

尿源性干细胞移植修复慢性肝损伤裸鼠肝脏功能

胡超群^{1,2} 方姝煜¹ 龚梦嘉¹ 何昀¹ 毕杨^{1*}

(¹重庆医科大学附属儿童医院儿研所干细胞实验室, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 重庆 400014;

²重庆市干细胞治疗工程技术研究中心, 重庆 400014)

摘要 该研究探讨尿源性干细胞(urine-derived stem cells, USCs)的生物学性状及移植治疗慢性肝损失模型的可能。分离培养USCs, 观察细胞形态、流式细胞术检测干细胞表面标记, 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色、茜素红染色、油红O染色、ICG(indocyanine green)摄取实验、PAS(periodic acid-Schiff)染色等评估其成骨、成脂和成肝分化。建立四氯化碳(carbon tetrachloride, CCL₄)诱导的慢性肝损伤模型, 尾静脉4次移植USCs, 计算肝脏指数, 检测血清ALT、AST, HE及Masson染色, 评估治疗效果。结果表明, USCs为米粒状贴壁生长细胞, 表达多种间充质干细胞标志物: CD24、CD29、CD73、CD90和CD105, 表达细胞周期表面标志物CD146, 不表达造血细胞表面标志物CD31、CD34、CD45。成骨成肝诱导的USCs后ALP染色、茜素红染色、油红O染色阳性, 单纯成肝诱导后几乎无ICG摄取及PAS染色阳性的细胞, 而与肝干细胞共培养的USCs诱导组中, 约10%细胞有ICG摄取及PAS染色阳性。与模型组相比, USCs移植组肝脏指数显著降低, ALT、AST降低但无统计学意义, 肝细胞退行性变及纤维增生明显改善。该研究成功分离培养出增殖能力强并具有多向分化潜能的USCs, 移植入慢性肝损伤裸鼠, 可在一定程度上修复肝脏损伤。

关键词 尿源性干细胞; 慢性肝损伤; 细胞移植

Urine-Derived Stem Cells Repair Liver Function in Nude Mice with Chronic Liver Injury

Hu Chaoqun^{1,2}, Fang Shuyu¹, Gong Mengjia¹, He Yun¹, Bi Yang^{1*}

(¹Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Children's Hospital of Chongqing Medical University; Chongqing 400014, China; ²Chongqing Stem Cell Biology and Therapy Laboratory, Chongqing 400014, China)

Abstract In the present study, we try to investigate the biological characteristics of urine-derived stem cells (USCs) and its potentiality on the treatment of chronic liver injury. USCs were isolated and cultured, cell morphology was observed under light microscopy. Flow cytology was used to detect the stem cell surface markers. Alkaline phosphatase (ALP) staining, alizarin red staining, oil red O staining, indocyanine green (ICG) uptake test and PAS (periodic acid-Schiff) staining were performed to evaluate osteogenic, adipogenic, and hepatic differentiation of USCs. The nude mice model of chronic liver injury was established by intraperitoneal injection of carbon tetrachloride (CCL₄), and then USCs were transplanted into mice model by tail vein injection. Liver index, ALT, AST in serum, HE and Masson staining were performed to determine the therapeutic effect. The results showed that USCs were rice-like adherent growth cells expressing various mesenchymal stem cell markers, including CD24, CD29, CD73, CD90

收稿日期: 2018-12-29 接受日期: 2019-03-07

重庆市科委技术创新与应用示范项目(批准号: cstc2018jcsx-msybX0084)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-63633113, E-mail: yang_bi1981@hospital.cqmu.edu.cn

Received: December 29, 2018 Accepted: March 7, 2019

This work was supported by the Chongqing Municipal Science and Technology Commission Technology Innovation and Application Demonstration Project (Grant No. cstc2018jcsx-msybX0084)

*Corresponding author. Tel: +86-23-63633113, E-mail: yang_bi1981@hospital.cqmu.edu.cn

网络出版时间: 2019-06-13 16:19:11

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190613.1618.004.html>

and CD105, the periodic surface marker CD146, and not expressing hematopoietic cell surface markers CD31, CD34, CD45. With osteogenic and adipogenic induction, some of treated USC_s were positive for ALP staining, alizarin red staining and oil red O staining. With hepatic induction alone, almost no USC_s has the function of ICG uptake and no positive PAS staining cells, while 10% of USC_s were positive for ICG uptake and PAS staining when induced and co-cultured with hepatic progenitor cells. The liver index of the transplanted group was lower than that of the model group, however, there was no statistically significance of ALT and AST between two groups. H.E and Masson staining showed that the degeneration of hepatocytes and the fibrosis in the transplantation group was improved compared with that in the model group. Therefore, we successfully isolated and cultured USC_s which has the abilities of good proliferation and multiple differentiation. Transplantation of USC_s could partly repair liver injury and pathology of chronic liver injury mice model.

