

# 肝干细胞的研究进展\*

何祖平 汤越峰 刘亚兵 丰美福\*\*

中国科学院动物研究所生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100080

**摘要** 肝干细胞存在与否的问题已经争论了几十年, 近来的研究证明, 在肝组织中存在肝干细胞. 卵圆形细胞(oval cells)被认为是双潜能的肝干细胞, 它分布于闰管、门管区和胆管树状分支. 骨髓可能是卵圆形细胞的又一来源, 提示肝脏和成年造血之间存在紧密的联系. 肝干细胞体外培养能大量扩增, 并可诱导分化为肝细胞, 这将为肝病的细胞移植、组织工程和基因治疗开辟新的途径. 针对肝干细胞的存在依据、来源、鉴定、体外扩增和诱导分化等方面进行评述, 并对肝干细胞的应用前景和今后的研究方向进行展望.

**关键词** 肝干细胞 来源 鉴定 体外扩增 诱导分化 临床应用

当前, 肝干细胞正成为世界各国尤其是欧美以及日本的研究热点<sup>[1~5]</sup>. 肝干细胞研究热的原因在于肝干细胞移植将是解决供体肝脏严重缺乏的重要途径之一; 另一方面, 自体的肝干细胞移植能有效地避免排斥反应. 此外, 肝干细胞定向诱导分化为肝细胞, 这将为肝细胞移植和生物型人工肝提供无限的细胞来源.

最初, 人们在啮齿类动物的肝组织中发现了卵圆形细胞. Haruna 等<sup>[6]</sup>的工作证实, 人的肝组织中也存在肝干细胞. 由于肝干细胞本身缺乏特异的标记, 给肝干细胞的分离和鉴定带来了困难. Mitaka 和 Crosby 等先后<sup>[7,8]</sup>发现, 肝外来源尤其是骨髓可作为肝干细胞新的来源. Weissman<sup>[9]</sup>指出, 人的干细胞的端粒随着年龄的增长而缩短. 延缓肝干细胞的衰老和凋亡的途径之一是, 将逆转录病毒的基因导入肝干细胞, 使之永生. 我国对肝干细胞的研究起步较晚, 苏娟等<sup>[10]</sup>证实小鼠的胎肝存在肝干细胞, 细胞移植后在脾脏中呈集落样生长. 我们实验室自 1996 年以来从事肝干细胞的研究, 已成功地分离、鉴定、诱导分化和长期培养成年大鼠的肝干细胞<sup>1)</sup>. 在此, 我们根据肝干细胞的最新研究进展, 并结合自己的工作, 讨论肝干细胞的起源、分布、

鉴定、体外扩增及诱导分化, 分析肝干细胞的应用前景和未来的发展方向.

## 1 肝干细胞存在的依据、来源和分布

肝组织中是否存在肝干细胞? 长期以来, 这个问题引起了人们的广泛关注和争论. Wilson 等<sup>[11]</sup>在 1958 年首先提出肝组织中存在干细胞. 这一假说的依据是肝组织因外界因素造成严重肝损伤时仍能再生, 业已存在的肝细胞在严重肝损伤时并不能分裂和再生, 因而, 新的肝细胞应来源于肝干细胞. 肝癌发生机制的研究也支持了这种假说. Fausto 发现<sup>[12]</sup>, 当动物接触化学致癌物时, 最早的细胞反应是位于门管周围的小细胞的增殖, 这种细胞的细胞质少, 具有卵圆形细胞核, 因此, 将其命名为卵圆形细胞. 最具有说服力的例子是, Suzuki 等<sup>[13]</sup>对肝干细胞进行了单细胞克隆和鉴定, 单个细胞体外培养能大量增殖, 细胞移植后在形态上和功能上分化为肝细胞和胆上皮细胞. 按照干细胞的定义, 这种具有强大增殖能力和分化潜能的细胞应该是双潜能的肝干细胞. 令人欣喜的是, 人的肝组织在发育过程中也存在肝干细胞, 其形态与胆管细胞相似, 生化特征类似于人的胎肝细胞<sup>[6]</sup>. Crosby 等<sup>[14]</sup>的实验表明, 人

