论著

文章编号:1000-5404(2013)07-0604-05

肝星状细胞具有向肝细胞样细胞分化的干细胞潜能

罗 茜,王 斌,雷增杰,李 青,李 砚,熊 吉,陈潇迪,张霹雳,魏艳玲,王 军,陈东风 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所消化内科)

[摘要] **目的** 探讨肝星状细胞是否能体外诱导分化为肝细胞样细胞以及在这过程中某些干细胞标记物的表达和变化。**方法** 采用标准胶原酶灌注联合 percoll 密度梯度离心法提取并纯化原代大鼠肝星状细胞,免疫荧光鉴定细胞表型;将原代肝星状细胞分为对照组和实验组进行体外培养,对照组肝星状细胞不加任何细胞因子培养 24 h,实验组肝星状细胞加入 bFGF 20 μg/L、FGF_4 20 μg/L、HGF 20 μg/L、IL-6 1 μg/L 细胞因子诱导 7 d;倒置相差显微镜下观察诱导细胞形态的变化,Real-time PCR 和细胞免疫荧光技术检测肝星状细胞诱导前后肝细胞 ALB、AFP mRNA 和蛋白的表达情况,以及诱导前后干细胞标记物 mRNA 和蛋白水平的表达及变化。**结果** ①通过胶原酶灌注联合 percoll 密度梯度离心法获得的大鼠肝星状细胞,其特异性蛋白 Desmin 和 GFAP 表达阳性率≥95%。②实验组大鼠肝星状细胞经过 bFGF、FGF_4、HGF、IL-6 等细胞因子诱导 7 d 后,与对照组细胞相比细胞形态由星形变为类圆形或多角形,转录水平出现肝细胞特异性标记物 ALB 的表达($P<0.01$)和 AFP 的表达($P<0.05$),同时实验组 ALB 和 AFP 蛋白表达呈阳性,而对照组则呈阴性。③实验组大鼠肝星状细胞经过 bFGF、FGF_4、HGF、IL-6 等细胞因子诱导 7 d 后,与对照组相比干细胞标记物 P75NTR 转录水平表达下降($P<0.05$),CD90、c-kit、sox-2、oct-4 等转录水平表达显著下降($P<0.01$),并伴有干细胞标记物蛋白水平的表达下调或无表达。**结论** 初步证明肝星状细胞可能具有潜在的干细胞特性,在体外可诱导分化形成肝细胞样细胞,在诱导过程中肝星状细胞的干细胞标记物明显下调。

[关键词] 肝星状细胞;干细胞;细胞分离;诱导;分化

[中图法分类号] R322.47; R329-33; R392.12 [文献标志码] A

Hepatic stellate cells might possess potential capabilities of stem cells to differentiate into hepatocyte-like cells *in vitro*

Luo Xi, Wang Bin, Lei Zengjie, Li Qing, Li Yan, Xiong Ji, Chen Xiaodi, Zhang Piyun, Wei Yanling, Wang Jun, Chen Dongfeng (Department of Gastroenterology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate whether hepatic stellate cells (HSCs) can differentiate to hepatocyte-like cells *in vitro*, and the expression and changes of some stem cell markers during the induction. **Methods** Primary rat HSCs were isolated by the standard collagenase perfusion and purified by density gradient centrifugation, and then identified with fluorescent immunocytochemistry for Desmin and GFAP. The HSCs were treated with the cytokines as bFGF (20 μg/L), FGF4 (20 μg/L), HGF (20 μg/L) and IL-6 (1 μg/L) for 7 d served as experimental group, while those cultured without any cytokine for 24 h served as control group. The morphological changes of HSCs were examined by inverted phase contrast microscopy, and the hepatocyte-like phenotypes were determined by detecting the mRNA and protein expression of AFP, ALB, and other stem cell markers expression by real time-PCR and immunocytochemical assay. **Results** Our primary culture method obtained a large number of primary rat HSCs, with a positive rate to Desmin and GFAP of over 95%. After a combined induction of bFGF, FGF4, HGF and IL-6 for 7 d, HSCs showed a dramatically increased expression of AFP and ALB ($P<0.05$) at mRNA and protein levels, with the shape changing from star-like to rotund or polygonal. But no such change was found in control cells. The combined induction also resulted in a significant decrease in mRNA expression of p75NTR ($P<0.05$) and CD90, c-kit, sox-2 and

