

BMP9通过ALK1/2信号通路诱导肝祖细胞成熟分化的作用研究

刘代江¹ 万晓强¹ 陈佳¹ 李雯¹ 王银光^{2*}

(¹重庆大学附属中心医院(重庆市急救医疗中心)消化内科, 重庆 400010; ²重庆市中医院肛肠科, 重庆 400021)

摘要 该研究探讨了骨形态发生蛋白9(BMP9)通过ALK1/2信号通路诱导肝祖细胞成熟分化的作用。通过腺病毒介导 $siALK1$ 和 $siALK2$ 感染肝祖细胞14-19(hepatic progenitor cell 14-19, HP14-19), Real-time PCR及Western blot分别检测ALK1及ALK2的表达, 荧光素酶报告基因检测 $ALB-Gluc$ 活性, Real-time PCR检测肝脏相关基因 AFP 、 ALB 、 $CK18$ 、 $ApoB$ 的mRNA水平表达, PAS染色和ICG摄取实验检测肝细胞的代谢及糖原合成功能。结果显示, 腺病毒介导的 $siALK1$ 和 $siALK2$ 可特异性抑制HP14-19细胞内ALK1和ALK2的表达, BMP9可诱导HP14-19的成熟分化, 细胞形态呈现多角形铺路石样, $ALB-Gluc$ 读数显著增加, 肝干细胞标志物 AFP 下调, 成熟肝细胞标志物 ALB 、 $CK18$ 及 $ApoB$ 表达显著上调, ICG和PAS染色阳性细胞数增多, Ad- $siALK1$ 和Ad- $siALK2$ 组, 肝细胞标志物表达下降, 解毒代谢及糖原合成能力下降。总之, BMP9可通过ALK1/2信号通路诱导肝祖细胞成熟分化。

关键词 骨形态发生蛋白9; 活化素受体样激酶1/活化素受体样激酶2; 肝祖细胞; 分化

BMP9 Induces Mature Differentiation of Liver Progenitor Cells through ALK1/2 Signaling Pathway

LIU Daijiang¹, WAN Xiaoliang¹, CHEN Jia¹, LI Wen¹, WANG Yinguang^{2*}

(¹Department of Gastroenterology, Chongqing University Central Hospital (Chongqing Emergency Medical Center), Chongqing 400010, China; ²Department of Proctology, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 400021, China)

Abstract This study aimed to investigate the effect of BMP9 (bone morphogenetic protein 9) on induction of mature differentiation of liver progenitor cells through ALK1/ALK2 signaling pathway. HP14-19 (hepatic progenitor cell 14-19) was infected with adenovirus- $siALK1$ and $siALK2$. The expressions of ALK1 and ALK2 are detected by Real-time PCR and Western blot. Relative activity $ALB-Gluc$ was detected by luciferase reporter assay and the mRNA expression of liver related genes AFP , ALB , $CK18$ and $ApoB$ were detected by Real-time PCR. PAS staining and ICG uptake assay were used to detect the metabolism and glycogen synthesis of hepatocytes. The results showed that Ad- $siALK1$ and Ad- $siALK2$ infection could specifically inhibit the expression of ALK1 and ALK2 in HP14-19 cells, and BMP9 could induce the mature differentiation and hepatic function of HP14-19 cells. With BMP9 induction, cell morphology showed polygonal paving stone shape, $ALB-Gluc$ activity was significantly increased, and the expression of liver stem cells marker AFP was down-regulated, while the expressions of hepatic related markers ALB , $CK18$ and $ApoB$ in mature hepato-

收稿日期: 2022-04-02 接受日期: 2022-05-14

重庆市渝中区基础研究与前沿探索项目(批准号: 20210172)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18523972165, E-mail: 924769084@qq.com

Received: April 2, 2022 Accepted: May 14, 2022

This work was supported by the Chongqing Yuzhong District Basic Research and Frontier Exploration Project (Grant No.20210172)

*Corresponding author. Tel: +86-18523972165, E-mail: 924769084@qq.com

cytes were significantly up-regulated, and the number of ICG and PAS staining positive cells increased. In Ad-*siALK1* and Ad-*siALK2* treated groups, the expressions of hepatic mature markers, detoxification metabolism and glycogen synthesis decreased. In conclusion, BMP9 might induce mature differentiation of liver progenitor cells through ALK1/ALK2 signaling.

