

肝星型细胞分离方法和功能研究进展

李严严^{1,2}, 姜颖¹

1 军事医学科学院放射与辐射医学研究所 北京蛋白质组研究中心 蛋白质组学国家重点实验室, 北京 102206

2 清华大学生命科学学院, 北京 100086

李严严, 姜颖. 肝星型细胞分离方法和功能研究进展. 生物工程学报, 2014, 30(7): 1059-1072.

Li YY, Jiang Y. Update on isolation and functional research of hepatic stellate cells. Chin J Biotech, 2014, 30(7): 1059-1072.

摘要: 肝星型细胞 (Hepatic stellate cells, HSCs), 又叫储脂细胞 (Fat-storing cells, FSCs) 或脂肪细胞 (lipocytes), 是肝脏固有的非实质细胞类型之一, 存在于狄氏腔内, 以脂滴的形式储存人体维生素 A 总量的 50%–80%。原代 HSCs 分离方法, 目前主要集中于密度梯度离心法结合离心淘洗、HSCs 高侧向角的流式分选法、紫外激发的自发荧光或特异性抗体标记的流式细胞术等, 将为 HSCs 生理和病理研究提供坚实的基础。近年来, HSCs 的研究蓬勃发展, 合作领域不断拓宽。生理状态下, HSCs 处于静息状态, 合成细胞外基质 (Extracellular matrix, ECM) 并维持其稳态, 同时广泛摄取和储存维生素 A, 并具有调节肝细胞再生的功能; 而病理状态下, HSCs 在肝损伤和持续性刺激条件下被激活, 增殖活性明显增强, 脂滴减少或消失, ECM 合成也明显增加, 具有收缩性, 同时分泌多种促炎因子和粘附分子, 并向肌成纤维细胞转变, 表明 HSCs 的活化是肝纤维化发生发展过程中的关键环节之一。有关 HSCs 的分离和功能研究一直是肝脏细胞学和肝脏病理学研究的热点之一。文中我们将系统总结和探讨 HSCs 的分离方法和改进策略, 及其功能研究进展和具有潜在价值的研究方向。

关键词: 肝星型细胞, 分离方法, 肝脏生理功能, 肝纤维化, 肝再生, 肝脏蛋白质组学

Received: March 22, 2014; **Accepted:** June 4, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81123001).

Corresponding author: Ying Jiang. Tel: +86-10-80705299; E-mail: jiangying304@hotmail.com

国家自然科学基金 (No. 81123001) 资助。

网络出版时间: 2014-06-27

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140174.html>

Update on isolation and functional research of hepatic stellate cells

Yanyan Li^{1,2}, and Ying Jiang¹

1 State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, Beijing Institution of Radiation Medicine, Beijing 102206, China

2 School of Life Science, Tsinghua University, Beijing 100086, China

Abstract: Hepatic stellate cells (HSCs), also called Ito cells or lipocytes, are one of inherent liver nonparenchymal cell types located in the Dissé space between hepatocytes and sinusoidal endothelial cells, and account for up to 50%–80% of vitamin A in the form of lipid drops. The methods of primary HSCs isolation mainly focus on density gradient centrifugation combined with centrifugal elutriation, side scatter-activated cell sorting, UV-excited autofluorescence or antibody-based flow cytometry, etc., and will provide solid foundation for the research on physiological and pathological HSCs function. The research of this vitamin A-storing cells has developed and expanded vigorously. In physiological conditions, HSCs are quiescent and play pivotal roles in the synthesis of extracellular matrix (ECM) to maintain its stability with broad uptake and storage of vitamin A, and also regulate liver regeneration. But in pathological conditions, HSCs are activated by constant stimulations or liver injury, then with activated proliferation, reduced lipid drops, and increased ECM synthesis. Morphology of these cells also changes from the star-shaped stellate cells to that of fibroblasts or myofibroblasts with obvious contractibility and secretion of cytokines and chemokines including a variety of proinflammatory factors and adhesion molecules, suggesting that the activation of HSCs is one of the key events in the development of liver fibrosis. Study on the isolation and function of HSCs is always one of the hot topics for liver biology. In this review, we systematically summarize and discuss the recent advances in our understanding of the isolation methods and improvements of HSCs, and functional research of HSCs biology in health and disease, as well as potential directions.

Keywords: Hepatic stellate cells (HSCs), isolation method, liver physiology, liver fibrosis, liver regeneration, liver proteomics

肝星型细胞 (Hepatic stellate cells, HSCs), 只占正常肝脏总体积的约 1.4%和肝脏总细胞数的 5%–8%, 而且大部分位于肝小叶中心位置, 即肝窦和实质细胞之间的狄氏腔内, 极少数位于门静脉周^[1]。传统的 HSCs 分离技术主要集中于结合胶原酶的肝脏原位灌流和体外消化, 进而通过密度梯度离心和离心淘洗等手段获取相对纯净的 HSCs^[2]。HSCs 的新分离技术^[3], 特别是基于自发荧光和表面抗体的 HSCs 流式细胞分选技术, 为我们提供了更多的机会加深对健康和疾病状况下 HSCs 生物学功能的理解。

继不断完善的分离和鉴定方法出现后,

HSCs 在肝损伤和纤维化中的作用越来越明显, 证据也越来越充分, 吸引了肝脏生理学家和病理学家的注意^[4]。肝损伤后激活静息期 HSCs, 转化为增殖、收缩和纤维发生的肌成纤维细胞特性, 大大促进了肝纤维化进程和逆转机制的理解。该模式不仅在肝损伤, 而且在肝脏发育、再生、异质性反应、中间代谢和免疫调节等都已经取得了相当广泛的认识。同样有趣的是, HSCs 显著的可塑性不仅具有可变的中间纤维表型, 也是其功能的重要体现。HSCs 也可被视为连接复杂的肝内环境的纽带, 严格调控自身分泌和旁分泌的交互作用, 快速响应细胞外基质

的变化,以及精确应答肝脏生长和修复的代谢需求^[5]。对该细胞类型的深入研究将会得到更多的惊喜,揭开 HSCs 神秘的面纱,最终将有利于我们对肝脏生理功能的理解和肝脏疾病的诊断和治疗。

1 HSCs 分离方法进展

肝脏非实质细胞种类多样,功能复杂,与肝脏发育及肝脏疾病密切相关。分离纯化肝脏非实质细胞类群的工作由来已久。1982年,研究者首次从大鼠中成功分离 HSCs^[6],随后逐渐建立了多种改进的 HSCs 分离方法,并拓展到其他模型上,如小鼠、猪和人肝样本,分离得到的 HSCs 纯度、活性和得率也越来越高^[7]。下面,主要总结几种广泛应用的 HSCs 分离和纯化方法。