Keywords urine-derived stem cells; chronic liver injury; cell transplantation

肝细胞移植(hepatocyte transplantation, HCT)是将体外分离纯化的具有正常生物活性的肝实质细胞,通过各种不同的途径导入受体,使之发挥正常生理代谢功能的一种细胞工程技术。大量的动物实验证明, HCT能逆转小鼠的肝纤维化,修复肝脏功能,并能显著改善急性肝损伤及肝细胞癌小鼠的肝功能,降低血氨水平,延长生存期,改善肝性脑病症状^[1-4]。肝细胞移植是肝功能衰竭的一种潜在替代治疗方法,从理论上讲,也可以作为等待肝移植患者的一种过渡治疗手段。肝细胞移植技术发明并研究用于治疗肝脏疾病已有三十余年的历史。然而,人肝细胞来源困难、哺乳动物肝细胞有传播动物源性传染病的可能性、永生化肝细胞株的功能差异以及远期致癌危险等,使细胞来源成为肝细胞移植进一步临床研究与应用瓶颈。

尿源性干细胞(urine-derived stem cells, USC_s)是尿液中存在一类为数不多却具有强大增殖能力及某些间充质干细胞特征的细胞。这种细胞可通过一种非创伤、简单、安全和低费用的方法获得,并易于培养传代,能表达间充质干细胞的表面标记物,具有很强的自我更新能力及多向分化潜能。目前,已有研究表明USC_s可以用于泌尿生殖系统(如膀胱缺损、急性肾衰竭、糖尿病肾病和阴茎勃起功能障碍等)的组织工程研究^[5-6]。USC_s用于肝细胞移植治疗修复肝损伤尚未报道。

本研究从健康志愿者的尿液中分离培养出USC_s,并对其形态、表型和分化潜能等生物学性状进行了研究。CCL₄诱导的慢性肝损伤模型裸鼠经尾静脉多次USC_s移植后,评价其治疗效果。病

人尿液中提取的自体USC_s移植治疗慢性肝功能衰竭,可能成为治疗慢性肝损伤的一种新的治疗方法。

1 材料及方法

1.1 材料

2%青链霉素、霍乱毒素、氢化可的松、转铁蛋白、胰岛素、腺嘌呤、表皮生长因子、0.25%胰蛋白酶均购自Gibco公司; Hoechst 33342购自上海碧云天生物技术公司; CD24-FITC、CD29-PE、CD31-FITC、CD34-PE、CD45-FITC、CD73-PE、CD90-PE、CD105-FITC、CD146-PE细胞表面标志物抗体, Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒, ALP染色试剂盒购自BD公司; 成骨诱导分化培养基、成脂诱导分化培养基购自赛业生物科技有限公司; 吖啶青绿(indocyanine green, ICG)、成肝细胞诱导分化培养基均购自Sigma-Aldrich公司; 4%多聚甲醛、油红O染液、苏木素伊红(HE)染色试剂盒、Masson三色染色试剂盒购自北京雷根生物技术有限公司; PBS、1%茜素红染液、PAS(periodic acid-Schiff)染色试剂盒、Transwell小室均购自索来宝公司; 玉米油购自阿拉丁生化科技股份有限公司。

配制USC_s培养基, 含500 mL K-SFM、375 mL DMEM、125 mL Ham F-12、100 mL FBS(fetal bovine serum)^[7]。

1.2 尿源性干细胞的分离培养

本研究获得重庆医科大学附属儿童医院伦理委员会批准, 尿液标本来源于重庆医科大学附属儿童医院儿研所的志愿者, 并签署知情同意书。收集200 mL无菌清洁中段尿液, 加入20 mL 10% FBS/

DMEM, 分装至50 mL离心管中, 1 500 r/min, 离心5 min, 吸弃上清, 每管加入5 mL USCs培养基, 吹打均匀后种入24孔板, 1 mL细胞悬液/孔, 置于37 °C、5% CO₂细胞培养箱, 培养10~14天后传代至6孔板。

1.3 干细胞表面标记物的鉴定

取P₃ USCs制成细胞悬液(1×10⁶细胞/管), PBS洗2遍后每管加入5 μL抗体(鼠抗人CD24-FITC、CD29-PE、CD31-FITC、CD34-PE、CD45-FITC、CD73-PE、CD90-PE、CD105-FIT和CD146-PE), 避光室温孵育30 min, PBS洗涤2次后加300 μL PBS重悬, 流式细胞仪检测。

1.4 成骨诱导及检测

取P₃ USCs接种在24孔板中, 接种密度约为30%, 细胞贴壁后换成骨培养基, 3天换液1次。诱导1周后进行ALP染色: 吸弃原培养基, PBS洗3次, 4%多聚甲醛固定1 min, PBS洗3次, 加入提前配制的ALP染色工作液, 37 °C孵育30 min, 吸弃染液, PBS洗3次, 加1 mL PBS, 显微镜下观察、拍照。成骨诱导培养基+β-磷酸甘油, 维生素C诱导2周后进行茜素红染色: 吸弃原培养基, PBS洗3次, 4%多聚甲醛固定1 min, PBS洗3次, 加入1%的茜素红染液, 37 °C孵育5 min, 吸弃染液, PBS洗3次, 加1 mL PBS, 显微镜下观察、拍照。

1.5 成脂诱导及检测

取P₃ USCs接种在24孔板中, 接种密度约为30%, 细胞贴壁后换成脂(A/B培养基交替使用)培养基, 3天换液1次。诱导2周后进行油红O染色: 吸弃原培养基, PBS洗3次, 4%多聚甲醛固定1 min, PBS洗3次, 加入油红O染液, 37 °C孵育30 min, 吸弃染液, PBS洗3次, 加1 mL PBS, 显微镜下观察、拍照。