Keywords bone morphogenetic protein 9; activin receptor-like kinase 1/activin receptor-like kinase 2; hepatic progenitor cell; differentiation

在肝细胞移植技术中, 分化终末期的肝细胞表现出强大的解毒、代谢和合成功能, 但体外扩增效率低。来源于肝脏的肝祖细胞(hepatic progenitor cells, HPCs)是一种双潜能干细胞, 具有自我更新和双向分化潜力, 免疫源性低, 是肝细胞移植的重要种子细胞来源^[1-2]。尽管许多研究报道肝祖细胞在体外和体内都能分化成具有一定功能的肝细胞, 但分化效率还有待进一步提高^[3-4]。因此, 有必要研究稳定、高效的从肝祖细胞中获得成熟肝细胞的技术方案。

骨形态发生蛋白9(bone morphogenetic protein 9, BMP9)是细胞因子转化生长因子- β 家族的成员之一, 是一组具有类似结构的高度保守的功能蛋白, 除了对骨骼的胚胎发育和再生修复起重要作用外, 其功能还延伸到包括肝脏生长、发育过程等多个领域^[5-6]。ALK1/ALK2是BMP9发挥其生物学作用的主要受体, 本文采用胚胎来源的肝祖细胞为研究对象, 通过siRNA抑制ALK1/ALK2的表达, 旨在探讨BMP9诱导肝祖细胞成熟分化的具体分子生物学机制, 为BMP9信号通路对肝脏的发育及肝祖细胞成熟分化影响的研究提供重要的理论基础及实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

小鼠胚胎肝祖细胞14-19(hepatic progenitor cell 14-19, HP14-19)、携带ALB启动子及荧光素酶报告基因(ALB promoter derived luciferase reporter gene, ALB-GLuc)的HP14-19稳定细胞株^[7-8]、腺病毒Ad-GFP(green fluorescent protein)、Ad-RFP(red fluorescent protein)、Ad-BMP9、含有特异性针对mouse ALK1的3组序列的3种Ad-*siALK1*(activin receptor-like kinase 1)腺病毒混合物、含有特异性针对mouse ALK2的3组序列的3种Ad-*siALK2*(activin receptor-like kinase 2)腺病毒混合物由美国芝加哥大学何通川教授馈赠(表1), 于本实验室保存。

DMEM培养基、胎牛血清及胰酶购自Gibco公司。RNA提取试剂盒、蛋白质提取试剂盒、逆转录试剂盒及Real-time PCR试剂盒购自美国Biotek公司。荧光素酶报告基因检测试剂盒、ICG试剂盒、PAS染色试剂盒购自美国Sigma公司。小鼠来源的 β -肌动蛋白(β -actin)一抗、ALK1一抗、ALK2一抗, HRP标记的二抗购自美国Santa Cruz公司。PCR引

表1 siALK序列
Table 1 Sequences of siALK

序列名称 Name of sequence	序列(5'→3') Sequences (5'→3')
Mouse ALK1 siRNA site-1 top	TGG TAG AGT GTG TGG GAA A
Mouse ALK1 siRNA site-1 bottom	TTT CCC ACA CAC TCT ACC A
Mouse ALK1 siRNA site-2 top	CAG GAG AAG CAG CGG GAT T
Mouse ALK1 siRNA site-2 bottom	AAT CCC GCT GCT TCT CCT G
Mouse ALK1 siRNA site-3 top	CCA GAG AAG CCC AAA GTG A
Mouse ALK1 siRNA site-3 bottom	TCA CTT TGG GCT TCT CTG G
Mouse ALK2 siRNA site-1 top	GAG CAA TGG TAT AGT GGA A
Mouse ALK2 siRNA site-1 bottom	TTC CAC TAT ACC ATT GCT C
Mouse ALK2 siRNA site-2 top	CGA TAA TTC CCT AGA CAA A
Mouse ALK2 siRNA site-2 bottom	TTT GTC TAG GGA ATT ATC G
Mouse ALK2 siRNA site-3 top	GGG AAG ATG ACG TGT AAG A
Mouse ALK2 siRNA site-3 bottom	TCT TAC ACG TCA TCT TCC C

物由北京六合华大基因科技有限公司合成, 序列见表2。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及实验分组 将HP14-19细胞按适宜细胞密度接种于含10% FBS、100 U/mL青霉素和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的DMEM完全培养液中, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养, 待贴壁生长至细胞融合率达80%~90%, 0.25%胰酶常规胰酶消化后传代。ALK抑制实验分为4组。control组(空白对照组): 不加任何处理; Ad-null组(空载腺病毒组): 空载腺病毒Ad-RFP感染细胞; Ad-*siALK1*组: Ad-*siALK1*感染细胞; Ad-*siALK2*组: Ad-*siALK2*感染细胞; 以上各组分别采用相应病毒感染细胞48 h后更换培养基, 72 h进行检测。细胞分化实验分为5组。control组(空白对照组): 不加任何处理; Ad-null组(空载腺病毒组): 空载腺病毒Ad-GFP+Ad-RFP感染细胞; Ad-BMP9组: Ad-BMP9+Ad-RFP感染细胞; Ad-BMP9+*siALK1*组: Ad-BMP9+Ad-*siALK1*感染细胞; Ad-BMP9+*siALK2*组: Ad-BMP9+Ad-*siALK2*感染细胞; 病毒感染细胞48 h后更换培养基, 不同时间点进行检测。