1.1 密度梯度离心法结合离心淘洗法

密度梯度离心法主要基于不同类型细胞的密度不同而分离,因为 HSCs 富含脂滴,其密度最低,通常浮在梯度介质的最上层,这样就比较容易和其他细胞分离。但仅仅依靠密度梯度离心得到的 HSCs 纯度较低,离心淘洗法则可进一步富集 HSCs,其中不同细胞可根据各自在重力场中沉降系数的不同实现分离^[2]。该过程的关键是肝脏消化和密度梯度离心。目前广泛采用的是改进的 Seglen 胶原酶两步原位灌流法对小鼠肝脏进行原位灌流,接着离体分散并消化肝脏组织,差速离心获得肝脏的非实质细胞群体后,利用 Stractan[®]^[8]、Nycodenz[®]^[9]、Percoll[™]^[10]和 OptiPrep[™]^[11]等不同类型的密度梯度介质进行密度梯度离心分离纯化 HSCs,通常 HSCs 富集的密度范围是 1.025–1.035 g/mL。这些密度梯

度液的结构都不同,但都具有低渗透性和化学惰性,对细胞无毒。细胞分离后,采用 HSCs 经典的标记物,如 Desmin、Vimentin、N-CAM 或 GFAP 等检测 HSCs 的分离纯度,细胞培养或台盼蓝染色确定细胞活性^[12]。

除了该方法本身外,还有多种因素影响 HSCs 的得率和纯度,如实验动物本身的遗传背景、性别、年龄和营养状况,以及为达到实验目的的特殊处理等^[2]。一个重要的前提条件是 HSCs 富含脂滴以降低该细胞的密度,使得 HSCs 密度与其他细胞差异更大,分离得到的 HSCs 纯度更高。有研究尝试富含维生素 A 饮食喂养实验动物以提高 HSCs 的得率,同时选择大龄实验动物也可以在一定程度上提高得率^[2]。为提高 HSCs 纯度,也有研究者尝试选择性去除肝脏内的其他非实质细胞群,如给动物模型注射二氯亚甲基二磷酸盐可选择性对枯否细胞有毒性,因此可去除枯否细胞对 HSCs 的污染^[13],但其副作用可能对实验本身产生干扰。

该法获得的细胞可能含有一些杂质细胞群和亚细胞颗粒,造成 HSCs 的污染。由于该法对操作者的要求较高,而且样本的差异等因素导致不同批次的实验结果差异较大,稳定性不好,影响后续实验结果的可靠性,因此需要结合高性能的仪器提高 HSCs 的纯度。

1.2 结合 HSCs 细胞形态特性的流式细胞术分选法

HSCs 是肝内主要非实质细胞群中细胞形态最小的一类,因而在没有特异性抗体标记的流式细胞术分选时,HSCs 具有前向角小而侧向角大的特点,在流式图中呈现特异性的细胞群,因而实现 HSCs 的分选,接着可以采用特异性染

色的免疫细胞化学法 (如 Desmin、GFAP 等) 或光镜和透射电镜检测 HSCs 纯度。有研究报道, 传统的密度梯度离心后得到的 HSCs 细胞群纯度约 50%–70%, 经过高侧向角的流式分选后细胞纯度超过 96%^[12]。

1.3 自发荧光的流式细胞术分选法

最近的一些研究是基于 HSCs 富含维生素 A 的特性实现细胞分选, 即刚分离的 HSCs 胞浆中含有大量的脂滴, 并因大量的维生素 A 在紫外光的激发下自发蓝绿色荧光。为检测 HSCs 的自发荧光并收集这群细胞, 该方法需要配备 355 nm 激发光的流式细胞仪实现 HSCs 的分选, 因而对仪器的要求较高。有研究采用经典的胶原酶灌流法消化肝脏后进行密度梯度离心富集非实质细胞, 然后结合 HSCs 自发荧光的流式分选获得高纯度的 HSCs^[14]。

还有一个需要考虑的问题是, 由于 HSCs 每个细胞的脂滴含量不同, 因而其自发荧光呈现一定的弥散性, 与阴性细胞的分群不太明显, 还有部分弱阳性细胞群, 导致该细胞分选时的得率较低, 而且获得的细胞只是 HSCs 中含有较多脂滴的一类, 这样造成了一定的细胞选择偏性。

1.4 抗体标记的流式细胞术分选法

目前, 抗体标记 HSCs 的流式细胞术分选纯化的 HSCs 还比较少, 主要是因为还没有公认的适合 HSCs 流式分选的细胞表面标记物^[15]。有研究采用 GFAP 标记 HSCs 进行流式分选, 再采用 Desmin 等免疫标记检测分选纯度, 但没有推广。

为克服这一缺陷, 还有采用负选分离 HSCs。考虑到肝内细胞类型的有限性, 以及经过一定的初分离后得到非实质细胞群, 密度梯

度离心后得到的细胞群只有淋巴细胞、枯否细胞、肝窦内皮细胞和 HSCs, 其他类型的细胞几乎可以忽略不计。淋巴细胞公认的细胞表面标记物是 CD3 (T 淋巴细胞特异) 和 CD19 (B 淋巴细胞特异), 枯否细胞公认的细胞表面标记物是 F4/80, 肝窦内皮细胞公认的细胞表面标记物是 CD146。因此, 整体细胞群标记以上所有的抗体后筛选的阳性细胞群就是除 HSCs 外的细胞, 选择阴性目的细胞群就是 HSCs, 这样可以排除掉前 3 种细胞的干扰, 分选得到纯净的 HSCs^[3]。同时, 如果采用不同的荧光标记, 这也为我们提供了一个同时分选不同类型细胞的策略。

相比于传统的密度梯度离心, 流式分选 HSCs 有几个明显的优势: 首先, HSCs 纯度得到了极大的提高, 结合 HSCs 细胞特异性的分选和负选策略, 有效排除了其他类型非实质细胞对后续实验的干扰, 如淋巴细胞、枯否细胞和肝窦内皮细胞等。其次, 不同的细胞群特异性标记不同的荧光抗体, 可以同时进行多通道分离, 这样利于全面综合比较同一批次动物模型肝脏不同细胞群的生物特性。最后, 该分选方法的适用对象更广泛, 相比于手工分选的密度梯度离心法对实验对象的严格要求, 该方法适用于年幼动物和一些较难分离得到 HSCs 的动物模型 (如肝损伤模型和基因敲除模型), 因此可用于 HSCs 在病理过程中的作用分析。当然, 流式分选的一个主要问题是细胞分选速率较慢, 细胞损耗较大, 得到的 HSCs 较少, 因而得加大样本量, 已得到足够的细胞, 用于后续实验。

总之, 在本实验室广泛尝试和比较的基础上, 传统的密度梯度离心结合流式细胞术分离纯化 HSCs, 可以获得高纯度的 HSCs, 大大促

进了 HSCs 的生物学研究。当然,寻找 HSCs 特异性细胞表面标记物的工作仍在继续,如果找到这样的特异性标记物,就可以简化现有的 HSCs 分选过程,建立新的一步分选方法,显著减少细胞分选时间,提高 HSCs 得率。

