

不同肝脏损伤模型下新生肝细胞来源研究进展

李婷 杨劲树 杨卫军*

(浙江大学生命科学学院, 细胞与发育生物学研究所, 杭州 310058)

摘要 肝脏是执行很多重要生理功能的器官, 它具有强大的再生能力, 在损伤后可以迅速恢复到原本的体积。它的再生特性得益于肝细胞和胆管上皮细胞在损伤后的快速增殖; 然而, 在极端急性损伤或长期慢性损伤的情况下, 肝脏可能无法再生或再生不佳。有众多研究表明, 不同的肝损伤模型会动员不同的细胞亚群促进肝再生。该文主要介绍了五种不同的肝脏损伤模型, 并对在不同损伤情况下新生肝细胞的来源、胆管上皮细胞与肝细胞的互相转换等方面进行了总结, 为肝脏后续相关研究和疾病治疗提供了借鉴。

关键词 肝脏祖细胞; 损伤和修复; 细胞可塑性

Advances in the Research of New Hepatocytes Origin in Different Liver Injury Models

LI Ting, YANG Jinshu, YANG Weijun*

(Institute of Cell and Developmental Biology, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract The liver is a unique organ that performs many vital physiological functions. It possesses a remarkable regenerative capacity that can restore normal volume rapidly after injury. The capacity for repair is largely attributable to the ability of its differentiated epithelial cells, including hepatocytes and biliary epithelial cells, to proliferate after injury. However, in cases of extreme acute injury or prolonged chronic insult, the liver may fail to regenerate or do so suboptimally. Many studies have demonstrated that different liver-damage models mobilize different subtypes of hepatic epithelial cells in contributing to liver regeneration. This review discusses five hepatic injury models, and the origin of new hepatocytes, cellular plasticity within the epithelial cells under these circumstances, which will provide reference for future research and disease treatment.

Keywords liver progenitor cell; injury and repair; cell plasticity

肝脏是人体内的重要器官, 肝脏由肝细胞(hepatocytes)、胆管上皮细胞(biliary epithelial cells)、枯否细胞(Kupffer cells)、肝星形细胞(hepatic stellate cells)等多种细胞组成, 其中两种上皮类细胞——肝细胞和胆管上皮细胞是占比最多的细胞, 这两类细胞在发育过程中有共同的祖细胞——成肝细胞(hepatoblasts)。肝细胞具有解毒各种代谢物、调节糖脂代谢、

合成血清蛋白、分泌胆汁等功能, 胆管上皮细胞形成胆管网络结构将胆汁从肝细胞运输到胆囊中^[1]。肝细胞的寿命是200至300天^[2], 大部分的肝细胞在稳态下增殖缓慢^[3], 但是当其受到损伤时又可以迅速增殖以响应损伤, 因此研究人员通常利用损伤实验模型包括部分肝切除术、胆管结扎术和一些毒物诱导的损伤, 来研究肝细胞增殖再生的动态变化。

收稿日期: 2021-11-02 接受日期: 2022-01-14

国家自然科学基金(批准号: 31730084)资助的课题

*通讯作者: Tel: 0571-88273176, E-mail: w_jyang@zju.edu.cn

Received: November 2, 2021 Accepted: January 14, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31730084)

*Corresponding author: Tel: +86-571-88273176, E-mail: w_jyang@zju.edu.cn

肝脏在急性损伤中可以迅速增殖并修复损伤,但是长期慢性损伤会减弱这种增殖能力。慢性肝脏疾病造成了重大的经济社会医疗负担。现有的治疗方法中,只有器官移植可能从根本上治疗终末期肝病患者。肝细胞的细胞疗法给慢性肝病治疗带来希望,但是高质量的肝细胞供应不足。利用小鼠损伤模型研究肝细胞的来源,能够探索有强大增殖潜力的肝细胞亚群,为肝脏疾病的细胞治疗、肝组织工程、药物筛选和基础研究提供一个更好的替代方法。

1 新生肝细胞来源的研究历史

肝脏是从前肠内胚层起始的,在胚胎发育过程中成肝细胞会分化成胆管上皮细胞和肝细胞,这些成肝细胞具有干细胞的特性,但是只存在于胚胎期^[4]。长久以来人们都认为成体肝脏干细胞(liver stem cells)存在于“赫令氏管”(canal of Hering)中,这些干细胞会产生肝脏祖细胞(liver progenitor cells)并分化为肝细胞和胆管上皮细胞,从而维持肝脏稳态和损伤修复,但是这个假说存在很多争议^[5-6]。在1956年,FA-RBER^[7]提出了最早的肝脏祖细胞——卵圆细胞(oval cells),卵圆细胞被认为是胆管来源的并可以在损伤后增殖分化为肝细胞,但是更进一步的研究表明,只有当肝细胞的增殖被抑制时,卵圆细胞才会往肝细胞方向增殖^[8]。人们陆续分离出EPCAM⁺、CD133⁺、CD13⁺和SOX9⁺等成体肝脏祖细胞^[9-11],但是这些细胞在体外形成克隆和分化为肝细胞的效率会随着传代次数的增加而降低^[12]。2017年,LI等^[13]发现,ST14⁺胆管细胞可以形成连续传代的类器官,但并不能确定其是否存在于赫令氏管中。大多数对成体肝脏干细胞或祖细胞的研究都需要进行损伤诱导,这表明成体肝脏干细胞/祖细胞是在特定的损伤类型中行使功能的,而不是在肝脏稳态中发挥作用的。

人类肝脏干细胞(human liver stem cells, HLSCs)首先在胚胎期肝脏中被发现^[14],随后在成体肝脏中被成功分离出来^[15],HLSCs具有自我更新的能力和双向分化的潜能,表达典型的干细胞标志物,比如OCT4、NANOG、SOX2等。比起间充质干细胞,HLSCs有更好的肝细胞分化潜力和更低的免疫原性^[16],其修复损伤肝脏的能力依靠抵抗炎症、免疫调节和抗纤维化实现。目前,临床上已经采用HLSCs治疗代谢异常儿童患者,因HLSCs在肝脏再生中的重要功能,HLSCs值得更进一步的探究^[17]。