1.2.2 荧光素酶报告基因检测 ALB-Gluc的表达 复苏携带ALB-GLuc的HP14-19细胞, 传代后按细胞初始密度30%接种于24孔板, 同上分5组处理1、4、7、10天后, 从各孔中取20 μL 培养上清液, 放入1.5 mL EP管中, 加入按Luciferin反应缓冲液:底物=100:1新

鲜配置的荧光素酶反应液10 μL , 迅速吹打混匀, 快速置于单孔荧光检测仪下读数。实验设置3复孔, 并重复3次。

1.2.3 Real-time PCR检测不同基因的mRNA水平的表达 HP14-19按细胞初始密度30%接种于直径6 cm的培养皿或6孔板中, ALK抑制实验分组处理3天后, 细胞分化实验分组处理10天后, 试剂盒提取各组细胞的总mRNA, 逆转录酶合成cDNA模板, Real-time PCR扩增相关基因, 反应体系为: 2 μL cDNA、上下引物各1 μL 、10 μL 2 \times SYBR Green反应液、加水至20 μL ; 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 退火20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸20 s, 共35个循环, 熔解曲线65 $^{\circ}\text{C}$ ~95 $^{\circ}\text{C}$, 每5 s增加0.5 $^{\circ}\text{C}$ 读板。实验重复3次, 设置3复孔, 以磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)为内参, 标化处理数据。

1.2.4 Western blot检测蛋白质水平 ALK抑制实验分组处理3天后提取各组细胞总蛋白, BCA检测蛋白浓度, 保证每孔上样量(每孔20 μg 蛋白)一致, 10% SDS-PAGE电泳120 V/2 h分离蛋白, 80 V/1 h电转移至PVDF膜, 加入封闭液, 室温下作用1 h, TBST洗膜3次, 分别加入小鼠来源的抗ALK1单抗(sc-101556, 1:200)和ALK2单抗(sc-73676, 1:200)一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST洗膜, 加入1:100稀释的HRP标记二抗, 室温孵育1~2 h, TBST洗膜, ECL发光。

1.2.5 ICG摄取实验及PAS染色实验 HP14-19按

表2 引物序列

Table 2 Sequences of primers

序列名称 Name of sequence	序列(5'→3') Sequences (5'→3')
Mouse ALK1 forward	ACC TGG GAC TGG CTG TGA
Mouse ALK1 reverse	GCA GTC TGT GCG GAT GTG
Mouse ALK2 forward	GTG GCT CCG GTC TTC CTT
Mouse ALK2 reverse	AGC GAC ATT TTC GCC TTG
Mouse AFP forward	ACG AGG AAA GCC CCT CAG
Mouse AFP reverse	GCC ATT CCC TCA CCA CAG
Mouse ALB forward	CCA GAC ATT CCC CAA TGC
Mouse ALB reverse	CAA GTT CCG CCC TGT CAT
Mouse CK18 forward	CTG GGC TCT GTG CGA ACT
Mouse CK18 reverse	ACA GAG CCA CCC CAG ACA
Mouse ApoB forward	CAT GTG ATC CCC ACA GCA
Mouse ApoB reverse	TCC CAG GAC CAT GGA AAA
Mouse GAPDH forward	GGC TGC CCA GAA CAT CAT
Mouse GAPDH reverse	CGG ACA CAT TGG GGG TAG

细胞初始密度30%接种于24孔板中, 分组处理10天后进行检测。ICG染色: 吸弃培养基, 加入250 μ L ICG染液(1 g/L, DMEM完全培养基新鲜配置), 37 $^{\circ}$ C 孵育1~2 h, 吸弃染液, PBS洗3次, 显微镜下观察ICG摄取情况, 细胞核绿染为阳性, 更换为DMEM完全培养基, 4~6 h后再次观察。PAS染色: 吸弃培养基, 4%多聚甲醛固定, PBS洗3次, 加入200 μ L高碘酸, 室温孵育5 min, ddH₂O轻轻冲洗2~3 min, 加入200 μ L Schiff染液, 室温孵育15 min, ddH₂O轻轻冲洗2 min, 显微镜下观察并拍照, 胞质红染为PAS染色阳性。

1.2.6 统计学分析 采用SPSS 22.0软件进行统计学分析。数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两两组间比

较采用 t 检验, $P<0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 腺病毒介导ALK1和ALK2表达抑制

腺病毒 Ad-null(Ad-RFP), Ad-*siALK1* 和 Ad-*siALK2* 分别感染HP14-19细胞, 24 h可见红色荧光, 48 h荧光增多达60%~70%(图1)。Real-time PCR及Western blot结果显示, Ad-*siALK1*抑制ALK1的mRNA及蛋白水平的表达, 对ALK2的表达没有影响, Ad-*siALK2*抑制ALK2的mRNA及蛋白水平的表达, 对ALK1的表达没有影响(图2, $P<0.05$)。腺病毒Ad-*siALK1*和Ad-*siALK2*携带特异性针对ALK1和