1.6 成肝脏细胞诱导分化

取P₃ USCs单独接种在24孔板中或与胚胎肝干细胞(HPCs)共同接种在带transwell小室的24孔板中(24孔板内接种HPCs, Transwell小室内接种USCs), 接种密度约为30%, 细胞贴壁后换成肝分化诱导培养基^[8], 3天换液1次, 诱导10天时进行ICG摄取释放试验和PAS染色检测肝细胞功能。ICG摄取试验: 吸弃原培养基, PBS洗3次, 加入1 mg/mL新鲜配置的ICG染液200 μL, 37 °C孵育1 h, PBS洗3次, 显微镜下观察、拍照。随后吸弃PBS, 换回原来的培养基, 37 °C孵育6 h, 显微镜下观察细胞ICG释放情况。PAS染色: 吸弃原培养基, PBS洗3次, 4%多聚甲醛固定10 min,

PBS再洗3次, 用0.5%高碘酸液处理5 min, 流水冲洗5 min, 滴加Schiff染液染色15 min, 流水冲洗5 min, 置于显微镜下观察、拍照。

1.7 动物模型及细胞移植

8周龄雄性裸鼠15只, 体重20~26 g, 购于重庆腾鑫生物技术有限公司, 合格证号: SCXK(京)2014-0004。于重庆医科大学附属儿童医院动物实验中心饲养, 进行12 h光/暗循环, 提供食物和水。移植组裸鼠($n=5$, CCL₄+USCs组)及模型组裸鼠($n=5$, CCL₄组)腹腔注射10 mL/kg的CCL₄(1:9溶于玉米油), 每周2次共12周, 制备慢性肝损伤模型。第1次CCL₄注射12周后, 移植组裸鼠尾静脉注射PBS重悬的USCs, 剂量为2×10⁶细胞/200 μL, 每周2次, 模型组给予等量PBS。移植组中的2只裸鼠, 移植的细胞预先给予Hochest 33342标记, 用于检测外源细胞的定植。

1.8 计算肝脏指数及检测血清AST和ALT

USCs移植2周后, 小鼠用10%水合氯醛麻醉, 取肝脏组织, 计算肝脏指数=肝脏湿重(g)/体重(g)×100%。眼球取血, 离心收集血清检测ALT及AST活性。

1.9 肝脏组织冰冻切片

取2 cm×2 cm×3 cm新鲜小鼠肝脏组织, 用OTC (optimal cutting temperature compound)包埋后进行冰冻切片, 于荧光显微镜下观察标记USCs在肝脏中的定植情况。

1.10 肝脏组织病理学检测

取2 cm×2 cm×3 cm肝脏组织, 用4%多聚甲醛固定后脱水、石蜡包埋、切片。HE染色检测肝脏病理组织变化: 石蜡切片脱蜡水化后苏木素染色2 min, 流水冲洗后盐酸酒精分化7 s, 饱和碳酸锂返蓝10 s, 流水冲洗, 5%伊红染色5 s, 流水冲洗, 酒精梯度脱水后中性树脂封片, 通风橱晾干, 光学显微镜下拍照。Masson染色观察肝组织纤维化: 石蜡切片脱蜡水化后weigert铁苏木素染核8 min, 流水冲洗2 min, 盐酸酒精分化10 s, 流水冲洗1 min, Masson蓝化液10 s, 流水冲洗1 min, Masson丽春红染色液染色6 min, 配制弱酸工作液(蒸馏水:弱酸原液=2:1), 洗涤组织40 s, 1%磷钼酸溶液水化2 min, 弱酸工作液洗涤1 min, 苯胺蓝染色1.5 min, 弱酸工作液洗涤1 min, 95%酒精脱水3 min, 100%酒精脱水2次, 每次5 min, 中性树脂封片, 通风橱晾干, 光学显微镜下拍照。

1.11 统计学分析

采用SPSS统计软件进行数据分析, 结果用平均值±标准差表示, 单因素方差分析(ANOVA)用于比

较3组间差异, *t*检验用于比较2组间的差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 USCs的形态学

正常健康人的USCs为贴壁生长细胞, 呈米粒状, 胞体较小, 排列紧密, 原代接种后3天左右开始贴壁, 10~14天可达50%~60%, 即可传代。传代后细胞生长速度加快, 3~4天细胞融合率达80%以上, 体外培养至10代增殖明显减慢(图1)。

2.2 USCs的鉴定

流式结果显示, USCs表达间充质干细胞表面特异性标志物CD24、CD29、CD73、CD90和CD105, 阳性率分别为96.0%、99.9%、95.9%、90.5%、3.64%, 表达周期表面标志物CD146, 阳性率为93.1%, 不表达造血细胞表面标志物CD31、CD34、CD45(图2)。这说明, USCs具有一定间充质干细胞的特性。

2.3 成骨分化

未经诱导的USCs ALP及茜素红染色阴性, 成骨诱导1周后ALP染色阳性细胞率为20%~30%, 胞质成蓝紫色, 核外围较深染, 说明有早期成骨分化; 成骨诱导2周后茜素红染色阳性明显增多, 钙结节呈红色团块, 部分细胞为紫红色, 说明USCs晚期成骨分化明显, 有钙盐沉积。这提示USCs具有成骨分化的能力(图3A)。

