

彭金荣, 浙江大学动物科学学院教授、教育部“长江特聘教授”。主要以斑马鱼为模式动物研究肝脏发育和再生的分子调控机制, 发现核仁中存在一个由Def-Capn3复合体介导蛋白质降解的途径, 该途径通过降解关键蛋白质在肝脏发育和再生中发挥重要功能, 为肝脏发育和再生研究开辟了新的领域。此外, 在植物激素赤霉素信号传导领域开展了系统的研究工作, 通过研究DELLA基因功能提出了赤霉素“去抑制生长”的作用机制, 克隆了小麦‘绿色革命基因’*Rht*, 为人们认识赤霉素作用的分子机制作出了重要贡献。

<https://person.zju.edu.cn/pengjinrong#0>

## 肝脏再生过程中的信号传导与细胞来源

陈锋 彭金荣\*

(浙江大学动物科学学院, 动物分子营养教育部重点实验室, 杭州 310058)

**摘要** 肝脏是哺乳动物中唯一能够在损伤后再生恢复到100%最初重量的内脏器官, 是再生研究的理想模型。关于肝脏再生过程中的信号传导与调控方式的研究由来已久, 尤其是肝脏手术切除后的再生过程, 积累的研究结果已能对该再生时空坐标系进行相对完善的描述。该文将整合目前人们对肝脏再生的认识, 结合小鼠和斑马鱼模型的最新的研究成果, 对肝脏的再生过程调控和细胞来源问题进行概述。

**关键词** 肝脏再生; 信号传导; 小鼠; 斑马鱼; 肝脏部分切除; 细胞来源; 肝脏前体细胞

## Signal Transduction and Cell Origin During Liver Regeneration

CHEN Feng, PENG Jinrong\*

(MOE Key Laboratory for Molecular Animal Nutrition, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract** Liver is the only mammalian internal organ capable of regrowing to 100% of its original weight after partial hepatectomy, which makes it an ideal model for organ regeneration research. There has been a long history of researches on signal transduction and transcriptional regulation during the process of liver regeneration, especially after partial hepatectomy. In this review, the current understanding of the signaling pathways and cell origins governing liver regeneration based on the latest studies in mouse and zebrafish models are summarized.

**Keywords** liver regeneration; signal transduction; mouse; zebrafish; partial hepatectomy; cell source; hepatocyte progenitor cells (HPCs)

肝脏是人体内部最大的实质性内脏器官, 起着储存肝糖原、合成分泌性蛋白质、调节脂质代谢等作用, 肝脏同时也是胆汁的制造场所, 还具有解毒功

能, 并参与机体的免疫反应, 是机体内不可或缺的重要内脏器官。

肝脏是哺乳动物中唯一能够在部分切除或化

国家科技部重点研发计划(批准号: 2018YFA0800502)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0571-88982233, E-mail: pengjr@zju.edu.cn

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2018YFA0800502)

\*Corresponding author. Tel: +86-571-88982233, E-mail: pengjr@zju.edu.cn

网络出版时间: 2019-09-29 16:47:28

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190929.1647.012.html>

学损伤后能够100%再生恢复最初重量的内脏器官。当然,肝脏再生(liver regeneration)确切的表达方式应该是由细胞数量增殖带来的肝脏代偿性增生(compensatory liver hyperplasia),使肝脏恢复到原来的大小和功能,而无法使肝脏在形态上恢复到损伤前的样子<sup>[1]</sup>。不过,学界统一沿用肝脏再生这一说法。

关于肝脏能够再生的认识由来已久,古希腊人似乎早已发现肝脏具有很强的再生能力:在古希腊神话中,普罗米修斯因替人类盗取火种而触犯宙斯,被锁缚于高加索山,被恶鹰啄食肝脏,而其肝脏却又总能够迅速再生,每日如此,由此承受循环往复之苦。相较于古希腊人的“先知先觉”,近代真正文献记载的关于肝脏再生的定义和描述可以追溯到19世纪,当时研究人员发现肝脏组织小部分切除后能够成功恢复<sup>[2]</sup>。至今关于肝脏再生过程中的细胞动力学变化、组织学变化、相关信号通路的调控都有了细致的研究,很多综述都对这一过程进行了详细的探讨<sup>[1,3-14]</sup>。本文将整合最新关于肝脏再生研究中主要的信号传导过程进行概述。

## 1 肝脏再生模型

诱导肝脏再生的模型有很多,在主要的哺乳动物模型大鼠和小鼠中,诱导肝脏再生的方法主要有肝脏2/3手术切除和化学药物损伤。其中部分肝脏外科手术切除是最受推崇的诱导肝脏再生的方法,主要原因在于:其一,手术切除不涉及大规模组织坏死、不引起急性炎症;其二,肝切后不涉及坏死组织的清除过程,肝组织能够迅速进行再生,过程保守稳定,利于建立整个再生过程的调控模型<sup>[8]</sup>。相比之下,化学药物损伤本质上是通过化学毒素(如CCl<sub>4</sub>)诱导的部分肝组织坏死,损伤后的最初反应是坏死组织的清理,白细胞和巨噬细胞的浸润使得再生修复过程变得复杂,而且坏死的组织多少个体间存在很大差异,导致清除过程不易控制。这使得化学药物损伤模型不稳定,易受剂量、个体状态、个体年龄等因素影响,故而不易描述和建模。不过,尽管肝切后的再生模型确实适合作为研究细胞增殖的一般机制,但与人体面对的实际情况并不一致——除肝脏移植外,人更多的时候是由于接触各种来源的毒素导致肝脏组织坏死,这使得细胞毒素诱导的肝脏再生模型显得更具有临床意义,因而近年来备受重

视<sup>[15]</sup>。

除了上述的两种主要模型外,诱导肝脏再生的方法还有门静脉分支高位结扎(portal branch ligation)<sup>[16-17]</sup>、门体静脉分流手术(portosystemic shunting)<sup>[18-19]</sup>以及遗传模型<sup>[20-21]</sup>等。本文将主要对肝脏部分切除后的再生模型进行探讨。