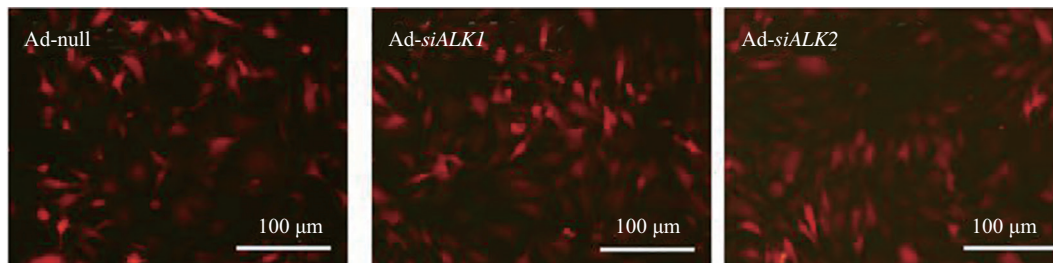
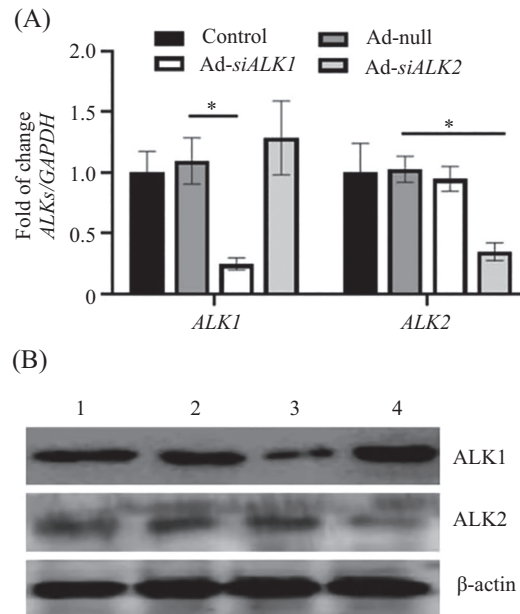


图1 腺病毒Ad-null (Ad-RFP)、Ad-*siALK1*和Ad-*siALK2*分别感染HP14-19细胞

Fig.1 HP14-19 cells were respectively infected with Ad-null (Ad-RFP), Ad-*siALK1* and Ad-*siALK2*



A: Real-time PCR检测各组ALK1和ALK2的表达。 $*P<0.05$, 与Ad-null组比较。B: Western blot检测各组ALK1和ALK2蛋白水平的表达。1: control组; 2: Ad-null组; 3: Ad-*siALK1*组; 4: Ad-*siALK2*组。

A: the mRNA expression of ALK1 and ALK2 were detected by Real-time PCR. $*P<0.05$ compared with Ad-null group. B: the protein expression of ALK1 and ALK2 were detected by Western blot. 1: control group; 2: Ad-null group; 3: Ad-*siALK1* group; 4: Ad-*siALK2* group.

图2 Real-time PCR及Western blot检测ALK1及ALK2的表达

Fig.2 The mRNA and protein expression of ALK1 and ALK2 were detected by Real-time PCR and Western blot

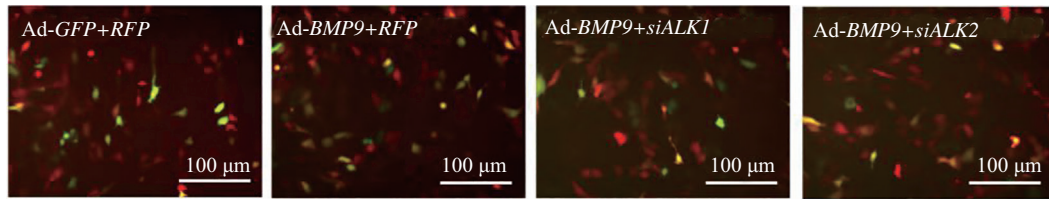
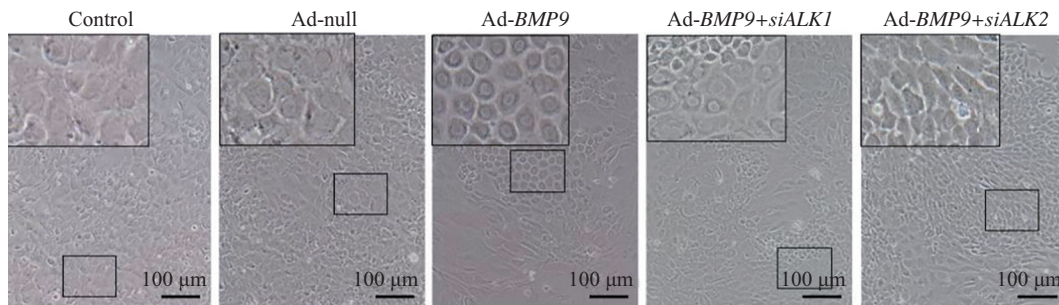


