

论著 · 基础研究

转化生长因子 β 信号通路对小鼠肝大部分切除术后干细胞介导的肝再生的影响

陈梓昕¹, 金 鑫¹, 万 里¹, 李德卫²

1. 重庆医科大学附属第一医院实验研究中心, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属第一医院肝胆外科, 重庆 400016

[摘要] 目的· 探讨抑制转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β) 通路对小鼠肝大部分切除术 (partial hepatectomy, PH) 后干细胞介导的肝再生过程的影响。**方法**· 取 18 只 C57BL/6 雄性小鼠, 建立小鼠肝大部分切除模型, 监测术前 (PH0)、术后第 1 日 (PH1)、第 3 日 (PH3)、第 7 日 (PH7) 的肝组织中 TGF- β 通路的信号分子, 以及干细胞标志物甲胎蛋白 (α -fetoprotein, AFP) 和富含亮氨酸重复单位的 G 蛋白偶联受体 5 (leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5, LGR5) 的 mRNA 和蛋白表达情况。再取 32 只小鼠, 分为抑制剂组 [PH+SB-431542, 10 mg/(kg·d)] 和对照组 (PH+ 生理盐水), 并于术后第 1 日 (PH1) 和第 3 日 (PH3) 留取肝脏标本, 使用荧光定量 PCR、Western blotting 以及免疫荧光染色检测 TGF- β 通路和干细胞标志物 AFP、LGR5 的变化情况。**结果**· 肝大部分切除术后小鼠肝脏 TGF- β 1 的 mRNA 和蛋白、磷酸化 SMAD2 (p-SMAD2) 蛋白, 以及 *Afp* 的 mRNA 和阳性细胞数量、*Lgr5* 的 mRNA 水平均随时间推移逐渐上调, 至 PH3 达到高峰 (均 $P < 0.05$), 到 PH7 时则恢复至术前水平。与对照组相比, 抑制剂组小鼠 PH3 时的上述指标均被显著抑制 (均 $P < 0.05$)。**结论**· TGF- β 通路可能对小鼠肝大部分切除术后干细胞介导的肝再生起着一定的调控作用。

[关键词] 肝大部分切除术; 转化生长因子 β ; 干细胞; 肝再生; 甲胎蛋白

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.03.007 **[中图分类号]** R333.4 **[文献标志码]** A

Effect of transforming growth factor β signaling on the stem cell-mediated liver regeneration in mice after partial hepatectomy

CHEN Zi-xin¹, JIN Xin¹, WAN Li¹, LI De-wei²

1. Laboratory Research Center, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective**· To explore the effect of inhibiting transforming growth factor β (TGF- β) signaling pathway on the stem cell-mediated liver regeneration in mice after partial hepatectomy (PH). **Methods**· Eighteen C57BL/6 male mice were selected to establish the model of hepatectomy. mRNA and protein levels of the signal molecules in TGF- β pathway, as well as stem cell markers α -fetoprotein (AFP) and leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 (LGR5) in the liver tissues were detected before (PH0) and on the 1st (PH1), 3rd (PH3) and 7th (PH7) day after operation. Then, additional 32 mice were assigned into inhibitor group [PH+SB-431542, 10 mg/(kg·d)] and control group (PH+normal saline). The mice were sacrificed on the 1st (PH1) and 3rd (PH3) day after operation and liver remnants were obtained. Realtime-PCR, Western blotting, and immunofluorescence staining were used to detect the expressing variation of TGF- β signaling pathway, AFP and LGR5. **Results**· The mRNA and protein expression of TGF- β 1, phosphorylated SMAD2 (p-SMAD2) protein, *Afp* mRNA, the number of AFP immune-positive cells and *Lgr5* mRNA were upregulated significantly after PH, peaked at PH3 ($P < 0.05$) and recovered to pre-operative level at PH7. Compared with control group, the above indices were all obviously inhibited in inhibitor group at PH3 ($P < 0.05$). **Conclusion**· TGF- β signaling pathway may regulate the stem cell-mediated liver regeneration in mice after PH.

[Key words] partial hepatectomy (PH); transforming growth factor β (TGF- β); stem cell; liver regeneration; α -fetoprotein (AFP)

肝脏具有很强的再生能力。健康成人 70% 的肝脏切除后, 肝脏功能和肝实质在数周至数月内就能完全恢复; 而在啮齿类哺乳动物的肝再生进展会更迅速, 7~10 d 即可完成肝脏的修复重建^[1]。多数学者认为, 急性肝损伤后

肝细胞受到多种刺激因子的作用, 启动自我复制并增殖, 以此代偿和修复肝功能^[2]。但近年来有研究^[3-7]报道, 在急、慢性肝损伤疾病模型中, 发现多种不同类型的干细胞参与了肝脏的再生修复过程, 而关于该过程动员干细胞机

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (81470898) (National Natural Science Foundation of China, 81470898)。