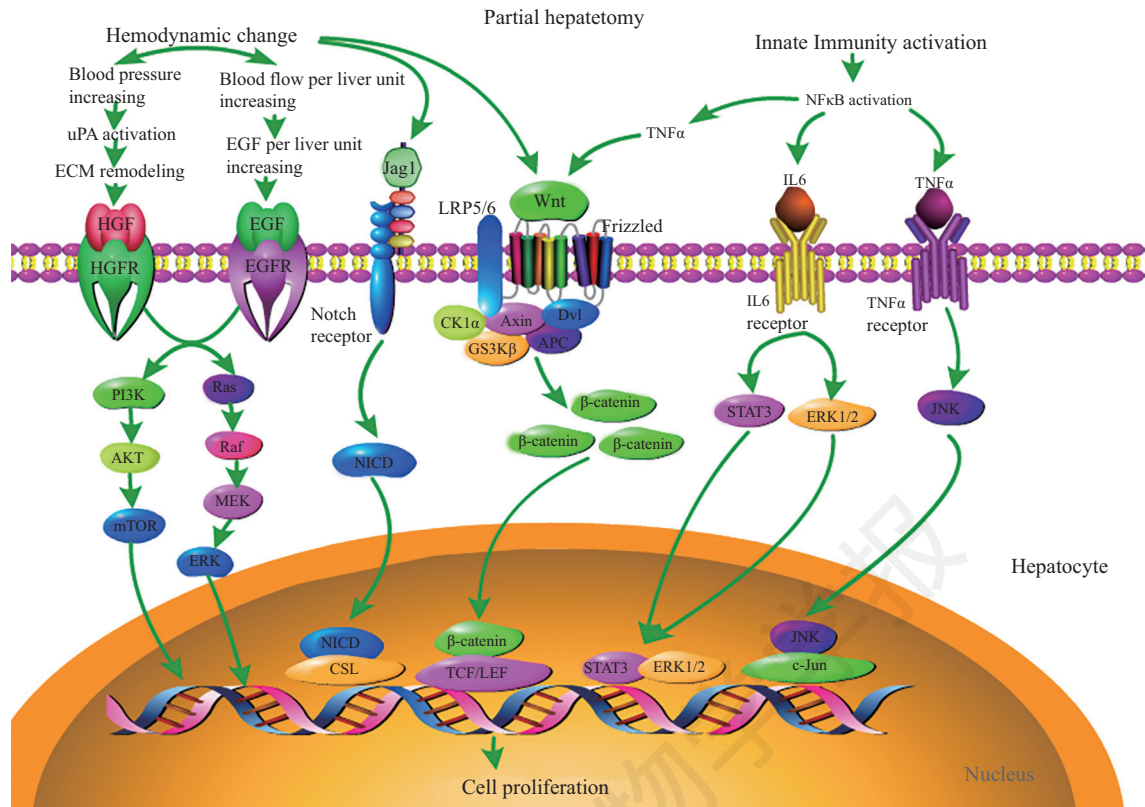
## 2 肝脏部分切除后的再生

以大鼠和小鼠的肝脏2/3切除后的再生为例,肝脏再生过程可分为三个阶段:起始阶段、增殖阶段和终止阶段。因为增殖阶段主要涉及到细胞后期的调控,以下针对起始阶段和终止阶段的信号传导方式进行讨论(图1)。

### 2.1 起始阶段

**2.1.1 HGF与EGF** 肝脏再生过程中细胞增殖的激活首先需要使细胞感受到肝脏损伤的存在。现在普遍认为,肝脏细胞的损伤感受主要与血液动力学的改变有关。肝门静脉是肝脏中血液的主要供应途径,在肝脏2/3切除后,门静脉中本应流向全肝的血液只流向剩余1/3肝组织。用简单的数学推演就会发现,这必然会导致两个结果:其一,整个毛细血管床受到的压力显著增加;其二,相对而言,每一个肝脏细胞接收到的来自于门静脉中的信号因子的数量是肝切前的3倍<sup>[14]</sup>。尽管实际情况并不一定如数学推演一般确切,但压力的增加和信号因子的相对增多应是必然的。Marubashi等<sup>[22]</sup>建立肝-门静脉分流模型使肝切后血压保持恒定,结果发现,在这一模型中肝脏并不能及时再生,证实了门静脉血压变化对于肝脏损伤感受以及生长信号激活的重要作用。这一实验中血液实际流经肝组织的流量也没有变化,因此结论也可能是血液中的信号因子浓度不曾增加导致再生异常,或者两种原因兼而有之。总之,肝切后血液动力学变化是损伤感受和再生信号激活的第一步。

血液动力学变化随后导致一系列结果。首先,血管内皮细胞感受到的压力增大,这种机械压力会导致尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase plasminogen activator, uPA)活性增加<sup>[23]</sup>。uPA的迅速激活(肝切后5分钟左右)致使纤溶酶原转化为纤溶酶,随后导致细胞外基质蛋白的重构和周转变换(extracellular matrix protein remodeling)。在此过程中,位于细胞外基质中的主要增殖启动因子之一——肝实质细



在肝脏部分切除后, 血液动力学出现明显变化, 其中门静脉血压增高诱导uPA活化, 进而导致细胞外基质重构, 使HGF的激活并与受体结合。同时, 血流的加速使肝组织接收到的十二指肠来源的EGF相对量增加, 激活其受体EGFR。二者通过PI3K-AKT-mTOR和Ras-Raf-MEK等信号级联反应, 激活细胞增殖相关转录因子表达, 启动再生。配体Jag1通过特定的方式感受到血液动力学变化而激活, 结合肝细胞表面的Notch1受体, 使酶切释放的NICD易位至细胞核中, 激活目的基因表达。Wnt也能够通过特定的方式感受来自静脉的血液动力学变化而被激活并分泌, 结合其位于肝实质细胞膜上受体Frizzled和LRP5/6, 使 $\beta$ -Catenin的磷酸化降解复合物钝化,  $\beta$ -Catenin激活入核, 诱导下游基因表达。肝脏中的巨噬细胞Kuffer细胞产生的先天性免疫反应激活NF- $\kappa$ B, 致使Kuffer分泌更多的IL6和TNF $\alpha$ , 其中IL6与肝实质细胞上的受体结合, 激活STAT3和ERK1/2, 诱导目的基因表达。TNF $\alpha$ 与肝实质细胞上的受体结合, 激活JNK/c-Jun启动目的基因的表达, 促进细胞增殖。

