

骨髓来源干细胞在肝移植中的应用及其相关机制

罗海英^{①②} 王韞芳^① 孔维^② 裴雪涛^{①*}

(① 军事医学科学院野战输血研究所干细胞与再生医学研究室, 北京 100850; ② 吉林大学生命科学学院, 长春 130062.)

* 联系人, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

摘要 肝脏移植已经日益成为治疗终末期肝病最为有效的方法, 而供肝严重短缺、急慢性排斥反应以及长期应用免疫抑制剂所带来的毒副作用一直是肝移植面临的三大难题。骨髓来源的干细胞具有向肝系细胞分化的潜能, 参与损伤后肝再生。肝移植术后, 急性排斥反应、缺血再灌注、部分肝移植肝量损失、术后肝炎复发及“小肝综合征”等对移植肝造成的损伤环境可对骨髓来源不同干细胞亚群产生趋化作用, 动员其进入外周循环并迁移至肝脏, 促进移植肝功能修复。此外, 骨髓来源干细胞还可参与活体肝移植供者的功能性肝再生。骨髓源干细胞参与肝再生的过程可能是通过 SDF-1 及其受体 CXCR4 的相互作用以及 HGF, IL-8, MMP9, VEGF/VEGFR-2 等因子的参与而实现的。肝移植联合供者来源的骨髓源干细胞移植可以诱导供者特异性免疫耐受, 使异体移植肝得以长期高质量存活。总之, 无论是从参与再生的角度还是从诱导免疫耐受的角度, 无论从受者的角度还是从活体供者的角度, 骨髓来源的干细胞移植都显示了辅助肝移植治疗肝衰竭, 进而拓宽肝移植发展空间的强大优势, 为广大肝病患者带来新的希望。

关键词 干细胞 可塑性 肝移植 肝再生

肝脏是人体最为重要的器官之一, 由于病毒感染、中毒及遗传代谢性疾病等因素导致的终末期肝病严重威胁人类的健康。目前, 肝脏移植(liver transplantation, LT)已成为治疗终末期肝病最有效的方法。从1963年Starzl成功实施了世界第一例临床原位肝移植(orthotopic liver transplantation, OLT)以来, LT经历了全肝移植到减体积肝移植、尸肝移植到活体肝移植(living donor liver transplantation, LDLT)、儿童活体肝移植到成人活体肝移植, 以及活体肝左叶移植到活体肝右叶移植等不同阶段、不同形式的发展过程, 不断为肝病患者带来生存的希望。在世界范围内大约有超过50000名患者在肝移植术后的1、3和5年存活率分别达到90%、80%和70%^[1]。尽管如此, 供肝来源严重短缺及长期应用免疫抑制剂的毒副作用仍然限制了肝移植在临床的广泛开展。据统计, 有10%~15%的需要肝移植的患者在等待供肝的过程中死亡^[2]。长期应用免疫抑制剂使受者感染发生率增高, 活体肝移植中肝细胞癌及丙型肝炎的复发也被认为与免疫抑制剂的应用有关^[3,4]。

近年来, 全球掀起的干细胞研究热潮使干细胞受到了广泛关注。研究表明, 成体干细胞存在于哺乳动物的多种组织内, 人们把其在特定条件下跨系、跨

胚层分化的潜能称为成体干细胞分化“可塑性”(plasticity)。例如, 在特定细胞因子(肝细胞生长因子HGF, bFGF, FGF4等)组合的条件下体外培养或肝损伤动物体内, 可观察到骨髓或脐带血来源的成体干细胞向肝系细胞分化^[5,6]。该现象激发了学者们对各种来源肝干细胞的研究兴趣, 为肝脏疾病的细胞治疗提供了更广泛的组织细胞来源。如果在肝移植研究中结合干细胞的应用, 可能会从干细胞的角度寻找到部分解决肝移植主要问题的新思路, 推动肝移植技术的发展, 为肝移植治疗终末期肝病开辟新的天地。

1 骨髓来源干细胞(bone marrow-derived stem cells, BMDSC)与移植肝再生

随着干细胞研究的深入, 肝干细胞也成为引人注目的内容之一。肝干细胞的起源可能是多源性的。肝内干细胞主要以卵圆细胞、小肝细胞为主; 肝外肝干细胞可能来源于胚胎干细胞、胰腺干细胞、唾液腺干细胞; 另一个重要来源就是骨髓^[7,8]。