[作者简介] 陈梓昕 (1992—), 男, 硕士生; 电子信箱: Doctorchenzx@outlook.com。

[通信作者] 李德卫, 电子信箱: lidewei406@sina.com。



制的研究目前鲜有报道。

转化生长因子β (transforming growth factor β, TGF-β) 通路不仅在胚胎生长发育^[8-11]、组织纤维修复^[12]、肿瘤增殖^[13]、血管生成^[14]中起重要作用, 而且本课题组前期研究^[15]发现 TGF-β 通路对胚胎发育过程中的胚胎肝细胞的分化起着关键的调控作用; 对孕鼠注射 TGF-β 通路受体抑制剂后, 可以观察到胚胎肝脏胆管干细胞的标志物下调, 胎肝内胆管的发育受阻。同时, 甲胎蛋白 (α-fetoprotein, AFP) 是经典的肝细胞前体细胞标志物, 广泛参与肝脏的再生过程^[16]; 富含亮氨酸重复单位的 G 蛋白偶联受体 5 (leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5, LGR5) 是来源于胃肠道、毛囊和乳腺的多能干细胞标志物, 近期发现其在 CCl₄ 毒性诱导肝损伤模型的再生过程中大量表达, 并最终分化为肝细胞或者胆管上皮细胞^[17]。所以, 本研究对小鼠采取经典 70% 肝脏切除手术 (partial hepatectomy, PH), 观察 TGF-β 通路及重要干细胞标志物 AFP、LGR5 的变化情况; 再经腹腔注射药物阻断 TGF-β 通路, 检测肝再生过程中干细胞标志物的表达变化, 初步探讨 TGF-β 通路对肝再生过程中干细胞反应的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠, 6~8 周龄, 体质量 (21±3) g, 普通饲料喂养, 由重庆医科大学实验动物中心提供, 自由进饮水, 明暗周期 12 h。本研究已通过重庆医科大学附属第一医院伦理委员会审查, 符合动物伦理学要求。实验动物生产许可证号为 SCXK (渝) 2018-0003, 使用许可证号为 SYXK (渝) 2018-0003。

1.1.2 主要试剂 兔抗小鼠 AFP 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司, 兔抗小鼠 TGF-β1 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司, 兔抗小鼠磷酸化 SMAD2 (p-SMAD2) 单克隆抗体购自美国 CST 公司, 总 RNA 提取试剂 RNAiso Plus、反转录试剂盒、SYBR Green 实时荧光定量 PCR 试剂盒、内参引物购自日本 TaKaRa 公司, TGF-β 受体抑制剂 SB-431542 购自 MCE (中国) 公司。RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂 (PMSF)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。辣根过氧化物酶 (HRP) 标记二抗、正常封闭用山羊血清购自博士德生物工程有限公司。Alexa Fluor 594 山羊抗兔 IgG 荧光二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司, 含 DAPI 抗荧光淬灭剂购自北京索莱宝科技有限公司。冰冻切片包埋剂 OCT 购自美国 SAKURA 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 18 只 C57BL/6 雄性小鼠随机分为 3 组, 每组 6 只, 统一在 14 点至 18 点, 按 Higgins-Anderson 法^[18]对所有小鼠行 70% 肝脏切除术, 留取术中切下的肝脏作为对照组 (PH0), 然后分别于术后第 1 日 (PH1, n=6)、第 3 日 (PH3, n=6)、第 7 日 (PH7, n=6) 采用颈椎脱臼法处死小鼠, 统一将右前叶进行 4% 多聚甲醛固定, 右后叶液氮速冻以备提取 RNA 和蛋白质。

为了研究 TGF-β 通路对小鼠肝大部分切除术后肝再生过程的影响, 将另外 32 只小鼠随机等分为 2 组, 即对照组和抑制剂组, 每组 16 只。2 组均实施 70% 肝大部分切除手术, 抑制剂组于术前 2 h 腹腔注射 TGF-β 受体抑制剂 SB-431542 (10 mg/kg), 并于术后每隔 24 h 再次腹腔注射相同剂量 SB-431542, 对照组则给予等量生理盐水, 分别于术后第 1 日 (PH1, n=8)、第 3 日 (PH3, n=8) 采用颈椎脱臼法处死小鼠, 开腹取出肝脏, 将右前叶进行 4% 多聚甲醛固定, 右后叶液氮速冻保存以备提取 RNA 或者蛋白质。

1.2.2 70% 肝脏切除术 小鼠麻醉后腹部去毛, 沿剑突下、腹中线靠左剪开一道 1.5~2.0 cm 长的切口, 棉签钝性分离出肝左外叶, 于肝叶根部埋入 0-0 手术缝线结扎; 待肝叶淤血, 颜色变成暗红色, 再予以切除; 然后以同样方法结扎并切除 2 片肝中叶, 观察 10 min 无明显活动性出血后, 使用 4-0 手术缝线逐层关腹。术后电热毯复温复苏, 正常进饮水。

