该种肝样细胞表达肝脏标志基因, 但是缺少成熟肝实质细胞的部分功能; 而且胰腺细胞获取比较困难, 因而这种方法并没有实际的应用价值。

目前进行重编程最常见的, 也最容易获得的细胞来源是成纤维细胞。此外, 也有用血液中的单核白细胞进行重编程的研究<sup>[32]</sup>。由于成纤维细胞和器官组织细胞亲缘关系较远, 重编程的实现相对比较困难, 常需要强制其表达某些特定的转录因子。因此在成纤维细胞重编程为肝系细胞的研究中, 大多从肝脏发育的调控因子中筛选关键因子, 再利用病毒载体携带目的基因感染成纤维细胞。目前, 已发表的谱系重编程获得的肝系细胞大致可以分为肝细胞样细胞以及肝干细胞两类(图1)。肝细胞样细胞具有成熟的肝实质细胞功能, 植入受体肝脏后可以直接修复、弥补损伤的肝脏; 肝干细胞具有旺盛的自我更新能力, 以及在特定的微环境下分化为肝实质细胞和胆管细胞的双向分化潜能。

### 3.1 肝细胞样细胞

Huang等<sup>[33]</sup>将Gata4(GATA binding protein 4)、Hnf1a(HNF1 homeobox A)、Foxa3(forkhead box A3)三个转录因子通过慢病毒导入小鼠成纤维细胞, 同时敲除了 $p19^{arr}$ 阻止细胞凋亡, 从而促进增殖, 将其重编程为小鼠诱导肝细胞样细胞(mouse induced hepatocyte-like cell, miHep)。这种细胞具有积累肝

糖原、摄取低密度脂蛋白、转运吲哚青绿等肝实质细胞的功能, 体外白蛋白分泌量达到了原代肝实质细胞的1/3。miHep在基因水平上检测到了反应肝细胞代谢能力的CYP450的表达, 并在经过3-甲基胆蒽诱导后获得了部分CYP450的活性。Suzuki等<sup>[34]</sup>用Hnf4a(hepatic nuclear factor 4 alpha)和Foxa(forkhead box A)家族(Foxa1、Foxa2和Foxa3)中的任一因子组合, 将小鼠成纤维细胞重编程为具有功能的肝细胞样细胞(miHep)。上述两种重编程方法所获得的miHep移植到Fah(fumarylacetoacetate hydrolase)基因敲除的肝衰竭小鼠模型中, 都能够定植并逐渐成熟, 显示出一定的治疗作用。移植后的Fah阳性率最高可达80%。随后, Huang等<sup>[33]</sup>用Foxa3、Hnf4a、Hnf1a三个转录因子结合SV40(simian virus 40)大T抗原, 将人成纤维细胞重编程为具有增殖能力的人肝细胞样细胞(hiHep)。这种重编程方法获得的hiHep同样具有与原代肝实质细胞相似的形态、基因表达谱以及成熟的肝实质细胞功能, 包括CYP450活性以及胆汁排泄能力等。hiHep植入免疫缺陷的Fah<sup>-/-</sup>小鼠中最高有约4%的整合效率, 并有约1/3的小鼠移植后的存活时间超过九周<sup>[33-34]</sup>。

上述重编程方法获得的miHep和hiHep, 其细胞形态、基因表达以及肝细胞功能都优于ES/iPS诱导获得的肝细胞样细胞<sup>[33-34]</sup>, 但是与原代细胞相比仍有差距。例如, hiHep在体外不表达CYP3A4等部分肝实质细胞基因, 而植入到小鼠肝脏内后, CYP3A4有较低水平的表达, miHep尚有成肝细胞(hepatoblast)



标志物AFP(alpha fetoprotein)的表达等。Huang等<sup>[33]</sup>在诱导miHep时敲除了细胞衰老信号通路中的*p19<sup>arf</sup>*,而在诱导hiHep时采用了过表达SV40大T抗原的方法,解决了miHep和hiHep在体外扩增的问题,但是也造成了潜在的致癌性。这种细胞可以克服异体免疫排斥,也可以用于生物人工肝装置以及肝脏疾病模型的研究。