2002-07-08 收稿, 2002-08-27 收修改稿

\* 国家“八六三”计划(批准号: 2001AA216051)和北京市自然科学基金(批准号: 7022023)资助项目

\*\* 联系人, E-mail: fengmf@panda.ioz.ac.cn

1) 何祖平, 等. 肝细胞生长因子和表皮生长因子诱导大鼠卵圆形细胞分化为成熟肝细胞. 待发表

的肝干细胞样细胞能诱导分化为胆上皮细胞。

另据 Sell<sup>[15]</sup>报道, 肝组织的干细胞包括: (1) 成熟肝细胞. 以前, 人们认为这种肝细胞是终末分化细胞, 事实上, 它们属于单潜能的干细胞, 具有一定的增殖能力. 这种肝细胞在平时处于静止期( $G_0$ 期), 适当的刺激或损伤可引起其激活与增殖<sup>[16,17]</sup>. (2) 双潜能的肝干细胞, 如卵圆形细胞, 其数量比

肝细胞少, 但增殖时间长. (3) 多潜能的干细胞, 其主要来源是骨髓. 多潜能的干细胞数量更少, 而增殖能力更强. 此外, Mitaka<sup>[7]</sup>认为, 肝干细胞在发育过程中, 还可能存在着嗜碱性的小的肝细胞. 如卵圆形细胞在分化过程中首先变成小肝细胞, 然后由小的肝细胞分化为成熟肝细胞. 基于以上假说, 我们绘制了肝细胞世系发生图(图1).

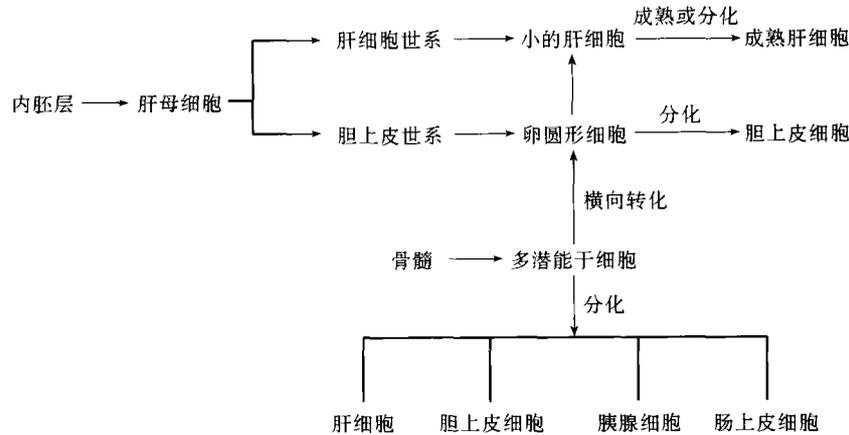


图1 肝细胞世系发生示意图

肝干细胞的来源可能有两种: 其一是肝自身来源的处于休眠期的肝干细胞, 其二是肝外来源的肝干细胞. Petersen 等<sup>[18]</sup>首先证实骨髓可作为卵圆形细胞的来源. 他们将雄鼠的骨髓移植到经致死量放射线照射的同系雌鼠, 发现从雌鼠血液分离的卵圆形细胞可分化为肝细胞, 部分肝细胞含有 Y 染色体, 表明这些肝细胞并非来源于雌鼠自身的肝组织, 应该来源于雄鼠的骨髓. Avital 等<sup>[19]</sup>从大鼠的骨髓分离出 Thy1 抗体(造血干细胞的一种表面标记物)阳性的细胞, 将这种细胞移植到大鼠的肝脏, 它们能整合成肝板, 并分化为成熟的肝细胞. Theise 等<sup>[20]</sup>报道, 从人的骨髓分离出的细胞也能分化为肝细胞. 这些结果为骨髓作为肝干细胞的又一来源提供了重要佐证. 肝干细胞的骨髓来源问题的阐明, 有助于我们通过性别不相匹配的骨髓移植试验, 来解析以前无法回答的一些问题, 如肝干细胞的起源、命运、生理功能等.