After partial hepatectomy, hemodynamics showed significant changes, among which increased portal vein blood pressure induced uPA activation, which led to extracellular matrix remodeling and the activation and binding of HGF to its receptor. Meanwhile, the acceleration of blood flow increases the relative amount of duodenal-derived EGF, thus activating its receptor EGFR in liver tissue. Through signaling cascade reactions such as PI3K-AKT-mTOR and RAS-RAF-MEK, the expression of transcription factors related to cell proliferation is activated, thus initiating liver regeneration. Ligand Jag1 is activated by sensing hemodynamic changes in a specific way, binding to the Notch1 receptor on the surface of liver cells, enabling NICD translocation released by enzyme digestion to the nucleus and activating target gene expression. Wnt can also be activated and secreted through sensing the changes of hemodynamics from veins in a certain way. Through binding with its receptor Frizzled and LRP5/6 on the surface of hepatocytes, Wnt can passivate the phosphorylated degradation complex of  $\beta$ -Catenin, activate  $\beta$ -Catenin through translocating into the nucleus to induce downstream gene expression. The innate immune response produced by macrophages Kuffer cells in the liver activates NF- $\kappa$ B, causing Kuffer cells to secrete more IL6 and TNF $\alpha$ . IL6 binds to its receptors on liver parenchymal cells, activates STAT3 and ERK1/2, and induces the expression of target genes. TNF $\alpha$  binds to receptors on liver parenchyma cells, activates JNK/c-Jun to promote the expression of target genes, then accelerates cell proliferation.

图1 肝脏部分切除后再生信号的启动模式图

Fig.1 Signaling pathways involved in initiating liver regeneration after partial hepatectomy

胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)被uPA激活, 进而激活其位于肝实质细胞表面的受体HGFR。与此同时, 肝门静脉血液中来自十二指肠的另一个主要增殖启动因子——表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)因血流量的增加而在肝组织中相对浓度上升, 激活其受体EGFR<sup>[24-25]</sup>。HGFR和EGFR的激活随后导致细胞内一系列的信号级联反应, 其

中主要包括Ras-Raf-MEK和PI3K-AKT-mTOR两种信号通路, 从而增强C-myc、C-foc、C-jun等转录因子的表达, 诱导Cyclin和CDKs的表达和活化, 激活蛋白合成和细胞分裂<sup>[5]</sup>。

2.1.2 先天性免疫反应 先天性免疫反应被认为也在损伤信号呈递和再生激活方面扮演重要角色<sup>[1,4]</sup>。先天性免疫组件脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和补

体因子C3a、C5a激活肝脏中的巨噬细胞——Kuffer细胞,使NF- $\kappa$ B活化并由细胞质转移到细胞核中,激活肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)的转录。TNF信号通路也能反过来进一步活化NF- $\kappa$ B,形成互相激活的循环,从而诱导Kuffer细胞产生更多的白细胞介素6(interleukin 6, IL6)。IL6随后与其位于肝实质细胞上的受体结合,进而活化信号转导及STAT3(signal transducer and activator of transcription 3)和ERK1/2,随即激活大量与肝细胞增殖相关的目的基因的表达,如细胞周期蛋白Cyclin D1。

**2.1.3 Wnt/ $\beta$ -Catenin** Wnt/ $\beta$ -Catenin的迅速激活也是肝切后早期最显著的现象之一。 $\beta$ -Catenin蛋白在肝切后1~5分钟就出现了瞬时的显著上调并迅速地转移至细胞核中<sup>[26]</sup>。细胞核中 $\beta$ -Catenin的增加激活其目的基因如Cyclin D1,而瞬时表达Cyclin D1确实足以促进细胞增殖和肝脏再生<sup>[27]</sup>。 $\beta$ -Catenin在细胞核中的上调可以维持到肝切后6小时<sup>[26]</sup>。关于最初几分钟 $\beta$ -Catenin的激活与细胞核转移源于何种信号,尚无有效定论。不过可能与ECM重构和细胞接触的信号因子增多有关,因为 $\beta$ -Catenin的活化需要细胞外的Wnt蛋白通过其细胞膜上受体Frizzled和共同受体LPR5/6将 $\beta$ -Catenin的降解复合体吸附于细胞膜上从而钝化降解功能来实现<sup>[28]</sup>,而Wnt的增加可能与血流加速带来的更多信号因子相关。

Wnt/ $\beta$ -Catenin的激活也被认为与先天免疫激活有关<sup>[28]</sup>。TNF $\alpha$ 激活后,能够促进肝脏中的巨噬细胞(Kuffer细胞)中Wnt的表达,Wnt的分泌导致肝实质细胞中的 $\beta$ -Catenin免于降解并进入核仁,促进目的基因Cyclin D1等的表达,从而激活细胞增殖。另外,值得一提的是,Wnt/ $\beta$ -Catenin对于肝小叶分区具有关键作用<sup>[29]</sup>。

**2.1.4 Notch** Notch的激活在肝切后很早时间就已出现。研究表明,肝切后不久肝脏中Notch的主要配体Jag1在肝脏中显著上调,致使Notch受体Notch1的胞内结构域NICD在肝切后5~15分钟便已经在细胞核中出现上调<sup>[30]</sup>,从而促进Hes1/5、c-myc和Cyclin D1等目的基因转录,进而激活细胞增殖。关于Jag1如何能够迅速地响应损伤变化而激活,还没有明确定论。有研究发现,Jag1作为肝脏内重要Notch配体,不仅在肝祖细胞(hepatic progenitor cells, HPCs)和胆管细胞中表达,还在门静脉间充质平滑肌细胞中表达,特异性敲除这部分细胞中的Jag1会导致肝脏发

育的异常<sup>[31]</sup>。这表示,Jag1的激活可能也是感应门静脉血压增高的结果,也可能与血液流速加快导致接触的信号因子的增多有关。

## 2.2 终止阶段

增殖期,残余的肝脏组织增殖扩张使肝脏恢复到原初的大小或略超。此后,肝脏需要停止分裂增殖并通过细胞程序凋亡清除过度增殖的细胞以保持肝脏合适的大小,否则过度增殖会导致不良后果甚至诱发癌变<sup>[3]</sup>。目前对于肝脏再生的启动已能较清晰地描画出整个调控通路时空谱,相比之下,人们对于再生终止的了解还远远不够。以下对至今了解较多的几个相关信号通路进行概述。