[基金项目] 重庆市自然科学基金重点项目(CSTC2009BA5060)

[通信作者] 陈东风,电话:(023)68757741,E-mail: chendf1981@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130227.1336.002.html (2013-02-27)

oct-4 ($P<0.01$). The expression of these markers at protein level was also significantly decreased or even undetectable. **Conclusion** HSCs might be of the potential as stem cells to differentiate into hepatocyte-like cells *in vitro*. During the induction, the expression of some stem cell markers is significantly downregulated.

[**Key words**] hepatic stellate cells; stem cells; isolation; induction; differentiation

Supported by the Key Project of Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2009BA5060). Corresponding author: Chen Dongfeng, Tel:86-23-68757741, E-mail: chendf1981@126.com

肝星状细胞(hepatic stellate cell,HSC)又称储脂细胞,最早于19世纪由德国学者Von Kupffer研究发现,主要存在于肝窦周Disse间隙内,储存维生素A以及调控肝窦窦内血压血流。既往学者对肝星状细胞的研究发现,当肝脏受损时,星状细胞通过转分化作用形成肌纤维母细胞,其过度增殖并分泌大量细胞外基质成分在慢性肝病发展过程中与肝纤维化、肝硬化密切相关。但是,目前关于肝星状细胞的胚胎来源方面的研究尚存在争论。文献[1]报道肝星状细胞表达3个不同胚层表面分子标记物以及神经干细胞表面分子GFAP、nestin等,学者们猜想其可能来源于骨髓或胚胎神经嵴[2],然而Cassiman等[3]利用$Wnt1^{Cre}Rosa26$报告基因小鼠追踪神经嵴细胞在胚胎发育中子代的去向否定肝星状细胞来源于神经嵴这一观点。Asahina等[4]根据肝星状细胞的形态学研究表明其可能来源于胚胎早期横膈间质。Yang等[5]利用$GFAP^{Cre}Rosa26$报告基因小鼠研究发现在受损肝脏内肝星状细胞能分化形成肝细胞和胆管细胞,推测其可能是肝内一种类似于卵圆细胞的具有干细胞潜能的干/祖细胞群。本研究通过检测肝星状细胞干细胞标记物P75NTR、CD90、c-kit、sox-2、oct-4等,试图探讨肝星状细胞是否具有潜在干细胞特性,并观察肝星状细胞是否可诱导分化为肝细胞样细胞及其诱导过程中干细胞标记物的表达及变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级SD大鼠12只,雄性,14~16周龄,体质量450~520 g,批号SCXK(军)2007-015,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂和仪器

IMDM培养基、特级胎牛血清、胰蛋白酶、青链霉素混合液、HBSS粉末(Hyclone,美国),Ⅳ型胶原酶(Gibco,美国),Pronase E酶、DNase Ⅰ酶(Roche,美国),percoll(Pharmacia,美国),Trizol试剂盒(天根,中国),RT-PCR试剂盒(Fermantas,美国),一抗兔抗鼠P75NTR、CD90、c-kit、sox-2、oct-4多克隆抗体(Abcam,美国),一抗兔抗鼠ALB、AFP多克隆抗体(博奥森,中国),二抗羊抗兔FITC(博奥森,中国),ST-40R冷冻离心机(Thermo,美国),激光共聚焦显微镜(Carl Zeiss,德国),高速冷冻离心机(Eppendorf,德国),荧光定量PCR仪(Bio-rad icycler,美国)。