1.1 BMDSC 向肝细胞分化的潜能

目前认为, 骨髓是成体中干细胞含量最丰富的组织, 包括多种具有向不同组织细胞分化潜能的干

细胞群体,其中以造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSC)及间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)为主。BMDSC同样具有向肝内细胞分化的潜能,而且认为BMDSC是肝卵圆细胞的重要来源之一^[9]。体外实验已经证实,与CCl₄损伤的肝组织^[10]共培养或向培养体系中加入FGF4和HGF等细胞因子^[11]均可诱导HSC表达肝细胞的特异性标志。大量肝损伤动物模型的研究发现,骨髓移植后2 d损伤肝内即出现移植骨髓来源的肝细胞和胆管细胞,而且随着时间的推移,这样的再生细胞也逐渐增多^[9,11,12]。在FAH缺陷小鼠体内,移植骨髓细胞参与了30%~50%损伤肝脏的修复^[13]。人类骨髓移植也得到了同样的结果,BMDSC参与实质细胞再生的效率可达40%,其中丙型肝炎肝损伤最重,BMDSC参与再生效率也最高^[14]。部分肝切除一直是研究肝再生的经典模型,Fujii等人^[15]研究证实,70%肝切除后移植的GFP⁺骨髓细胞有70%参与肝窦内皮细胞(sinusoidal endothelial cells, SEC)的再生,而肝脏SEC在肝切除早期可以诱导增殖状态的肝细胞及静息状态的肝细胞增殖。以上研究证实,BMDSC既可以参与肝实质细胞再生,也可以通过参与非实质细胞再生而促进肝功能恢复。而病毒感染、遗传化学因素以及部分肝切除引起的严重肝损伤可能是BMDSC参与损伤肝功能修复的启动因素。

目前,对于BMDSC如何参与肝损伤修复还存在着争议。Vassilopoulos等人^[16]对骨髓源肝干细胞“可塑性”提出质疑,认为BMDSC主要通过和肝细胞发生融合而发挥作用。他们向雌性FAH^{-/-}基因敲除小鼠体内移植雄性FAH^{+/+} BMDSC,结果发现,FAH^{+/+}的肝细胞表现为80, XXXY(二倍体和二倍体融合)和120, XXXXY(二倍体和四倍体融合)的核型,由此推测,供者和受者的细胞发生了融合,这与之前Wang等人^[17]认为“可塑性”实质上是干细胞与已分化成体细胞之间的融合相一致。然而Jang等人^[10]的研究结果恰恰与之相反,体内外实验证实HSC来源的肝细胞和胆管细胞具有XY或XYXY的核型,所以他们认为肝实质细胞是由HSC转分化而来而不是细胞融合的结果。另有研究显示,人的骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSC)直接移植入异丙醇肝损伤大鼠体内可分化成人肝细胞,而且通过荧光原位杂交发现没有人和大鼠细胞融合的出现^[18]。然而该如何解释这些结果的不同呢?出

现这两种不同观点可能是因为两种研究所应用的动物模型不同。有报道显示^[19],高酪氨酸血症患者多种组织细胞会发生基因改变,所以认为供受者细胞融合可能是FAH^{-/-}小鼠基因改变的结果。部分肝切除后,骨髓中的上皮祖细胞动员至外周血并迁移至肝脏分化为肝脏SEC。Harris等人^[20]认为,BMDSC分化而来的上皮细胞也不是细胞融合的结果。这些研究都充分证明了BMDSC在特定微环境下具有向肝内细胞分化的潜能。

1.2 BMDSC 参与移植肝再生

普遍认为,肝再生主要是由具有强大增生能力的成熟肝细胞完成。动物及人类研究都证实,BMDSC作为肝外肝干细胞的重要来源参与肝再生,而各种原因引起的严重肝损伤是启动这一过程的关键因素^[9,12,21]。LT由于供受不匹配造成的小肝移植^[22]以及排斥损伤和缺血再灌注损伤^[23]等均可导致肝细胞增殖不足,致使肝量不足甚至肝功能衰竭。所以改善肝脏的再生能力对于肝移植可能是至关重要的。随着干细胞研究的深入,BMDSC促进移植肝或肝移植再生功能恢复的报道也屡见不鲜。