2 肝细胞亚群

肝小叶是肝脏的功能单位,小鼠的肝小叶根据门静脉-中央静脉轴划分为三个区域:门静脉周围为1区,靠近中央静脉为3区,处于两者之间的区域为2区^[18]。近期研究发现,处于不同肝区的肝细胞可能在正常稳态维持和损伤中扮演着不同的角色(图1)。

(1) Wnt通路的靶向基因*Axin2*(axis inhibition protein 2)在靠近中央静脉周围的几层肝细胞中表达,利用*Axin2*-CreER^{T2}谱系示踪小鼠模型发现,AXIN2⁺细胞是单能的肝脏干细胞,这些细胞在稳态维持的情况下可以增殖分化为其他肝区的肝细胞^[19],但是该研究并没有阐明AXIN2⁺肝细胞在应对损伤和肝癌发生中的作用,然而,另一研究并不支持上述关于AXIN2⁺细胞在稳态维持中的贡献^[20],研究人员发现相比于其他细胞而言,AXIN2⁺肝细胞并没有突出的增殖潜力。(2) *Lgr5*(leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5)同样是Wnt通路的靶向基因,LGR5⁺细胞也在靠近中央静脉周围的肝细胞中表达,在肝脏出生后发育和成体稳态中主要维持自身的细胞类群,但是LGR5⁺细胞是肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的主要细胞来源^[21]。(3) 性别决定相关高迁移率族基因9(SRY-related high mobility group-box gene 9, *Sox9*)是胆管上皮细胞的标识物,也在一小群邻近门静脉的肝细胞中有低水平的表达,这一小群SOX9⁺肝细胞可以在损伤后增殖分化为一定量的新生肝细胞或者分化为胆管上皮细胞应对损伤^[22]。(4) 端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)在分散的少数肝细胞中有高量的表达,利用*Tert*-CreER^{T2};R26-LSL-tdTomato谱系示踪小鼠发现在稳态维持的情况下TERT^{H^{igh}}细胞可以增殖分化为其他细胞,并且随着时间的推移TER-T^{H^{igh}}细胞的后代几乎占据了整个肝叶,在损伤后TER-T^{H^{igh}}细胞的增殖加快并形成跨区域的后代克隆^[23]。(5) 主要促进调控超家族蛋白2A(major facilitator super-family domain containing 2A, *MFSD2A*)基因被认为是维持血脑屏障功能的重要基因,同时也在门静脉周围区域的肝细胞中表达,MFSD2A⁺肝细胞在应对损伤时会产生新的肝细胞,然而它们在正常稳态下会逐渐被其他细胞所取代^[24]。(6) 啮齿类动物的肝细胞大约有90%是多倍体,利用*Ubc*-CreER^{T2};Rosa-Confetti谱系示踪小鼠标记多倍体细胞发现多倍体细胞在损伤后有强大的增殖潜力^[25]。

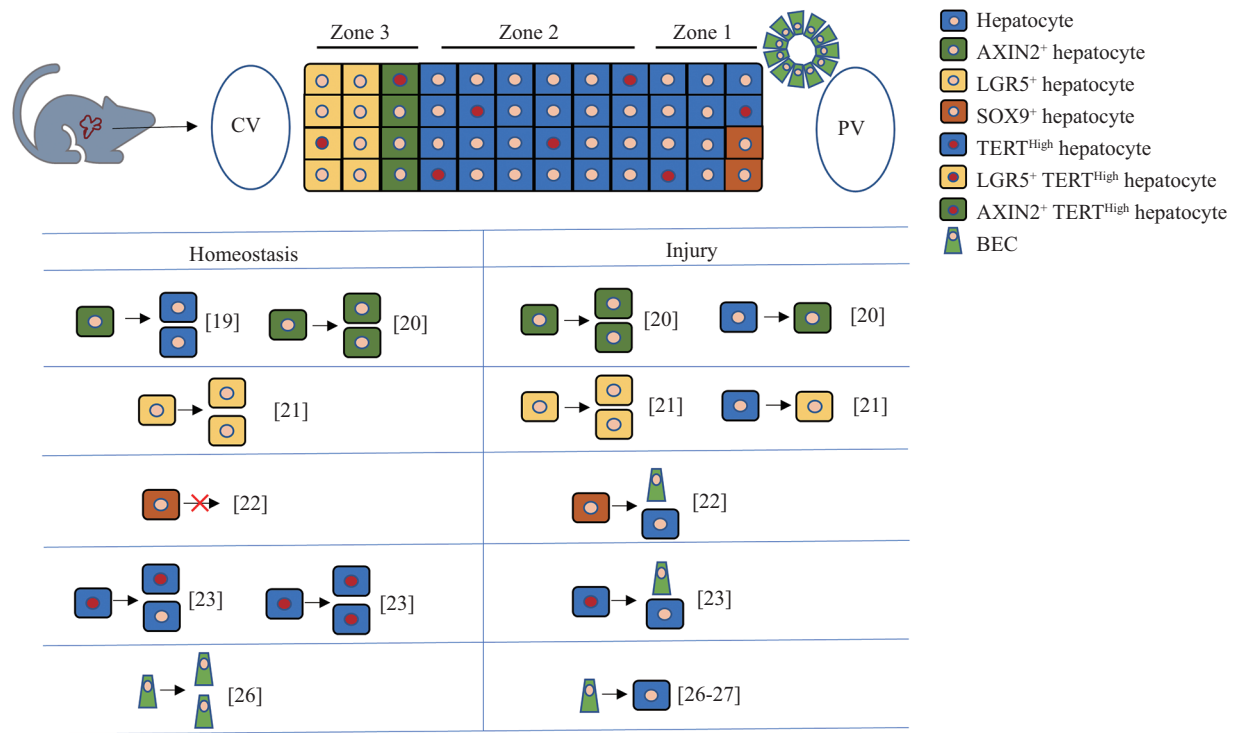


图1 维持肝脏稳态和再生的不同肝细胞类群

Fig.1 Different hepatocyte populations proposed to enable liver homeostasis and regeneration

