



徐成冉, 北京大学生命科学学院研究员。1999年获得复旦大学遗传学学士学位, 2005年获得北京大学植物学专业理学博士学位。2005–2013年分别于美国Scripps研究所、Fox Chase癌症中心和宾夕法尼亚大学进行博士后研究。2013年起成为北京大学生命科学学院研究员和清华大学-北京大学生命科学联合中心研究员。目前的主要研究方向和兴趣包括哺乳动物肝脏和胰腺的发育路径及调控机制、干细胞向肝脏和胰岛内分泌细胞的定向分化的调控等。

[http://www.bio.pku.edu.cn/homes/Index/news\\_cont\\_jl/16/84.html](http://www.bio.pku.edu.cn/homes/Index/news_cont_jl/16/84.html)

## 肝脏细胞分化和成熟的分子调控机制

杨李<sup>1,2</sup> 拉毛切忠<sup>1,2</sup> 徐成冉<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>北京大学生命科学学院, 细胞增殖与分化教育部重点实验室, 北京 100871;

<sup>2</sup>北京大学前沿交叉学科研究院, 北京 100871)

**摘要** 肝脏是重要的代谢调控和药物解毒器官, 执行体内多种生理功能。肝脏疾病已经越来越严重地影响着人体健康和生存质量。考虑到临床研究和转化医学的迫切需求, 人们必须深入研究肝脏内各种细胞特别是肝实质细胞和胆管细胞的分化成熟过程及分子调控机制。该文概述了肝脏内起源于内胚层的肝实质细胞和胆管分化成熟的发育过程, 总结了调控此过程的信号通路和转录因子, 并简要介绍了最新技术对于肝脏发育研究的推动作用。这些结果对于人们在体外高效地诱导得到或建立更成熟、结构功能更完善的肝脏样细胞或肝脏类器官以及肝脏疾病的研究与治疗有重要意义。

**关键词** 肝脏; 细胞分化; 肝母细胞; 肝实质细胞; 胆管细胞; 单细胞分析

## Molecular Regulation Mechanism of Hepatic Lineage Differentiation and Maturation

YANG Li<sup>1,2</sup>, Lamaoqiezhong<sup>1,2</sup>, XU Cheng-Ran<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Cell Proliferation and Differentiation of the Ministry of Education, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China; <sup>2</sup>Academy for Advanced Interdisciplinary Studies, Peking University, Beijing 100871, China)

**Abstract** The liver is an important organ for metabolic regulation and drug detoxification that performs a variety of physiological functions in the body. Liver diseases have increasingly affected human health and quality of life. Considering urgent needs for clinical research and translational medicine, we must thoroughly define the differentiation and maturation processes and molecular regulatory mechanisms of liver cells, especially hepatocytes and cholangiocytes. This article outlines the differentiation and maturation processes of endoderm derived hepatic lineages, summarizes the signaling pathways and transcription factors involved in these developmental processes,

科技部国家重点基础研究计划(批准号: 2015CB942800)和国家自然科学基金(批准号: 31521004、31471358、31522036)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 010-62755513, E-mail: cxu@pku.edu.cn

This work was supported by the National Basic Research Program of China (Grant No.2015CB942800) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31521004, 31471358, 31522036)

\*Corresponding author. Tel: +86-10-62755513, E-mail: cxu@pku.edu.cn

网络出版时间: 2019-11-12 12:27:24

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20191112.1107.026.html>

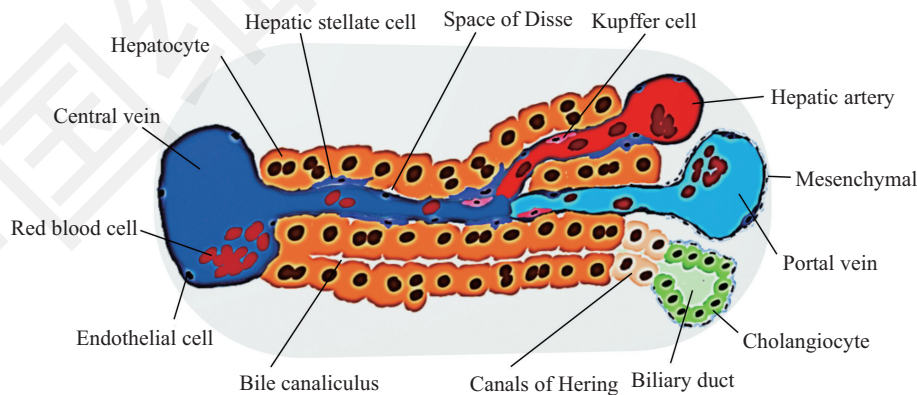
and briefly introduces the promotion of advanced technologies for liver development research. These achievements guide us to efficiently induce or establish more mature liver-like cells or organoids *in vitro* for liver disease-related research and treatment.

**Keywords** liver; cell differentiation; hepatoblast; hepatocyte; cholangiocyte; single-cell analysis

肝脏是哺乳动物体内最大的腺体, 执行多种重要的生理功能, 对于维持体内生理稳态的作用不可替代。肝脏作为代谢调控中心, 参与碳水化合物、脂肪及氨基酸的合成与分解, 存储多种维生素和矿物质、调控尿素代谢、促进白蛋白和载脂蛋白等血浆蛋白的合成与分泌; 作为解毒中心, 能够有效降解各种药物分子及乙醇等。肝脏也能够通过合成并分泌胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor)、血管紧张素原(angiotensinogen)和促血小板生成素(thrombopoietin)等执行内分泌功能, 并通过合成并分泌胆酸(bile acid)和胆盐(bile salt)等物质实现外分泌功能。此外, 肝脏还参与免疫调节, 促进免疫球蛋白、补体及凝血因子的产生<sup>[1]</sup>。

肝脏的功能与结构紧密相关。人的肝脏是由约500 000个亚结构——肝小叶(lobule)规则排列组成的<sup>[2-3]</sup>。肝小叶的横切面呈六边形, 在其六个角上各有一组由肝动脉(hepatic artery)、门静脉(portal vein)和肝内胆管(intrahepatic biliary duct)构成的“门三联管”(portal triad)结构, 而中央分布有中央静脉(central vein)(图1)。“门三联管”与中央静脉之间充满了形态

均一旦呈索状规律排列的肝实质细胞(hepatocyte)。肝实质细胞占肝脏细胞总数的60%、体积的80%以上, 是肝脏结构和功能的主体<sup>[4]</sup>。来自于肺的动脉血和来自于小肠等营养代谢器官的静脉血分别通过肝动脉和门静脉进入肝小叶, 流经肝毛细血管后, 两种血液汇入中央静脉流出肝小叶。肝实质细胞与毛细血管内皮细胞(sinusoidal endothelial cell)之间紧密相互作用, 内皮细胞上形成孔状结构与肝实质细胞直接相通, 保证了肝实质细胞与血液循环系统之间高效的物质交换。肝内胆管由胆管细胞(cholangiocyte)构成, 其通过赫氏小管(canals of Hering)与由双极性肝实质细胞形成的胆小管(bile canaliculus)结构直接相连, 是肝实质细胞合成并分泌的胆酸、胆盐及药物代谢废物运出肝脏的唯一途径。除了肝实质细胞、胆管细胞和内皮细胞, 肝脏还包括包被肝脏的间皮细胞(mesothelial cell)、肝脏毛细血管附近存储维生素A并能够调节血流的肝星状细胞(hepatic stellate cell)、肝脏内特化的巨噬细胞库普弗细胞(Kupffer cell)、门静脉附近的间充质细胞(mesenchymal cell)以及大量的血细胞(图1)。肝脏功能的正常执行需要



局部肝小叶结构及肝脏内细胞组成分布示意图。左侧为中央静脉区域, 右侧为“门三联管”区域。其中血流方向为从右向左, 即从肝动脉和门静脉流向中央静脉; 胆酸、胆盐及药物代谢废物运输方向为从左向右, 即从胆小管流经赫氏小管汇入肝内胆管。

Schematic diagram of local liver lobule structure and distribution of cell components in the liver. The left side is the central vein area, and the right side is the “portal triad” area. The blood flow direction is from right to left, that is, from the hepatic artery and the portal vein to the central vein; the bile acids, bile salts and drug metabolism wastes are transported from left to right, that is, from the bile canaliculus through the canals of Hering into the intrahepatic biliary ducts.

