

· 综述 ·

“异常肝再生”的发生机制及其在肝纤维化治疗中的作用

乔露瑶, 张晓伟*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

摘要: 肝纤维化是酒精性肝病、病毒性肝炎和结节性肝硬化等多种慢性肝病的核心病理改变, 而肝再生则是肝脏对抗多种损伤、促进炎症转归并逆转肝纤维化的关键机制。当肝脏受到损伤发生纤维化时, 纤维化肝脏再生状态的改变通常对多种肝病的转归起到重要作用。本文从发生条件、肝脏基础状态、对肝脏修复的影响、涉及到的细胞种类及发生机制等方面对“稳态肝再生”、“正常肝再生”与“异常肝再生”进行区别, 重点总结“正常肝再生”和“异常肝再生”的发生机制, 详细介绍了常用肝纤维化模型中的“异常肝再生”情况并进行总结, 基于“异常肝再生”的发生机制探究了与其相关的肝纤维化治疗策略, 并考虑其潜在风险, 以期对临床肝纤维化的治疗提供借鉴依据。

关键词: 肝再生; 肝硬化; 肝细胞; 星形细胞

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)10-2243-13

Mechanism of "aberrant liver regeneration" and its role in treatment of liver fibrosis

QIAO Lu-yao, ZHANG Xiao-wei*

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Liver fibrosis is a critical pathological structural basis of a variety of chronic liver diseases such as alcoholic liver disease, viral hepatitis and nodular cirrhosis, while liver regeneration is the key mechanism for protecting liver against multiple injuries, promoting inflammation resolution and reversing liver fibrosis. When fibrosis occurs after liver injuries, the alternation of liver regeneration status in fibrosis usually plays an essential role in the outcome of diverse liver diseases. In this review, the differences between "homeostatic regeneration", "normal regeneration" and "aberrant regeneration" were identified in terms of the occurrence conditions, the basic state of the liver, the effects on liver repair, the types of cells involved and the pathogenesis. Emphatically, we not only summarize the differences of mechanisms between "aberrant regeneration" and "normal regeneration" in the pathogenesis of liver fibrosis, but also elucidate the features of "aberrant regeneration" in various liver fibrosis models, as well as the therapeutic strategies for the treatment of liver fibrosis based on "aberrant regeneration", expecting to provide evidence and clues for considering the risks and proposing possible solutions in clinical treatment of liver fibrosis.

Key words: liver regeneration; cirrhosis; hepatocyte; hepatic stellate cell

组织纤维化是由各种因素诱发的结缔组织成分过

度沉积造成的一种病理改变, 可影响包括皮肤、肺、肝脏和肾脏等在内的诸多器官和系统, 最终引发器官功能障碍。纤维化疾病具有高发病率和高死亡率的特点, 据统计, 发达国家中多达45%的死亡均归因于纤维化反应^[1]。其中肝纤维化是病毒性肝炎、胆道梗阻和酒精肝等多种慢性肝病的核心病理改变。在各种

收稿日期: 2020-03-10; 修回日期: 2020-04-10.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773800); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目 (2016-I2M-1-010).

*通讯作者 Tel: 86-10-83161187, E-mail: zhxw@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0282

内、外致病原引起的持续肝损伤条件下,肝纤维化会进一步发展成肝硬化,而肝硬化是肝功能衰竭和原发性肝癌的重要诱发因素,也是引起肝病患者死亡的主要原因。在肝纤维化病理过程中,存在着结缔组织的修复,而肝星形细胞 (hepatic stellate cells, HSCs) 在结缔组织修复和肝纤维化过程中发挥着关键作用。

在纤维化发生的同时,肝脏在受到损伤之后会激活自身细胞补偿性生长,以取代因损伤而丢失的组织,该过程称为肝再生。肝细胞是肝脏的主要组成部分,约占肝脏细胞的80%,也是肝脏损伤的重要参与者,其能够通过增殖来恢复肝脏的结构,进而维持机体内环境稳定所必需的肝脏功能,在肝再生过程中扮演主要角色。此外,胆汁淤积会导致肝脏和血液中胆汁酸 (bile acids, BAs) 积累,引起胆道的增殖反应,称为导管反应^[2],导管反应亦可作为一种祖细胞来源,这种祖细胞可以分化成肝细胞或胆管细胞以增强肝脏再生。

肝再生与结缔组织增生修复作为肝脏修复自身损伤的两种机制,同时存在于肝纤维化进程中。根据诱发原因的不同,将不同条件下的肝再生分为“稳态肝再生”、“正常肝再生”和“异常肝再生”,其中慢性肝损伤条件下纤维化肝脏的“异常肝再生”更为常见。阐明“异常肝再生”与“正常肝再生”的机制和常见肝纤维化中的“异常肝再生”状态,对于准确把握纤维化与再生之间的相互联系至关重要。本文以肝脏中的实质细胞 (parenchymal cells, PCs) 和常见非实质细胞 (nonparenchymal cells, NPCs) 在不同类型肝再生中的作用为论述单元,对不同类型肝再生的发生机制进行综述,在“异常肝再生”发生机制的基础上,进一步探究了增加“异常肝再生”逆转肝纤维化的治疗策略并考虑其潜在风险,以期为临床肝纤维化的治疗提供新的见解与思路。

1 肝再生的分类和机制

根据肝脏所处状态的不同,研究者将不同条件下的肝再生分为“稳态肝再生”、“正常肝再生”和“异常肝再生”^[3]。在稳态条件下的成人肝脏中,肝窦内皮细胞 (liver sinusoidal endothelial cells, LSECs) 分泌肝脏中最重要的抗增殖因子——转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β), 阻碍生理条件下的肝细胞增殖,绝大多数肝细胞处于有丝分裂静止的状态,即处于

细胞周期的G0期,所以健康状态下的肝脏仅存在极少量的再生。研究者将此种再生情况称为稳态肝再生 (表1)。由于稳态肝再生的临床研究价值不高,在此暂不赘述。临床中受损肝脏的肝再生居多,其中纤维化肝脏中的肝再生最为常见,因此本文重点探究“异常肝再生”的相关机制,并对“正常肝再生”和“异常肝再生”进行区分。

1.1 正常肝再生

经历部分肝切除或急性肝损伤后,肝脏会发生再生修复,在此种情况下,肝脏本身无基础病变,因此称这种再生为“正常肝再生”。此时肝脏NPCs如巨噬细胞、HSCs和LSECs均可向肝细胞发出信号,使其从静止状态进入有丝分裂阶段,从而诱导肝脏再生 (表1)。HSCs未激活为成纤维细胞,纤维化瘢痕极少或没有。研究“正常肝再生”最常用的模型是肝部分切除术 (partial hepatectomy, PHx) 模型,且该手术模型已经在大鼠和小鼠中得到可靠的验证。

1.1.1 “正常肝再生”中的肝细胞来源 在“正常肝再生”中,肝细胞自我复制是主要的再生来源。遗传谱系追踪和单细胞测序的最新研究表明,肝细胞存在异质性^[4]。最近的研究表明,再生能力在肝细胞之间分布不均,集中在肝小叶或位于中央静脉周围的部分肝细胞中,表现出高端粒清除活性或活跃的Wnt信号传导^[5]。端粒酶高表达的肝细胞 (high telomerase expression hepatocytes, Tert^{high} hepatocytes) 分布在整个肝小叶中,并参与了所有小叶区域肝细胞的再生^[6]。此外也有报道称,中央静脉周围的轴抑制蛋白2 (axis inhibition protein 2, Axin2) 高表达肝细胞可引发Wnt相关信号通路,随着时间的推移可以再生肝小叶^[7] (图1a)。但是, Axin2⁺肝细胞在“正常肝再生”中的作用仍存在争议^[8], Tert^{high}肝细胞和 Axin2⁺肝细胞对“正常肝再生”的贡献仍有待进一步证实。

1.1.2 LSECs调节“正常肝再生” LSECs对“正常肝再生”的调节具有双相性,前期诱导肝细胞增殖促进肝再生,后期抑制肝细胞增殖从而调节再生终止 (图1a)。在“正常肝再生”的前期, LSECs中血管紧张素2 (angiotensin 2, ANG2) 和TGF- β 的分泌减少,解除了稳态时期由TGF- β 引起的肝细胞增殖抑制,促进肝再生;相反,在“正常肝再生”后期, ANG2分泌增加,在此

Table 1 Classification and comparison of liver regeneration. PHx: Partial hepatectomy; PCs: Parenchymal cells; NPCs: Nonparenchymal cells

Type of liver regeneration	Condition of regeneration	Basic state of liver	Effect on liver repair	Type of cells involved
Homeostasis regeneration	Homeostasis	Healthy	Benign	Few hepatocytes
Normal regeneration	PHx/Acute injury	Without underlying disease	Benign	Almost all PCs and NPCs
Aberrant regeneration	Chronic injury	Fibrosis	Benign	Almost all PCs and NPCs

