|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 分类号： | R364.3+3 | 密级： |
| UDC ： |  | 编号： |

学 位 论 文

**Keap1/Nrf2 信号通路对再Th肝细胞周期的调控The Keap1/Nrf2 Signaling Pathway: Regulation of Hepatocyte Cell Cycle during Liver Regeneration**

博士研究生 胡敏

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 导 师 | 杨 雁 教授 安徽医科大学 | | |  |
| 导 师 组 成 员 | 戴国利 教授 美国 IUPUI 大学 | | | |
| 申 请 学 位 级 别 | 博士 |  | 专 业 名 称 | 药 理 学 |
| 提 交 论 文 日 期 | 2014 年 3 月 | | 论 文 答 辩 日 期 | 2014 年 5 月 |
| 学位授予单位和日期 | | 安 徽 医 科 大 学 | |  |
|  | 答辩委员会主席 | | | 教授 |
|  | 评 阅 人 | | | 教授 |

2014 年 05 月

**安徽医科大学**

**博 士 学 位 论 文**

**论文题目 Keap1/Nrf2 信号通路对再生肝细胞周期的调控**

**The Keap1/Nrf2 Signaling Pathway: Regulation of Hepatocyte Cell Cycle during Liver Regeneration**

|  |  |
| --- | --- |
| **作** 者 姓 **名** | **胡** 敏 |
| **指** 导 老 **师** | **杨** 雁 **教授** |
|  | **戴国利 教授** |
| **学** 科 方 **向** | **药理学** |
| **研** 究 方 **向** | **分子药理学** |
| **论文工作时间** | **2011 年 07 月至 2013 年 10 月** |

学位论文独创性声明

本人所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确说明并表示谢意。

学位论文作者签名： 日 期：

学位论文使用授权声明

本人完全了解安徽医科大学有关保留、使用学位论文的规定：学校有权保留学位论文并向国家主管部门或其指定机构送交论文的电子版和纸质版，有权允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。愿意将本人的学位论文提交《中国博士学位论文全文数据库》、《中国优秀硕士学位论文全文数据库》和《中国学位论文全文数据库》中全文发表，并可以以电子、网络及其他数字媒体形式公开出版，并同意编入 **CNKI**《中国知识资源总库》，在《中国博硕士学位论文评价数据库》中使用和在互联网上传播。保密的学位论文在解密后适用本规定。

学位论文作者签名： 导师签名：

日期： 日期：

目 录

[英文缩略词表](#_Toc686831234) 4

[中文摘要](#_Toc686831235) 7

**[Abstract](#_Toc686831236)** 8

[正文](#_Toc686831237) 8

**[1](#_Toc686831238)** [前言](#_Toc686831238) 8

**[1.1](#_Toc686831239)** [研究背景](#_Toc686831239) 8

**[1.2](#_Toc686831240)** [本课题实验设计路线](#_Toc686831240) 10

**[2](#_Toc686831241)** [实验材料和方法](#_Toc686831241) 10

**[2.1](#_Toc686831242)** [实验动物](#_Toc686831242) 10

**[2.2](#_Toc686831243)** [实验试剂](#_Toc686831243) 10

**[2.3](#_Toc686831244)** [实验仪器](#_Toc686831244) 11

**[2.4](#_Toc686831245)** [实验方法](#_Toc686831245) 12

**[2.5](#_Toc686831246)** [统计分析](#_Toc686831246) 18

**[3](#_Toc686831247)** [结果](#_Toc686831247) 18

**[3.1](#_Toc686831248)****[Keap1](#_Toc686831248)**[在肝再生过程中调节肝脏氧化还原反应以及复制肝细胞的细胞周期进程](#_Toc686831248) 18

**[3.2](#_Toc686831249)****[Nrf2](#_Toc686831249)**[缺乏引起肝再生过程中肝细胞有丝分裂延迟以及肝细胞短暂的去分化](#_Toc686831249) 23

**[4](#_Toc686831250)** [讨论](#_Toc686831250) 27

**[5](#_Toc686831251)** [结论](#_Toc686831251) 28

**[6](#_Toc686831252)** [参考文献](#_Toc686831252) 29

[附](#_Toc686831253)[录](#_Toc686831253) 31

[个人简历](#_Toc686831254) 31

[主要学习和工作经历](#_Toc686831255) 32

[综述](#_Toc686831256) 32

**[6](#_Toc686831257)** [参考文献](#_Toc686831257) 37

# 英文缩略词表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **英文缩写** | **英文全名** | **中文全名** |
| IL-6 | interleukin-6 | 白细胞介素-6 |
| TNF-α | Tumor necrosis factor alpha | 肿瘤坏死因子- α |
| HGF | Hepatocyte growth factor | 肝细胞生长因子 |
| EGF | Epidermal growth factor | 表皮生长因子 |
| TGF-α | Transforming growth factor alpha | 转化生长因子 |
| Keap1 | Kelch-like epichlorohydrin-associated protein 1 | Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 |
| Nrf2 | Nuclear factor- E2 -related factor 2 | 核因子 E2 相关因子 2 |
| BrdU | 5 -bromo-2-deoxyuridine | 溴脱氧核苷 |
| IHC | immunohistochemistry | 免疫组织化学染色 |
| qRT-PCR | Quantitative real-time polymerase chain reaction | 定量实时聚合酶链反应 |
| DHE | dihydroethidium | 二氢乙啶 |
| ROS | Reactive oxygen species | 活性氧 |
| PH | Partial hepatectomy | 肝部分切除术 |
| STAT3 | Signal transducer and activator of transcription protein 3 | 信号转导分子和转录蛋白激活剂 3 |
| NF-ҡB | Nuclear factor-kappa B | 核因子-ҡB |
| GPX2 | Glutathione peroxidase 2 | 谷胱甘肽过氧化物酶 2 |
| TBARS | Thiobarbituric acid reactive substances | 硫代巴比妥酸反应物质 |
| MDA | malondialdehyde | 丙二醛 |
| GAPDH | Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase | 甘油醛 3-磷酸脱氢酶 |
| NBS | New born bovine serum | 新生牛血清 |
| *P* | propability | 概率 |
| PBS | Phosphate-buffered saline | 磷酸缓冲盐溶液 |
| WB | Western blotting | 免疫印迹 |
| EHC | epichlorohydrin | 环氧氯丙烷 |
| NE | norepinephrine | 去甲肾上腺素 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |
|  | **英文缩写** | **英文全名** | **中文全名** |  |
|  | IF | immunofluorescent | 免疫荧光检测法 |  |
|  | H&E | Hematoxylin and eosin | 苏木素-伊红染色 |  |
|  | BSA | Bovine serum albumin | 牛血清蛋白 |  |
|  | TWEAK | TNF-like weak inducer of apoptosis | 肿瘤坏死因子样凋亡诱导剂 |  |
|  | Fn14 | Fibroblast growth factor-inducible 14 | 早期反应蛋白 14 |  |
|  | TFF | Trefoil factor family | 三叶家族 |  |
|  | AhR | Aryl Hydrocarbon Receptor | 芳香烃受体 |  |

Keap1/Nrf2信号通路对再Th肝细胞周期的调控

# 中文摘要

**引言：**Keap1(Kelch-like epichlorohydrin-associated protein 1)和转录因子NF-E2相关因子2（nuclear factor-E2-related factor 2, Nrf2）形成一个Keap1/Nrf2信号通路，使细胞能够抵御一系列内在的和外来的损害。在生理状态下，细胞质内的Keap1通过一个含有E3的Cul3泛素连接酶的泛素连接作用与Nrf2相结合，使Nrf2作为目标被蛋白体酶所降解。当氧化应激反应出现时，Keap1 作为一个氧化还原反应的传感器，它末端敏感的半胱氨酸残基被氧化还原反应产生的高效分子（比如亲电子试剂）所修饰，导致其构象发生变化，从而使Nrf2从泛素结合区脱落，进入细胞核内，与它的配体蛋白（如小Maf蛋白）形成异二聚体，依次转录激活一组基因，编码细胞保护分子，包括解毒酶、谷胱甘肽合成酶、抗氧化蛋白等。这些分子共同对抗氧化应激反应，使细胞的内稳态得以恢复。随后，Keap1 转位进入细胞核内，与Nrf2一起出核并使Nrf2在胞浆内持续被蛋白酶降解，Nrf2水平下降，激活终止。此外，Keap1能够和其它蛋白之间产生相互作用，Nrf2的活性也能够在转录水平或者通过磷酸化而被调控，这提示它们在不同的生物学和病理学过程中具有独立的功能和作用。

有报道指出，Nrf2缺失可使再生的肝脏由于氧化应激介导的胰岛素/类胰岛素生长因子抵抗和Notch1信号减弱而引起损伤。这些少量的研究指出Nrf2参与了肝再生过程中肝细胞增殖的调节。然而Keap1/Nrf2信号通路是怎样调控肝细胞增殖的过程目前并不清楚，也没有相关系统研究的报道。

**目的：**我们研究的目的是进一步深入探讨Keap1/ Nrf2信号通路在肝再生过程中的作用，特别是要明确Keap1/ Nrf2通路是否参与肝再生过程中复制肝细胞的细胞周期进程，以及如果参与其中，是通过怎样的方式进行调控。

**方法：**利用Keap1+/+和Keap1+/-小鼠，以及Nrf2+/+和Nrf2-/-小鼠进行2/3肝部分切除术（partial hepatectomy, PH），并且在手术后多个时间点利用免疫组织化学、免

疫荧光、qRT-PCR、Western blotting等方法，对肝细胞增殖、细胞周期蛋白、促有丝分裂信号分子的功能状态、肝氧化还原状态等方面进行评估。

**结果：**Keap1基因单等位体敲除可以引起复制的肝细胞进入S期延迟，进而扰乱

S期进程，以及有丝分裂的节律性丧失，但并不会对肝脏切除术后整体的肝细胞再生过程产生影响。这些现象的产生是由于Keap1基因单等位体敲除导致再生肝脏c-Met 和EGFR 的磷酸化减少，Akt1 和p70SP6K 活性异常调节，以及

CyclinA2、CyclinB1表达异常引起。令人惊讶的是，我们发现在PH后肝细胞复制的第一个回合内，Keap1+/+小鼠再生肝脏在G1/S期交界处展现出一个非常明显的氧化还原反应起伏波型，随后在S期出现两个附加的逐渐减弱的波型，同时

Nrf2并没有被激活。Keap1基因单等位体敲除引起肝细胞氧化还原反应的严重破坏以及再生肝脏肝细胞周期的异常调节，这两者密切相关。

虽然在PH术后7天缺损的肝组织最终可以被修复，但是Nrf2-/-小鼠的肝脏再生表现迟缓。在PH术后肝细胞复制的第一个波型内，Nrf2缺乏造成肝再生过程中过多的Cyclin A2蛋白积聚以及Wee1/Cdc2/Cyclin B1通路的异常调节，从而引起肝细胞有丝分裂的延迟。值得注意的是，在PH后60 h，绝大多数缺乏Nrf2的肝细胞明显变小，肝细胞祖细胞标记物(CD133，TWEAK受体和trefoil家族蛋白3)被激活，使一组对它们功能起关键作用的基因表达下降，这些变化伴随着

p70S6K的灭活。因此，缺乏Nrf2表达的肝细胞经历了暂时而广泛的去分化，作为对肝组织缺失的反应。

**结论：**我们证实了Keap1/ Nrf2信号通路在肝再生过程中具有非常重要的调节作用。在肝细胞再生过程中，Keap1表达精密的调控肝细胞的增殖，使细胞能够顺利的进入并通过S期，展现出有丝分裂的节律。Nrf2对于复制的肝细胞及时地进入M期以及对新生的肝细胞保持分化状态是所必需的。

关键词：Keap1； Nrf2； 肝细胞增殖； 细胞周期； 肝细胞去分化； 肝再生

The Keap1/Nrf2 Signaling Pathway: Regulation of Hepatocyte Cell Cycle during Liver Regeneration

**Abstract**

**Introduction:** Actin-binding Kelch-like ECH-associated protein1 (Keap1) and a leucine zipper motif-containing transcription factor nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) form a pathway combating a variety of xenobiotic and endobiotic insults. In the quiescent state, cytosolic Keap1, as an adaptor, tethers Nrf2 for ubiquitin conjugation by a Cul3-containing E3 ubiquitin ligase, targeting Nrf2 for proteasomal degradation. When oxidative stress occurs, Keap1, as a redox sensor, undergoes a con- formational change because of the modification of its ultrasensitive cysteine residues by oxidative stress-causing highly active molecules such as electrophiles. As a result, Nrf2 escapes from ubiqui tin conjugation, translocates into the nucleus, and, in turn, trans- criptionally activates a group of genes encoding cytoprotective molecules, including detoxifying enzymes, GSH synthesis enzymes, and antioxidant proteins. These mole- cules coordinately combat oxidative stress, thus restoring cellular homeostasis. Subsequently, Keap1 translocates into the nucleus and escorts nuclear export of Nrf2 for continuous proteasomal degradation in the cytoplasm, thus terminating Nrf2 activation. Moreover, Keap1 can interact with other proteins and Nrf2 activity can be regulated at tran-scriptional level or by phosphorylation, suggesting their independent regulation and roles in different biological or pathological processes.

It has been shown that Nrf2 deficiency causes impairment of liver regeneration due to oxidative stress-mediated insulin/insulin-like growth factor resistance and dimi- nished Notch1 signaling. Those few studies indicate that Nrf2 participates in regulating hepatocyte proliferation during liver regeneration. However, how the Keap1/Nrf2 signaling pathway controls hepatocyte replication has never been precisely and sys- tematically investigated.

**Object:** The aim of our study was to gain further insights into the roles of the Keap1/Nrf2 signaling pathway in regulating liver regeneration, with a particular focus on determining whether and how Keap1 and Nrf2 modulate the cell cycle of rege- nerating hepatocytes.

**Methods**: Wild-type and Keap1 knockdown mice and wild-type and Nrf2-null mice were subjected to 2/3 partial hepatectomy (PH), and Various experimental endpoints will be analyzed including hepatocyte cell cycle progression, the expression of the cell cycle components, and the functional states of mitogenic signaling molecules.

**Results:** We found that Keap1 knockdown did not affect the overall hepatic regrowth in response to liver resection but resulted in a delay in S phase entry, disruption of S phase progression, and loss of mitotic rhythm of replicating hepatocytes. These defects caused by Keap1 knockdown are associated with decreased phosphorylation of c-Met and EGFR, aberrant regulation of Akt1 and p70SP6K activities, and abnormal expression of Cyclin s A2 and B1 in regenerating livers. Astonishingly, we found that wild -type regenerating livers exhibited a surprisingly strong wave of redox fluctuation at the G1/S boundary, followed by two additional progressively reduced waves in the S phase, without Nrf2 activation, during the first round of hepatocyte replication following PH. Keap1 knockdown caused severely disrupted hepatic redox cycle, which was closely correlated with dysregulated hepatocyte cell cycle, in regenerating livers.

Nrf2-null mice exhibited sluggish liver regrowth, although the lost liver mass was eventually restored seven days after PH. During the first wave of hepatocyte replication following PH, Nrf2 deficiency caused a delay in hepatocyte mitosis due to excessive accumulation of Cyclin A2 protein and dysregulation of the Wee1/Cdc2/Cyclin B1 pathway in regenerating livers. Most strikingly, at 60 h post-PH, the vast majority of hepatocytes lacking Nrf2 reduced their sizes, activated hepatic progenitor markers (CD133, TWEAK receptor, and trefoil factor family 3 ), and downregulated the

Expression of a group of genes critical for their functions, which was accompanied by p70S6K inactivation. Thus, Nrf2-null hepatocytes were undergoing transient but massive dedifferentiation in response to liver mass loss.

**Conclusion:** We demonstrated that the Keap1/Nrf2 signaling pathway is very important in regulating liver regeneration. The proliferating hepatocytes require precisely regulated Keap1 expression to enter and progress through the S phase and exhibit mitotic rhythm during liver regeneration. Nrf2 is required for timely M phase entry of replicating hepatocytes and for the maintenance of newly regenerated hepatocytes in a fully differentiated state.

**Key Words:** Keap1; Nrf2; Hepatocyte proliferation; Cell cycle; Hepatocyte dediffer- entiation; Liver regeneration

# 正文

Keap1/Nrf2信号通路对再Th肝细胞周期的调控

博士研究生胡敏

导师杨雁教授戴国立教授

# **1** 前言

## **1.1** 研究背景

肝脏是体内少有的具有强大再生能力的器官之一。在正常情况下，虽然肝脏背负着巨大的代谢负担，却只有0.0012%到0.01%的肝细胞处于增殖状态[1-4]。可是肝脏一旦遭受损伤或者遭受外科切除术后，这样低比例的细胞更新就会发生改变。通过肝脏的再生使受损的组织得到修复，并恢复器官的结构和功能。肝细胞作为肝脏主要的结构和功能细胞，在修复过程中表现出强大的再生能力。值得我们注意的是，肝细胞的增殖构成了肝脏再生的基本动力和基本过程。近半个世纪以来，有关肝脏损伤和化学物的毒性研究已经得出一个明确的观点：肝脏组织的修复在决定肝脏损伤最后的转归（存活或者死亡）方面扮演了决定性的角色[5]。及时和/或者增强肝细胞增殖，可以使受损的肝脏得以恢复并存活，反之在病理状态下延迟和/或者抑制肝细胞增殖可引起肝功能衰竭甚至死亡。因此，了解肝细胞增殖的调控机制，对于研发肝损伤预防和治疗手段具有极其重要的意义，也为将来寻求药物作用靶点奠定理论基础。

包括细胞因子、生长因子和基质重塑在内的信号级联放大，通过复杂而精密的分子机制调控着肝再生的起始、发展和终止[6-11]。早期的再生反应包括白细胞介素-6（interleukin-6, IL-6）和肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor alpha, TNF-α）

的产生，以及活化尿激酶（urokinase）、Notch、β-连环蛋白（β-catenin）、信号转导分子转录蛋白激活剂3 (signal transducer and activator of transcription protein 3,

STAT3)、核因子-ҡB(nuclear factor-kappa B, NF-ҡB)、c-fos、c-jun、肝细胞生长因子受体（hepatocyte growth factor receptor, HGFR）和表皮生长因子受体

（epidermal growth factor receptor, EGFR）。这些改变出现在肝组织缺失后最初的几个小时，直接或者间接地为肝细胞进入细胞周期做准备。跟随着这些早期反应事件，是产生直接有丝分裂原，包括肝细胞生长因子（hepatocyte growth factor，

HGF）和转化生长因子-α（transforming growth factor alpha, TGF-α），以及增强直接有丝分裂原作用的物质，如肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor, TNF）和去甲肾上腺素（norepinephrine, NE）。这些因素在肝实质细胞和间质细胞之间，通过自分泌、旁分泌和内分泌方式构成复杂的信号网络，促使肝细胞进入并且通过细胞周期。继发展期之后就是肝脏再生长的终止期，TGF-β和激动素等终止因子抑制肝细胞增殖，诱导肝细胞凋亡并调节肝器官质量。然而，我们对于肝脏损伤反应引起的肝细胞增殖调控的精密的分子机制目前依然所知甚少，而且这在生物医学研究领域是至关重要的。肝损伤过程中的肝细胞再生，胚胎形成过程中肝细胞的发育，甚至肝细胞癌，都通过一个共同的中心事件：肝细胞增殖（受调控或者失控），相互连接在一起。因此，深入探讨肝细胞增殖的调节机制，对于了解肝脏生理机能和病理状态都极为重要。

Keap1(Kelch-like epichlorohydrin-associated protein 1) /转录因子NF-E2相关因子2 (nuclear factor- E2 -related factor 2, Nrf2)信号调节通路在保护细胞抗氧化以及外来损害方面扮演了重要的作用。

转录因子Nrf2是一个强有力的转录激活因子，在保护多种细胞对抗氧化还原反应和电子应激反应过程中起到重要的作用。Nrf2属于CNC-bZIP ( cap'n'collar subfamily of basic leucine zipper)，即CNC亮氨酸拉链转录激活因子家族，主要在肝脏、肾脏等代谢和解毒组织内表达，以及其它持续暴露在环境中的组织，如皮肤、肺、消化道等，普遍表达于各种细胞[12]。它能够与DNA中的抗氧化反应原件

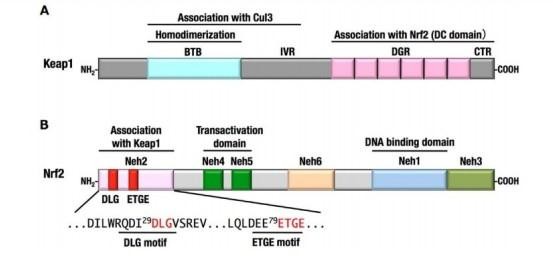
ARE序列（GTGACTCAGCA）相结合。不同物种如人、鼠和鸡的Nrf2基因具有同源性，均含有6个高度保守的环氧丙氯烷（epichlorohydrin, EHC）相关蛋白同源结构域（Nrf2- EHC homology, Neh）[12-14]，分别被命名为Neh1-6. Neh1区中含有一个亮氨酸拉链结构（bZIP），通过bZIP可以与小Maf蛋白（smallMafproteins, 包括MafG、MafK、MafF）形成异二聚体，识别ARE上DNA序列并与之结合，启动目标基因转录[15]。Neh2区是Nrf2的活性区，包含有DLG和ETGE序列，可以与胞浆蛋白Keap1的Kelch/ DGR结合，通过蛋白酶介导Nrf2降解而对Nrf2活性进行负性调节。Neh2区域与Nrf2的转录活性密切相关[16]。Neh3的C-端对Nrf2的转录活性是必不可少的[7]。通过招募共激动剂-染色质解螺旋酶DNA结合蛋白 6

（chromodomain helicase DNA-binding protein 6, CHD6）活化转录。Neh4和Neh5位于Neh1和Neh2之间，是两个独立的激活区，它们可以与共激活因子CREB结合蛋白CBP[cyclic AMP -response elememb; binding protein (CREB)]结合会使CBP协同参与对Nrf2目标基因转录活性的激活[17]。Neh6富含丝氨酸残基，与Nrf2的负性调节有关[18]。