2.4 成脂分化

未经诱导的USCs油红O染色阴性, 成脂诱导2周后, 油红染色结果显示, 30%~40%的细胞呈空泡

样、脂肪样变、红染, 部分细胞可见较多脂滴, 提示USCs具有成脂分化的能力(图3A)。

2.5 成肝分化

未诱导USCs及单独成肝诱导的USCs, ICG及PAS染色阴性。10天后对照组及单独的USCs诱导组没有细胞摄取ICG, 与肝干细胞共培养的USCs诱导组有10%~20%的细胞摄取ICG; PAS染色结果类似: 对照组以及单独的USCs诱导组细胞质内几乎无紫红色颗粒, 即几乎没有糖原合成, 与肝干细胞共培养的USCs诱导组中, 8%~10%的细胞质内有少量紫红色的颗粒。这说明单独的成肝诱导培养基不能诱导USCs成肝分化, 而与肝干细胞共培养成肝诱导对USCs成肝分化有一定效果(图3B)。

2.6 Hoechst标记细胞在肝组织中的定植

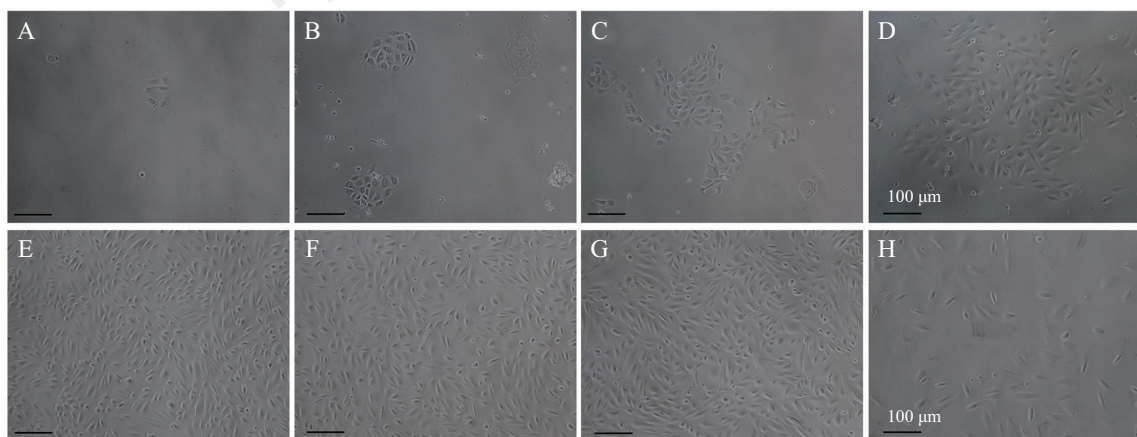
USCs移植组观察到有少量蓝色标记的细胞, 说明尾静脉注射的细胞能定植到肝脏(图4)。

2.7 各组裸鼠肝脏指数及血生化指标

模型组与正常组相比, 肝脏指数显著增高 ($P < 0.05$), 急性肝损伤标志ALT增高, 但无统计学意义 ($P > 0.05$), 慢性肝损伤标志AST增高, 有统计学意义。移植组与模型组相比, 肝脏指数显著降低 ($P < 0.05$), ALT和AST均降低, 但无统计学意义 ($P > 0.05$)。这说明, 10% CCL₄能成功构建慢性肝损伤模型, 且USCs尾静脉移植对CCL₄构建的慢性肝损伤有一定修复作用(图5)。

2.8 各组裸鼠肝脏组织病理

HE染色切片可以看到对照组裸鼠肝脏组织结构正常, 肝小叶完整; CCL₄模型组较空白对照组有



A~D分别代表3、5、7、9天; E~H分别代表P₃、P₅、P₇、P₁₀。

A~D represent 3, 5, 7, and 9 days, and E~H represent P₃, P₅, P₇, and P₁₀, respectively.