图1 肝小叶结构示意图

Fig.1 Liver lobule structure

各类细胞形成特定结构并通过不同类型细胞或结构之间高度相互作用而协同实现。

肝脏内任何细胞的病变都会导致肝脏疾病的发生,特别是肝实质细胞和胆管细胞。肝脏疾病已经越来越严重地影响人类身体健康。对于肝脏病变,迄今没有药物能够有效治愈,一种有前景的方式是通过调控肝脏本身的再生而促进肝脏损伤修复或疾病治疗,但由于病理条件的高度复杂性,我们对再生的过程和调控机制知之甚少。对于恶性肝脏疾病,肝脏移植是唯一的治疗方法。考虑到肝源短缺且免疫排斥性强,多能性干细胞或其他类型细胞分化或转分化形成肝实质样细胞及胆管样细胞并进一步构建肝脏类器官(organoid)是比较可行的替代方法,但目前的细胞诱导或类器官构建方案并不成熟完善。有研究表明,器官组织再生的过程和调控机制与正常发育高度相似,并且体外细胞诱导和类器官构建是完全以发育知识为基础的<sup>[5-6]</sup>,因此,肝脏发育研究对于肝脏疾病的治疗具有重要的意义。

## 1 肝脏发育和调控

肝脏起源于内胚层,在经历了肝脏前体细胞特化形成及双潜能肝母细胞分化形成肝实质细胞和胆管细胞后,进一步发育成熟。已有研究发现了多种信号通路和转录因子阶段特异性调控肝脏发育(图2)。

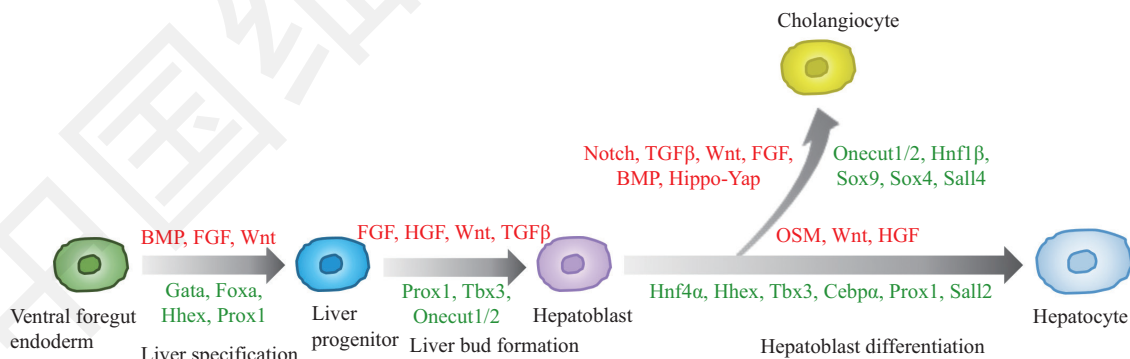
### 1.1 肝脏特化

在小鼠胚胎发育(embryonic day, E) 8.5天左右,

腹侧前肠内胚层(ventral foregut endoderm)中线上出现共表达Sox17、Hhex和Gata的细胞区域<sup>[7]</sup>,其中有些细胞逐渐表达肝脏前体细胞(liver progenitor)标志基因Alb,形成中间肝脏前体细胞。同时,腹侧前肠内胚层两侧的特定区域也出现表达Alb的细胞,形成两侧肝脏前体细胞。此后,两侧肝脏前体细胞向中间迁移并与中间肝脏前体细胞共同形成肝脏前体细胞群<sup>[8]</sup>。

来源于中胚层的细胞组织与将要特化形成肝脏前体细胞的内胚层细胞高度相互作用,调控肝脏特化。横膈膜间充质细胞(septum transversum mesenchyme)和侧向中胚层细胞(lateral mesoderm cell)产生BMP信号分子BMP2/4,能够通过Smad1/5/8-Smad4级联促进肝脏前体细胞特化形成<sup>[9]</sup>。心脏中胚层细胞产生FGF信号分子FGF8/10,通过FGF受体和下游MAPK-ERK通路促进表达FGFR1/4的腹侧前肠内胚层细胞特化为肝脏前体细胞<sup>[10-11]</sup>。在小鼠中,腹侧中胚层细胞产生Wnt信号分子,但经典Wnt信号通路不参与肝脏特化,而非经典Wnt信号通路抑制肝脏特化<sup>[12]</sup>。在非洲爪蟾和斑马鱼中,中胚层细胞产生的Wnt信号通过β-catenin通路促进肝胰前体细胞选择肝脏命运<sup>[13-14]</sup>。

这些信号通路能够通过调控下游转录因子发挥作用,特别是Gata和Foxa家族的“先锋因子”(pioneer factor)。例如,BMP下游Smad1/5/8-Smad4级联的激活能够促进Gata4表达<sup>[9,14]</sup>。在将要特化形成肝脏前



腹侧前肠内胚层特化为肝脏前体细胞;肝脏前体细胞通过增殖、迁移形成由双潜能肝母细胞组成的肝芽;肝母细胞分化形成肝实质细胞和胆管细胞,这些细胞会进一步发育成熟。肝脏发育受到多种信号通路和转录因子的调控。图中红色标记为调控肝脏发育的重要信号通路,绿色为关键转录因子。

The ventral foregut endoderm is specialized into liver progenitor cells; liver progenitor cells develop into bi-potential hepatoblasts which form the liver bud through cellular proliferation and migration. The hepatoblasts differentiate into hepatocytes and biliary cells (cholangiocytes), which are further mature. Liver development is regulated by varieties of signaling pathways and transcription factors. In the figure, the important signaling pathways regulating liver development are labeled in red, and the key transcription factors in green.

图2 肝脏发育及调控示意图

Fig.2 Liver development and regulation



体细胞的内胚层细胞中, 肝脏特异基因调控区域的染色质一般处于结构固缩状态, 常规的转录因子很难结合上去并发挥作用。但“先锋因子”由于结构类似于连接组蛋白(linker histone), 能够先于其他转录因子结合在这种结构区域, 例如*Alb*的转录管理元件(增强子)上<sup>[15]</sup>。这种结合能够重塑染色质结构, 暴露其他调控肝脏特化转录因子的结合结构域。此外, BMP信号能够通过抑制胰腺发育重要调控因子*Pdx1*的表达促进肝胰前体细胞选择肝脏命运<sup>[14]</sup>。而BMP和FGF信号也能够上调促进肝脏特化转录因子*Hhex*和*Prox1*的表达<sup>[11]</sup>。

## 1.2 肝芽形成

在小鼠E9.0左右, 特化的肝脏前体细胞从前肠上突出, 形成由一层立方体状细胞组成的肝盲囊(liver diverticulum)结构。这层细胞不断发育、增殖和迁移, 进一步形成由肝母细胞(hepatoblast)组成的假复层状肝芽(liver bud)结构<sup>[16]</sup>。

构成肝盲囊的肝脏前体细胞是典型的上皮细胞。在肝芽形成过程中, 肝脏前体细胞需要脱离其所处的肝盲囊细胞层而侵入附近的间充质细胞群中, 这个过程需要解除上皮细胞与附近细胞或胞外基质(extracellular matrix)之间的相互作用并促进其增殖和迁移<sup>[17]</sup>。肝芽形成过程受到一系列转录因子的调控。*Prox1*能够通过降低肝脏前体细胞中细胞连接相关蛋白E-cadherin的表达并促进降解胞外基质的基质金属蛋白酶的产生而调控细胞迁移<sup>[18]</sup>。*Prox1*敲除的小鼠能够形成肝盲囊结构, 但肝脏前体细胞不能迁移进入间充质细胞群中形成肝芽。在小鼠中同时敲除*Onecut1*和*Onecut2*会产生与*Prox1*敲除相同的表型, 但*Prox1*的表达没有变化<sup>[19]</sup>。因此, *Onecut1*和*Onecut2*可能在*Prox1*下游发挥作用。而敲除*Tbx3*的小鼠不仅表型与*Prox1*敲除的相同, 其肝脏前体细胞中*Prox1*的表达量也发生了变化, 表明*Tbx3*可能是*Prox1*的上游调控因子。此外, 除了肝脏前体细胞, 其附近的间充质细胞也能够合成并分泌基质金属蛋白酶MMP2并促进层黏连蛋白(laminin)和胶原(collagen)降解<sup>[20]</sup>。肝芽附近的内皮细胞也能够产生包括neurturin在内的一系列因子而促进肝脏前体细胞的迁移, 然而机制有待进一步研究<sup>[21]</sup>。

FGF、HGF和Wnt等信号调控肝芽中肝母细胞的增殖和迁移<sup>[22-31]</sup>。这些信号高度相互作用, 并主要通过 $\beta$ -catenin通路实现调控功能。在肝母细胞

中,  $\beta$ -catenin的表达在E10.0至E12.0达到峰值<sup>[32]</sup>。活化的 $\beta$ -catenin进入细胞核, 直接调控其下游基因的表达, 包括细胞增殖相关因子*Cyclin D*等<sup>[33]</sup>。此外, TGF $\beta$ 信号通过下游Smad2/3-Smad4和 $\beta$ 1-integrin通路调控肝芽形成<sup>[27]</sup>。此外, 间皮细胞产生的形态发生素多效生长因子(pleiotrophin)和肝素结合细胞因子(midkine)也能够促进肝母细胞增殖<sup>[34]</sup>。