2 HSCs 功能研究进展

2.1 HSCs 生理功能研究进展

HSCs,作为肝脏特异性的间质细胞,在肝脏生理过程中发挥着重要的作用。HSCs 负责基底膜、ECM、细胞因子和趋化因子等众多生物活性分子的合成,维生素 A 和类维生素 A 的储存和代谢等。HSCs 的主要功能如图 1 所示,这里重点讨论了 HSCs 在类维生素 A 代谢和生长因子和细胞因子合成中的作用。

2.1.1 HSCs 在类维生素 A 代谢中的作用

生理条件下,HSCs 的胞浆中主要以富含视黄酯的脂滴形式储存着人体 50%–80% 的维生素 A,该细胞同时参与调控维生素 A 的转运和存储^[16]。为保持体内正常的视黄酸浓度,类维生素 A 代谢是至关重要的。研究表明^[17],胞浆中的类维生素 A 结合蛋白参与调控自由类维生素 A 的浓度,同时将类维生素 A 与结合蛋白的复合物转运至关键酶部位进行代谢。例如,视黄醇结合蛋白(Cellular retinol-binding protein, CRBP)参与视黄醇吸收、视黄醇酯化和维生素 A 调动。与不同化学特性和异构形式的类维生素 A 结合的结合蛋白也有多种类型,位于细胞内或细胞外,表明类维生素 A 可能结合在细胞膜上或与胞内特定的结合蛋白结合,如反式视黄醇与血清中 RBP 结合(又称为 RBP4),而胞内反式视黄醇及其氧化物反式视黄醛与 CRBP 的 3 种异构体之一结合(又分别称为 RBP1、RBP2

和 RBP3)。同时,特定的类维生素 A 结合蛋白在运输、代谢和调控特定类维生素 A 的行为时具有独特的功能^[18]。然而,维生素 A 从 HSCs 释放至血浆中的机制仍存在较大争议。从肝脏中分离的原代 HSCs 检测到 RBP mRNA 的表达;蛋白质印迹(Western blotting)分析,培养的 HSCs 分泌 RBP,并且向其中加入 ³H 标记的视黄酯后检测到了放射性的视黄醇-RBP 复合物^[19]。进一步研究表明^[20],外源性 RBP 加入 HSCs 培养基后,视黄醇的分泌量增加。这些数据表明体内 HSCs 直接调动视黄醇至血液,不需要介质的传递,其他组织的星型细胞可能存在同样的机制。然而,负责从 HSCs 中动员视黄醇的分子机制尚未详细阐明。

类维生素 A 调控 HSCs 活化的生物学功能仍是未知的,而且现有的研究表明类维生素 A 对 HSCs 的作用和促纤维生成是相互矛盾的^[21-22]。在体外培养条件下,视黄醇和视黄酸抑制 HSCs 的增殖,而视黄酸的效果是视黄醇的 1 000 倍^[23]。与此相反,视黄酸的两种代谢产物却通过上调纤溶酶原激活剂促进纤维发生,这又反过来诱导 TGF- β 的合成和激活^[24]。另一项大鼠胆管结扎的肝纤维化模型研究表明,TGF- β 合成的增加归因于 HSCs 中视黄酸的减少^[25]。

2.1.2 HSCs 合成分生长因子和细胞因子的作用

HSCs 是肝脏中细胞因子的重要来源。这些细胞因子结合到膜受体上启动的信号转导过程是正常和受损肝脏中细胞与细胞相互作用的主要形式。HSCs 不仅能分泌生长因子,而且能做出相应的响应^[26]。其中,两个重要的表皮生长因子^[27],TGF- α 和 EGF,在肝细胞增殖过程中起着重要的作用,同时也刺激 HSCs 的分裂,这样形成了一个 HSCs 活化的自分泌环。HSCs 合

成的 HGF 也是一种重要的肝细胞有丝分裂原^[28]。血小板衍生生长因子 PDGF 是目前最有效的 HSCs 有丝分裂原^[29]。肝损伤时, HSCs 合成 PDGF 和 PDGFR 的量显著上调, 增强 HSCs 的增殖能力。另一个例子是酸性成纤维因子 aFGF^[30]。PDGFR^[31]是第一个在 HSCs 中鉴定到的膜受体。活化的 PDGFR 招募信号分子 Ras, 进而激活 ERK/MAPK 通路。而且, PI3K 和 STAT-1 也参与 HSCs 中的 PDGF 信号级联通路。PDGFR 也用于开发直接以 HSCs 为治疗目标的

靶向试剂。

有证据表明, HSCs 可能是维持肝组织结构中 ECM 稳态的最重要的细胞^[32]。ECM 在调节相互接触的细胞行为方面发挥着复杂的作用, 影响细胞的形态、发育、迁移、增殖和功能。有研究表明^[33], ECM 调节 HSCs 合成胶原的类型, HSCs 对细胞因子的响应, 以及 HSCs 的形态、增殖和功能。正常情况下, HSCs 是合成和降解 ECM 的速率处于动态平衡中, 因而不会产生 ECM 的沉积。