1.2.3 荧光定量 PCR 称取 50 mg 肝组织, 根据说明书加入 1 mL RNAiso Plus 进行匀浆提取肝脏总 mRNA, 再按照反转录试剂盒说明书操作生成 cDNA; 反转录条件: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。按照 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书操作, 以 cDNA 为模板。扩增条件: 预变性 95 °C 30 s; 变性 95 °C 5 s, 退火 60 °C 30 s, 延伸 72 °C 30 s, 重复 40 个循环。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Tab 1 Realtime-PCR primer sequences

目的基因	上游序列 (5'→3')	下游序列 (5'→3')
Tgf-β1	TTATGAGAGAAATGCTGGTATGCC	CCTCCCTGTTGGCTGAGTTGT
Afp	GCTACATTCGCTCGTCCA	CGGAACAAACTGGTAAAGGTG
Lgr5	GGATTCCACAGCAACACATCAG	CGAGGCACCATTCAAAGTCAGTG

1.2.4 Western blotting 称取肝组织 20 mg, 加入组织裂解液 (RIPA:PMSF=100:1) 提取组织总蛋白, 使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。各孔道上样 50 μg 蛋白进行 SDS-

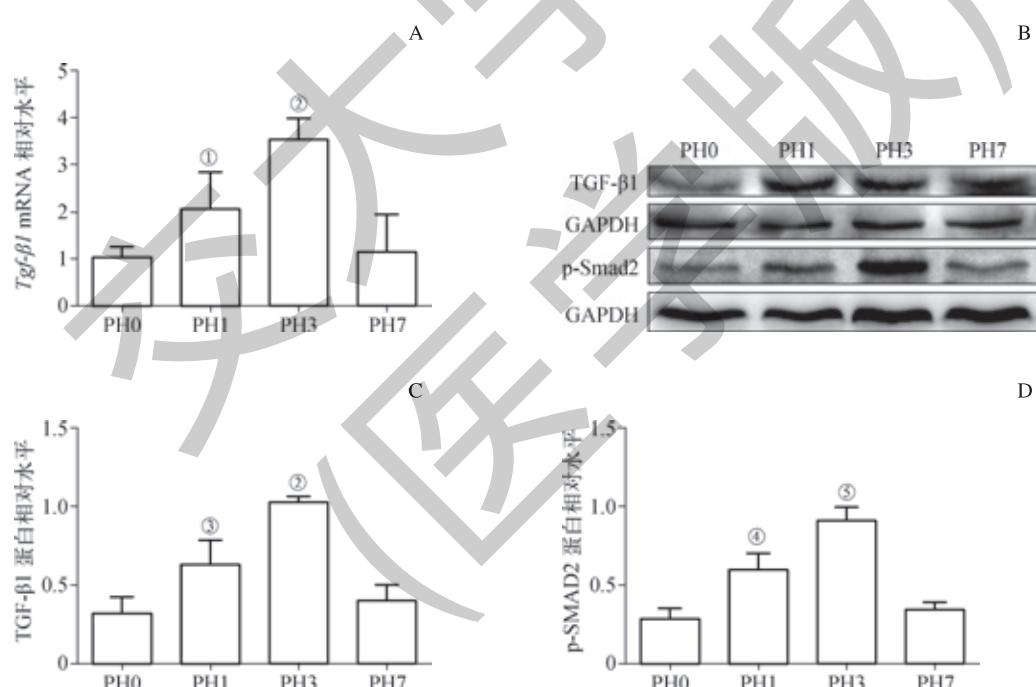


PAGE 电泳, 电转至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭, 4 ℃一抗孵育过夜, 37 ℃二抗孵育 1 h。经化学发光液 (ECL) 和 Fusion 凝胶系统显影, 使用 Image J 软件对蛋白进行相对定量, 目的蛋白灰度值与相应的内参 GAPDH 灰度值相比, 得到目的蛋白相对表达量。

1.2.5 免疫荧光染色 肝组织经 4% 多聚甲醛固定 6 h, 浸入 30% 蔗糖脱水过夜后, OCT 包埋速冻切片, 制成肝组织厚度 8 μm 的冰冻切片, 经 Triton-X100 通透破膜, 山羊血清室温封闭 1 h, 4 ℃一抗孵育过夜, 室温避光孵育荧光二抗 1 h (Alexa Fluor 594 山羊抗兔 IgG 荧光二抗), 最后经含 DAPI 的抗荧光淬灭剂封片, 经激光共聚焦显微镜观察拍照。使用 Image Pro Plus 6.0 对阳性细胞进行计数。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 6.0 软件行统计分析。定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 2 组间均数比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。



注: A. 肝脏 *Tgf-β1* mRNA 的相对表达量; B. TGF-β1、p-SMAD2 的 Western blotting 蛋白条带; C. TGF-β1 蛋白相对定量; D. p-SMAD2 蛋白相对定量。^① $P=0.018$, ^② $P=0.000$, ^③ $P=0.042$, ^④ $P=0.012$, ^⑤ $P=0.001$, 与 PH0 比较。