表1 不同损伤模型下各类群细胞的响应

Table 1 The response of each cell subset under different injury models

损伤模型 Injury model	细胞类型及贡献 Cell type and contribution
PHx	MFSD2A ⁺ hepatocyte ^[24] ; area index from 21.21%±2.91% to 33.74%±3.52%
CCl ₄	SOX9 ⁺ hepatocyte ^[22] ; area index from 2.55%±0.28% to 15.22%±1.57% TERT ^{High} hepatocyte ^[23] ; increase in the number of GS ⁺ Tomato ⁺ cells
TAA	BECs ^[27] ; BECs to hepatocytes: 55.7%±3.9%
BDL	SOX9 ⁺ hepatocyte ^[22] ; hepatocytes to BECs: 3.46%±0.33%
DDC	SOX9 ⁺ hepatocyte ^[22] ; hepatocytes to BECs: 3.63%±0.27% TERT ^{High} hepatocyte ^[23] ; area index from 5.60%±0.30% to 38.00%±3.20% BECs ^[27] ; BECs to hepatocytes: 23.30%±3.80%

PHx: 部分肝切除术; CCl₄: 四氯化碳; TAA: 硫代乙酰胺; BDL: 胆管结扎; DDC: 3,5-二乙酯基-1,4-二氢三甲吡啶。
PHx: partial hepatectomy; CCl₄: carbon tetrachloride; TAA: thioacetamide; BDL: bile duct ligation; DDC: 3,5-diethoxycarbon-yl-1,4-dihydrocollidine.

胆管上皮细胞被认为是兼性的干细胞(facultative stem cell), 之前有研究表明, 当利用*p21*过表达或者抑制*Itgb1*(β1-integrin)表达来抑制肝细胞增殖时, 胆管上皮细胞会在肝损伤后增殖产生大量的肝细胞^[26]。同时在另一研究中也有着相似的结果: 在长期慢性的肝损伤之后, 修复产生的肝细胞主要来源就是胆管上皮细胞, 同时他们还发现了细胞由胆管上皮细胞

向肝细胞转换时需要经历双表型(共表达CK19和HNF4α)的状态^[27]。

以上众多研究表明, 在损伤后多种肝细胞亚群都可以产生新的肝细胞, 同时在严重的肝损伤中胆管上皮细胞和肝细胞可以作为彼此的兼性干细胞进行转化, 下文将对不同的损伤模型及其新生肝细胞的来源进行总结(表1)。

3 部分肝切除术(partial hepatectomy, PHx)

肝有强大的再生能力, 即使当肝体积的70%被切除之后, 其也会迅速恢复肝脏原本的体积和功能^[28], 但是被移除的肝叶不会重新长出来, 是剩余的肝叶增殖膨大从而使肝总体积恢复至损伤前的水平^[29]。啮齿类动物肝脏具有多叶的结构, 所以可以通过手术切除不同的肝叶来实现不同程度的部分肝切除损伤, 70%肝切除术通常会去除肝的左侧叶、左中叶和右中叶^[30]。同时部分肝切除不会对剩余的肝叶造成损伤, 也不会造成其他器官的病变^[31]。1931年, HIGGINS和ANDERSON^[32]发现对大鼠进行70%的肝切除术后, 成熟的肝细胞类群会发生增殖, 在此过程中, DNA进行合成, 细胞体积增大, 从而恢复肝的体积, 小鼠中肝细胞增殖最旺盛的时间点在切除后的36~48 h内。因此, 部分肝切除模型是用来研究肝细胞再生的理想模型^[33]。

近年来在多篇研究肝脏祖细胞的文章中都采用了部分肝切除损伤模型作为损伤方法。在上文提到的关于AXIN2⁺肝细胞的研究中^[11], 研究人员发现AXIN2⁺肝细胞在稳态持续追踪了10个月之后仍然只限制在中央静脉周围区域, 并且相比于其他的肝细胞来说, 在进行70%肝切除损伤后, 其没有明显的增殖优势。LGR5和AXIN2在中央静脉周围的肝细胞中共表达, ANG等^[13]利用成年 *Lgr5-rtTA/TetO-Cre; R26-LSL-tdTomato* 谱系小鼠进行 LGR5⁺肝细胞的研究, 他们发现在诱导表达荧光1周后对其实施部分肝切除手术, 新生的LGR5⁺肝细胞都来源于已有的LGR5⁺肝细胞, 并且LGR5⁺肝细胞不会增殖为门静脉周围的肝细胞和胆管上皮细胞, 只会增殖以维持本身的细胞系。关于SOX9⁺肝细胞的研究得到了跟AXIN2⁺、LGR5⁺肝细胞类似的结果^[14], 用 *Sox9-CreER; Hnf4a-DreER; R26-Ai66* 谱系小鼠标记 SOX9⁺肝细胞后进行部分肝切除术, 研究人员发现SOX9⁺肝细胞与SOX9⁺肝细胞在增殖方面没有区别, 而当用免疫荧光标记胆管上皮细胞后, 他们发现SOX9⁺肝细胞在部分肝切除后不会产生胆管上皮细胞。MFSD2A⁺肝细胞对于部分肝切除术有所响应^[16], 在对 *Mfsd2a-CreER; Rosa26-LSL-RFP* 谱系小鼠进行部分肝切除术后, 整体荧光视野显示, RFP⁺细胞仍然分布在门静脉周围, 分布特征没有改变, 但是RFP⁺细胞所占的面积增加为原来的1.66倍, 说明门静脉周围的肝细胞响应损伤进行了高效的增殖。近期有