1.3 原代大鼠肝星状细胞的分离培养及鉴定

SD大鼠用10%的乌来糖麻醉,切开大鼠腹部暴露肝脏并钝性分离门静脉系统,结扎肝固有动脉、胃十二指肠静脉及胆管,24G静脉留置针穿刺门静脉并固定,预先推注2 mL肝素钠溶液(25 U/mL),HBSS液灌注肝脏呈土黄色,再依次用0.1% Pronase E酶溶液以及0.05% Ⅳ型胶原酶液灌注,眼科镊撕碎肝组织并剔除Glisson鞘,用0.025% Ⅳ型胶原酶与0.000 4% DNase Ⅰ酶混合液37 ℃水浴摇床孵育,200目细胞筛过滤,500 r/min离心去除肝细胞,1 500 r/min离心获得肝脏间质细胞,以IMDM培养液重悬,离心管内依次加入60%和40% percoll工作液3 mL再加入细胞悬液,以2 500 r/min离心20 min,60%与40% percoll工作液之间淡黄色细胞带即为目的细胞。收集细胞以含20%胎牛血清的IMDM培养基重悬,以2×10^6接种于25 cm^2细胞培养瓶。目的细胞通过免疫细胞化学法鉴定其特异性标记物结蛋白(Desmin)和胶原纤维酸性蛋白(GFAP)。

1.4 诱导肝星状细胞向肝细胞样细胞分化过程中干性标记物的表达及变化

1.4.1 分组及诱导方法 分为对照组和实验组,每组6只大鼠,分别提取肝星状细胞。实验组肝星状细胞诱导方法参照文献[6-8],用含20 μg/L FGF4+20 μg/L bFGF+20 μg/L HGF+1 μg/L IL-6+10% FBS的IMDM培养基培养,以后每隔1天换液,诱导7 d。对照组肝星状细胞用未加任何细胞因子含10% FBS的IMDM培养基培养24 h。

1.4.2 细胞形态的变化 用倒置相差显微镜观察实验组和对照组细胞在体外培养及诱导过程中形态的变化。

1.4.3 肝星状细胞诱导分化为肝细胞样细胞

1.4.3.1 Real-time PCR检测肝细胞特异性标记物 检测实验组和对照组肝细胞标记物ALB、AFP诱导前后的表达及变化,检索GenBank中基因序列,ALB正义链:5′-CTTCCTGGGC-AAGGAGGAC-3′,反义链:5′-CGTTTGATCCAAAGTTTCAGCTC-3′,扩增长度144 bp;AFP正义链:5′-CTTCCCTCATCCTCCTGC-TAC-3′,反义链:5′-ACAAACTGGGTAAAGGTGATGG-3′,扩增长度145 bp。引物由北京迪纳兴科生物科技有限公司合成。分别收集对照组和实验组细胞用Trizol法提取总RNA,以RNA为模板逆转录合成cDNA,再以cDNA为模板进行Real-time PCR扩增。反应体系为:cDNA 1 μL,前后引物各1 μL,Maxima SYBR Green qPCR Master Mix(2×)12.5 μL,Nuclease-free Water 9.5 μL,总共25 μL体系。反应条件:95 ℃ 10 min;95 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 20 s,共60个循环;72 ℃ 10 min。

1.4.3.2 细胞免疫荧光法检测肝细胞特异性标记物 分别收集对照组和实验组细胞爬片,4%多聚甲醛固定10 min,PBS

清洗3遍,每次5 min,0.4% Triton X-100穿孔10 min,PBS清洗3遍,每次5 min,1% BSA溶液封闭30 min,PBS清洗3遍,每次5 min,加入一抗兔抗鼠(ALB 1∶100,AFP 1∶100)孵育,湿盒4 ℃过夜,PBS清洗3遍,每次5 min,加入二抗羊抗兔FITC(1∶100)室温孵育1 h,PBS清洗3遍,每次5 min,DAPI染核5 min,PBS清洗3遍,每次5 min,抗荧光猝灭封片剂封片,激光共聚焦显微镜下观察。

1.4.4 肝星状细胞在诱导分化过程中干细胞标记物的表达及变化

1.4.4.1 Real-time PCR检测肝星状细胞干细胞标记物的表达及变化 检测实验组和对照组肝星状细胞干细胞标记物P75NTR、CD90、c-kit、sox-2、oct-4等诱导前后的表达及变化,检索GenBank中基因序列,设计引物见表1。