## 1.3 肝母细胞分化

随着肝芽的发育, 在小鼠E11.5左右, 肝芽逐渐形成肝脏形态, 肝母细胞开始分化。肝脏内细胞种类很多, 但现有研究认为, 只有肝实质细胞和胆管细胞起源于内胚层并由双潜能的肝母细胞分化形成。其他类型的肝脏细胞主要通过迁入肝脏内的前体细胞逐步发育形成或在其他组织器官内形成后迁入肝脏。

1.3.1 肝母细胞分化形成肝实质细胞 大部分肝母细胞分化形成肝实质细胞, 伴随着细胞增殖降低、大小增加、极性形成以及胆小管结构建立<sup>[35-37]</sup>等现象。在这个过程中, 肝脏内其他类型细胞也在急剧发育, 包括造血细胞增殖和分化、毛细血管形成和延伸、肝星状细胞迁移和定位以及间皮细胞特化和成熟等。这些细胞与发育的肝母细胞及肝实质细胞高度相互作用, 并且能够产生多种细胞因子、信号分子及胞外基质。因此, 肝实质细胞的分化发育必然受到这些细胞的调控。例如, 造血细胞合成并分泌的细胞因子OSM能够促进肝母细胞分化形成肝实质细胞; 信号分子Wnt和HGF也能够调控肝实质细胞的分化发育<sup>[38-39]</sup>。除此之外, 我们对调控肝实质细胞分化发育的信号通路知之甚少, 且对于其分子机制并不清楚。

转录因子可能在肝实质细胞分化发育过程中发挥重要的调控作用。*Hnf4 $\alpha$* 从肝脏特化时就开始在肝脏前体细胞中表达, 在随后的发育过程中其表达量不断增加。*Hnf4 $\alpha$* 的敲除会导致小鼠肝实质细胞结构和功能分化异常。*Hhex*不仅在内胚层细胞命运选择过程中促进肝脏特化, 也能够通过上调*Hnf4 $\alpha$* 的表达促进肝实质细胞分化发育。*Tbx3*是肝母细胞分化发育的重要调控因子, 其不仅能够通过上调*Hnf4 $\alpha$* 的表达, 也能够通过调控*Onecut1*和*Hnf1 $\beta$* 等命运决定因子而影响肝母细胞的分化发育<sup>[40]</sup>。在小鼠中敲除*Tbx3*会导致肝母细胞向肝实质细胞分化受阻而促进胆管细胞分化形成。*Cebp $\alpha$* 和*Prox1*在肝母

细胞和肝实质细胞中表达,而在胆管细胞中并不表达。这两个因子能够促进肝母细胞向肝实质细胞的命运选择<sup>[41-42]</sup>。此外,体外小鼠肝母细胞培养诱导实验表明,转录因子Sall2也能够促进肝实质细胞的分化发育。进一步,有研究通过对12个调控肝实质细胞分化发育的转录因子进行一系列染色质免疫共沉淀实验发现,这些转录因子之间相互调控,形成作用网络<sup>[43]</sup>。这其中Foxa2、Hnf1 $\alpha$ 、Hnf1 $\beta$ 、Hnf4 $\alpha$ 、Onecut1和Nr5a2等6个转录因子组成核心调控网络,促进肝实质细胞的分化成熟。随着肝实质细胞分化发育的进行,这些因子之间的相互作用不断加强,作用网络的稳定性逐渐增加;并且,其他调控肝实质细胞分化发育的转录因子也能够通过与这些因子相互作用加入网络,共同促进肝实质细胞的分化成熟。

**1.3.2 肝母细胞分化形成胆管细胞** 只有少部分肝母细胞分化形成胆管细胞,这个过程与胆管形态建成高度相关。有研究通过对胆管细胞标志分子染色和成像,描绘了其分化发育过程<sup>[44-45]</sup>。相较于成熟胆管细胞标志分子Ck19, Sox9被认为能够标记早期发育胆管细胞。在小鼠E11.5左右,一些分布在门静脉附近的肝母细胞开始表达Sox9,而Hnf4 $\alpha$ 的表达降低。随着发育的进行,更多的Sox9<sup>+</sup>/Hnf4 $\alpha$ <sup>-</sup>细胞产生,并逐渐围绕门静脉形成单细胞层,被称为“胆管板”(ductal plate)。Sox9<sup>+</sup>/Hnf4 $\alpha$ <sup>-</sup>细胞的特化和“胆管板”结构的形成与门静脉附近的间充质细胞密切相关。“胆管板”及胆管结构发育异常通常与门静脉及其附近的间充质细胞的不正常发育有关,而只有间充质细胞附近的肝母细胞才有可能分化为胆管细胞。从E15.0左右开始,“胆管板”的部分区域开始出现第二层细胞。这些细胞虽然是Sox9<sup>-</sup>/Hnf4 $\alpha$ <sup>+</sup>,但两层细胞之间出现腔孔,形成管状结构,被称为不对称初级胆管结构。而对于这第二层细胞的来源并没有定论。有研究认为,这些Sox9<sup>-</sup>/Hnf4 $\alpha$ <sup>+</sup>细胞来源于“胆管板”附近的肝母细胞,另有研究认为,这些细胞是“胆管板”细胞通过去分化迁移出来的。这需要进一步通过细胞谱系追踪确认并证明。随着发育的进行,不对称初级胆管结构中Sox9<sup>-</sup>/Hnf4 $\alpha$ <sup>+</sup>细胞转变为Sox9<sup>+</sup>/Hnf4 $\alpha$ <sup>-</sup>,形成对称初级胆管结构。对称初级胆管结构进一步发育成熟,典型的极性特征建立,细胞连接及胞外基质正确定位,完善的管状结构形成,且间充质细胞紧密环绕<sup>[46]</sup>。由于只有部分“胆管板”细胞参与胆管形成,未参与的将逐渐退化而减少。成

体小鼠中,门静脉附近主要存在成熟的胆管。不过,调控“胆管板”细胞是否参与胆管形成的机制并不清楚。此外,通过肝脏连续切片发现,肝脏中不同区域胆管细胞分化形成和胆管形态建成是不同步的,肝脏中心位置(与肝外胆管相连)最先发生,朝向肝脏外周逐渐发育滞后<sup>[45]</sup>。最终,胆管沿着中心-外周轴形成层级排列的网络化树状结构。

对于胆管细胞分化形成机制的研究比较深入,已经发现多种信号通路和转录因子调控肝母细胞分化形成胆管细胞。

Notch信号促进胆管细胞分化形成和胆管形态建成<sup>[47-49]</sup>。Notch信号分子JAG1或其受体NOTCH2的突变会引发Alagille综合征,导致胆管缺失<sup>[47-49]</sup>。Jag1分布在细胞膜表面,因此其发挥作用需要表达Jag1的细胞与表达对应受体的靶细胞直接相互作用。门静脉附近的间充质细胞表达Jag1,能够与正在特化的胆管细胞表面受体Notch2结合而促进胆管细胞分化形成。“胆管板”结构形成后,参与胆管形成的细胞开始表达Jag1,而其附近Sox9<sup>-</sup>/Hnf4 $\alpha$ <sup>+</sup>细胞表达Notch2,两者的相互作用促进了不对称初级胆管结构的形成及向对称初级胆管结构的转变<sup>[49-50]</sup>。因此,诱导性的Notch信号沿胆管半径方向分布,对于胆管细胞分化形成和胆管形态建成有重要的意义。胆管细胞分化发育过程中发挥作用的Notch信号受体是Notch2而不是Notch1。激活的Notch2主要通过下游介导蛋白Rbpj和转录调控因子Hes1发挥作用<sup>[51]</sup>。另有研究表明,Sox9也是Notch2下游的调控因子<sup>[45,49-50]</sup>。在体外培养的小鼠肝母细胞中激活Notch信号通路能够促进其选择胆管细胞命运<sup>[52]</sup>。而小鼠中Jag1的错义突变会抑制胆管发育<sup>[53]</sup>。但肝脏特异性敲除Notch2或Hes1对胆管细胞分化形成没有影响,只是导致胆管形态建成缺陷,这可能的原因是Notch信号通路的功能冗余性或相关基因敲除时间滞后<sup>[54-55]</sup>。

门静脉附近的间充质细胞也表达TGF $\beta$ 信号分子TGF $\beta$ 2/3,这些可扩散信号沿着门静脉至中央静脉方向形成逐渐降低的信号梯度<sup>[45,56]</sup>。TGF $\beta$ 信号分子与正在特化的胆管细胞表面相关受体TGF $\beta$ r2相互作用,促进胆管细胞分化形成。这种作用是瞬时的,分化的胆管细胞不再表达TGF $\beta$ r2。在不对称初级胆管结构形成时,远离门静脉的Sox9<sup>-</sup>/Hnf4 $\alpha$ <sup>+</sup>细胞开始表达TGF $\beta$ r2,接受TGF $\beta$ 信号而进一步分化。