Petersen等人^[9]在大鼠OLT术后,在CCl₄损伤的L21-6⁺移植肝内发现受者骨髓来源的L21-6⁺肝细胞及胆管细胞。Avital等人^[24]在大鼠OLT模型中将受者自体骨髓 $\beta_2\text{M}^-/\text{Thy-1}^+$ 细胞注入移植肝,可进一步分化为肝细胞和胆管内皮细胞而逐步替代供肝实质细胞(达供肝的60%),明显减轻了移植肝的急性排斥损伤,证明自体BMDSC移植可用于治疗器官移植免疫损伤,而且效果显著强于成熟肝细胞移植。在临床实践中,Theise等人^[14]应用FISH等方法证实受者BMDSC参与移植肝实质细胞再生,其中有一例患者在肝移植后丙型肝炎复发,造成移植肝严重损伤,研究发现,在此患者肝内有高达38%的胆管细胞及门脉周围区域有64%的肝细胞是来源于受者骨髓细胞,而且干细胞参与再生的效率明显高于单纯的移植损伤肝。以上研究结果都充分证实,OLT后受者自体BMDSC可以促进移植肝功能再生。

近年来,由于供肝缺乏严重,部分肝移植(partial liver transplantation, PLT)(包括LDLT和劈离式肝移植)逐渐引起了人们的注意。研究表明,PLT对移植物的损伤重于全肝移植,不仅包括再灌注损伤和早期免疫损伤,而且还包括肝质量丢失损伤。Liu等人^[23]的实验表明,PLT组外周血中 $\beta_2\text{M}^-/\text{Thy-1.1}^+$ 及CD34⁺细

胞水平高于部分肝切除组和全肝移植组, 这些细胞可能迁移至移植肝参与肝再生. 进一步研究发现^[25], 在50%肝移植术后, 给予受体G-CSF治疗可动员自体骨髓来源的CD34⁺细胞进入移植肝参与肝再生, 提示在大鼠模型可以通过自体BMDSC动员来促进移植肝的再生, 这与Avital等人^[24]的研究不谋而合, 后者是通过相当于自体的同系BMDSC移植来参与移植肝再生.

以上的研究表明, 无论是全肝移植还是 PLT, 自体 BMDSC 都有参与移植肝再生的潜能, 这就为肝移植联合自体 BMDSC 移植促进受者肝脏功能性再生奠定了基础.

1.3 BMDSC 参与移植肝再生的可能机制

肝再生过程是一个复杂的、多阶段的、多因素参与的组织功能重建过程, BMDSC 参与移植肝再生同样也受到多种因素的影响.

(i) 参与移植肝再生的BMDSC亚群. 骨髓作为成体中多种干细胞的发源地受到了各国研究者的重视. 大量的研究证实, BMDSC在移植肝再生过程中发挥着一定的作用, 但是由于肝干细胞没有特异的鉴定标志, 骨髓中到底由哪一群细胞起着最重要的促移植肝再生作用始终没有得到统一. 骨髓中 $\beta_2\text{M}^+/\text{Thy-1}^+$ 细胞是一群始终表达肝特异基因的干细胞, 大鼠OLT联合骨髓 $\beta_2\text{M}^+/\text{Thy-1}^+$ 细胞移植, 移植肝中有60%的肝细胞由此类干细胞转分化而来^[24]. 在大鼠PLT模型中发现, 移植后外周血中CD34⁺及 $\beta_2\text{M}^+/\text{Thy-1.1}^+$ 细胞水平升高, 而c-kit⁺和Flt-2/3⁺细胞的数量没有改变. 移植肝标本免疫组化结果发现, 在门脉周围出现的是CD34⁺/Thy-1.1⁺/c-kit⁺或CD34⁺/Thy-1.1⁺/c-kit⁻细胞^[23]. 所以认为CD34⁺细胞是参与移植肝再生的重要的干细胞亚群. 人类研究也同样发现移植CD34⁺细胞可以参与移植肝的再生. 2006年, Lemoli等人^[26]研究发现, 人类OLT可以动员受者骨髓造血干/祖细胞(CD34⁺/CD90⁺)及内皮干/祖细胞(CD34⁺/VEGFR-2⁺)入外周血, 而且动员的HSC还表达GATA-4, CK19及AFP等肝性标志, 证明其有参与移植肝再生的潜能. 与HSC相比, 内皮干/祖细胞在组织损伤修复中发挥不同的作用. 器官损伤修复既包括实质细胞增殖也包括血管重建, 所以在肝组织损伤时动员的内皮干/祖细胞可能是参与血管的重建. 另外小鼠实验证实^[15], 部分肝切除可以动员骨髓内皮祖细胞参与肝脏SEC的再生, 后者又可以促进肝细