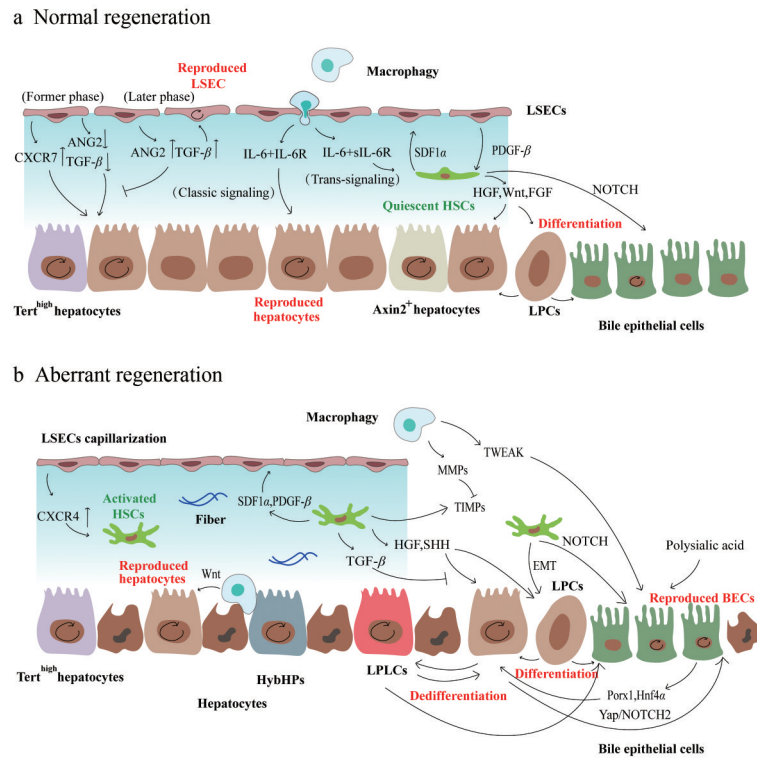


Figure 1 Mechanisms of normal regeneration and aberrant regeneration. (a) In normal regeneration, LSECs promotes/inhibits the proliferation of hepatocytes by regulating the increase/decrease of ANG2 and TGF- β in the former/later phase. In addition, the increase of CXCR7 in LSECs promotes the proliferation of hepatocytes. Macrophages (Kupffer cells in the liver) activate hepatocyte proliferation through the IL-6 classic signaling pathway, or activate the IL-6 *trans*-signaling pathway to promote HSCs to secrete HGF, which indirectly promotes hepatocyte proliferation. Quiescent HSCs and LSECs promote vascular endothelial formation through SDF- α and PDGF- β interactions. HSCs can secrete HGF, Wnt and FGF to promote liver cell proliferation and LPCs differentiation. In addition, HSCs promote the proliferation of bile epithelial cells by NOTCH. At this time, hepatocytes are derived from Tert^{high} hepatocytes, Axin2⁺ hepatocytes and LPCs. (b) In aberrant regeneration, LSECs' upregulation of CXCR4 promotes the activation of HSCs and inhibits regeneration. When macrophages phagocytose necrotic cells, they activate Wnt-related signaling pathways and promote hepatocyte proliferation. TWEAK secreted by macrophages promotes the proliferation of bile epithelial cells, while MMPs antagonizes TIMPs secreted by HSCs and promotes the degradation of ECM. Activated HSCs secrete HGF and SHH to promote liver cell proliferation and LPCs differentiation, but TGF- β in the later stage inhibits liver cell proliferation. At this time, hepatocytes are derived from HybHPs, Tert^{high} hepatocytes, LPLCs and LPCs. Hepatocytes, LPLCs and bile epithelial cells could transform into each other under certain conditions. LSECs: Liver sinusoidal endothelial cells; ANG2: Angiotensin 2; TGF- β : Transforming growth factor- β ; CXCR7: Chemokine receptor 7; HGF: Hepatocyte growth factor; HSCs: Hepatic stellate cell; SDF1 α : Stromal cell derived factor 1 α ; PDGF- β : Platelet-derived growth factor receptor β ; FGF: Fibroblast growth factor; LPCs: Liver progenitor cells; Tert^{high} hepatocytes: High telomerase expression hepatocytes; Axin2: Axis inhibition protein 2; CXCR4: Chemokine receptor 4; TWEAK: Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis; MMPs: Matrix metalloproteinases; TIMPs: Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases; ECM: Extracellular matrix; SHH: Sonic hedgehog; HybHP: Hybrid hepatocytes; LPLCs: Liver progenitor-like cells

阶段它激活血管内皮细胞生长因子受体2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR-2) 和人血管生成素受体酪氨酸激酶2 (tyrosine kinase receptors with immunoglobulin and EGF homology domains receptors-2, TIE-2) 相关信号传导, 使LSECs增殖增加; 同时TGF- β 1含量上升, 抑制肝细胞增殖。除此之外, 急性损伤后, LSECs上调趋化因子受体7 (chemokine receptor 7, CXCR7), CXCR7可增加DNA结合抑制蛋白 (inhibitor of DNA binding 1, Id1) 的表达^[9]。Id1是

一种转录因子, CXCR7-Id1可诱导产生Wnt2和肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF), 从而刺激肝脏再生。

1.1.3 库普弗细胞调节“正常肝再生” 库普弗细胞是肝脏中的特殊巨噬细胞, 是位于肝窦内表面的吞噬细胞, 能够清除血液中的外来抗原、抗原-抗体复合物和细胞碎片等物质, 亦称为肝巨噬细胞。它是单核吞噬细胞系统的一部分, 由血液单核细胞黏附于肝窦壁上分化而成。在肝纤维化过程中, 可见库普弗细胞的

增生。

白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 在“正常肝再生”中发挥重要作用, HGF 和 IL-6 的协同作用通过促进肝细胞有丝分裂和存活来控制再生。在“正常肝再生”中, 包括脂多糖在内的肠源性因子激活库普弗细胞, 以肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF α) 依赖的方式分泌 IL-6。IL-6 调节肝再生的相关信号通路根据崩解素和金属肽酶 (a disintegrin and metalloproteinase, ADAM) 蛋白酶是否激活可分为两种: ADAM 未激活的 IL-6 经典信号通路和 ADAM 激活 IL-6 反式信号通路^[10] (图 1a)。① 在经典信号通路中, IL-6 与细胞膜 IL-6 受体 (IL-6 receptor, IL-6R) 结合, 随后发生糖蛋白 130 (glycoprotein 130, gp130) 二聚反应, 导致 JAK/STAT、MAPK、PI3K/AKT 信号通路活化, 但 IL-6 或 IL-6R 单独与 gp130 无亲和力^[11]。IL-6R 的表达存在于几种细胞类型中, 包括免疫细胞和肝细胞, 肝细胞被 IL-6 经典信号直接激活促进再生。② 在反式信号通路中, 由 ADAM 蛋白酶产生可溶性 IL-6 受体 (soluble IL-6 receptor, sIL-6R)。尽管肝细胞表达相对较高的 IL-6R 水平, 但肝切除术后的 sIL-6R 水平也有所增加, 使肝脏内的局部反式信号转导成为可能。相关研究证实, 阻断 IL-6 反式信号与阻断经典 IL-6 信号一样有损肝再生^[10]。但 IL-6 反式信号转导是否可以完全补偿“正常肝再生”中的 IL-6 经典信号转导仍有待进一步探究。HGF 可由 HSCs 产生, 并在“正常肝再生”诱导肝细胞增殖中起重要作用。尽管 HSCs 表达 gp130 和 IL-6R, 但其仅可以通过 IL-6 反式信号刺激 HGF 的产生。这种现象的原因尚不清楚, 但 HSCs 中 IL-6R 的免疫组织化学染色显示, 其大多数 IL-6R 蛋白存在于细胞内区室中, 推测这可能会阻止经典信号传导的有效诱导。

1.1.4 HSCs 调节“正常肝再生” “正常肝再生”过程中, 绝大部分 HSCs 处于静息状态。HSCs 可分泌基质细胞衍生因子 1 α (stromal cell derived factor 1 α , SDF1 α), 而 LSECs 表达其受体 CXCR4; 同时, LSECs 产生血小板衍生生长因子受体 β (platelet-derived growth factor receptor β , PDGF β), 而 HSCs 表达其受体。SDF1 α 和 PDGF β 信号维持 HSCs 和 LSECs 之间的紧密联系, 促进肝再生中血管的形成^[12]。受库普弗细胞分泌的 IL-6 的影响, HSCs 可分泌 HGF 促进肝细胞增殖, 还可通过产生生长因子如 Wnt、成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 和视黄酸来调节肝祖细胞 (liver progenitor cells, LPCs) 的分化和肝细胞的增殖^[10]。通过控制肝脏中的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 成分, HSCs 可调节肝细胞和 LPCs 向胆管细胞的分化。此外, HSCs 可通过 NOTCH 信号通路