研究利用新型增殖示踪系统(ProTracer)标记损伤后进行增殖的肝细胞, 发现部分肝切除术导致的肝细胞增殖起始于1区并逐渐通过2区向3区进展^[34], 这与MFSD2A⁺肝细胞的研究一致。

4 中央静脉周围肝细胞损伤模型

中央静脉周围肝细胞损伤模型包括四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)损伤模型和硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA)损伤模型。这两种模型都需要依靠细胞色素P450同工酶(CYP2E1)来造成损伤, 而CYP2E1主要在3区肝细胞中表达^[35], 所以损伤是从中央静脉周围肝细胞开始的。CCl₄和TAA都能引起脂质氧化损伤肝细胞, CCl₄诱导肝纤维化模型更适合研究肝纤维化的自发逆转机制, TAA诱导的肝纤维化模型更适合于肝纤维化机制的研究以及治疗药物的筛选^[36]。

4.1 四氯化碳损伤模型

四氯化碳(CCl₄)是无色的非极性有机物, 具有剧毒, 是一种常用的肝脏损伤化学物质, CCl₄会通过改变溶酶体的渗透率及线粒体膜来直接损害肝细胞^[37], 同时肝细胞内的氧化酶系统通过细胞色素P450同工酶(CYP2E1)将CCl₄转变为高活性的自由基代谢物, 导致严重的中央小叶坏死^[38]。CCl₄损伤模型一般通过腹腔注射造模, 注射浓度和频率会影响CCl₄损伤的区域和程度^[36]。

LGR5⁺细胞位于中央静脉周围, 对于CCl₄损伤很敏感, 因此在注射单剂CCl₄ 3天后LGR5⁺细胞会枯竭, 但是在6~14天后, 其他细胞会逐渐补充LGR5⁺细胞, 损伤得以恢复^[13]。谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)是3区的标志物^[39], TERT^{High}细胞在GS⁺区域内数量很少, 但是当进行单剂CCl₄注射7天之后, TERT^{High}细胞在GS⁺区域中的后代比例显著增加了, 所以针对于中央静脉周围区域肝细胞的CCl₄损伤激活了邻近的TERT^{High}细胞, 并且后代开始表达区域性标志物GS来修复损伤^[15]。

除了直接影响中央静脉周围细胞之外, CCl₄对中央静脉周围肝细胞进行损伤之后还会间接导致门静脉周围肝细胞的代偿性增殖, HAN等^[22]对 *Sox9-CreER; Hnf4a-DreER; R26-Ai66* 谱系小鼠进行3天1剂, 连续10次的CCl₄注射, 分析损伤后以及恢复4周后的样本, 发现相比于对照组, RFP⁺细胞所占区域显著增加了(损伤后: 15.22%±1.57%; 恢复4周后:

12.99%±1.51%; 对照组: 2.55%±0.28%), 并且SOX9⁺来源的肝细胞形成了从门静脉周围区域向中央静脉周围区域的克隆。WEI等^[40]发现在CCl₄损伤3区肝细胞后, 2区肝细胞(HAMP2⁺)和1区肝细胞(SOX9⁺)可以增殖补充损伤的细胞, 他们还认为肝细胞的损伤修复可能并不是依靠单一的干细胞或者祖细胞进行的, 进行增殖来损伤修复的肝细胞来源有很多, 但是其增殖率存在差异。

MATSUMOTO等^[25]用低剂量腺病毒相关病毒(AAV8-Ttr-Cre)诱导*Rosa-Confetti*谱系小鼠标记单颗肝细胞, 二倍体细胞被标记为单色(YFP或RFP), 而多倍体细胞被标记为双色(YFP和RFP)。在进行4周的CCl₄损伤后, 57.3%被标记细胞的克隆体积是损伤前的3倍, 而且双色多倍体细胞与无性增殖细胞具有类似的扩张模式。这些发现表明, 多数多倍体肝细胞经历了多个细胞分裂周期, 从而不断进行增殖修复肝损伤。同时在损伤后双色肝细胞的比例有显著下降(损伤后: 11.1%±1.2%; 对照组: 26.4%±2.1%), 说明部分双色肝细胞增殖为单色肝细胞, 这与倍型减少时等位基因分离一致, 表明多倍体肝细胞在损伤后会进行染色体减少的有丝分裂(reductive mitosis)。

4.2 硫代乙酰胺损伤模型

硫代乙酰胺(TAA)损伤是一种常用的肝脏慢性损伤模型, TAA本身没有肝毒性, 但是其活性代谢物会与蛋白质和脂质共价结合, 造成氧化应激和小叶中央坏死, 导致大面积肝细胞遭到破坏^[41], 促进肝硬化发展^[42], 与CCl₄损伤相比, TAA导致更多门静脉周围细胞浸润和更明显的导管增生, 最常用的TAA损伤模型是以300 mg/L的浓度给小鼠喂水2~4个月^[43]。

上面提到过的针对胆管上皮细胞参与肝细胞再生的研究采取了TAA损伤的方法, 利用双荧光报告mTmG小鼠结合甲状腺素结合球蛋白(thyroxine-binding globulin, TBG)启动子调控表达Cre重组酶的腺病毒相关病毒(AAV-Cre)来标记所有的肝细胞, 因此肝细胞表达GFP, 而其他细胞表达RFP^[19]。对小鼠进行TAA损伤12周后, 肝中存在严重的纤维化和胆管反应, 但是肝细胞仍然是GFP⁺, 说明在这种程度损伤下肝再生是由已经存在的肝细胞维持的。而将TAA损伤时间延长到24周后, 小鼠中出现了RFP⁺的肝细胞, 这些非实质细胞来源的细胞具有典型的肝细胞表型, 同时表达HNF4α和ALB(成熟