卵圆形细胞迄今为止被认为是一种双潜能的肝干细胞, 研究最为广泛, 但卵圆形细胞的具体位置

尚未明确. 目前认为, 卵圆形细胞可能分布于闰管(Herning 氏管)、门管区及管周、肝内的胆管树状分支<sup>[21-23]</sup>. 了解肝干细胞的位置, 有利于人们分离出数量多且活性高的肝干细胞, 以满足实验和临床应用的需要.

## 2 肝干细胞的生物学特性和鉴定

肝干细胞鉴定的理论基础是其生物学特性, 包括细胞的形态与结构特征及生物学表型. 我们实验室采用酶消化和密度梯度离心相结合的分离方法, 从成年大鼠的肝脏收获了  $10^7$  数量级细胞, 透射电镜观察细胞的超微结构有: (1) 细胞很小, 直径  $6\sim 8\ \mu\text{m}$ ; (2) 细胞核呈椭圆形; (3) 细胞质少, 核/质比例大; (4) 胞质内细胞器少, 含少量的线粒体和粗面内质网; (5) 核内有凝聚的染色质<sup>1)</sup>. 细胞的这些特征与 Pack 等<sup>[24]</sup>报道的卵圆形细胞的超微结构相一致. 其中, 卵圆形细胞核是这种细胞的典型结构特征, 而细胞的外形呈卵圆形是其形态特征, 因而, 可依据这些形态与结构特征对卵圆形细胞作出初步的鉴定.

1) 见第 15 页的脚注 1)

由于肝干细胞本身缺乏特异性标记物,人们主要通过肝干细胞的分化潜能对肝干细胞作进一步的鉴定.如双潜能的肝干细胞可分化为肝细胞和胆上皮细胞,它能同时表达肝细胞和胆上皮细胞的标记物,因而,可利用肝细胞和胆上皮细胞的特异性抗体对肝干细胞进行鉴定.Pack等报道<sup>[24]</sup>,细胞角蛋白CK7和CK19为胆上皮细胞的特异性标志,白蛋白(albumin)和肝代谢酶细胞色素P450(如CYP1A2)可作为肝细胞的特异性标记物.甲胎蛋白(AFP)可在胎肝细胞和卵圆形细胞中表达,而在成熟肝细胞中呈阴性反应;细胞角蛋白CK8和CK18是肝上皮细胞的标记,卵圆形细胞和胆上皮细胞也表达这两种抗体<sup>[25]</sup>.OV-6抗体被认为是啮齿类动物卵圆形细胞的特异标志,Heather等<sup>[26]</sup>的实验表明,它在正常人的胎肝和幼儿的肝脏中也有表达.综上所述,我们将卵圆形细胞及其分化产物的标记物概括如表1.

表1 卵圆形细胞及其分化产物的常用标记物

标记物	卵圆形细胞	肝细胞	胆上皮细胞
CK7	+	-	+
CK19	+	-	+
albumin	±	+	-
CYP1A <sub>2</sub>	-	+	-
AFP	+	-	-
CK8	+	+	+
CK18	+	+	+
OV-6	+	-	+

“+”表示为阳性反应;“-”为阴性结果;“±”表示阳性和阴性结果均有

运用上述一些特异性抗体,我们对刚分离的卵圆形细胞进行了流式细胞术鉴定<sup>1)</sup>.结果显示,90%以上的细胞同时表达白蛋白和细胞角蛋白CK19,提示新鲜分离的细胞为双潜能的肝干细胞;少量细胞表达CD34,这与Crosbie等<sup>[27]</sup>报道的成人肝脏中可能存在造血干细胞相一致,表明成年肝脏可能在造血和免疫调节方面有重要作用.这种推论得到了进一步的验证和支持.Golden等<sup>[3]</sup>报道,成人肝脏很可能是自然杀伤细胞(NK细胞)成熟的重要场所.Douagi等<sup>[28]</sup>也从小鼠的肝脏分离出一种新的细胞,这种细胞具有T细胞和NK细胞的双分化潜能,而丧失了体内和体外分化为B细胞和骨髓细胞的能力.结果提示,这些细胞可能是胸腺T/NK细胞的