胞的增殖. 肝移植损伤动员的内皮祖细胞可能以同样的方式参与移植肝再生. 在人类LDLT研究中发现, 供者部分肝切除又可动员骨髓髓系祖细胞进入外周循环^[27]. 另有大量实验证明, 骨髓间充质干细胞具有参与肝再生的潜能^[25,28], 但是否能在移植肝再生中发挥作用还没有得到证实, 我们实验室正在进行此方面的研究. 综合上述研究结果, 认为干细胞“可塑性”的概念可能并不只局限于单一干细胞群, 而更可能是骨髓细胞的一个一般特性, 根据不同的刺激因素来调配其转录计划. 这可能是骨髓中不同特征的干细胞参与肝再生的原因.

(ii) BMDSC动员并向移植肝定向迁移的机制. 人类及动物研究都已证实, 各种原因造成的严重肝损伤可以动员BMDSC进入外周血继而迁移至肝脏发挥修复作用. 在肝移植过程中, 急性排斥损伤、缺血再灌注损伤及PLT肝量丢失等损伤是刺激BMDSC入血的主要因素^[25,27].

SDF-1 (stromal cell-derived factor-1)是由各种骨髓基质细胞和各种正常组织上皮细胞产生的CXC趋化因子, 对造血干/祖细胞的归巢、迁移、增殖、分化以及存活都起着非常重要的作用, 主要是通过与其受体CXCR4的相互作用发挥调节效应^[29]. 成体骨髓中的HSCs释放入血与骨髓微环境形成的SDF-1浓度梯度有关^[30-32]. 研究显示, 肝移植引起免疫排斥损伤、缺血再灌注损伤可以使肝内SDF-1表达增加, 提示损伤肝可能通过在肝脏和骨髓之间形成一个SDF-1的浓度梯度来招募骨髓HSCs进入血循环进而进入肝脏^[31]. 而这种浓度梯度的形成可能与MMP-9 (matrix metalloproteinase-9)等蛋白裂解酶产生增加有关^[33]. 研究表明, 急性排斥损伤^[34]、缺血再灌注损伤^[35]可以引起人体血中MMP-9的水平升高. MMP-9可以降解骨髓中的SDF-1, 造成SDF-1低浓度, 进而促进干细胞释放. 移植肝损伤也可以使循环中的IL-8水平升高, 通过诱导和激活MMP-9间接促进HSCs的释放^[36]. Lemoli等人^[26]实验发现, 人类OLT后, 循环中CXCR4阳性表达的CD34⁺细胞数量增加, 也进一步证明了这一观点. 此外, 肝移植后, 肝内及循环中HGF增加可能通过促进CXCR4与SDF-1相互作用而诱导干细胞向肝脏迁移^[32,37]. 肝移植不仅可以动员HSC, 而且还可以动员内皮干/祖细胞, 研究证实后者的发生可能是VEGF及其受体VEGFR-2⁺的相互作用的结果^[15,24].

1.4 BMDSC 参与肝损伤修复过程中存在的问题

虽然BMDSC能够以不同的方式参与肝损伤的修复,但有报道显示,BMDSC的某些亚群可能与受损肝脏的慢性纤维化形成有关,其中以BMMSC的作用最为显著^[38]。慢性肝病引起的纤维化主要是以I型胶原为主的细胞外基质的沉积^[39]。肝损伤可以引起静息状态的肝星状细胞活化转变成高表达I型胶原的具有成肌纤维表型的细胞^[39]。在CCl₄肝硬化损伤小鼠模型中发现肝,内有68%的肝星状细胞和70%成肌纤维细胞源自移植的骨髓细胞^[38]。而在胆道结扎引起的慢性肝损伤小鼠模型中却没有发现骨髓来源的活化的星状细胞^[39]。就目前的研究可以从两个方面来加以解释:一方面是不同的肝损伤模型引起的肝纤维化的机制可能不同;另一方面就是所移植入受鼠的骨髓细胞并不是单一细胞成分,即便前一研究也应用了MSCs和HSCs移植,但做到从骨髓中100%纯化出这两种细胞却是不可能的。