的肝细胞标志物), 此时RFP⁺肝细胞占有所有肝细胞的20.7%±2.6%, 他们将损伤时间继续延长到52周, RFP⁺肝细胞继续增殖补充肝实质, 且占比达到了55.7%±3.9%, 表明慢性肝损伤触发了由非实质细胞向肝细胞转变的持续性增殖。同时他们还做了一个损伤修复的模型, 即在TAA损伤持续24周后, 将含TAA饮水更换为正常饮水, 使小鼠进行为期24周的恢复期。在小鼠肝实质全部恢复正常之后, RFP⁺和GFP⁺肝细胞均停止了增殖, 并且不同区域的RFP⁺肝细胞表达不同的区域标志物, 表明非实质细胞来源的肝细胞已经与肝实质融为一体。此外, 长时间的TAA损伤会导致肝癌^[44], 在TAA损伤52周后的确发现了肝癌结节, 但是所有的肿瘤都是GFP⁺, 说明非实质细胞来源的肝细胞在此损伤条件下不会形成肿瘤。

5 门静脉周围肝细胞损伤模型

门静脉周围肝细胞损伤模型包括胆管结扎(bile duct ligation, BDL)模型和3,5-二乙酯基-1,4-二氢三甲吡啶(3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine, DDC)饮食损伤模型。这两种损伤模型都是通过造成胆汁淤积而引起肝纤维化的。胆汁淤积是一种既阻碍胆汁流动形成又阻碍胆汁排泄的疾病。持续胆汁淤积会导致慢性炎症, 且损伤胆管细胞和肝细胞, 并通过多种调节因子激活成纤维细胞以及细胞外基质过度沉积, 导致肝纤维化^[45]。

5.1 胆管结扎模型

胆管结扎是应用最广泛的研究胆管损伤和增殖的方法, 早在许多年前就已经建立了其成熟的模型^[46-47]。胆管结扎术使肝内胆汁淤积, 持续的胆汁淤积会引发慢性炎症、损伤胆管细胞和肝细胞, 从而致使细胞外基质过度沉积, 造成肝纤维化^[48]。胆管结扎造成的损伤可以用天狼星红染色来确定, 也可以根据免疫荧光染色标记胆管上皮细胞CK19, 观察是否有胆管反应来确定。

HAN等^[22]对*Sox9-CreER;Hnf4a-DreER;R26-Ai66*小鼠在TAM注射2周之后施行BDL, 发现SOX9⁺肝细胞可以分化为胆管上皮细胞。在MFSD2A⁺肝细胞研究^[16]中也利用了BDL, *Mfsd2a-CreER;Rosa26-LSL-RFP*谱系鼠在实施BDL 2周前注射TAM标记MFSD2A⁺的肝细胞, 在BDL损伤之后发现RFP⁺细胞显著减少(7.14%±0.35%), 只有门静脉周围的两到三

层细胞中还有RFP的表达, 而假手术组的RFP⁺细胞占31.89%±2.62%, 这说明门静脉周围的肝细胞容易受到胆管阻塞损伤的影响, 并且在损伤后其他部位的肝细胞会补充MFSD2A⁺肝细胞。HE等^[34]利用新型增殖示踪系统(ProTracer)小鼠, 在施行BDL 3、4、7天后进行取样分析, 发现GFP⁺在2区富集, 这表明2区的肝细胞增殖在BDL诱导的损伤修复中有着重要作用。

5.2 3,5-二乙酯基-1,4-二氢三甲吡啶饮食损伤

DDC损伤模型是用来研究胆管反应和肝细胞与胆管上皮细胞相互转化的模型^[49]。该模型会引起胆管内卟啉堆积、胆管梗阻, 导致胆管炎和门静脉周围的纤维化^[50], 模拟人类胆管疾病, 如原发性硬化胆管炎、原发性胆管肝硬化以及药物性胆管损伤。常用的DDC损伤方法是给小鼠喂食含0.1% DDC的饲料, 喂食时间根据实验目的有所不同。

之前有研究团队对LGR5⁺细胞进行谱系示踪实验, 发现了尽管在正常肝中几乎没有LGR5⁺细胞, 但是当对小鼠进行DDC损伤后发现了LGR5⁺胆管上皮细胞和肝细胞^[51]。他们将这些标记细胞分选出来, 并将其培养为自我更新的类器官, 而此类器官表达胆管上皮细胞和肝细胞的标志物(CK19和HNF4 α), 当类器官被重新移植进体内环境时可以分化为肝细胞, 这表明LGR5⁺细胞是损伤诱导的肝祖细胞。

YANGER等^[52]发现连续的DDC损伤会导致一些肝细胞的命运发生转变, 呈现出胆管上皮细胞的表型。TARLOW等^[53]通过转录组测序发现SOX9在肝细胞来源的胆管上皮细胞中高度表达, 于是他们利用*Sox9-CreER^{T2}; ROSA-mTmG*小鼠, 在DDC损伤4周后对其注射他莫昔芬进行标记, 此时大多数GFP⁺细胞表达卵圆细胞的标志物A6。随后恢复小鼠正常饮食使其进入自然恢复期。对恢复期GFP⁺肝细胞数量进行持续观察, 发现恢复4周后GFP⁺肝细胞数量是恢复初期的5倍, 这表明在DDC损伤时, 某些肝细胞首先去分化为卵圆细胞再分化为胆管上皮细胞, 但是当损伤被修复时, 大多数肝细胞来源的胆管细胞又重新变为肝细胞。但是我们仍不清楚是哪一类肝细胞在行使上述功能。HAN等^[22]对*Sox9-CreER; Hnf4a-DreER; R26-Ai66*谱系小鼠注射他莫昔芬2周后开始DDC损伤, 损伤8周后进行取样分析, 在实验组中发现了RFP⁺CK19⁺的双阳性细胞, 但是在增加了SOX9⁺细胞来源的胆管上皮细胞的同时,