促进胆道细胞的发育 (图 1a)。

1.2 异常肝再生

在临床实践中, 相对于本身无基础病变的正常肝脏的“正常肝再生”, 受损肝脏的“异常肝再生”更为常见。研究者将慢性肝损伤, 即纤维化相关肝损伤后肝脏发生的再生称为“异常肝再生”。在纤维化肝脏中, “异常肝再生”作为一种良性修复过程对抗损伤进展, 相关机制区别于“正常肝再生” (表 1)。此时肝细胞和胆管上皮细胞受损或逐渐衰老失去分裂能力, 静止的 HSCs 被激活为成纤维细胞, 促使 ECM 过度沉积, 导致肝纤维化^[13]。肝脏中纤维化瘢痕的形成可抑制肝细胞增殖。此外, 在再生受损期间发生的“胆管反应”与纤维化之间也存在着复杂的关系^[14], 其一方面可以作为一种祖细胞来源, 这种祖细胞可以分化成肝细胞或胆管细胞以增强肝脏再生; 另一方面, 它也可导致门静脉周围纤维化, 最终发展为肝硬化并导致死亡。相关研究亦表明, 来自 LSECs 的血管平滑肌信号在急性肝损伤后可促进再生, 在慢性肝损伤后可引起肝纤维化^[9]。消除损伤因素后, 瘢痕组织可被降解, 巨噬细胞被认为是发挥降解作用的关键细胞, 其分泌可降解瘢痕组织的基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) (图 1b)。如果肝损伤因素持续存在, 瘢痕组织持续积累, 肝再生进一步被抑制, 纤维化程度加重, 最终将发展为肝硬化。

1.2.1 “异常肝再生”中的肝细胞来源 发生慢性损伤时, Tert^{high} 肝细胞、混合肝细胞 (hybrid hepatocytes, HybHPs)、源自肝细胞的 Sox9⁺ 肝祖细胞样细胞 (liver progenitor-like cells, LPLCs) 和胆管上皮细胞均可发生肝细胞再生 (图 1b)。在肝细胞向 LPLCs 的转化过程中, 已发现了多种信号通路, 包括 NOTCH^[15]、Wnt^[16] 和 Hippo^[17], 可调节肝细胞向 LPLCs 的去分化作用。在慢性门静脉周围肝损伤 [如 bile duct ligation (BDL) 和 1,4-二氢-2,4,6-三甲基吡啶-3,5-二羧酸盐 (DDC) 模型] 中, 发现肝细胞会分化为 LPLCs, 同时表达肝细胞和胆管上皮细胞标记, 特别是 Sox9, 一种公认 LPCs 标记。值得注意的是, 肝细胞来源的 LPLCs 占了体内新生肝细胞的近 20%^[18]。此外, 当肝损伤迁延反复时, LPLCs 可产生胆管上皮细胞。但是在中央静脉周围肝损伤 [如四氯化碳 (CCl₄) 和硫代乙酰胺 (TAA) 模型] 中未发现肝细胞向 LPLCs 的去分化^[19]。肝再生所涉及的肝细胞来源取决于损伤的类型。在慢性门静脉周围损伤中, Tert^{high} 肝细胞和 Sox9⁺ LPLCs 有助于肝细胞再生, 而在慢性中央静脉周围损伤中, 肝细胞可以来自 HybHPs 和 Tert^{high} 肝细胞。位于门静脉周围区域的 HybHPs 增殖并向中心周围区域扩展, 并补充受损的肝

细胞^[20]。相比之下,遍布整个小叶的Tert^{high}肝细胞的再生无位置特异性。最新随机谱系追踪研究对Tert^{high}肝细胞在损伤诱导的肝再生中的作用提出质疑,该研究表明在损伤下不存在具有增殖优势的肝细胞^[5]。除肝细胞相关的再生来源之外,在肝细胞增殖被严重损伤所阻断的条件下,LPCs可作为肝再生的替代途径。卵圆细胞被认为是LPCs,其表现出几个显著特征,包括细胞小、卵圆形核、胞质少、基底膜缺乏,并表达肝祖细胞标志物AFP和其他胆道相关基因^[21]。体外双向分化试验显示卵圆形细胞同时产生肝细胞和胆管上皮细胞,支持卵圆形细胞可在肝损伤中充当LPCs的观点。

此外,在肝细胞增殖受阻的严重损伤中,胆管上皮细胞可以补充受损的肝细胞。相关研究表明,在特定条件下,肝细胞也可通过TGF- β 相关通路转分化为胆管上皮细胞^[22]。

1.2.2 LSECs调节“异常肝再生” 与急性肝损伤不同,在慢性肝损伤的情况下,LSECs中CXCR4激活上调,成纤维细胞生长因子受体1(fibroblast growth factor receptor 1,FGFR1)激活,CXCR7被抑制而降低了CXCR7-Id1的信号传导,导致HSCs的激活和增殖,促再生作用转化为促纤维化作用^[9](图1b)。

1.2.3 巨噬细胞调节“异常肝再生” 在慢性肝损伤中,疤痕组织过量沉积,肝细胞衰老,增殖受到抑制。在这种情况下,巨噬细胞分泌的肿瘤坏死因子样凋亡微弱诱导剂(tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis,TWEAK)可以激活胆管上皮细胞的增殖。肝细胞凋亡或坏死增加,巨噬细胞行使吞噬肝细胞碎片的功能,并上调Wnt的表达,促进肝细胞增殖,同时有研究认为其可促进胆管反应中祖细胞向肝细胞的分化,从而刺激肝再生,在组织死亡和再生之间建立了至关重要的联系^[23](图1b)。除此之外,在纤维化肝脏中,巨噬细胞是促进疤痕组织沉积的关键,但也参与疤痕的消除。在纤维化损伤阶段,与疤痕相关的巨噬细胞为CD11BhiF4/80intLy-6Chi,而在疤痕消退期间它们主要为CD11BhiF4/80intLy-6Clo。在损伤消退阶段有条件地消融与疤痕相关的巨噬细胞会限制基质疤痕的减少^[24]。活化的HSCs通过释放基质金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitors of matrix metalloproteinases,TIMPs)对慢性损伤做出反应,对抗通常由巨噬细胞表达的MMPs(图1b)。在疤痕消退过程中,出现了抗纤维化环境,其中巨噬细胞获得了主要的抗纤维化表型^[25],TIMPs表达降低,而MMPs活性增加,HSCs恢复为静态表型或发生凋亡。对关键的MMPs具有抗性的胶原基因突变的转基因小鼠,在慢性损伤后的恢复期,成熟肝细胞和导管细胞及肝祖细胞的增殖受到损

害^[26],说明巨噬细胞通过分泌MMPs可促进肝再生,其具体机制有待进一步探究。

1.2.4 HSCs调节“异常肝再生” 在持续肝损伤期间,ECM沉积过多,肝细胞和胆管上皮细胞增殖受到损害,从而使肝脏再生能力受损。HSCs在“异常肝再生”的调节中具有双重作用,一方面促进慢性损伤后的肝再生,以损伤前期为主;另一方面促进纤维化进展抑制再生,其分泌的细胞因子,例如HGF和刺猬(hedgehog,HH)因子无法刺激肝脏生长,从而损伤肝细胞和肝祖细胞介导的再生^[27],多发于慢性肝损伤后期(图1b)。

在促再生方面,活化的HSCs通过产生血管生成因子和调节内皮细胞和肝细胞增殖的因子,并重塑ECM参与协助肝脏再生,已有研究证明显示血管重塑对肝纤维化可发挥治疗作用^[28]。在“异常肝再生”的早期阶段,HSCs促进LPCs和肝细胞的增殖。它们还刺激受伤区域的血管生成,并协助将造血干细胞和免疫细胞募集至肝脏^[29]。最近的研究表明,活化的HSCs可能经历上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT),从而分化为LPCs。纤维化肝脏中胆管损伤后,HSCs分泌NOTCH配体,增强了胆管壁内和周围的NOTCH信号通路,从而促进了胆管上皮细胞和LPCs的再生。HSCs产生HGF的一种潜在介质是神经营养蛋白受体P75NTR,它在肝纤维化肝损伤后的HSCs中表达,P75NTR通过Rho促进HSCs激活,而激活的HSCs分泌HGF以刺激再生期间的肝细胞增殖^[30]。HH信号传导是再生过程中HSCs和肝细胞相互作用的另一个重要中介。体外培养激活的HSCs,可合成音猬因子(sonic hedgehog,SHH),作为细胞的自分泌生长因子。在体内,HH配体已被证明可诱导肝细胞增殖^[31]。值得注意的是,活化的HSCs是参与ECM重塑的TIMPs的主要来源。因为ECM能够隔离生物活性分子,细胞因子的产生和ECM的重塑可能会结合在一起发挥作用。因此,除了直接分泌细胞因子外,活化的HSCs还可以通过从ECM产生或降解释放细胞因子来调节“异常肝再生”。