图 1 小鼠肝大部分切除术后 TGF-β1 及其下游信号分子的表达变化

Fig 1 Change of the expressions of TGF-β1 and its downstream signaling molecule in the mice after PH

2.2 肝大部分切除术后干细胞标志物的表达变化

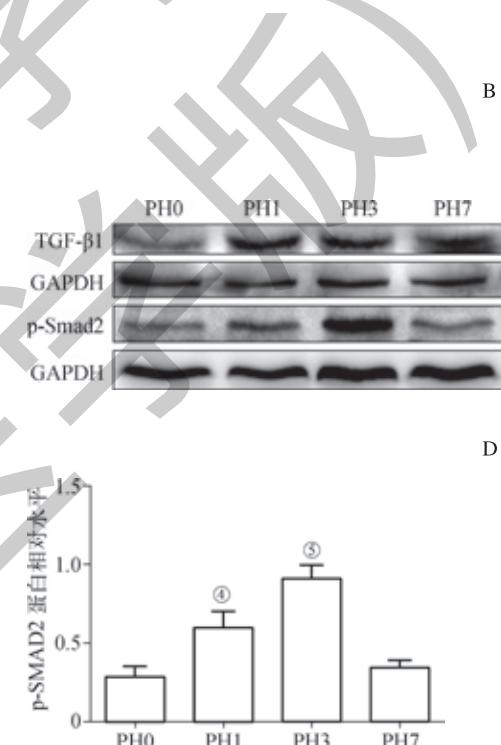
免疫荧光染色结果显示, 与术前水平相比, 干细胞标志物 AFP 阳性细胞数量在 PH1 即开始增加 ($P < 0.05$), 且阳性细胞散在分布于肝实质内; 到 PH3, AFP 阳性细胞

2 结果

2.1 肝大部分切除术后 TGF-β1 及其下游信号分子的表达变化

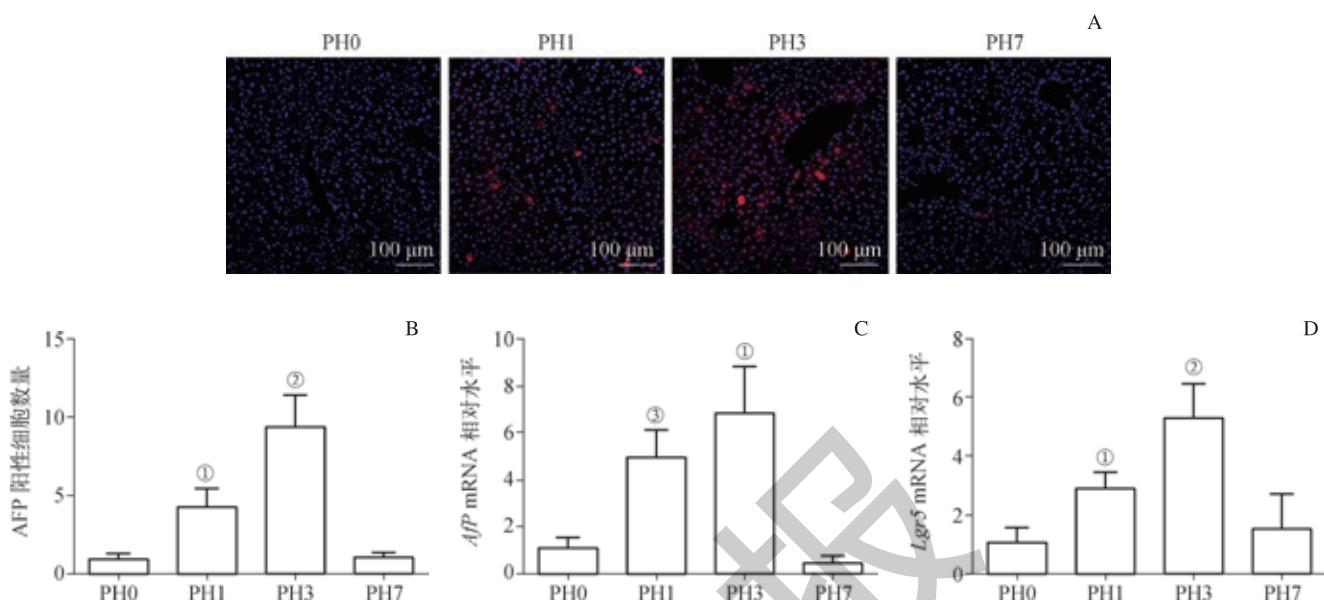
小鼠大部分肝脏切除后, 剩余肝脏内 *Tgf-β1* mRNA 水平随时间有明显变化。在 PH1 和 PH3 *Tgf-β1* mRNA 水平较术前显著增加 (均 $P < 0.05$); 而至 PH7 时, 又降至约术前水平 ($P > 0.05$) (图 1A)。