SOX9⁺细胞来源的肝细胞数量相比于对照组减少了(实验组: 1.07%±0.14%; 对照组: 2.59%±0.29%)。相比于其他肝细胞, SOX9⁺肝细胞在DDC损伤后更倾向于产生胆管上皮细胞。当DDC损伤进行时, SOX9⁺肝细胞数量减少, 是因为这些细胞参与了胆管上皮细胞的产生。同样的, 在另一个关于MFSD2A⁺细胞的研究中, PU等^[16]发现在DDC慢性损伤之后, RFP⁺细胞仍然分布在门静脉周围区域, 但是数量减少了, 同时观察到了RFP⁺CK19⁺HNF4 α ⁺且具有胆管上皮细胞表型的细胞, 说明MFSD2A⁺细胞在DDC慢性损伤中会改变细胞命运。

门静脉周围的肝细胞被损伤之后主要由邻近的细胞(SOX9⁺、MFSD2A⁺)修复, TERT^{High}肝细胞在肝小叶中均匀分布, 因此邻近门静脉的TERT^{High}细胞对DDC损伤也会有积极响应。LIN等^[15]对*Tert-CreER^{T2}; R26-LSL-tdTomato*谱系小鼠进行TAM注射2周后开始DDC饮食, 1个月后取样分析发现RFP⁺肝细胞所占面积显著增加了(实验组: 38.0%±3.2%; 对照组: 5.6%±0.3%), 同时TERT^{High}细胞的一部分后代还分化为了胆管上皮细胞, 这表明TERT^{High}细胞在DDC损伤后进入快速增殖来进行肝细胞的再生。为了确认TERT^{High}肝细胞是正常肝损伤响应所必需的, 他们构建了以腺相关病毒(AAV)载体为基础的白喉毒素特异性擦除TERT^{High}肝细胞的系统(AAV-lsl-DTA), 利用这个系统可以擦除约75.1%的TERT^{High}肝细胞。在擦除TERT^{High}肝细胞之后进行为期4周的DDC损伤实验, 发现相比于对照组, 实验组的肝纤维化程度更严重, 包括胶原蛋白沉积增加以及活化的星形细胞数量增加等现象, 同时胆管上皮细胞数量也增加了, 说明抑制肝细胞的更新导致了胆管反应的加剧。这些数据表明, TERT^{High}肝细胞对于正常肝组织损伤后的再生是不可或缺的。WEI等^[40]对不同谱系小鼠进行6周DDC饮食实验后发现, 除了1区肝细胞有显著增殖外, 2区肝细胞(HAMP2⁺)也响应损伤进行了增殖, 他们认为由于2区位置的特殊性(毒性损伤往往发生于1区和3区), 2区肝细胞中存在一类肝细胞可以增殖并补充其他区域肝细胞。

除此之外, DDC损伤模型也被用于研究胆管上皮细胞参与肝细胞的再生。DENG等^[19]对小鼠进行DDC饮食4周后, 发现所有的肝细胞仍然是GFP⁺的, 说明短期的损伤靠肝细胞的自我更新来修复, 当DDC饮食延长到24周后, 发生了细胞衰老凋亡等病

理性改变以及细胞外基质沉积增加,同时在肝实质细胞中发现了RFP⁺肝细胞,其占总实质细胞比例的23.3%±3.8%,这些数据表明慢性的DDC损伤会诱导非实质细胞向肝细胞的转变。在另一个类似的研究中,RAVEN等^[18]通过两种不同方法抑制肝细胞的增殖来研究胆管上皮细胞的干细胞特性,再施行DDC损伤得到了相似的结果。其一是将AAV8.TBG.Cre注射进*R26-LSL-tdTomato;Itgb^{fl/fl}*小鼠中标记绝大多数肝细胞,同时擦除了*Itgb1*的表达,从而抑制肝细胞的增殖然后进行为期1周的DDC饮食损伤。在进行DDC损伤之后,所有的小鼠体重都有所下降但是*Itgb^{fl/fl}*小鼠的体重恢复比对照组缓慢,可见*Itgb^{fl/fl}*小鼠肝细胞不能有效地增殖以修复损伤。*Itgb^{fl/fl}*小鼠在DDC损伤及修复之后,20%~30%的肝细胞是RFP⁺的,RFP⁺肝细胞分布有明显的特征,起初它们分布在胆管上皮细胞的周围,离胆管反应区越远,RFP⁺肝细胞数量越少,而且某些RFP⁺细胞呈现双表型的状态(CK19⁺和HNF4α⁺),推定它们处于胆管上皮细胞和肝细胞的中间状态。因为RFP⁺肝细胞看起来是胆管来源的,所以他们利用*CK19-CreER^T;R26-LSL-tdTomato*谱系示踪小鼠来标记胆管上皮细胞,同时用RNA干扰(RNA interference, RNAi)抑制*Itgb1*的表达,之后进行DDC饮食损伤,观察到了胆管上皮细胞来源的肝细胞。第二种方法是在*CK19-CreER^T;R26-LSL-tdTomato*谱系示踪小鼠中利用腺相关病毒过表达P21,然后进行DDC损伤,RFP⁺肝细胞贡献了所有肝细胞的6.12%±0.3%,考虑到系统的标记效率只有40%,因此在这个损伤模型中胆管上皮细胞贡献了所有肝细胞的15.3%,这些胆管来源的细胞行使正常的肝细胞功能,并且在损伤后10周仍然存在。

6 总结与展望

综上所述,肝脏在损伤的情况下有着多样的再生反应,多种肝细胞亚群的增殖和作为兼性干细胞的胆管上皮细胞确保了肝脏的再生。

除了上述模型之外,常见的肝脏损伤模型还有烯丙醇(allyl alcohol, AA)损伤模型^[54]、胆碱缺乏添加乙硫氨酸(choline-deficient, ethionine-supplemented, CDE)饮食损伤模型^[55]等。由于人类肝脏疾病的复杂生理特征,这些损伤模型都不能够完全模拟疾病过程,研究人员仍在探寻新的损伤模型,更接近人类肝脏疾病生理过程的模型是深入研究分子机制、