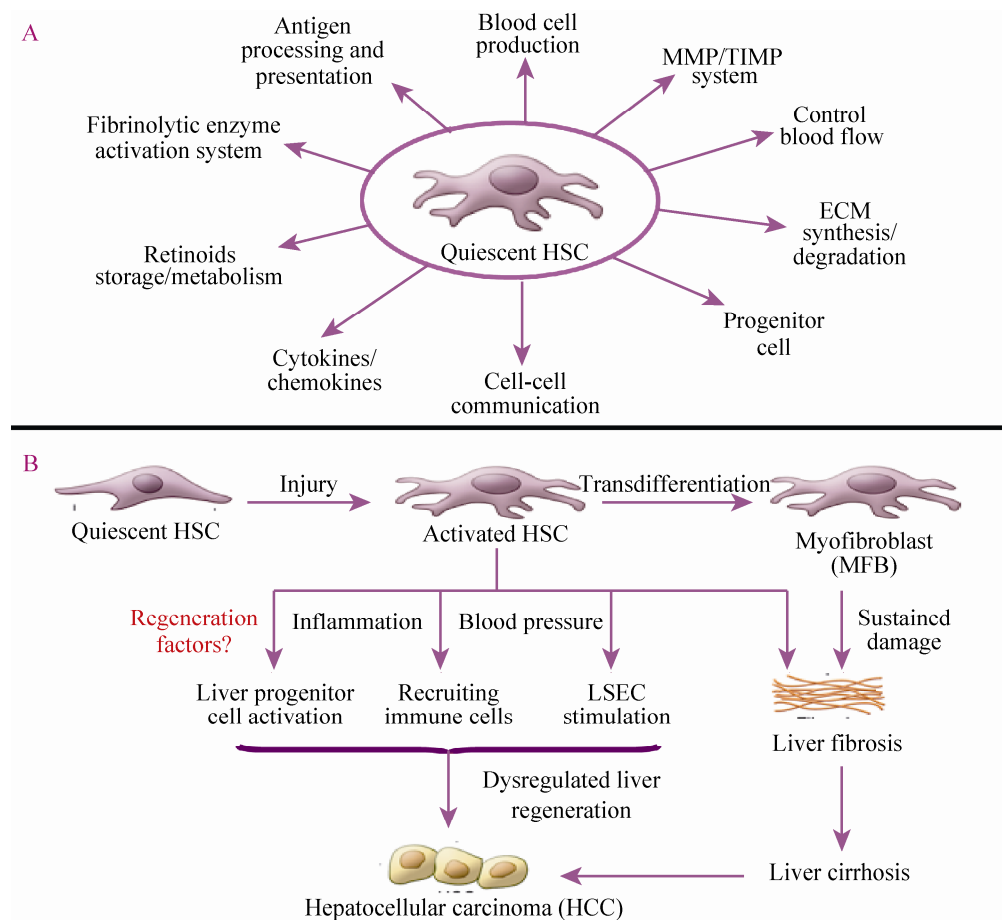


图 1 HSCs 的生理和病理功能^[34-35]

Fig. 1 Physiological and pathological functions of HSCs (From Atzori et al^[34], Yin et al^[35]).

2.2 HSCs 病理功能研究进展

HSCs, 肝脏非实质细胞中的一种, 储存脂肪和类维生素 A, 合成胶原蛋白和细胞质基质等, 同时分泌一些细胞因子和其他介质, 在肝纤维化发生发展和肝再生过程中起着关键的调控作用。实验性肝损伤后, HSCs 大量增殖, 而去除损伤因素后, HSCs 数量也渐渐恢复正常。阐明 HSCs 如何响应肝损伤以及损伤后的修复过程是理解肝纤维化等其他疾病的关键。特别是, HSCs 活化作为肝纤维化的一个关键事件为解析肝损伤响应提供了一个重要框架。以下主要集中在探讨肝纤维化和肝再生过程中 HSCs 的作用。

2.2.1 HSCs 在肝纤维化过程中的作用

肝纤维化是由多种持续性损伤因素导致的急性或慢性肝病的组织学变化, 多种细胞、刺激因素和活性因子等复杂作用的结果。越来越多的研究表明^[36], HSCs 活化并向肌成纤维细胞

转变以及活化的 HSCs 引起的一系列生物学效应是肝纤维化的中心环节。HSCs 活化^[37]主要包括两个阶段: 起始阶段和永生阶段。如果肝损伤因素消退后, 肝纤维化可能减轻, 甚至消退, 此时活化的 HSCs 发生细胞凋亡, 或逆转至静息状态的表型, 这个过程称为修复阶段。起始阶段, 又称为促炎阶段, 指的是早期细胞响应细胞因子和其他刺激的基因表达和表型的变化。起始主要由旁分泌刺激引起, 主要是周围细胞外基质的变化, 以及暴露在脂质过氧化物和受损肝实质细胞释放的产物下。永生阶段主要由于这些刺激维持活化的表型并产生纤维化, 其中涉及自分泌以及旁分泌循环, 包含多个独立的响应包括维生素 A 丢失、增殖、收缩性、纤维生成、基质降解和炎症细胞浸润等。HSCs 活化的过程和效应通路以及逆转方向如图 2 所示。HSCs 活化最熟知的早期标志是类维生素 A 脂滴的消失, HSCs 向肌成纤维细胞表型

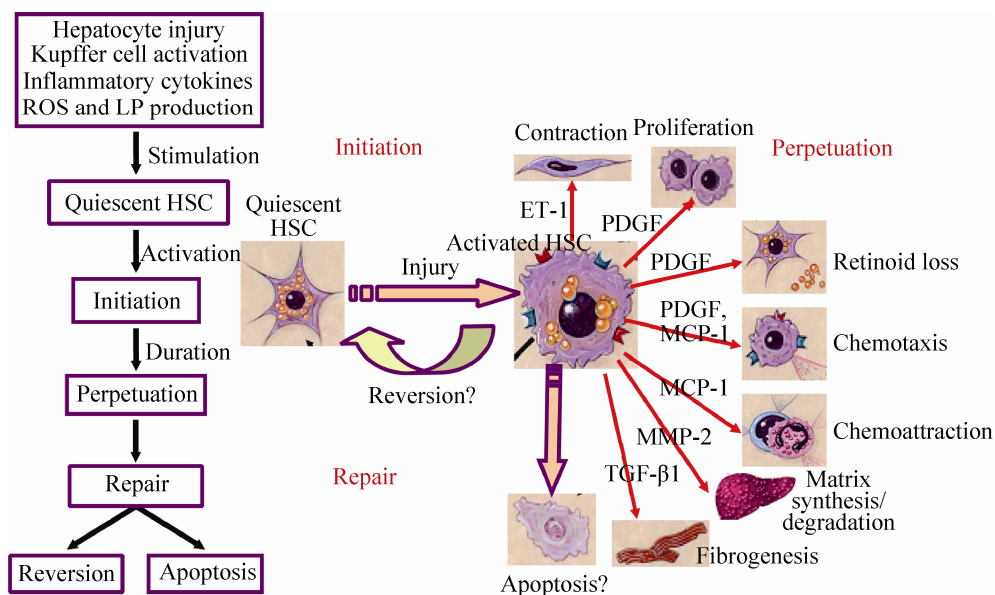


图 2 HSCs 活化过程和效应以及逆转方向示意图^[5]

Fig. 2 Diagram of HSCs activation, effect and reversion (From Friedman^[5]).

转变,但该事件是 HSCs 活化的起因还是结果尚未阐明。关于随后的类维生素 A 介导的细胞信号下调的问题,进一步的研究应该集中于是否会出现类维生素 A 消失和纤维增生和炎症细胞因子过表达这两者的负相关效应。

静息期的 HSCs 不会发生有丝分裂,而活化后 HSCs 开始增殖。多种生长因子和细胞因子对 HSCs 有促增殖作用,其中血小板衍生生长因子 PDGF 是最强的促分裂素,而且在这阶段 PDGFR 的表达也诱导增强。PDGF 与 HSCs 受体 PDGFR 结合后,激活酪氨酸激酶和 3-磷酸肌醇,促进 HSCs 增殖和迁移,并诱导 TGF- β 的表达^[38]。