在 Western blotting 分析中, 可以发现 TGF-β1 蛋白水平的变化与 mRNA 变化基本一致, PH1 时 TGF-β1 蛋白表达水平开始升高 ($P < 0.05$), PH3 达到高峰 ($P < 0.05$), 至 PH7 降低到术前水平 ($P > 0.05$)。同样, 使用 Western blotting 检测 TGF-β1 下游核内转录因子 p-SMAD2 的蛋白水平, 在 PH1 和 PH3 较术前表达水平显著升高 (均 $P < 0.05$), 而随着 TGF-β1 的表达水平下降, 至 PH7 基本恢复到术前水平 ($P > 0.05$) (图 1B)。



聚集在脉管区周围, 并达到高峰 ($P < 0.05$); 最后在 PH7 仅检测到微弱的 AFP 表达 ($P > 0.05$)。同时, 使用荧光定量 PCR 对 *Afp* 及另一重要的多能干细胞标志物 *Lgr5* 的 mRNA 表达水平检测发现, 变化趋势基本一致 (图 2)。





注: A. 肝脏切除术后 AFP 免疫荧光染色共聚焦显微镜拍照结果 ($\times 200$)，AFP 阳性细胞呈红色荧光；B. 免疫荧光染色 AFP 阳性细胞计数；C. *Afp* mRNA 的相对表达量；D. *Lgr5* mRNA 的相对表达量。^① $P=0.001$, ^② $P=0.000$, ^③ $P=0.002$, ^④ $P=0.002$, 与 PH0 比较。

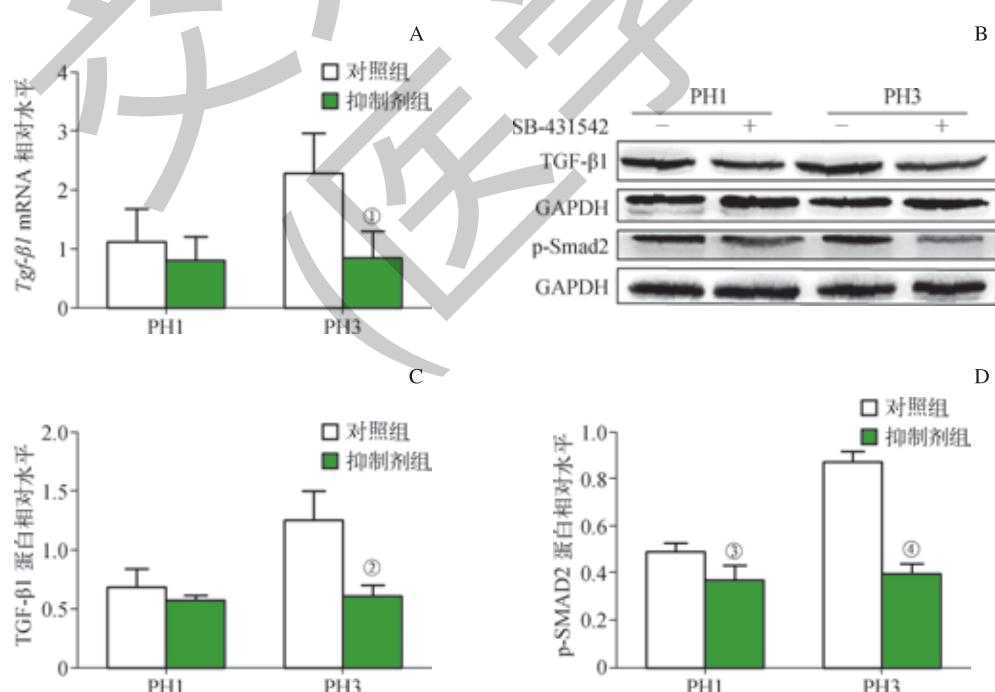
图 2 小鼠肝大部分切除术后干细胞标志物 *Afp* 和 *Lgr5* 的表达变化

Fig 2 Change of the expression of progenitor markers *Afp* and *Lgr5* in the mice after PH

2.3 SB-431542 对肝大部分切除术后 TGF- β 通路的影响

对肝大部分切除小鼠腹腔注射 TGF- β 受体抑制剂 SB-431542 后, 实时荧光定量 PCR 检测 *TGF-β1* mRNA 表达水平。PH1 结果显示, 抑制剂组相比对照组未见明显差异 ($P>0.05$); 至 PH3, 抑制剂组相比对照组 *TGF-β1* mRNA 水平受到显著

抑制 ($P<0.05$)。使用 Western blotting 检测 TGF- $\beta1$ 的蛋白表达, 与 PCR 结果相一致: 在 PH1, 抑制剂组相比对照组未见明显降低 ($P>0.05$), 但到 PH3, 抑制剂组相比对照组显著降低 ($P<0.05$)。而 p-SMAD2 的蛋白水平, 抑制剂组在 PH1 及 PH3 均比对照组显著降低 (均 $P<0.05$) (图 3)。