疾病治疗的有力工具。

在肝脏损伤的情况下上皮细胞展现了强大的细胞可塑性,肝细胞和胆管上皮细胞可以互相转换,但是这种转换是直接的转分化还是去分化为双能祖细胞再分化仍然有待研究,同时是否只有胆管上皮细胞和肝细胞特定的某一类群进行转换还有待证明。在疾病损伤的情况下,上皮细胞有多样的细胞来源和动态的细胞命运,至今还未找到肝祖细胞特异标志物。一个问题是尽管曾经有一些标志物比如FOXL1^[56]、LGR5^[57]等被认为是祖细胞标志物,但是它们都不能去标记上所有的肝祖细胞类群,因此新的肝祖细胞标志物的发现会使这个领域取得巨大的进步。另一个亟待解决的问题是:肝祖细胞向肝细胞分化是否可以作为慢性肝疾病的治疗靶点。有一部分慢性肝疾病的患者会发展为终末期肝病和肝癌,而肝祖细胞在其中的作用尚不清楚。如果阐明了细胞命运转换的分子机制,就可以将其用于开发新的药物靶点,肝祖细胞领域的进步可以给慢性肝疾病患者的治疗带来希望。

参考文献 (References)

- [1] STANGER B Z. Cellular homeostasis and repair in the mammalian liver [J]. *Annu Rev Physiol*, 2014, 77: 179-200.
- [2] MACDONALD R A. Lifespan of liver cells: autoradiographic study using tritiated thymidine in normal, cirrhotic, and partially hepatectomized rats [J]. *Arch Intern Med*, 1961, 107: 335-43.
- [3] FAUSTO N, CAMPBELL J S, RIEHLE K J. Liver regeneration [J]. *Hepatology*, 2006, 43(2 Suppl 1): S45-53.
- [4] DORDILLO M, EVANS T, GOUON-EVANS V. Orchestrating liver development [J]. *Development*, 2015, 142(12): 2094-108.
- [5] KOPP J L, GROMPE M, SANDER M. Stem cells versus plasticity in liver and pancreas regeneration [J]. *Nat Cell Biol*, 2016, 18(3): 238-45.
- [6] MIYAJIMA A, TANAKA M, ITOH T. Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(5): 561-74.
- [7] FARBER E. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetyl-amino-fluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene [J]. *Cancer Res*, 1956, 16(2): 142-8.
- [8] MALCOLM, ALISON, MATTHEW, et al. Wholesale hepatocytic differentiation in the rat from ductular oval cells, the progeny of biliary stem cells [J]. *J Hepatol*, 1997, 26(2): 343-52.
- [9] KAMIYA A, KAKINUMA S, YAMAZAKI Y, et al. Enrichment and clonal culture of progenitor cells during mouse postnatal liver development in mice [J]. *Gastroenterology*, 2009, 137(3): 1114-26, e1-14.
- [10] OKABE M, TSUKAHARA Y, TANAKA M, et al. Potential hepatic stem cells reside in EpCAM⁺ cells of normal and injured