图1 USCs的形态

Fig.1 Morphology of USCs

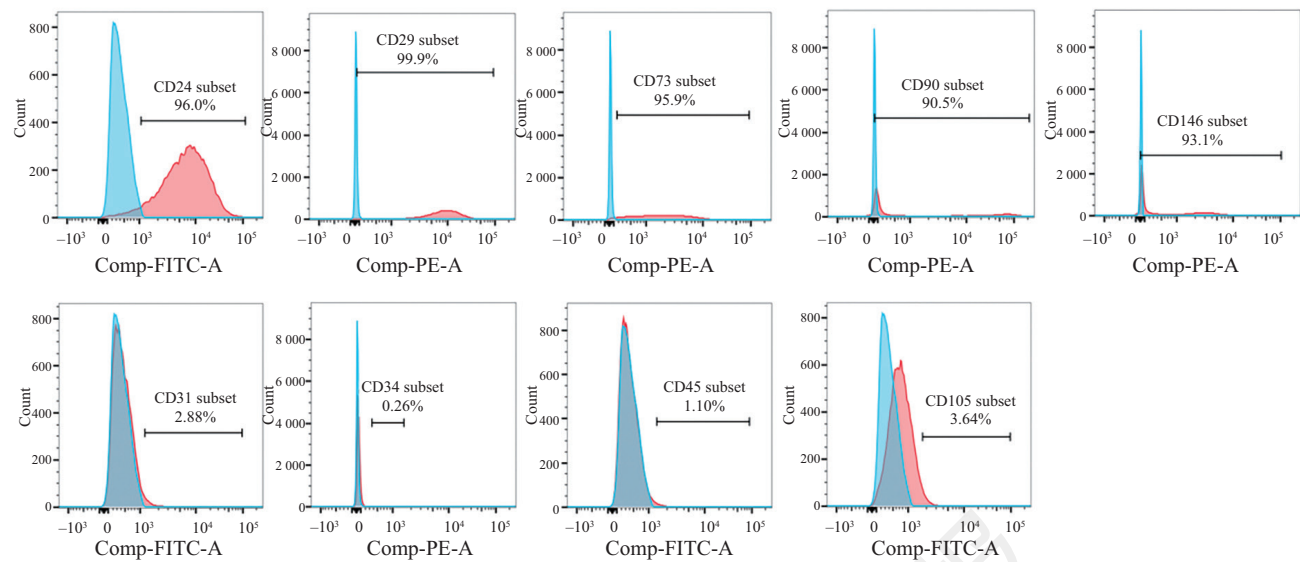
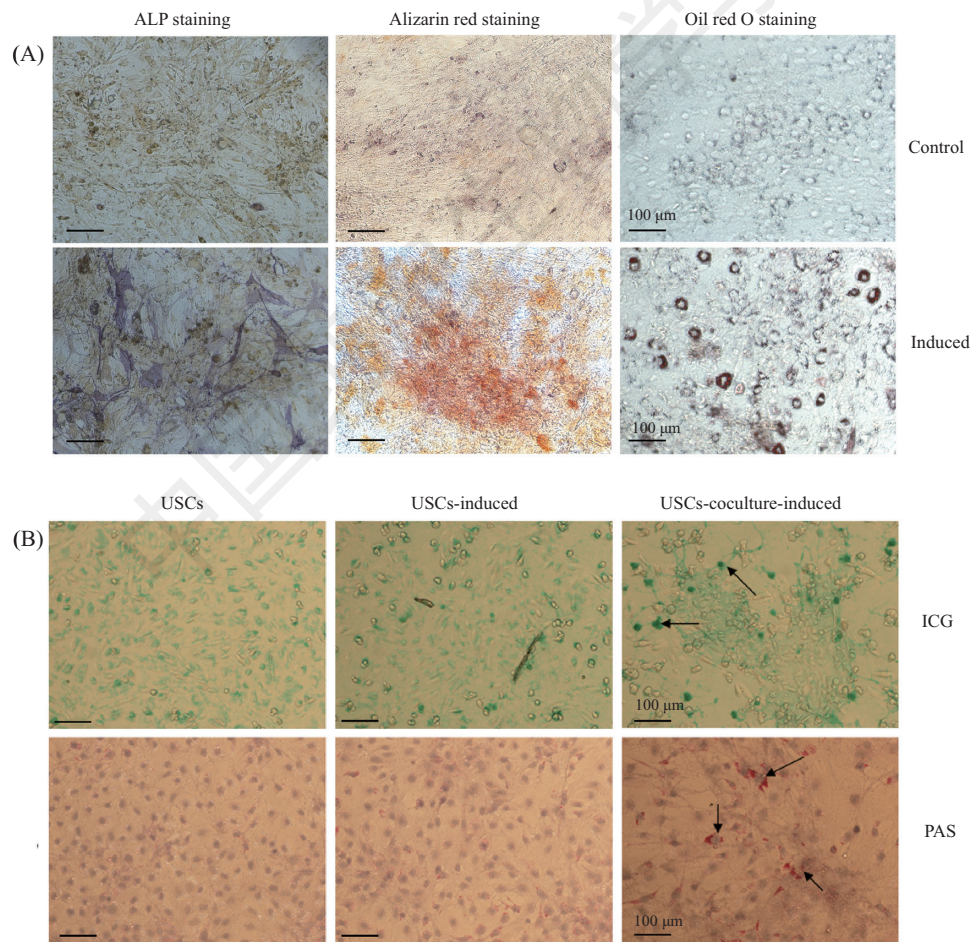


图2 USCs表达大多数间充质干细胞标志物
Fig.2 USCs express most mesenchymal stem cell markers



A: 处理1周后的ALP染色及处理2周后的茜素红染色、油红O染色; B: 处理10天后的ICG摄取实验及PAS染色。箭头表示吲哚菁绿颗粒及PAS染色阳性颗粒。

A: ALP staining after 7 days of treatment and alizarin red staining and oil red O staining after 14 days of treatment; B: ICG uptake and PAS staining after 10 days of treatment, respectively. Arrows represent indocyanine green spots and PAS staining positive spots respectively.

图3 USCs的多向分化
Fig.3 Multidirectional differentiation of USCs

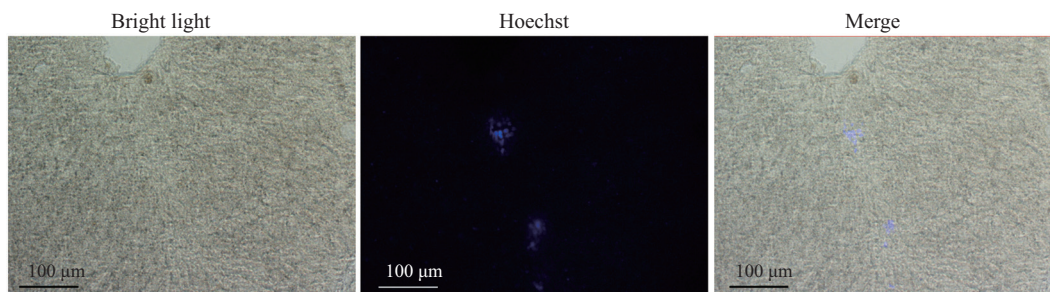
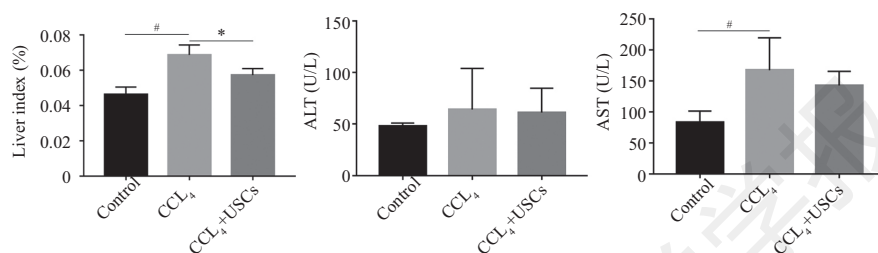