Keap1是Kelch家族多区域阻抑蛋白。正常情况下在胞浆中锚定于肌动蛋白细胞骨架上[13-14]。人类Keap1蛋白一级结构包含5个区，分别是：（1）N末端区域；（2）BTB(bric-α-brac/tramtrack/broad complex)区域：这是在肌动蛋白结合蛋白和锌指转录因子中发现的一个蛋白-蛋白相互作用的进化保守基序，通常和其它BTB区域形成二聚体，是Keap1与Nrf2解离、阻止II相基因转录所必需的；

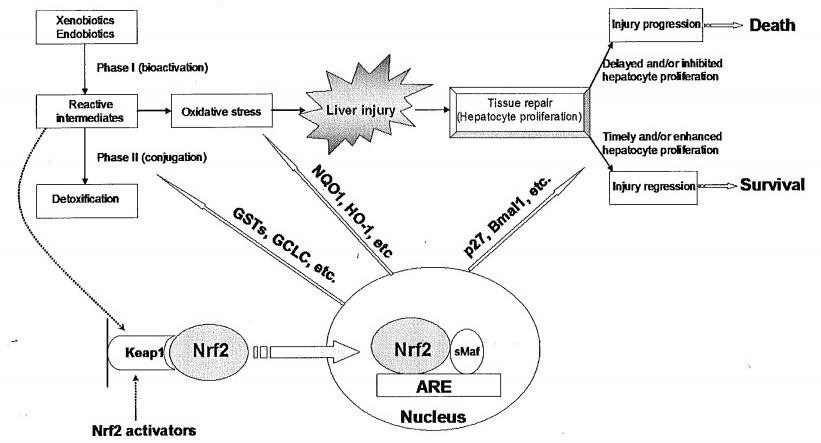
（3）干预区（intervening region, IVR）：该区域不仅富含半胱氨酸，而且含有

Keap1活性最强的半胱氨酸残基，是整个蛋白的功能调节区，不仅参与亲电子化合物及氧化剂的反应，同时还参与形成泛素化连接、稳定Nrf2；（4）双甘氨酸或Kelch重复区（double glycine or Kelch repeat, DGR区）：含有6个双甘氨酸重复序列或6个Kelch模序，重复的Kelch模序形成6片经典的β螺旋，含有多个潜在的蛋白质结合位点，是Keap1与Neh2区结合的位点，也是Keap1与胞浆肌动蛋白结合的位点；（5）C末端。见图1和图2。



**图 1** Keap1**和Nrf2的分子结构**

**Fig.** **1** Molecular structures of Keap1 and **Nrf2**



**图 2** Nrf2**激活机制**

**Fig.** **2** Machanism of Nrf2 **action**

在生理状态下，细胞质内的Keap1起到一个结合器的作用，通过一个含有E3的Cul3泛素连接酶泛素连接作用与Nrf2结合在一起，Nrf2作为目标被蛋白体酶降解。当氧化应激反应出现，Keap1 作为一个氧化还原反应的传感器，它末端敏

感的半胱氨酸残基通过氧化还原反应产生高效分子（比如亲电子试剂）而被修饰，导致其构象发生变化。从而使Nrf2从泛素结合区脱落，进入细胞核内，与其配偶蛋白（如小Maf蛋白）形成异二聚体，依次转录激活一组基因，编码细胞保护分子，包括解毒酶、谷胱甘肽合成酶、抗氧化蛋白等[19]。这些分子共同对抗氧化应激反应，恢复细胞的内稳态。随后，Keap1进入细胞核内，与Nrf2一起出核并使

Nrf2在胞浆内持续被蛋白酶降解，Nrf2水平下降，激活终止[20-21]. Nrf2在全身广泛表达，但是在代谢器官表达更加明显，包括肝脏[22]。通过Keap1/Nrf2信号通路的激活，在解毒、抗氧化作用和抗炎方面表现出多方面的有利影响。在过去的十多年里，这吸引了很多研究者的兴趣去研究在健康和疾病状态下它们的调节、激活方式、靶基因和功能。这已经被广泛地被认为是预防和治疗各种疾病，包括肝损害的一个有希望的药物作用靶点。见图3。



**图 3** Keap1/Nrf2**信号通路**

**Fig.** **3** Keap1/Nrf2 signaling **pathway**

真核细胞的细胞周期进程被分为G0期（静止期），G1期（DNA合成前期），

S期（DNA合成期），G2期（DNA合成后期）和M期（有丝分裂期）。细胞周期的每一个阶段都受到由细胞周期蛋白（调节亚基）和细胞周期素依赖性激酶

（Cdks）（催化亚基）构成的各种蛋白复合物的连续激活的调控[23-26]. Cdk4与Cyclin D相结合是G1期进程所必不可少的。Cdk2与Cyclin E和Cyclin A相结合是从G1向S期转换以及S期进程所必须的。有丝分裂促进激酶，Cdk1（也称为

Cdc2）的激活，需要与Cyclin B相绑定，在G2向M期的转换扮演一个基本的角色。2/3 部分肝切除（PH）是活体内研究细胞周期调节的一个广泛应用的模型，因为PH 可引起肝细胞内细胞周期进程的高度同步，并且不会造成主要细胞的损伤和炎症[4,9,27]。PH后的小鼠，残余成熟肝细胞显示出4个连续的复制起伏波型，最终在7-10天可以使缺失的肝脏得以修复。其中在肝细胞复制周期第一个也是最强的一个波型中，肝细胞大概在PH后24 h到达G1/S期临界点，36 h经历DNA合成（S期）高峰，随后，在44-48 h展现出有丝分裂的高峰[4,28-29]。这一过程高度同步，因此我们能够精确地评估Keap1/Nrf2信号通路在细胞周期的每个阶段中的调节作用。见图4。



**图 4** PH**后增殖的肝细胞周期**

**Fig.** **4** The cell cycle of proliferating hepatocytes after **PH**

有报道指出，Nrf2缺失可使再生的肝脏由于氧化应激介导的胰岛素/类胰岛素生长因子抵抗和Notch1信号减弱而引起损伤[42]。我们研究的目的是进一步探讨Keap1/ Nrf2信号通路在肝再生过程中的调节作用，特别是要深入了解Keap1/

Nrf2通路是否参与肝再生过程中复制肝细胞的细胞周期进程，以及如果参与其中，是通过怎样的方式进行调控。我们运用2/3肝脏切除术模型，是因为肝部分切除不会引起主要细胞的损伤和炎症反应，并可诱导肝细胞形成高度同步的细胞周期进程[6]。小鼠在部分肝脏切除术后，残余肝细胞的复制会表现出四个连续的波型，最终受损的肝脏在7-10天使得以修复。在肝细胞复制第一个也是最强的波型过程中，肝细胞在术后24h到达G1/S转换区，在术后36h到达DNA合成（S期）的高峰，随后在手术后第2天，亮灯时间到达有丝复制高峰（M期）[28-29]。活体实验所表现出来的这种特性，可以使我们精确地评估Keap1/Nrf2通路在细胞周期每一个阶段的调节作用。

## **1.2** 本课题实验设计路线

基于以上背景，我们选取keap1+/+和Keap1+/-小鼠以及Nrf2+/+和Nrf2-/-小鼠作为研究对象，进行2/3肝脏切除手术，并在术后多个时间点利用免疫组织化学、免疫荧光、qRT-PCR、Western blotting等方法，对肝细胞增殖、细胞周期蛋白、促有丝分裂信号分子的功能状态、肝氧化还原状态等方面进行评估，证实

Keap1基因单等位体缺失和Nrf2基因缺失给肝细胞增殖带来的影响。详细实验技术路线见图5。



**图 5** **研究设计方案概述**

**Fig.** **5** The overview of syudy **design**

# **2** 实验材料和方法

## **2.1** 实验动物

Keap1+/+和Keap1+/-小鼠购于日本RIKEN生物资源中心(RBRC01388)，雄性，5- 6个月大小；Nrf2 +/+和Nrf2 -/-小鼠由C57BL6/129SV杂交所得[30]，雄性，

3个月大小。小鼠放于塑料笼内，置于温度22±1°C，从早上6: 00到晚上6: 00实行12小时照明/12小时黑暗周期的动物房内饲养。整个饲养过程采用标准的啮齿类动物饲料和水，自由摄取。所有动物实验都遵循美国国立卫生护理研究院和实验动物使用指导。

## **2.2** 实验试剂

组织溶解液：购于美国Thermo Scientific公司( Prod#78510 Lot#KF133296)

蛋白酶和磷酸酶抑制剂：购于美国Thermo Scientific公司(Prod#78443)

蛋白分析液：购于美国Thermo Scientific公司（Prod#1861426 Lot#KA128788）4×Invitrogen NuPAGE**®**LDS上样缓冲液：购于美国Invitrogen公司（Cat# NP0008）

2-Mecraptoethanol (BP176-100): 购于美国Fisher Scientific公司

4-12% 15孔上样胶：购于美国Invitrogen公司(Cat# NP0323BOX)

4-12% 26孔上样胶：购于美国Invitrogen公司(Cat# WG1403BOX)

牛血清蛋白：购于美国Fisher Scientific公司( Cat# BP1605-100)

ft羊抗兔IgG (H+L) -HRP结合二抗：购于加拿大Bio-Rad公司（Cat# 170-6515）ft羊抗小鼠IgG (H+L) -HRP结合二抗：购于加拿大Bio-Rad公司（Cat# 170-6516)牛抗ft羊IgG (H+L) -HRP结合二抗：购于美国Santa Cruz公司(sc-2378)

抗Ki-67抗体：购于美国Thermo Scientific公司

抗BrdU抗体：购于美国Cell Signaling Techology公司（#5292）Vectastain ABC试剂盒（Rabbit IgG): 购于美国Vector Laboratory (PK-4001)

DAB试剂盒：购于美国Vector Laboratory (SK-4001)

Pierce 660nm蛋白分析液：购于美国Thermo Scientific公司（Prod#1861426）

Trizol: 购于美国Invitrogen公司(Cat#15596-018)

氯仿：购于美国IBI Scientific公司(Cat# IB05040，分子生物级别)

异丙醇：购于美国Acros Organics公司(Cat# AC32727，分子生物级别)

PBS缓冲液：购于美国Thermo Scientific公司（Cat# 28376）

75%酒精：购于美国Fisher Scientific公司（Cat# BP2818-4，分子生物级别）无RNase水：购于美国Fisher Scientific公司（Cat# BP561-1）

cDNA试剂盒：购于美国Thermo Scientific公司（Cat# AB-1453B）

PCR反应96孔板：购于美国Eppndorf公司

DNA级别水：购于美国Applied Biosystems公司（Cat# N801-0560）

Taqman基因表达分析探针：购于美国Biosystems公司

Taqman基因表达通用液体：购于美国Biosystems公司（Cat# PN4369016）

TBARS分析试剂盒：购于美国ZeptoMetrix Corporation

小鼠多克隆抗-Cdc2抗体：购于美国Santa Cruz Biotechnology公司(sc-54 AC)

裂解缓冲液：购于美国Thermo Scientific公司

Cdc2 -Cyclin B激酶分析试剂盒：购于日本CycLex公司

β-catenin一抗：购于美国BD Biosciences公司总RNA提取试剂盒：购于美国Invitrogen公司

Western Blotting蛋白标准品：购于美国Fisher Bioreagents (Cat# BP3603-500)

ECL试剂：购于美国Millipore Immobilon (Cat# WBKLS0100)

X线胶片：购于美国Thermo Scientific公司（Prod# 34093）

DPBS: 购于美国JR Science公司（Cat# 30045）

中性树胶：购于美国Thermo Scientific公司（Prod# 1859351）

## **2.3** 实验仪器

大功率微型离心机5417R：购于美国Eppendorf公司

RW16基本型顶置式电子搅拌器：购于IKA公司

Fisher Scientific\* Isotemp\* Plus Chromatography Lab Refrigerators （4°C）：购 于

Fisher Scientific公司（cat#13-986-138）

Kenmore 16.7cu. ft. Freezerless Refrigerator -20°C (Item# 04660722000, Mfr. Model # 60722 ): 购于Kenmore公司

Forma\* High-Performance Lab Refrigerators with Solid Doors: 购于美国Thermo

Scientific公司

Fisher Scientific\* Analog Vortex Mixer: 购于美国Fisher Scientific公司NanoDrop\* 2000 Spectrophotometer（分光光度计）：购于美国Thermo Scientific公司Thermomixer compact(Temperature and mixing): 购于美国Eppendorf公司

电泳槽Invitrogen XCell SureLockTM Mini-Cell, Cat# EI0001）: 购于美国Invitrogen

公司

Orbit™1000 Multipurpose Digital Shaker（Orbit™1000多功能数字振荡器）：购于美国Lebnet International公司

Criterion™Blotter With Wire Electrodes and PowerPac™HC Power Supply #170-

3874（转膜槽）：购于加拿大Bio Red公司

Mastercycler®pro PCR扩增仪：购于美国Eppendorf公司

[Fisher Scientific\* Isotemp\* Basic Stirring Hotplates](http://www.fishersci.com/ecomm/servlet/%09%09%09%09%09%09%09%09fsproductdetail?position=content&amp;tab=Items&amp;productId=6931448&amp;fromSearch=1&amp;highlightProductsItemsFlag=Y&amp;catlogId=29104&amp;storeId=10652&amp;langId=-1%20%20%20%20%09)> Ceramic stirring hotplate, 4 x 4 in, 120V 60Hz 加热搅拌器11-100-16SH: 购于美国Fisher Scientific公司

[Fisher Scientific\* Isotemp\* Basic Stirring Hotplates](http://www.fishersci.com/ecomm/servlet/%09%09%09%09%09%09%09%09fsproductdetail?position=content&amp;tab=Items&amp;productId=6931448&amp;fromSearch=1&amp;highlightProductsItemsFlag=Y&amp;catlogId=29104&amp;storeId=10652&amp;langId=-1%20%20%20%20%09)> Ceramic stirring hotplate, 10 x 10 in, 120V 60Hz加热搅拌器11-100-100SH: 购于美国Fisher Scientific公司MS3002S Precision Balance: 购于美国Mettler Toledo公司

XP204 analytical balance: 分析天平：购于美国Mettler Toledo

ABI Prism 7900 sequence detection system: 购于美国Applied Biosystems公司

CO2 incubator: 购于美国Forma Scientific公司Isotemp Heat Stirrer: 购于美国Fisher Scientific公司Mettler Toledo PH meter: 购于美国Mettler Toledo公司Labnet Orbit Shaker: 购于美国Labnet International公司

Termo Scientific -80 Freezer: 购于美国Termo Scientific公司Eppendorf Thermomixer: 购于Eppendorf North America公司Eppendorf Centrifuge 5810R: 购于Eppendorf North America公司Leica Microscope Imaging System: 购于美国Buffalo Grove公司Power Supply 200V: 购于加拿大Bio-Rad公司

Eppendorf Thermocycler: 购于Eppendorf North America公司

Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader: 购于美国BioTek公司

## **2.4** 实验方法

### **2.4.1** 肝部分切除术（**partial hepatectomy**，**PH**）

参照标准的手术方法对实验小鼠进行2/3肝脏切除术[31]。3个大的肝叶（左叶、左中叶和右中叶）（见图5），大约68%的肝脏被切除。所有的操作严格标准化。手术在每天上午10: 00至12:00间进行，以减少由于手术时间和生物钟对肝再生进程所导致的一些潜在误差的可能性[32]。动物的使用和护理方案得到印地安那大学-普渡大学印第安纳波利斯分校动物护理和使用协会的许可。手术主要操作过程如下：

(1)用吸入麻醉法（异氟烷）将小鼠进行麻醉。

(2)用手术剪刀，沿小鼠腹部中线偏左的位置剪开一个2.5 cm~3 cm的切口，上至剑突软骨的上方，暴露剑突，下至距小鼠肛门处3 cm的位置。用弧形拉钩拉开腹肌，另一端固定在手术板上。两支拉钩撑开切口，暴露肝脏。

(3)使用眼科剪游离与肝脏相连的韧带，充分暴露左叶。以2-0缝合线，自左叶根部结扎。

(4)用镊子轻轻夹起，使用眼科剪贴线结根部将左叶靠近根部打结并进行切除切除，肝切面如有出血情况，使用消毒的棉球轻轻擦拭即可。

(5)同（3）（4）法切除其余几叶，胆囊保留。

(6)用连续缝合法缝合腹腔，并闭合表皮。碘酒、酒精消毒切口。

(7)术后，在腹腔缝合后皮下注射3ml 0.9%生理盐水，以补充手术过程中的体液丢失。

(8)将手术后的小鼠右侧卧位，置于干燥柔软的手术巾上，置于灯光下复温至小鼠苏醒。



**图5 小鼠肝脏结构**

**Fig.** **5** **The struction of mice**

### **2.4.2** 肝细胞增殖的评估

在处死实验小鼠1 h之前，给将要被处死的实验小鼠腹腔注射溴脱氧核苷(5- bromo-2-deoxyuridine, BrdU ) (100 mg/kg)。处死后立刻取下小鼠肝脏标本，并放入福尔马林溶液中进行固定，采用石蜡包埋制作肝组织切片。在HE染色切片中观察核有丝分裂像。同时利用免疫组织化学染色（immunohistochemistry, IHC ）对增殖肝细胞中Ki-67和BrdU进行染色。光学显微镜下，每张切片随机选取5个视野，对Ki-67（200×）和BrdU（200×）阳性肝细胞和肝细胞有丝分裂象（100×）进行计数。

免疫组织化学染色（IHC）操作步骤如下：

##### （1) 取出制备好的石蜡切片，放入二甲苯溶液中浸泡5 min

##### （2) 按照酒精浓度梯度依次脱蜡至水

1）100%酒精5 min，甩去多余液体

2）90%酒精5 min，甩去多余液体

3）85%酒精2 min，甩去多余液体

4）70%酒精5 min，甩去多余液体

##### （3) PBS洗涤，5 min

##### （4) 将装有枸橼酸钠的容器放置于恒温加热器上加热至煮沸

##### （5) 将玻片放入煮沸的枸橼酸钠溶液，盖上容器盖，断去电源，用余热加热

10 min

枸橼酸缓冲液的配制

枸橼酸1.92 g

20% Tween-20 2.5 ml

加入双蒸水至总体积1L，用NaOH调节PH值至6.0。将容器拿下，至少冷却3 h，使切片温度降至37℃

##### （6) PBS洗涤，5 min

##### （7) 甩去玻片上多余的PBS液体，放入3%的H2O2灭活内源性过氧化物酶，

10 min

##### （8) PBS洗涤，5 min

(9)取出Vectastain ABC试剂盒，在3.3 ml的DPBS溶液中加入一滴（50μl）正常血清

(10)甩去玻片上多余的PBS溶液，每张切片滴加上述配制好的液体200μl，放入湿盒内，室温孵育1h

(11)甩去玻片上多余的液体，不洗，滴加事先按浓度稀释好的一抗溶液，每张切片滴加200μl，4℃过夜，

(12)取出玻片，甩去玻片上多余液体，放入PBS洗涤，5min×2

(13)加入事先按比例稀释好的二抗溶液，放入湿盒内，室温孵育1 h

(14)在孵育至30 min时取出Vectastain ABC试剂盒，配制ABC试剂。5 ml

DPBS溶液中先滴入1滴试剂A，然后再加入1滴试剂B，静置30 min

(15)取出玻片，甩去玻片上多余的液体，用PBS清洗，5 min×2

(16)每张切片滴加配制好的ABC试剂200μl，室温放置30 min

(17)取出玻片，甩去玻片上多余的液体，PBS清洗，5 min×2

(18)甩去玻片上多余液体，滴加新鲜配置的DAB工作液，显微镜控制显色，自来水冲洗

(19)苏木素复染，梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封固

每批实验均设有阴性和阳性对照。用PBS代替一抗作为阳性对照，已知阳性切片作为阳性对照。

实验所用一抗抗Ki-67抗体购于美国Thermo Scientific公司（Cat#9106S）；抗BrdU抗体购于美国Cell Signaling Techology公司（Cat #5292）