虽然 HSCs 的收缩功能在正常情况下对肝血流调节的作用仍不清楚,但却是肝纤维化时肝内门静脉高压的主要决定因素^[39]。HSCs 显著收缩性的主要刺激因素是内皮素 ET-1^[40]。ET-1 经自分泌和旁分泌途径作用于活化的 HSCs 受体 ETBR 和 ETAR,导致细胞内的钙释放并引起细胞外的钙离子经二氢吡啶非敏感性钙通道进入细胞内,引起钙的增加,因而发生细胞收缩和增生。肝损伤后,HSCs 中 ET-1 的表达量显著增加而 NO 的合成减少,HSCs 收缩性增强,导致肝内门静脉压升高。而且,ET-1 促进培养早期的 HSCs 增殖,但抑制 HSCs 的完全活化。有趣的是,HSCs 同样也能合成 NO^[41],作为 ET-1 的生理拮抗剂,NO 可能在肝损伤时维持微循环发挥一定的作用。以 HSCs 收缩性为靶向的策略为治疗肝内门静脉高压提供了一个新的视角。

活化的 HSCs 开始增殖并合成大量的 I 型胶原,还有 ECM、金属蛋白酶 MMP 及其抑制物,尤其是 IV 型胶原酶、TIMP-1 等,还能大量表达各种炎症因子、趋化因子和细胞因子等,

进而引起 ECM 沉积并诱发肝窦毛细血管瘤化及小叶纤维化^[4]。在活化的 HSCs 分泌的大量细胞因子中,TGF- β 1^[42]作为最强的促胶原生成因子最可能代表对肝纤维化过程中胶原过量合成和积累的影响。TGF- β 1 结合到细胞表面特定受体(TGFR I 和 TGFR II)上,然后通过 Smad 家族的胞内介质将信号传递至核,诱导靶基因转录。从目前的研究来看,TGF- β 1 信号通路的调控和抑制可能是抗纤维化疗法的可行性方案^[43]。活化的 HSCs 合成并分泌 TIMP-1^[44],抑制 MMPs 的功能,从而抑制胶原降解,促进肝纤维化的发展,因此 TIMPs 与 MMPs 调控机制的异常可能是胶原沉积和促纤维化的原因。

同时,细胞因子表达量的升高或活性的增强也是 HSCs 持续性活化很重要的因素^[34]。HSCs 自身释放的细胞因子放大了炎症和促纤维化的组织反应,基质蛋白酶也可能加速正常基质的替代过程,形成一个典型疤痕组织。同时,其他类型细胞旁分泌的作用也功不可没。枯否细胞的浸润和激活有助于 HSCs 的活化,枯否细胞刺激基质合成,细胞增殖,以及通过细胞因子和活性氧中间体或脂质过氧化物的作用促进 HSCs 释放类维生素 A。早期损伤时,肝窦内皮细胞合成细胞纤连蛋白,刺激 HSCs 的活化,而且该细胞也可能参与激活 TGF- β 成为促纤维生成的形式。血小板^[45]也会合成 PDGF, TGF- β 和 EGF,维持 HSCs 的活化状态。而且,肝损伤时肝实质细胞的大量坏死会产生大量的脂质过氧化物,促进 HSCs 的胶原合成,也通过 Fas 途径促炎和促纤维发生^[46]。

但是,肝纤维化过程还有其他显著的动态变化,如炎症细胞的浸润、炎症因子的调节等,因此需综合考虑多种因素对肝纤维化发生发展

的影响,进而找到抗纤维化的解决办法。体外塑料培养皿中培养的 HSCs 可自发活化,与体内肝损伤后的活化过程相似,可以作为体外肝纤维化模型,用于探讨肝纤维化的形成机制、细胞间的相互关系及抗肝纤维化药物的筛选^[47]。以 HSCs 为靶向的肝纤维化治疗策略^[48]主要包括:①直接抑制 HSCs 的活化;②抑制 HSCs 的增殖和表型转变,以及炎症反应;③促进活化的 HSCs 凋亡或逆转至静息状态;④消除持续性损伤因素,改变 HSCs 活化事件中显著性的表型,如促进基质蛋白酶类的表达以减少 ECM 的过度沉积,恢复 HSCs 的储脂状态,降低门静脉压等。

综上所述,HSCs 活化是肝纤维化发生发展的关键,ECM 沉积是肝纤维化形成最直接的原因,所有以 HSCs 为中心的探究都是为寻找肝纤维化的治疗策略。尽管目前对 HSCs 的研究已取得很大的进展,但仍有很多问题有待深入,例如:1) 维生素 A 在 HSCs 活化中起着什么样的作用,以及如何发挥这种作用;2) 不同损伤因素诱导的肝纤维化的差异形成的原因;3) 肝纤维化发生发展过程中不同类型细胞的相互作用及其分子机制;4) 肝纤维化的基因治疗;5) 肝纤维化逆转的调控因素;6) 以 HSCs 为靶细胞的肝纤维化治疗方法;7) 特异性阻断剂或激活剂的安全性和有效性临床研究等。最有前景的抗纤维化药物主要类型是细胞因子调节剂、血管收缩剂和抗氧化剂等,期望有效缓解甚至攻克肝纤维化。

2.2.2 HSCs 在肝再生过程中的作用

活化的 HSCs 会合成血管新生因子,分泌调节内皮细胞和肝实质细胞增殖的因子,以及重塑 ECM,进而协助肝再生^[49]。一些研究结果表明,在祖细胞介导的肝再生过程中,HSCs 可能

通过表皮间质转化产生肝实质细胞^[50]。为证实 HSCs 参与肝再生,在对乙酰氨基酚和 2AAF/PH 分别诱导的肝损伤模型中,使用胶霉素^[51]和 L-半胱氨酸^[52]抑制活化的 HSCs 后,肝实质细胞和卵圆细胞的正常再生反应都受到了抑制。而且,CCl₄ 诱导损伤的 Foxf1^{+/-}小鼠 HSCs 的活性明显下降,以及再生周期中肝实质细胞的坏死情况更加严重^[53]。这说明 HSCs 调控其他肝脏细胞的功能,其活性状态对肝再生过程有着重要影响。然而,活化的 HSCs 调节肝再生的机制仍然有待进一步探讨,HSCs 不同亚型的相对重要性可能取决于肝脏受损的类型。

活化的 HSCs 合成一系列的细胞因子和趋化因子,这些因子直接增强肝祖细胞和肝实质细胞的增殖能力或通过肝窦内皮细胞和免疫细胞间接促进肝再生。在大鼠 2AAF/PH 肝损伤模型的肝再生早期阶段收集培养 HSCs 的条件型培养基检测发现,HGF 高表达并且促进卵圆细胞的增殖^[54]。HSCs 合成 HGF 的一个潜在介质是神经营养因子受体 P75NTR,其主要在纤维化肝损伤的人 HSCs 中表达。体外实验证实,P75NTR 缺陷型小鼠的 HSCs 不能分化为肌成纤维细胞,而且在纤溶酶原缺陷型 (Plg^{-/-}) 小鼠中,纤维素沉积诱导肝损伤。因此,在 P75NTR 缺陷型小鼠和 Plg 双敲小鼠模型中,HGF 的合成和肝实质细胞增殖受损。体外研究表明^[55],P75NTR 缺陷型 HSCs 中 Rho 的持续激活可以恢复 HSCs 的分化能力。因此,这些结果共同支持一个模型,即在肝再生过程中,P75NTR 通过 Rho 促进 HSCs 活化,而且活化的 HSCs 分泌 HGF 进而刺激肝实质细胞增殖。