**2.2.1 TGF $\beta$**  TGF $\beta$ 虽是最为人熟知的肝脏再生终止信号,但人们对TGF $\beta$ 在肝脏再生过程中的作用的认知并不深刻。TGF $\beta$ 主要以一种旁分泌方式由间充质细胞如肝脏星状细胞(hepatic stellate cells)、Kupffer细胞以及血小板合成和分泌<sup>[32]</sup>。有趣的是,早在肝切后1小时内,TGF $\beta$ 在血液中的含量已显著升高。考虑到TGF $\beta$ 本是通过Decorin黏附在细胞膜表面<sup>[33]</sup>,血液中的含量升高是TGF $\beta$ 从膜表面脱离进入血液并与血液中的 $\alpha$ -2巨球蛋白结合<sup>[34]</sup>的结果,这种从肝实质细胞膜表面解离并固定到血浆中的过程可能起到避免TGF $\beta$ 在早期抑制肝脏细胞的增殖的作用<sup>[7]</sup>。

TGF $\beta$ 需要在肝脏再生后期被激活,以达成抑制细胞增殖的目的。从增殖的中期开始,一种间接的肝细胞抑制因子CIMPR表达,将TGF $\beta$ 前体转换为激活态TGF $\beta$ ,并调节活化的TGF $\beta$ 与其受体TGF $\beta$ R的结合<sup>[3,35]</sup>。除了TGF $\beta$ 本身的活化,其受体的表达与激活也在整个通路的活化上起重要作用,甚至可能更具决定性。研究发现,在肝脏再生的后期,TGF $\beta$ 的受体明显表达增高,致使细胞对于TGF $\beta$ 的敏感程度增加<sup>[36]</sup>。TGF $\beta$ 与受体结合后,R-Smad蛋白被磷酸化并易位至细胞核中,激活细胞周期抑制因子(如CDKs抑制因子)的转录的同时,抑制细胞周期促进因子(如CDK2/4、Cyclin D/E等)的生成,导致细胞周期的阻滞<sup>[3,35]</sup>。TGF $\beta$ 还能启动肝小叶的重构过程并通过提高活性氧(reactive oxygen species, ROS)的水平,诱导过度增殖的肝细胞凋亡。另外,TGF $\beta$ 还能抑制CDK的激活蛋白Cdc25A,从而抑制并终止细胞周期<sup>[3]</sup>。除了TGF $\beta$ 外,与TGF $\beta$ 在同一家族并与TGF $\beta$ 有相似的化学结构的Activin作为DNA合成的

抑制因子,也参与了终止过程<sup>[37-38]</sup>。

**2.2.2 细胞外基质蛋白(extracellular matrix protein, ECM)** 如前文所述,肝脏再生的早期诱导过程中,伴随着强烈的ECM破坏和重构。再生的终止自然不应少了ECM的恢复。TGF $\beta$ 1被激活后,能诱导合成新的ECM,从而抑制新生的HGF和尿激酶,同时新生的ECM使得TGF $\beta$ 在新合成的Decorin的帮助下再次结合到肝实质细胞的细胞膜上,终止细胞周期,并使细胞保持在G<sub>0</sub>期<sup>[6]</sup>。

ECM的重新生成除了影响TGF $\beta$ 外,新生的ECM成分如糖胺聚糖、不同的胶原蛋白等,能通过复杂的方式促进再生的终止。其中,整合素(integrin)作为介导细胞及其外环境之间的跨膜受体,其连接激酶(integrin linked kinase, ILK)复合体IPP(主要成分为ILK、Parvin、Pinch)发挥着抑制细胞周期的功能<sup>[7,39]</sup>,其中具体的调控细节还有待进一步研究。

**2.2.3 Hippo/Yap信号通路** 上述关于终止信号的讨论一直回避了一个重要问题,就是机体是如何感受到肝脏质量的恢复的。这个问题很关键,因为我们探讨过门静脉血压和血流量的变化是再生感受的开始,可是肝脏如何知道何时该终止?是否也是通过血压和血流量恢复?这些问题至今仍是一大谜团。不过,Hippo/Yap信号通路的研究可能为解决这个问题带来曙光。Hippo信号通路是一个新发现的信号通路,在控制器官大小和肿瘤发生方面扮演重要角色<sup>[40]</sup>。Hippo信号通路激活后,MST1/2被激活,并随后通过磷酸化激活LATS1/2,而LATS1/2作为磷酸激酶,进而磷酸化Yap,使其结合14-3-3并停留在胞质,并最终被泛素化途径降解从而失去活性。而当Hippo失活时,未磷酸化的Yap进入细胞核,结合转录因子TEAD(TEA domain family members),促进细胞增殖<sup>[40]</sup>。在肝脏再生过程的早期MST1/2与LATS1/2失活和YAP的活化,以及再生后期肝重恢复后MST1/2和LATS1/2的重新活化证实了Hippo信号通路在肝脏再生过程中的作用<sup>[41]</sup>。不过MST1/2和LATS1/2是通过何种途径被失活和激活的,仍不得而知。尽管关于Hippo调控器官大小的机制仍未清楚,但随着研究的深入,这一通路很可能是解决肝脏再生终止信号来源问题最有前景的方向<sup>[7]</sup>。

尽管关于肝脏再生的调控,已经积累了大量的研究数据,也发现了很多信号感受和传导方式,不过还有很多需要解决的问题,并且很多通路的实际功

能可能比通用模型中描述的要复杂得多。另外,利用手术切除肝脏诱导的再生模型能够让我们很好地认识肝脏再生过程细胞增殖调控的一般模式,但是在临床上,肝脏的损伤更倾向于毒素诱导的慢性肝组织坏死,这一过程往往伴随着组织清理和组织再生的同步进行,其过程要更为复杂,进一步揭示这一情况下的肝脏再生方式对于肝脏疾病的临床治疗更具有指导意义。另外,肝脏再生的终止信号以何种形式发出,又是以何种形式被机体接收的,仍是一个很大的谜题,需要更多的研究人员的努力去揭示这一问题的答案。虽然有很多问题亟待解决,充分总结前人对再生过程的理解依然能够为未来的研究做好铺垫。

### 3 哺乳动物肝脏再生的细胞来源

肝脏再生过程中细胞来源的问题一直备受研究人员的关注。相关的研究也是层出不穷,其中的争议却也持续不断。其实不仅仅是肝脏损伤后的再生过程,成年肝脏本身稳态的维持,即肝实质细胞的更新的细胞来源,也是一个颇具争议的话题。下面先从成体肝脏细胞更新说起。