### **2.4.3** 免疫印记法（**Western blotting**）检测

#### **2.4.3.1** 肝组织蛋白的提取

(1)提前将离心机预冷至4℃

(2)每支混匀管中加入500μl组织溶解缓冲液以及10μl蛋白酶和磷酸酶抑制剂，并放于冰上冷却

(3)将大约100 mg的小块冷冻肝脏组织加入预冷的混匀管中，立刻用电子研磨器，以2.5的速率进行研磨混匀，2min

(4)将装有肝组织溶解液的混匀管放置于冰上至少2 min，使研磨产生的泡沫消失

(5)将肝组织溶解液转移至新的1.5 ml的EP管，并置于冰上

(6)离心组织溶解液，4℃，3000 rpm, 5 min

(7)离心后，将微量移液器插入放置离心后的组织溶解液的EP管中间部位，将组织溶解液转移至新的EP管并置于冰上

(8)肝组织溶解液存储至-80℃冰箱内备用

#### 2.4.3.2 蛋白浓度的测定

（一）制备蛋白浓度标准曲线

1. 把制备好的组织溶解产物存储液用BSA制备成连续的标准品系：125, 250，

500, 750，1000，1500, 2000μg/ml

2. 从上述制备好的标准品存储液中取出10μl，与150μl 660 nm蛋白分析试剂相混合

3. 每个样本均设置复孔

4. 用旋涡混匀器轻轻混匀，并孵育5 min

5. 使用Nano Drop 2000分光光度计，以2μl超纯水作为空白对照

6. 以2μl 660 nm蛋白分析试剂作为内参

7. 以每个制备的稀释的组织溶解产物存储液2μl产生标准曲线

8. 保存标准曲线并永久使用



（二）使用Nano Drop 2000分光光度计检测样本蛋白浓度

1. 将装有组织溶解液的离心管用旋涡混匀器轻轻混匀

2. 把10μl原始组织溶解液与190μl超纯水在离心管中混匀（20倍稀释）

3. 轻轻旋涡混匀

4. 将10μl稀释过的组织溶解液与150μl 660 nm蛋白分析试剂相混合

5. 轻轻旋涡混匀并孵育5 min

6. 使用Nano Drop 2000分光光度计，以2μl超纯水作为空白对照

7. 使用Nano Drop 2000分光光度计检测2μl混合液的吸光度

8. 原始组织溶解液的蛋白浓度为读出数×20μg/ml

#### **2.4.3.3** 上样样本的制备

1. 将加热混匀器的温度设置至99℃

2. 将组织溶解液从-80℃冰箱取出后，放于冰上至融化，用之前轻轻旋涡混匀

3. 按照顺序加入以下试剂

每15μl上样标本，终浓度为10μg/15 ml

超纯水：Xµl (X + Y =10.875µl) 4×LDS上样缓冲液：3.75µl

β-巯基乙醇：0.375µl

组织溶解液：Yµl

4. 将上述制备好的样本放入加热混匀器中，99℃，800 rpm, 5 min

5. 拿出后立刻置于冰上，冷却2 min

6. 短暂离心

7. 短暂旋涡混匀样本

8. 制备好的样本存储在-80℃冰箱

9. 上样前从冰箱拿出，放置室温融化，并在上样前轻轻旋涡混匀

#### **2.4.3.4** 蛋白电泳

1. 将去除梳子的凝胶放入电泳槽，在电泳槽里倒入电泳缓冲液，内槽装满，外槽装至标记部位

2. 上样。用微量移液器加蛋白分子标准量10μl/孔，制备好的上样标本14μl/孔

3. 电泳：开始时电压为100V，样本进入分离胶后，增加到200V，电泳到样本抵达分离胶底部，断电

10×SDS Running Buffer制备

MOPS 104.6 g

Tris Base 60.6 g

SDS 10.0 g

EDTA 3.0 g

加蒸馏水至1000 ml。

#### **2.4.3.5** 转膜

1. 取出凝胶，切除上样孔，并浸泡于蒸馏水中，放于摇床轻轻摇晃10 min

2. 剪2张滤纸和1张PVDF膜，大小与凝胶完全吻合，不能大于凝胶，切左上角作标记

3. 将PVDF膜浸入100%甲醇1 min，浸入电转液10min 4×transfer buffer制备

Tris 24.24 g

Glycine 115.2 g

H2O to 2 L

1×transfer buffer(1L包含25 mM Tris(3.03g), 192 mM Glycine(14.4g), 200ml

甲醛）制备

4×transfer buffer 250 ml

Methanol 200 ml

H2O to 1L

4. 将滤纸和多孔垫片浸入电转液

5. 安装转膜装置：

从+（黑色）→－（红色）依次为：

多孔垫片→滤纸→凝胶→PVDF膜→滤纸→多孔垫片

6. 接通电源：100V，30 min

#### **2.4.3.6** 抗体封闭

1. 取出PVDF膜，放入10 ml封闭液（5% milk-TBST），置于摇床，80转/分，室温孵育1 h

10×Tris Buffer Saline (TBS)的制备Tris base: 24.2 g

Nacl: 80 g

加蒸馏水至1 L，用HCL调节pH至7.6

Wash Buffer（1×TBS）的制备：1×TBS+0.1% Tween-20 10×TBS: 100 ml

20% Tween-20: 5 ml

加蒸馏水至1 L

2. 缓缓倒去封闭液

3. 翻转膜，正面向下，加入20 ml用5% milk-TBST或者5% BSA-TBST稀释的一抗，4℃，轻摇过夜

4. 把膜正面向上翻转，加入TBST轻摇洗膜10 min×3次，室温

5. 翻转膜，正面向下，放入40 ml用5% milk-TBST稀释的二抗溶液中，室温轻摇孵育1h

6. 把膜正面向上翻转，加入TBST轻摇洗膜10 min×3次，室温

#### **2.4.3.7** **ECL**显色

1. 显色之前打开冲洗机器，预热20分钟

2. 配制显色液：按试剂盒说明书指导，将A液和B液按1: 40比例混合均匀

3. 滴去膜表面多余的TBST，将膜蛋白面朝下与显影液充分接触，室温，1 min

4. 取出膜，用滤纸吸去多余的液体

5. 用保鲜膜把膜包起来（去除气泡），放在暗盒中，至暗室

6. 取出胶片，左上角做标记，放入暗盒，曝光时间从1 min钟开始，根据条带深浅进行调整

7. 从暗盒中取出胶片，放入冲洗机器中冲洗

实验中利用抗Cyclin D1 (#2922), Cyclin B1 (#4138), p-p70S6K (T389) (#9234),

P-p70S6K (S371) (#9208), p70S6K (#2708), p-4E-BP1 (T37/46) (#2855), 4E-BP1

(#9644), mTOR (#2983), and p-MTOR (S2448) (#5536) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA); against Cyclin A2 (1540-1), Akt1 (#1081-1), p-Akt1 (T308) (#2214-1), p-Akt1 (S473) (#2118-1), epidermal growth factor (EGFR) (#1114-1), and p-EGFR (Y1086) (Epitomics, Burlingame, CA); against c-Met (#47431) and p-c-Met (#5662) (Abcam, Cambridge, MA); and against Cyclin E1 (SC-481) and glyceraldehyde 3-

Phosphate dehydrogenase (GADPH) (SC-25778) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); against Fn14 (ab109365, Abcam, Cambridge, MA); NQO-1 (2618-1) (Epitomics, Burlingame, CA); against TFF3 (SC-18273), Wee1 (SC -9037), p-Cdc2 p34 (Tyr 15) (SC -7898), Cdc2 p34 (SC -54)(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); and against CD133 ( PAB12663, Abnova, Walnut, CA)抗体作为探针进行检测。

免疫复合物用增强化学发光系统进行检测(Pierce, Rockford, IL)。

### **2.4.4** 定量实时聚合酶链反应**(Quantitative realtime polymerase chain reaction, qRT-PCR)**

#### **2.4.4.1** 总**RNA**的提取

总RNA的提取是严格按照操作手册指导(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)，利用裂解液从冰冻的肝脏组织中提取。

(1)大约100 mg的组织样本加入1 ml的Trizol裂解液，用探针伸入其中，电子研磨器开至“5”档，上下反复研磨6次，使组织完全匀浆化

##### （2) 将研磨好的的溶液转移至新的1.5 ml EP管，室温静置10 min

##### （3) 按200 ul氯仿/mlTRIZOL加入氯仿，盖紧盖子，剧烈振荡30 s，室温放置5 min

##### （4）4℃，12000g离心，15 min

##### （5) 吸取上层水相约400µl至1.5 ml EP管，加入1 ml异丙醇，充分混匀，室温放置10min

##### （6) 4℃，12000g离心10 min，弃上清，RNA沉于管底

##### （7) 加入0.5 ml 75％的乙醇，温和振荡，悬浮沉淀

##### （8) 4℃，12000g离心，10 min，尽量弃上清，室温自然干燥5-10 min

(9)加150µl无Rnase的水，溶解沉淀

（10）样本置于混合器上，60℃，800 rpm, 10 min

#### **2.4.4.2** **RNA**纯度测定

参照美国Thermo Scientific公司NanoDrop 2000分光光度计使用说明，对

RNA浓度进行测量。

(1)每个样本取2µl RNA进行测量

(2)如果A260/A280比值大于2.0, 1:1稀释RNA样本重新进行测量

(3)用40µl无Rnase的水稀释20µg RNA（0.5µg/µl），为qRT-PCR所用

(4) RNA样本冻存于-80℃备用

#### **2.4.4.3** **cDNA**合成

利用反义cDNA试剂盒(Thermo Scientific, Rockford)，从总RNA (1µg)中合成cDNA. 根据试剂盒说明进行，采用20 ul逆转录反应体系：

##### (1)在装有40µl DEPC水的EP管中加入8µg RNA，混匀后，70℃，5min。取出后迅速置于冰上泠却。

##### （2) 配制反应液

5.0 µl RNA(1 µg )

4.0µl 5×cDNA Synthesis Buffer

2.0 µl dNTP Mix

1.0 µl RNA Primer

1.0µl RT Enhancer

1.0µl Verso Enzyme Mix

6.0µl RNase free Water

以上操作在冰上进行，将反应液与RNA混匀后，转移至PCR 仪

##### （3) 在 PCR 仪中建立 PCR 反应体系

25℃ 10 min 1cycle

42℃ 60 min 1cycle

95℃ 2 min 1cycle

4℃ hold

##### （4) 简单离心。在20µl反应体系内加入60µl DNA级别水，进行1: 4稀释，用微量移液器混匀

##### （5) cDNA存储于-20℃备用

#### **2.4.4.4** 定量实时聚合酶链反应，对**mRNA**水平进行定量

TaqMan通用的PCR混合液和探针，以及小鼠CyclinA2 (Mm00438063\_m1), Keap1 (Mm00497268\_m1), Nrf2 (Mm00477786\_m1), NQO1 (Mm01253561\_m1), RAD51 (Mm00487905\_m1) , RAD51l1 (Mm01302591\_m1) , CyclinB1

(Mm03053893\_gh), Cdc2 (Mm00772472\_m1), Wee1 (Mm00494175\_ml), Cyp7a1 (mm00484150\_m1), Cyp8b1 (Mm00501637\_s1), SHP (mm00442278\_m1), FXR (Mm00436425\_m1) , AhR (Mm00478932\_m1) , PPARα(Mm00440939\_m1) , β-

actin (Mm00607939\_s1)和albumin (Mm00802090\_m1)探针均购于Applied Biosystems (Foster City, CA). 扩增反应在ABI Prism 7900序列检测系统(Applied Biosystems, Foster City, CA)中进行。

起始hold（50°C 2 min , 接着95°C 10 min），循环40次进行扩增（92°C 15 s和60°C 1 min）。以白蛋白转录物水平作为标准物，采用相对CT方法检测每个样本mRNA含量。

### **2.4.5** 肝脏氧化还原反应分析

#### **2.4.5.1** 二氢已啶（**DHE**）染色

(1)制备肝组织样本冰冻切片（10μM）

(2)每张切片加入配制好的30μM二氢已啶（DHE），在37oC染色30 min，避光

(3) PBS漂洗，5 min×3

(4)荧光显微镜下观察红色荧光物

所有肝脏样本切片照片(400×)在同样对比度及亮度下进行拍摄。

#### **2.4.5.2** 肝脏硫代巴比妥酸反应物（**TBARS**）进行定量检测

按照说明书，运用TBARS分析试剂盒(ZeptoMetrix Corporation, Buffalo, NY)，对肝脏硫代巴比妥酸反应物（TBARS）进行定量检测。

试剂的准备：

TBA/Buffer试剂

用一瓶TBARS稀释液1（50 ml），一瓶TBARS稀释液2（50 ml）和1小瓶硫代巴比妥酸（TBA）。100 ml准备的液体大约可以用作40份检测。

把TBA加入半瓶含有TBARS稀释液1的混合容器内，用剩下的半瓶TBARS稀释液1冲洗TBA小瓶，并且使之充分混合。加入1瓶TBARS稀释液2，充分混合，使TBA完全溶解。

用于荧光光度计的MDA标准曲线

用未稀释的MDA 100 nmol/ml作为标准。按照给的表格依次准备5个MDA标准稀释品。



操作步骤

(1)每只小鼠取50 mg肝脏组织，与300μl冰冻的PBS混匀

(2)从每个肝脏混合液取60μl参与再反应

(3)在950C孵育60 min后，检测肝脏混合液在532 nm处的吸收值。TBARS作为丙二醛的等同物，利用丙二醛的标准曲线可以对其定量。

### **2.4.6** **DNA**损伤分析

用抗磷酸化组蛋白H2A. X (γ-H2AX) (S139) (#05-636, Millipore, Billerica, MA)抗体，采用免疫荧光染色对福尔马林固定的肝脏石蜡切片进行检测。二抗采用Dylight 488-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (#115-485-174, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). 在荧光显微镜下（200×）每张切片随机选取5个区域，对细胞核内4个及4个以上γ-H2AX-阳性碎片进行计数。

免疫荧光染色（IF）步骤如下：

##### （1) 取出制备好的石蜡切片，放入二甲苯，浸泡5 min

##### （2) 按照酒精浓度梯度脱蜡至水

1）100%酒精，5 min，甩去多余液体

2）90%酒精，5 min，甩去多余液体

3）85%酒精，2 min，甩去多余液体

4）70%酒精，5 min，甩去多余液体

##### （3) PBS洗涤，5 min

##### （4) 将装有枸橼酸钠的容器放置于恒温加热器上加热至煮沸

##### （5) 将切片放入煮沸的枸橼酸钠溶液，盖上容器盖，切断电源，利用余热加热10 min

枸橼酸缓冲液的制备

枸橼酸1.92 g

20% Tween-20 2.5 ml

加入双蒸水至总体积1L，用NaOH调节PH值至6.0。

将容器拿下，至少冷却3 h，使玻片温度降至37℃

##### （6) PBS洗涤，3 min

##### （7) 取出Vectastain ABC试剂盒，在3.3 ml DPBS溶液中加入一滴（50μl）正常血清

##### （8) 甩去玻片上多余的PBS溶液，每张切片滴加上述配置液体200μl，放入湿盒内，室温孵育1 h

##### （9) 甩去玻片上多余的液体，不洗，滴加事先按浓度稀释好的一抗溶液，4℃过夜

（10）取出玻片，甩去玻片上多余液体，放入PBS洗涤，5 min× 2

（11）加入事先按比例稀释好的有荧光标记的二抗溶液，放入湿盒内室，温孵育1 h

（12）取出玻片，甩去玻片上多余的液体，加上DAPI孵育1 min

（13）PBS洗涤，5 min× 2

（14）中性树胶封固，放于荧光显微镜下进行观察

### **2.4.7** 瞬间转染和荧光素酶报告基因活性检测

Hepa-1细胞在含10%胎儿牛血清(Biomeda, CA)的Dulbecco's改良的伊戈尔培养基( Mediatech, VA)培养，37°C，5% CO2. 细胞种植于24孔板，每孔细胞大约1×105。经过一夜培养，根据制造商的操作指南，利用FuGENE6 (Promega,

Madison, WI）共转染下列质粒构建物。

(1) mCyclin A2-Luc (300 ng/well)，鼠Nrf2表达质粒(50 ng/well)和renial荧光素酶表达质粒。mCyclin A2-Luc含有firely荧光素酶报告基因，此报告基因由700bp的鼠Cyclin A2基因5'端序列调控。Renial荧光素酶表达质粒作为内对照来矫正转染效果。

(2) mCyclin A2-Luc (300 ng/well)，平衡质粒(pGL-3) (50 ng/well)和renial荧光素酶表达质粒。这一转染组作为组(1)的阴性对照。

(3) hHO1ARE -Luc (300 ng/well)，鼠Nrf2表达质粒(50 ng/well)和renial荧光素酶表达质粒。hHO1ARE -Luc含有firely荧光素酶报告基因，此报告基因被6个拷贝的人HO-1基因抗氧化组件(ARE)调控。这一转染组作为组(1)的阳性对照。

上述三个转染组在转染48 h后，收集并裂解细胞。随后用Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI)进行firely荧光素酶和renial荧光素酶的活性检测。用renial荧光素酶活性对firely荧光素酶活性就代表着报告基因调控序列的活性，由此判断报告基因调控序列被Nrf2激活或抑制。

### **2.4.8** **Cdc2**激酶活性分析

Cdc2蛋白是来自于肝脏溶解产物的免疫沉淀，可以用激酶分析试剂盒来确定它的活性。简单地实验步骤如下：

(1)在包含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的裂解缓冲液中加入肝脏样本，在冰上共孵育30 min，使之匀浆化

(2)将匀浆进行离心，4°C , 10000 g，10 min

(3)用Pierce 660蛋白分析试剂对上清液中的的蛋白浓度进行测量

(4)将包含有100µg肝脏蛋白的上清液加入PBS调整体积至300µl

(5)将（4）的液体与20µl琼脂糖结合的小鼠多克隆抗-Cdc2抗体共孵育，放于摇床缓慢摇晃，4°C，过夜

(6)将孵育的液体取出进行离心，1000 g，收集免疫沉淀物

(7)用1ml PBS洗涤4 次

(8)根据操作手册，利用Cdc2-Cyclin B激酶分析试剂盒对Cdc2激酶活性进行评估。野生型小鼠在PH后24 h的平均值设置为1。

### **2.4.9** 肝细胞密度测定

将福尔马林固定，石蜡包埋的肝脏切片进行苏木素-伊红染色。每个样本在显微镜下（400×）随机选取5个显微镜视野，利用Image-Pro Plus软件对肝细胞进行计数。一部分切片用β-catenin抗体进行免疫染色，直观的观察肝细胞大小的变化。

## **2.5** 统计分析

利用SPSS分析统计软件对两组小鼠肝/体重比，增殖肝细胞数量，DNA损伤等实验结果进行统计分析。实验结果使用均数±标准差（SD）来表示。采用单因素方差分析或者T-检验进行统计学分析。*p* <0.05定义为差异显著。

# **3** 结果

## **3.1** **Keap1**在肝再生过程中调节肝脏氧化还原反应以及复制肝细胞的细胞周期进程

### **3.1.1** **Keap1**基因单等位体敲除不会对**PH**后的肝脏再生长产生明显影响

在静息状态下，Keap1+/-小鼠平均肝体重比稍稍低于同窝出生的Keap1+/+小鼠(4.62%±0.16 vs 5.22%±0.18; *p* <0.05, n=5)，这提示Keap1+/-小鼠肝脏有所减小。利用肝体重比作为衡量肝脏再生长的参考指标，我们发现Keap1基因单等位体敲除不会对PH后的肝脏再生长以及肝脏修复后的最终大小产生明显影响。见图1A。



**图1** **A Keap1+/+和Keap1+/-小鼠PH之后的肝再生(平均肝体重比±标准差, n = 3-8）Fig.1A Liver regrowth following partial hepatectomy (PH) in wild-type (Keap1+/+) and Keap1 knockdown (Keap1+/-) mice（mean liver-to-body weight ratios±SD , n = 3-8）**

### **3.1.2** **Keap1**基因单等位体敲除可引起**PH**后复制的肝细胞进入**S**期延迟以及随后

**S期进程的破坏**

#### **3.1.2.1** 增殖肝细胞总数的评估

在细胞周期过程中，凡是处于活动期（包括G1后期，S期，G2期和M期）的细胞可特异的表达Ki-67 [33]。因此，通过对肝细胞内Ki-67阳性表达细胞数量计数可以对正在经历细胞周期的肝细胞总数评估。我们通过对阳性细胞计数发现，和同窝出生的Keap1+/+小鼠相比较，Keap1+/-小鼠处于增殖期的肝细胞数量在肝细胞增殖周期的第一个波型内(PH后24 h到60 h)中表现出显著的变化（图2A和图2B）。在PH后24 h，Keap1+/+和Keap1+/-两个基因型小鼠都只有少量肝细胞Ki-67表达阳性。在PH后30 h，Keap1+/+小鼠肝细胞内平均Ki-67阳性表达数明显增加，可以达到79个/显微镜视野，可是Keap1+/-小鼠却只有7个/显微镜视野。在PH后34 h，Keap1+/-小鼠处于增殖期的肝细胞数量达到Keap1+/+小鼠的

5倍。在PH后36 h，Keap1+/+小鼠肝细胞平均Ki-67阳性细胞数为110个/显微镜视野，然而Keap1 +/-小鼠却只有21个/显微镜视野。在PH后40 h以及以后的各时间点内，两个基因型小鼠之间增殖的肝细胞数量基本相当，没有明显差别。



**图 2** **A** **Keap1+/+和Keap1+/-小鼠PH后增殖肝细胞总数评估**

**Fig.** **2** **A** Assessment of total proliferating hepatocytes after partial hepatectomy (PH) in **wild-**

**Type (Keap1+/+) and Keap1 knockdown (Keap1+/-) mice (** *x**s* **, n=3-8; \*p <0.05,**

**Compared with Keap1+/+ mice)**



**图 2** **B典型Ki-67免疫组织化学染色肝组织切片( 200**× **)**

**Fig.** **2B** **Representative liver sections subjected to Ki-67 immunostaining( 200**× **)**

#### **3.1.2.2** **PH**后处于**S**期的肝细胞数量评估

接下来我们利用BrdU阳性肝细胞数作为指标，精确地了解在肝细胞细胞周期第一轮进程中处于S期的肝细胞数量（图3A和图3B）。正如我们所预期的，在PH后24 h，无论是Keap1+/+还是Keap1+/-小鼠，再生的肝脏都只有少量的肝细胞BrdU表达阳性。在PH后30 h，Keap1+/+小鼠每个显微镜视野下平均有80个肝细胞正处于DNA合成期，可是Keap1+/-小鼠却只有15个，这显示Keap1基因单等位体敲除以后可以显著地抑制肝细胞进入S期。然而，在PH后34 h，Keap1+/-小鼠肝细胞进入S期的数量明显增加，在每个显微镜视野下平均可达到

145个，可此时Keap1+/+小鼠每个显微镜视野下平均只有44个阳性细胞。在接下来的PH后36 h，Keap1+/+小鼠进入S期的肝细胞数量到达高峰，131个/显微镜视野，Keap1+/-小鼠却相对少了很多，每个显微镜视野下只有26个肝细胞正处于

S期。PH后40 h，两个基因型小鼠进入S期的肝细胞数量基本相当，没有明显差别。我们可以看出来，Ki-67和BrdU检测结果完全一致，证明Keap1基因单等位体敲除引起了PH后肝细胞在第一个肝细胞细胞周期进入S期延迟，随后S期进程也遭到了破坏。



**图3** **A Keap1+/+和Keap1+/-小鼠PH后处于S期肝细胞数目**

**Fig.** **3A** **Assessment of S-phase hepatocytes after partial hepatectomy (PH) in wild-type**

**(Keap1+/+) and Keap1 knockdown (Keap1+/-) mice (** *x**s* **, n=3-8; \*p <0.05 in**

**Comparison between Keap1+/+ and Keap1+/- mice )**



**图3B** **典型BrdU免疫组织化学染色肝组织切片( 200**× **)**

**Fig.** **3** **B Representative liver sections subjected to BrdU immunostaining ( 200**× **)**

#### **3.1.2.3** **PH**后处于**M**期肝细胞数量评估

接下来我们对肝细胞内的核分裂像进行计数，以评估处于M期的肝细胞总数

（图4A和图4B）。在PH引起的肝再生过程中，肝细胞有丝分裂受到生物钟的调控并在早晨6: 00动物房亮灯时达到有丝分裂的高峰[28, 34]。Keap1+/-小鼠肝细胞有丝分裂数在PH后44 h到达第一个高峰，但是与对照组Keap1+/+小鼠之间并无统计学意义上的差别（p > 0.05）。实验结果与我们之前预期的一样，