当其分化为Sox9<sup>+</sup>/Hnf4 $\alpha$ -细胞后, TGF $\beta$ 2的表达量降低。细胞中TGF $\beta$ 2的表达受到转录因子Onecut1和Onecut2的调控。TGF $\beta$ 信号通过激活Smad2/3-Smad4通路促进胆管细胞分化形成<sup>[27,45,56]</sup>, 也能够通过调控Jag1-Notch2信号通路发挥作用, 表明调控胆管细胞分化发育的信号通路之间高度相互作用<sup>[57]</sup>。在体外小鼠肝母细胞培养体系中加入TGF $\beta$ 1/2/3足以促进其选择胆管细胞命运。在体内通过TGF $\beta$ 抗体阻断TGF $\beta$ 信号通路会抑制胆管细胞分化形成。而在肝母细胞中维持TGF $\beta$ 2的表达会导致胆管发育滞后。

Wnt信号影响胆管细胞分化发育。用Wnt3a处理小鼠胚胎肝脏外植体能够促进胆管细胞的产生, 而非经典Wnt信号Wnt5a的处理抑制胆管细胞的分化形成<sup>[58-59]</sup>。有趣的是, 不同研究组在小鼠体内敲除 $\beta$ -catenin, 发现其对胆管细胞分化发育的影响不同<sup>[33,60]</sup>。此外, 我们并不清楚体内影响胆管细胞分化发育的Wnt信号的种类和来源, 其分子机制也有待进一步研究。

FGF和BMP在肝脏发育的不同阶段都发挥重要的调控作用。正在特化的鸡胆管细胞中表达FGF信号受体FGFR1/2, 用bFGF和FGF7处理鸡胚胎肝脏外植体能够促进胆管细胞的产生并增加胆管细胞标志基因的表达<sup>[61]</sup>。但体内FGF信号的种类和来源并不清楚。门静脉附近的间充质细胞表达BMP信号分子BMP4, 其能够通过Smad1/5/8-Smad4通路促进胆管细胞分化形成。BMP信号也能够与FGF信号协同调控这个过程<sup>[62]</sup>。但有研究通过体外培养和诱导实验发现, BMP4和Wnt5a协同抑制胆管细胞的分化发育, 这需要进一步分析确认<sup>[63]</sup>。

Hippo-Yap通路参与调控胆管细胞分化发育。肝脏中特异性敲除Hippo相关激酶Lats1/2导致Yap/Taz激活, 促进胆管细胞分化形成。Hippo-Yap通路主要通过调控TGF $\beta$ 和Notch信号发挥作用<sup>[64-65]</sup>。但我们对Hippo-Yap的上游信号并不清楚。

正在特化或分化的胆管细胞与周围环境密切相互作用, 胞外基质等也影响胆管细胞的分化发育。间充质细胞表达I型胶原(type I collagen)和纤维连接蛋白(fibronectin)。在鸡肝芽体外培养体系中加入这两种胞外基质组分能够促进肝母细胞分化形成胆管细胞<sup>[66]</sup>。体外小鼠肝母细胞培养实验表明, I型胶原在小鼠胆管细胞分化发育过程中也发挥促进作用<sup>[67]</sup>。间充

质细胞也合成并分泌表皮形态发生素(epimorphin), 其能够通过RhoA/Rock通路调控胆管细胞的分化发育<sup>[68]</sup>。此外, 分化的胆管细胞表达多种层黏连蛋白受体, 包括Integrins  $\alpha$ 6 $\beta$ 1、 $\alpha$ 2 $\beta$ 1、 $\alpha$ 3 $\beta$ 1和 $\alpha$ 6 $\beta$ 4等, 肝脏中广泛表达的层黏连蛋白能够通过这些受体促进胆管细胞分化形成及胆管形态建成<sup>[69]</sup>。

Onecut1和Onecut2是最早发现的在胆管细胞分化发育中发挥重要调控作用的转录因子<sup>[70-71]</sup>。Onecut1的缺失引起胆管发育缺陷。敲除Onecut1的小鼠胎肝中大量形成胆管细胞, 并出现提前成熟现象, 肝实质细胞区域会产生由这种细胞形成的索状纤维化结构, 且门静脉附近会出现大量胆管样囊状结构。Onecut1和Onecut2的双敲除破坏了肝母细胞的正常分化发育, 导致肝实质细胞区域出现大量共表达肝实质细胞和胆管细胞标志基因的兼性细胞。Hnf1 $\beta$ 是Onecut1下游的转录调控因子, 在胆管细胞中表达较高。Hnf1 $\beta$ 敲除的小鼠胎肝中“胆管板”发育异常, 出生后缺乏胆管结构。Hnf1 $\beta$ 也受到肝实质细胞分化发育促进因子Cebpa的调控, 肝脏中Cebpa的缺失会增加Hnf1 $\beta$ 的表达。

Sox9不仅是早期发育胆管细胞的标志分子, 而且能够促进胆管细胞分化形成及胆管形态建成。Sox9能够抑制Cebpa的表达<sup>[45]</sup>。遗传学实验表明, 在小鼠E18.5时, 即使胆管细胞已经分化形成, Sox9的敲除也会导致细胞中Cebpa的持续表达。进一步研究发现, Sox4作为Sox家族的另一个成员, 与Sox9功能冗余, 协同促进胆管细胞分化形成和胆管形态建成。Sox4和Sox9通过调控TGF $\beta$ 、Notch和Hippo-Yap信号通路发挥作用, 也能够通过增强层黏连蛋白laminin  $\alpha$ 5的合成和分泌以促进胆管成熟<sup>[72]</sup>。

此外, Sall4也参与肝母细胞分化调控。在体外培养的小鼠肝母细胞中过表达Sall4会导致肝实质细胞成熟受阻, 但促进胆管细胞的产生和成熟<sup>[51]</sup>。

#### 1.4 肝脏成熟

肝脏形态在胚胎肝脏发育早期已经形成, 但肝脏结构和功能等需要进一步经历较长一段时间的发育才能成熟。在胚胎发育后期, 随着肝脏细胞分化形成, 其增殖能力降低。出生后, 肝脏必须通过增加相关细胞的体积和数目以满足结构与功能的需要。这个过程伴随着肝脏细胞特别是肝实质细胞的不断生长和增殖能力的重新激活。数周之后, 肝脏细胞的生长和增殖能力逐渐降低至静息状态。与此同时,

肝实质细胞形成多倍性(polyplodization)。随着肝脏成熟,肝实质细胞内出现双核,染色质的倍性不同程度的增加,形成4、8、16甚至32倍。相比于2倍性的肝实质细胞,多倍性降低了细胞的增殖能力和损伤修复或再生潜能<sup>[73]</sup>。成熟肝脏的另一个显著特征是结构和功能分区化(zonation)。特别对于肝实质细胞,虽然其形态比较均一,但门静脉和中央静脉附近细胞的功能有明显差异。靠近门静脉的肝实质细胞主要参与葡萄糖转运、糖异生和脂肪酸氧化分解等,而靠近中央静脉的肝实质细胞主要与糖酵解、脂质合成、酮体生成及药物解毒代谢等相关<sup>[74]</sup>。肝脏中这种功能分区对于其功能高效的实现及稳态的动态维持具有重要的意义。肝脏成熟也伴随着胆管形态、结构和功能的不断建立和完善,但相关研究较少。

肝脏从胚胎发育后期就开始进入成熟阶段,多种细胞因子、生长因子及激素等调控肝脏成熟过程。造血细胞合成并分泌的OSM通过细胞膜表面受体活化靶细胞内Stat3等转录调控因子,不仅能够促进肝母细胞分化形成肝实质细胞,也能够促进胚胎时期肝实质细胞的成熟<sup>[75]</sup>。相反,TNF $\alpha$ 作为OSM的拮抗剂,抑制OSM下游肝脏特异性基因的表达<sup>[76]</sup>。OSM和TNF $\alpha$ 的动态平衡对于胚胎期肝实质细胞的发育成熟有重要的调控作用。此外,EGF信号促进重要的药物解毒代谢酶CYP3A4的表达,并能够促进体外培养诱导体系中人胚胎干细胞诱导得到的肝脏前体细胞的分化和肝实质细胞的成熟<sup>[77]</sup>。TGF $\beta$ 1抑制胚胎肝实质细胞增殖,但能够增强并维持肝脏特异性基因的表达<sup>[78]</sup>。HGF通过其受体酪氨酸激酶受体Met促进脂质生物学合成,并在肝脏再生过程中促进其结构和功能的成熟<sup>[79]</sup>。类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)能够促进间充质干细胞分化形成肝实质细胞并增强其肝脏特异性基因的表达<sup>[80]</sup>。来自小肠的FGF15抑制胆酸合成调控酶CYP7A1的表达,进而调控肝脏内胆酸的稳态平衡<sup>[81]</sup>。胰岛素(insulin)在肝脏代谢功能成熟过程中也发挥重要的调控作用<sup>[82]</sup>。除了肝实质细胞,其他非实质细胞结构和功能的建立与成熟也受到调控。例如,VEGF信号的激活和TGF $\beta$ -ALK-Smad2/3信号通路的抑制能够增强肝毛细血管内皮细胞中结构和功能基因的表达<sup>[83]</sup>。