活化的 HSCs 是基质金属蛋白酶及其抑制剂的主要来源^[56],主要参与 ECM 重塑。细胞因

子的合成和 ECM 重塑很可能是相伴随的,因为 ECM 能隔离生物活性分子。因此,除了直接分泌细胞因子,活化的 HSCs 还可能通过从 ECM 中剪切或释放细胞因子进而调节其功能。

肝再生是一个多步骤的复杂过程,其中包括肝生长的起始和终止。当肝脏达到生物体所需的质量时会停止再生。最著名的肝细胞抗增殖因子是 TGF- β ,而 HSCs 是合成 TGF- β 的主要细胞类型之一^[57]。那么,HSCs 是如何调控肝再生的起始和终止的呢?可能的一个解释是“HGF-TGF- β 1 平衡理论”:如前所述,肝再生早期阶段 HSCs 高表达 HGF,该分裂素可能超过了 TGF- β 1 的抗增殖效应;而在肝再生终端阶段,HSCs 合成并分泌高水平的 TGF- β 1 进而,抑制肝实质细胞的增殖,甚至诱导细胞凋亡。研究证实,在原代培养的小鼠 HSCs 中,5-羟色胺能通过 5-羟色胺 2B (5-HT2B) 受体提高 TGF- β 1 的表达主要,而在 PH、BDL 和 CCl₄ 诱导的肝损伤模型中,抑制 5-HT2B 能促进肝实质细胞的增殖^[58]。因此,HSCs 可能通过改变肝再生过程中的细胞因子表达谱调节肝再生的起始和终止。

任何单一的动物模型都不可能完全模拟人类肝脏再生的所有相关方面,特别是还要考虑到介导肝再生的细胞和分子通路可能取决于肝脏受损类型而稍微有些改变。因此,未来有关 HSCs 调控肝再生过程的研究可能需要多种可用的动物模型来提供互补的启示。啮齿动物模型的优势在于能够在体外分离、培养和激活 HSCs,以便后续集中于肝再生分子机制的研究。另一方面,斑马鱼的活体成像技术非常适合研究肝再生过程中细胞间相互作用^[59]。与啮齿动物模型类似,部分肝切除或有毒化学物质刺激

也可以用来诱导斑马鱼的肝再生^[60]。遗传工具也可以用于开发肝再生模型,其中包括硝基还原酶/甲硝唑细胞消融系统^[61]和线粒体导入基因的呜啉基敲低^[62]诱导肝实质细胞死亡的模型。还一种可行的方法是在各种类型肝损伤的斑马鱼模型中进行高通量的化学筛选,寻找肝再生过程中影响 HSCs 的药物^[63]。

随着 HSC 研究的全面深入,HSC 还参与多种肝病的发生发展过程并发挥着重要的调控作用。例如,活化的 HSCs 可能导致酒精性脂肪肝或非酒精性脂肪肝病和肝炎中的微血管血流失调^[64]。HSC 对肝癌的发生和转移也有举足轻重的作用。大多数的证据表明^[35],纤维化促进肝癌,但在一些临床背景中,纤维化和 HCC 可能在相同因素的刺激下同时发生,而不是一个促进另一个。

2.3 HSCs 蛋白质组学研究进展

越来越多的细胞和分子生物学水平的研究证据表明 HSC 在肝脏生理和病理状态下都发挥重要的功能,而从基因组和蛋白质组水平全面揭示 HSC 的功能则成为 HSC 研究的发展趋势。因此,随着蛋白质组学技术的飞速发展和不断创新,HSC 的蛋白质组功能研究也越来越全面和深入。

HSC 的蛋白质组研究初期主要集中于不同状态下 HSC 蛋白质表达的差异分析,这有助于寻找参与或调控 HSC 活化的重要分子。2001 年,Kristensen 等^[65]研究鉴定到大鼠 HSC 在静息和活化两种状态下共 150 多种蛋白质的表达,其中有 43 种蛋白质的表达水平显著变化,这些数据为全面解析 HSC 活化与肝纤维化的关系提供了重要线索。同时,进一步的数据分析发现一种与 HSC 活化相关的蛋白质 STAP,其在活化

的 HSC 中高表达,静息期 HSC 表达量少,同时在肝脏其他类型细胞中则不表达,提示 STAP 可能在 HSC 活化过程中起重要作用。分子功能研究证实,STAP 是内源性过氧化物酶,参与脂质过氧化物的代谢,可能作为 HSC 活化的特异性标志物。此后,以各种肝病动物模型为基础,HSC 的蛋白质组研究蓬勃发展。Schwabe 课题组^[66]构建了小鼠的 CCl₄ 注射和胆管结扎的肝损伤模型,与正常小鼠为对照,构建了静息状态、体内和体外活化状态的 HSC 的蛋白质差异表达谱,共鉴定到 2 073 个差异蛋白质,其中 1 161 个蛋白质显著上调,而 912 个显著下调。而且,体内与体外活化的 HSC 的表达谱存在较大的差异,而 CCl₄ 注射和胆管结扎的肝损伤模型则没有多大的差别,表明 HSC 在体内和体外的活化形式是不同的,而损伤类型对 HSC 的活化没有影响,揭示了体内研究的必要性。同时,与枯否细胞共培养或内毒素诱导的实验证明 HSC 活化依赖于微环境中细胞因子的作用。后续的蛋白质功能分析筛选出一些与促炎、抗凋亡等生物过程相关的分子进行深入验证,为深入研究 HSC 的活化机制奠定了基础。再者,HSC 蛋白质组研究鉴定到了多种状态下的 HSC 蛋白质,其数据的广泛性使得构建 HSC 细胞内蛋白质的相互作用网络成为可能,有助于采用系统生物学的概念和工具从完整的信号通路和代谢途径等方面解析 HSC 的功能^[67]。在慢性肝病进程中,显著的特征之一是 HSC 活化后向成纤维细胞转变,其中胶原蛋白的沉积形成疤痕组织。目前,系统生物学方法利用 HSC 的组学数据,构建胶原蛋白的调控网络,进而探究肝纤维化起始和发展过程中该信号介导的分子事件,寻找阻止纤维化发展的解决办法。最后,HSC 与肝脏其

他类型细胞的相互作用在肝病发生发展中的作用也逐渐得到深入挖掘。Coulouarn 等^[68]通过肝实质细胞和活化的 HSC 共培养证实两者存在紧密的相互作用,导致功能性的基因网络失调,而且这种双向作用通过诱导 HSC 中 VEGFA 和 MMP9 的表达形成促血管生成的微环境,促进细胞迁移,使肝纤维化逐渐发展为肝癌。

蛋白质组技术为全面揭示 HSC 的功能提供了契机,有望筛选出特异性的诊断标志物,明确 HSC 参与肝病发生发展的分子事件和信号网络,为肝脏疾病的诊断和治疗提供新的思路。