Keap1+/+小鼠在PH后，再生的肝细胞展现出4个有丝分裂的节律性起伏波型。可是由于Keap1基因单等位体敲除，导致Keap1+/-小鼠在肝细胞复制第2、3、4波型过程中，肝细胞有丝分裂周期节律消失。



**图 4** **A** Keap1+/+**和Keap1+/-小鼠PH后处于M期肝细胞数目**

**Fig. 4A** The numbers of M-phase hepatocytes after partial hepatectomy (PH) in **wild-type**

**(Keap1+/+) and Keap1 knockdown (Keap1+/ -) mice (** *x**s* **, n=3-8; \*p <0.05 in**

**Comparison between Keap1+/+ and Keap1+/- mice )**



**图4** **B PH后44 h典型的肝组织核分裂像H&E染色切片（100**× **)**

**Fig.** **4** **B** Representative liver sections showing mitotic figures in hepatocytes at 44 **h following PH（100**×**）**

### **3.1.3** **Keap1+/+**小鼠肝脏**Nrf2**在**PH**后第一个肝细胞增殖周期内并未被激活

我们通过对肝细胞Keap1、Nrf2以及Nrf2的目标基因NQO1和谷胱甘肽过氧化物酶（GPX2）[35-37] 的mRNA表达水平的分析，来评估Keap1/Nrf2信号通路在第一个肝细胞细胞周期进程中的功能状态。见图5。我们发现与正常肝脏相比较，

Keap1+/+小鼠再生的肝脏在Keap1 mRNA水平上表现出动态的变化，Nrf2基因持续表达，而NQO1、GPX2 mRNA表达水平没有明显的改变。这些数据证明，当

肝细胞进入和通过细胞周期的过称中，无论Keap1表达发生怎样的变化，肝脏

Nrf2并没有被激活，保持在一个静息和稳定的状态。Keap1+/-小鼠再生肝脏中，除了在PH后36 h之外，其余各个时间点Keap1的基因表达与对照组Keap1+/+小鼠相比较减少大约50%，可是Nrf2的表达水平却与Keap1+/+小鼠表达相当，

NQO1和GPX2的mRNA表达最初没有改变，但随后有所增高。这些结果提示，

Keap1基因单等位体敲除在PH后36 h之前并没有激活Nrf2。



**图 5** Keap1+/+**和Keap1+/-小鼠PH后Keap1, Nrf2, NQO1, GPX2的mRNA表达**

**Fig.** **5** **Hepatic mRNA expression of Keap1, Nrf2, NQO1 , and GPX2 after PH in Keap1+/+**

**and Keap1+/- mice(**

*X**s* **, n=3; \*p <0.05 in comparison between Keap1+/+ and Keap1+/- mice )**

### **3.1.4** **Keap1**基因单等位体敲除引起肝再生过程中部分细胞周期组件调节异常

我们通过对再生肝脏中部分细胞周期组件表达水平的检测，从分子水平观察依赖于Keap1的细胞周期的调节。Keap1基因单等位体敲除导致PH之后肝脏Cyclins D1，A2，E1和B1蛋白表达改变（图6A）。当肝脏再生的过程中，

Keap1+/+和Keap1+/-小鼠肝细胞持续表达Cyclin D1和Cyclin E1。而小鼠再生肝脏中Cyclin A2蛋白表达在Keap1+/+小鼠和Keap1+/-小鼠，分别在PH后30 h及34 h被激活，这提示Keap1缺失可引起Cyclin A2蛋白表达的延迟。非常显著的是，在PH后44 h之前，Keap1+/-小鼠再生肝脏Cyclin A2蛋白水平异常调节与S期进程的破坏有密切的关联（图3A）。在PH后44 h以及之后的时间里，相对于对照组Keap1+/+小鼠，在Keap1+/-小鼠再生肝脏内有过多的Cyclin A2蛋白积聚。另外，在PH 48 h之后，Keap1基因单等位体敲除导致肝细胞Cyclin B1表达被抑制，这与Keap1+/-小鼠再生肝脏中有丝分裂节律的缺失有关（图4A）。总的来说，这个实验结果证实，Keap1 基因单等位体敲除可以引起肝脏再生过程中部分细胞周期组件的异常调节，特别是Cyclin A2和Cyclin B1。同时，通过qRT-PCR检测我们发现，无论是Keap1+/+还是Keap1+/-小鼠，再生的肝细胞通过S期的过程中，其Cyclin A2 mRNA也展现出与蛋白水平一致的变化（图6B），说明Keap1对Cyclin A2调控发生在转录水平。



**图6** **A Keap1+/+和Keap1+/ -小鼠再生肝脏部分细胞周期组件蛋白表达**

**Fig.** **6A** **Protein expression of a subset of cell cycle components in regenerating livers of Keap1+/+ and Keap1+/ - mice（n=3, GADPH was used as a loading control; NL, normal liver）**



**图 6** **B** Keap1 **+/+和Keap1+ / -小鼠正常肝脏和再生肝脏Cyclin A2 mRNA表达**

**Fig.** **6** **B mRNA expression of Cyclin A2 in normal and regenerating livers in Keap1 +/+**

**And Keap1+/- mice (**

*X**s* **, n=3; \*p <0.05 in comparison between Keap1+/+ and Keap1+/-**

**mice )**

### **3.1.5** **Keap1**基因单等位体敲除引起肝再生过程中多个促有丝分裂信号分子调节异常

肝细胞生长因子（Hepatocyte growth factor, HGF）和表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)是目前已知的两个最强的直接促进肝细胞分裂的促有丝分裂原，分别通过它们的受体c-Met和EGFR起作用[7]。我们发现Keap1基因单等位体敲除可导致整个肝脏再生长过程中c-Met磷酸化被抑制，特别是在PH后30 h（图

7）。另外，Keap1基因单等位体敲除同时可引起EGFR磷酸化过程在静息期以及

PH后44 h之前被抑制（图7）。有证据支持Akt/ mTOR信号在增殖肝细胞细胞周期增殖过程中起到调控作用[38]。如图7所示，Keap1基因单等位体敲除使肝脏在PH术后，Akt1在S473和T308两个位点，以及p70S6K在T389 和S371两个位点磷酸化作用模式被破坏。另一个非常重要的方面，在整个肝脏再生过程中，无论是哪一种基因型小鼠，p70S6K在T389位点磷酸化与Akt1在T308位点磷酸化模式基本同步，而不是直接受到mTOR的调控（图7）。这个发现有力的提示，在肝再生过程中Akt1和p70S6K可以直接形成信号通路。值得注意的是，Keap1+/-小鼠在术后30 h时间点，复制肝细胞进入S期延迟（图3A） 与肝脏Akt1

（T308）和p70S6K (T389)失活伴随产生。因此，在肝再生过程中，我们把Keap1

与4个有丝分裂信号分子c-Met，EGFR，Akt 1和p70S6K关联起来。





**图7 Keap1** **+/+和Keap1+/-小鼠再生肝脏多个促有丝分裂信号分子蛋白表达**

**Fig. 7 Protein expression of a subset of mitogenic signaling molecules in regenerating livers of wild-type (Keap1 +/+) and Keap1 knockdown (Keap1+/-) mice (n=3, GADPH was used as a loading control; NL, normal liver )**

### **3.1.6** **Keap1**基因单等位体敲除引起再生肝脏肝细胞氧化还原调节被破坏

Keap1/Nrf2信号通路参与细胞氧化还原平衡的调节，而细胞增殖与细胞内氧化还原平衡系统紧密相关[39]。我们通过二氢乙啶（dihydroethidium, DHE）染色和硫代巴比妥酸反应物（thiobarbituric acid reactive substances, TBARS）两种方法来检测两种基因型小鼠在肝再生过程中肝细胞增殖第一个波型内的氧化还原状态

（图8）。令我们惊讶的是，在PH后24 h（G1/S期交界），再生的肝脏处于高度氧化的状态，这个水平与Keap1表达水平无关（图5）。随后，Keap1+/+小鼠再生肝脏在PH后30 h转变为还原状态，在PH后34 h氧化程度经历一个轻微的增加，在PH后36 h又再次转入还原状态，而后在PH后40 h又表现出还原状态的略微增强。Keap1+/+小鼠再生肝脏在术后所表现出来的3个起伏氧化还原反应的波型刚好与DNA合成的活动相反（图3A）。很明显，当氧化应激水平高的时候，

DNA合成活动就弱，反之亦然。这个发现证明正常的再生肝脏展现出很强的氧化还原起伏，这与增殖肝细胞细胞周期的进程相吻合。值得注意的是，Keap1基因单等位体敲除引起肝细胞氧化还原反应周期的严重破坏，这与肝细胞S期进程被打乱密切相关（图3A）。因此，我们的数据证实，Keap1不仅是一个有效地细胞周期调节器，同时也是一个有力的氧化还原反应调节器。

**图 8** Keap1+/+**和+/-Keap1小鼠PH后在肝细胞增殖第一个波型中的肝脏氧化还原状态**

**Fig.** **8** Hepatic **redox states during the first wave of hepatocyte proliferation after partial hepatectomy (PH) in wild -type (Keap1+/+) and Keap1 knockdown (Keap1+/-) mice**



**图 8** **A肝脏冰冻切片二氢乙啶（DHE）染色(400×)**

**Fig.** **8** **A** Liver cryosections were stained with dihydroethidium (DHE) **(400×)**



**图8** **B利用TBARS试剂盒通过肝脏丙二醛（MDA）等同物量化监测脂质过氧化反应氧化还原反应**

**Fig.** **8B** **Hepatic malondialdehyde(MDA) equivalents were quantified to monitor lipid pero- xidation indicative of oxidative stress using a thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)**

**assay kit (** *x**s* **, n=3; \*p <0.05 in comparison between Keap1+/+ and Keap1+/- mice )**

### **3.1.7** **Keap1**基因单等位体敲除可增加再生肝脏内肝细胞基因组的完整性和稳定性

为了探讨Keap1基因单等位体敲除后，是否可以维持再生肝细胞基因组的完整性和稳定性，我们通过对肝细胞内磷酸化的组蛋白H2AX颗粒（γ-H2A X）进行定量，来对DNA受损程度进行评估（图9A和图9B）。由于DNA受损使组蛋白磷酸化被激活，并在受损位点参与装配修复蛋白。因此它是检测细胞（包括肝细胞）DNA损伤的一个敏感指标[40-41]。我们发现在大多数正常肝脏的肝细胞内，每个细胞核内可以有2-4个γ-H2A X+颗粒。在Keap1+/+小鼠再生肝脏内，细胞核内超过4个γ-H2A X+颗粒的细胞数量明显在S期肝细胞内明显增加，特别在

PH后36 h（DNA合成的高峰），同时伴随着DNA修复基因RAD51和RAD51/1表达到达高峰（图9C）。相比之下，Keap1+/-小鼠再生肝脏内，由于DNA损伤引起的自发性的应答反应被阻断，细胞核内超过4个γ-H2A X+颗粒的细胞数量明显少于Keap1+/+小鼠，甚至在PH后34 h , DNA合成的高峰期（图9B和图

3A）也是如此。同时，在这个时间点，肝细胞出现比对照组Keap1+/+更高的

RAD51和RAD51/1表达（图9C）。这些数据证明，Keap1基因单等位体敲除可以使肝细胞在DNA复制期肝细胞完整性和稳定性得以改善，这与DNA修复基因

RAD51和RAD51/1表达增加有关。

**图9** **Keap1+/+和Keap1+/-小鼠PH后在肝细胞增殖第一个波型中DNA损伤的评估和DNA**

**修复基因的表达**

**Fig. 9 DNA damage assessment and DNA damage repair gene expression during the first wave of hepatocyte proliferation after partial hepatectomy (PH) in wild-type (Keap1+/+) and Keap1 knockdown (Keap1+/-) mice.**



**图** **9A PH后再生肝脏组织切片γ-H2A. X 免疫组织化学染色（200**×**）**

**Fig.** **9A** **Immunohistochemistry was performed using theγ-H2A. X antibody with liver sections prepared from regenerating livers at the indicated time points after PH（200**×**）**



**图 9** **B每张切片随机选取5个显微镜视野核内多于4个γ-H2A. X+颗粒计数结果（200**×**）**

**Fig. 9B The nuclei with more than fourγ-H2A. X+ foci were counted in five randomly chosen**

**microscope fields (200x) per section (** *x**s* **, n=3; \*p <0.05 in comparison between**

**Keap1+/+ and Keap1+/- mice )**



**图 9** **C通过qRT-PCR对肝脏内RAD51和RAD51/1 mRNA表达进行定量**

**Fig.** **9C** **Hepatic mRNA expression of RAD51 and RAD51/1 was quantified by qRT-PCR**

**(** *x**s* **, n=3; \*p <0.05 in comparison between Keap1+/+ and Keap1+/- mice )**

## **3.2** **Nrf2**缺乏引起肝再生过程中肝细胞有丝分裂延迟以及肝细胞短暂的去分化

### **3.2.1** **Nrf2**缺失引起肝脏再生长受损

我们的实验结果与之前的报道相一致[56-57]，与同窝Nrf2+/+小鼠相比较，Nrf2-/-小鼠肝/体重比相对低( 4.52±0.09 vs. 4.91±0.1 0; p <0.05 )，也就说明

Nrf2的缺失可以使肝脏的减小。在70%部分肝切除术后，每一个基因型的小鼠残余的肝脏都会通过再生长恢复到它们原始的肝脏质量（图1）。然而，与同窝的

Nrf2+/+小鼠相比较，Nrf2基因敲除小鼠表现出较为迟缓的肝脏再生模式。Nrf2突变小鼠的肝脏再生长在PH后60 h表现出明显滞后，68 h有所恢复，接着这种

滞后一直持续到PH后92 h，96 h恢复。很明显，Nrf2缺陷小鼠使肝脏受损引起的再生受到影响。



**图 1** Nrf2+/+**和Nrf2-/-小鼠PH后肝再生**

**Fig.** **1** Liver **regrowth following partial hepatectomy (PH) in wild-type ( Nrf2+/+ ) and Nrf2- null ( Nrf2 -/-) mice (** *x**s* **, n=3-5; \*p <0.05 in comparison between Nrf2+/+ and Nrf2-/- mice )**

### **3.2.2** **Nrf2**缺乏导致在**PH**后肝细胞复制的第一个波型内肝细胞有丝分裂延迟

PH诱导的肝脏再生经历了4个连续的肝细胞复制波型[34]。通过Ki-67免疫组织化学染色我们发现，在PH后92 h , Nrf2-/-小鼠处于增殖期肝细胞数目少于

Nrf2+/+小鼠(图2 A). PH后36 h，在肝细胞增殖第一波DNA合成的峰值这个

时间点，两个基因型小鼠的BrdU阳性肝细胞之间没有明显差异（图2B和图2C）。通过对肝细胞核分裂像计数（图3），我们注意到在PH后44 h，Nrf2-/-小鼠处于

M期的肝细胞数量只是Nrf2+/+小鼠的一半，随后在PH后48 h，两者水平基本相当。另外，Nrf2-/-小鼠在PH后92 h处于有丝分裂期的肝细胞数量明显少于Nrf2野生型小鼠，这与Ki-67结果一致（图2A）。这些数据共同证实了，Nrf2的缺乏不会对复制的肝细胞进入S期以及细胞周期进程产生明显影响，但是可以引起肝细胞在肝脏复制起始也是最强的一个波形内有丝分裂的延迟。此外，Nrf2缺失表现出在肝细胞增殖周期第三个回合(PH后84到108 h)内肝细胞的复制被抑制。**图2 Nrf2+/+和Nrf2-/-小鼠PH后增殖肝细胞数目**



**Fig. 2** The numbers of proliferating hepatocytes after partial hepatectomy (PH) **in wild-type (Nrf2+/+) and Nrf2 -null (Nrf2-/-) mice**

**图 2** **A** Nrf2+/+**和Nrf2-/-小鼠PH后增殖肝细胞总数的评估（200**×**）**

**Fig.** **2A** **Assessment of total proliferating hepatocytes after partial hepatectomy(PH) in wild-**

**type (Nrf2+/+) and Nrf2-null (Nrf2-/-) mice (** *x**s* **, n=3-5; \*p <0.05 in comparison**

**Between Nrf2 +/+ and Nrf2 -/- mice) (200**×**)**



**图2** **B&C Nrf2+/+和Nrf2-/-小鼠PH后36 h经历DNA合成的肝细胞数目**

**Fig.** **2** **B&C The number s of hepatocytes undergoing DNA synthesis at 36 h after partial hepatectomy(PH) in wild-type (Nrf2 +/+) and Nrf2-null (Nrf2 -/-) mice**

**图 2** **B典型的肝切片展示BrdU阳性肝细胞（100×）**

**Fig.** **2B** **Representative liver sections showing BrdU-positive hepatocytes（100×）图2C** BrdU**阳性肝细胞计数（100×）**

**Fig. 2C** BrdU-positive hepatocytes were counted at 100**×magnification in five randomly**

**Chosen fields per section (** *x**s* **, n=3-5; p> 0.05)**



**图 3** Nrf2+/+**和Nrf2-/-小鼠PH后经历有丝分裂的肝细胞数目（100×）**

**Fig.** **3** The numbers of hepatocytes undergoing mitosis after PH in Nrf2 +/+ and **Nrf2-/-**

**Mice (**

*X**s* **, n=3-5; \*p <0.05 in comparison between Nrf2 +/+ and Nrf2-/- mice)**

**（100×）**

### **3.2.3** **Nrf2**缺失导致再生肝脏内一些细胞周期组件的调节异常

我们通过对Nrf2的目的基因NQO1蛋白表达进行测量[58]，来对再生肝脏内

Nrf2活性进行评估（图4A）。结果显示，Nrf2+/+小鼠肝脏NQO1蛋白表达水平在肝脏再生过程中逐步增加，而Nrf2 -/-小鼠在静止期以及再生肝脏中表达却很弱。这个观察结果提示，平稳、持续的肝再生过程需要Nrf2活性的增加来得以保证。我们同时分析了两个基因型小鼠再生肝脏主要细胞周期组件蛋白的表达情况。如图4A所示，Nrf2缺乏可以影响肝脏Cyclins D1，A2和E1蛋白表达水平，但没有明显的时间规律。相对于Nrf2+/+小鼠，Nrf2-/-小鼠在PH后36 h和44 h，肝

脏内有过多的Cyclin A2蛋白积聚。同时，去除Nrf2也导致Cyclin A2转录活性增加（图5）。此外，Hepa-1 cells内Nrf2的过表达使小鼠Cyclin A2启动子活性下降大约一半（图4B）。因此，这些数据证实了Nrf2是Cyclin A2的转录抑制因子。



**图 4** **A** Nrf2+/+**和Nrf2-/-小鼠再生肝脏一些细胞周期组件的蛋白表达**

**Fig. 4A** The protein expression of a subset of cell cycle components and **regulators in regenerating livers of wild-type (Nrf2+/+) and Nrf2-null (Nrf2-/ -) mice (GADPH was used as a loading control; NL, normal liver)**



**图 4** **B** Nrf2**负性调节Cyclin A2转录（\*p <0.05 ）**

**Fig.** **4** **B** Nrf2 negatively regulates Cyclin A2 transcription**（\*p <0.05 ）**

**A Nrf2 expression vector (mNRF2) and a mouse Cyclin A2 promoter reporter construct (mCyclinA2-Luc) or a construct containing six copies of an antioxidant response element (ARE) of human heme oxygenase 1 gene (hHO1ARE -Luc, positive control) were cotransfected into Hepa-1 cells as describ ed in the experimental procedure. Note that Nrf2 overexpression increased the activity of the ARE in hHO1ARE -Luc, but reduced the activity of mouse Cyclin A2 promoter. The data are representative results from three repeats of the experiment. \* p <**

**0.05 .**

小鼠Nrf2表达质粒（mNrf2），mCyclinA2-Luc或hHO1ARE-Luc被转入

Hepa-1细胞。mCyclinA2-Luc构建物含有小鼠CyclinA2的5'端启动子序列和

firefly荧光素酶报告基因。hHO1ARE-Luc含有HO-1基因抗氧化反应元件（ARE，

6个拷贝）和firefly荧光素酶报告基因。转入方法和两种荧光素酶的活性分析如

前所述。结果显示，Nrf2过度表达提高了hHO1ARE-Luc中ARE的活性，但却降低了小鼠CyclinA2启动子的活性。实验重复3次。



**图5** **Nrf2+/+和Nrf2-/-小鼠再生肝脏一些细胞周期组件和调节器的mRNA的表达**

**Fig.** **5** **The mRNA expression of a subset of cell cycle components and regulators in**

**regenerating livers of wild-type (Nrf2+/+) and Nrf2 -null (Nrf2-/-) mice (** *x**s* **, n=3; \*p <**

**0.05 in comparison between Nrf2+/+ and Nrf2-/- mice )**

### **3.2.4** **Nrf2**基因敲除引起**PH**后肝细胞复制第一个回合的**Wee1/Cdc2/Cyclin B1**通路调节异常

在细胞周期中，Wee1/Cdc2/Cyclin B1信号通路的适当调节对于正常细胞从

G2期到M期的转换是非常重要的。通过Wee1激酶增加Cdc2在Tyr 15位点的磷酸化作用，降低了Cdc2/Cyclin B复合物的激活，导致进入M期抑制[51]。我们发现Nrf2缺失时，Wee1, Cdc2和Cyclin B1在mRNA和蛋白水平都显示出了变化

（图4D和图5）。此外，Nrf2缺失导致过多的Wee1积聚，从而在PH后36 h和44 h Cdc2高度磷酸化，导致当肝细胞处于有丝分裂期时Cdc2活性明显下降( PH后44 h)（图4C）。所以，我们把Nrf2-/-小鼠肝再生过程中Wee1/Cdc2/Cyclin B1信号通路调节异常以及Cdc2活性下降和有丝分裂延迟联系在一起。