- mouse liver [J]. *Development*, 2009, 136(11): 1951-60.
- [11] DORRELL C, ERKER L, SCHUG J, et al. Prospective isolation of a bipotential clonogenic liver progenitor cell in adult mice [J]. *Genes Dev*, 2011, 25(11): 1193-203.
- [12] TANIMIZU N, KOBAYASHI S, ICHINOHE N, et al. Downregulation of miR122 by grainyhead-like 2 restricts the hepatocytic differentiation potential of adult liver progenitor cells [J]. *Development*, 2014, 141(23): 4448-56.
- [13] LI B, DORRELL C, CANADAY P S, et al. Adult mouse liver contains two distinct populations of cholangiocytes [J]. *Stem Cell Rep*, 2017, 9(2): 478-89.
- [14] CAMPAGNOLI C. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow [J]. *Blood*, 2001, 98(8): 2396.
- [15] HERRERA M B, BRUNO S, BUTTIGLIERI S, et al. Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver [J]. *Stem Cells*, 2010, 24(12): 2840-50.
- [16] WANG Y, YU X, CHEN E, et al. Liver-derived human mesenchymal stem cells: a novel therapeutic source for liver diseases [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1): 71.
- [17] KHOLODENKO I V, KURBATOV L K, KHOLODENKO R V, et al. Mesenchymal stem cells in the adult human liver: hype or hope [J]? *Cells*, 2019, 8(10): 1127.
- [18] COLNO S, PERRET C. "Liver zonation" in molecular pathology of liver diseases S. P. S. Monga, Ed [M]. New York: Springer, 2010, 7-16.
- [19] WANG B, ZHAO L, FISH M, et al. Self-renewing diploid Axin2⁺ cells fuel homeostatic renewal of the liver [J]. *Nature*, 2015, 524(7564): 180-5.
- [20] SUN T, PIKIOLEK M, ORSINI V, et al. AXIN2⁺ pericentral hepatocytes have limited contributions to liver homeostasis and regeneration [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 26(1): 97-107.e6.
- [21] ANG C H, HSU S H, GUO F, et al. Lgr5⁺ pericentral hepatocytes are self-maintained in normal liver regeneration and susceptible to hepatocarcinogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(39): 19530-40.
- [22] HAN X, WANG Y, PU W, et al. Lineage tracing reveals the bipotency of sox9⁺ hepatocytes during liver regeneration [J]. *Stem Cell Rep*, 2019, 12(3): 624-38.
- [23] LIN S D, SHENGDA E M, NASCIMENTO C R, et al. Distributed hepatocytes expressing telomerase repopulate the liver in homeostasis and injury [J]. *Nature*, 2018, 556(7700): 244-8.
- [24] PU W, ZHANG H, HUANG X, et al. Mfsd2a⁺ hepatocytes repopulate the liver during injury and regeneration [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13369.
- [25] MATSUMOTO T, WAKEFIELD L, TARLOW B D, et al. *In vivo* lineage tracing of polyploid hepatocytes reveals extensive proliferation during liver regeneration [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(1): 34-47.e3.
- [26] RAVEN A, LU W Y, MAN T Y, et al. Cholangiocytes act as facultative liver stem cells during impaired hepatocyte regeneration [J]. *Nature*, 2018, 555(7696): 402.
- [27] DENG X, ZHANG X, LI W, et al. Chronic liver injury induces conversion of biliary epithelial cells into hepatocytes [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(1): 114-22.e3.
- [28] BÖHM F, KÖHLER U A, SPEICHER T, et al. Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines [J]. *EMBO Mol Med*, 2010, 2(8): 294-305.
- [29] TAUB R. Liver regeneration: from myth to mechanism [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(10): 836-47.
- [30] NEVZOROVA Y A, TOLBA R, TRAUTWEIN C, et al. Partial hepatectomy in mice [J]. *Lab Anim*, 2015, 49(1 Suppl): 81-8.
- [31] MIYAOKA Y, MIYAJIMA A. To divide or not to divide: revisiting liver regeneration [J]. *Cell Div*, 2013, 8(1): 8.
- [32] HIGGINS G M, ANDERSON R M. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal [J]. *Arch Pathol*, 1931, 12: 186-202.
- [33] MICHALOPOULOS G K. Liver regeneration [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 213(2): 286-300.
- [34] HE L, PU W, LIU X, et al. Proliferation tracing reveals regional hepatocyte generation in liver homeostasis and repair [J]. *Science*, 2021, 371(6532): eabc4346.
- [35] PLANAS-PAZ L, ORSINI V, BOULTER L, et al. The RSPO-LGR4/5-ZNRF3/RNF43 module controls liver zonation and size [J]. *Nat Cell Biol*, 2016, 18(5): 467-79.
- [36] BAO Y L, WANG L, PAN H T, et al. Animal and organoid models of liver fibrosis [J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 666138.
- [37] WEBER L, BOLL M, STAMPFL A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model [J]. *Crit Rev Toxicol*, 2003, 33(2): 105-36.
- [38] ZANGAR R C, BENSON J M, BURNETT V L, et al. Cytochrome P4502E1 is the primary enzyme responsible for low-dose carbon tetrachloride metabolism in human liver microsomes [J]. *Chem Biol Interact*, 2000, 125(3): 233-43.
- [39] JUNGEMANN K, KIETZMANN T. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver [J]. *Annu Rev Nutr*, 1996, 16(1): 179-203.
- [40] WEI Y, WANG Y G, JIA Y, et al. Liver homeostasis is maintained by midlobular zone 2 hepatocytes [J]. *Science*, 2021, 371(6532): eabb1625.
- [41] HUNTER A L, HOLSCHER M A, NEAL R A. Thioacetamide-induced hepatic necrosis. I. Involvement of the mixed-function oxidase enzyme system [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1977, 200(2): 439-48.
- [42] MULLER A, MACHNIK F, ZIMMERMANN T, et al. Thioacetamide-induced cirrhosis-like liver lesions in rats: usefulness and reliability of this animal model [J]. *Exp Pathol*, 1988, 34(4): 229-36.
- [43] WALLACE M, HAMESCH K, LUNOVA M, et al. Standard operating procedures in experimental liver research: thioacetamide model in mice and rats [J]. *Lab Anim*, 2015, 49(1 suppl): 21-9.
- [44] GERVASI P G, LONGO V, MARZANO M, et al. Chronic liver injury by thioacetamide and promotion of hepatic carcinogenesis [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1989, 115(1): 29-35.
- [45] LI T, APTE U. Bile acid metabolism and signaling in cholestasis, inflammation, and cancer. *adv pharmacol* [J]. 2015, 74: 263-302.
- [46] CAMERON G R, OAKLEY C L. Ligation of the common bile duct [J]. *J Pathol*, 1932, 35(5): 769-98.
- [47] KOUNTOURAS J. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat [J]. *Br J Exp Pathol*, 1984, 65(3): 305-11.
- [48] DESMOULIÈRE A, DARBY I, COSTA A M, et al. Extracellular matrix deposition, lysyl oxidase expression, and myofibroblastic differentiation during the initial stages of cholestatic fibrosis in

- the rat [J]. *Lab Invest*, 1997, 76(6): 765-78.
- [49] PREISEGGER K H, FACTOR V M, FUCHSBICHLER A, et al. Atypical ductular proliferation and its inhibition by transforming growth factor beta1 in the 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocolidine mouse model for chronic alcoholic liver disease [J]. *Lab Invest*, 1999, 79(2): 103-9.
- [50] FICKERT P, STÖGER U, FUCHSBICHLER A, et al. A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis [J]. *Am J Pathol*, 2007, 171(2): 525-36.
- [51] HUCH M, DORRELL C, BOJ S F, et al. In vitro expansion of single Lgr5⁺ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration [J]. *Nature*, 2013, 494(7436): 247-50.
- [52] YANGER K, ZONG Y, MAGGS L R, et al. Robust cellular reprogramming occurs spontaneously during liver regeneration [J]. *Genes Dev*, 2013, 27(7): 719-24.
- [53] TARLOW B D, PELZ C, NAUGLER W E, et al. Bipotential adult liver progenitors are derived from chronically injured mature hepatocytes [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(5): 605-18.
- [54] BELINSKY S A, BADR M Z, KAUFFMAN F C, et al. Mechanism of hepatotoxicity in periportal regions of the liver lobule due to allyl alcohol: studies on thiols and energy status [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1986, 238(3): 1132-7.
- [55] FENG C, JIMENEZ R J, KHUSHBU S, et al. Broad distribution of hepatocyte proliferation in liver homeostasis and regeneration [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(1): 27-33, e4.
- [56] SHIN S, UPADHYAY N, GREENBAUM L E, et al. Ablation of foxl1-cre-labeled hepatic progenitor cells and their descendants impairs recovery of mice from liver injury [J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(1): 192-202, e3.
- [57] LIN Y, FANG Z P, LIU H J, et al. HGF/R-spondin1 rescues liver dysfunction through the induction of Lgr5⁺ liver stem cells [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1175.