由于肝脏的发育是一个多因子参与的、多种信号通路相互作用的复杂过程,仅仅几个因子的作用可能并不足以使目的细胞获取成熟的功能。在这个基础上,有研究采用“分步法”,并寻找促细胞成熟的转录因子和辅助小分子。Zhu等<sup>[35]</sup>找到了人成纤维细胞重编程过程的一个多能的中间态细胞(induced multipotent progenitor cell, iMPC)。这种中间态细胞增殖能力旺盛,可以在体外大量扩增,其分化能力低于iPSC,因而致癌性大大减弱。Zhu等<sup>[35]</sup>用OCT4(octamer-binding transcription factor 4)、SOX2(sex determining region Y box 2)和KLF4(kruppel-like factor 4)三个转录因子,EGF(epidermal growth factor)、bFGF(basic fibroblast growth factor)等生长因子以及CHIR(CHIR99021)等促进重编程的小分子,将人成纤维细胞重编程为表达内胚层细胞标志SOX17(sex determining region Y box 17)和Foxa2的iMPC源内胚层前体细胞(iMPC-derived endoderm progenitor cells, iMPC-EPC)。iMPC-EPC在体外的倍增时间不到2天,并能够持续扩增25代以上。进一步用类似于iPS-Hep的诱导方法,通过BMP4(bone morphogenetic protein 4)、DEX(dexamethasone)、OSM(oncostatin M)等小分子以及A83、Notch通路抑制剂促使iMPC-EPC分化为iMPC源肝细胞样细胞(iMPC-Hep)。iMPC-Hep具有典型的肝细胞多边形形态,表达Hnf4a、ALB(Albumin)、AAT(alpha-1 antiproteinase)等肝细胞标志分子,并有糖原储存、脂质摄取、尿素分泌等经典肝细胞功能。iMPC-Hep的白蛋白分泌水平以及CYP450活性检测结果与原代肝细胞相比仍有差距,但是均优于iPSC-Hep,约为后者的1~2倍。在移植到免疫缺陷的酪氨酸血症肝衰竭小鼠模型中后,iMPC-Hep的增殖能力优于原代肝细胞,并能够在体内进一步成熟,实验9个月后仍然能观察到增殖的迹象。这种方法使得成纤维细胞回到了一个类似于iPS起始状态的“中间阶段”,从而获得了更安全、

更容易诱导为成熟肝细胞的种子细胞。

在获取功能性肝实质细胞的研究中,Du等<sup>[36]</sup>将三种肝细胞命运决定因子Hnf1a、Hnf4a和Hnf6(又名OC1, one cut homeobox 1)组合感染人成纤维细胞,同时利用MYC(v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog)和P53 siRNAs来减少重编程过程中的细胞增殖停止和死亡,获得了具有部分人肝细胞特征和功能的中间态肝细胞样细胞,并将其命名为“3H细胞”。3H细胞具有很强的增殖能力,解决了肝实质细胞在体外扩增困难的问题。3H细胞进一步过表达肝细胞功能成熟因子ATF5(activating transcription factor 5)、PROX1(prospero homeobox 1)和CEBPA(CCAAT/enhancer binding protein, alpha)后,得到了功能成熟的人诱导型肝实质细胞(human induced hepatocytes, hiHeps),其诱导效率超过90%。这种hiHeps具有成熟的肝细胞功能,体外白蛋白分泌量与原代肝实质细胞相当,并有成熟的药物代谢能力和毒素敏感性。它能够较高地表达药物代谢的经典CYP450以及代谢关键步骤的转运因子。CYP3A4、CYP1A2以及CYP2B6的活性与人原代肝实质细胞相当,CYP2A9和CYP2C19的活性也达到了原代肝实质细胞的30%。这些药物代谢酶的活性是ESC源肝系细胞的100倍之多。在植入到Tet-uPA/Rag2<sup>-/-</sup>/γc<sup>-/-</sup>小鼠中后,能够达到30%的修复效率,且无肿瘤形成。这种hiHeps实现了重编程来源的肝实质细胞功能的高度成熟,使得体外获得大量的功能性肝实质细胞成为可能,也为人肝脏药物代谢的研究以及体外药物高通量筛选提供了很好的细胞来源。