**图 4** **C** Nrf2+/+**和Nrf2-/ -小鼠再生肝脏Cdc2激酶活性**

**Fig. 4C** Cdc2 kinase activity in regenerating livers of Nrf2 +/+ and Nrf2 -/- mice **(**

*x*  *s* **,**

**n=3-5; \*p < 0.05 in comparison between Nrf2 +/+ and Nrf2 -/- mice )**



**图 4** **D** Nrf2+/+**和Nrf2-/-小鼠再生肝脏一些细胞周期组件的蛋白表达**

**Fig. 4D The protein expression of a subset of cell cycle components and regulators in regenerating livers of wild-type (Nrf2+/+) and Nrf2-null (Nrf2-/ -) mice (GADPH was used as a loading control; NL, normal liver)**

### **3.2.5** **Nrf2**基因敲除导致肝再Th过程中短暂而广泛的肝细胞去分化

在PH 所诱导的肝再生过程中，肝细胞肥大是一个经常被大家忽略但却是非常重要的细胞机制[59]。经历PH术后，两个基因型小鼠肝细胞密度总体上显示出减少趋势的动态变化（图6A）。数据显示，肝细胞通过逐渐生长（肥大）使肝脏再生向前推进，这个结果和最新的一个报道相吻合[59]。然而在PH后60 h和140 h，Nrf2-/-小鼠展现出比同窝野生型小鼠明显增高的肝细胞密度。而且，通过β- catenin免疫组织化学染色显示，PH后60 h，Nrf2-/-小鼠肝细胞明显小于对照组的Nrf2+/+小鼠（图6B）。

**图 6** Nrf2+/+**和Nrf2-/ -小鼠PH后细胞密度的变化**

**Fig.** **6** Changes **in hepatocyte density after partial hepatectomy (PH) in wild-type (Nrf2+/+) and Nrf2-null ( Nrf2-/-) mice**



**图6** **A 肝脏切片苏木素-伊红染色细胞密度计数（400×）**

**Fig.** **6** **A Liver sections were prepared and subjected to hematoxylin and eosin staining**

**(400×)(** *x**s* **, n=3-5; \*p <0.05 in comparison between Nrf2 +/+ and Nrf2 -/- mice )**



**图6B** **Nrf2+/+和Nrf2 -/-小鼠PH后60 h肝组织切片β-catenin免疫组织化学染色（400×）Fig. 6B Liver sections were prepared at 60 h after PH in Nrf2 +/+ and Nrf2 -/- mice and subjected to immunostaining withβ-catenin primary antibody（400×）**

细胞大小的下降是细胞经历去分化的一个特征性表现，包括肝细胞[60]。因此，我们假设在肝再生过程中，Nrf2 的缺乏可以使肝细胞经历短暂的去分化。为了验证这个假设，我们通过对比Nrf2+/+和Nrf2-/-小鼠再生肝脏在特定时间点（PH后60 h） 基因表达谱，寻找去分化的标记物。我们发现CD133，肿瘤坏死因子样凋亡诱导剂（TWEAK）受体（Fn14）和三叶因子家族3（TFF3），由于Nrf2缺乏表达明显上调。CD133在很多组织中（包括肝脏）常看用作为祖细胞的标记物[61-62]. Fn14在肝脏祖细胞内可以表达[63-65]. TFF3是一个稳定的分泌蛋白，主要由胃肠粘膜产生，与上皮的修复有关[66-69]。最近发现，TFF3在肝癌细胞前体也有

表达[70]。如图7A所示，在PH后60 h，Nrf2-/-小鼠肝脏CD133, Fn14和TFF3蛋白表达大幅度的激活，而对照组Nrf2+/+小鼠并没有变化。免疫组织化学染色分析证实，它们表达于肝组织和肝细胞内（图7B和图7C）。在PH后60 h，几乎缺乏Nrf2的所有肝细胞在胞浆内都均匀的表达CD133, Fn14在表面表达，TFF3细胞溶胶聚集成颗粒状。因此，绝大多数缺失Nrf2 的肝细胞展示了

CD133+/Fn14+/TFF3+。另外，在PH后相同的时间点，缺失Nrf2的肝脏胆管上皮细胞也表达TFF3+。



**图7A Nrf2+/+和Nrf2 -/-小鼠再生肝脏CD133, Fn14, TFF3, p70S6K和4E-BP1蛋白表达Fig. 7A Protein expression of CD133, Fn14, TFF3, p70S6K, and 4E-BP1 in regenerating livers of wild-type (Nrf2+/+) and Nrf2-null (Nrf2-/ -) mice (GADPH was used as a loading**

**Control; NL, normal liver)**





**图 7B** **&7C** Nrf2+/+**和Nrf2 -/-小鼠PH后60 h肝组织CD133, Fn14和TFF3免疫组织化学染色（400×）**

**Fig.** **7** **B &7C** Liver sections were prepared from the livers isolated at 60 h after PH **from the two genotypes of mice. Immunostaining was performed with primary antibodies against**

**CD133, Fn14, and TFF3 (400×)**

此外，由于Nrf2缺失使PH后60 h一些代表肝细胞功能的关键性基因表达显著地下调，包括胆汁酸合成酶Cyp7a1和Cyp8b1，调节异生物质代谢转录的因子芳烃受体（AhR），调节脂肪代谢的核受体过氧化物酶体增生物激活受体 α

（PPARα）（图8）。缺失Nrf2的再生肝脏在这个时间点，伴随着Cyp7a1基因表达减弱，它的负性调节蛋白SHP的mRNA水平增加。然而SHP正性调节蛋白FXR表现出依赖于PH，却与Nrf2无关的下调作用。这个发现提示SHP对Cyp7a1的抑制作用不依赖于FXR, SHP介导的Cyp7a1表达抑制可能是对肝脏缺失的最敏感的的反应之一。



**图8** **Nrf2+/+和Nrf2 -/-小鼠再生肝脏与肝功能有关的基因mRNA表达**

**Fig.** **8** **The mRNA expression of a subset of genes associated with liver functions in**

**regenerating livers of Nrf2+/+ and Nrf2 -/- mice (** *x**s* **, n=3-5; \*p <0.05 in comparison**

**Between Nrf2+/+ and Nrf2-/- mice)**

总的来说，这些实验结果证实了，在肝再生过程中由于Nrf2的缺失而导致一个暂时而广泛的肝细胞去分化。这个事件的主要特征是肝细胞大小明显下降，三个肝脏祖细胞标记物激活，以及肝细胞主要功能相关基因表达下调。众所周知，

mTOR信号通过它的下游目的基因p70S6K和4E-BP1对细胞的大小进行调控，包括肝细胞[71-72]。我们发现，与对照Nrf2+/+小鼠相比较，Nrf2缺失导致p70S6K在PH后60 h和140 h失活（图7A），与此同时，Nrf2-/-小鼠在同样的时间点肝细胞的体积明显减小(图6A). PH之后，Nrf2缺失导致肝脏总的4E-BP1蛋白水平下降，但对4E-BP1蛋白的磷酸化作用并没有明显的影响（图7A）。这样看来，肝再生过程中Nrf2与p70S6K活性相关，并且都与肝细胞生长有关。

# **4** 讨论

Keap1-/-小鼠在出生后，由于食道鳞状上皮过度角化导致小鼠发生死亡，所以实验中我们利用Keap1+/- （Keap1 基因单等位体敲除）小鼠进行研究。与

Keap1+/+小鼠相比较，Keap1+/-小鼠Keap1的mRNA和蛋白水平都减少了一半，导致Nrf2持续地激活，从而使Nrf2的靶基因不断的上调。所以，Keap1+/-小鼠对药物毒素和外来物诱导的氧化应激有高度抵抗力。Keap1+/-小鼠已经被很多实验室应用于在健康和疾病状态下Keap1/Nrf2信号系统功能的研究。

我们的研究已经证实，Keap1在肝再生过程中对增殖肝细胞的细胞周期具有有力的调节作用。一个等位基因的缺失可以使Keap1表达减少，而导致PH后肝细胞再生进入S期延迟，S期进程破坏，以及复制肝细胞有丝分裂节律的丧失。因此，Keap1的适度表达对于肝细胞正常的细胞周期的整个进程是必不可少的。另一方面，Keap1基因单等位体缺失可使由于肝脏缺失引起的肝再生过程中，复制肝细胞基因组DNA的完整性和稳定性增加。这个至少可以从部分方面解释为什么Keap1+/-小鼠在PH后，即使肝细胞周期被破坏，也不会对总体肝细胞的再生产生明显的不利影响。之前有一些报道指出Nrf2基因缺失会损害肝细胞增殖以及肝脏再生，因此认为Nrf2有希望成为改善受损的肝脏在肝再生的药物治疗靶点[42-43]。可令我们惊讶的是，在我们的实验中，并没有发现Keap1基因单等位体敲除引起的Nrf2激活会对肝脏切除引起的肝细胞再生有明显的促进作用。

我们把Keap1和几个促有丝分裂信号分子（c-Met, EGFR, Akt1和p70S6K）以及Cyclin s A2、B1联系在了一起。已经证实，肝细胞内c-Met, EGFR或者

p70S6K的不足可以使细胞进入S期严重受阻从而延迟肝脏再生[44-45]。在PH后30 h，当Keap1+/+小鼠的肝细胞表现出非常显著的DNA合成活性的时候，Keap1+/-小鼠肝细胞仍旧处于G1/S期的转换期，同时伴随着c-Met激活被抑制，

EGFR磷酸化的不足，Akt1和p70S6K的失活，以及Cyclin A2表达的缺失（图6和图7）。有报道认为，在缺乏c-Met和EGFR的肝细胞内，细胞进入S期被明显的抑制，从而引起肝再生的延迟[44, 45]。p70S6K基因缺失同样可以造成在PH 之

后S期进入的延迟[46]。因此，抑制这些促有丝分裂的信号分子可以诱导Keap1+/-小鼠处于细胞周期中的肝细胞进入S期延迟。另外，我们发现Keap1+/-基因单等位体敲除也可以引起复制肝细胞S期进程的破坏，伴随着c-Met，EGFR, Akt1 ，

p70S6K和Cyclin A2的异常调节（图6和图7）。在哺乳动物细胞的细胞周期内，Cyclin A2通过与Cdk2一起结合Cdc2，启动染色体浓缩，驱动S期进程[47-50]。因此，Cyclin A2很可能就是这些促有丝分裂信号的主要效应器，并最终影响S期的进入和增殖肝细胞的DNA合成。另外，我们发现Keap1+/-基因单等位体敲除使肝细胞增殖第一个波型内肝细胞的有丝分裂节律减损，这与Cyclin B1 表达的缺失以及过多的Cyclin A2积聚有关（图6）。我们已知，Cdc2/Cyclin B复合物激活是哺乳动物细胞进入M期必不可少的[51] ，并且这个通路可以调节肝再生过程中肝细胞有丝分裂的时间[28]。此外，Cyclin A2适时的降解也是M期进展所需要的[52]。因此，Keap1+/-小鼠PH后44 h再生肝脏有丝分裂节律的丧失可能与Cyclin B1表达缺失以及Cyclin A2过度积聚有关。总的来说，我们的结论证实了

Keap1 表达减少一半可以对那些关键的促有丝分裂的信号分子和细胞周期蛋白的表达起到一个强有力的负性调节作用，从而破坏了PH后复制肝细胞的细胞周期。

通过对多种培养的细胞或低等生物研究证实，增殖细胞的细胞周期进程与氧化还原反应周期保持同步化。G1期需要在氧化状态下前进，相反S期和M期只有在还原状态下才可进行，以确保DNA复制的保真性[39]。我们首次发现肝再生过程中，伴随着肝细胞周期的进程，肝脏氧化还原反应表现出3个起伏的波型。令我们吃惊的是，Keap1+/+小鼠在PH后24 h，也就是再生的肝脏处于G1/S期的转换期，这时增殖肝细胞自由基有一个显著性增高，同时在接下来的S期出现2个逐渐减弱的自由基增加（图8）。我们相信这样不寻常的氧化还原反应起伏是机体正常的表现，并且受到紧密的调控，同时也是肝再生过程中必不可少的。我们感兴趣的是，再生的肝脏是如何产生那么多的自由基。在以后的工作中我们会对这一非常有趣现象的生物意义进行进一步的研究。过多的ROS通过破坏大分子而产生有害作用，但是越来越多的证据支持ROS具有信号分子的作用[53-54,39]。高水平ROS对于激活促有丝分裂信号通路，启动细胞周期蛋白启动转录是必不可少

的[54]。ROS在促有丝分裂信号级联反应中，可以氧化一些细胞周期调控因子和组件的半胱氨酸残基转换分子信号。半胱氨酸氧化在信号转换过程中和磷酸化作用一样重要[39]。在接下来的研究中我们需要了解，半胱氨酸氧化介导的ROS信号和磷酸化作用介导的促有丝分裂信号在肝再生的过程中是怎样结合在一起，又是怎样促使肝细胞通过细胞周期进程的。

我们的研究也证实，Keap1是一个强有力的氧化还原反应调节器。在肝脏再生过程中Keap1有一个适当的临界值，这对于正常的氧化还原反应的调节是必不可少的。总的来说，在实验过程中我们发现了一些完全意想不到的和之前所了解的在对抗氧化应激过程中Keap1/Nrf2 信号通路所具备的功能相反的结果，当

Keap1+/+小鼠在肝再生过程中氧化还原反应3个波型出现时，Nrf2并没有被激活。这些发现提示：（1）Keap1通过一个不依赖于Nrf2的机制对肝脏氧化还原周期和肝细胞细胞周期进行调节；（2）Nrf2激活不仅受到Keap1调控，同时还会受到一个不依赖于Keap1的因素调控。严格调控Keap1表达是确保再生肝脏中Nrf2处于静止状态、适宜的氧化还原起伏波动和正常肝细胞细胞周期进程所必需的。一个最新的报道显示，在慢性肝损伤和PH诱导的肝再生过程中，Nrf2持续激活使肝细胞增殖延迟，并增加肝细胞凋亡，不会给再生带来任何有利的影响[55]。一个最新的研究指出，在Keap1修饰的肿瘤和正常细胞内，氧化还原介导一个相反的效应。证据显示，Keap1可以与Nrf2之外的其它蛋白相绑定，比如p62 和

PGAM5。同样Nrf2活性可以通过磷酸化作用被调节。我们近期的研究证实，再生肝脏中Keap1表达水平的密切调控是确保Nrf2不被激活以及保持正常的氧化还原反应起伏的一个重要条件。Keap1基因单等位体敲除诱导氧化还原反应调节异常可能是引起肝细胞周期破坏的上游机制。已经证实，ROS激活了促有丝分裂信号通路的一些关键组件，包括EGFR和Akt以及激活生长因子和它们的受体，产生ROS。依赖于氧化还原反应的磷酸化作用可能参与蛋白激酶A和Akt活性的调节。这些发现支持这样一个观点，就是ROS调节促有丝分裂信号的强度和持续时间，而且促有丝分裂信号激活产生ROS。所以，在未来的研究中，我们要进一步

了解增殖的肝细胞中，依赖于Keap1的氧化还原反应周期以及促有丝分裂信号之间是怎样进行相互协调，共同对细胞周期进行调节的。

总之，我们证实了在肝再生过程中，增殖的肝细胞需要通过精密的调控

Keap1表达，使细胞顺利进入并通过S 期，展现出有丝分裂的节律。适度的

Keap1表达水平对于肝再生过程中氧化还原反应周期的调节，c-Met，EGFR，

Akt1和p70S6K的激活，以及Cyclins A2和B1的表达都是必不可少的。

在接下来的研究中，我们需要把肝再生过程中Keap1信号，氧化还原信号，有丝分裂信号和细胞周期蛋白表达对肝细胞周期调整的机制进行整合。我们提出一个关于再生肝脏中肝细胞氧化还原反应周期和肝细胞周期调控的假设。如图10所示。氧化还原反应传感器Keap1通过一个不依赖于Nrf2通路调节再生肝脏的自由基循环。Keap1同样调控肝细胞促有丝分裂信号分子的活性，包括c-Met, EGFR, Akt1和p70S6K，以及它们下游的效应器，包括Cyclins A2和B1。当肝细胞在进行复制的时候，通过一个未知的Nrf2负性调节作用使Nrf2保持在静止状态。Keap1表达的临界值被紧密的调控，以确保与肝脏氧化还原反应周期和肝细胞周期适当地偶联，从而使肝细胞在肝再生过程中顺利地进入并通过细胞周期，保持其节律性。



**图10一个关于Keap1介导的肝细胞氧化还原周期和肝细胞周期对再生肝脏的假设。Fig. 10 A hypothesis for Keap1-mediated hepatic redox cycle and hepatocyte cell cycle in regenerating livers.**

我们的研究证实，Nrf2在肝脏再生过程中是一个新的肝细胞有丝分裂的调节因子。Nrf2缺失不会对再生的肝细胞进入和通过S期产生影响，但是能够使细胞进入M期延迟。我们把Nrf2与Cyclin A2和Wee1/Cdc2/Cyclin B1信号通路调节联系在一起。我们的发现证实了Nrf2可能具有类似一个刹车的功能，当肝细胞通过细胞周期时，Nrf2阻止了Cyclin A2转录的过度激活和翻译。已经证实Cyclin

A的及时降解是M期前进的一个关键，因为Cyclin A不降解可以导致在细胞分裂中期的细胞阻滞[73-74]。从而，Nrf2缺失使Cyclin A2过度积聚，引起复制期的肝细胞有丝分裂延迟。此外，当Nrf2缺失时，Wee1/Cdc2/Cyclin B1通路的每个组件在mRNA和/或者蛋白水平异常调节，导致Wee1激酶总量增加，它的底物

Cdc2在Tyr 15 位点高度磷酸化，继而引起Cdc2活性下降。之前已经证实，

Cdc2/Cyclin B复合物活性是进入M期所必须的[51]。因此，这个通路的异常调节参与了Nrf2缺乏导致的肝细胞有丝分裂延迟的机制。这些发现共同证实了Nrf2通过调控Cyclin A2和Wee1/Cdc2/Cyclin B1通路，参与了再生肝脏细胞周期进程的调节。

Nrf2在多种肿瘤细胞中高度激活，通过一些目前还没有完全明了的机制促进肿瘤细胞的增殖[75]。一些证据显示，Nrf2能够增加K-Ras-诱导的增殖和肿瘤发生[76]。此外，Nrf2通过重新定向肿瘤细胞内葡萄糖和谷氨酸盐进入合成代谢通路而调节代谢作用的重新编程，支持肿瘤细胞的增殖[77]。在未来的工作中，我们需要去探讨，是否这些依赖于Nrf2的机制也会在正常的肝细胞复制中起到作用，或者反过来，在肿瘤细胞中，Nrf2是否也会对Cyclin A2和Wee1/Cdc2/Cyclin B1通路进行调节。而且，已经证实了Nrf2缺乏可以引起体外培养的小鼠肺泡上皮细胞

G2/M阻滞，这是由于GSH-介导的氧化应激信号受损所引起的[78]。这个发现和我们的数据一起证实了Nrf2能够参与其他类型细胞的G2/M转换调节。

最振奋人心的是，我们揭示了在病理状态（Nrf2基因缺失和肝组织丧失）下大量的肝细胞暂时处于去分化的现象。我们提供了三条证据来支持我们的假设。首先，缺乏Nrf2的肝细胞在PH后60 h体积明显减小。Sahin的研究小组报道，体外培养的成熟的肝细胞可以直接去分化成为祖细胞。细胞的压缩和收缩可能是成熟肝细胞去分化的一个潜在的独特的细胞机制[60]。第二，伴随着细胞体积的下降，缺乏Nrf2的肝细胞展现出一个去分化的CD133+/Fn14+/TFF3+表型。我们已知这些分子在肝脏祖细胞内共表达[63,70]。第三，一些与肝脏主要功能相关的基因下调甚至表达关闭。值得注意的是在肝再生这个特殊的阶段（PH后60 h）几乎所有的肝细胞因Nrf2缺失同时收缩它们的大小，使这三个祖细胞标记物激活，使成熟肝细胞功能基因表达减少。这些数据揭示了Nrf2一个重要的作用，即在肝脏修复过程中维持重新再生的肝细胞处于分化状态。

哺乳动物活体内可以观察到胰腺细胞去分化。切除转录因子Foxo1可引起在生理应激（多产和衰老）和糖尿病后，β 细胞一个亚群去分化为祖细胞-类似细胞

表达神经元素3，Oct4，胚胎干细胞关键蛋白，L-Myc[79]。提高Hedgehog信号也可以导致β细胞去分化，以激活前体细胞标记物Hes1和Sox9，减少β细胞功能关键性基因和与它们的成熟表型有关转录因子的表达为特征[80]。我们这里证实，成熟肝细胞经历了广泛而短暂的去分化，作为成年动物对病理状态（Nrf2 缺失和肝损伤）的反应。最近的研究证实，在PH后48 h内，复制的肝细胞内参与肝脏代谢功能的一大部分基因表达减少[ 81-82] 。虽然并没有看到胚胎肝细胞或者肝癌癌细胞特征性的标志基因被激活，这个现象被认为是经历增殖的正常成熟肝细胞短暂的转录去分化[82]。在这里我们研究发现，伴随肝细胞复制第一个波型的完成，肝脏祖细胞标记物(CD133, Fn14和TFF3 )由于Nrf2缺失而被激活。我们的发现提示在肝脏再生过程中，Nrf2可能是阻止增殖肝细胞进一步去分化所需要的。