在促纤维化抑制再生方面,HSCs通过释放TIMPs对慢性损伤做出反应,可以抵消通常由巨噬细胞表达的MMPs,巨噬细胞和HSCs之间的相互作用决定了组织损伤中疤痕沉积和疤痕消退之间的平衡。在晚期,HSCs可能通过TGF- β 的高表达参与再生的终止。肝脏中最重要的抗增殖因子是TGF- β ,HSCs是产生TGF- β 的主要细胞类型。研究已证明血清素可通过5-羟色胺2B(5-HT_{2B})受体,在原始小鼠HSCs中促进TGF- β 1的表达,且5-HT_{2B}被抑制后,PHx、BDL、CCl₄

模型中肝细胞的增殖增加,促进肝脏损伤修复^[32]。瘢痕形成过多会抑制肝脏修复,如纤维化肝脏再生不良。过多的瘢痕组织会抑制肝细胞和LPCs的增殖,其原因可能与ECM对促再生因子、氧等物质的阻隔作用相关。所以HSCs过度活化将促使肝纤维化进展,并进一步发展为肝硬化,甚至是肝衰竭和肝癌。

1.2.5 胆管上皮细胞调节“异常肝再生” 与成熟的肝细胞不同,胆管上皮细胞表达神经细胞黏附分子(neural cell adhesion molecule, NCAM),该分子介导细胞与细胞、细胞与基质的相互作用。聚唾液酸(polysialic acid)是NCAM的翻译后修饰子,在胆管反应过程中被上调,削弱NCAM的作用,促进胆管上皮细胞迁移和肝脏再生(图1b)。

慢性严重肝损伤存在肝细胞向胆管上皮细胞的转化。Wnt信号可促进肝细胞增殖,而NOTCH信号则在胆管发育中至关重要。使用腺相关病毒标记肝细胞并追踪其转化为胆管上皮细胞的研究表明,在NOTCH表达的影响下肝细胞可转化为胆管上皮细胞。小鼠肝脏中编码Hippo的基因失活揭示了从肝细胞向胆管上皮细胞表型转化的信号通路,该基因导致肝细胞以Yap/NOTCH2依赖性的方式大规模转化为胆管上皮细胞,促进胆管上皮细胞的再生^[17](图1b)。TGF- β 途径被认为是Alagille综合征小鼠模型中,肝细胞向胆管上皮细胞的转分化的主要参与者之一。

慢性严重肝损伤诱导胆汁上皮细胞向肝细胞的转化。研究显示,通过标记胆管上皮细胞,纤维化损伤模型一致显示胆管上皮细胞可因门静脉周围和中心静脉周围肝损伤而转化为肝细胞^[33]。斑马鱼模型也显示,肝细胞的极度耗竭将导致胆管上皮细胞转化为肝细胞。这些发现共同表明,当肝细胞受到严重损伤并且其增殖能力受到抑制时,胆管上皮细胞的分化有助于肝细胞再生。在此过程中,肝细胞特异性转录因子,如肝细胞核因子4 α (hepatocyte nuclear factor 4 alpha, Hnf4a)的激活与胆管上皮细胞向肝细胞的转化相关。使用斑马鱼模型的研究已经确定了胆管上皮细胞可塑性调节中的几种表观遗传因素和信号通路。通过减少同源异型转录因子(prospero-related homeobox transcription factor, Prox1)和Hnf4a的诱导,可减少胆汁上皮细胞向成肝细胞的去分化(图1b)。此外,发现mTORC1和BMP途径调节斑马鱼胆汁上皮细胞向肝细胞的转化^[33]。考虑到斑马鱼和哺乳动物肝脏之间肝脏组织结构的巨大差异,在哺乳动物中必须进一步验证这些途径。此外,已有相关研究表明,ECM在肝细胞向胆管上皮细胞转分化过程中发挥重要作用^[34]。最近发现了胆管上皮细胞之间也存在异质性。因此,胆

管上皮细胞转化成肝细胞的能力是否不同有待进一步研究。

2 肝纤维化实验动物模型发病过程伴随的“异常再生”

肝纤维化是多种临床肝脏疾病进展的共同阶段,因此对肝纤维化条件下的“异常再生”的研究显得尤为重要。由前文可知,在“异常肝再生”中可补充肝细胞的细胞类型主要是增殖的肝细胞和胆管反应中的LPCs。在“异常肝再生”中可参与增殖的肝细胞亚型主要是Tert^{high}肝细胞和HybHPs,其一部分可转化为LPLCs,而胆管反应中的LPCs可在一定条件下分化为肝细胞和胆管上皮细胞。不同的纤维化动物模型“异常肝再生”中肝细胞的主要来源不同。在此,对临床前研究最常用的几种肝纤维化模型的“异常再生”情况进行简要分析,为探究肝纤维化与肝再生之间的相互联系提供实验依据。

2.1 CCl₄诱导肝纤维化模型

CCl₄进入肝细胞后,细胞色素P450s将CCl₄代谢为CCl₃自由基,其与大分子共价结合,导致细胞膜脂质过氧化。自由基还干扰甘油三酯和蛋白质的结合,抑制脂蛋白合成,激活Disse空间的HSCs。有毒的化学物质发挥毒性作用大都遵循以下规律:通过自由基形成和脂质过氧化等途径诱发组织损伤,受各种因素影响损伤进一步发展。低至中等剂量的有毒物质使用后,损伤会刺激代偿性组织修复反应,从而使损伤迅速消退。相反,高剂量的有毒物质会抑制组织修复,进而导致损伤进一步发展,最终导致死亡^[35]。这种组织修复反应主要为肝再生。在肝纤维化“异常再生”的研究中,最常用的模型是CCl₄模型。CCl₄中毒会导致肝细胞损伤、坏死、肝脏炎症和纤维化,最终导致肝硬化^[36]。相关研究表明,组织修复的速度和程度是决定肝损伤最终结果的关键因素。肝损伤和肝再生引起的组织修复可作为两种相伴但相反的反应进行考量。CCl₄等化学物质造成的肝损伤与相应的肝再生之间已被证明存在一定的给药次数、剂量与时间相关性,这些相关性有助于更好地理解CCl₄造成纤维化和再生的相互联系,并对化学毒物引发的肝纤维化的治疗起到一定的指导作用。

2.1.1 CCl₄与“异常再生”的给药次数-反应关系 已有研究指出,CCl₄(2.0 mL·kg⁻¹)与肝再生之间存在一定的给药次数-反应关系,即单次给药促进再生修复,多次长期给药促进纤维化进展^[9]。CCl₄(2.0 mL·kg⁻¹)单次给药后,可见肝组织围绕中心静脉出现实质性坏死,白细胞浸润,脂肪沉着,24 h达到峰值,同时血浆转氨酶活性显著上升,肝脏膨胀变色。然后肝脏再生,

48 h后肝脏再生达到巅峰,72 h后几乎恢复到正常的肝脏组织形态^[37]。若CCl₄ (2.0 mL·kg⁻¹)每周2次,连续8~12周重复给药,则肝纤维化开始发展,HSCs被激活形成纤维母细胞并分泌胶原,胶原逐渐积累成瘢痕,瘢痕组织过度沉积并进一步抑制再生,最终发展为肝硬化^[36]。在肝纤维化向肝硬化发展的过程中,停止使用CCl₄后,肝实质会再生,并伴有瘢痕降解和炎症消退。

2.1.2 CCl₄与“异常再生”的剂量-反应关系 在低至中等剂量的CCl₄给药后,损伤引起组织的再生修复,使损伤迅速恢复,动物存活率高。相反,高剂量的毒物会抑制组织修复,损伤持续进展,最终导致动物死亡^[38]。对雄性Sprague-Dawley大鼠梯度注射40倍剂量的CCl₄ (0.1~4 mL·kg⁻¹ i.p.,玉米油),通过血清相关指标和组织病理检测肝损伤,通过³H-胸腺嘧啶掺入肝细胞核DNA检测肝细胞增殖,结果表明使用剂量递增的CCl₄给药时,肝再生遵循毒理学剂量反应的黄金法则,组织修复以剂量依赖的方式增加,直到达到阈值剂量(2 mL·kg⁻¹),即低剂量刺激肝脏再生,超过阈值剂量后,随着毒物剂量的增加,组织修复的开始则出现相应延迟和减弱,且组织损伤开始明显加速,表明损伤进一步发展。CCl₄暴露后细胞分裂周期的分析也表明,高剂量可抑制细胞周期进展,特别是在细胞周期的G1期和S期之间。该结果显示,给予大鼠4 mL·kg⁻¹ CCl₄在48 h内引起的死亡率达到80%,检测20%存活大鼠发现,其再生修复反应较死亡大鼠增加了5倍^[39],这也证明了组织修复在克服损伤和使提高存活率方面的关键作用,及时开始组织修复对于肝损伤进展至关重要。