表1 P75NTR、CD90、c-kit、sox-2、oct-4的引物序列

基因	引物序列(5′→3′)	扩增长度(bp)
P75NTR	正义链: CAATGTCCACCAGGA AAACGA 反义链: GGAAGTTAGGGGCAAGTCGG	137
CD90	正义链: CAGGCTCCGACTCGCTTTATT 反义链:GTCCCCGATCTTGAAAGGACC	161
c-kit	正义链: GCCACGTCTCAGCCATCTG 反义链:GTCGCCAGCTTCAACTATTAACT	160
sox-2	正义链: GCTCGCAGACCTACATGAAC 反义链:GCCTCGGACTTGACCACAG	109
oct-4	正义链: ACCTGGCTTCAGACTTCGC 反义链:TGAGCCTGGTCCGATTCCA	140

引物由北京迪纳兴科生物科技有限公司合成。分别收集对照组和实验组细胞用Trizol法提取总RNA,以RNA为模板逆转录合成cDNA,再以cDNA为模板进行Real-time PCR扩增。反应体系为:cDNA 1 μL,前后引物各1 μL,Maxima SYBR Green qPCR Master Mix(2×)12.5 μL,Nuclease-free Water 9.5 μL,总共25 μL体系。反应条件:95 ℃ 10 min;95 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 20 s,共60个循环;72 ℃ 10 min。

1.4.4.2 细胞免疫荧光法检测肝星状细胞干细胞标记物的表达及变化 分别收集实验组和对照组细胞爬片,4%多聚甲醛固定15 min,PBS清洗3遍,每次5 min,0.4% Triton X-100穿孔15 min,PBS清洗3遍,每次5 min,1% BSA溶液封闭30 min,PBS清洗3遍,每次5 min,加入一抗兔抗鼠(P75NTR 1∶500,CD90 1∶100,c-kit 1∶200,sox-2 1∶200,oct-4 1∶200)孵育,湿盒4 ℃过夜,PBS清洗3遍,每次5 min,加入二抗羊抗兔FITC/Cy3(1∶100)室温孵育3 h,PBS清洗3遍,每次5 min,DAPI染核8 min,PBS清洗3遍,每次5 min,抗荧光猝灭封片剂封片,激光共聚焦显微镜下观察。

1.5 统计学分析

采用SPSS 20.0统计软件,实验数据组间比较采用配对样本t检验。

2 结果

2.1 肝星状细胞的培养及细胞免疫荧光鉴定

倒置相差显微镜活体细胞观察:新分离的星状细胞呈圆球形,体积较小,细胞质折光性强,悬浮于培养液中,24 h后大部分细胞呈类圆形贴壁,可见细胞质内高折光颗粒。培养7 d后细胞体积明显增大,呈典型星形贴壁,细胞质内含有丰富脂滴呈“花环”状围绕细胞核,并可见细胞呈集落生长,此为活化状态下肝星状细胞形态(图1A)。14 d后成自然活化状态成纤维细胞样。大鼠肝星状细胞免疫荧光FITC染色鉴定,7 d爬片肝星状细胞特异性蛋白表达Desmin和GFAP(图1B、C),阳性细胞数≥95%。