祖细胞.此外,Karin等<sup>[29]</sup>指出,干细胞因子(SCF)可用来作为鉴定肝干细胞分化与否的重要标志.其原因在于,SCF可影响肝干细胞定向分为各种细胞系的相对频率,一旦肝干细胞分化为成熟肝细胞,SCF的表达就被中止.在我们分离的卵圆形细胞中,95%的细胞共表达SCF和OV-6,表明卵圆形细胞尚处于未分化状态.上述观察结果为成年大鼠肝组织中存在肝干细胞提供了直接的证据.

### 3 肝干细胞的体外培养与扩增

肝干细胞的扩增首先要解决的问题是阻止引起分化的基因的激活,以抑制分化;同时,给予适当的营养物质和生长因子以促进其增殖.Knight等<sup>[30]</sup>发现,肿瘤坏死因子(TNF)受体在卵圆形细胞增殖的过程中上调,TNF 1型受体敲除的小鼠其卵圆形细胞的增殖大大受损,而TNF 2型受体敲除的小鼠其卵圆形细胞的增殖未受影响,由此可见,TNF 1型信号通路对卵圆形细胞的自我更新和增殖有重要作用.

重要的生长因子包括肝细胞生长因子(HGF)、干细胞生长因子(SCF)、表皮生长因子(EGF)和肝刺激因子(HSS).这些生长因子通过不同的作用机理促进肝干细胞的生长或增殖.HGF是强大的促肝细胞分裂剂,在卵圆形细胞增殖过程中,出现HGF的表达上调<sup>[31]</sup>.Fujio等<sup>[32]</sup>的研究表明,SCF可通过自分泌和旁分泌调节,对肝干细胞的生存、增殖、迁移和配子形成起基础性作用.Monga等<sup>[33]</sup>联合应用SCF和HGF,成功地促使肝干细胞在体外大量扩增和富集.EGF是卵圆形细胞的有丝分裂原,它可促进DNA合成和mRNA转录,使细胞S期提前,细胞周期缩短;转化生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ )可诱导卵圆形细胞凋亡.有趣的是,Isort等<sup>[34]</sup>联合应用EGF和TGF- $\beta$ ,卵圆形细胞既不增殖也不凋亡,而出现一种新奇的现象:卵圆形细胞在培养液中散播,并在形态上发生分化.另据Liu等<sup>[35]</sup>报道,HSS可能通过调节EGF受体的表达和信号通路刺激细胞的增殖.

目前常用的分化抑制物有饲养层、条件培养基和分化抑制因子(DIA).饲养层包括原代小鼠胎儿成纤维细胞饲养层(PMET)、Buffalo大鼠肝细胞饲养层(BRL)和已建株的胚胎成纤维细胞(STO)等,其

1) 见第15页的脚注1)

中 PMET 以其易于取材和抑制分化效果好等优点而被广泛采用. 饲养层作用表现在促进细胞增殖和抑制其分化两方面. 前者由于饲养层细胞可合成和分泌成纤维细胞生长因子(FGF)等有丝分裂因子, 后者是因为其分泌白血病抑制因子(LIF), 这些因子通过与细胞表面受体结合而发挥作用. STO 还为肝干细胞的生长提供微环境, 对肝干细胞的自我更新和增殖有重要作用<sup>[36]</sup>. 此外, 条件培养基可能通过肝细胞分泌到培养液中的生长因子刺激肝干细胞的增殖, 也可能通过分泌 DIA 抑制其分化. 应用条件培养基的优点有: (1) 可以消除饲养层细胞的干扰, 得到纯化的肝干细胞; (2) 使肝干细胞免受丝裂霉素 C 致癌剂的影响; (3) 影响因素简单, 可以进一步分析肝干细胞增殖的机制, 找出影响肝干细胞增殖的关键因子, 以便探索肝干细胞的最佳培养条件.