普遍的观点认为,正常生理条件下肝组织的维持和肝脏细胞的更新是来自于成熟的肝实质细胞的分裂增殖,但是也有研究发现,成年肝脏细胞的稳态来源于肝脏内的前体细胞或干细胞<sup>[6,11]</sup>。他们认为,存在肝脏前体细胞这个观念源于一个现象:在维持细胞稳态方面,具有高度增殖能力的肝实质细胞往往来自于胆管丰富的门静脉周细胞,并且增殖的肝实质细胞逐渐扩散至中央静脉附近<sup>[42]</sup>。这表明,胆管附近可能存在具有干性的细胞来完成成年肝脏细胞的更新。Furuyama等<sup>[43]</sup>通过敲入(Knock in)的方法进行谱系追踪Sox9阳性的胆管细胞,发现Sox9阳性细胞逐渐从门静脉周向中央静脉流动扩张最终占领整个肝实质区域。不过随后,其他研究人员使用转基因的方法标记Sox9,却完全观察不到这一现象<sup>[44]</sup>。腺病毒标记的肝实质细胞的实验同样没有发现除肝实质细胞以外的细胞来源<sup>[45]</sup>。更有趣的是,Wang等<sup>[46]</sup>发现,中央静脉周的肝实质细胞表达更高的Wnt,并以此为依据标记这些细胞进行谱系追踪,结果却发现这一层中央静脉外周细胞具有更强的增殖活性,并且这些细胞以与Furuyama等<sup>[43]</sup>发现的完全相反的方向进行扩张。不过这些Wnt高表达的细

胞并不能够被视为前体细胞或者说干细胞,因为干细胞的定义是能够自我更新并且能够分化成另一类细胞的细胞类型,而这些Wnt高表达的门静脉周细胞并不具备分化为胆管细胞的能力<sup>[12,46]</sup>。总之,人们依然普遍认为成熟肝实质细胞的分裂增殖是正常生理条件下肝脏细胞更新的主要来源。

关于再生过程中肝实质细胞的来源问题同样很有争议。再生过程中细胞可能的来源总体上有三种:其一,来自已经存在的成熟肝细胞的分裂增殖;其二,来自干细胞(stem cell)或者前体细胞(progenitor cell)的增殖和分化;其三,来自于其他细胞的转分化<sup>[47]</sup>。通常认为这三种可能性都存在,主要取决于损伤的方式和类型。其中急性的细胞损伤条件下,比如常用的2/3部分肝脏切除模型中,主要靠成熟的肝实质细胞的增大和分裂增殖填补缺失的肝实质细胞<sup>[48]</sup>;在温和的慢性损伤情况下,成熟的肝实质细胞大量死亡,具有高度增殖活性的门静脉周的肝实质细胞则大规模参与再生,不过这些细胞同样被认为是肝实质细胞的一个亚群<sup>[49]</sup>;而在严重的慢性损伤条件下,成熟肝实质细胞和门静脉周肝实质细胞都大量死亡并且肝实质细胞的增殖受到抑制,此时需要前体细胞,也被称为兼性干细胞的参与<sup>[11]</sup>;在特别严重的损伤情况下,胆管细胞的转分化也被认为是重要的肝实质细胞来源<sup>[50]</sup>。

不过这一看似系统的来源学说并未被普遍接受,挑战一直存在。Yanger等<sup>[51]</sup>发现,非典型胆管细胞(atypical ductal cells, ADCs)和胆管上皮细胞(biliary epithelial cells, BECs)——常被认为特定情况下扮演兼性干细胞角色的细胞类群,以及干细胞快速增殖的子代细胞(transit-amplifying cells, TA cells),都没有前体细胞活性,不论使用何种损伤方式都不能够发展为肝实质细胞。不过这也可能是Yanger等<sup>[51]</sup>使用的损伤严重程度不够所致。Alexander Raven等<sup>[50]</sup>在肝实质细胞敲除 $\beta$ 整合素( $\beta$ -integrin)的同时使用DDC进行损伤,发现胆管细胞能够转分化为肝实质细胞,成为这一条件下肝脏再生的细胞来源。其实,这种一个细胞类群集体受到严重损伤时另一类细胞通过转分化成为损伤细胞来源的情况在肝脏中并非独立,Schaub等<sup>[52]</sup>发现,肝脏能够在彻底破坏肝内胆管的情况下,通过肝实质细胞的转分化重新形成胆管系统。成体肝脏中是否真的存在能够在损伤条件下分化成肝实质细胞的干细胞依然存在争议。

考虑到不同亚类群肝实质细胞的增殖潜力不同,关于具体哪一亚类肝实质细胞更具增殖能力,意见也不一致。除了前文所述的Wnt富集表达的中央静脉外周肝实质细胞群<sup>[46]</sup>和门静脉周的肝实质细胞群<sup>[49]</sup>外,还有研究证明,区域性分布的高表达端粒酶的一类肝实质细胞在正常生理条件和再生过程中都更具有增殖活性<sup>[53]</sup>。

虽然研究人员对于肝脏再生过程中的细胞来源各执一词,但我们依然能从中看到肝脏利用各种资源进行自我修复的强大再生能力,这也使得肝脏再生成为人们研究机体再生过程最受欢迎的模型之一。

#### 4 斑马鱼的肝脏再生

斑马鱼因其繁殖能力强、后代数量多、易于养殖、胚胎半透明且具有在体外发育、与人类的基因相似度高等特点,近年来成为备受关注的脊椎动物模型。斑马鱼有着比哺乳动物更强的再生能力,使得斑马鱼成为再生研究的新宠。

针对斑马鱼成鱼肝脏稳态维持的肝细胞来源,通过Cre<sup>E<sup>RT</sup></sup>-LoxP技术使胚胎期肝细胞永久性表达EGFP荧光蛋白,并让其生长到1.5年,继而观察此时肝脏中EGFP表达分布情况,Gao等<sup>[54]</sup>惊奇地发现,所有肝脏细胞都表达EGFP,说明肝脏稳态维持过程中肝细胞来源于原有的肝细胞。