近年来,肿瘤干细胞与成体干细胞的相似性使人们联想到某些肿瘤干细胞可能来源于成体干细胞^[40]。肝细胞的恶性转化可能与慢性肝损伤、再生及硬化密切相关。肝细胞通过增殖和产生细胞外基质来修复损伤肝脏,但是反复发生的损伤-修复过程则会增加突变的几率最终发展成肿瘤^[41]。肝损伤过程中,BMDSC可以被招募至肝内通过分化为卵圆细胞和肝细胞参与肝再生^[9,37]。这种持续再生可以导致过度增殖同样增加了恶性转变的几率。此外,细胞外基质的转变又启动了级联反应:抑制肝特异性转录因子活化,从而阻断干细胞的成熟,最终导致肝细胞癌的出现^[42]。所以有人提出HCC可能来源于BMDSC。

虽然BMDSC的肝向分化潜能给我们带来了希望,但是它们又有在肝损伤修复时发挥负面作用的可能,这使得我们不得不在应用BMDSC损伤修复功能的过程中更加慎重。

2 BMDSC 与移植肝免疫耐受

急慢性移植排斥损伤经常使肝移植功能丧失,虽然应用免疫抑制剂大大促进了肝移植的发展,但是长期应用免疫抑制剂增加了受者感染的机会,有学者认为肝移植术后肝细胞癌及丙型肝炎的高复发率可能与长期应用免疫抑制剂有关^[3,4]。因此,解决这些问题的关键在于诱导移植肝免疫耐受。而BMDSC因其特定的生物学特征可以从不同角度、以

不同方式参与移植肝免疫耐受的诱导。

2.1 供者来源 BMDSC 与移植肝耐受

有报道显示,有大约20%的肝移植受者对移植肝可以产生自发免疫耐受,从而停止免疫抑制剂的应用,但是尚无法证实这些病例移植后不使用免疫抑制剂是安全的^[43]。在肾移植的研究中发现,在不应用免疫抑制剂的情况下,通过移植前给予受者骨髓预处理并输注供体HSC可诱导对移植肾的耐受^[44]。在肝移植中也有同样的报道。Mellgren等人^[45]和Susanne等人^[46]分别在应用CD34⁺干细胞治疗先天遗传病和血液病后,由于受者肝功能衰竭而进行同一供者来源的LDLT,结果发现移植肝耐受的发生,且移植后只需要小剂量应用免疫抑制剂,甚至可以完全停用。由此认为,同一供者来源的干细胞输注在诱导移植肝免疫耐受中发挥了重要作用。但是,输注之前应用放射或化学药物进行骨髓抑制处理,会对机体造成毒性损伤,而且在造血细胞输注后还有引起移植植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)的危险,在某种程度上限制了这一方法的应用。2004年,Donckier等人^[47]在给2例肝病患者行LDLT前,没有进行骨髓抑制,而是先给受者输注HLA配型不符的供者来源CD34⁺细胞,然后分别在输注后40和55d实施LDLT,结果诱导了供者特异性的免疫耐受使肝移植植物长期存活,而且没有观察到GVHD的发生,证明HSC在这一治疗中起到了关键作用。2006年,Donckier等人^[48]又进行了LDLT之后第7天输注同一供者来源的干细胞的研究,也得到了同样的结果,而且在术后早期即停止了免疫抑制治疗。以上报道中所输注的CD34⁺干细胞均是从G-CSF动员后的供者外周血中收集而来,而成体骨髓的HSC含量最丰富,故认为这些细胞最可能来源于骨髓。鼠类研究认为,供者骨髓细胞的这一作用主要是增加了受体体内供-受免疫细胞共存的微嵌合水平;而在人类和大动物研究中却没有发现持续存在的微嵌合现象^[47,48],认为这可能是由于血管性移植植物自身作为供者抗原表达细胞的来源而参与维持免疫耐受。目前广泛开展的LDLT使获得供者来源的BMDSC成为可能,这就为其广泛应用于临床奠定了基础。

2.2 受者来源 BMDSC 与移植肝耐受

除了供者BMDSC外,受者自体的BMDSC也可能参与免疫耐受的形成。Avital等^[24]在大鼠OLT术后

经门静脉输注受者自体骨髓 $\beta_2\text{M}^-/\text{Thy-1}^+$ 细胞,这些细胞逐步分化并替代了60%的供肝实质细胞,在短期小剂量应用免疫抑制剂的情况下明显减轻了移植肝的急性排斥损伤,使受鼠长期存活。在人类也已证实BMDSC可以参与移植肝再生。这些结果说明,可以利用干细胞参与移植肝排斥损伤修复的功能,使异体移植自体化,从而诱导移植肝免疫耐受。