#### 4 肝干细胞的定向诱导分化

肝干细胞不仅能分化为肝细胞和胆上皮细胞, 还能横向转化产生其他组织的细胞, Tatematsu 等<sup>[37]</sup>的结果表明, 肝干细胞可跨胚层分化为肠上皮细胞. 如不添加分化抑制因子和分化诱导剂, 肝干细胞能自发地分化为多种混杂细胞. 另有人认为, 肝细胞癌可能是肝干细胞的异常分化或分化骤停所致<sup>[38, 39]</sup>. 因此, 选择适当的诱导剂, 确保肝干细胞定向分化为人们所需的功能细胞具有重要意义. 据 Germain 等<sup>[40]</sup>报道, 丁酸钠通过抑制肝干细胞 DNA 的合成促进肝干细胞分化为肝细胞. 二甲基亚砷(DMSO)也可诱导肝干细胞分化为肝细胞, 其促分化作用表现在抑制肝非实质细胞的增殖和成纤维细胞的生长<sup>[41]</sup>. 我们在基础培养液中添加 DMSO, 发现卵圆形细胞在分化过程中, 形态变大拉长, 核/质比例变小, 细胞质含有丰富的细胞器; 分化后的细胞形成集落和肝板样结构. 经免疫组织化学和流式细胞术鉴定, 细胞只表达白蛋白和 CYP1A2, 而 CK19 和 CK7 呈阴性反应; 并且, 这些细胞在两周内持续高水平分泌白蛋白<sup>1)</sup>. 上述结果显示, 肝干细胞在形态和功能上已分化为成熟的肝细胞. DMSO 的作用机理可能与 Wnt/ $\beta$ -catenin ( $\beta$ -连环蛋白)通路的下调、纤连蛋白和层粘连蛋白受体的下调有关; 此外, 二甲基亚砷还能诱导细胞周期骤停, 这可以从细胞周期蛋白 I 的上调和细胞周期蛋

白 B1 与 D 的下调反映出来<sup>[42]</sup>.

另一方面, Yin 等<sup>[4]</sup>的结果表明, Matrigel(一种人工构建的基底膜)可诱导肝干细胞分化为胆上皮细胞, 并形成管样结构. Monga 等<sup>[33]</sup>的实验发现, TGF- $\beta$ 可诱导胎肝来源的肝干细胞生成原始胆管(PBD), 而白细胞介素 IL-3 可促进肠上皮细胞的生成; 若在培养体系中添加心肌组织, 则增加红细胞的生成. 这些工作提示, 利用肝干细胞的多向分化潜能和可塑性, 在基础培养液中添加不同的分化剂, 可以诱导肝干细胞分化为不同种类的细胞, 这将为消化系统和循环系统疾病的细胞替代治疗奠定基础. 最近, Suzuki 等<sup>[13]</sup>的体内试验发现, 将肝干细胞移植到胰腺时, 肝干细胞分化为胰腺细胞; 而把肝干细胞移植到十二指肠时, 则分化为肠上皮细胞, 结果表明, 肝干细胞在合适的微环境中能分化为内胚层其他器官的细胞, 这有望给内分泌系统和消化系统等疾病提供新的治疗途径.

#### 5 肝干细胞的应用前景与展望

目前, 生物型人工肝和肝细胞移植的细胞来源主要有: 高度分化的人肝细胞<sup>[43]</sup>; 人肝肿瘤细胞株和动物肝细胞<sup>[44, 45]</sup>. 成人的肝细胞来源困难, 幼肝和胎肝又涉及伦理问题. 人肝肿瘤细胞株在安全上存在隐患, 有病毒感染和致癌的危险. 动物肝细胞不能代替人类血浆白蛋白的合成, 酶的活性有种间的特异性差异, 除了异种生物组织的免疫排斥外, 还可能病毒感染危险和异种移植的伦理问题. 因此, 上述 3 种细胞均不理想. 人肝干细胞体外大量扩增后, 再定向诱导分化为肝细胞, 可为肝病的治疗和组织工程提供重要的细胞来源<sup>[46]</sup>.