在再生方面,与大鼠和小鼠一样,斑马鱼也可以通过肝脏部分切除进行损伤并诱导肝脏再生修复。不过斑马鱼属硬骨鱼类,其肝脏形态与哺乳动物存在明显差异。成年斑马鱼有三个肝叶,分别是位于腹侧的腹侧叶,以及位于两侧的左右背侧叶。斑马鱼的部分肝脏切除手术通常采用腹侧叶整体切除的方式,达到切除约1/3肝脏的目的。研究表明,斑马鱼的肝脏在进行腹侧叶切除后7天左右完成再生<sup>[55-58]</sup>。利用这一模型,人们发现,斑马鱼再生过程与哺乳动物存在很高的保守性:Tan等<sup>[58]</sup>发现, $\beta$ -Catenin的缺失导致斑马鱼肝脏部分切除后再生过程中细胞增殖信号明显减少;Goessling等<sup>[56]</sup>研究指出,在Wnt的缺失突变体中,肝脏的肝细胞数量明显减少,而APC突变导致的Wnt上调则能显著增进肝切后肝脏的特化和再生;而Kan等<sup>[57]</sup>则通过研究发现,干扰Fgf的受体Fgfr、Bmp的受体Bmpr信号都会在斑马鱼中导致严重的再生障碍。除了证实哺乳动物的再生调控机制外,人们还通过研究斑马鱼肝切

后再生发现了其他调控再生的因子。例如, Dovey等<sup>[59]</sup>发现, *top2a*杂合体单倍剂量表达不足影响肝脏的再生; Zhu等<sup>[60]</sup>的研究表明, 核仁因子*def*杂合子单倍剂量表达不足在肝脏再生过程中会导致TGF- $\beta$ 依赖的伤疤形成; Goessling等<sup>[61]</sup>通过研究还发现, PGE2/Wnt的相互作用是肝脏再生的主要调控因子<sup>[61]</sup>。这些基于斑马鱼肝脏再生的研究进一步完善了肝脏再生模型。

另一种常用的斑马鱼肝脏损伤模型是NTR/Mtz系统。在该体系中, 通过组织特异性表达硝基还原酶(NTR), 将药物甲硝哒唑(Mtz)转化为具有细胞毒性的交联剂, 从而可以特异性地对特定细胞进行损伤<sup>[62]</sup>。有这一特异性损伤工具的加持, 研究人员得以对肝脏再生过程中前体细胞或干细胞的来源进行深入分析。Choi等<sup>[63]</sup>和He等<sup>[64]</sup>的研究都发现, 胆管上皮细胞能在肝细胞严重损伤后分化为肝母细胞样细胞(HB-LCs), 然后再分化为肝实质细胞; 随后Ko等<sup>[65]</sup>进一步研究表明, BET蛋白能够调控胆管依赖的肝脏再生过程——从去分化形成HB-LCs, 到HB-LCs增殖, 再到肝实质细胞的增殖和成熟; Choi等<sup>[66]</sup>还发现, Bmp信号通过*tbx2b*调控HB-LCs向肝实质细胞的分化; Russell等<sup>[67]</sup>研究人员的研究证实, 肝脏前体细胞向肝实质细胞的分化依赖于Notch-Sox9信号轴的抑制<sup>[67]</sup>。除此以外, STAT3、Hdac1和mTOR信号通路等都参与了肝脏前体细胞向肝实质细胞的分化过程<sup>[68-70]</sup>。这些基于斑马鱼肝脏再生模型的研究, 进一步充实了和拓展了哺乳动物肝脏再生的模型。尤其是关于前体细胞或干细胞以及胆管细胞转分化的探索, 为关于肝脏再生过程中前体细胞或干细胞的参与问题的争论提供了有力的证据和借鉴。

哺乳动物模型和斑马鱼模型的相互印证和充实, 为我们深入理解肝脏再生过程提供了更多的思考, 同时也为临床上对肝脏的治疗提供潜在的理论指导。

### 参考文献 (References)

- 1 Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006; 43(2): S45-53.
- 2 Milne LS. The histology of liver tissue regeneration. *J Pathol Bacteriol* 1909; 13: 127-60.
- 3 Liu MG, Chen P. Proliferation-inhibiting pathways in liver regeneration. *Mol Med Rep* 2017; 16(4): 23-35.
- 4 Mao SA, Glorioso JM, Nyberg SL. Liver regeneration. *Transl Res* 2014; 163(3): 352-62.
- 5 Abu Rmilah A, Zhou W, Nelson E, Lin L, Amiot B, Nyberg SL. Understanding the marvels behind liver regeneration. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2019; 8(2): e340.
- 6 Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol* 2007; 213(1): 286-300.
- 7 Michalopoulos GK. Principles of liver regeneration and growth homeostasis. *Compr Physiol* 2013; 3(1): 485-513.
- 8 Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol* 2010; 176(1): 2-13.
- 9 Taub R. Liver regeneration: From myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2004; 5(10): 836-47.
- 10 Michalopoulos GK. Hepatostat: liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatology* 2017; 65(4): 1384-92.
- 11 Miyajima A, Tanaka M, Itoh T. Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming. *Cell Stem Cell* 2014; 14(5): 561-74.
- 12 Stanger BZ. Probing hepatocyte heterogeneity. *Cell Res* 2015; 25(11): 1181-2.
- 13 Cox AG, Goessling W. The lure of zebrafish in liver research: regulation of hepatic growth in development and regeneration. *Curr Opin Genet Dev* 2015; 32(8): 153-61.
- 14 Michalopoulos GK. Advances in liver regeneration. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2014; 8(9): 897-907.
- 15 Palmes D, Spiegel HU. Animal models of liver regeneration. *Biomaterials* 2004; 25(9): 1601-11.
- 16 Rozga J, Jeppsson B, Bengmark S. Portal branch ligation in the rat—reevaluation of a model. *Am J Pathol* 1986; 125(2): 300-8.
- 17 Lee YW. Pulsed Doppler ultrasonographic evaluation of portal blood flow in dogs with experimental portal vein branch ligation. *J Vet Med Sci* 1999; 61(1): 59-61.
- 18 Murphy ST, Ellison GW, Long M, Van Gilder J. A comparison of the ameroid constrictor versus ligation in the surgical management of single extrahepatic portosystemic shunts. *J Am Anim Hosp Assoc* 2001; 37(4): 390-6.
- 19 Meyer HP, Rothuizen J, van Sluijs J, Voorhout G, van den Brom WE. Progressive remission of portosystemic shunting in 23 dogs after partial closure of congenital portosystemic shunts. *Vet Rec* 1999; 144(13): 333-7.
- 20 Azuma H, Paulk N, Ranade A, Dorrell C, Al-Dhalimy M, Ellis E, et al. Robust expansion of human hepatocytes in *Fah<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>/Il2rg<sup>-/-</sup>* mice. *Nat Biotechnol* 2007; 25(8): 903-10.
- 21 Hickey RD, Mao SA, Glorioso J, Lillegard JB, Fisher JE, Amiot B, et al. Fumarylacetoacetate hydrolase deficient pigs are a novel large animal model of metabolic liver disease. *Stem Cell Res* 2014; 13(1): 144-53.
- 22 Marubashi S, Sakon M, Nagano H, Miyamoto A, Dono K, Nakamori S, et al. Effect of portal hemodynamics on liver regeneration, studied in a novel portohepatic shunt rat model. *Hepatology* 2003; 38(4): 484a-a.
- 23 Sokabe T, Yamamoto K, Ohura N, Nakatsuka H, Qin K, Obi S, et al. Differential regulation of urokinase-type plasminogen activator expression by fluid shear stress in human coronary artery endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287(5): H2027-34.
- 24 Olsen PS, Poulsen SS, Kirkegaard P. Adrenergic effects on secretion of epidermal growth factor from Brunner's glands. *Gut*