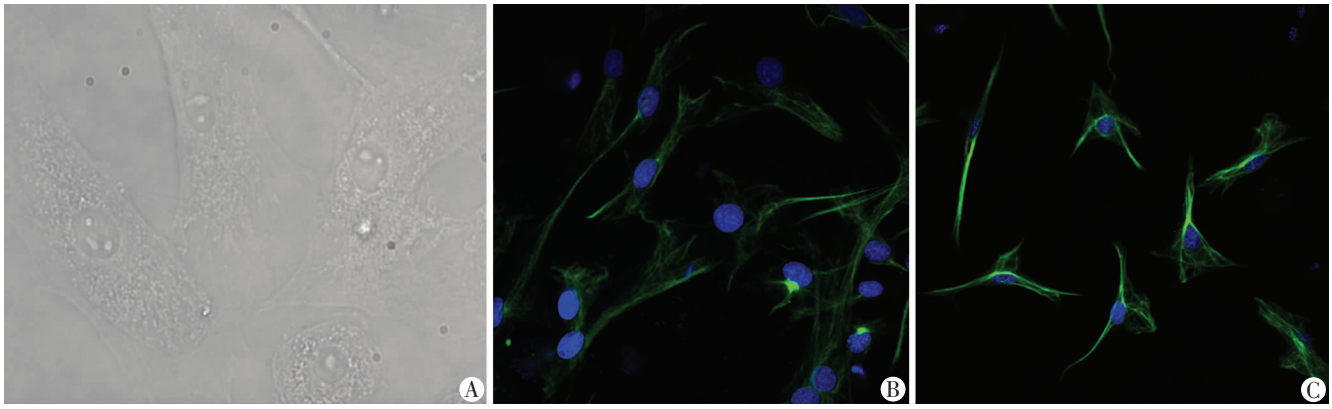
2.2 肝星状细胞诱导后细胞形态的变化

肝星状细胞用bFGF、FGF4、HGF和IL-6等细胞因子联合诱导培养7 d,随着诱导时间的延长,星状细胞由星形逐渐向多角形或类圆形细胞改变,细胞质脂滴含量逐渐减少,核质比增加,其形态类似于培养状态下肝细胞(图2A)。肝星状细胞常规培养7 d后呈特异性星形或纺锤形(图2B)。

2.3 肝星状细胞诱导分化形成肝细胞样细胞

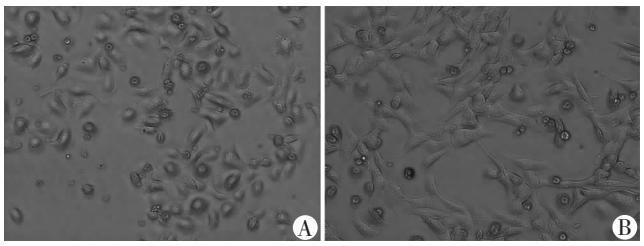
2.3.1 甲胎蛋白与白蛋白mRNA的表达 Real-time PCR结果显示,大鼠肝星状细胞经多种细胞因子诱导7 d后较对照组星状细胞AFP[(1.32±0.25)vs(0.24±0.08),$P<0.05$]、ALB的mRNA表达水平明显上升[(1.43±0.16)vs 0,$P<0.01$]。

2.3.2 甲胎蛋白与白蛋白表达免疫荧光结果 实验组肝星状细胞经过多种细胞因子联合诱导7 d后AFP、ALB免疫荧光染色呈现部分阳性,阳性率约为15%,而对照组呈阴性表达(图3)。



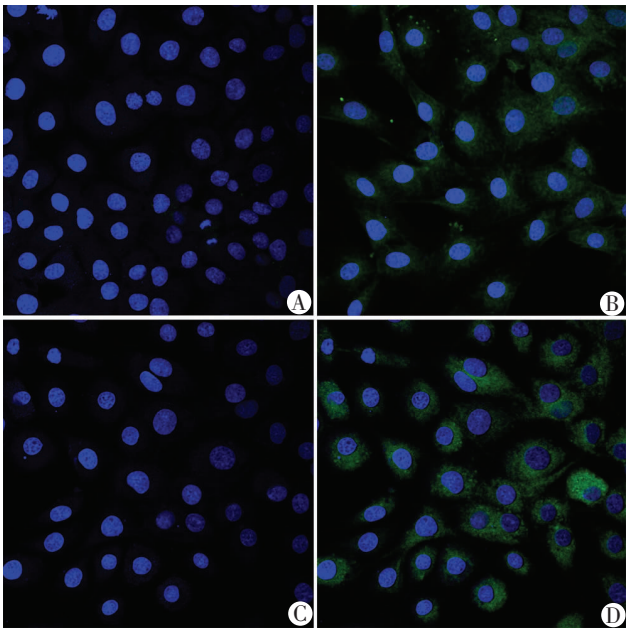
A:倒置相差显微镜; B:激光共聚焦显微镜(Desmin);C: 激光共聚焦显微镜(GFAP)

图1 肝星状细胞的培养及细胞免疫荧光FITC鉴定结果 (×400)



A:诱导培养 7 d; B:常规培养 7 d

图 2 倒置相差显微镜观察大鼠肝星状细胞培养结果 (×100)