2.1.3 CCl₄与“异常再生”的时间-反应关系 有研究表明,除了组织修复的程度,出现组织修复的时间也决定了肝脏损伤的程度,且大量数据表明给药后48 h肝脏再生达到巅峰。具体时间关系在给药次数-时间关系中已有详细描述。

以上关系的“异常再生”研究对象主要为肝细胞。导管反应中肝祖细胞的增殖分化在CCl₄模型中的研究较少。CCl₄肝纤维化为中心静脉周围损伤模型,其中参与再生的肝细胞主要是Tert^{high}肝细胞和HybHPs(表2)。最新的一项恒河猴实验结果显示,上皮细胞黏

附分子(Epcam)、细胞角蛋白19(CK19)和谷氨酰转移酶(GGT)等肝导管反应的重要指标在CCl₄模型中被上调,提示CCl₄诱导的肝纤维化模型可能存在导管反应引发的“异常再生”^[40]。

2.2 TAA诱导肝纤维化模型

TAA发挥毒性作用亦遵循上述化学毒性物质发挥毒性作用的一般规律。但与大多数肝毒性药物不同,大剂量TAA在动物肝功能衰竭和死亡前有较大的时间窗(3.5~7天)。而在其他典型的肝毒物如CCl₄、对乙酰氨基酚、CHCl₃等药物中,动物会在12~24 h内死于致死剂量,这使TAA与其他药物相比具有明显的优势^[35]。CCl₄模型肝再生的剂量-反应关系和时间-反应关系同样适用于TAA诱导的肝损伤和再生修复。

① 剂量-反应关系:雄性SD大鼠分别暴露于50、150、300和600 mg·kg⁻¹剂量的TAA,在0~96 h的时间内测量肝损伤和组织再生的变化。结果显示,前三剂量TAA没有产生超过相当于剂量倍数的肝损伤,且无死亡发生。给予高剂量(600 mg·kg⁻¹) TAA后,48~60 h内损伤表现出急剧发展的态势,且出现90%死亡率,而在给予TAA后72 h,组织再生的增加几乎可以忽略不计。³H-胸腺嘧啶掺入和PCNA分析表明,高剂量后组织修复反应受到抑制和延迟。这些数据表明,TAA损伤存在阈值剂量(在本例中为300~600 mg·kg⁻¹),组织修复呈剂量相关。② 时间-反应关系:上例中,300~600 mg·kg⁻¹ TAA之间时,肝细胞再生峰值出现在36~48 h之间^[38]。

研究显示,TAA中胆管反应向促进肝纤维化方向激活,而祖细胞向肝细胞和胆管细胞的分化受到抑制(表2)。但TAA中胆管反应引发的肝细胞增殖仍有待进一步探究。

2.3 胆管结扎术诱导肝纤维化模型

胆汁淤积性肝损伤是一种常见的临床疾病,以肝内胆汁流动障碍为特征。临床胆汁淤积的原因多种多样,如急性肝炎、病毒感染、酒精性肝病和药物性肝损伤等。肝脏中胆汁流出障碍使具有细胞毒性的BAs在肝脏中过分过度积累,引起肝细胞死亡。如果不及时治疗,胆汁淤积将导致肝纤维化、肝硬化和肝衰竭^[41,42]。BDL可诱导小鼠胆汁淤积性肝损伤。

Table 2 Summary and comparison of four common animal models of liver fibrosis. BDL: Bile duct ligation; BAs: Bile acids; PBG: Peribiliary gland

Type of model	Feature of model	Classification	Source of hepatocytes
CCl ₄	Frequency/dose/time-response correlation	Pericentral liver injury	HybHPs, Tert ^{high} hepatocytes, few ductular reaction
TAA	Dose/time-response correlation	Pericentral liver injury	HybHPs, Tert ^{high} hepatocytes, few ductular reaction
BDL	BAs level increases significantly	Periportal liver injury	LPLCs, Tert ^{high} hepatocytes, more ductular reaction
DDC	Accompanied by PBG hyperplasia	Periportal liver injury	LPLCs, Tert ^{high} hepatocytes, more ductular reaction

2.3.1 BDL 模型中肝实质细胞的“异常再生” 炎症是胆汁淤积症的主要特征之一,因此抗炎治疗被认为是胆汁淤积症的治疗重点之一,其中肝脏NPCs,尤其是免疫细胞(如中性粒细胞和巨噬细胞),在胆汁淤积性肝损伤中的作用已经得到了较为详细的研究^[41,43],但关于在胆汁淤积性肝损伤中肝细胞功能的研究相对较少。最近的一项研究显示,肝细胞特异性抑制miRNA可减轻肝纤维化^[44]。另一方面,肝细胞也参与肝损伤的修复过程。最近的研究使用单细胞RNA测序(scRNA-seq)揭示了BDL组织中正常肝细胞的不同簇,在单细胞水平上表征了胆汁淤积性肝细胞的转录组特征,明确了胆汁淤积性肝损伤后肝细胞的变化,为胆汁淤积性肝损伤的治疗提供了新的思路。该研究显示,胆汁淤积损伤的肝细胞是不均匀的,其分成6个不同的簇,即从BDL损伤的肝脏中分离出6组肝细胞,这6组细胞的转录组特征不同,功能也各不相同。其中,BDL-5肝细胞特异性表达调控细胞分裂和细胞周期的基因,如着丝粒蛋白E(Cenpe)、核仁和纺锤体相关蛋白1(Nusap1)、单克隆抗体Ki-67鉴定的抗原(Mki67)、cyclin A2(Ccna2)、cyclin B1(Ccnb1)等。细胞周期分析显示,BDL-5细胞几乎全部是增殖细胞,再次证实BDL-5肝细胞是BDL中负责再生修复的肝细胞。而BDL-5仅占全部肝细胞的13.49%,说明在BDL模型小鼠中,肝实质细胞再生较弱^[45]。BDL损伤属于门静脉周围损伤,肝细胞再生修复过程中以Tert^{hi}肝细胞为主,并且伴有LPLCs的生成(表2)。损伤因素持续存在时,LPLCs可分化为胆管细胞。

2.3.2 BDL 模型中祖细胞相关的“异常再生” 近年来BAs被认为在祖细胞诱导的肝脏再生中发挥重要作用。导管反应是胆汁淤积性肝病的重要诊断指标,其特点是胆管上皮细胞的增殖增强^[2]。胆管上皮细胞是高度分化的细胞,位于复杂的解剖生态位中,参与胆汁的生成和稳态平衡。相关研究表明,导管反应一方面可以作为一种祖细胞来源,这种祖细胞可以分化成肝细胞或胆管细胞以增强肝脏再生;另一方面,它也可导致门静脉周围纤维化,最终发展为肝硬化并导致死亡^[14]。BDL刺激胆管上皮细胞和卵形细胞(肝细胞祖细胞)增殖,导致胆管增生并伴有门脉炎症和纤维化^[36](表2)。3D-荧光共聚焦技术生成的胆管图像显示,在胆汁淤积症中小叶间胆管广泛重塑,形成一个围绕门静脉分支的致密网络,管腔表面大约扩大5倍,这可能会增强胆汁的重吸收并减轻胆汁淤积^[2]。

除此之外,已知高水平的BAs还可通过抑制肝脏再生过程中STAT3的磷酸化从而影响肝再生^[46]。在小鼠中,在没有明显的肝细胞损伤和衰老的情况下,肝

细胞自我复制可满足肝再生需求,而肝祖细胞在肝再生中的贡献暂无明确的文献报道。在严重肝损伤和肝细胞复制失败的情况下,肝祖细胞对再生的贡献程度和重要性仍需要进一步研究。

2.4 DDC 饮食诱导肝纤维化模型

DDC饮食会引起胆道损伤,引发上述导管反应,导致肝脏纤维化和再生,是胆道损伤和纤维化的模型^[47]。DDC损伤后, $\beta 1$ 整合素($\beta 1$ -integrin)fl/fl小鼠肝重恢复延迟,且 $\beta 1$ -integrin fl/fl小鼠延长延缓了肝细胞Ki67和p21的表达,并增加了肝损伤的血清标志物,表明 $\beta 1$ -integrin调控了DDC损伤后肝细胞的增殖。DDC属于门静脉周围损伤,其再生肝细胞亚型与BDL模型相同。

最近的研究结果显示,小鼠DDC损伤模仿了典型的原发性硬化性胆管炎(PSC)组织病理学损伤,包括胆周腺体(PBG)增生和导管反应(表2)。在DDC引起损伤后,PBG增生并参与胆管上皮细胞的再生;Wnt信号触发胆道祖细胞增殖和迁移,NOTCH途径诱导其分化为成熟表型^[48]。

综上所述,以上4种模型各具特点,如CCl₄中存在给药次数/剂量/时间-反应相关性,TAA存在给药剂量/时间-反应相关性,BDL中BAs含量高,DDC中存在PBG的增生;但4种模型也存在一定的联系,CCl₄与TAA模型同属于中心静脉周围损伤,肝细胞来源以HybHPs和Tert^{hi}肝细胞为主,而BDL与DDC同属于门静脉周围损伤,肝细胞来源以Tert^{hi}肝细胞为主,且存在肝细胞向LPLCs的转分化(表2)。