### 3.2 肝干细胞

运用类似于肝细胞重编程的方法,Yu等<sup>[37]</sup>筛选出Hnf1b和Foxa3两个转录因子,将小鼠成纤维细胞重编程为具有成熟肝实质细胞和胆管细胞双向分化潜能的诱导型肝脏干细胞(induced hepatic stem cells, iHepSC)。iHepSC具有高核质比等干细胞的形态特征,表达肝干细胞的分子标志物LGR5(leucine rich repeat containing G protein coupled receptor 5)、EpCAM(epithelial cell adhesion molecule)、SOX9等,共同表达肝向和胆向的分子标志Alb和CK19(cytokeratin 19),而不表达成熟肝细胞的标志AAT、G6P(glucose 6 phosphate dehydrogenase)等。iHepSC的增殖能力极强,可以在体外稳定扩增30代

以上。通过全基因表达谱的比较, iHepSC与肝脏上皮祖细胞(liver epithelial progenitor cells, LEPCs)以及其他一些肝脏前体细胞系具有类似的干细胞信号通路, 如Shh通路、Wnt通路以及其他一些脂肪、糖原代谢通路等。体外诱导分化实验中, 利用OSM和EGF等因子, 可以将iHepSCs分化为具有糖原储存等功能的肝细胞样细胞, 效率可达到50%以上; 在添加胶原的三维培养条件下, 可以诱导为具有碱性磷酸酶活性以及转运功能的胆管细胞。iHepSC移植到*Fah*基因敲除的肝衰竭模型小鼠的肝脏后, 能够分化为功能性肝细胞, 显著改善*Fah*小鼠肝功能并提高生存率; 在植入到DDC(3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine)诱导的胆管损伤小鼠体内后, iHepSC可分化为胆管细胞并参与损伤胆管的修复, 且均未见肿瘤的发生。iHepSC作为一种前体细胞, 它的最大优势是其优于同类肝系细胞的强大增殖能力, 以及植入体内的双向分化潜能。iHepSC的研究为肝脏疾病的细胞治疗和工程组织的发展打开了新的思路。

#### 4 存在的问题

谱系重编程是基础医学领域的一项新兴热门技术, 它的作用机制尚未完全明晰。在以上的研究中, 用来作为阳性对照的原代细胞以及来自不同实验室的工程细胞互相之间难以进行比较, 且缺乏统一、规范的评价体系。最近, Morris等<sup>[38]</sup>和Cahan等<sup>[39]</sup>建立了一种基于网络的生物信息平台, 它利用计算机算法和存储在电脑里的细胞信息网络来鉴定实验室里获得的工程细胞是否与目的细胞相符, 并根据这些信息对工程细胞的“身份”以及分化程度进行量化和定位, 从而提供了一种工程细胞质量的衡量方法; 并且可以通过对目的细胞的基因表达和调控网络的分析, 来寻找重编程的转录因子。利用这种算法, Morris等<sup>[38]</sup>对部分已经发表的重编程方法进行了验证, 发现很多重编程获得的细胞转化并不完全, 保留了很多原始细胞的特征。如Suzuki的*Hnf4a*和*Foxa*家族组合获得的miHep更加趋向于一种内胚层祖细胞。在移植到溃疡型结肠炎的小鼠体内后, 这种细胞可分化为肠上皮细胞, 并参与修复损伤组织。在横向比较的过程中, Morris等<sup>[38]</sup>还偶然发现了肠系因子*Cdx2*(caudal type homeobox 2)的表达量在miHep的重编程过程中有着重要且复杂的作用。例

如低水平的*Cdx2*使得miHep丢失肠向特征而更加趋向于肝系细胞, 而miHep却并不会随着*Cdx2*的敲除而愈发趋于肝系。Morris等<sup>[38]</sup>的这种方法对重编程调控因子的筛选和机制的研究提供了一种强大的辅助工具, 但是它依赖于已有的研究成果和生物信息, 程序内固定的算法对一些复杂或者未知的重编程机制未必适用。Morris等<sup>[38]</sup>对工程细胞质量的检测结果也提示了我们细胞命运操纵的复杂性和面临的挑战。