2.3 作为基因治疗靶细胞参与移植肝耐受

20世纪90年代以来,随着基因转移技术的迅速发展及基因治疗理论和实践的不断完善,使基因治疗成为在分子水平研究移植免疫耐受的重要手段。目前,CTLA4, CD40, FasL, MHC I 抗原等是常用的基因治疗的靶基因。BMDSC在体外易培养和扩增,在体内是个相对静止、更新率低的群体,外源基因的表达可以持续较长的时间,并且其代谢活力高,有利于重组蛋白的分泌,是基因治疗理想的靶细胞。Bagley等人^[49]的研究证实,将供者MHC I 基因转移的受者骨髓细胞回输体内可以诱导供者特异性免疫无反应性。在LDLT,人们完全有机会在移植术前通过转基因方法构建表达这些基因的受者骨髓细胞然后回输给受者,从而诱导免疫耐受。

3 结语与展望

据不完全统计,从1994年末到2005年初,等待肝移植的患者数量已从4000增加到17000,是原来的4倍还多。而且在终末期肝病患者中,待移植患者的死亡率远远高于行肝移植手术的患者死亡率^[50]。这一方面说明肝移植是治疗严重肝病的最有效的方法,另一方面也凸显出供肝来源短缺所带来的严重后果。LDLT在某种程度上扩大了供肝池,部分解决了尸肝来源严重不足的问题。然而,由于移植后免疫抑制剂的毒副作用、肝炎复发、“小肝综合征”等问题的存在限制了其广泛开展。另外,对于健康供者,如果切除的肝移植超过供者肝脏的70%时,就会威胁到其生命^[51]。因此,目前肝移植术前急需解决的问题就是如何延长待移植患者的生命,直到寻找到相匹配的供肝进行肝移植;而移植术后尤其在LDLT,如何促进受者及供者肝功能恢复以及寻找到免疫抑制剂替代疗法又成为肝移植治疗的重中之重。面对这些问题,将BMDSC移植应用于临床可能会开辟出新的解决途径。BMDSC可自体取材,易于分离,来源充足,增殖能力强,在体内外均有很强的向肝系细胞分化

的能力,而供者BMDSC移植又可以诱导供者特异性的免疫耐受,在短期或小剂量应用免疫抑制剂的情况下使肝移植长期存活。而且,目前各种BMDSC亚群的分离、富集及移植手段也越来越成熟,LDLT又使获得同一供者来源的BMDSC成为可能。以上这些为BMDSC的临床应用既奠定了理论基础也奠定了技术基础。自体BMDSC移植不仅有望为肝衰竭患者在等待供肝的过程中争取更多的时间,而且也可以作为肝移植术后受者及供者肝功能恢复的一种有效支持治疗应用于临床,此外同一供者BMDSC移植又可减少甚至替代免疫抑制剂的应用,从而减轻甚至避免各种毒副作用的出现。

综上所述,无论是从参与再生的角度,还是从诱导免疫耐受的角度,无论从术前的角度,还是从术后的角度,无论从受者的角度,还是从活体供者的角度,BMDSC移植都显示了辅助肝移植治疗肝衰竭,进而拓宽肝移植发展空间的强大优势,可能为肝移植的发展带来新的契机,为广大肝病患者的带来新的希望。