3 展望

HSCs 一直是细胞学和肝病学的重点研究对象之一,近几十年来取得了重大进展和突破。随着研究的不断深入和拓展,HSCs 千变万化的功能已经远远超出任何人的想象,但是仍有很多关键问题悬而未决,有待深入探索,很难预测有关该细胞的研究还会出现什么意外的惊喜。例如,HSCs 在肝脏发育和再生中的多能性和功能都值得细致探究,并有待开发更好的遗传模型来证实 HSCs 的功能。有必要继续阐明 HSCs 的免疫功能,特别是其对肝脏高免疫耐受功能的贡献,以及其在病毒感染(包括艾滋病)、抗宿主反应和肝纤维发生中的重要作用。再者,有关 HSCs 和炎性细胞亚群之间微妙而复杂的相互作用的更多的证据也逐渐浮出水面。仍有待收集的证据和证实更多的假设来证明在体内活化的 HSCs 能逆转至静息状态,当然这需要复杂的遗传模型,也可以为细胞的显著可塑性提供进一步的证据。利用 HSCs 支持培养的肝细胞分化和体内肝细胞的移植也是有巨大前景的新功能。基于这些发现,在肝辅助设备中利用

HSCs 值得进一步的研究,可能会为晚期肝病患者创建新的治疗方案。可以肯定的是,在可预见的未来,HSCs 将继续吸引和激发肝脏生物学家、免疫学家和临床医生从事相关的研究。

REFERENCES

- [1] Blouin A, Bolender RP, Weibel ER. Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J Cell Biol*, 1977, 72(2): 441–455.
- [2] Weiskirchen R, Gressner AM. Isolation and culture of hepatic stellate cells. *Methods Mol Med*, 2005, 117: 99–113.
- [3] Tacke F, Weiskirchen R. Update on hepatic stellate cells: pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012, 6(1): 67–80.
- [4] Senoo H, Yoshikawa K, Morii M, et al. Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative-past, present and future. *Cell Biol Int*, 2010, 34(12): 1247–1272.
- [5] Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*, 2008, 88(1): 125–172.
- [6] Knook DL, Seffelaar AM, de Leeuw AM. Fat-storing cells of the rat liver. Their isolation and purification. *Exp Cell Res*, 1982, 139(2): 468–471.
- [7] Gridelli B, Vizzini G, Pietrosi G, et al. Efficient human fetal liver cell isolation protocol based on vascular perfusion for liver cell-based therapy and case report on cell transplantation. *Liver Transplantation*, 2012, 18(2): 226–237.
- [8] Friedman SL, Roll FJ. Isolation and culture of hepatic lipocytes, Kupffer cells, and sinusoidal endothelial cells by density gradient centrifugation with Stractan. *Anal Biochem*, 1987, 161(1): 207–218.
- [9] Schäfer S, Zerbe O, Gressner AM. The synthesis of proteoglycans in fat-storing cells of rat liver. *Hepatology*, 1987, 7(4): 680–687.
- [10] Blomhoff R, Berg T. Isolation and cultivation of rat liver stellate cells. *Methods Enzymol*, 1990, 190: 58–71.
- [11] Sicklick JK, Li YX, Choi SS, et al. Role for Hedgehog signaling in hepatic stellate cell activation and viability. *Laboratory Investigation*, 2005, 85(11): 1368–1380.
- [12] Geerts A, Niki T, Hellemans K, et al. Purification of rat hepatic stellate cells by side scatter-activated cell sorting. *Hepatology*, 1998, 27(2): 590–598.
- [13] Yata Y, Enosawa S, Suzuki S, et al. An improved method for the purification of stellate cells from rat liver with dichloromethylene diphosphate (CL2MDP). *Methods Cell Sci*, 1999, 21(1): 19–24.
- [14] Ichikawa S, Mucida D, Tzysnik AJ, et al. Hepatic stellate cells function as regulatory bystanders. *J Immunol*, 2011, 186(10): 5549–5555.
- [15] Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, et al. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J Hepatol*, 2002, 36(2): 200–209.
- [16] Blomhoff R, Blomhoff HK. Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol*, 2006, 66(7): 606–630.
- [17] Blomhoff R, Green MH, Berg T, et al. Transport and storage of vitamin A. *Science*, 1990, 250(4979): 399–404.
- [18] Blomhoff R, Helgerud P, Rasmussen M, et al. *In vivo* uptake of chylomicron [3H]retinyl ester by rat liver: evidence for retinol transfer from parenchymal to nonparenchymal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79(23): 7326–7330.
- [19] Blomhoff R, Norum KR, Berg T. Hepatic uptake of [3H]retinol bound to the serum retinol binding protein involves both parenchymal and perisinusoidal stellate cells. *J Biol Chem*, 1985, 260(25): 13571–13575.
- [20] Andersen KB, Nilsson A, Blomhoff HK, et al. Direct mobilization of retinol from hepatic perisinusoidal stellate cells to plasma. *J Biol Chem*, 1992, 267(2): 1340–1344.
- [21] Davis BH, Coll D, Beno DW. Retinoic acid suppresses the response to platelet-derived growth factor in human hepatic Ito-cell like myofibroblasts: a post-receptor mechanism independent of raf/fos/jun/egr activation. *Biochem J*, 1993, 294: 785–791.
- [22] Okuno M, Moriwaki H, Imai S, et al. Retinoids exacerbate rat liver fibrosis by inducing the