- 1985; 26(9): 920-7.
- 25 Stolz DB, Mars WM, Petersen BE, Kim TH, Michalopoulos GK. Growth factor signal transduction immediately after two-thirds partial hepatectomy in the rat. *Cancer Res* 1999; 59(16): 3954-60.
- 26 Monga SP, Padiaditakis P, Mule K, Stolz DB, Michalopoulos GK. Changes in WNT/beta-catenin pathway during regulated growth in rat liver regeneration. *Hepatology* 2001; 33(5): 1098-109.
- 27 Nelsen CJ, Rickheim DG, Timchenko NA, Stanley MW, Albrecht JH. Transient expression of cyclin D1 is sufficient to promote hepatocyte replication and liver growth *in vivo*. *Cancer Res* 2001; 61(23): 8564-8.
- 28 Russell JO, Monga SP. Wnt/beta-Catenin signaling in liver development, homeostasis, and pathobiology. *Annu Rev Pathol* 2018; 13: 351-78.
- 29 Benhamouche S, Decaens T, Godard C, Chambrey R, Rickman DS, Moinard C, *et al.* Apc tumor suppressor gene is the “zonation-keeper” of mouse liver. *Dev Cell* 2006; 10(6): 759-70.
- 30 Kohler C, Bell AW, Bowen WC, Monga SP, Fleig W, Michalopoulos GK. Expression of Notch-1 and its ligand Jagged-1 in rat liver during liver regeneration. *Hepatology* 2004; 39(4): 1056-65.
- 31 Hofmann JJ, Zovein AC, Koh H, Radtke F, Weinmaster G, Iruela-Arispe ML. Jagged1 in the portal vein mesenchyme regulates intrahepatic bile duct development: insights into Alagille syndrome. *Development* 2010; 137(23): 4061-72.
- 32 Braun L, Mead JE, Panzica M, Mikumo R, Bell GI, Fausto N. Transforming growth factor beta mRNA increases during liver regeneration: a possible paracrine mechanism of growth regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85(5): 1539-43.
- 33 Dudas J, Kovalszky I, Gallai M, Nagy JO, Schaff Z, Knittel T, *et al.* Expression of decorin, transforming growth factor-beta 1, tissue inhibitor metalloproteinase 1 and 2, and type IV collagenases in chronic hepatitis. *Am J Clin Pathol* 2001; 115(5): 725-35.
- 34 Webb DJ, Roadcap DW, Dhakephalkar A, Gonias SL. A 16-amino acid peptide from human alpha2-macroglobulin binds transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor-BB. *Protein Sci* 2000; 9(10): 1986-92.
- 35 Hines IN, Kremer M, Isayama F, Perry AW, Milton RJ, Black AL, *et al.* Impaired liver regeneration and increased oval cell numbers following T cell-mediated hepatitis. *Hepatology* 2007; 46(1): 229-41.
- 36 Nishikawa Y, Wang M, Carr BI. Changes in TGF-beta receptors of rat hepatocytes during primary culture and liver regeneration: increased expression of TGF-beta receptors associated with increased sensitivity to TGF-beta-mediated growth inhibition. *J Cell Physiol* 1998; 176(3): 612-23.
- 37 Schwall RH, Robbins K, Jardieu P, Chang L, Lai C, Terrell TG. Activin induces cell-death in hepatocytes *in-vivo* and *in-vitro*. *Hepatology* 1993; 18(2): 347-56.
- 38 Kogure K, Zhang YQ, Kanzaki M, Omata W, Mine T, Kojima I. Intravenous administration of follistatin: Delivery to the liver and effect on liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology* 1996; 24(2): 361-6.
- 39 Xu CS, Yang YJ, Yang JY, Chen XG, Wang GP. Analysis of the role of the integrin signaling pathway in hepatocytes during rat liver regeneration. *Cell Mol Biol Lett* 2012; 17(2): 274-88.
- 40 Hong LX, Cai YB, Jiang MT, Zhou DW, Chen LF. The Hippo signaling pathway in liver regeneration and tumorigenesis. *Acta Bioch Bioph Sin* 2015; 47(1): 46-52.
- 41 Grijalva JL, Huizenga M, Mueller K, Rodriguez S, Brazzo J, Camargo F, *et al.* Dynamic alterations in Hippo signaling pathway and YAP activation during liver regeneration. *Am J Physiol-Gastr L* 2014; 307(2): G196-204.
- 42 Zajicek G, Oren R, Weinreb M, Jr. The streaming liver. *Liver* 1985; 5(6): 293-300.
- 43 Furuyama K, Kawaguchi Y, Akiyama H, Horiguchi M, Kodama S, Kuhara T, *et al.* Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat Genet* 2011; 43(1): 34-U52.
- 44 Carpentier R, Suner RE, van Hul N, Kopp JL, Beaudry JB, Cordi S, *et al.* Embryonic ductal plate cells give rise to cholangiocytes, periportal hepatocytes, and adult liver progenitor cells. *Gastroenterology* 2011; 141(4): 1432-U902.
- 45 Malato Y, Naqvi S, Schurmann N, Ng R, Wang B, Zape J, *et al.* Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration. *J Clin Invest* 2011; 121(12): 4850-60.
- 46 Wang B, Zhao LD, Fish M, Logan CY, Nusse R. Self-renewing diploid Axin2<sup>+</sup> cells fuel homeostatic renewal of the liver. *Nature* 2015; 524(7564): 180.
- 47 Stanger BZ. Cellular homeostasis and repair in the mammalian liver. *Annu Rev Physiol* 2015; 77: 179-200.
- 48 Miyaoka Y, Ebato K, Kato H, Arakawa S, Shimizu S, Miyajima A. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Curr Biol* 2012; 22(13): 1166-75.
- 49 Font-Burgada J, Shalapour S, Ramaswamy S, Hsueh B, Rossell D, Umemura A, *et al.* Hybrid periportal hepatocytes regenerate the injured liver without giving rise to cancer. *Cell* 2015; 162(4): 766-79.
- 50 Raven A, Lu WY, Man TY, Ferreira-Gonzalez S, O'Duibhir E, Dwyer BJ, *et al.* Cholangiocytes act as facultative liver stem cells during impaired hepatocyte regeneration. *Nature* 2017; 547(7663): 350-4.
- 51 Yanger K, Knigin D, Zong Y, Maggs L, Gu G, Akiyama H, *et al.* Adult hepatocytes are generated by self-duplication rather than stem cell differentiation. *Cell Stem Cell* 2014; 15(3): 340-9.
- 52 Schaub JR, Huppert KA, Kurial SNT, Hsu BY, Cast AE, Donnelly B, *et al.* De novo formation of the biliary system by TGF-beta-mediated hepatocyte transdifferentiation. *Nature* 2018; 557(7704): 247-51.
- 53 Lin SD, Nascimento EM, Gajera CR, Chen L, Neuhofer P, Garbuzov A, *et al.* Distributed hepatocytes expressing telomerase repopulate the liver in homeostasis and injury. *Nature* 2018; 556(7700): 244.
- 54 Gao C, Zhu ZH, Gao YQ, Lo LJ, Chen J, Luo LF, *et al.* Hepatocytes in a normal adult liver are derived solely from the embryonic hepatocytes. *Journal of Genetics and Genomics* 2018; 45(3): 173-5.
- 55 Sadler K, Krahn KN, Gaur N, Ukomadu C. Liver growth in the embryo and during liver regeneration in zebrafish requires the cell cycle regulator, UHRF1. *Hepatology* 2006; 44(4): 258a.
- 56 Goessling W, North TE, Lord AM, Ceol C, Lee S, Weidinger G, *et al.* APC mutant zebrafish uncover a changing temporal requirement for wnt signaling in liver development. *Dev Biol*