3 通过增强“异常肝再生”治疗肝纤维化

综上所述,肝纤维化中存在的“异常肝再生”是恢复纤维化肝脏体内平衡、预防肝纤维化的关键。现有研究中,基于前文所述“异常肝再生”的机制,改善肝纤维化中肝脏再生的策略包括针对干细胞和巨噬细胞、HSCs以及胆管上皮细胞的局部促进策略,和毒性药物预处理的整体促进策略(自体保护和异质保护)。除此之外还包含一些直接促进肝再生相关的细胞因子策略。每种策略在发挥治疗作用的同时均存在潜在的治疗风险。

3.1 干细胞和巨噬细胞治疗策略及潜在风险

外源性补充可促进再生的细胞的“细胞疗法”在肝纤维化的临床前模型中已经得到广泛研究。其中巨噬细胞^[49]、骨髓干细胞^[50]和间充质干细胞^[51]在CCl₄诱导的肝纤维化模型中均显示有效。细胞疗法既可以外源性补充干细胞,也可以补充免疫细胞。

外源性补充干细胞治疗肝纤维化已取得一定的研究成果。在大鼠肝再生模型中,通过外周静脉注射的骨髓源LSECs祖细胞在肝脏中形成LSECs,促进肝再

生^[52]。对慢性肝病患者的的小规模临床研究也表明,骨髓干细胞疗法可减少肝纤维化,改善肝功能^[53]。

外源性补充免疫细胞治疗慢性疾病近年来已成为研究热点。免疫系统,尤其是巨噬细胞,在“异常肝再生”中发挥重要作用,对受损组织给予具有丰富旁分泌或营养作用的免疫活性细胞前景可观。以巨噬细胞为例,注射的巨噬细胞分泌可破坏瘢痕组织的MMPs,通过多种细胞因子激活内源性肝细胞、胆管上皮细胞和LPCs,补充再生的肝细胞^[54],即通过促进“异常肝再生”机制缓解肝纤维化。此外,外源性补充的巨噬细胞可直接或通过趋化因子介导内源性巨噬细胞的募集,从而进一步增强其作用^[49]。但是,注射的巨噬细胞在肝脏中存活时间很短,其旁分泌作用是短暂的。这种短暂的作用一方面提高人体试验的安全性,但另一方面需要重复给药。

尽管有望通过外源性补充细胞到受伤的组织,促进“异常肝再生”来治疗肝纤维化,但外源性补充细胞的再生能力受局部基质微环境影响。因局部基质微环境对外源性细胞的反应存在不确定性,可能存在免疫排斥反应或其他的不利反应,此种方法的临床应用仍存在较大的风险。通过安全递送外源细胞(无论是干细胞还是免疫细胞)来进行临床组织修复,需要进一步完善基础设施。此外,细胞疗法分为自体细胞疗法和异体细胞疗法。相较而言,自体细胞疗法更具有吸引力,因为它避免了宿主的免疫排斥,理论上消除了对免疫抑制的需要。使用常规的免疫抑制药物可能导致严重的心血管疾病风险、肾功能不全和癌症风险增加,还可消除完整免疫系统对组织修复的有益作用。因此,最近大量研究已经转向局部基质微环境的细胞和信号通路如何成功促进组织再生的分析,提出“种子和土壤”概念,试图推动基于细胞疗法促进组织修复的应用。

3.2 HSCs策略及潜在风险

在纤维化肝脏“异常肝再生”的情况下,HSCs发挥双重作用,其一方面通过分泌TIMP和胶原加重纤维化;另一方面通过分泌HGF和SHH等细胞因子促进肝再生修复。目前对于调控HSCs治疗肝纤维化的研究绝大部分集中于抑制其对于肝纤维化进展的促进作用,如利用酪氨酸激酶抑制剂抑制HSCs表面EGFR的表达,从而抑制HSCs活化,可发挥抗纤维化作用^[55]。抑制HSCs活化后,静止的HSCs是否仍然保留其促进肝再生的作用有待进一步研究。最近的一项研究表明,通过使用胶原纤维酸性蛋白(GFAP)启动子来驱动相关基因的表达,可以使小鼠增殖的HSCs易受病毒诱导而死亡^[56],这种新模型的一个优点是能够在不影响静止的HSCs或其他肌成纤维细胞的情况下,在

体内靶向增殖的HSCs,为静止HSCs的研究提供了新的思路和方法。目前研究常使用斑马鱼肝损伤模型进行高通量化学筛选,寻找在肝再生过程中影响HSCs的药物^[57]。

此外,已有研究显示,HSCs促再生作用的失调可能促进肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发展^[58]。大多数证据表明,纤维化会促进HCC,但是肝纤维化和HCC发生的先后顺序及促发机制的相关性和特异性仍有待明确。因此,开发促进HSCs促再生作用的治疗手段时,应充分考虑其对HCC和肝纤维化的影响。

3.3 胆管上皮细胞策略及潜在风险

胆管上皮细胞在“异常肝再生”中的作用与胆管反应息息相关。为了模拟由严重损伤引起的人类肝脏疾病,最近的研究将经典的化学诱导的肝纤维化模型与延长损伤持续时间^[59],或基因操作相结合以抑制肝细胞的增殖^[60]。这对研究胆汁上皮细胞与胆管反应对于“异常肝再生”的贡献提供了极大的便利。但相关研究显示,即使出现强烈的胆管反应,慢性重度肝纤维化仍然有可能发展为肝硬化甚至肝衰竭,这意味着这种再生形式通常不足以完全弥补肝细胞增殖引起的肝再生。因此,针对胆管上皮细胞和胆管反应的策略研究较少。此外,此类研究策略同时存在巨大的风险,因在促进胆管反应引发的增殖作用的同时,相关因素可触发同样由胆管反应驱动的纤维化反应,从而加剧肝纤维化。

3.4 “自体保护”和“异质保护”及潜在风险

另一种促进肝纤维化中的组织再生的策略是,使用自体 and 异源化合物的预给药刺激肝脏进行组织修复,通过低剂量的化合物“A”给药刺激纤维化肝脏的“异常肝再生”,从而防止随后致死剂量的相同化合物“A”(自体保护)或完全不同的化合物“B”(异质保护)造成的肝脏损伤。自体保护已经在CCl₄^[61]、TAA^[62]和对乙酰氨基酚^[63]等毒性物质中得到验证,而异质保护在TAA与对乙酰氨基酚联用^[64]的研究中得到验证。由于此种策略主要应用于毒性化合物造成的肝纤维化,所以此种方式对于预给药的化合物A的给药剂量及给药次数要求严格,且其预给药的特点极大地限制了该策略的临床应用。

3.5 药物制剂和细胞因子策略及潜在风险

其他策略包括使用药物制剂或细胞因子直接刺激肝细胞增殖。但此种策略目前仍不明确促进的是“正常肝再生”或“异常肝再生”,因此在此作为一种刺激肝细胞增殖引发内源性再生,从而达到治疗肝纤维化效果的补充策略进行介绍。粒细胞集落刺激因子(G-CSF)在临床前模型中已经得到广泛使用,其已被证

明可刺激内源性肝细胞的增殖,从而减少肝损伤和纤维化^[65]。除促进肝细胞增殖以外,GCSF还被证明可以增加LPCs的增殖和运动,从而有助于再生^[66]。临床一项关于慢性肝衰竭的急性随机对照试验证明,GCSF的使用可以改善患者的生存率。中性粒细胞功能通常在慢性肝病中会减弱,推测GCSF可能会改善中性粒细胞功能,但尚未确定产生这种作用的机制^[67]。最新研究证实,生长分化因子11(GDF11)通过增加肝脏中LPCs的增殖,对纤维化产生保护作用^[68]。

当考虑促进内源性再生时,一个重要的问题是防止HCC的潜在发展。此时必须考虑HCC的细胞起源。相关数据表明,在两种HCC小鼠模型中,癌症起源于肝细胞而不是胆管相关细胞及胆管反应所产生的祖细胞^[69],因此胆管反应引发HCC的风险较小,即问题的关键集中在促进内源性肝细胞增殖如何避免引发HCC。最近的研究给出了一种解决方案,其使用超深度靶向测序技术,筛选出再生肝细胞中具有促再生能力的突变基因,与HCC中的突变基因进行比对,最后挑选出肝细胞中既能促进再生又不引起癌变的突变基因,为基于内源性肝再生的肝纤维化治疗策略提供了可靠的新思路与新方法^[70]。其中,通过此种方法筛选出的Arid1a基因突变已被证实小鼠模型中具有显著促进肝脏再生的作用^[71]。