肝实质细胞多倍性的形成和分布在肝小叶内是不均质的,其在肝小叶的中间区域最先形成<sup>[84]</sup>。研

究认为,小鼠在断奶(weaning)时食性的改变与肝实质细胞多倍化相关,细胞分裂中胞质分裂(cytokinesis)受阻可能是细胞多倍化的主要原因。小鼠断奶时,营养物质来源和类型发生显著变化,相应地,一些新陈代谢酶例如黄素(flavin)和碳水化合物代谢酶及代谢底物也发生转变,这些会调控肝实质细胞多倍化。Insulin/Akt信号通路通过mTORC2调控肝实质细胞胞质分裂的不完整性,进而调控细胞多倍化<sup>[82]</sup>。长非编码RNA H19在二倍性肝实质细胞中的表达量高于多倍性中的,但这种变化是多倍化的原因还是结果并不清楚,且其调控机制也有待进一步研究<sup>[85]</sup>。

肝脏结构和功能分区化也是受到调控的。一种观点认为,结构和功能分区化是不同位置细胞的功能需求不同而导致的被动调控的结果。来自于肺的动脉血通过肝动脉进入肝小叶,其中富含氧气等成分;来自于小肠等营养代谢器官的静脉血通过门静脉进入肝小叶,其中富含营养物质、细胞因子、激素等成分;这两种血液流经肝毛细血管时与附近的细胞特别是肝实质细胞进行物质交换,并汇合入中央静脉流出肝小叶。由此,氧气、营养物质、细胞因子、激素以及肝实质细胞代谢物等在门静脉与中央静脉之间形成浓度梯度,而分布于肝小叶不同位置细胞的代谢需求不同,产生了功能分区。另有观点认为,分区化是信号通路主动调控的结果,Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路在其中发挥关键作用<sup>[86-91]</sup>。有研究通过在小鼠肝脏内不同细胞类型中特异性敲除*Wls*发现,肝实质细胞、胆管细胞及巨噬细胞都不是调控分区化Wnt信号的来源。在所有内皮细胞中敲除*Wls*会导致胚胎致死,但在内皮细胞亚类中特异性敲除*Wls*会影响肝脏分区,表明特定的内皮细胞亚类是调控分区化Wnt信号的来源。Wnt信号激活靠近中央静脉肝实质细胞相关基因的表达,而Ha-ras激活靠近门静脉肝实质细胞相关基因的表达<sup>[86]</sup>。HGF能够激活Ras通路,但其在肝脏分区化过程中的调控作用并不清楚<sup>[92]</sup>。

## 2 肝脏发育的转录组研究

转录是基因表达的关键步骤之一,基因转录产物不仅能够作为模板介导蛋白质合成,其本身也能够作为调控分子或调控复合物的重要组分发挥调节、管理的作用。不同类型细胞中基因转录并不相同,细胞命运转变过程伴随着基因转录的连续变化。



因此, 基因转录研究是定义细胞类型、解析发育过程及调控机制的便捷且有效的方法之一。

肝脏发育是持续的过程, 伴随着细胞间高度动态相互作用、细胞命运选择及细胞结构和功能的建立与完善。多个研究组已经对肝脏发育过程中基因转录水平及变化进行了探究。这些研究通过选取一系列小鼠肝脏发育时间点, 利用实时定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)或微阵列技术(microarray)检测了相关基因的表达变化情况<sup>[93-96]</sup>。其中, Li等<sup>[96]</sup>利用高密度寡核苷酸微阵列技术, 选取了包括胚胎期和出生后肝脏发育的14个时间点, 对每个时间点肝脏细胞特定基因转录水平及变化作了全面的研究。分析发现, 肝脏发育被很好地区分为胚胎期和出生后发育两个阶段; 胚胎期肝脏高表达基因主要与细胞周期、基因转录和翻译以及造血相关, 而出身后肝脏表达与其功能相关的基因, 包括脂质、胆固醇、脂肪酸代谢及类固醇生物合成等。这些研究虽然很好地解析了肝脏整体发育状况, 但存在缺陷。由于肝脏内细胞种类繁多, 且细胞组成和占比随发育高度动态变化, 因此整体肝脏细胞的基因转录研究可以反映特定时期占比最大类型细胞的基因表达状态, 而其他低丰度细胞的基因表达被掩盖或稀释。但我们关注的重点往往是肝脏中每类细胞的发育过程及其之间的相互作用。此外, 上述研究中微阵列方法虽然比RT-qPCR等方法检测基因通量高, 但其他也只能检测已知基因的表达, 不能用于检测未知基因, 检测基因数有限; 且其是基于核酸杂交成像技术发展而来的, 对可检测基因表达阈值要求高, 并存在一定程度的偏好性。

基于第二代测序技术的RNA测序(RNA-sequencing)能够从全转录组(transcriptome)水平上解析相关细胞的基因表达, 灵敏度高、精确性强, 不受基因表达丰度低和基因序列未知性的限制。常规RNA测序是建立在数以万计细胞基础上的, 且平均能够检测到上万个表达基因。但其所需细胞量和纯度相对较高, 且不适用于高度异质性或性质连续变化的细胞类群的研究。因此, 常规RNA测序并不适用于细胞量少且性质和特异性标记分子不明确的细胞, 特别是正在分化或刚分化形成的细胞。自从Tang等<sup>[97]</sup>于2009年首次建立了单细胞水平上全转录组RNA测序技术, 并成功地解析了小鼠囊胚发育过程, 近些年来这种技术取得了迅速的发展。一般来说, Smart-seq2等方法细胞

通量低但测得的基因数多, 精确性强<sup>[98-99]</sup>; 而10× genomics等方法能够显著提高细胞通量, 但测得的基因数少, 精确度低。这些方法的出现推动了相关领域的发展, 已被成功且广泛地应用于发育研究、稀有细胞鉴定及细胞异质性分析等方面。

单细胞RNA测序技术也推动了肝脏发育领域的发展。Li等<sup>[100]</sup>解析腹侧前肠内胚层上Pdx1表达区域细胞命运时发现, 其中低表达Pdx1的细胞虽然表达胰腺分化发育重要的转录调控因子Pdx1, 但其中包含一群多潜能前体细胞, 其能够分化产生肝母细胞。Yang等<sup>[101]</sup>选取了小鼠胚胎肝脏发育7个重要的时间点, 通过单细胞RNA测序深入地解析了肝母细胞向肝实质细胞和胆管细胞的分化发育过程。通过细胞层次聚类、差异基因表达分析等发现, 肝母细胞“默认”地选择肝实质细胞命运, 肝实质细胞分化调控因子及功能相关基因在发育早期的肝母细胞中就已经开始表达; 胆管细胞分化受到更多的转录因子和信号通路调控, 是从肝母细胞向肝实质细胞分化发育主线上“分支”出来的, 从E11.5至E14.5不断有新生的胆管细胞生成, 且胆管细胞表现出高度异质性。通过这些数据, 他们也进一步发现并证明了RAS-PKC-ERK/MAPK信号通路促进胆管细胞分化成熟。这表明, 单细胞RNA测序不仅能够解析细胞分化发育路径及基因表达变化特征, 也能够为阐释发育调控机制提供线索。另有研究也通过相关方法解析了小鼠胚胎肝脏细胞类型及发育路径<sup>[102]</sup>。Halpern等<sup>[103]</sup>则通过单细胞RNA测序详细解析了成熟小鼠肝脏中肝实质细胞分区化特征。他们依据基因表达分布, 在传统二分法(门静脉侧和中央静脉侧)的基础上进一步定义了数百个分区化分布的基因, 并发现且定义了位于两者之间的第三群细胞, 其不仅是两侧两类细胞的过渡, 而且特异性高表达一大群基因。此外, 他们发现了一些可能调控肝实质细胞分区化形成的信号通路, 也以胆汁代谢为例, 发现胆汁代谢重要调控因子按照其发挥作用的先后顺序沿着中央静脉至门静脉顺序梯度分布。这些结果增强了我们对肝脏分区化的理解。MacParland等<sup>[104]</sup>则详细地解析了成体人肝脏中细胞类型及组成, 为了解不同细胞之间的相互作用奠定了基础。