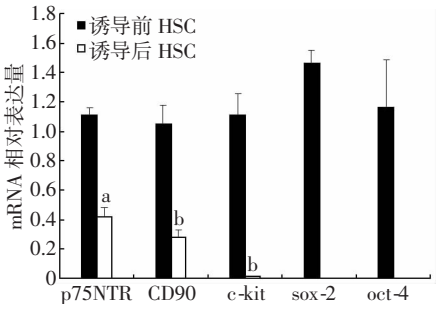


A:对照组 AFP 表达;B:实验组 AFP 表达;C:对照组 ALB 表达;D:实验组 ALB 表达

图 3 免疫荧光观察 2 组肝星状细胞诱导前后 AFP、ALB 表达变化 (×400)

2.4 肝星状细胞向肝细胞样细胞诱导过程中干细胞标记物的表达下调

2.4.1 干细胞标记物 mRNA 水平的表达下调 Real-time PCR 结果显示,对照组肝星状细胞高表达 P75NTR、CD90、c-kit、sox-2、oct-4 干细胞标记物,实验组肝星状细胞经过多种细胞因子联合诱导 7 d 后干细胞标记物 mRNA 水平有所下降,其中 P75NTR 下降较明显($P<0.05$),而 CD90、c-kit、sox-2 和 oct-4 等显著下降($P<0.01$)。见图 4。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与诱导前 HSC 比较

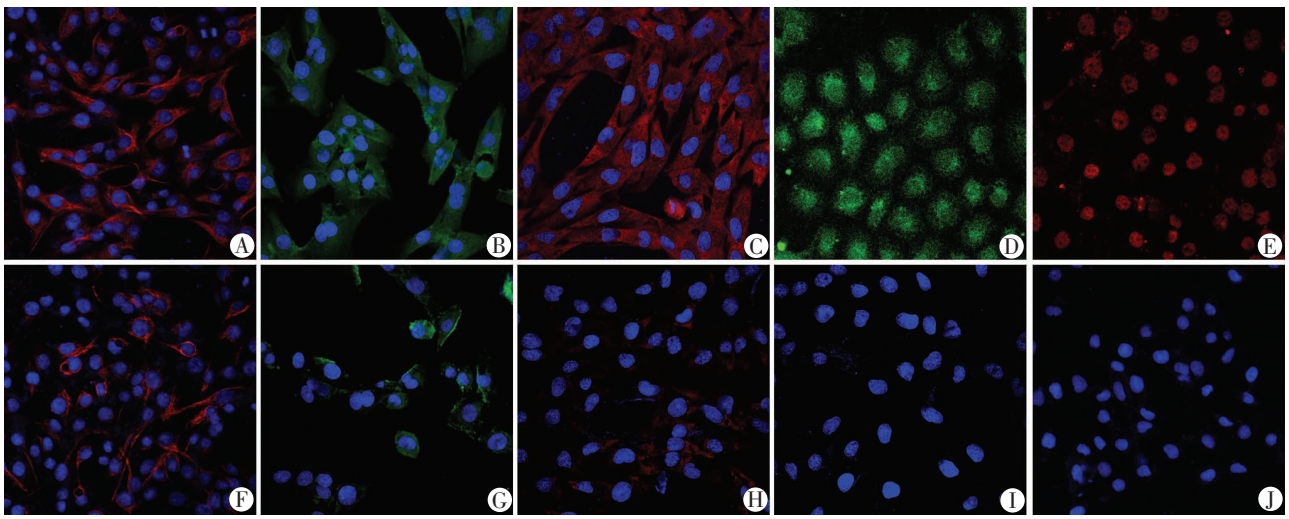
图 4 Real-time PCR 检测肝星状细胞诱导前后干细胞标记物表达变化

2.4.2 干细胞标记物表达下调免疫荧光结果 对照组肝星状细胞 P75NTR、CD90、c-kit、sox-2、oct-4 干细胞标记物呈阳性表达(图 5A ~ E)。实验组肝星状细胞经过诱导分化后干细胞标记物呈部分阳性表达或不表达(图 5F ~ J)。