注: A. 肝脏 *Tgf-β1* mRNA 的相对表达量; B. TGF- $\beta1$ 、p-SMAD2 的 Western blotting 蛋白电泳条带; C. TGF- $\beta1$ 蛋白相对定量; D. p-SMAD2 蛋白相对定量。^① $P=0.002$, ^② $P=0.012$, ^③ $P=0.044$, ^④ $P=0.000$, 与对照组比较。

图 3 SB-431542 对肝大部分切除小鼠 TGF- $\beta1$ 及其下游信号分子的影响

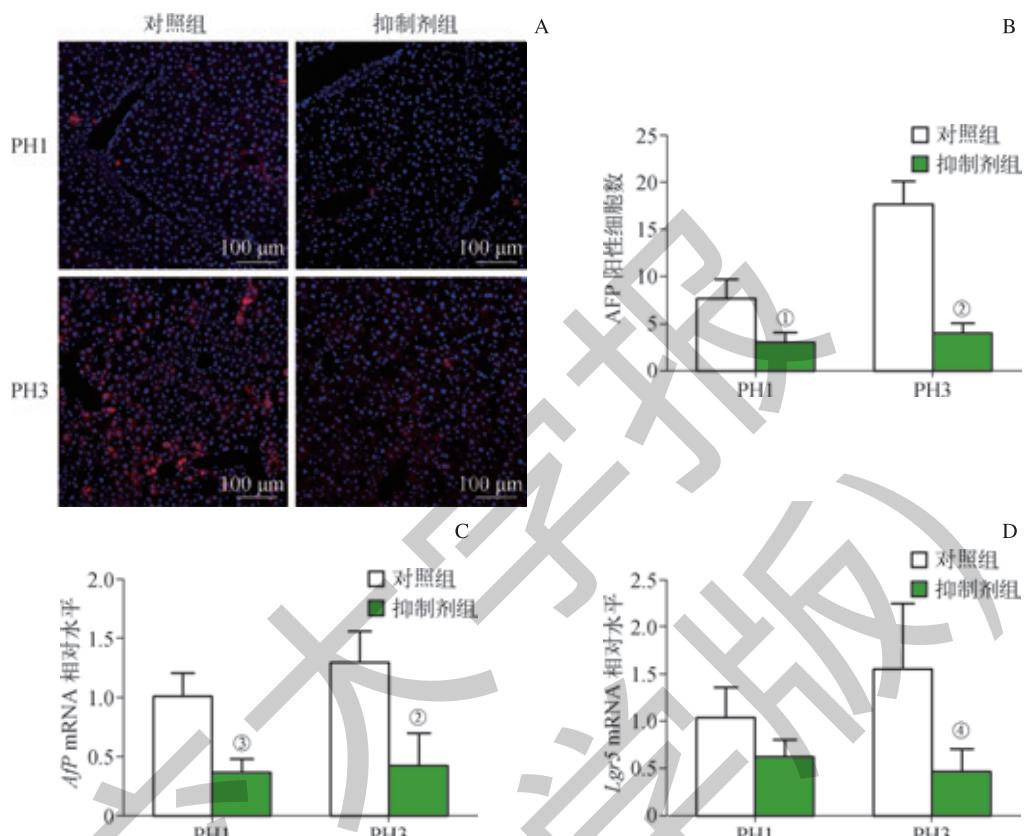
Fig 3 Effects of SB-431542 on TGF- $\beta1$ and its downstream signaling molecule in the mice after PH



2.4 SB-431542 对干细胞标志物表达的影响

对肝大部分切除小鼠行腹腔注射 TGF- β 受体抑制剂 SB-431542 后, 免疫荧光法检测 AFP 阳性细胞, 结果显示, 抑制剂组阳性细胞数量相比对照组在 PH1 和 PH3 均显著减少 (均 $P<0.05$)。使用荧光定量 PCR 检测,

PH1 时, 抑制剂组 *Afp* mRNA 表达比对照组显著降低 ($P<0.05$), 而 *Lgr5* mRNA 表达则与对照组差异无统计学意义 ($P>0.05$); 到 PH3, 抑制剂组 *Afp* 和 *Lgr5* mRNA 表达均比对照组显著降低 (均 $P<0.05$) (图 4)。



注: A. AFP 免疫荧光染色共聚焦显微镜拍照结果 ($\times 200$), AFP 阳性细胞呈红色荧光; B. 免疫荧光染色 AFP 阳性细胞计数; C. *Afp* mRNA 的相对表达量; D. *Lgr5* mRNA 的相对表达量。^① $P=0.025$, ^② $P=0.001$, ^③ $P=0.000$, ^④ $P=0.028$, 与对照组比较。

图 4 SB-431542 对肝大部分切除小鼠干细胞标志物 *Afp* 和 *Lgr5* 表达的影响

Fig 4 Effects of SB-431542 on the expression of progenitor markers *Afp* and *Lgr5* in the mice after PH