参 考 文 献

- 1 Wiesner R H, Rakela J, Ishitani M B, et al. Recent advances in liver transplantation. *Mayo Clin Proc*, 2003, 78: 197—210
- 2 Abouljoud M, Yoshida A, Dagher F, et al. Living donor and splitliver transplantation: An overview. *Transpl Proc*, 2003, 35: 1772—74
- 3 Charlton M. Recurrence of hepatitis C infection: Where are we now? *Liver Transpl*, 2005, 11(S1): S57—S62[DOI]
- 4 Marco V, Alessandro C, Fabio P, et al. Analysis of risk factor for tumor recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Key role of immunosuppression. *Liver Transpl*, 2005, 11: 497—503[DOI]
- 5 Wang Y F, Nan X, Li Y H, et al. Induction of umbilical blood-derived $\beta_2\text{M}^-/\text{c-met}^+$ cell into hepatocyte-like cells by coculture with CFSC/HGF cells. *Liver Transpl*, 2005, 11: 635—643[DOI]
- 6 王福芳, 南雪, 张锐, 等. 转基因肝星状细胞定向诱导骨髓 $\text{Thy-1}+\beta_2\text{M}^-$ 细胞向肝细胞分化. *科学通报*, 2004, 49: 549—553
- 7 Robert L, Helen B, Douglas M, et al. *Handbook of Stem Cells*. vol 2. Washington: Academic Press, 2004. 487—490
- 8 Okumura K, Nakamura K, Hisatomi Y, et al. Salivary gland progenitor cells induced by duct ligation differentiate into hepatic and pancreatic lineages. *Hepatology*, 2003, 38: 104—113[DOI]
- 9 Petersen B E, Bowen W C, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, 1999, 284: 1168—1170[DOI]
- 10 Jang Y Y, Collector M I, Baylin S B, et al. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol*, 2004, 6: 532—539[DOI]
- 11 Schwartz R E, Reyes M, Koodie L, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*, 2002, 109: 1291—1302[DOI]
- 12 Oyagi S, Hirose M, Kojima M, et al. Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into