3 讨论

肝星状细胞是肝脏内具有重要生理病理意义的一类间质细胞,在肝纤维化的发生、发展中起着至关重要的作用[9]。既往研究表明,肝星状细胞在肝再生过程中通过分泌多种细胞因子可调控肝细胞和卵圆细胞等细胞参与受损肝脏的修复[10]。但其更多的研究集中于慢性肝病过程中与肝纤维化及肝硬化的发生发展中的重要作用。近来,Yang 等[5]研究发现肝星状细胞在转基因小鼠体内能分化形成肝细胞和胆管细胞,推测肝星状细胞可能也是肝内一类具有干细胞潜能的细胞群。这一新观点逐渐成为近期学者感兴趣的研究方向。

干细胞是一类具有自我增殖更新和多向分化潜能



A ~ E:P75NTR、CD90、c-kit、sox-2、oct-4 诱导前;F ~ J:P75NTR、CD90、c-kit、sox-2、oct-4 诱导后

图 5 免疫荧光观察肝星状细胞诱导前后干细胞标记物表达 (×400)

的“全能”细胞。目前认为肝脏干细胞主要来源于骨髓造血干细胞以及来源于 Hering 管周围的卵圆细胞[11]。学者们在建立了成熟的肝脏卵圆细胞提取分离技术的基础上,进一步研究发现,在肝损伤模型中,卵圆细胞可增殖分化形成肝细胞和胆管上皮细胞,在肝脏受损后修复再生过程中发挥着重要作用[12-13]。有趣的是陈琳等[14]利用肝星状细胞与肝卵圆细胞共培养体系诱导卵圆细胞分化为成熟肝细胞并有部分卵圆细胞向胆管细胞分化的趋势。该作者认为肝星状细胞可能通过分泌某些因子诱导卵圆细胞向成熟肝细胞分化,但并未关注肝星状细胞本身是否也具有潜在干细胞特性以及定向分化的潜能。

我们分离、提取原代大鼠肝星状细胞,通过细胞免疫荧光染色等方法发现肝星状细胞表达 P75NTR、CD90、c-kit、sox-2、oct-4 干细胞标记物。文献报道 P75NTR 主要表达于神经嵴神经干细胞[15],而 CD90 和 c-kit 主要表达于骨髓造血干细胞系[16],sox-2 和 oct-4 主要作为研究胚胎干细胞的标记物[17]。因此,综合本实验结果,推测肝星状细胞可能是肝脏内一类未分化完全的干/祖细胞群,其在向肝细胞样细胞分化过程中伴有某些干性标志物的下调或丧失。

既然,我们研究发现肝星状细胞具有潜在干细胞特性且体外诱导可分化形成肝细胞样细胞,那么在肝脏损伤再生过程中,其是否还参与形成肝细胞或者胆管细胞等修复受损肝脏呢?本研究与 Yang 等[5]研究结果相印证。目前,有部分文献报道肝窦周 Disse 间隙可能是肝星状细胞的干细胞龛[18],肝星状细胞可能通过 hedgehog、beta-catenin Wnt 以及 Notch 等信号途径维持自身干性和细胞的分化[19-20]。关于肝星状细胞在特定条件下分化参与肝再生修复的分子机制尚不清楚,还有待进一步研究。

既往学者们认为肝星状细胞主要是细胞外基质分泌细胞,与肝纤维化、肝硬化密切相关。本研究发现肝星状细胞表达某些干细胞标记物,并具有诱导后向肝细胞样细胞分化的潜能,初步认为肝星状细胞可能也是肝脏内干细胞的重要组成,在特定条件下可能分化形成肝细胞参与肝脏的修复再生过程。这一新观点丰富了我们以往对肝星状细胞的认识,为我们更全面深入的了解肝星状细胞的生物学功能以及不同条件下其生物学特性的转变的研究奠定了基础。既然肝星状细胞可能具有某些干细胞的特性,我们是否可以通过某些手段干预其定向分化的方向,在慢性肝病中诱导星状细胞定向分化为肝细胞或者胆管细胞参与肝脏的再生修复,进而抑制其活化为肌纤维母细胞所导致的肝内大量细胞外基质的沉积,从而对终末期肝病进行干预或治疗。随着我们对肝星状细胞干细胞特性的深入研究,肝星状细胞将可能成为终末期肝病患者细胞干预治疗的新的细胞靶点。

参考文献:

[1] Tacke F, Weiskirchen R. Update on hepatic stellate cells: pathogenic role in liver fibrosis and novel Isolation techniques[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2012, 6(1): 67-80.