4 小结与展望

近年来,以肝纤维化为基础的肝脏疾病的发病率逐渐升高,全球纤维化相关的医疗保健负担也呈现逐渐增加的态势^[72]。因此,有效的抗纤维化治疗的临床需求很高。本文重点从分子细胞生物学机制方面明确了“正常肝再生”与“异常肝再生”的联系和区别,此过程涉及多种细胞间的相互作用,即细胞所发挥的作用与其所处的细胞环境和体液环境息息相关。近年来,越来越多的研究已经开始对不同细胞及其所处的环境进行探索且初见成效,明确各种细胞发挥再生作用所需的细胞环境和体液环境对促进“异常肝再生”治疗肝纤维化具有重要意义。随后文章揭示了CCl₄、TAA、BDL和DDC等常见临床前纤维化模型中的“异常肝再生”情况,为“异常肝再生”的临床前研究提供了理论参考。但此处仍有一些问题有待探明,如CCl₄和TAA模型中“导管反应”的贡献仍需进一步确证。此外,LPCs在各模型中的作用探究目前多采用抑制肝细胞增殖后观察LPCs分化的方法,而在肝细胞增殖旺盛的情况下LPCs是否存在及其在“异常肝再生”中的贡献程度仍存在争议,需进一步研究。本文最后重点指出以促进“异常肝再生”为目标治疗肝纤维化的策略和潜在风险,以期临床以肝纤维化为基础的疾病提供新的治

疗思路和理论指导。除文中所述治疗策略之外,近年来大量研究显示microRNA在肝纤维化和肝再生中发挥重要作用。大多数microRNA以高度细胞特异性和组织特异性的方式表达,可选择性参与特定器官的纤维化。如miR-29可抑制多种胶原基因,抑制HSCs的活化,同时阻碍ECM转化中涉及的几种酶的翻译^[73]。此外,越来越多的证据表明,microRNA对肝脏发育、再生和代谢功能的调节至关重要^[74]。许多microRNA被证明在肝再生过程中控制肝细胞增殖,其中包括miR-21、miR-23b和miR-221^[75]。此外,也有部分microRNA被证明会抑制肝再生,如miR-217具有增殖抑制作用^[76]。但目前尚未建立microRNA在肝纤维与“异常肝再生”之间的联系。鉴于microRNA在肝纤维化与肝再生中均具有一定功能,研究者期待其能在纤维化肝脏的“异常肝再生”中发挥作用。此外,在采用再生疗法进行治疗时需注意,肝再生与细胞癌变存在一定的相关性,临床促进“异常肝再生”治疗肝纤维化时,人体需要对再生组织和器官定期进行影像学的检测。诸如磁共振成像扫描可用于检测肿瘤等异常组织发展。理想的检测还应包括肝组织结构改善和新陈代谢特征的评估,并且与原始疾病和健康的对照组织进行比较^[77]。偏离健康特征可以理解一种预警信号,可能需要采取干预措施,如停止再生疗法。除此之外,对康复患者循环免疫细胞的评估可以更好地了解免疫成分与肝组织再生之间的关系,从而为组织损伤的程度和组织再生的进展提供更多线索。综上所述,虽然现有研究已初步取得一定成果,但要完全阐明纤维化肝脏“异常肝再生”的机制,促进再生疗法在临床肝纤维化中的安全应用仍然需要相关研究的进一步推进。

作者贡献: 乔露瑶负责文章选题、文献查阅及撰写工作; 张晓伟研究员负责文章整体思路指导,同时负责文章的修改及校对工作,为文章的主要负责人。

利益冲突: 本文不涉及任何利益冲突。

References

- [1] Distler JHW, Györfi AH, Ramantjui M, et al. Shared and distinct mechanisms of fibrosis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2019, 15: 705-730.
- [2] Damle-Vartak A, Begher-Tibbe B, Gunther G, et al. Pipe-3d: a pipeline based on immunofluorescence, 3D confocal imaging, reconstructions, and morphometry for biliary network analysis in cholestasis [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1981: 25-53.
- [3] Forbes SJ, Rosenthal N. Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy [J]. *Nat Med*, 2014, 20: 857-869.

- [4] Aizarani N, Saviano A, Sagar, et al. A human liver cell Atlas reveals heterogeneity and epithelial progenitors [J]. *Nature*, 2019, 572: 199-204.
- [5] Chen F, Jimenez RJ, Sharma K, et al. Broad distribution of hepatocyte proliferation in liver homeostasis and regeneration [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26: 27-33.
- [6] Lin S, Nascimento EM, Gajera CR, et al. Distributed hepatocytes expressing telomerase repopulate the liver in homeostasis and injury [J]. *Nature*, 2018, 556: 244-248.
- [7] Wang B, Zhao L, Fish M, et al. Self-renewing diploid Axin2⁺ cells fuel homeostatic renewal of the liver [J]. *Nature*, 2015, 524: 180-185.
- [8] Sun T, Pikirolek M, Orsini V, et al. Axin2 pericentral hepatocytes have limited contributions to liver homeostasis and regeneration [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26: 97-107.
- [9] Ding BS, Cao Z, Lis R, et al. Divergent angiocrine signals from vascular niche balance liver regeneration and fibrosis [J]. *Nature*, 2014, 505: 97-102.
- [10] Fazel Modares N, Polz R, Haghighi F, et al. Il-6 *trans*-signaling controls liver regeneration after partial hepatectomy [J]. *Hepatology*, 2019, 70: 2075-2091.
- [11] Garbers C, Hermanns HM, Schaper F, et al. Plasticity and crosstalk of interleukin 6-type cytokines [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2012, 23: 85-97.
- [12] Yin C, Evason KJ, Asahina K, et al. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123: 1902-1910.
- [13] Hu C, Wu Z, Li L. Mesenchymal stromal cells promote liver regeneration through regulation of immune cells [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16: 893-903.
- [14] Banales JM, Huebert RC, Karlsen T, et al. Cholangiocyte pathobiology [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16: 269-281.
- [15] Yanger K, Zong Y, Maggs LR, et al. Robust cellular reprogramming occurs spontaneously during liver regeneration [J]. *Genes Dev*, 2013, 27: 719-724.
- [16] Okabe H, Yang J, Sylakowski K, et al. Wnt signaling regulates hepatobiliary repair following cholestatic liver injury in mice [J]. *Hepatology*, 2016, 64: 1652-1666.
- [17] Yimlamai D, Christodoulou C, Galli GG, et al. Hippo pathway activity influences liver cell fate [J]. *Cell*, 2014, 157: 1324-1338.
- [18] Li W, Yang L, He Q, et al. A homeostatic Arid1a-dependent permissive chromatin state licenses hepatocyte responsiveness to liver-injury-associated Yap signaling [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 25: 54-68.
- [19] Tanimizu N, Ichinohe N, Yamamoto M, et al. Progressive induction of hepatocyte progenitor cells in chronically injured liver [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 39990.
- [20] Font-Burgada J, Shalpour S, Ramaswamy S, et al. Hybrid periportal hepatocytes regenerate the injured liver without giving rise to cancer [J]. *Cell*, 2015, 162: 766-779.
- [21] Miyajima A, Tanaka M, Itoh T. Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 561-574.
- [22] Li W, Li L, Hui L. Cell plasticity in liver regeneration [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30: 329-338.
- [23] Tanimizu N, Nakamura Y, Ichinohe N, et al. Hepatic biliary epithelial cells acquire epithelial integrity but lose plasticity to differentiate into hepatocytes *in vitro* during development [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126: 5239-5246.
- [24] Shiojiri N, Kametani H, Ota N, et al. Phylogenetic analyses of the hepatic architecture in vertebrates [J]. *J Anat*, 2018, 232: 200-213.
- [25] Choi TY, Khaliq M, Tsurusaki S, et al. Bone morphogenetic protein signaling governs biliary-driven liver regeneration in zebrafish through Tbx2b and Id2a [J]. *Hepatology*, 2017, 66: 1616-1630.
- [26] Sauer V, Roy-Chowdhury N, Guha C, et al. Induced pluripotent stem cells as a source of hepatocytes [J]. *Curr Pathobiol Rep*, 2014, 2: 11-20.
- [27] Sun L, Wang Y, Cen J, et al. Modelling liver cancer initiation with organoids derived from directly reprogrammed human hepatocytes [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21: 1015-1026.
- [28] Wu XX, Zhang CZ, Wang X, et al. Targeting angiogenesis and vascular remodeling as a novel therapeutic approach to liver fibrosis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 535-540.
- [29] Lee JS, Semela D, Iredale J, et al. Sinusoidal remodeling and angiogenesis: a new function for the liver-specific pericyte [J]. *Hepatology*, 2007, 45: 817-825.
- [30] Passino MA, Adams RA, Sikorski SI, et al. Regulation of hepatic stellate cell differentiation by the neurotrophin receptor P75^{ntr} [J]. *Science*, 2007, 315: 1853-1856.
- [31] 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: 1712-1723.
- [32] Ebrahimkhani MR, Oakley F, Murphy LB, et al. Stimulating healthy tissue regeneration by targeting the 5-H₂B receptor in chronic liver disease [J]. *Nat Med*, 2011, 17: 1668-1673.
- [33] Deng X, Zhang X, Li W, et al. Chronic liver injury induces conversion of biliary epithelial cells into hepatocytes [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23: 114-122.
- [34] Español-Suñer R, Carpentier R, Van Hul N, et al. Liver progenitor cells yield functional hepatocytes in response to chronic liver injury in mice [J]. *Gastroenterology*, 2012, 143: 1564-1575.
- [35] Mehendale HM. Tissue repair: an important determinant of final outcome of toxicant-induced injury [J]. *Toxicol Pathol*, 2005, 33: 41-51.
- [36] Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117: 539-548.
- [37] Masuda Y. Learning toxicology from carbon tetrachloride-in-