上皮细胞向间叶细胞的转变(EMT) 被看作为肝细胞去分化成为肝脏祖细胞的一个潜在机制[60]。细胞经历EMT伴随着间叶的和上皮标记物的表达，它们的基因表型展现出动态的变化[ 83-85] 。肝脏祖细胞（卵原细胞）可共表达间叶的和上皮标记物[63]。由于肝脏祖细胞标记物CD133, Fn14, and TFF3共同激活，我们假设在肝再生过程中，缺乏Nrf2可以使肝细胞经历EMT。值得注意的是在EMT时并不是所有的间叶细胞的标记物可同时表达[86]。因此，CD133+/Fn14+/TFF3+表型可能代表了EMT过程中一个非常特异的阶段。尽管这个现象只是短暂的出现，这个发现强烈的提示肝再生过程中，Nrf2在促进新的再生肝细胞成熟中扮演了重要的角色。最近报道指出成熟的肝细胞表现出可塑性。体外实验中，肝细胞能够去分化成为肝脏祖细胞，并且在慢性肝损伤期间转化为胆管上皮细胞[60, 87]。无论如何，Nrf2是否参与调节肝细胞成熟需要进一步研究。

很明显，Nrf2-/-小鼠在多个器官都展现出对致癌物或者炎症诱发的致癌作用的高度敏感性[88-91] 。对有丝分裂的不当调节可以促进肿瘤的发生[92] 。此外，

EMT 也参与了瘤的形成。因此，很有可能在肝损伤引起的肝再生过程中，缺乏

Nrf2的肝细胞不能及时进入M期，随后经历了短暂的EMT或者去分化，从而促

进肿瘤形成。此外，TFF3与肿瘤的转化、生长、迁移有关[ 93]。因此，我们的发现提供了一个潜在的新的解释，为什么Nrf2缺乏可以引起肿瘤的高发生率。

令人感兴趣的是Nrf2基因敲除在肝脏修复过程中是怎样触发肝细胞去分化的。我们的研究提示依赖于Nrf2的p70S6K活性的调节可能至少部分参与了这个事件。

PH后60h, Nrf2缺乏引起肝脏p70S6K失活，继而肝细胞体积减小，这是肝细胞去分化起始所必需的一个步骤。虽然肝脏p70S6K活性在Nrf2 -/-小鼠PH后140 h被明显的抑制，这些肝细胞的状态与PH后60 h却截然不同。在肝细胞再生长的后期阶段，Nrf2 +/+和Nrf2 -/-小鼠的肝细胞都会明显的增大（肥大）。在这种情况下，缺乏Nrf2的肝细胞p70S6K失活，使它们的生长减少，并不能使它们的体积比正常细胞要小。这可能能够解释为什么在后期的时间点看不到肝细胞去分化，甚至当p70S6K失活的时候。因此我们的研究表明Nrf2对p70S6K信号的正常调控是必不可少的，这个可能是肝再生过程中，维持肝细胞生长保持肝细胞特性所必需的。

之前的报道和我们的发现指出，Nrf2 在肝再生的过程中，在不同的阶段可能扮演了多重角色。而且Nrf2缺失可以引起NF-kB的明显激活，减少胰岛素信号，在PH后3 h和/或者6h增加肝细胞凋亡。此外，Nrf2 -/-再生肝脏在PH后48 h脂肪变性明显加重，PH后48 h，72 h和120 h，处于S期的肝细胞数量增加或者减少，以及PH后72 h氧化反应增高[94]。Notch1和肝再生的增压器被认为是再生肝脏中Nrf2直接的靶基因[95-96]。雌激素2介导的Nrf2, mTOR和p53/p21信号网被认为是参与了肝损伤以后作为反应性应答引起肝细胞再生过程[97]。这里我们发现Nrf2缺失导致PH后肝细胞复制的第一个波峰内，由于Cyclin A2和Wee1/Cdc2/Cyclin B1通路的异常调节，而使肝细胞有丝分裂延迟。非常显著的是，

Nrf2缺失使肝细胞有丝分裂延迟后出现广泛的肝细胞去分化。

总的来说，我们对Nrf2在肝再生过程中的功能有了新的了解。PH后，增殖的肝细胞需要Nrf2去适当调控Cyclin A2和Wee1/Cdc2/Cyclin B1通路，从而确

保及时进入M期。随着肝再生进程，Nrf2增加活性使p70S6K产生适宜的生长信号，使肝细胞持续生长，并且使新生的肝细胞保持其成熟特性。

# **5** 结论

我们利用Keap1+/-和Nrf2-/-小鼠，通过两个独立的实验，证实了Keap1 和

Nrf2在肝再生过程中对肝细胞周期进行调节的重要功能。主要的发现总结如下：

1 Keap1和Nrf2在再生肝细胞的细胞周期中是各自分离，独立进行作用的；

2 Keap1对再生肝脏中的氧化还原反应周期进行调节；

3 Keap1对肝再生过程中增生肝细胞S期进入，S期进程以及有丝分裂的节律进行调控；

4 Keap1表达的临界值对于PH后促有丝分裂原信号（c-Met、EGFR、Akt1 和

p70S6K)的激活以及Cyclin A2和Cylin B1的表达都是非常关键的；

5 Nrf2在肝再生过程中，肝细胞进入和通过细胞周期时并没有被激活；

6 Nrf2对于再生肝细胞及时进入M期是必不可少的；

7 Nrf2对于调控Cyclin A2的适度表达以及Wee1/Cdc2/Cyclin B1通路的激活都是必需的；

8 Nrf2能够使新生的再生肝细胞处于完全分化状态。Nrf2缺失会引起暂时并且广泛的肝细胞去分化。

通过以上这些研究，在未来的时间里，我们打算进行以下几个方面的研究

1 Keap1是怎样独立于Nrf2调控氧化还原周期和细胞周期的？

2 Nrf2是怎样在氧化还原周期和细胞周期过程中处于静止状态的？

3再生的肝脏是怎样产生ROS并且形成氧化还原周期的？

4氧化还原周期是怎样与细胞周期相关联的？

# **6** 参考文献

1. Starzl T E, K A Porter, J A Francavilla, et al. A hundred years of the hepatotrophic controversy [J]. *Ciba Foundation Symposium*. 1977, (55): 111-129.

2. Fausto N, E M Webber. Liver regeneration [A]. Arias I, J Boyer, N Fausto, et al.

*The liver: biology and pathobiology* [C]. New York: Raven Press, 1994.1059-1084.

3. Diehl A M, R Rai. Review: regulation of liver regeneration by pro-inflammatory cytokines [J]. *J Gastroenterol Hepatol*. 1996, 11(5): 466-470.

4. Michalopoulos G K, M C DeFrances. *Liver regeneration* [J]. Science, 1997, 276(5309): 60-66.

5. Plaa G L. Chlorinated methanes and liver injury: highlights of the past 50 years [J].

*Annual review of pharmacology and toxicology*, 2000, 40: 42-65.

6. Michalopoulos G K. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas [J]. *The American journal of pathology*, 2010, 176(1): 2- 13. PMCID: 2797862.

7. Michalopoulos G K. Liver regeneration[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2007, 213(2): 286-300.

8. Michalopoulos G K. M DeFrances. Liver regeneration [J]. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnoogyl*, 2005,93:101-34.

9. Fausto N, J S Campbell, K J Riehle. Liver regeneration [J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2006, 43(2 Suppl 1): S45-53.

10. Fausto N, K J Riehle. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications [J]. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2005, 12(3): 181-9.

11. Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells [J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2004, 39(6): 1477-87.

12. Moi P, K Chan, I Asunis, et al. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2- like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-

E2/AP1 repeat of theβ-globin locus control regine [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of Amcrica*, 1994, 91(21): 9926-9930

13. Zhang D D. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway [J]. *Drug Metabolism Reviews*, 2006, 38(4): 769-789.

14. Kang M I, A Kobayashi, N Wakabayashi, et al. Identification of the interactive interface and phylogenic conservation of the Nrf2-Keap1 system [J]. *Genes Cell*, 2002, 7(8): 807-820.

15. Takagi Y, M Kobayashi, L Li, et al. MafT, a new member of small Maf protein family in zebrafish [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 320(1): 62-69.

16. Nioi P, T Nguyen, P J Sherratt, et al. The carboxy-termainal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, 25(24):10895-10906.

17. Katoh Y, K Itoh, E Yashida, et al. Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB bingding preotein, and synergistically avtivate transcription [J]. *Genes to Cells*, 2001, 6(10): 857-868.

18. Mcmahon M, N Thomas, K Itoh, et a1. Redox-regular turn over of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redexsensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 dngmn [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(30): 31556-31567.

19. Taguchi K, H Motohashi, M Yamamoto. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution[J]. *Genes to Cells*, 2011, 16(2):123-40.

20. Sun Z, S Zhang, J Y Chan, et a1. Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2 [J]. *Molecular and cellular biology*, 2007, 27(18): 6334-49. PMCID: 2099624.

21. Velichkova M, T Hasson. Keap1 regulates the oxidation-sensitive shuttling of Nrf2

Into and out of the nucleus via a Crm1-dependent nuclear export mechanism [J].

*Molecular and cellular biology*, 2005, 25(11):4501-13. PMCID: 1140621.

22. Chan K, R Lu, J C Chang, et a1. NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(24):13943-8.

23. Pagno M, K Ravid. Signaling networks and cell cycle control: the molecular basis of cancer and other diseases [M]. *Gutkind J Silvio.* Cancer Drug Discovery and Development [Z]. Totowa NJ: Humana Press Inc, 2000. 545-51.

24. Musgrove E A. Cyclins: roles in mitogenic signaling and oncogenic transformation [J]. *Growth Factors*, 2006, 24(1):13-9.

25. Deshpande A, P Sicinski, P W Hinds. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective [J]. *Oncogene*, 2005, 24(17): 2909-2915.

26. Dobashi Y. Cell cycle regulation and its aberrations in human lung carcinoma [J]. Pathology International, 2005, 55(3): 95-105.

27. Mitchell C, H Willenbring. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice [J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(7): 1167-1170.

28. Matsuo T, S Yamaguchi, S Mitsui, et a1. Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo [J]. Science (New York, NY), 2003, 302(5643): 255-9.

29. Zou Y, Q Bao, S Kumar, et a1. Four waves of hepatocyte proliferation linked with three waves of hepatic fat accumulation during partial hepatectomy-induced liver regeneration [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(2): e30675. PMCID: 3272022.

30. Chan K, R Lu, J C Chang, et a1. NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(24): 13943-13948.

31. Greene A K, M Puder. Partial hepatecto my in the mouse: technique and peri- operative management [J]. *Journal of Investigative Surgery*, 2003, 16(2): 99-102.

32. Matsuo T, S Yamaguchi, et al. Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo [J]. Science, 2003, 302 (5643): 255 -259.

33. Scholzen T, J Gerdes. The Ki-67 protein: from the known and the unknown [J].

*Journal of Cellular Physiology*, 2000, 182 (3): 311-322.

34. Zou Y, Q Bao, S Kumar, et al. Four waves of hepatocyte proliferation linked with three waves of hepatic fat accumulation during partial hepatectomy-induced liver regeneration [J]. *PLoS*. *ONE*, 2012, 7 (2): e30675.

35. Chan K, X D Han, Y W Kan. An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of Amcrica*, 2001, 98(8): 4611 -4616.

36. Aleksunes L M, A L Slitt, Maher J M. et al. Nuclear factor- E2- related factor 2 expression in liver is critical for induction of NAD(P) H: quinone oxidoreductase 1 during cholestasis [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2006, 11(4): 356-363.

37. Singh A, T Rangasamy, et al. Glutathione peroxidase 2, the major cigarette smoke- inducible isoform of GPX in lungs, is regulated by Nrf2 [J]. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2006, 35(6): 639-650.

38. Espeillac C, C Mitchell, et al. S6 kinase 1 is required for rapamycin-sensitive liver proliferation after mouse hepatectomy [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2011, 121 (7): 2821 -2832.

39. Chiu J, I W Dawes. Redox control of cell proliferation [J]. *Trends in Cell Biology*, 2012, 22(11): 592 -601.

40. Podhorecka M, A Skladanowski, et al. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy [J]. *Journal of Nucleic Acids*, 2010, 2010: 92-161.

41. Lin T, W Ibrahim, et al. A novel role of nucleostemin in maintaining the genome

Integrity of dividing hepatocytes during mouse liver development and regeneration [J]. *Hepatology*, 2013, 58(6): 2176-2187.

42. Beyer T A, W Xu, et al. Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: role of ROS -mediated insulin/IGF-1 resistance [J]. *the Embo Journal*, 2008, 27(1): 212- 223.

43. Wakabayashi N, S Shin, et al. Regulation of notch1 signaling by nrf2: implications for tissue regeneration [J]. *Science Signaling*, 2010, 3(130): ra52.

44. Borowiak M, A N Garratt, et al. Met provides essential signals for liver regeneration [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of Amcrica*, 2004, 101 (29): 10608 -10613.

45. Natarajan A, B Wagner, et al. The EGF receptor is required for efficient liver regeneration [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of Amcrica*, 2007, 104 (43): 17081 -17086.

46. Espeillac C, C Mitchell, et al. S6 kinase 1 is required for rapamycin-sensitive liver proliferation after mouse hepatectomy [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2011, 121 (7): 2821 -2832.

47. Furuno N, N den Elzen, et al. Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1999, 147 (2): 295-306.

48. Den Elzen N, J Pines. Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2001, 153 (1): 121-136.

49. Malumbres M, M Barbacid. Mammalian cyclin-dependent kinases [J]. *Trends in Biochemical Sciences. 2005*, 30 (11): 630-641.

50. Gong D, J R Pomerening, et al. Cyclin A2 regulates nuclear-envelope breakdown and the nuclear accumulation of cyclin B1 [J]. *Current Biology*, 2007, 17(1): 85-91.

51. Fisher D, L Krasinska, et al. Phosphorylation network dynamics in the control of cell cycle transitions [J]. *Journal of Cell Science*, 2012, 125 (Pt 20): 4703-4711.

52. Parry D H, P H O'Farrell. The schedule of destruction of three mitotic cyclins can dictate the timing of events during exit from mitosis [J]. *Current Biology*, 2001, 11(9): 671-683.

53. Menon S G, P C Goswami. A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new [J]. *Oncogene*, 2006, 26(8): 1101 -1109.

54. Burhans W C, N H Heintz. The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2009, 47(9): 1282-1293.

55. Kohler U A, Kurinna S, Schwitter D, et al. Activated Nrf2 impairs liver re- generation in mice by activation of genes involved in cell cycle control and apoptosis [J]. *Hepatology*, 2013.

56. Beyer T A, W Xu, D Teupser, et al. Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: role of ROS -mediated insulin/IGF-1 resistance [J]. *The EMBO journal*, 2008, 27(1):212-223.

57. Huang J, I Tabbi-Anneni, V Gunda, et al. Transcription factor Nrf2 regulates SHP and lipogenic gene expression in hepatic lipid metabolism [J]. *American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2010, 299(6): G1211-1221.

58. Chan K, X D Han, Y W Kan. An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(8):4611-4616.

59. Miyaoka Y, K Ebato, H Kato, et al. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration [J]. *Current Biology*, 2012, 22(13): 1166- 1175.

60. Chen Y, P P Wong, L Sjeklocha, et al. Mature hepatocytes exhibit unexpected plasticity by direct dedifferentiation into liver progenitor cells in culture [J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2012, 55(2): 563-574.

61. Suzuki A, S Sekiya, M Onishi, et al. Flow cytometric isolation and clonal identification of self-renewing bipotent hepatic progenitor cells in adult mouse liver

[J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2008, 48(6):1964-1978.

62. Grosse-Gehling P, C A Fargeas, C Dittfeld, et al. CD133 as a biomarker for putative cancer stem cells in solid tumours: limitations, problems and challenges [J]. *The Journal of pathology*, 2013, 229(3): 355-378.

63. Yovchev M I, P N Grozdanov, H Zhou, et al. Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver [J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2008, 47(2):636-647.

64. Tirnitz -Parker J E, C S Viebahn, A Jakubowski, et al. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis is a mitogen for liver progenitor cells [J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2010, 52(1):291-302.

65. Jakubowski A, C Ambrose, M Parr, et al. TWEAK induces liver progenitor cell proliferation. *The Journal of Clinical Investigation*, 2005, 115(9):2330 -2340.

66. Suemori S, K Lynch-Devaney, D K Podolsky. Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue-and cell-specific member of the trefoil protein family [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88(24):11017 -11021.

67. Podolsky D K, K Lynch-Devaney, J L Stow, et al. Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion [J]. *The Journal of biological chemistry*, 1993, 268(9):6694-6702.

68. Kanai M, C Mullen, D K Podolsky. Intestinal trefoil factor induces inactivation of extracellular signal-regulated protein kinase in intestinal epithelial cells [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(1):178-182.

69. Mashimo H, D C Wu, D K Podolsky, et al. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor [J]. *Science (New York, NY)*, 1996, 274(5285):262-265.

70. He G, D Dhar, H Nakagawa, et al. Identification of liver cancer progenitors whose

Malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling[J]. *Cell*, 2013, 155(2): 384-396.

71. Fingar D C, S Salama, C Tsou, et al. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E [J]. *Genes & Development*, 2002, 16(12):1472-1487.

72. Haga S, M Ozaki, H Inoue, et al. The survival pathways phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K) /phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) /Akt modulate liver regeneration through hepatocyte size rather than proliferation [J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2008; 49(1):204-214.

73. Sullivan M, D O Morgan. Finishing mitosis, one step at a time [J]. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 2007, 8:894 -903.

74. Parry D H, P H O'Farrell. The schedule of destruction of three mitotic cyclins can dictate the timing of events during exit from mitosis [J]. *Current Biology*, 2001, 11(9):671 -683.

75. Sporn M B, K T Liby. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context [J]. *Nature reviews. Cancer*, 2012, 12(8):564-571.

76. DeNicola G M, F A Karreth, T J Humpton, et al. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis [J]. *Nature*, 2011, 475(7354): 106-109.

77. Mitsuishi Y, K Taguchi, Y Kawatani, et al. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming [J]. *Cancer cell*, 2012, 22(1): 66-79.

78. Reddy N M, S R Kleeberger, J H Bream, et al. Genetic disruption of the Nrf2 compromises cell-cycle progression by impairing GSH-induced redox signaling [J]. *Oncogene*, 2008, 27(44): 5821-5832.

79. Talchai C, S Xuan, H V Lin, et al. Pancreatic beta cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic beta cell failure [J]. *Cell*, 2012, 150(6):1223 -1234.

80. Landsman L, A Parent, M Hebrok. Elevated Hedgehog/Gli signaling causes beta- cell dedifferentiation in mice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(41):17010-17015.

81. White P, J E Brestelli, K H Kaestner, et al. Identification of transcriptional networks during liver regeneration [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2005, (280):3715

-3722.

82. Klochendler A, N Weinberg-Corem, M Moran, et al. A transgenic mouse marking live replicating cells reveals in vivo transcriptional program of proliferation [J]. *Developmental Cell*, 2012, 23(4):681-690

83. Zeisberg M, E G Neilson. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions [J].

*Journal of Clinical Investigation*, 2009, 119(6):1429-1437.

84. Zavadil J, E P Bottinger. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions [J].

*Oncogene*, 2005, 24(37): 5764-5774.

85. Teng Y, M Zeisberg, R Kalluri. Transcriptional regulation of epithelial- mesenchymal transition [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2007, 117(2):304 - 306.

86. Choi S S, A M Diehl. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver [J].

*Hepatology (Baltimore, Md)*, 2009, 50(6):2007-2013.

87. Yanger K, Y Zong, L R Maggs, et al. Robust cellular reprogramming occurs spontaneously during liver regeneration [J]. *Genes & Development*, 2013, 27(7):719-724.

88. Ramos-Gomez M, M K Kwak, P M Dolan, et al. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(6):3410-3415.

89. Iida K, K Itoh, Y Kumagai, et al. Nrf2 is essential for the chemopreventive efficacy of oltipraz against urinary bladder carcinogenesis [J]. *Cancer Research*, 2004,

64(18): 6424-6431.

90. Xu C, M T Huang, G Shen, et al. Inhibition of 7, 12-dimethylbenz(a) anthracene- induced skin tumorigenesis in C57BL/6 mice by sulforaphane is mediated by nuclear factor E2-related factor 2 [J]. *Cancer Research*, 2006, (66):8293-8296.

91. Khor T O, M T Huang, A Prawan, et al. Increased susceptibility of Nrf2 knockout mice to colitis -associated colorectal cancer [J]. *Cancer Prevention Research (Phila)*, 2009, 1(3):187-191.

92. Yasutis K M, K G Kozminski. Cell cycle checkpoint regulators reach a zillion [J].

*Cell cycle (Georgetown, Tex)*, 2013, 12(10):1501 -1509.

93. Perry J K, N Kannan, P M Grandison, et al. Are trefoil factors oncogenic[J].

*Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2007, 19(2):74-81.

94. Beyer T A, W Xu, D Teupser, et al. Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: role of ROS-mediated insulin/IGF-1 resistance [J]. *The EMBO Journal*, 2007, 27(1):212-223.

95. Wakabayashi N, S Shin, S L Slocum, et al. Regulation of notch1 signaling by nrf2: implications for tissue regeneration [J]. *Science Signaling*, 2010, 3(130): ra52. PMCID: 2932745.

96. Dayoub R, A Vogel, J Schuett, et al. Nrf2 activates augmenter of liver regeneration (ALR) via antioxidant response element and links oxidative stress to liver regeneration [J]. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*, 2013, 19:237-244. PMCID: 3769531.

97. Buitrago-Molina L E, S Marhenke, T Longerich, et al. The degree of liver injury determines the role of p21 in liver regeneration and hepatocarcinogenesis in mice [J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2013, 58(3):1143-1152.