图4 尾静脉移植的USCs定植于肝脏

Fig.4 USCs transplanted through the tail vein colonize the liver



[#] $P < 0.05$, 与对照组比较; ^{*} $P < 0.05$, 与模型组比较。

[#] $P < 0.05$ compared with the control group; ^{*} $P < 0.05$ compared with the model group.

图5 USCs移植修复小鼠肝功能

Fig.5 USCs transplantation repair liver function in mice

明显的肝细胞退行性变, 表现为肝索结构紊乱, 核固缩或消失, 有较多岛屿状假小叶结构, 汇管区有较多炎性细胞浸润; USCs移植治疗组肝脏有一定修复作用(图6)。

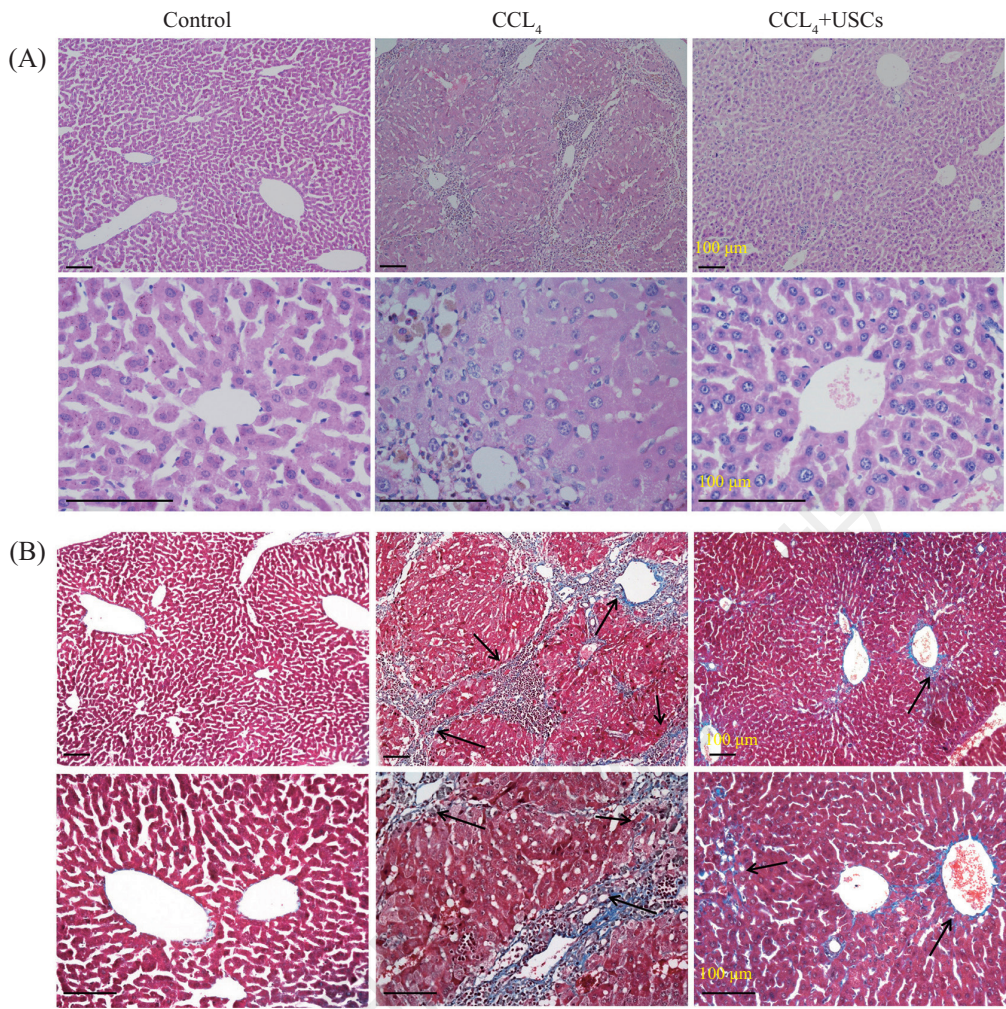
Masson染色切片可以看到CCL₄造模组较空白对照组有明显的纤维增生, 汇管区周边纤维架桥形成表现为蓝染, 肝脏组织结构紊乱; USCs移植组肝脏纤维化有一定修复(图6)。