- duced hepatotoxicity [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2006, 126: 885-899.
- [38] Mangipudy RS, Chanda S, Mehendale HM. Tissue repair response as a function of dose in thioacetamide hepatotoxicity [J]. *Environ Health Perspect*, 1995, 103: 260-267.
- [39] Rao PS, Mangipudy RS, Mehendale HM. Tissue injury and repair as parallel and opposing responses to CCl₄ hepatotoxicity: a novel dose-response [J]. *Toxicology*, 1997, 118: 181-193.
- [40] Lai C, Feng T, Wei L, et al. Development and validation of a primate model for liver fibrosis [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2019, 100: 106600.
- [41] Woolbright BL, Jaeschke H. Inflammation and cell death during cholestasis: the evolving role of bile acids [J]. *Gene Exp*, 2019, 19: 215-228.
- [42] Santiago P, Scheinberg AR, Levy C. Cholestatic liver diseases: new targets, new therapies [J]. *Ther Adv Gastroenterol*, 2018, 11: 1-15.
- [43] Zhang Y, Lu Y, Ji H, et al. Anti-inflammatory, anti-oxidative stress and novel therapeutic targets for cholestatic liver injury [J]. *Biosci Trends*, 2019, 13: 23-31.
- [44] Tsay HC, Yuan Q, Balakrishnan A, et al. Hepatocyte-specific suppression of microRNA-221-3p mitigates liver fibrosis [J]. *Hepatology*, 2019, 70: 722-734.
- [45] Chang N, Tian L, Ji X, et al. Single-cell transcriptomes reveal characteristic features of mouse hepatocytes with liver cholestatic injury [J]. *Cells*, 2019, 8: 1069-1087.
- [46] Graf D, Kohlmann C, Haselow K, et al. Bile acids inhibit interleukin-6 signaling *via* Gp130 receptor-dependent and -independent pathways in rat liver [J]. *Hepatology*, 2006, 44: 1206-1217.
- [47] Preisegger KH, Factor VM, Fuchsichler A, et al. Atypical ductular proliferation and its inhibition by transforming growth factor beta1 in the 3, 5-diethoxycarbonyl-1, 4-dihydrocollidine mouse model for chronic alcoholic liver disease [J]. *Lab Invest*, 1999, 79: 103-109.
- [48] Carpino G, Nevi L, Overi D, et al. Peribiliary gland niche participates in biliary tree regeneration in mouse and in human primary sclerosing cholangitis [J]. *Hepatology*, 2019. DOI: 10.1002/hep.30871.
- [49] Thomas JA, Pope C, Wojtacha D, et al. Macrophage therapy for murine liver fibrosis recruits host effector cells improving fibrosis, regeneration, and function [J]. *Hepatology*, 2011, 53: 2003-2015.
- [50] Sakaïda I, Terai S, Yamamoto N, et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice [J]. *Hepatology*, 2004, 40: 1304-1311.
- [51] Meier RP, Mahou R, Morel P, et al. Microencapsulated human mesenchymal stem cells decrease liver fibrosis in mice [J]. *Hepatology*, 2015, 62: 634-641.
- [52] Wang L, Wang X, Xie G, et al. Liver sinusoidal endothelial cell progenitor cells promote liver regeneration in rats [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122: 1567-1573.
- [53] Houlihan DD, Newsome PN. Critical review of clinical trials of bone marrow stem cells in liver disease [J]. *Gastroenterology*, 2008, 135: 438-450.
- [54] Bird TG, Lu WY, Boulter L, et al. Bone marrow injection stimulates hepatic ductular reactions in the absence of injury *via* macrophage-mediated tweak signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 6542-6547.
- [55] Fuchs BC, Hoshida Y, Fujii T, et al. Epidermal growth factor receptor inhibition attenuates liver fibrosis and development of hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2014, 59: 1577-1590.
- [56] Puche JE, Lee YA, Jiao J, et al. A novel murine model to deplete hepatic stellate cells uncovers their role in amplifying liver damage in mice [J]. *Hepatology*, 2013, 57: 339-350.
- [57] Yin C, Evason KJ, Maher JJ, et al. The basic helix-loop-helix transcription factor, heart and neural crest derivatives expressed transcript 2, marks hepatic stellate cells in zebrafish: analysis of stellate cell entry into the developing liver [J]. *Hepatology*, 2012, 56: 1958-1970.
- [58] Schuppan D, Kim YO. Evolving therapies for liver fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123: 1887-1901.
- [59] Manco R, Clerbaux LA, Verhulst S, et al. Reactive cholangiocytes differentiate into proliferative hepatocytes with efficient DNA repair in mice with chronic liver injury [J]. *Hepatology*, 2019, 70: 1180-1191.
- [60] Russell JO, Lu WY, Okabe H, et al. Hepatocyte-specific B-catenin deletion during severe liver injury provokes cholangiocytes to differentiate into hepatocytes [J]. *Hepatology*, 2019, 69: 742-759.
- [61] Thakore KN, Mehendale HM. Role of hepatocellular regeneration in CCl₄ autoprotection [J]. *Toxicol Pathol*, 1991, 19: 47-58.
- [62] Mangipudy RS, Chanda S, Mehendale HM. Hepatocellular regeneration: key to thioacetamide autoprotection [J]. *Pharmacol Toxicol*, 1995, 77: 182-188.
- [63] Dalhoff K, Laursen H, Bangert K, et al. Autoprotection in acetaminophen intoxication in rats: the role of liver regeneration [J]. *Pharmacol Toxicol*, 2001, 88: 135-141.
- [64] Chanda S, Mangipudy RS, Warbritton A, et al. Stimulated hepatic tissue repair underlies heteroprotection by thioacetamide against acetaminophen-induced lethality [J]. *Hepatology*, 1995, 21: 477-486.
- [65] Yannaki E, Athanasiou E, Xagorari A, et al. G-Csf-primed hematopoietic stem cells or G-Csf per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs [J]. *Exp Hematol*, 2005, 33: 108-119.
- [66] Piscaglia AC, Shupe TD, Oh SH, et al. Granulocyte-colony stimulating factor promotes liver repair and induces oval cell migration and proliferation in rats [J]. *Gastroenterology*, 2007, 133: 619-631.
- [67] Forbes SJ, Newsome PN. Liver regeneration - mechanisms and

- models to clinical application [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016, 13: 473-485.
- [68] Dai Z, Song G, Balakrishnan A, et al. Growth differentiation factor 11 attenuates liver fibrosis *via* expansion of liver progenitor cells [J]. *Gut*, 2019. DOI: 10.1136/gutjnl-2019-318812.
- [69] Mu X, Español-Suñer R, Mederacke I, et al. Hepatocellular carcinoma originates from hepatocytes and not from the progenitor/biliary compartment [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125: 3891-3903.
- [70] Zhu M, Lu T, Jia Y, et al. Somatic mutations increase hepatic clonal fitness and regeneration in chronic liver disease [J]. *Cell*, 2019, 177: 608-621.
- [71] Sun X, Chuang JC, Kanchwala M, et al. Suppression of the Swi/Snf Component Arid1a promotes mammalian regeneration [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18: 456-466.
- [72] Nanthakumar CB, Hatley RJ, Lemma S, et al. Dissecting fibrosis: therapeutic insights from the small-molecule toolbox [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14: 693-720.
- [73] Maurer B, Stanczyk J, Jüngel A, et al. MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62: 1733-1743.
- [74] Pogribny IP, Starlard-Davenport A, Tryndyak VP, et al. Difference in expression of hepatic microRNAs miR-29c, miR-34a, miR-155, and miR-200b is associated with strain-specific susceptibility to dietary nonalcoholic steatohepatitis in mice [J]. *Lab Invest*, 2010, 90: 1437-1446.
- [75] Chen Y, Verfaillie CM. MicroRNAs: the fine modulators of liver development and function [J]. *Liver Int*, 2014, 34: 976-990.
- [76] Pan C, Chen H, Wang L, et al. Down-regulation of miR-127 facilitates hepatocyte proliferation during rat liver regeneration [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e39151.
- [77] Psaltis PJ, Simari RD, Rodriguez-Porcel M. Emerging roles for integrated imaging modalities in cardiovascular cell-based therapeutics: a clinical perspective [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2012, 39: 165-181.