单细胞RNA测序能够从单细胞和全转录组水平上解析细胞的基因表达特征, 但丢失了细胞分布位置信息。肝脏发育过程中细胞的分化发育与位



置密切相关, 例如胆管细胞的分化是完全依赖于门静脉附近的间充质细胞的。有研究利用激光在切片上原位捕捉细胞进行单细胞RNA测序, 但这种方法细胞损伤大、细胞精度低, 且仪器设备依赖度大, 还没有被广泛应用。传统的原位杂交(*in situ* hybridization, ISH)及单分子荧光原位杂交(*fluorescent in situ* hybridization, FISH)虽然能够在组织水平上原位检测RNA含量, 但能够同时检测的基因数有限, 通量低, 因此主要用于验证其他数据(例如单细胞RNA测序数据)得到的结果, 不能够全面系统地发现新的线索。另有研究利用标签(barcode)标记和多轮染色成像的方法, 能够在切片上原位检测上万个基因的表达, 但这种方法也还处于探索阶段<sup>[105]</sup>。

### 3 展望

肝脏发育研究的重要应用是促使我们发展出治疗肝脏疾病的技术或方法。特别是对于体外肝脏样细胞诱导形成及肝脏类器官构建具有重要的指导意义。依据现有关于肝脏发育的知识, 我们并不能诱导得到结构和功能类似于原代细胞的肝脏样细胞, 而关于肝脏类器官的构建更是处于初步探索阶段。这其中, 细胞或类器官培养条件(例如诱导性小因子组分、胞外基质组分、三维培养结构材料组分及共培养细胞类型和比例等)不完善是主要原因。然而实验发现, 如果将体外诱导得到的肝实质样细胞或肝脏类器官移植入模式动物体内时, 其能够进一步发育, 形成类似于原代细胞的结构与功能, 表明肝脏内微环境对于肝脏细胞结构和功能的建立和维持有重要的作用。血液循环系统输送氧气、营养物质、细胞因子、激素等进入肝脏, 这些物质在肝脏发育不同时期高度动态变化且调控肝脏发育。肝脏细胞结构和功能的建立和维持也与细胞和细胞之间或细胞和胞外基质之间的相互作用高度相关, 不同类型的细胞甚至相同类型但不同位置的细胞与周围环境的作用各不相同, 其接收到的信号及作出的反应也各异。因此, 为了在体外更高效地诱导得到或建立更成熟、结构功能更完善的肝脏样细胞或肝脏类器官, 我们有必要利用最新发展的技术, 例如单细胞RNA测序技术、高通量荧光原位杂交技术等, 详细解析人及模式生物整个肝脏发育过程中细胞类型、细胞组成、基因表达动态变化及细胞间相互作用等。这些研究将对推动肝脏疾病的治疗产生不可替代的作用。

### 参考文献 (References)

- 1 Si-Tayeb K, Lemaigre FP, Duncan SA. Organogenesis and development of the liver. *Dev Cell* 2010; 18(2): 175-89.
- 2 Stenvall A, Larsson E, Strand SE, Jonsson BA. A small-scale anatomical dosimetry model of the liver. *Phys Med Biol* 2014; 59(13): 3353-71.
- 3 Zhu M, Lu T, Jia Y, Luo X, Gopal P, Li L, *et al.* Somatic mutations increase hepatic clonal fitness and regeneration in chronic liver disease. *Cell* 2019; 177(3): 608-21, e12.
- 4 Blouin A, Bolender RP, Weibel ER. Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J Cell Biol* 1977; 72(2): 441-55.
- 5 Takeo M, Tsuji T. Organ regeneration based on developmental biology: past and future. *Curr Opin Genet Dev* 2018; 52: 42-7.
- 6 Hagoood JS, Ambalavanan N. Systems biology of lung development and regeneration: current knowledge and recommendations for future research. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2013; 5: 125-33.
- 7 Gordillo M, Evans T, Gouon-Evans V. Orchestrating liver development. *Development* 2015; 142(12): 2094-108.
- 8 Tremblay KD, Zaret KS. Distinct populations of endoderm cells converge to generate the embryonic liver bud and ventral foregut tissues. *Dev Biol* 2005; 280(1): 87-99.
- 9 Rossi JM, Dunn NR, Hogan BL, Zaret KS. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev* 2001; 15(15): 1998-2009.
- 10 Calmont A, Wandzioch E, Tremblay KD, Minowada G, Kaestner KH, Martin GR, *et al.* An FGF response pathway that mediates hepatic gene induction in embryonic endoderm cells. *Dev Cell* 2006; 11(3): 339-48.
- 11 Shin D, Shin CH, Tucker J, Ober EA, Rentzsch F, Poss KD, *et al.* Bmp and Fgf signaling are essential for liver specification in zebrafish. *Development* 2007; 134(11): 2041-50.
- 12 Rodriguez-Seguel E, Mah N, Naumann H, Pongrac IM, Cerda-Esteban N, Fontaine JF, *et al.* Mutually exclusive signaling signatures define the hepatic and pancreatic progenitor cell lineage divergence. *Genes Dev* 2013; 27(17): 1932-46.
- 13 Poulain M, Ober EA. Interplay between Wnt2 and Wnt2bb controls multiple steps of early foregut-derived organ development. *Development* 2011; 138(16): 3557-68.
- 14 Wandzioch E, Zaret KS. Dynamic signaling network for the specification of embryonic pancreas and liver progenitors. *Science* 2009; 324(5935): 1707-10.
- 15 Cirillo LA, Lin FR, Cuesta I, Friedman D, Jarnik M, Zaret KS. Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol Cell* 2002; 9(2): 279-89.
- 16 Bort R, Signore M, Tremblay K, Martinez Barbera JP, Zaret KS. Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. *Dev Biol* 2006; 290(1): 44-56.
- 17 Zhang Y, Hassan MQ, Li ZY, Stein JL, Lian JB, van Wijnen AJ, *et al.* Intricate gene regulatory networks of helix-loop-helix (HLH) proteins support regulation of bone-tissue related genes during osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 2008; 105(2):