[2] Baba S, Fujii H, Hirose T, *et al*. Commitment of bone marrow cells to hepatic stellate cells in mouse[J]. J Hepatol, 2004, 40(2): 255-260.

[3] Cassiman D, Barlow A, Vander-Borght S, *et al*. Hepatic stellate cells do not derive from the neural crest[J]. J Hepatol, 2006, 44(6): 1098-1104.

[4] Asahina K, Zhou B, Pu W T, *et al*. Septum transversum-derived mesothelium gives rise to hepatic stellate cells and perivascular mesenchymal cells in developing mouse liver[J]. Hepatology, 2011, 53(3): 983-995.

[5] Yang L, Jung Y, Omenetti A, *et al*. Fate-mapping evidence that hepatic stellate cells are epithelial progenitors in adult mouse livers[J]. Stem Cells, 2008, 26(8): 2104-2113.

[6] Zhang Y N, Lie P C, Wei X. Differentiation of mesenchymal stromal cells derived from umbilical cord Wharton's jelly into hepatocyte-like cells[J]. Cytotherapy, 2009, 11(5): 548-558.

[7] 钟晓琳, 万居易, 王忠琼, 等. 淤胆血清及肝细胞生长因子体外诱导 BMSCs 向肝细胞分化[J]. 中国修复重建外科杂志, 2010, 24(3): 344-349.

[8] Alaimo G, Cozzoli E, Marfe G, *et al*. Blood-Derived Stem Cells (BDSCs) plasticity: *In vitro* hepatic differentiation[J]. J Cell Physiol, 2013, 228(6): 1249-1254.

[9] Lee U E, Friedman S L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2011, 25(2): 195-206.

[10] 罗茜, 王军, 陈东风. 肝脏微环境对干细胞的分化调控作用[J]. 肝脏, 2012, 17(5): 347-349.

[11] Zhang L, Ye J S, Decot V, *et al*. Research on stem cells as candidates to be differentiated into hepatocytes[J]. Biomed Mater Eng, 2012, 22(1/3): 105-111.

[12] Tanaka M, Miyajima A. Identification and isolation of adult liver stem/progenitor cells[J]. Methods Mol Biol, 2012, 826: 25-32.

[13] Lowes K N, Croager E J, Olynyk J K, *et al*. Oval cell-mediated liver regeneration: Role of cytokines and growth factors[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2003, 18(1): 4-12.

[14] 陈琳, 陈孝平, 张伟, 等. 肝星状细胞诱导卵圆细胞向成熟肝细胞分化的体外研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2009, 17(10): 765-770.

[15] Hill R P, Gledhill K, Gardner A, *et al*. Generation and characterization of multipotent stem cells from established dermal cultures[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e50742.

[16] Wisniewski D, Affer M, Willshire J, *et al*. Further phenotypic characterization of the primitive lineage- $CD34^+$ $CD38^-$ $CD90^+$ CD45RA-hematopoietic stem cell/progenitor cell sub-population isolated from cord blood, mobilized peripheral blood and patients with chronic myelogenous leukemia[J]. Blood Cancer J, 2011, 1(9): e36.

[17] Chen C Y, Morris Q, Mitchell J A. Enhancer identification in mouse embryonic stem cells using integrative modeling of chromatin and genomic features[J]. BMC Genomics, 2012, 13: 152.

[18] Sawitza L, Kordes C, Reister S, *et al*. The niche of stellate cells within rat liver[J]. Hepatology, 2009, 50(5): 1617-1624.

[19] Kordes C, Sawitza I, Haussinger D. Canonical Wnt signaling maintains the quiescent stage of hepatic stellate cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 367(1): 116-123.

[20] Kordes C, Sawitza I, Haussinger D. Hepatic and pancreatic stellate cells in focus[J]. Biol Chem, 2009, 390(10): 1003-1012.

(**收稿**:2013-01-04;**修回**:2013-02-05)

(编辑 王 红)