附 **录**

# 个人简历

姓名：胡敏

出生年月：1976年8月民族： 汉

籍贯：安徽省蚌埠市政治面貌：中共党员专业：药理学

研究方向：免疫药理学

# 主要学习和工作经历

1996.9～2001.6 安徽中医药大学 中西医结合临床专业 获学士学位

2004.9～2007.6 安徽医科大学 病理学与病理生理学专业攻读硕士学位

2010.10～至今 安徽医科大学 药理学专业博士研究生攻读博士学位

2011.7～2013.10 美国 IUPUI 生物系 访问学者

2001.6～至今 安徽中医学院病理学教研室 教师**攻读博士期间发表的文章**

1. **Min Hu**, Yuhong Zou, Shashank Manohar Nambiar, Joonyong Lee, Yan Yang\* and Guoli Dai\*. Keap1 Modulates the Redox Cycle and Hepatocyte Cell Cycle in Rege- nerating Liver. Cell cycle （已接收）(SCI 影响因子：5.243)

2. **Min Hu**, Yuhong Zou, Shashank M. Nambiar, Joonyong Lee, Yan Yang, Guoli Dai. Persistent Activation of Nrf2 Causes Delay in S Phase Entry and Subsequent Accelera- tion in DNA Synthesis of Replicating Hepatocytes during Liver Regeneration. Hepato- logy, 58(S1), The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases: The Liver Meeting 2013. 468A, 2013(SCI影响因子：12.03)

3. Yuhong Zou, **Min Hu**, Qi Bao, Jefferson Y. Chan, Guoli Dai\*. Nrf2 participates in regulating maternal hepatic adaptations to pregnancy. Journal of Cell Science, 126, 1618–1625,

2013(SCI影响因子：5.877)

4. Yuhong Zou, Qi Bao, Sudhanshu Kumar, **Min Hu**, Guo-Ying Wang, Guoli Dai \*. Four waves of hepatocyte Proliferation Linked with three waves of hepatic fat accumulation during partial hepatectomy-induced liver regeneration. PLOS ONE, 7(2), 1-8, 2012(SCI影响因子：3.73)

5. Yuhong Zou, **Min Hu**, Joonyong Lee, Shashank Manohar Nambiar, Qi Bao, and Guoli Dai\*. Nrf2 is Essential for Timely M-phase Entry of Replicating Hepatocytes during Liver Regeneration. The Journal of Biological Chemistry. (Unde review) (SCI影响因子：4.651)

6. Yuhong Zou, Joonyong Lee, Shashank Nambiar, **Min Hu**, Wenjuan Rui, Qi Bao, Jefferson Chan, and Guoli Dai\*. Nrf2 Is Involved in Maintaining Hepatocyte Identity during Liver Regeneration. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Phy-siology. (Unde review)(SCI影响因子：3.649)

致 **谢**

岁月如梭，转眼三年的博士研究生学习生活即将结束。站在毕业的门槛上，回首往昔，奋斗和辛劳成为丝丝的记忆，甜美与欢笑也都尘埃落定。安徽医科大学药理教研室所以其优良的学习风气、严谨的科研氛围教我求学，以其博大包容的情怀胸襟、充实而又激情的学科生活育我成人。

本论文是在导师杨雁教授和美国印地安那大学普渡大学印第安纳波利斯分校生物系戴国利教授的悉心指导之下完成的。三年来，两位导师以渊博的专业知识，严谨的治学态度，精益求精的工作作风，诲人不倦的高尚师德，朴实无华、平易近人的人格魅力深深影响着我。导师不仅教我如何做事，而且教我如何做人，这短短的三年，却让我受益终生。在此，我向我的导师杨雁教授、戴国利教授表示深切的谢意与祝福！

本课题的顺利完成凝集了药理教研室和美国IUPUI所有老师和同学们的汗水和艰辛！感谢戴国利教授在课题合作双方联系、沟通与协调等方面给予的帮助和支持！以及邹宇宏老师在日常实验工作中给予了无私的帮助和指导，在此表示衷心的感谢！

感谢与我朝夕相处、并肩奋斗的兄弟姐妹们：鲍琦、Sudhanshu Kumar、Joonyong Lee、Shashank Manohar Nambia，与你们在学习工作中交流讨论，日常生活中互相关心与帮助，都给我留下了美好的回忆。感谢所有为本课题实验过程中付出的辛勤劳动的师弟妹们！

最后，深深感谢我的家人、我的丈夫，给予我最无私、最伟大爱，时刻理解、支持和鼓励着我，在你们物质和精神的双重支持下我终于能够顺利完成学业！

胡敏

2014年5 月

# 综述

肝脏再Th

肝脏通过调控基本代谢，促进肠营养物质的吸收，合成多种蛋白维持渗透平衡，激素传递，除去有害异物毒素，为组织的代谢调节提供了多种基本的功能。这一系列的功能需要肝脏适当地调节其大小以满足机体需要。这很像一种自我平衡[1]。由此我们认为，肝脏应该具有非常强大的再生能力，无论肝细胞有多大范围的缺失，都应该可以被修复，这个过程就是“肝脏再生”。在对肝再生进行观察的过程中我们发现，除了肝脏的形状可以恢复之外，肝脏的大小也可以恢复，这个可能是代偿性的增生引起的。由此我们想到，肝脏在生理状态下（比如：怀孕、儿童期的生长、青春期）也会通过增加它的大小来满足机体的需要。与此同时，当机体新陈代谢发生变化或者由于一些疾病（恶病质、化疗反应、慢性炎症状态）改变机体的结构和功能的时候，肝脏也会变小。

为了使不同程度缺失以后肝脏能够保持其大小，生物体在进化过程中获得了多种再生方式。主要有以下两种不同的模式：

1. 通过高保真表型的细胞对缺失组织进行补充（肝脏自身细胞进入增殖修复自身的细胞缺失）

2. 通过激活干细胞分化途径对缺失组织进行补充

另外，在使用一些特殊的药物或者激素以后，可以引起肝脏体积过度增大，称为“过度肝肿大”。这三种不同的肝脏生长的再生方式如图1所示。



**图 1** 肝脏不同的再生**模式示意图**

这篇综述主要是介绍目前已知的一些肝再生的研究进展。上面所提到的两个过程并不是相互排斥的，它们可以根据组织缺失的大小以按不同比例同时发生，使细胞增殖并对其进行修复。啮齿类动物2/3肝切除术提供了分析第一种再生方式的实验模型。其他的一些条件下，特别是普遍发生在人类的一些疾病，可能会引起第二种方式进行修复，很多时候这两种方式往往同时并存。

**一肝脏2/3切除术以后的肝脏再生**

我们通常利用啮齿类动物2/3肝脏切除模型来对肝再生进行研究。这个模型是由Higgins和Anderson在1931年首次进行命名的[2]。他利用啮齿类动物肝脏多小叶的结构特点，使用简单的外科手术操作对肝脏进行切除。这个方法的优势在于切除的小叶不会引起残余肝脏组织的破坏，而且随后的炎症反应只发生在那些

坏死的肝脏部分。少数情况下，可以看到丙氨酸转氨酶的增加，但不会对再生肝叶的实质造成损害。另一个优点在于，可以进行精密的时间调控，从而更清楚的观察组织学和生物学的改变。

（一）肝再Th的启动

PH后引起的一个直接后果就是之前所有流经门静脉的血液，现在只通过总毛细血管床的三分之一。虽然在实验室中门脉压力动力学在肝部分切除手术后并没有被完全的破坏，但是我们很容易想到门静脉的压力会增加。肝脏门静脉每个单位血流增加以及正常存在于门静脉循环中有效血量的增加，在肝再生的启动过程中扮演了重要的作用。当门静脉循环部分从肝脏分流，再生过程就会被延迟，并且肝细胞生长因子（hepatocyte growth factor, HGF）激活减少[3]。除此之外，门静脉血流的改变和肝再生启动之间的关系并不明确。同时还发现肝脏大小由于细胞肿胀而增加（通过胰岛素潜在的诱导产生），这可能与胰岛素和表皮生长因子（epidermal growth factor receptor, EGFR）间的相互作用有关[4]。我们同时考虑到门静脉内的血流量的变化，可能集中表现为促有丝分裂生长因子，比如EGF的变化[5-6]。早前的一些研究显示，彻底的移除肝脏门静脉内的血液可以使再生反应消失。在正常的小鼠，门静脉血流（门腔静脉分门腔静脉分流术）完全分流可引起肝萎缩，肝脏大小大约可以减少一半。一旦门静脉血流循环恢复或者注射胰岛素促使细胞增殖，肝脏大小可以完全恢复[7]。然而给正常肝脏输注胰岛素，并不会产生促有丝分裂作用。Gock等近期的研究表明，门静脉血流在肝组织维持方面具有重要作用。门静脉左叶结扎，可引起受到影响的小叶由于肝细胞凋亡、坏死以及白细胞浸润显著萎缩，然而没有受到影响的肝小叶，肝细胞反而增殖和膨胀[8]。[这种由于门静脉结扎引起选择性萎缩的的方式目前运用于临床那些肝叶独立肿瘤切除[9]]。

在肝切除术很短暂时间以后，一些信号通路便开始启动。如预期的一样，尿激酶激活血纤维蛋白溶酶原转变为血纤维蛋白溶酶，而使尿激酶活性有一个明显的增加，后者可以激活金属蛋白酶(MMP 9)[10-16]。蛋白酶级联反应中的三个步骤

可以降解细胞外基质（extracellular matrix, ECM）的特定成分[12]。此外尿激酶还与HGF激活相关[14-16]。尿激酶活性的增加可能是一个很重要的事件，它可以触发ECM的重建以及激活HGF的活性，从而使肝细胞促有丝分裂信号被激活。肝细胞能够产生尿激酶[14]，但是并不清楚其它细胞是否参与这一过程。在尿激酶基因敲除小鼠，再生受到损害[17-18]，然而在正常小鼠肝脏，腺病毒介导尿激酶转入肝细胞，可引起再生反应[19]。激活HGF反过来可使尿激酶表达增加，这可能是通过Est1转录因子起作用，它是HGF/MET信号通路的作用靶点[20]。尿激酶活性的增加是肝再生早期的生物化学改变，但是在实验上并没有很明确的确定门脉血流和尿激酶激活间的信号连接。不过值得注意的是尿激酶活性的迅速增加与正常细胞以及癌细胞的增殖有关[21-23]。

另一个迅速发生的信号是β-连环蛋白迁移至肝细胞核内。在正常情况下，β-连环蛋白通常与细胞膜上的钙粘蛋白结合。在胞浆内有一个非常有效地泛素化酶可以使标记有β-连环蛋白的分子迅速降解。Wnt家族蛋白通过激活细胞膜上的跨膜受体卷曲蛋白泛素化标记过程使β-连环蛋白迁移至细胞核内，与膜上的Tcf家族的转录因子形成二聚体，启动与细胞周期有关的基因转录[24]。除了Wnt, HGF的受体MET[在肝细胞[25-26]]和EGFR[在其它细胞[27-28]]通过特定的酪氨酸磷酸化也显示出对β-连环蛋白的保护作用，并且促进其转移进入细胞核。在PH后5 min，肝细胞内的β-连环蛋白水平增加，在细胞核内停留的时间超过24 h [29]。β-连环蛋白基因敲除小鼠缺乏肝再生能力[30]。

Notch是另一个在PH后信号传递迅速被激活的蛋白。Notch在细胞内的区域，通常在与和特异性的配体结合以后，与Notch裂开，在PH后15 min以内转移进入细胞核，启动依赖于Nocth的基因转录，比如Hes1。抑制Notch 1表达或者其配体异常都可引起再生的缺乏[31]。

还有一些其他因素也参与到肝细胞增殖的启动环节中，方式还没有完全阐明。最近的研究已经证实，PH后可以有明显的血糖过低，注射胰岛素可以经由p21信号通路导致肝再生的降低[32]。

以上作用（每单位肝脏门静脉血流增加、Notch和β-连环蛋白信号通路、尿激酶的活化以及ECM的重构）当然也可能还有更多的信号通路参与，可以引起肝细胞在基因表达模式上产生快速而深远的变化。100多种在正常静止期肝细胞下不会表达的新的基因快速被激活。然而这些基因中的很大一部分基因功能毫无疑问的与细胞周期相关，但其它一部分基因（比如IGFBP家族成员）功能还不是很明确[33-37]。肝细胞调节基因表达的模式也同样重要，因此在高容量的时候有一个大多数蛋白产物的上调，并释放入血浆。基因表达增加使蛋白质产生增多可能是肝脏维持机体内平衡稳定的一个代偿效应[38]。大量产生的肝细胞相关蛋白

mRNA增加出现在两个阶段，这可能是为了保证在这个进程或者再生过程中有充足的基本循环蛋白的产生[39]。

（二）起作用的Th长因子和细胞因子

一些细胞外信号在PH之后很快就对肝细胞产生影响。目前已知很多信号都参与其中，但究竟是哪一个单独的在肝再生反应中起决定性作用很受争议。长达二十多年的研究目前得到结论，认为所有的信号都从不同的方面对再生过程起到作用。目前还没有一个信号通路完全消除后，可以延长再生反应或者与再生反应完全无关。很据它们的作用模式，可以把细胞外信号分为两大类：

1. 完全的有丝分裂原信号。只有两个信号属于这一类。一个是HGF和它的受体EMT，一个是EGFR及其相关配体，其中EGF、TGF-α、双调蛋白和HB-EGF直接和肝再生相关联。

2. 辅助的有丝分裂原信号。它们主要调控与肝细胞增殖起始有关的基本转录因子的精确的时间。消除这些信号可以导致再生的延迟，主要是由于引起特殊的转录因子激活的延迟。

虽然这两类信号功能不同，但是它们都非常重要。在一些情况下，比如肝实质严重的缺失，由于重要信号发生时机的缺陷可以导致戏剧性的结果-肝再生失败。而且在PH以后，这些信号在血循环中明显增加。通过一些早期研究可以解释这

些实验结果。在联体生活环境中的大鼠，其中一个肝脏进行肝部分切除可以引起没有手术的动物肝脏的再生[40]。另外一个研究，给受体动物皮下植入肝脏碎片作为对PH后再生的应答[41]。另外，遭受了皮下脂肪垫进行肝细胞植入的动物进行PH，可以刺激移植的肝细胞DNA合成[42]。这些研究提示肝细胞再生的刺激与来自于血液的因子相关。一些实验室利用化学方法培养的肝细胞旨在对来源于血液的促有丝分裂原活性研究，导致HGF分离[43-46]. HGF在PH后短时间内就会上升，可以作为解释上面所提到的早期发现的一个候选分子。然而在接下来的几年，有很多辅助的有丝分裂原在PH后也会增加，再生的血液来源的影响可能可以解释HGF和这些同时增加的有丝分裂原辅助分子的联合作用，包括去甲肾上腺素，IL-6，肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor, TNF），胆汁酸，瘦素等。很多这些辅助的有丝分裂原在肝细胞培养中表现出协同加强HGF和EGF，提高主要有丝分裂原作用的影响。下面列出了很多研究中提到的与肝细胞增殖起始有关的信号。

1肝细胞Th长因子（HGF）和它的受体MET

为了对肝脏以外的很多细胞系统的由HGF信号和它的受体产生的一般特性做一个深入的讨论，请参考相关的综述[47-55]。由HGF受体产生的信号涵盖了多个组织的各种细胞功能，包括细胞增殖和运动。Met 是一个多功能的受体，在与

HGF结合之后与自身形成二聚体使其激活，同时与其它受体建立伙伴关系。它与胰岛素形成二聚体，可以有助于肝细胞和其它细胞内葡萄糖的调节和一些代谢过程。这个能力在肝脏代谢中扮演了一个主要的角色[56]。MET也可以与脂肪合成酶形成二聚体，可以防止脂肪合成酶三聚化并且导致细胞死亡[57]。通过门脉循环灌注碘化的HGF，在门脉三连管周围HGF主要的限制EMC蛋白[15, 59]。很有趣的是，肝细胞的增殖过程从门静脉周围到小叶中心区域[60]。在PH后30 min内HGF受体明显激活，并在60 min到达高峰[61]。周边血液内的HGF蛋白水平迅速增加，在PH后1 h到达高峰[62]。同时肝组织内HGF的水平在最初的3 h会下降[63]。血浆内HGF活性选择性的增加与大多数正常肝脏内HGF并不活跃形成对比，提示通过激活尿激酶后释放HGF。既然后者启动了ECM的重构，HGF释放入血浆可

能是ECM降解的结果，由同步释放的透明质酸可以证实[64]。注射抗-HGF抗体阻止肝细胞增殖[65]。HGF 再激活之后是否对肝细胞在局部产生直接作用还是间接地入血，它的受体在1 h内被激活提示它的作用在细胞周期的起始阶段是很重要的[61]。用RNA干扰MET表达，导致MET活性明显下降以及大鼠在PH后24 h所出现的有丝分裂高峰完全消失[66]。除此之外与细胞周期相关的酶的基因表达也明显的改变，在用沉默ShRNA治疗之后，伴随着c-Met mRNA的下调，与凋亡相关的基因发生上调[66]。消除小鼠肝脏内的c-MET基因可以观察到再生缺陷[67]。然而目前还不清楚，再生过程中所出现的这些改变是不是由于c-Met自身的消除所引起，还是由于c-Met消除引起的二级病理变化所引起的[67]。在PH后3 h，肝脏开始合成新的HGF mRNA，并在24 h到达高峰[68]。新的HGF是由肝星状细胞

[69]和内皮细胞[70]所合成。除了肝脏之外，新的HGF在肺、脾和肾合成的数目还没有确定[31,72]。虽然胰岛素样生长因子1[73]可能在这过程中起了一定的作用，但是去甲肾上腺素是目前唯一已知的可以提高HGF产生的物质[74-75]。值得注意的是除了肝细胞之外也有其它的肝脏细胞表达c-MET。包括胆管和内皮细胞。独立研究显示，一些非肝细胞的细胞类型可以在肝细胞后几个小时（胆管细胞）或者几天（内皮细胞）进入DNA合成期[76]。因此，早期的MET的激活可能是通过酪氨酸磷酸化引起的。

2 EGFR和EGF, TGF-α，双调蛋白和HB-EGF

EGFR是ErbB1家族成员，也是受体[77]。目前已知EGFR有一些相应的配体，其中有些参与了肝细胞增殖的信号[78-79]. EGFR可以被EGF，TGF-α，双调蛋白，细胞调节素和上皮调节蛋白所激活。EGFR所有的配体会在后面讨论，能够刺激用化学方法合成的培养基内的肝细胞增殖。已经证实EGFR是通过酪氨酸磷酸化被激活，在PH后60 min可以到达高峰。Sibilia和他的同事研究发现PH后肝脏内EGFR缺失可以增加小鼠的死亡率[80]。用ShRNA干扰抗EGFR可以使肝细胞增殖减少[81]。这个影响并不像我们在MET观察到的那么引人注意。另一方面，使用过EGFR ShRNA可引起细胞周期抑制被延长，这与再生结束时肝细胞增大以

及肝脏重量恢复有关。有趣的是，使用EGFR ShRNA伴随着ErbB1家族另一个成员ErbB2的上调，同时MET的表达增高，MET与ErbB3结合增多。后者是一个接合器分子，缺乏激酶功能。正常情况下与EGFR相关联，提高它的作用。

MET和Her2/Neu表达增高证实，当两个主要的促有丝分裂受体中的一个被干扰，正常肝细胞内就会产生一个非常复杂的补偿信号反应，这也能够解释为什么干扰抗EGFR没有出现和干扰抗MET那样明显的作用。用EGFR沉默干扰发现，与刺激DNA合成有关的，表达EGFR的其它类型细胞（胆管细胞，库普弗细胞，内皮细胞）出现的的比肝细胞要晚很多[82]。对肝再生起到作用的EGFR的受体包括以下几种：

（1）EGF是最早被研究的EGFR配体。EGF是培养的肝细胞的促有丝分裂原[83]，并且把EGF灌注大鼠可引起DNA合成[84]。EGF可以由多个部位产生，包括唾液腺，十二指肠的Brunner's腺体[85]。由后者产生的EGF通过门脉循环不断地作用于肝脏。正常肝脏内大部分EGFR的激活应该是通过酪氨酸的磷酸化。EGF虽然经过门脉循环但是主要集中在肝脏门脉三连管周围区域[86]。肝再生过程中门脉循环内的EGF浓度可以被直接的测量出来。然而之前的研究显示，PH后周边血液内的去甲肾上腺素明显的增加，刺激十二指肠的Brunner's腺体产生EGF [85]。周边血液内的EGF浓度可能是由其它部位所产生的。已知雄性小鼠唾液腺可以产生高水平的EGF。切除雄性小鼠的唾液腺可以使肝再生受到影响并且外周血液内

EGF水平较低。

（2）TGF-α是EGFR的一个配体，对靶细胞的作用比EGF要更明显。EGF和TGF-α之间的差别的原因可能与EGFR配体复合物形成的过程有关，通过这两个配体经由不同的方式影响内吞作用和返回到细胞质膜[86]。产生一个28 KD的TGF-α前体，位于跨膜转运区域[87]。细胞外的蛋白裂开通过特异的蛋白酶释放小的分子量8 KD分泌形式[88]。TGF-α在肝再生过程中由肝细胞产生[89]。这增加了TGF-α作为肝细胞自分泌因子的可能性，并且驱动肝再生反应[90]。然而，肝细胞内TGF-α表达在细胞周期起始后20 h才出现。TGF-α+/-小鼠有正常的肝再

生[91]。这些发现提示，TGF-α可能通过肝细胞扮演了一个旁分泌的作用，刺激邻近细胞增殖。

（3）双调蛋白，与TGF-α相似，在啮齿类动物PH后由肝细胞产生。在培养的肝细胞，双调蛋白表达可以被IL-1β和前列腺素E2所诱导，HGF，IL-6和TNF不能产生双调蛋白。双调蛋白基因单等位体敲除小鼠引起肝再生缺陷[77,92]。在Yap蛋白和Hippo蛋白激酶通路的调控下可以表达双调蛋白，提示在调控hepatostat方面有重要作用[94]。

（4）HB-EGF是另一个EGFR的配体。与EGF和TGF-α相比较，HB-EGF由内皮细胞和库普弗细胞产生。HB-EGF对培养的肝细胞来说，是一个强效的促有丝分裂原[95]。小鼠1/3肝部分切除之后，通过自身刺激再生过程使HB-EGF作用增强。2/3肝部分切除可提高HB-EGF的增强。HB-EGF +/-小鼠肝再生缺陷[96]。

3肿瘤坏死因子（Tumor necrosis factor, TNF）

各种各样的上皮细胞有大量相反效应的细胞因子。在很多情况下，当他们的受体与先前遭受刺激进入增殖的细胞相互作用的时候，激活细胞死亡通路，同时也与细胞增殖信号增强有关。Diehl等人首先报道TNF参与了肝脏再生[97]。PH之后胞浆内的TNF增加。PH后激活TNF可加速NF-ҡB激活。Fausto等人研究证实，缺乏TNFR1可以使小鼠NF-ҡB活性下降，并使再生延迟[98-100]。在正常小鼠，已知TNF引起肝细胞凋亡，肝毒性和肝功能衰竭[101-109]. TNR R1 and Fas可以各自独立的诱导肝功能衰竭[33]。TNF在肝脏的作用结果依赖于NF-ҡB的活性状态