- 487-96.
- 18 Sosa-Pineda B, Wigle JT, Oliver G. Hepatocyte migration during liver development requires Prox1. *Nat Genet* 2000; 25(3): 254-5.
- 19 Margagliotti S, Clotman F, Pierreux CE, Beaudry JB, Jacquemin P, Rousseau GG, *et al.* The Onecut transcription factors HNF-6/OC-1 and OC-2 regulate early liver expansion by controlling hepatoblast migration. *Dev Biol* 2007; 311(2): 579-89.
- 20 Margagliotti S, Clotman F, Pierreux CE, Lemoine P, Rousseau GG, Henriot P, *et al.* Role of metalloproteinases at the onset of liver development. *Dev Growth Differ* 2008; 50(5): 331-8.
- 21 Tatsumi N, Miki R, Katsu K, Yokouchi Y. Neurturin-GFRalpha2 signaling controls liver bud migration along the ductus venosus in the chick embryo. *Dev Biol* 2007; 307(1): 14-28.
- 22 Berg T, Rountree CB, Lee L, Estrada J, Sala FG, Choe A, *et al.* Fibroblast growth factor 10 is critical for liver growth during embryogenesis and controls hepatoblast survival via beta-catenin activation. *Hepatology* 2007; 46(4): 1187-97.
- 23 Sekhon SS, Tan X, Micsenyi A, Bowen WC, Monga SP. Fibroblast growth factor enriches the embryonic liver cultures for hepatic progenitors. *Am J Pathol* 2004; 164(6): 2229-40.
- 24 Sekiya T, Adachi S, Kohu K, Yamada T, Higuchi O, Furukawa Y, *et al.* Identification of BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI), an inhibitor of transforming growth factor-beta signaling, as a target of the beta-catenin pathway in colorectal tumor cells. *J Biol Chem* 2004; 279(8): 6840-6.
- 25 Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M, *et al.* Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 1995; 373(6516): 699-702.
- 26 Monga SP, Mars WM, Padiaditakis P, Bell A, Mule K, Bowen WC, *et al.* Hepatocyte growth factor induces Wnt-independent nuclear translocation of beta-catenin after Met-beta-catenin dissociation in hepatocytes. *Cancer Res* 2002; 62(7): 2064-71.
- 27 Weinstein M, Monga SP, Liu Y, Brodie SG, Tang Y, Li C, *et al.* Smad proteins and hepatocyte growth factor control parallel regulatory pathways that converge on beta1-integrin to promote normal liver development. *Mol Cell Biol* 2001; 21(15): 5122-31.
- 28 Monga SP, Monga HK, Tan X, Mule K, Padiaditakis P, Michalopoulos GK. Beta-catenin antisense studies in embryonic liver cultures: role in proliferation, apoptosis, and lineage specification. *Gastroenterology* 2003; 124(1): 202-16.
- 29 Klein D, Demory A, Peyre F, Kroll J, Augustin HG, Helfrich W, *et al.* Wnt2 acts as a cell type-specific, autocrine growth factor in rat hepatic sinusoidal endothelial cells cross-stimulating the VEGF pathway. *Hepatology* 2008; 47(3): 1018-31.
- 30 Matsumoto K, Miki R, Nakayama M, Tatsumi N, Yokouchi Y. Wnt9a secreted from the walls of hepatic sinusoids is essential for morphogenesis, proliferation, and glycogen accumulation of chick hepatic epithelium. *Dev Biol* 2008; 319(2): 234-47.
- 31 Ober EA, Verkade H, Field HA, Stainier DY. Mesodermal Wnt2b signalling positively regulates liver specification. *Nature* 2006; 442(7103): 688-91.
- 32 Micsenyi A, Tan X, Sneddon T, Luo JH, Michalopoulos GK, Monga SP. Beta-catenin is temporally regulated during normal liver development. *Gastroenterology* 2004; 126(4): 1134-46.
- 33 Tan X, Yuan Y, Zeng G, Apte U, Thompson MD, Cieply B, *et al.* Beta-catenin deletion in hepatoblasts disrupts hepatic morphogenesis and survival during mouse development. *Hepatology* 2008; 47(5): 1667-79.
- 34 Onitsuka I, Tanaka M, Miyajima A. Characterization and functional analyses of hepatic mesothelial cells in mouse liver development. *Gastroenterology* 2010; 138(4): 1525-35, e1-6.
- 35 Feracci H, Connolly TP, Margolis RN, Hubbard AL. The establishment of hepatocyte cell surface polarity during fetal liver development. *Dev Biol* 1987; 123(1): 73-84.
- 36 Lemaigre FP. Mechanisms of liver development: concepts for understanding liver disorders and design of novel therapies. *Gastroenterology* 2009; 137(1): 62-79.
- 37 Luzzatto AC. Hepatocyte differentiation during early fetal development in the rat. *Cell Tissue Res* 1981; 215(1): 133-42.
- 38 Kamiya A, Kinoshita T, Ito Y, Matsui T, Morikawa Y, Senba E, *et al.* Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *EMBO J* 1999; 18(8): 2127-36.
- 39 Matsui T, Kinoshita T, Morikawa Y, Tohya K, Katsuki M, Ito Y, *et al.* K-Ras mediates cytokine-induced formation of E-cadherin-based adherens junctions during liver development. *EMBO J* 2002; 21(5): 1021-30.
- 40 Ludtke TH, Christoffels VM, Petry M, Kispert A. Tbx3 promotes liver bud expansion during mouse development by suppression of cholangiocyte differentiation. *Hepatology* 2009; 49(3): 969-78.
- 41 Raynaud P, Carpentier R, Antoniou A, Lemaigre FP. Biliary differentiation and bile duct morphogenesis in development and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43(2): 245-56.
- 42 Yamasaki H, Sada A, Iwata T, Niwa T, Tomizawa M, Xanthopoulos KG, *et al.* Suppression of C/EBPalpha expression in periportal hepatoblasts may stimulate biliary cell differentiation through increased Hnf6 and Hnf1b expression. *Development* 2006; 133(21): 4233-43.
- 43 Kyrmizi I, Hatzis P, Katrakili N, Tronche F, Gonzalez FJ, Talianidis I. Plasticity and expanding complexity of the hepatic transcription factor network during liver development. *Genes Dev* 2006; 20(16): 2293-305.
- 44 Takashima Y, Terada M, Kawabata M, Suzuki A. Dynamic three-dimensional morphogenesis of intrahepatic bile ducts in mouse liver development. *Hepatology* 2015; 61(3): 1003-11.
- 45 Antoniou A, Raynaud P, Cordi S, Zong Y, Tronche F, Stanger BZ, *et al.* Intrahepatic bile ducts develop according to a new mode of tubulogenesis regulated by the transcription factor SOX9. *Gastroenterology* 2009; 136(7): 2325-33.
- 46 Libbrecht L, Cassiman D, Desmet V, Roskams T. The correlation between portal myofibroblasts and development of intrahepatic bile ducts and arterial branches in human liver. *Liver* 2002; 22(3): 252-8.
- 47 Alagille D, Estrada A, Hadchouel M, Gautier M, Odievre M, Dommergues JP. Syndromic paucity of interlobular bile ducts (Alagille syndrome or arteriohepatic dysplasia): review of 80 cases. *J Pediatr* 1987; 110(2): 195-200.
- 48 Li L, Krantz ID, Deng Y, Genin A, Banta AB, Collins CC, *et al.* Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nat Genet* 1997; 16(3): 243-51.
- 49 Zong Y, Panikkar A, Xu J, Antoniou A, Raynaud P, Lemaigre F, *et al.* Notch signaling controls liver development by regulating

- biliary differentiation. *Development* 2009; 136(10): 1727-39.
- 50 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.
- 51 Lemaigre FP. Molecular mechanisms of biliary development. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2010; 97: 103-26.
- 52 Tchorz JS, Kinter J, Muller M, Tornillo L, Heim MH, Bettler B. Notch2 signaling promotes biliary epithelial cell fate specification and tubulogenesis during bile duct development in mice. *Hepatology* 2009; 50(3): 871-9.
- 53 Andersson ER, Chivukula IV, Hankeova S, Sjoqvist M, Tsoi YL, Ramskold D, *et al.* Mouse model of alagille syndrome and mechanisms of Jagged1 missense mutations. *Gastroenterology* 2018; 154(4): 1080-95.
- 54 Geisler F, Nagl F, Mazur PK, Lee M, Zimmer-Strobl U, Strobl LJ, *et al.* Liver-specific inactivation of Notch2, but not Notch1, compromises intrahepatic bile duct development in mice. *Hepatology* 2008; 48(2): 607-16.
- 55 Kodama Y, Hijikata M, Kageyama R, Shimotohno K, Chiba T. The role of notch signaling in the development of intrahepatic bile ducts. *Gastroenterology* 2004; 127(6): 1775-86.
- 56 Clotman F, Jacquemin P, Plumb-Rudewicz N, Pierreux CE, Van der Smissen P, Dietz HC, *et al.* Control of liver cell fate decision by a gradient of TGF beta signaling modulated by Onecut transcription factors. *Genes Dev* 2005; 19(16): 1849-54.
- 57 Wang W, Feng Y, Aimaiti Y, Jin X, Mao X, Li D. TGFbeta signaling controls intrahepatic bile duct development may through regulating the Jagged1-Notch-Sox9 signaling axis. *J Cell Physiol* 2017.
- 58 Hussain SZ, Sneddon T, Tan X, Micsenyi A, Michalopoulos GK, Monga SP. Wnt impacts growth and differentiation in ex vivo liver development. *Exp Cell Res* 2004; 292(1): 157-69.
- 59 Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nitta S, Yamanaoka H, *et al.* Wnt5a signaling mediates biliary differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells in mice. *Hepatology* 2013; 57(6): 2502-13.
- 60 Cordi S, Godard C, Saandi T, Jacquemin P, Monga SP, Colnot S, *et al.* Role of beta-catenin in development of bile ducts. *Differentiation* 2016; 91(1/2/3): 42-9.
- 61 Yanai M, Tatsumi N, Hasunuma N, Katsu K, Endo F, Yokouchi Y. FGF signaling segregates biliary cell-lineage from chick hepatoblasts cooperatively with BMP4 and ECM components *in vitro*. *Dev Dyn* 2008; 237(5): 1268-83.
- 62 Ader T, Norel R, Levoci L, Rogler LE. Transcriptional profiling implicates TGFbeta/BMP and Notch signaling pathways in ductular differentiation of fetal murine hepatoblasts. *Mech Dev* 2006; 123(2): 177-94.
- 63 Goto F, Kakinuma S, Miyoshi M, Tsunoda T, Kaneko S, Sato A, *et al.* Bone morphogenetic protein-4 modulates proliferation and terminal differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells. *Hepatol Res* 2017; 47(9): 941-52.
- 64 Lee DH, Park JO, Kim TS, Kim SK, Kim TH, Kim MC, *et al.* LATS-YAP/TAZ controls lineage specification by regulating TGFbeta signaling and Hnf4alpha expression during liver development. *Nat Commun* 2016; 7: 11961.
- 65 Wu N, Nguyen Q, Wan Y, Zhou T, Venter J, Frampton GA, *et al.* The Hippo signaling functions through the Notch signaling to regulate intrahepatic bile duct development in mammals. *Lab Invest* 2017; 97(7): 843-53.
- 66 Tanimizu N, Miyajima A, Mostov KE. Liver progenitor cells develop cholangiocyte-type epithelial polarity in three-dimensional culture. *Mol Biol Cell* 2007; 18(4): 1472-9.
- 67 Tanimizu N, Saito H, Mostov K, Miyajima A. Long-term culture of hepatic progenitors derived from mouse Dlk+ hepatoblasts. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 26): 6425-34.
- 68 Jia Y, Yao H, Zhou J, Chen L, Zeng Q, Yuan H, *et al.* Role of epimorphin in bile duct formation of rat liver epithelial stem-like cells: involvement of small G protein RhoA and C/EBPbeta. *J Cell Physiol* 2011; 226(11): 2807-16.
- 69 Takayama K, Mitani S, Nagamoto Y, Sakurai F, Tachibana M, Taniguchi Y, *et al.* Laminin 411 and 511 promote the cholangiocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 474(1): 91-6.
- 70 Clotman F, Lannoy VJ, Reber M, Cereghini S, Cassiman D, Jacquemin P, *et al.* The onecut transcription factor HNF6 is required for normal development of the biliary tract. *Development* 2002; 129(1): 1819-28.
- 71 Coffinier C, Gresh L, Fiette L, Tronche F, Schutz G, Babinet C, *et al.* Bile system morphogenesis defects and liver dysfunction upon targeted deletion of HNF1beta. *Development* 2002; 129(8): 1829-38.
- 72 Poncy A, Antoniou A, Cordi S, Pierreux CE, Jacquemin P, Lemaigre FP. Transcription factors SOX4 and SOX9 cooperatively control development of bile ducts. *Dev Biol* 2015; 404(2): 136-48.
- 73 Wilkinson PD, Delgado ER, Alencastro F, Leek MP, Roy N, Weirich MP, *et al.* The polyploid state restricts hepatocyte proliferation and liver regeneration in mice. *Hepatology* 2019; 69(3): 1242-58.
- 74 Ben-Moshe S, Itzkovitz S. Spatial heterogeneity in the mammalian liver. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019; 16(7): 395-410.
- 75 Kamiya A, Kinoshita T, Miyajima A. Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Lett* 2001; 492(1/2): 90-4.
- 76 Kamiya A, Gonzalez FJ. TNF-alpha regulates mouse fetal hepatic maturation induced by oncostatin M and extracellular matrices. *Hepatology* 2004; 40(3): 527-36.
- 77 Yin M, Yang H, Su X, Li Z, Yue Z, Zhang X, *et al.* Identification of EGF as an important regulator for promoting CYP3A4 expression in human embryonic stem cell-derived hepatocytes using TALEN-based gene targeting. *J Genet Genomics* 2014; 41(6): 349-52.
- 78 Sanchez A, Alvarez AM, Benito M, Fabregat I. Transforming growth factor beta modulates growth and differentiation of fetal hepatocytes in primary culture. *J Cell Physiol* 1995; 165(2): 398-405.
- 79 Kaibori M, Kwon AH, Oda M, Kamiyama Y, Kitamura N, Okumura T. Hepatocyte growth factor stimulates synthesis of lipids and secretion of lipoproteins in rat hepatocytes. *Hepatology* 1998; 27(5): 1354-61.
- 80 Mortezaee K, Minaii B, Sabbaghziarani F, Ragerdi Kashani I, Hassanzadeh G, Pasbakhsh P, *et al.* Retinoic acid as the stimulating factor for differentiation of Wharton's Jelly-mesenchymal