肝干细胞有可能先于胚胎干细胞和神经干细胞进入临床应用. Incara 公司的科学家计划 2002 年进行肝干细胞治疗肝损伤病人的临床试验. 目前, 他们成功地将人肝干细胞移植到具有先天免疫缺陷的小鼠体内, 这些细胞可以增殖并分化为成熟肝细胞. 公司打算进一步在成年的慢性肝病患者中检测这些细胞, 研究它们能否行使肝脏功能并作为一个“桥梁”直到肝脏恢复完好.

肝干细胞相对于成熟肝细胞的优势在于: (1) 肝干细胞的捐赠范围更大; (2) 移植的细胞体积较小; (3) 更好的增殖能力; (4) 可以冷冻保存, 具有更多的灵活性. 另一方面, 肝干细胞移植将具有传

1) 见第 15 页的脚注 1)

统肝细胞移植无法比拟的优点：一次性介入，永久性治疗；无需了解疾病的确切机理。

此外，肝干细胞还可使人们追求的基因治疗的夙愿得以实现。这里的基因治疗是指用遗传改造过的肝干细胞直接移植到病人体内，达到控制和治疗各种肝病的目的。遗传改造包括纠正病人中存在的基因突变，如遗传性代谢失调。目前，基因治疗的一大难题是被用做基因修饰的成熟肝细胞在体外不易扩增和传代。肝干细胞具有强大的增殖能力，即使经遗传修饰后仍有可能传代，这将为克服目前基因治疗中存在的主要问题开辟新的途径。

若要将肝干细胞应用于临床治疗，尚有以下问题有待于进一步的研究。(1)人肝干细胞的分离和纯化。虽然人们已经分离了动物的肝干细胞，但要分离出高纯度的人肝干细胞仍属一项艰辛的任务。有效的分离方法之一可能是密度梯度离心和离心淘洗，这种方法能有效地分离啮齿类动物的卵圆形细胞，但它是否适合于分离人的肝干细胞，还有待于人们进一步的探讨和验证。(2)肝干细胞分化机制的阐明，其目的在于诱导肝干细胞形成具有一定解剖结构和功能的肝小叶结构或类肝组织。为了阐明肝干细胞的分化机制，人们可建立新的培养体系，以便自由调控肝干细胞的分化及肝干细胞与其他细胞的相互作用，这种培养体系有助于构建人工肝和肝组织的自体移植。(3)肝干细胞的建系，这是今后研究的重点和难点。与小鼠的肝干细胞相比，人的肝干细胞生长较缓慢，体外培养一段时间后又容易分化，并失去分裂增殖能力。迄今，关于人和鼠的肝干细胞的增殖能力差异的分子机制尚不清楚，这无疑给人肝干细胞的扩增和建系带来更大的困难。近来，Allain等<sup>[1]</sup>将逆转录病毒SV40大T抗原的基因转入灵长类动物胎肝的双潜能肝干细胞，实现了肝干细胞的永生。这些细胞体外培养能无限增殖，并表达CK7，CK19，白蛋白和内源性的端粒酶；经门静脉移植永生化的肝干细胞，它们能整合成肝实质细胞。令人鼓舞的是，这种永生化的肝干细胞无致癌的危险性，细胞移植3周后，只表达白蛋白，而CK19呈阴性反应，结果提示肝干细胞已分化为肝细胞，上述工作将为肝细胞移植和生物型人工肝提供无限的细胞来源。使肝干细胞永生化的另一种新的途径是利用p53基因敲除的动物作为研究对象，p53基因的缺失可允许细胞循环越过正常的海弗利克极限(Hayflick limit)(指细胞生命的自