- 2008; 320(1): 161-74.
- 57 Kan NG, Junghans D, Belmonte JCI. Compensatory growth mechanisms regulated by BMP and FGF signaling mediate liver regeneration in zebrafish after partial hepatectomy. *Faseb J* 2009; 23(10): 3516-25.
- 58 Tan XP, Behari J, Cieply B, Michalopoulos GK, Monga SPS. Conditional deletion of beta-catenin reveals its role in liver growth and regeneration. *Gastroenterology* 2006; 131(5): 1561-72.
- 59 Dovey M, Patton EE, Bowman T, North T, Goessling W, Zhou Y, *et al.* Topoisomerase II alpha is required for embryonic development and liver regeneration in zebrafish. *Mol Cell Biol* 2009; 29(13): 3746-53.
- 60 Zhu Z, Chen J, Xiong JW, Peng J. Haploinsufficiency of Def activates p53-dependent TGFbeta signalling and causes scar formation after partial hepatectomy. *PLoS One* 2014; 9(5): e96576.
- 61 Goessling W, North TE, Loewer S, Lord AM, Lee S, Stoick-Cooper CL, *et al.* Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration. *Cell* 2009; 136(6): 1136-47.
- 62 Curado S, Anderson RM, Jungblut B, Mumm J, Schroeter E, Stainier DYR. Conditional targeted cell ablation in zebrafish: A new tool for regeneration studies. *Dev Dynam* 2007; 236(4): 1025-35.
- 63 Choi TY, Ninov N, Stainier DY, Shin D. Extensive conversion of hepatic biliary epithelial cells to hepatocytes after near total loss of hepatocytes in zebrafish. *Gastroenterology* 2014; 146(3): 776-88.
- 64 He JB, Lu HQ, Zou QL, Luo LF. Regeneration of liver after extreme hepatocyte loss occurs mainly via biliary transdifferentiation in zebrafish. *Gastroenterology* 2014; 146(3): 789.
- 65 Ko S, Choi TY, Russell JO, So J, Monga SPS, Shin D. Bromodomain and extraterminal (BET) proteins regulate biliary-driven liver regeneration. *J Hepatol* 2016; 64(2): 316-25.
- 66 Choi TY, Khaliq M, Tsurusaki S, Ninov N, Stainier DYR, Tanaka M, *et al.* Bone morphogenetic protein signaling governs biliary-driven liver regeneration in zebrafish through *tbx2b* and *id2a*. *Hepatology* 2017; 66(5): 1616-30.
- 67 Russell JO, Ko S, Monga SP, Shin D. Notch inhibition promotes differentiation of liver progenitor cells into hepatocytes via *sox9b* repression in zebrafish. *Stem Cells Int* 2019; 2019: 8451282.
- 68 Khaliq M, Ko S, Liu Y, Wang H, Sun Y, Solnica-Krezel L, *et al.* Stat3 regulates liver progenitor cell-driven liver regeneration in zebrafish. *Gene Expr* 2018; 18(3): 157-70.
- 69 Ko S, Russell JO, Tian J, Gao C, Kobayashi M, Feng R, *et al.* Hdac1 Regulates differentiation of bipotent liver progenitor cells during regeneration via *Sox9b* and *Cdk8*. *Gastroenterology* 2019; 156(1): 187-202.e14.
- 70 He J, Chen J, Wei X, Leng H, Mu H, Cai P, *et al.* mTORC1 Signaling is Required for the Dedifferentiation from Biliary Cell to Bi-potential Progenitor Cell in Zebrafish Liver Regeneration. *Hepatology* 2019; doi:10.1002/hep.30790.