3 讨论

广义的肝再生, 即为肝实质大量丢失而启动的肝细胞自我更新复制, 以此补充肝实质, 代偿肝脏功能; 但越来越多的研究^[1,5-6, 19]表明, 干细胞的参与和动员, 在肝再生过程中同样扮演重要的角色。所以, 明确肝再生过程中干细胞的调控机制显得十分重要。本研究发现在小鼠肝大部分切除模型中, TGF- β 通路的激活伴随着干细胞标志物 AFP、LGR5 的上调, 而抑制 TGF- β 通路后, 这些干细胞标志物亦明显下调, 说明 TGF- β 通路在肝再生过程中对干细胞介导的再生反应起着重要的调控作用。

TGF- β 超家族是一类由多种蛋白组成的重要细胞生长因子, 哺乳动物中有 3 种亚型 (TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3), 其中以 TGF- β 1 为主, 其与相应的受体结合, 活化后的

TGF- β 受体 I 或者 II 通过使 SMAD 等蛋白分子磷酸化, 逐级将胞内信号传递至细胞核内, 调控目的基因表达, 掌控着一系列生理过程, 如干细胞多能性、细胞增殖和分化等^[20-21]。TGF- β 通路在肝脏自稳态的维持、肝细胞的终末分化和凋亡中起着重要的作用^[22]。研究^[23]表明, 在肝损伤的病理条件下, TGF- β 1 的表达升高; 而 TGF- β 通路信号对肝脏再生过程起着负性调控的作用, 包括抑制多种生长因子的分泌^[24], 抑制肝细胞有丝分裂及细胞增殖, 并且 TGF- β 与肝再生终止密切相关^[25-26]。而本研究中, 小鼠肝大部分切除后的第 1 日和第 3 日 (即 PH1 和 PH3), TGF- β 1 的 mRNA 和蛋白及 p-SMAD2 的蛋白水平显著升高, 而至 PH7 时已与术前水平相比无显著差异, 这说明在切除后的剩余肝脏内 TGF- β 通路被显著激活, 在肝再生过程中发挥着重要的作用。

越来越多的证据证实多种急、慢性肝损伤或者肝病中

存在广泛的干细胞参与的肝脏再生修复。曾有研究^[27]表明只有抑制肝细胞的自身增殖复制后, 才能动员体内静止的干细胞, 或者根据肝脏损伤的类型、程度而表现出不同的肝再生模式^[28]。前期有研究^[15]报道, 对大鼠施行肝部分切除术后, 利用cDNA原位杂交技术可以观察到再生初期, 肝脏干细胞标志物AFP的mRNA局限在门静脉周围的肝细胞胞核内表达; 随着时间推移, *Afp*mRNA分子广泛表达于肝实质肝细胞胞质内, 但并未在蛋白水平检测到AFP的表达。此外, 有研究^[16]报道, 对CCl₄诱导的小鼠肝损伤模型进行谱系追踪, 发现部分再生的肝细胞和胆管细胞来源于Lgr5⁺细胞, 表明LGR5同样为肝脏再生过程中重要的干细胞标志物。本研究则显示, 小鼠肝大部分切除后, 2个重要的干细胞标志物AFP和LGR5在肝再生初期, 即PH1和PH3显著上调, 而在PH7降低到原始水平; 另外, 本研究发现当抑制TGF- β 通路后, 在PH1和PH3, 抑制剂组相比对照组, 这2种干细胞标志物均被显著抑制, 这也表明TGF- β 通路激活可以调动该过程中干细胞的活化, 从而影响肝脏干细胞参与的再生修复。

TGF- β 通路不仅在肝纤维化、肝再生修复过程中起关键的调控作用, 而且还调控胚胎肝脏的发育和胚胎干细胞的分化^[14], 虽然早期对TGF- β 通路参与肝再生的研究均集中于TGF- β 通路对肝细胞复制的抑制作用, 即对肝再生的负性调控。但本研究着重从干细胞参与肝再生的观点重新出发, 首次发现了TGF- β 通路参与肝再生过程中干细胞反应的调控; 以肝再生过程干细胞的动员为研究点, 我们有理由认为TGF- β 通路的激活反而能促进该过程中干细胞的激活, 从而促进肝脏干细胞参与的再生修复。此观点可从近期的研究^[1,4-5,18-19]中得到支持。

肝再生是受众多通路调控的一系列复杂而精密的过程, 而不是单一通路就能起决定性的调控作用。明确调控肝脏的再生修复机制, 可为临床慢性、急性肝病的治疗提供重要的指导。本研究已经初步证明TGF- β 通路在小鼠大部分肝切除后对干细胞参与的再生修复的调控作用, 而其具体的调控机制、下游作用位点, 以及是否与其他参与肝再生的通路, 如Hedgehog通路、Wnt/ β -连环蛋白通路、Yap-Hippo通路之间存在交互作用还尚待进一步研究。