然极限)。Dumble等<sup>[2]</sup>将小鼠的p53基因敲除，获得了永生化的肝干细胞系，这种细胞系对于研究肝干细胞的分化和肝细胞癌的发生机理有重要意义。值得注意的是，这种永生化的肝干细胞系有致癌的危险性。尽管人们对肝干细胞的研究做了巨大的努力，至今，尚未有人能建立安全可靠、功能完全和永生化的人肝干细胞系(株)，以取代原代的肝细胞。(4)肝干细胞的移植试验和临床应用。移植试验包括肝干细胞的疗效和安全性评价。建议采用裸鼠或犬等动物为实验模型，进行肝干细胞移植。(5)肝干细胞和正常肝细胞以及肝癌细胞的基因表达谱的差异比较。这将有助于阐明肝癌的致病机理，为肝癌的基因治疗带来新的希望。

总之，从肝干细胞存在的假说提出，到肝干细胞的分离与纯化、全面鉴定、体外培养与扩增、定向诱导分化、永生以及临床试验，人们对肝干细胞的认识已经有了长足的进步，但仍存在一些悬而未决的问题，有待人们进一步探索。

**致谢** 香港理工大学的谭薇琦博士对本文提供了热忱的帮助，在此深表谢意！

### 参 考 文 献

- Allain J E, et al. Immortalization of a primate bipotent epithelial liver stem cells. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, 99(6): 3639
- Dumble M L, et al. Generation and characterization of p53 null transformed hepatic progenitor cells: Oval cells give rise to hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, 2002, 23(3): 435
- Golden M L, et al. Having it all? Stem cells, haematopoiesis and lymphopoiesis in adult human liver. *Immunol Cell Biol*, 2002, 80(1): 45
- Yin L, et al. Derivation, characterization, and phenotypic variation of hepatic progenitor cell lines isolated from adult rats. *Hepatology*, 2002, 35(2): 315
- Sell S. The role of progenitor cells in repair of liver injury and in liver transplantation. *Wound Repair Regen*, 2001, (6): 467
- Haruna Y, et al. Identification of biopotential progenitor cells in human liver development. *Hepatology*, 1996, 23: 476
- Mitaka T. Hepatic stem cells: From bone marrow cells to hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 281(1): 1
- Crosby H A, et al. Adult liver stem cells: Bone marrow, blood, or liver derived? *Gut*, 2001, 48(2): 153
- Weissman I L. Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, 2000, 100: 157
- 苏娟, 等. 肝干细胞在小鼠脾脏中集落样生长. *科学通报*, 2001, 46(19): 1625
- Wilson J W, et al. Role of cholangioles in restoration of the liver of