利用谱系重编程的方法获取用于移植的种子细胞具有较大的临床应用潜力。当前对重编程的研究, 除了如何得到合适的肝系细胞外, 还有许多问题需要解决, 比如治疗用细胞的标准化和质量控制, 细胞的类型和肝病阶段的对应关系等。获取合适的、可应用于临床的肝系细胞的关键, 是提高对细胞的人工操控能力。目的细胞既需要有合适的增殖能力和细胞功能, 还应该具有相当的体内环境适应能力来稳定地发挥治疗作用。从当前的研究成果来看, 我们对细胞命运的掌控仍然有一段相当长的道路要走。

#### 参考文献 (References)

- 1 Beath SV. End stage liver disease. *Paediatr Child Health* 2013; 23(12): 535-44.
- 2 Bilir BM, Guinette D, Karrer F, Kumpe DA, Krysl J, Stephens J, *et al.* Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl* 2000; 6(1): 32-40.
- 3 DiNorcia J, Lee MK, Harlander-Locke M, Zarrinpar A, Kaldas FM, Yersiz H, *et al.* Reoperative complications after primary orthotopic liver transplantation: A contemporary single-center experience in the post model for end-stage liver disease. *J Am Coll Surg* 2014; 219(5): 993-1000.
- 4 Pietrosi G, Vizzini GB, Gruttadauria S, Gridelli B. Clinical applications of hepatocyte transplantation. *World J Gastroenterol* 2009; 15(17): 2074.
- 5 Fisher RA, Strom SC. Human hepatocyte transplantation: Worldwide results. *Transplantation* 2006; 82(4): 441-9.
- 6 Puppi J, Strom SC, Hughes RD, Bansal S, Castell JV, Dagher I, *et al.* Improving the techniques for human hepatocyte transplantation: Report from a consensus meeting in London. *Cell Transplant* 2012; 21(1): 1-10.
- 7 Xavier S, Mustapha N, Khuu ND, Françoise S, Louis H, Bruno G, *et al.* Cryopreservation of human hepatocytes alters the mitochondrial respiratory chain complex I. *Cell Transplant* 2007; 16(4): 409-19.
- 8 Jorns C, Gramignoli R, Saliem M, Zemack H, Mork LM, Isaksson B. Strategies for short-term storage of hepatocytes for repeated clinical infusions. *Cell Transplant* 2014; 23(8): 1009-18.
- 9 You N, Liu W, Zhong X, Dou K, Tao K. Possibility of the enhanced progression of fetal liver stem/progenitor cells therapy for treating end-stage liver diseases by regulating the notch signaling pathway. *Arch Med Res* 2012; 43(7): 585-7.