参·考·文·献

- [1] Thenappan A, Li Y, Kitisin K, et al. Role of transforming growth factor β signaling and expansion of progenitor cells in regenerating liver[J]. Hepatology, 2010, 51(4): 1373-1382.
- [2] Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas[J]. Am J Pathol, 2010, 176(1): 2-13.
- [3] Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells[J]. Hepatology, 2004, 39(6): 1477-1487.
- [4] Duncan AW, Dorrell C, Grompe M. Stem cells and liver regeneration[J]. Gastroenterology, 2009, 137(2): 466-481.
- [5] Swiderska-Syn M, Syn WK, Xie G, et al. Myofibroblastic cells function as progenitors to regenerate murine livers after partial hepatectomy[J]. Gut, 2014, 63(8): 1333-1344.
- [6] Michelotti GA, Xie G, Swiderska M, et al. Smoothened is a master regulator of adult liver repair[J]. J Clin Invest, 2013, 123(6): 2380-2394.
- [7] Huch M, Boj SF, Clevers H. Lgr5⁺ liver stem cells, hepatic organoids and regenerative medicine[J]. Regen Med, 2013, 8(4): 385-387.
- [8] Watabe T, Miyazono K. Roles of TGF- β family signaling in stem cell renewal and differentiation[J]. Cell Res, 2009, 19(1): 103-115.
- [9] Zaret KS. Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons for stem-cell differentiation[J]. Nat Rev Genet, 2008, 9(5): 329-340.
- [10] Haramis AP, Begthel H, van den Born M, et al. *De novo* crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine[J]. Science, 2004, 303(5664): 1684-1686.
- [11] He XC, Zhang J, Tong WG, et al. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt- β -catenin signaling[J]. Nat Genet, 2004, 36(10): 1117-1121.
- [12] Liang R, Šumová B, Cordazzo C, et al. The transcription factor GLI2 as a downstream mediator of transforming growth factor- β -induced fibroblast activation in SSc[J]. Ann Rheum Dis, 2017, 76(4): 756-764.
- [13] Pickup M, Novitskiy S, Moses HL. The roles of TGF β in the tumour microenvironment[J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(11): 788-799.
- [14] Mazzocca A, Fransvea E, Lavezzari G, et al. Inhibition of transforming growth factor β receptor I kinase blocks hepatocellular carcinoma growth through neangiogenesis regulation[J]. Hepatology, 2009, 50(4): 1140-1151.
- [15] Wang W, Feng Y, Aimaiti Y, et al. TGF β signaling controls intrahepatic bile duct development may through regulating the Jagged1-Notch-Sox9 signaling axis[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(8): 5780-5791.
- [16] Bernauau D, Poliard A, Feldmann G. *In situ* cellular analysis of α -fetoprotein gene expression in regenerating rat liver after partial hepatectomy[J]. Hepatology, 1988, 8(5): 997-1005.
- [17] Huch M, Dorrell C, Boj SF, et al. *In vitro* expansion of single Lgr5⁺ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration[J]. Nature, 2013, 494(7436): 247-250.
- [18] Higgins G, Anderson RM. Experimental pathology of the liver[J]. Arch Pathol, 1931, 12: 186-202.
- [19] Ochoa B, Syn WK, Delgado I, et al. Hedgehog signaling is critical for normal liver regeneration after partial hepatectomy in mice[J]. Hepatology, 2010, 51(5): 1712-1723.
- [20] Shi Y. Structural insights on Smad function in TGF β signaling[J]. Bioessays, 2001, 23(3): 223-232.
- [21] Zúñiga JE, Groppe JC, Cui Y, et al. Assembly of T β R I : T β R II : TGF β ternary complex *in vitro* with receptor extracellular domains is cooperative and isoform-dependent[J]. J Mol Biol, 2005, 354(5): 1052-1068.
- [22] Böhm F, Köhler UA, Speicher T, et al. Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines[J]. EMBO Mol Med, 2010, 2(8): 294-305.
- [23] Karkampouna S, Goumans MJ, Ten DP, et al. Inhibition of TGF β type I receptor activity facilitates liver regeneration upon acute CCl₄ intoxication in mice[J]. Arch Toxicol, 2016, 90(2): 347-357.
- [24] Nakamura T, Ueno T, Sakamoto M, et al. Suppression of transforming growth factor- β results in upregulation of transcription of regeneration factors after chronic liver injury[J]. J Hepatol, 2004, 41(6): 974-982.
- [25] Romero-Gallo J, Sozmen EG, Chytil A, et al. Inactivation of TGF- β signaling in hepatocytes results in an increased proliferative response after partial hepatectomy[J]. Oncogene, 2005, 24(18): 3028-3041.
- [26] Oe S, Lemmer ER, Conner EA, et al. Intact signaling by transforming growth factor β is not required for termination of liver regeneration in mice[J]. Hepatology, 2004, 40(5): 1098-1105.
- [27] Chen J, Chen L, Zern MA, et al. The diversity and plasticity of adult hepatic progenitor cells and their niche[J]. Liver Int, 2017, 37(9): 1260-1271.
- [28] Bird TG, Forbes SJ. Two fresh streams to fill the liver's hepatocyte pool[J]. Cell Stem Cell, 2015, 17(4): 377-378.

[收稿日期] 2018-10-15

[本文编辑] 瞿麟平