- the mouse after dietary injury. *J Pathol Bacteriol*, 1958, 76: 441
- 12 Fausto N. Oval cells and liver carcinogenesis: An analysis of cell lineages in hepatic tumor using oncogene transfection techniques. *Prog Clin Biol Res*, 1990, 331: 325
  - 13 Suzuki A, et al. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *J Cell Biol*, 2002, 156(1): 173
  - 14 Crosby H A, et al. Human hepatic stem like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium. *Gastroenterology*, 2001, 120: 534
  - 15 Sell S. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology*, 2001, 33: 738
  - 16 Feldmann G. Liver transplantation of hepatic stem cells: Potential use for treating liver diseases. *Cell Biol Toxicology*, 2001, 17(2): 77
  - 17 Zimmermann A. Liver regeneration: The emergence of new pathways. *Med Sci Monit*, 2002, 8(3): 53
  - 18 Petersen B E, et al. Bone marrows a potential source of hepatic oval cells. *Science*, 1999, 284: 1168
  - 19 Avital I, et al. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 288(1): 156
  - 20 Theise N D, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*, 2000, 32: 11
  - 21 Thorgerisson S S, et al. Hepatic stem cells in liver regeneration. *The FASEB Journal*, 1996, 10: 1248
  - 22 Alison M R, et al. Pluripotential liver stem cells: Facultative stem cells located in the biliary tree. *Cell Proliferation*, 1996, 29: 373
  - 23 Alison M R, et al. Update on hepatic stem cells. *Liver*, 2001, 21(6): 367
  - 24 Pack R, et al. Isolation, biochemical characterization, long-term culture, and phenotype modulation of oval cells from carcinogen-fed rats. *Experimental Cell Research*, 1993, 204: 198
  - 25 Marceau N, et al. Cell lineages and differentiation programs in epidermal urothelial and hepatic tissue and their neoplasms. *Lab Invest*, 1990, 63: 4
  - 26 Crosby H A, et al. Immunolocation of OV-6, a putative progenitor cell marker on human fetal and diseased pediatric liver. *Hepatology*, 1998, 28: 980
  - 27 Crosbie O M, et al. *In vitro* evidence for the presence of hematopoietic stem cells in the adult human liver. *Hepatology*, 1999, 29: 1193
  - 28 Douagi I, et al. Identification of the earliest prethymic bipotent T/NK progenitor in murine fetal liver. *Blood*, 2002, 99(2): 463
  - 29 Blakolmer K, et al. Hematopoietic stem cell markers are expressed by ductal plate and bile duct cells in developing human liver. *Hepatology*, 1995, 21: 1510
  - 30 Knight B, et al. Impaired preneoplastic changes and liver tumor formation in tumor necrosis factor receptor type 1 knockout mice. *J Exp Med*, 2000, 192(12): 1809
  - 31 Thorgerisson S S, et al. Hepatic stem cell compartment: Activation and lineage commitment. *Pro Soci Exp Bio Med*, 1993 (204): 253
  - 32 Fujio K, et al. Expression of stem cell factor and its receptor, c-kit, during liver regeneration from putative stem cells in adult rat. *Lab Invest*, 1994, 70: 511
  - 33 Monga S P, et al. Expansion of hepatic and hematopoietic stem cells utilizing mouse embryonic liver explants. *Cell Transplant*, 2001, 10(1): 81
  - 34 Isort R J, et al. The combination of epidermal growth factor and transforming growth factor-beta induces novel phenotypic changes in mouse liver stem cell lines. *J Cell Sci*, 1997, 24: 3117
  - 35 Liu X J, et al. Regulator effect of hepatic stimulator substance on the proliferation of human hepatoma cell. *Acta Physiological Sinica*, 1998, 50: 543
  - 36 Sakamoto T, et al. Concanavalin a simultaneously primes liver hematopoietic and epithelial progenitor cells for parallel expansion during liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Hepatology*, 2000, 32: 256
  - 37 Tatematsu M, et al. Intestinal metaplasia as a common option of oval cells in relation to cholangiofibrosis in liver of rats exposed to 2-acetylaminofluorene. *Lab Invest*, 1985, 52: 354
  - 38 Sell S, et al. Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. *Lab Invest*, 1994, 70 (1): 6
  - 39 Hixson D C, et al. Antigenic phenotypes common to rat oval cells, primary hepatocellular carcinomas and developing bile ducts. *Carcinogenesis*, 1997, 18(6): 1169
  - 40 Germain, L. et al. Promotion of growth and differentiation rat ductal oval cells in primary culture. *Cancer Research*, 1988, 46: 368
  - 41 Lazaro C A, et al. Generation of hepatocytes from oval precursors in culture. *Cancer Research*, 1998, 58: 5514
  - 42 Plescia C, et al. Genomic expression analysis implicates Wnt signaling pathway and extracellular matrix alterations in hepatic specification and differentiation of murine hepatic stem cells. *Differentiation*, 2001, 68: 254
  - 43 Sussman N L, et al. Reversal of fulminant hepatic failure using an extracorporeal liver assist device. *Hepatology*, 1992, 16: 60
  - 44 Nagamori S, et al. Development in bioartificial liver research: Concepts, performance and applications. *Gastroenterology*, 2000, 35: 483
  - 45 Strain A J, et al. A bioartificial liver-state of the art. *Science*, 2002, 295(5557): 1005
  - 46 Faris R A, et al. Liver stem cells: A potential source of hepatocytes for the treatment of human liver disease. *Artif Organs*, 2001, 25(7): 513