- CCl₄-injured rats. *J Hepatol*, 2006, 44: 742—748[DOI]
- 13 Lagasse E, Connors H, A-Dhalimy M, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med*, 2000, 6: 1229—1234[DOI]
 - 14 Theise N D, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*, 2000, 32: 11—16[DOI]
 - 15 Fujii H, Hirose T, Oe S, et al. Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatol*, 2002, 36: 653—659[DOI]
 - 16 Vassilopoulos G, Wang P, Russell D W. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature*, 2003, 422: 901—904[DOI]
 - 17 Wang X, Willenbring H, Akkari Y, et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*, 2003, 422: 897—901[DOI]
 - 18 Sato Y, Araki H, Kato J, et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*, 2005, 106: 756—763[DOI]
 - 19 Wilson K S, Timmons C F, Hilton D S, et al. Chromosomal instability in hereditary tyrosinemia type I. *Pediatr Pathol*, 1994, 14: 1055—1057
 - 20 Harris R G, Herzog E L, Bruscia E M, et al. Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science*, 2004, 305: 90—93[DOI]
 - 21 Pahlavan P S, Feldmann R E, Zavos C, et al. Prometheus' challenge: Molecular, cellular and systemic aspects of liver regeneration. *J Surg Res*, 2006, 134: 238—251[DOI]
 - 22 Tanaka K, Ogura Y. "Small-for-size graft" and "Small-for-size syndrome" in living donor liver transplantation. *Yonsei Med J*, 2004, 45: 1089—1094
 - 23 Liu F, Pan X B, Chen G D, et al. Hematopoietic stem cell mobilization after rat partial orthotopic liver transplantation. *Transpl Proc*, 2006, 38: 1603—1609[DOI]
 - 24 Avital I, Feraresso C, Aoki T, et al. Bone marrow-derived liver stem cell and mature hepatocyte engraftment in livers undergoing rejection. *Surgery*, 2002, 132: 384—90[DOI]
 - 25 Liu F, Pan X B, Chen G D, et al. Hematopoietic stem cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor partly contribute to liver graft regeneration after partial orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl*, 12: 1129—1137
 - 26 Lemoli R M, Lucia C, Simona T, et al. Mobilization of bone marrow-derived hematopoietic and endothelial stem cells after orthotopic liver transplantation and liver resection. *Stem Cells*, 2006, 24: 2817—2825[DOI]
 - 27 Gehling U M, Willems M, Dandri M, et al. Partial hepatectomy induces mobilization of a unique population of haematopoietic progenitor cells in human healthy liver donors. *J Hepatol*, 2005, 43: 845—853[DOI]
 - 28 Aurich I, Mueller L P, Aurich H, et al. Functional integration of human mesenchymal stem cell-derived hepatocytes into mouse livers. *Gut*, 2007, 56: 405—15[DOI]
 - 29 Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol*, 2002, 3: 687—694[DOI]
 - 30 Terada R, Yamamoto K, Hakoda T, et al. Stromal cell-derived factor-1 from biliary epithelial cells recruits CXCR4-positive cells: Implications for inflammatory liver diseases. *Lab Invest*, 2003, 83: 665—672[DOI]
 - 31 Goddard S, Williams A, Morland C, et al. Differential expression of chemokines and chemokine receptors shapes the inflammatory response in rejecting human liver transplants. *Transplantation*, 2001, 72: 1957—1967[DOI]
 - 32 Dalakas E, Newsome P N, Harrison D J, et al. Hematopoietic stem cell trafficking in liver injury. *FASEB J*, 2005, 19: 1225—1231[DOI]
 - 33 Kollet O, Shvitzel S, Chen Y Q, et al. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34⁺ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest*, 2003, 112: 160—169[DOI]
 - 34 Kuyvenhoven J P, Verspaget H W, Gao Q, et al. Assessment of serum matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 after human liver transplantation: Increased serum MMP-9 level in acute rejection. *Transplantation*, 2004, 77: 1646—1652[DOI]
 - 35 Kuyvenhoven J P, Molenaar I Q, Verspaget H W, et al. Plasma MMP-2 and MMP-9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 during human orthotopic liver transplantation. The effect of aprotinin and the relation to ischemia/reperfusion injury. *Thromb Haemost*, 2004, 91: 506—513
 - 36 Pruijt J F, Verzaal P, van O R, et al. Neutrophils are indispensable for hematopoietic stem cell mobilization induced by interleukin-8 in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 6228—6233[DOI]
 - 37 Wang X, Ge S, McNamara G, et al. Albumin-expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice that received transplants of highly purified human hematopoietic stem cells. *Blood*, 2003, 101: 4201—4208[DOI]
 - 38 Russo F P, Alison M R, Bigger B W, et al. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology*, 2006, 130: 1807—1821[DOI]
 - 39 Tatiana K, Hiroshi U, Nikki F, et al. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatol*, 2006, 45: 429—438[DOI]
 - 40 Rubio D, Garcia-Castro J, Martin M C, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res*, 2005, 65: 3035—3039
 - 41 Bissell D M. Chronic liver injury, TGF-beta, and cancer. *Exp Mol Med*, 2001, 33: 179—90
 - 42 Wu X Z, Yu X H. Bone marrow cells: The source of hepatocellular carcinoma? *Med Hypotheses*, 2007, 69: 36—42[DOI]
 - 43 Devlin J, Doherty D, Thomson L, et al. Defining the outcome of immunosuppression withdrawal after liver transplantation. *Hepatology*, 1998, 27: 926—933[DOI]
 - 44 Spitzer T R, Delmonico F, Tolkoff-Rubin N, et al. Combined histoincompatibility leukocyte antigen-matched donor bone marrow and renal transplantation for multiple myeloma and end stage renal disease: The induction of allograft tolerance through mixed lymphohematopoietic chimerism. *Transplantation*, 1999, 68: 480—484[DOI]
 - 45 Mellgren K, Fasth A, Saalman R, et al. Liver transplantation after stem cell transplantation with the same living donor in a monozygotic twin with acute myeloid leukemia. *Ann Hematol*, 2005, 84: 755—757[DOI]
 - 46 Susanne M M, Christina P, Alfred K, et al. Successful stem cell transplantation following orthotopic liver transplantation from the same haploidentical family donor in a girl with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*, 2000, 96: 3997—3999
 - 47 Donckiera V, Troisib R, Tounouz M, et al. Donor stem cell infusion after non-myeloablative conditioning for tolerance induction to HLA mismatched adult living-donor liver graft. *Transpl Immunol*, 2004, 3: 139—146[DOI]
 - 48 Donckier V, Troisi R, Le Moine A, et al. Early immunosuppression withdrawal after living donor liver transplantation and donor stem cell infusion. *Liver Transpl*, 2006, 12: 1523—1528[DOI]
 - 49 Bagley J, Tian C, Sachs D H, et al. Induction of T-cell tolerance to an MHC class I alloantigen by gene therapy. *Blood*, 2002, 99: 4394—4399[DOI]
 - 50 Merion R M, Schaubel D E, Dykstra D M, et al. The survival benefit of liver transplantation. *Am J Transpl*, 2005, 5: 307—313[DOI]
 - 51 Kokudo N, Sugawara Y, Imamura H, et al. Tailoring the type of donor hepatectomy for adult living donor liver transplantation. *Am J Transpl*, 2005, 5: 1694—1703[DOI]