3 讨论

干细胞已被证实具有强大的分化潜能、自我更新能力、免疫调节作用以及靶向治疗功能, 是肝细胞移植的重要种子细胞来源。大量研究表明, 不同的干细胞能在体外一定条件下诱导为肝细胞样细胞^[9-12], 还可通过旁分泌作用激活内源性干细胞的增殖和分化、通过免疫调节减轻炎症反应、抑制受损肝细胞凋亡, 从而促进肝脏组织的再生修复^[13-14]。理想的种子细胞是来源于患者自身的干细胞, 可不被自身免疫系统所排斥, 从临床使用角度来看, 自体干细胞能够最大程度避免移植后的相关副作用。国内外已有应用自体骨髓间充质干细胞移植治疗慢性肝损伤的临床试验病例, 患者生化指标和临床症状

均有不同程度的改善^[15-16]。然而骨髓间充质干细胞采集需要患者的整体状态良好, 并提前进行细胞动员, MSCs的获取必须使用有创方法, 这会增加患者不必要的痛苦和潜在并发症的风险。如果能找到一种更易获取的自体干细胞, 作为肝细胞移植的种子细胞, 将会在很大程度上避免以上不足。

USCs是一种尿液中存在的具有很强增殖功能以及某些间充质干细胞特征的细胞^[17-19], 具有多向分化功能、免疫调节及旁分泌作用。不同模型动物实验证实USCs经旁分泌作用, 能改善肾功能, 阴茎勃起功能, 以及尿道括约肌功能^[18-19]。在本研究中, 我们也观察到USCs具有多向分化潜能, 能进行成骨成软骨和成脂分化。随后, 我们将诱导胚胎肝干细胞成熟分化的培养基用于诱导USCs, 发现其不能向肝脏样细胞分化, 而在与肝干细胞共培养的环境下, 少部分细胞具有ICG摄取和糖原合成功能。USCs很可能是来源于肾脏的干细胞, 属于中胚层细胞, 较易分化为同属于中胚层的骨细胞及脂肪细胞, 而不容易跨胚层分化为属于内胚层的肝脏细胞^[20]。我们采用的成肝分化培养基主要针对定向的肝脏干细胞, 但是共培养的诱导下, 有少部分USCs具有一定的合成代谢功能, 提示在体内肝脏微环境的作用下,



A: HE染色; B: Masson染色。黑色箭头: 纤维组织蓝染。
A: HE staining; B: Masson staining. Black arrow: fibrous tissue blue stain.

图6 USCs移植修复肝脏损伤
Fig.6 USCs transplantation repaired liver injury in mice

USCs有向肝细胞分化的潜能, 可作为肝细胞移植治疗的种子细胞。USCs具有强大的增殖能力, 1个USC经培养4周后可达 3.8×10^8 个, 将收集1次尿液(约200 mL)所得到的平均约14个USCs培养4周, 产生的细胞数量可达 5.3×10^9 (P₅), 收集24 h尿液可获得足够数量的细胞^[21-23]。自体USCs用于肝细胞移植有避免自身免疫排斥的优势, 临床上可能更适用于慢性肝脏疾病的治疗。CCL₄是一种肝毒物, 能引起肝细胞坏死, 常用于诱导各种急性或慢性肝衰竭模型。本研究中, 模型组肝脏指数显著增高, 血清AST水平较正常组增高, 但ALT无明显变化, 可能是12周的建模过程中裸鼠自身肝脏功能发生了代偿恢复。临床上也存在相似的情况: 急性肝病患者中反映肝细胞坏死严重程度的生化指标ALT、AST显著增高, 而

慢性肝病患者的肝功通常在正常范围的上限值波动^[24]。模型组肝脏有明显的肝细胞退行性变和纤维增生, 肝脏组织结构紊乱, 出现假小叶, 12周停止给药, 14周检测发现肝脏病理损伤持续存在, 提示建模稳定, 可用于评估USCs移植治疗的效果。在本研究中, 我们模拟临床外周静脉移植的方式, 将USCs分4次经尾静脉移植入, 移植组肝脏指数有明显降低, HE和Masson染色结果发现, 肝纤维化进展和肝细胞坏死减少, 说明USCs移植可在一定程度上修复慢性肝损伤的病理改变。我们用Hochest标记USCs进行体内示踪, 发现仅少量细胞进入损伤的肝组织, 外源细胞是否分化为有功能的肝细胞或通过分泌营养因子以改善肝功能还有待进一步研究^[25-26]。

综上所述, 本研究证实了尿源性干细胞的间充

质细胞表型, 自我更新的多向分化潜能, 移植入慢性肝损伤模型小鼠能有效改善肝组织的损伤。通过无创伤方法获取的自体尿源性干细胞可作为一种肝细胞移植的理想种子细胞来源, 在慢性肝脏疾病的临床治疗中显示出良好的应用前景。

参考文献 (References)