- activation of latent TGF-beta in liver stellate cells. *Hepatology*, 1997, 26(4): 913–921.
- [23] Davis BH, Kramer RT, Davidson NO. Retinoic acid modulates rat Ito cell proliferation, collagen, transforming growth factor beta production. *J Clin Invest*, 1990, 86(6): 2062–2070.
- [24] Okuno M, Sato T, Kato S, et al. Increased 9,13-di-cis-retinoic acid in rat hepatic fibrosis: implication for a potential link between retinoid loss and TGF-beta mediated fibrogenesis *in vivo*. *J Hepatol*, 1999, 30(6): 1073–1080.
- [25] Ohata M, Lin M, Satre M, et al. Diminished retinoic acid signaling in hepatic stellate cells in cholestatic liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointestinal Liver Physiol*, 1997, 35(3): G589–G596.
- [26] Sato M, Suzuki S, Senoo H. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Funct*, 2003, 28(2): 105–112.
- [27] Yang C, Zeisberg M, Mostenman B, et al. Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology*, 2003, 124(1): 147–159.
- [28] Schirmacher P, Geerts A, Pietrangelo A, et al. Hepatocyte growth factor/hepatopoietin A is expressed in fat-storing cells from rat liver but not myofibroblast-like cells derived from fat-storing cells. *Hepatology*, 1992, 15(1): 5–11.
- [29] Li D, Friedman S. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *J Gastroenterol Hepatol*, 1999, 14(7): 618–633.
- [30] Marsden ER, Hu Z, Fujio K, et al. Expression of acidic fibroblast growth factor in regenerating liver and during hepatic differentiation. *Lab Invest*, 1992, 67(4): 427–433.
- [31] Pinzani M. PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells. *Front Biosci*, 2002, 7: d1720–1726.
- [32] Senoo H, Sato M, Imai K. Hepatic stellate cells-from the viewpoint of retinoid handling and function of the extracellular matrix. *J Anatomy*, 1997, 72(2): 79–94.
- [33] Bedossa P, Paradis V. Liver extracellular matrix in health and disease. *J Pathol*, 2003, 200(4): 504–515.
- [34] Atzori L, Poli G, Perra A. Hepatic stellate cell: a star cell in the liver. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41(8/9): 1639–1642.
- [35] Yin C, Evason KJ, Asahina K, et al. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *J Clin Invest*, 2013, 123(5): 1902–1910.
- [36] Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2011, 6: 425–456.
- [37] Safadi R, Friedman SL. Hepatic fibrosis-role of hepatic stellate cell activation. *Med Gen Med*, 2002, 4(3): 27.
- [38] Liu Y, Wen XM, Lui FLH, et al. Therapeutic targeting of the PDGF and TGF- β -signaling pathways in hepatic stellate cells by PTK787/ZK22258. *Laboratory Investigation*, 2009, 89(10): 1152–1160.
- [39] Rockey DC. Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Semin Liver Dis*, 2001, 21(03): 337–350.
- [40] Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 1988, 332(6163): 411–415.
- [41] Rockey DC, Chung JJ. Inducible nitric oxide synthase in rat hepatic lipocytes and the effect of nitric oxide on lipocyte contractility. *J Clin Invest*, 1995, 95(3): 1199.
- [42] Castilla A, Prieto J, Fausto N. Transforming growth factors beta1 and alpha in chronic liver disease. Effects of interferon alpha therapy. *N Engl J Med*, 1991, 324(14): 933–940.
- [43] Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-b as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med*, 2006, 10(1): 76–99.
- [44] Ramachandran P, Iredale JP. Liver fibrosis: a bidirectional model of fibrogenesis and resolution. *QJM*, 2012, 105(9): 813–817.
- [45] Dhillon RS, Schwarz EM, Maloney MD. Platelet-rich plasma therapy-future or trend. *Arthritis Res Therapy*, 2012, 14(4): 219.
- [46] Ghatak S, Biswas A, Dhali GK, Boyer, et al. Oxidative stress and hepatic stellate cell activation are key events in arsenic induced liver fibrosis in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011, 251(1): 59–69.

- [47] Zhu J, Wu J, Frizell E, et al. Rapamycin inhibits hepatic stellate cell proliferation *in vitro* and limits fibrogenesis in an *in vivo* model of liver fibrosis. *Gastroenterology*, 1999, 117(5): 1198–1204.
- [48] Schuppan D, Kim YO. Evolving therapies for liver fibrosis. *J Clin Invest*, 2013, 123(5): 1887–1901.
- [49] Roskams T. Relationships among stellate cell activation, progenitor cells, and hepatic regeneration. *Clin Liver Dis*, 2008, 12(4): 853–860.
- [50] Yang L, Y Jung, A Omenetti, et al. Fate-mapping evidence that hepatic stellate cells are epithelial progenitors in adult mouse livers. *Stem Cells*, 2008, 26(8): 2104–2113.
- [51] Shen K, Chang W, Gao X, et al. Depletion of activated hepatic stellate cell correlates with severe liver damage and abnormal liver regeneration in acetaminophen-induced liver injury. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2011, 43(4): 307–315.
- [52] Pintilie DG, Shupe TD, Oh S, et al. Hepatic stellate cells' involvement in progenitor-mediated liver regeneration. *Lab Invest*, 2010, 90(8): 1199–1208.
- [53] Kalinichenko VV, Bhattacharyya D, Zhou Y, et al. Foxf1+/-mice exhibit defective stellate cell activation and abnormal liver regeneration following CCl4 injury. *Hepatology*, 2003, 37(1): 107–117.
- [54] Chen L, Zhang W, Zhou Q, et al. HSCs play a distinct role in different phases of oval cell-mediated liver regeneration. *Cell Biochem Funct*, 2012, 30(7): 588–596.
- [55] Passino MA, Adams RA, Sikorski SL, et al. Regulation of hepatic stellate cell differentiation by the neurotrophin receptor p75NTR. *Science*, 2007, 315(5820): 1853–1856.
- [56] Wells RG. Cellular sources of extracellular matrix in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis*, 2008, 12(4): 759–768.
- [57] Karkampouna S, Ten DP, Dooley S, et al. TGF-beta signaling in liver regeneration. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(27): 4103–4113.
- [58] Ebrahimkhani MR, Oakley F, Murphy LB, et al. Stimulating healthy tissue regeneration by targeting the 5-HT(2)B receptor in chronic liver disease, *Nat Med*, 2011, 17(12): 1668–1673.
- [59] Beis D, Stainier DYR. *In vivo* cell biology: following the zebrafish trend. *Trends Cell Biol*, 2006, 16(2): 105–112.
- [60] Chu J, Sadler KC. New school in liver development: lessons from zebrafish. *Hepatology*, 2009, 50(5): 1656–1663.
- [61] Curado S, Anderson RM, Jungblut B, et al. Conditional targeted cell ablation in zebrafish: a new tool for regeneration studies. *Dev Dyn*, 2007, 236(4): 1025–1035.
- [62] Curado S, Ober EA, Walsh S, et al. The mitochondrial import gene tomm22 is specifically required for hepatocyte survival and provides a liver regeneration model. *Dis Model Mech*, 2010, 3(7/8): 486–495.
- [63] Yin C, Evason KJ, Maher JJ, et al. The bHLH transcription factor Hand2 marks hepatic stellate cells in zebrafish: Analysis of stellate cell entry into the developing liver. *Hepatology*, 2012, 56(5): 1958–1970.
- [64] Amann T, Bataille F, Spruss T, et al. Activated hepatic stellate cells promote tumorigenicity of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*, 2009, 100(4): 646–653.
- [65] Kristensen DR, Kawada N, Imamura K, et al. Proteome analysis of rat hepatic stellate cells. *Hepatology*, 2000, 32(2): 268–277.
- [66] De Minicis S, Seki E, Uchinami H, et al. Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and *in vivo*. *Gastroenterology*, 2007, 132(5): 1937–1946.
- [67] Natalia N. A systems biology approach for understanding the collagen regulatory network in alcoholic liver disease. *Liver International*, 2012, 32(2): 189–198.
- [68] Coulouam C, Corlu A, Glaise D, et al. Hepatocyte–stellate cell cross-talk in the liver engenders a permissive inflammatory microenvironment that drives progression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 2012, 72(10): 2533–2542.

(本文责编 郝丽芳)