图3 HP14-19细胞分组感染腺病毒Ad-null(Ad-GFP+RFP)、Ad-BMP9+RFP、Ad-BMP9+siALK1、Ad-BMP9+siALK2
Fig.3 HP14-19 cells were respectively infected with Ad-null (Ad-GFP+RFP), Ad-BMP9+RFP, Ad-BMP9+siALK1 and Ad-BMP9+siALK2



小方框中图像放大显示在左上角处。

The image in the small box is enlarged and displayed at the upper left corner.

图4 各组不同的细胞形态

Fig.4 Cell morphology of each group

ALK2的siRNA, 可分别抑制ALK1和ALK2在HP14-19细胞中的表达。

2.2 抑制ALK1/ALK2信号影响BMP9诱导HP14-19的细胞形态

HP14-19细胞分为5组, 其中一组为空白对照组, 再设置4组不同的腺病毒感染组: Ad-null(Ad-GFP+RFP)、Ad-BMP9+RFP、Ad-BMP9+siALK1、Ad-BMP9+siALK2, 24 h可见红色和绿色荧光, 48 h荧光增多达70%~80%(图3)。显微镜下观察各组细胞形态(图4), HP14-19细胞体积较大, 呈多边形或不规则形, 大小不一, 部分细胞可见多个核, 核质比例高。BMP9作用10天后, 细胞体积变小, 排列紧密, 细胞界限清晰, 呈铺路石样聚集生长, 核仁明显。Ad-siALK1组部分细胞形态回复到扁平不规则形, 体积变大, 核质比例降低; Ad-siALK2组较多细胞的上皮样形态丢失, 呈现多角形、长梭性、扁平形、纺锤形等多种形态。

2.3 ALB-Gluc表达及肝细胞相关蛋白的表达情况

ALB-Gluc检测ALB启动子下游的荧光素酶活性表达情况, HP14-19细胞中的ALB-Gluc活性随着培养时间的延长而升高(图5A)。与control组相比, 相同时间点的Ad-BMP组的ALB-Gluc活性显著升

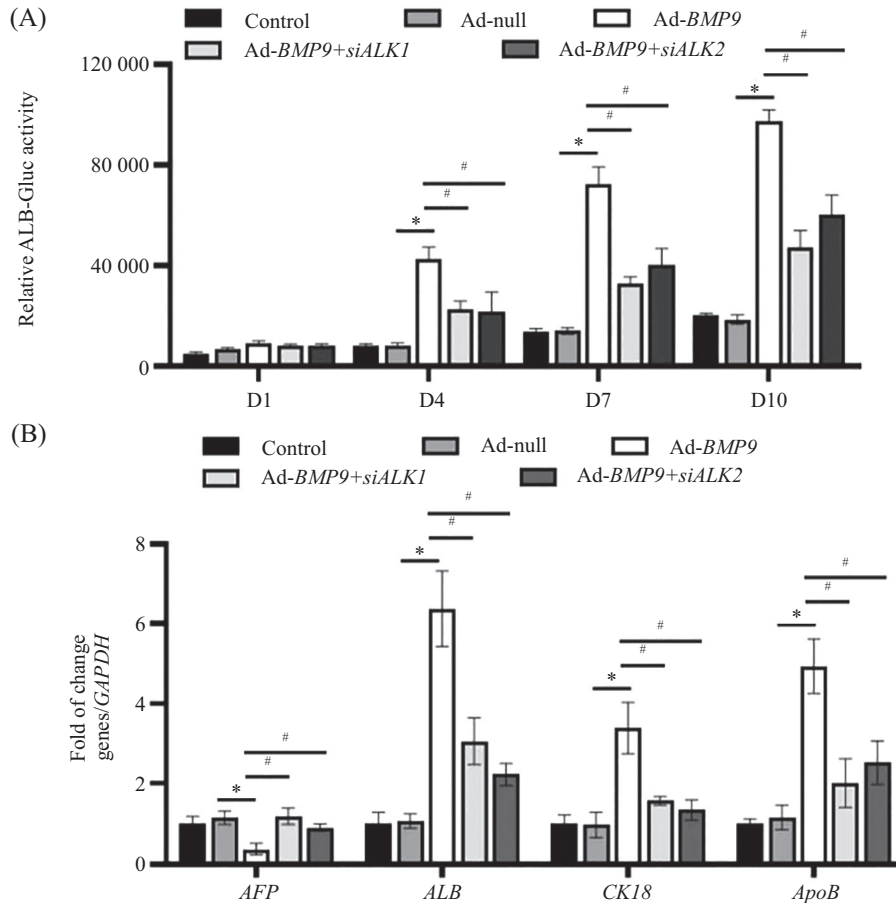
高, 第10天的肝干细胞标志物AFP表达下降, 而成熟肝细胞标志物ALB、CK18、ApoB的mRNA表达水平明显升高。与Ad-BMP组相比, 相同时间点的Ad-BMP9+siALK1组和Ad-BMP9+siALK2组的ALB-Gluc活性降低, 第10天的肝干细胞标志物AFP表达升高, 而成熟肝细胞标志物ALB、CK18、ApoB的mRNA表达水平下降(图5, $P < 0.05$), 但两组之间无统计学差异($P > 0.05$)。