- 10 刘凯歌, 尚红利, 赵 慧, 牛春燕, 汪 雯. 人胚胎肝细胞移植治疗大鼠急性肝衰竭的效果分析. 重庆医学(Liu Kaige, Shang Hongli, Zhao Hui, Niu Chunyan, Wang Wen. Effective analysis on treatment of rat acute liver failure by human fetal hepatocyte transplantation. *Chongqing Med J* 2011; 9: 848-50.
- 11 Mahieu-Caputo D, Allain JE, Branger J, Coulomb A, Delgado JP, Andreoletti M, *et al.* Repopulation of athymic mouse liver by cryopreserved early human fetal hepatoblasts. *Hum Gene Ther* 2004; 15(12): 1219-28.
- 12 Kyung A, Sun Y, Su J, Yun J, So Y, Ju Y, *et al.* Mesenchymal stem cells showed the highest potential for the regeneration of injured liver tissue compared with other subpopulations of the bone marrow. *Cell Biol Int* 2009; 33(7): 772-7.
- 13 Li Q, Zhou X, Shi Y, Li J, Zheng L, Cui L, *et al.* *In vivo* tracking and comparison of the therapeutic effects of MSCs and HSCs for liver injury. *PLoS One* 2013; 8(4): 62-3.
- 14 El-Ansary M, Abdel-Aziz I, Mogawer S, Abdel-Hamid S, Hammam O, Teaema S, *et al.* Phase II trial: Undifferentiated versus differentiated autologous mesenchymal stem cells transplantation in egyptian patients with HCV induced liver cirrhosis. *Stem Cell Rev* 2012; 8(3): 972-81.
- 15 Lee KD. Applications of mesenchymal stem cells: An updated review. *Chang Gung Med J* 2008; 31(3): 228-36.
- 16 Bonzo LV, Ferrero I, Cravanzola C, Mareschi K, Rustichell D, Novo E, *et al.* Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: Engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential. *Gut* 2008; 57(2): 223-31.
- 17 Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells *in vitro*: Effects of dexamethasone and IL-1 $\alpha$ . *J Cell Physiol* 1996; 166(3): 585-592.
- 18 Xagorari A, Siotou E, Yiangou M, Tsolaki E, Bougiouklis D, Sakkas L, *et al.* Protective effect of mesenchymal stem cell-conditioned medium on hepatic cell apoptosis after acute liver injury. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6(5): 831-40.
- 19 Agarwal S, Holton KL, Lanza R. Efficient differentiation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2008; 26(5): 1117-27.
- 20 Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, *et al.* Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* 2013; 499(7459): 481-4.
- 21 Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, Papst PJ, Meacham AM, Zon LI, *et al.* Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells *in vitro*. *FEBS Lett* 2001; 497(1): 15-9.
- 22 Lakshmi R, Choy-Pik C, Pratima K, Yun P, Melissa KC. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant* 2003; 12(1): 1-11.
- 23 Song Z, Cai J, Liu Y, Zhao D, Yong J, Duo S, *et al.* Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Cell Res* 2009; 19(11): 1233-42.
- 24 Si-Tayeb L, Noto FK, Nagaoka M, Li J, Battle M, Duris C, *et al.* Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 2010; 51(1): 297-305.
- 25 Chen YF, Teng 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.
- 26 Espejel S, Roll GR, Melaughlin KJ, Lee AY, Zhang JY, Laird DJ, *et al.* Induced pluripotent stem cell derived hepatocytes have the functional and proliferative capabilities needed for liver regeneration in mice. *J Clin Invest* 2010; 120(9): 3120-6.
- 27 Lu J, Dong HY, Lin LJ, Wang QH, Huang LH, Tan JM. miRNA-302 facilitates reprogramming of human adult hepatocytes into pancreatic islets-like cells in combination with a chemical defined media. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 453(3): 405-10.
- 28 Lin C, Yu C, Ding S. Toward directed reprogramming through exogenous factors. *Curr Opin Genet Dev* 2013; 23(5): 519-25.
- 29 Zaret KS. Genetic programming of liver and pancreas progenitors: Lessons for stem, cell differentiation. *Nat Rev Genet* 2008; 9(5): 40.
- 30 Corbett JL, Tosh D. Conversion of one cell type into another: Implications for understanding organ development, pathogenesis of cancer and generating cells for therapy. *Biochem Soc Trans* 2014; 42(3): 609-16.
- 31 Shen CN, Slack JM, Tosh D. Molecular basis of trans-differentiation of pancreas to liver. *Nat Cell Biol* 2000; 2(12): 879-87.
- 32 Zhang XB. Cellular reprogramming of human peripheral blood cells. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2013; 11(5): 264-74.
- 33 Huang P, He Z, Ji S, Sun H, Xiang D, Liu C, *et al.* Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature* 2011; 475(7356): 386-9.
- 34 Sekiya S, Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature* 2011; 475(7356): 390-3.
- 35 Zhu S, Rezvani M, Harbell J, Mattis AN, Wolfe AR, Benet LZ, *et al.* Mouse liver repopulation with hepatocytes generated from human fibroblasts. *Nature* 2014; 508(7494): 93-7.
- 36 Du Y, Wang J, Jia J, Song N, Xiang C, Xu J. Human hepatocytes with drug metabolic function induced from fibroblasts by lineage reprogramming. *Cell Stem Cell* 2014; 14(3): 394-403.
- 37 Yu B, He Z, You P, Han Q, Xiang D, Chen F, *et al.* Reprogramming fibroblasts into bipotential hepatic stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell* 2013; 13(3): 328-40.
- 38 Morris SA, Cahan P, Li H, Zhao AM, Roman AS, Shivdasani RA, *et al.* Dissecting engineered cell types and enhancing cell fate conversion via CellNet. *Cell* 2014; 158(4): 889-902.
- 39 Cahan P, Li H, Morris SA, Lummertz da Rocha E, Daley GQ, Collins JJ. CellNet: Network biology applied to stem cell engineering. *Cell* 2014; 158(4): 903-15.