- stem cells into hepatocyte-like cells. *Avicenna J Med Biotechnol* 2015; 7(3): 106-12.
- 81 Inagaki T, Choi M, Moschetta A, Peng L, Cummins CL, McDonald JG, *et al.* Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab* 2005; 2(4): 217-25.
- 82 Celton-Morizur S, Merlen G, Couton D, Margall-Ducos G, Desdouets C. The insulin/Akt pathway controls a specific cell division program that leads to generation of binucleated tetraploid liver cells in rodents. *J Clin Invest* 2009; 119(7): 1880-7.
- 83 Yoshida M, Nishikawa Y, Omori Y, Yoshioka T, Tokairin T, McCourt P, *et al.* Involvement of signaling of VEGF and TGF-beta in differentiation of sinusoidal endothelial cells during culture of fetal rat liver cells. *Cell Tissue Res* 2007; 329(2): 273-82.
- 84 Tanami S, Ben-Moshe S, Elkayam A, Mayo A, Bahar Halpern K, Itzkovitz S. Dynamic zonation of liver polyploidy. *Cell Tissue Res* 2017; 368(2): 405-10.
- 85 Shoshani O, Massalha H, Shani N, Kagan S, Ravid O, Madar S, *et al.* Polyploidization of murine mesenchymal cells is associated with suppression of the long noncoding RNA H19 and reduced tumorigenicity. *Cancer Res* 2012; 72(24): 6403-13.
- 86 Braeuning A, Itrich C, Kohle C, Buchmann A, Schwarz M. Zonal gene expression in mouse liver resembles expression patterns of Ha-ras and beta-catenin mutated hepatomas. *Drug Metab Dispos* 2007; 35(4): 503-7.
- 87 Burke ZD, Reed KR, Yeh SW, Meniel V, Sansom OJ, Clarke AR, *et al.* Spatiotemporal regulation of liver development by the Wnt/beta-catenin pathway. *Sci Rep* 2018; 8(1): 2735.
- 88 Cheng X, Kim SY, Okamoto H, Xin Y, Yancopoulos GD, Murphy AJ, *et al.* Glucagon contributes to liver zonation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018; 115(17): E4111-9.
- 89 Leibing T, Geraud C, Augustin I, Boutros M, Augustin HG, Okun JG, *et al.* Angiocrine Wnt signaling controls liver growth and metabolic maturation in mice. *Hepatology* 2018; 68(2): 707-22.
- 90 Monga SP. Role and regulation of beta-catenin signaling during physiological liver growth. *Gene Expr* 2014; 16(2): 51-62.
- 91 Yang J, Mowry LE, Nejak-Bowen KN, Okabe H, Diegel CR, Lang RA, *et al.* beta-catenin signaling in murine liver zonation and regeneration: a Wnt-Wnt situation! *Hepatology* 2014; 60(3): 964-76.
- 92 Gebhardt R, Matz-Soja M. Liver zonation: Novel aspects of its regulation and its impact on homeostasis. *World J Gastroenterol* 2014; 20(26): 8491-504.
- 93 Jochheim A, Hillemann T, Kania G, Scharf J, Attaran M, Manns MP, *et al.* Quantitative gene expression profiling reveals a fetal hepatic phenotype of murine ES-derived hepatocytes. *Int J Dev Biol* 2004; 48(1): 23-9.
- 94 Jochheim-Richter A, Rudrich U, Koczan D, Hillemann T, Tewes S, Petry M, *et al.* Gene expression analysis identifies novel genes participating in early murine liver development and adult liver regeneration. *Differentiation* 2006; 74(4): 167-73.
- 95 Otu HH, Naxerova K, Ho K, Can H, Nesbitt N, Libermann TA, *et al.* Restoration of liver mass after injury requires proliferative and not embryonic transcriptional patterns. *J Biol Chem* 2007; 282(15): 11197-204.
- 96 Li T, Huang J, Jiang Y, Zeng Y, He F, Zhang MQ, *et al.* Multi-stage analysis of gene expression and transcription regulation in C57/B6 mouse liver development. *Genomics* 2009; 93(3): 235-42.
- 97 Tang F, Barbacioru C, Wang Y, Nordman E, Lee C, Xu N, *et al.* mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods* 2009; 6(5): 377-82.
- 98 Picelli S, Bjorklund AK, Faridani OR, Sagasser S, Winberg G, Sandberg R. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. *Nat Methods* 2013; 10(11): 1096-8.
- 99 Ramskold D, Luo S, Wang YC, Li R, Deng Q, Faridani OR, *et al.* Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol* 2012; 30(8): 777-82.
- 100 Li LC, Qiu WL, Zhang YW, Xu ZR, Xiao YN, Hou C, *et al.* Single-cell transcriptomic analyses reveal distinct dorsal/ventral pancreatic programs. *EMBO R* 2018; 19(10): pii: e46148.
- 101 Yang L, Wang WH, Qiu WL, Guo Z, Bi E, Xu CR. A single-cell transcriptomic analysis reveals precise pathways and regulatory mechanisms underlying hepatoblast differentiation. *Hepatology* 2017; 66(5): 1387-401.
- 102 Su X, Shi Y, Zou X, Lu ZN, Xie G, Yang JYH, *et al.* Single-cell RNA-Seq analysis reveals dynamic trajectories during mouse liver development. *BMC Genomics* 2017; 18(1): 946.
- 103 Halpern KB, Shenhav R, Matcovitch-Natan O, Toth B, Lemze D, Golan M, *et al.* Single-cell spatial reconstruction reveals global division of labour in the mammalian liver. *Nature* 2017; 542(7641): 352-6.
- 104 MacParland SA, Liu JC, Ma XZ, Innes BT, Bartczak AM, Gage BK, *et al.* Single cell RNA sequencing of human liver reveals distinct intrahepatic macrophage populations. *Nat Commun* 2018; 9(1): 4383.
- 105 Eng CL, Lawson M, Zhu Q, Dries R, Koulina N, Takei Y, *et al.* Transcriptome-scale super-resolved imaging in tissues by RNA seqFISH. *Nature* 2019; 568(7751): 235-9.