2.4 ICG摄取实验及PAS染色实验结果

ICG摄取释放实验可检测肝细胞的清除和排泄功能, PAS染色可评估成熟肝细胞的糖原合成功能。如图6所示, 对照组和空病毒组的ICG和PAS染色几乎无阳性细胞, Ad-BMP9组ICG摄取和PAS染色阳性细胞均显著增多, 呈聚集状。Ad-BMP9+siALK1组和Ad-BMP9+siALK2组的阳性细胞数均少于Ad-BMP9组, 但多于对照组。以上结果综合显示, BMP9可促进肝祖细胞成熟分化, 抑制ALK1和ALK2的表达可减弱BMP9对肝祖细胞分化的诱导作用。

3 讨论

细胞移植较肝移植和人工肝, 具有细胞来源较广、移植手术简单、术后影响较小等特点, 目前正



A: 各组ALB-Gluc活性的表达; B: 各组肝细胞相关标志物的表达。* $P < 0.05$, 与Ad-null组比较; # $P < 0.05$, 与Ad-BMP9组比较。

A: the luciferase activity of ALB-Gluc in each group; B: the expression of hepatocyte related proteins in each group. * $P < 0.05$ compared with Ad-null group; # $P < 0.05$ compared with Ad-BMP9 group.

图5 ALB-GLuc活性(A)及肝细胞相关标志物的表达(B)

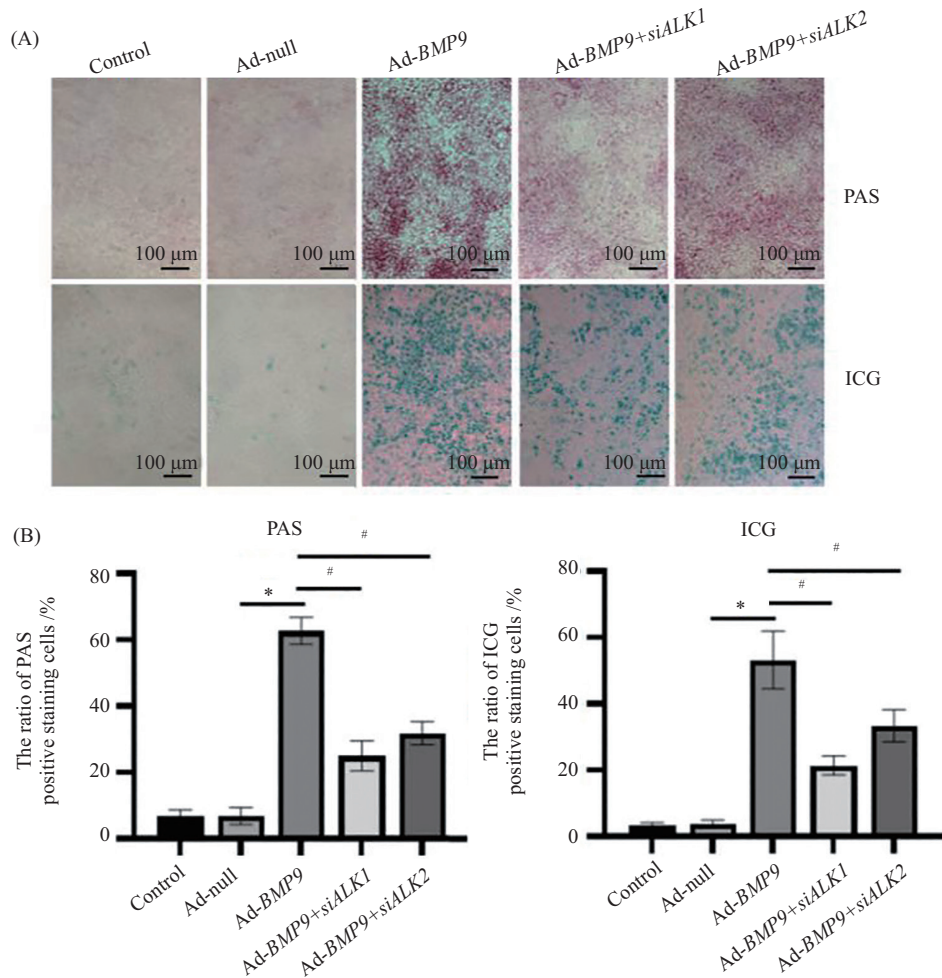
Fig.5 The luciferase activity of ALB-Gluc (A) and the expression of hepatocyte related proteins (B)