- Wang F, Zhou L, Ma X, Ma W, Wang C, Lu Y, *et al.* Monitoring of intrasplenic hepatocyte transplantation for acute-on-chronic liver failure: a prospective five-year follow-up study. *Transplant Proc* 2014; 46(1): 192-8.
- Koblihová E, Lukšan O, Mrázová I, Ryska M, Červenka L. Hepatocyte transplantation attenuates the course of acute liver failure induced by thioacetamide in Lewis rats. *Physiol Res* 2015; 64(5): 689-700.
- Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A. Current status of hepatocyte transplantation. *Transplantation* 2012; 93(4): 342-7.
- Pareja E, Cortés M, Gómez-Lechón MJ, Maupoey J, San-Juan F, López R, *et al.* Current status and future perspectives of hepatocyte transplantation. *Cir Esp* 2014; 92(2): 74-81.
- Qin D, Long T, Deng J, Zhang Y. Urine-derived stem cells for potential use in bladder repair. *Stem Cell Res Ther* 2014; 5(3): 69.
- Yang Q, Chen X, Zheng T, Han D, Zhang H, Shi Y, *et al.* Transplantation of human urine-derived stem cells transfected with pigment epithelium-derived factor to protect erectile function in a rat model of cavernous nerve injury. *Cell Transplant* 2016; 25(11): 1987-2001.
- Zhang Y, McNeill E, Tian H, Soker S, Andersson KE, Yoo JJ, *et al.* Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction. *J Urol* 2008; 180(5): 2226-33.
- Bi Y, He Y, Huang JY, Xu L, Tang N, He TC, *et al.* Induced maturation of hepatic progenitor cells *in vitro*. *Braz J Med Biol Res* 2013; 46(7): 559-66.
- Magner NL, Jung Y, Wu J, Nolte JA, Zern MA, Zhou P, *et al.* Insulin and IGFs enhance hepatocyte differentiation from human embryonic stem cells via the PI3K/AKT pathway. *Stem Cells* 2013; 31(10): 2095-103.
- Meng F, Francis H, Glaser S, Han Y, Demorrow S, Stokes A, *et al.* Role of stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor in remodeling during liver regeneration. *Hepatology* 2012; 55(1): 209-21.
- Lin N, Lin J, Bo L, Weidong P, Chen S, Xu R. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells in an alginate scaffold. *Cell Prolif* 2010; 43: 427-34.
- Hodgkinson CP, Naidoo V, Patti KG, Gomez JA, Schmeckpeper J, Zhang Z, *et al.* Abi3bp is a multifunctional autocrine/paracrine factor that regulates mesenchymal stem cell biology. *Stem Cells* 2013; 31(8): 1669-82.
- Alvarez-Dolado M, Martínez-Losa M. Cell fusion and tissue regeneration. *Adv Exp Med Biol* 2011; 713: 161-75.
- Lerou PH, Daley GQ. Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Rev* 2005; 19(6): 321-31.
- Watt FM, Driskell RR. The therapeutic potential of stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010; 365(1537): 155-63.
- 刘力伟, 陈从新, 李嘉嘉, 朱立新, 胡立芬. 不同年龄段慢性肝损伤患者自体骨髓干细胞体外增殖能力观察. *实用肝病杂志* (Liu Liwei, Chen Congxin, Li Jiajia, Zhu Lixing, Hu Lifeng. Observation of proliferative capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells in patients with chronic liver failure *in vitro*. *Journal of Practical Hepatology*) 2013; 16(1): 26-8.
- Zhang Y, McNeill E, Tian H, Soker S, Andersson KE, Yoo JJ, *et al.* Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction. *J Urol* 2008; 180(5): 2226-33.
- Bharadwaj S, Liu G, Shi Y, Wu R, Yang B, He T, *et al.* Multipotential differentiation of human urine-derived stem cells: potential for therapeutic applications in urology. *Stem Cells* 2013; 31(9): 1840-56.
- Bharadwaj S, Liu G, Shi Y, Markert C, Andersson KE, Atala A, *et al.* Characterization of urine-derived stem cells obtained from upper urinary tract for use in cell-based urological tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2011; 17(15/16): 2123-32.
- 孙博. 人胚胎干细胞向肝脏样细胞诱导分化中限定性内胚层分化的研究进展. *国际生殖健康/计划生育杂志* (Sun Bo. Recent Advances of differentiation of human embryonic stem cells into endoderm and hepato-like cell progenitor. *Journal of International Reproductive Health/Family Planning*) 2013; 32(1): 34-7.
- Zhang D, Wei G, Li P, Zhou X, Zhang Y. Urine-derived stem cells: A novel and versatile progenitor source for cell-based therapy and regenerative medicine. *Genes Dis* 2014; 1(1): 8-17.
- Wu S, Liu Y, Bharadwaj S, Atala A, Zhang Y. Human urine-derived stem cells seeded in a modified 3D porous small intestinal submucosa scaffold for urethral tissue engineering. *Biomaterials* 2011; 32(5): 1317-26.
- Qin H, Zhu C, An Z, Jiang Y, Zhao Y, Wang J, *et al.* Silver nanoparticles promote osteogenic differentiation of human urine-derived stem cells at noncytotoxic concentrations. *Int J Nanomedicine* 2014; 9: 2469-78.
- 曾珍, 楼敏, 常秀娟, 耿华, 韩玉坤, 陈菊梅, 等. 四类肝衰竭的临床特点及转归分析. *传染病信息* (Zeng Zhen, Lou Min, Chang Xiujuan, Geng Hua, Han Yukun, Chen Jumei, *et al.* Clinical characteristics and prognosis of four types of liver failure. *Infectious Disease Information*) 2008; 21(6): 353-4.
- Yamaza T, Alatas FS, Yuniartha R, Yamaza H, Fujiyoshi JK, Yanagi Y, *et al.* *In vivo* hepatogenic capacity and therapeutic potential of stem cells from human exfoliated deciduous teeth in liver fibrosis in mice. *Stem Cell Res Ther* 2015; 6(1): 171.
- Fu X, Jiang B, Zheng B, Yan Y, Wang J, Duan Y, *et al.* Heterogenic transplantation of bone marrow-derived rhesus macaque mesenchymal stem cells ameliorates liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mouse. *PeerJ* 2018; 6(13/14): e4336.