发展成为治疗肝衰竭有效可行的方法。骨髓间充质干细胞、造血干细胞、脐血干细胞等干细胞在治疗肝脏疾病方面已有很多的研究,不同来源的干细胞在一定诱导条件下可表达成熟肝细胞标志物,但未能获得较好的肝细胞功能^[9-10]。肝祖细胞是肝组织来源的干细胞,具有自我更新能力及双向分化潜能,可在体外培养和扩增,并诱导分化成为肝细胞和胆管细胞,是肝细胞移植的重要细胞来源^[3-4]。而肝祖细胞的来源、保存、优化使用、诱导分化等影响细胞移植成功的因素也是研究的重点。本研究主要就肝祖细胞诱导分化为有功能的成熟肝细胞的实验方案进行进一步研究。

骨形态发生蛋白BMPs属于转化生长因子- β 家族^[11],是早期肝脏的形成与发育过程中的重要信号分子,涉及肝脏的损伤后修复、组织重建及肝细胞再生等病理生理过程^[12-13]。研究报道的14种BMPs中,

BMP2、BMP9、BMP10对肝祖细胞成熟分化有诱导作用,其中BMP9的诱导作用最强^[14]。BMP9作为前体蛋白(pre-pro-BMP9)在肝组织中特异性表达,发挥调节铁离子平衡、软骨形成、血管生成和糖脂代谢等生理活动的作用^[15]。当BMP9作用于肝星状细胞时,可通过旁分泌作用促进肝实质细胞的再生^[16]。本研究也证实,腺病毒携带的BMP9过表达可有效诱导肝祖细胞分化,促进肝细胞功能的成熟。

分泌型BMPs通过结合跨膜的丝氨酸/苏氨酸激酶受体进行信号转导。目前已报道了5种BMP9膜受体,包括ALK1、ALK2、BMPRII、ActRII-B和共受体endoglin,其中前4种在肝组织中表达。BMPs对受体的结合有所偏好,对ALK1的亲合力最强,ALK2次之^[17-18]。在不同类型细胞中,BMP9对不同受体的亲合力也不尽相同。内皮细胞中,BMP9主要与ALK1和共受体endoglin高亲合力结合;在不表达ALK1的



A: ICG和PAS染色检测各组肝细胞功能; B: ICG和PAS染色的肝细胞阳性率。* $P < 0.05$, 与Ad-null组比较; # $P < 0.05$, 与Ad-BMP9组比较。

A: hepatocyte function in each group was detected by ICG and PAS staining; B: the positive staining hepatocyte ratio of ICG and PAS. * $P < 0.05$ compared with Ad-null group; # $P < 0.05$ compared with Ad-BMP9 group.

图6 ICG和PAS染色检测各组肝细胞功能

Fig.6 Hepatocyte function in each group was detected by PAS staining and ICG uptake assay

肝实质细胞中, BMP9通过与ActRII或ALK2结合发挥其生物学作用^[19-20]。本研究结果显示, 肝祖细胞中ALK2的基础表达较弱, 而ALK1的表达水平高于ALK2, 是肝祖细胞中的优势受体, 这与成熟肝细胞中没有ALK1表达的报道不一致^[21-22], 提示在肝脏发育的不同阶段BMP9信号及其受体表达水平随着肝细胞成熟发生了适应性的变化。腺病毒介导siRNA特异性抑制ALK的表达, 发现ALK1和ALK2抑制组对BMP9诱导的肝细胞特异标志物的表达、肝细胞的代谢解毒和糖原合成能力的影响一致, 组间无显著差异, 与BMP9组相比, ALK2抑制组较ALK1抑制组的细胞形态变化更明显, 出现长梭形、纺锤形等不同细胞形状, ADDANTE等^[23]也报道, BMP9通过TGF- β 及ALK2调控肝脏卵圆细胞的体外生长和细

胞凋亡, 提示ALK2可能是调控肝细胞干性状态的重要分子。

本研究证实了BMP9通过ALK1/ALK2信号通路诱导肝祖细胞成熟分化的作用。鉴于肝祖细胞形态的变化, 在后续的研究中, 我们拟从上皮间质转化的角度, 深入探讨BMP9/ALK信号诱导肝祖细胞成熟分化的具体分子生物学机制, 并重点关注ALK2受体在肝祖细胞与成熟肝细胞中的表达变化。肝祖细胞作为肝细胞移植中的重要种子细胞, 有潜在的应用前景, 本研究为寻找肝祖细胞体外成熟分化的优化方案提供了重要的理论基础和实验依据。

参考文献 (References)

- [1] YAN J, TAI Y, ZHOU H. Culture of mouse liver ductal organoids

- [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2455: 117-29.
- [2] HE Y, ZHOU J W, XU L, et al. Comparison of proliferation and differentiation potential between mouse primary hepatocytes and embryonic hepatic progenitor cells *in vitro* [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32(2): 476-84.
- [3] CHEN Y, ZHOU H, SARVER A L, et al. Hepatic differentiation of liver-derived progenitor cells and their characterization by microRNA analysis [J]. *Liver Transpl*, 2010, 16(9): 1086-97.
- [4] YU B, LI H, CHEN J, et al. Extensively expanded murine-induced hepatic stem cells maintain high-efficient hepatic differentiation potential for repopulation of injured livers [J]. *Liver Int*, 2020, 40(9): 2293-304.
- [5] BHARADWAZ A, JAYASURIYA A C, BHARADWAZ A, et al. Osteogenic differentiation cues of the bone morphogenetic protein-9 (BMP-9) and its recent advances in bone tissue regeneration [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2021, 120: 111748.
- [6] JIANG Q Q, LIU B B, XU K S. New insights into BMP9 signaling in liver diseases [J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(10): 3591-600.
- [7] BI Y, HE Y, HUANG J, et al. Functional characteristics of reversibly immortalized hepatic progenitor cells derived from mouse embryonic liver [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(4): 1318-38.
- [8] 张维玉, 何昀, 毕杨. 稳定表达ALB启动子及荧光素酶报告基因的肝干细胞株的构建[J]. *医学分子生物学杂志*(ZHANG W Y, HE Y, BI Y. Establishment and application of a liver stem cell line with stable expression of functional ALB promoter and luciferase reporter gene [J]. *Journal of Medical Molecular Biology*), 2010, 7(1): 39-44.
- [9] RAJU R, CHAU D, CHO D S, et al. Cell expansion during directed differentiation of stem cells toward the hepatic lineage [J]. *Stem Cells Dev*, 2017, 26(4): 274-84.
- [10] ZHU T, LI Y, GUO Y, et al. The development of stem cell-based treatment for liver failure [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2017, 12(7): 554-63.
- [11] CHEN Y, MA B, WANG X, et al. Potential functions of the bmp family in bone, obesity, and glucose metabolism [J]. *J Diabetes Res*, 2021, 2021: 6707464.
- [12] WU M, CHEN G, LI Y P. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease [J]. *Bone Res*, 2016, 4: 16009.
- [13] LUO K. Signaling cross talk between *tgf-beta*/*smad* and other signaling pathways [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017, 9(1): a022137.
- [14] 陈聪. BMP对小鼠肝干细胞定向分化为肝实质细胞的作用研究[D]. 重庆: 重庆医科大学儿科学院, 2013.
- [15] MOSTAFA S, PAKVASA M, COALSON E, et al. The wonders of BMP9: from mesenchymal stem cell differentiation, angiogenesis, neurogenesis, tumorigenesis, and metabolism to regenerative medicine [J]. *Genes Dis*, 2019, 6(3): 201-23.
- [16] DESROCHES-CASTAN A, TILLET E, RICARD N, et al. Bone morphogenetic protein 9 is a paracrine factor controlling liver sinusoidal endothelial cell fenestration and protecting against hepatic fibrosis [J]. *Hepatology*, 2019, 70(4): 1392-408.
- [17] LI W, SALMON R M, JIANG H, et al. Regulation of the ALK1 ligands, BMP9 and BMP10. [J]. *Biochem Soc Trans*, 2016, 44(4): 1135-41.
- [18] LAWERA A, TONG Z, THORIKAY M, et al. Role of soluble endoglin in BMP9 signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(36): 17800-8.
- [19] ADDANTE A, GONZÁLEZ-CORRALEJO C, RONCERO C, et al. BMP9 promotes an epithelial phenotype and a hepatocyte-like gene expression profile in adult hepatic progenitor cells [J]. *Cells*, 2022, 11(3): 365.
- [20] BI J, GE S. Potential roles of BMP9 in liver fibrosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(11): 20656-67.
- [21] HERRERA B, DOOLEY S, BREITKOPF-HEINLEIN K. Potential roles of bone morphogenetic protein (BMP)-9 in human liver diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(4): 5199-220.
- [22] HERRERA B, VAN DINTHER M, TEN DIJKE P, et al. Autocrine bone morphogenetic protein-9 signals through activin receptor-like kinase-2/*Smad1/Smad4* to promote ovarian cancer cell proliferation [J]. *Cancer Res*, 2009, 69: 9254-62.
- [23] ADDANTE A, RONCERO C, LAZCANOITURBURU N, et al. A signaling crosstalk between BMP9 and *hgf/c-met* regulates mouse adult liver progenitor cell survival [J]. *Cells*, 2020, 9(3): 752.