[103]. 关于是哪一个TNF帮助NF-ҡB激活的机制并不清楚。小鼠TNFR1基因单等位体敲除可使NF-ҡB活性缺失[99]。然而，在体外培养的肝细胞我们能够观察到HGF/Met或EGFR可以单独的激活NF-ҡB [110]. PH后NF-ҡB活性受阻可导致肝细胞的凋亡[103]。这些事件的一个决定因素可能是AKT的磷酸化状态。小鼠研究显示TNF激活NF-ҡB依赖于AKT的磷酸化[111]。然而在原代培养的小鼠肝细胞可以观察到TNF可以刺激AKT的磷酸化，AKT通过酪氨酸磷酸化被激活，被

公认为对MET和EGFR起作用[112-113]。在将MET特异的移除的小鼠肝细胞，

AKT激活在PH后明显延迟，而且ERK1/2没有被激活[114]。经由门静脉灌注

TNF不能够诱导细胞增殖，但是会使肝细胞对有丝分裂原HGF和EGF的反应性增强[115-116]。巨噬细胞可以产生TNF。它除了可以作用于NF-ҡB, TNF可能还可以通过诱导血浆膜蛋白酶比如TACE的产生而提高TGF-α的活性[117]。TNF的其它作用还包括在再生过程中与HGF相互作用激活MMP9 [118]，以及调节肝再生过程中肝细胞因子（stem cell factor, SCF）表达[119]。

4白介素6(Interleukin 6, IL-6)

这个细胞因子是最著名的被认为是急性期反应固有的免疫力象主要的配体触发器[120-122]。循环的IL-6绑定到一个可溶性的受体上形成一个复合物，这个复合物绑定到胞浆膜上，共享受体gp130 [123-124]。后者可以与其它配体（如抑癌蛋白

M等）共享，可以它们自身的可溶性受体形成复合物[125]。PH之后胞浆内IL-6水平快速增加。IL-6缺乏的小鼠由于肝细胞增殖一个关键的信号分子STAT3激活不足而引起肝再生延迟[126]。STAT3由于其它配体比如EGF和HGF导致其激活延迟，最终导致这些小鼠再生的延迟[127-128]。对正常的小鼠使用IL-6并不会诱导肝细胞增殖。同样，IL-6不会诱导原代培养的肝细胞增殖，但是可以促进胆管上皮细胞的有丝分裂[129]。肝细胞内IL-6和它的可溶性受体持续过表达导致门脉周围的肝细胞腺瘤的发生[130]。IL-6主要由肝脏的巨噬细胞在TNF的刺激下产生。缺乏gp130的小鼠对CCL4特别的敏感，但是对再生没有明显影响[131]。

5胆汁酸

有证据显示PH后循环血液里的胆汁酸升高，并且胆汁酸消耗可引起再生下降[132]。在PH后几个小时血浆内的胆汁酸水平可以到达高峰，因此这个变化可能与PH以后60 min内出现的早期改变没有什么关系。一些转录因子，比如法尼脂

X受体（farnesoid X receptor, FXR），可以对胆汁酸产生影响。FXR基因缺陷的小鼠表现出再生的缺乏[132]。通过肝细胞和其它类型细胞产生的胆汁酸信号，特

别是肠内皮细胞，非常的复杂。除了FXR，另一个细胞核激素受体LXP也扮演了一个主要的角色[133]。在啮齿类动物，胆汁酸通过肠FXR触发产生生长因子，比如FGF15（在人类产生的是FGF19）。最近一些研究显示这个生长因子在肝脏再生中并没有起到作用，但是作为一个内分泌激素（肠到肝脏）在肝脏胆汁酸和脂酸的代谢中起到作用[134-136]。给正常动物注射胆汁酸不会诱导肝细胞的增殖，胆汁酸也不会引起培养的肝细胞增殖。然而，最近有研究显示，胆汁酸可以通过

G蛋白偶联受体（TGR15）直接的促进胆管上皮细胞的有丝分裂[137]。这也许是胆管结扎以后胆管细胞广泛增殖这个复杂现象的关键原因，不过在综述中并没有阐述。TGR5 同时也会在肝窦内皮细胞表达。它对肝细胞的作用主要是通过激活

JUNK和Caspase 8而引起细胞凋亡[138]。

6去甲肾上腺素

这是总所周知的交感神经系统的一个配体，也可以由肾上腺的髓质产生。循环的儿茶酚胺类去甲肾上腺素和肾上腺素可以通过肝脏的一元胺氧化酶激活。最近一些证据显示，肝星状细胞也可以产生去甲肾上腺素[139-141]。通过观察体外培养的肝细胞，发现去甲肾上腺素不是自身的促有丝分裂原，但是可以明显的提高促有丝分裂原EGF和HGF的作用[142-144]，以及抵消TGF-β引起的有丝分裂的抑制作用[145]。去甲肾上腺素这个相似的作用我们可以在另一个TGF-β大家族里的成员激活素A观察到。去甲肾上腺素通过Smad7抵消激活素的作用，并且提高NF-ҡB的活性[146]。用适当地去甲肾上腺素处理体外培养的肝细胞，可以使EGF和TGF-β浓度改变，而使促有丝分裂和抑制有丝分裂平衡受到影响，导致肝细胞增殖[147]。PH后通过和HGF相似的动力学引起去甲肾上腺素和去甲肾上腺素水平明显增高[5]。去甲肾上腺素在PH后刺激促有丝分裂细胞因子的产生方面也起到重要的作用。可以刺激体外培养的成纤维细胞HGF产生增加[148]，以及增加十二指肠Brunner's腺产生EGF增加[74]。使用哌唑嗪（一种特异的α1肾上腺素能受体抑制剂）可以使大鼠肝脏再生延迟72 h [74]。肝脏外科或者化学性交感神经切除术可以引起同样的影响[139]。最近的研究显示去甲肾上腺素参与了STAT3和NF-

ҡB的激活[146]。通过近期研究发现，去甲肾上腺素在肝再生过程中扮演一定的角色，可以对EGFR, MET和TGF-β信号产生多方面的影响，而且对与细胞周期相关的转录因子产生直接作用，我们会进一步进行探讨。

7 5-羟色胺

小鼠的血小板数目减少可以导致肝再生下降。血小板包含了很多生物活性物质，包括HGF，TGF-β和5-羟色胺。对血小板减少的小鼠补充5-羟色胺可以产生与小板减少产生的影响的作用。5-羟色胺水平低的小鼠（缺乏色氨酸羟化酶）血小板5-羟色胺水平较低，并且它们会缺乏肝再生[148]。5-羟色胺是通过什么产生这些效果的机制并不清楚。近期一些研究显示5-羟色胺具有多种效应。它对胆汁阻塞损伤的肝脏有保护作用[149]，对随着年龄增长年龄引起的肝再生有改善作用。另一方面，消除血小板和周边血液的5-羟色胺转运体可以引起血小板内5-羟色胺明显的减少，但对消化速度的肝再生并不产生任何影响[150]。5-羟色胺的作用机制不清楚，增加5-羟色胺并不会使体外培养肝细胞增殖有所增加，而且对正常啮齿类使用5-羟色胺不会引起肝脏那个增大。如果5-羟色胺的作用是通过血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）产生的，那么可以想到HGF参与其中，因为内皮细胞通过VEGF受体1刺激VEGF产生HGF [70]。最近的研究表明，去甲肾上腺素可能通过自分泌或者旁分泌的方式参与胆管上皮细胞的增殖的调节[151-152]。

8瘦素

缺乏瘦素的小鼠，比如ob/ob小鼠可以引起肝再生缺陷[153]。一些研究指出瘦素在ob/ob小鼠肝再生中有一定作用，没有直接的证据证明瘦素通过自身在正常小鼠在再生过程中起作用。另外一些研究证实给ob/ob使用瘦素不会使缺乏再生的现象得以修复[154]。ob/ob小鼠缺乏再生很可能是由于肝细胞严重的脂肪变性引起，而不是自身缺乏瘦素。

9胰岛素

胰岛素在肝脏代谢和动力学方面扮演了一些重要的角色。由胰腺β-胰岛细胞产生，通过门静脉分泌新鲜的胰岛素，进入肝脏之前通过外周循环供给机体其他的组织。原代培养的肝细胞证实了在肝脏内胰岛素基本的功能，缺乏胰岛素可以导致肝细胞的死亡[155]。缺乏胰岛素使肝细胞内EGFR或者HGF配体不能促有丝分裂[142]。另一方面，胰岛素不能单独促进体外培养的肝细胞有丝分裂。当外科手术（门腔静脉分离术）使肝脏门脉循环分离，通过肝细胞凋亡的增加可以使肝脏比原始大小萎缩大约1/3。向门腔静脉分离术的实验模型注射胰岛素，可以通过肝细胞的增殖而恢复肝脏原始大小[89, 156]。门腔静脉分离术的啮齿类进行PH，同样可以引起再生缺乏。然而，对正常动物使用胰岛素处理，不会引起肝细胞增殖和肝脏变大。最近研究显示，胰岛素可能会引起EGFR在与受体无关的位点酪氨酸磷酸化，这个现象在PH后早期肝细胞肿胀时出现，也许是由于通过肝脏门脉的血流增多引起的[86]。以上结果证实了肝细胞内胰岛素和它的信号在肝细胞增殖和肝脏再生进程中扮演了基本的角色。

10补体复合物蛋白

PH后的或者由CCL4诱导的化学损伤引起的肝再生，在补体蛋白C3和C5缺乏时受到影响。用缺失的蛋白进行治疗，可以使肝再生反应有效恢复[157-159]。这个机制目前还不清楚。这个效应可能是通过IL4复杂的级联信号和IL-6的调节所介导的[160]。

11 Wnt家族成员和卷曲蛋白受体

关于Wnt在肝脏胚胎发育中的作用有很多的文献报道[161-163,50]. Wnt参与了肝脏发育的多个阶段，并且不同的Wnt家族成员在从斑马鱼、两栖类动物到哺乳类动物的肝脏发育中扮演了一个角色[164]。Wnt家族多个成员在不同的出生后的细胞和成人肝细胞内表达。同样也会表达所有的卷曲蛋白（Wnt受体家族）成员[165]。但是关于是否有特殊的Wnt家族成员起了更为重要的作用，以及在肝再生过程中Wnt蛋白和不同的卷曲蛋白受体是怎样各自调控的并不很清楚。然而，

Wnt家族成员中有很多都参与了肝脏的再生，从收集的证据来看，Wnt作用的主要的信号分子是β-catenin。β-catenin的激活和转移至细胞核内同样是由MET和EGFR的酪氨酸磷酸化所介导的[25-26]。因此，β-catenin的多个功能在肝再生过程中通过Wnt所产生的影响并没有展现出来。小鼠β-catenin的缺乏可引起肝再生障碍[50, 166]。如前面所提到的，β-catenin迁移进入细胞核内是肝再生早期发现的信号之一[29]。在肝细胞癌内可以发现β-catenin的突变[167]。Wnt可能部分上通过其他的促有丝分裂受体（比如EGFR）的调节产生作用[168]。没有明确的证据证实Wnt家族成员是否是体外培养的肝细胞的促有丝分裂原。同样也需要弄清楚Wnt成员是否由肝细胞自身所产生。

12 TGF-β

这是由TGF-β1,2和3组成的一个配体家族[169-175]。很多与再生有关的研究都集中于TGF-β1。TGF-β在肝再生中的作用很令人感兴趣。肝细胞表达TGF-β受体1,2和3 [169-172]。虽然TGF-β可以在肝细胞癌中产生，但目前还没有直接的证据证实肝细胞可以产生TGF-β[176]。然而肝星状细胞可以产生TGF-β[17]。TGF-β对体外培养的肝细胞增殖有抑制作用[145, 147]，但是会增加肝细胞的运动能力[177, 73]。

PH后短期使用TGF-β可以使肝再生延迟[180]。所以我们假设TGF-β可能参与抑制和/或终结再生。然而，TGF-β 转基因表达小鼠可以观察到正常的肝细胞再生

[181]. TGF-β受体1,2基因消除似乎并不能延长肝再生，除非同时消除激活素受体

[182]。

PH后2 -3 h以内TGF-βmRNA水平增高，24 h至72 h到达高峰[183]。肝脏类器官培养研究显示HGF/MET和EGFR信号触发TGF-βmRNA的表达[184-185]。然而，在这之前，在PH后1 h以内，TGF-β蛋白在血液内的水平非常高，与HGF和透明质酸水平相吻合[79,186]。既然TGF-β可以与核心蛋白聚糖（一种连接于肝细胞胞浆膜上的GPI蛋白）相结合[187]，TGF-β早期释放入血可能与ECM的重构有关。之前的研究显示TGF-β在胞浆内通过α-2巨球蛋白被绑定[188]。因此，TGF-β释放入血浆可能是一个作用机制，或者把肝细胞边缘处的TGF-β移至增殖

肝细胞周围。事实上，增殖肝细胞从门静脉周围到肝小叶中心周围形成一个波型，使用TGF-β进行免疫组织化学染色同样可以看到这样的变化[136]。以上这些提示，

PH后早期，TGF-β需要从肝细胞内移走，但是这个与肝细胞增殖无关，TGF-β可能参与其它功能的调节。我们猜想这些功能可能是来自于其它组织的TGF-β引起的。TGF-β 可以刺激成纤维母细胞和其它的间充质细胞持续产生结缔组织蛋白

[189]. 它也可以通过内皮细胞增加毛细血管的形成，继而促进新血管的形成[190-191]。

既然这些功能对后期肝再生肝脏组织的形成是必不可少的，我们可以认为TGF-β

参与了这些功能。

通过下游的TGF-β受体，再生的肝细胞（大鼠再生的第一和第二天）对TGF-β有丝分裂抑制作用具有抵抗力[169]。再生过程中，血浆中去甲肾上腺素的高水平表达可能也与再生肝细胞抵抗TGF-β有关。这使再生的肝细胞增殖过程继续。这些功能非常的复杂，而且可能促进了肝脏再生。β-2血影蛋白（TGF-β信号通路的一个组件）缺失，与肝再生延迟有关[192]。

TGF-β在肝再生终止过程中也起到了作用。肝细胞周围TGF-β与核心蛋白聚糖相结合可能有一个基本的功能，就是使肝细胞周期处于G0期。对正常大鼠给予抗TGF-β受体负显性质粒可以导致肝细胞在没有任何作用下（比如外科手术切除部分肝脏）肝细胞的增殖[193]。这提示肝细胞在G0期受到TGF-β和周围生长因子相反作用的持续的影响。消除TGF-β信号[136]可以使周围的生长因子产生相反的作用，而诱导信号导致肝细胞增殖。

13纤维母细胞Th长因子和它的受体

纤维母细胞生长因子（fibroblast growth factors, FGFs）家族包含多个成员

（目前已知的有23个）。FGF1和FGF2对元代培养的肝细胞DNA合成有个较弱的刺激作用[194]。FGF1和FGF2在S期肝细胞内表达增加[195-196]，但是对肝细胞或者邻近细胞的作用并不清楚。我们在FGF家族另一个成员角化细胞生长张因子（keratinocyte growth factor, KGF）也观察到这样的变化[197]。这个生长因子家

族包含有4个受体，每一个都由2个亚基组成。这些受体表达于肝脏不同类型的细胞，FGFR4特异的表达于肝细胞[198]。FGFR4是小鼠FGF15的受体（人类是

FGF19）。FGF15是由胆酸刺激肠细胞产生的，它可以产生一个内分泌的作用，对肝功能产生影响[198]。

14 Th长激素

这个激素在调控肝脏产生IGF1方面起到了一个重要的作用[199]。然而把GH作为肝脏再生的一个调控者的作用的研究是有限的。GH不是肝细胞直接的促有丝分裂原。GH对PH后早期DNA的合成没有促进作用[200]。同时，GH对垂体切除的大鼠肝脏HGF mRNA的表达有一定的修复作用[201]。小鼠GH受体缺陷使肝脏再生能力受到影响，这也与EGFR和ERK1/2激活缺失有关[202]。GH分泌的减少在成年肝脏再生能力受损方面起到了重要的作用，主要通过GH调控GSK-3所导致[203]。虽然促进肝脏产生生长调节素(IGF1和IGF2)是GH的主要功能，但是

GH在肝脏再生中介导的其它作用并不清楚。PH后它们的水平下降，可能是由于肝脏体积比较小。然而，与假手术组大鼠相比较，遭受PH的大鼠生长调节素的水平明显较高[204]。

（三）肝再Th的细胞动力学

值得注意的是，肝脏作为一个复杂的器官，其完成再生的这个过程很快而且非常有序。肝细胞是肝脏做主要的组成细胞，肝脏大部分的功能都是由其行使。它们是第一个对再生刺激产生反应细胞[76]。胆管细胞也和肝细胞一样迅速的进入增殖状态。内皮细胞和肝形状细胞进入相对较慢[76]。如前面所提到的，在PH后非常短的时间内，有信号的迅速涌入以及基因表达的巨大改变。这些信号触发肝细胞增殖，但是在DNA 合成高峰和有丝分裂的时间上在不同种属之间会有差异

（大鼠在术后24 h出现，小鼠在术后36-48 h出现）。在人类，肝细胞增殖的高峰时间的差异取决于疾病条件、营养状态以及手术切除的肝脏范围。参与这个过程的肝细胞比例也非常高，在20个月以上大小的啮齿类，可以达到95%。年龄

稍大一点动物的可以达到75%。年龄在一定程度上对肝细胞再生产生了影响，但是并不显著，生长激素参与了此过程。即使年龄在肝再生过程中起到了一定的影响，但是再生并不会停止，即使在年纪更大一点的啮齿类动物中也可以观察到有效地再生[205-207]。最近很多研究证实随着年龄的增长，虽然肝细胞的增殖会有所下降，但是肝脏不会丧失修复的能力，这可能与EGF有效性的变化有关，激活了它的受体，以及转录因子FoxM1B的功能变化有关[208]。肝细胞的增殖从门静脉周围到小叶中心区域呈现波浪式。在大鼠，大约48 h可以达到小叶中心区[60]。增殖的细胞从邻近的细胞接收到促有丝分裂信号并且对肝脏其它细胞产生类似的信号[79,186]。虽然大部分HGF作为不活跃的（单链）蛋白质被肝细胞利用已经绑定于ECM，新的EGF mRNA和蛋白质在PH后3 h在星状细胞和内皮细胞内合成[68]。来源于骨髓的细胞的主要功能是作为肝窦内皮细胞的祖细胞，并且对HGF的激活作用比自然sinusoidal细胞还要明显[209]。来源于内皮细胞和巨噬细胞的HB-EGF也对肝细胞起作用[95]。由巨噬细胞产生的TNF和IL-6也提供给肝细胞

[126,210,100]. 增殖的肝细胞按顺序合成生长因子有效地作用于邻近的细胞。这些生长因子包括TGF-alpha [209], FGF1, FGF2 [195], VEGF [70], 血管生成素1和2 [211, 79, 212, 186, 213]，血小板源生长因子A(platelet-derived growth factor, PDGF) [214]. 胆管

细胞同样也参与了这些过程并似乎产生干细胞因子（stem cell factor, SCF）和粒细胞巨噬细胞刺激因子[215]。以上大部分因子都有一些血管生成活性，在再生后期复杂的血管生成过程中可能起到重要的作用。内皮细胞和肝细胞之间的相互作用非常复杂。增殖的肝细胞产生VEGF，并按顺序刺激血管内皮细胞生长因子受体，包括产生HGF [70]。肝细胞产生的VEGF依次被一氧化碳合成酶调控[216]。导致肝细胞和内皮细胞之间这种正反馈环终止的信号通路目前尚不清楚。然而，一些网上的结论是内皮细胞渗透入增殖的肝细胞，导致血管通路的形成，最终形成血窦并使再生肝脏组织学结构恢复完整。最近的研究也证实了骨髓的间充质细胞参与了肝再生。它们导致肝细胞团的扩张所需要越来越多的巨噬细胞。然而，令人吃惊的是，它们通过作为内皮细胞的来源而促进肝窦状隙的修复。很明显，大部分的HGF由骨髓间叶细胞的前体细胞产生的内皮细胞所产生[209]。铁代谢的调

节通过抑制肝杀菌肽进行调节，所以在再生过程中，肝脏内大部分的铁吸收被保留[217]。肝再生过程中肝细胞和其它细胞间复杂的信号相互作用如图2所示。



**图 2** PH**后参与肝再生的信号分子示意图**

胆管上皮细胞（aka胆管细胞）增殖几乎和肝细胞增殖同时出现。这些细胞是对和肝细胞一样的增殖信号(HGF, EGFR配体)产生反应。另外，在培养的细胞中，IL-6和血清素对胆管上皮细胞有促有丝分裂的作用[51]。近来一些证据显示，胆管上皮细胞可以对血清素产生反应并生成血清素[151-152]。同样也有新的证据证实胆管上皮细胞产生肝形状细胞的有丝分裂原——PDGF 。通过溴脱氧尿苷

（BrdU）进行核标记的研究证实肝细胞和胆管上皮细胞增殖动力学之间的差异非常小。然而，事实证明在再生过程中没有新的门脉三连管和小叶的产生。结果是，再生的肝脏小叶体积总体上增大。再生末期肝板的平均厚度是2.5 个肝细胞，而

正常肝脏肝板的平均厚度是1.5个肝细胞。肝板厚度在慢性疾病导致的长时间的肝再生过程中，是一个很特征性的诊断依据。

（四）存在于细胞周期G1和S期的信号印记

大多数的内皮细胞，它们从细胞周期G1期到S期利用共同的促有丝分裂信号通路。这些通路在很多种类型的细胞中都可以观察到，并且涉及细胞周期蛋白和细胞周期依赖性激酶[218]和信号分子，比如ERK1/2（175）的级联激活。PH后肝细胞基因表达有多种变化[219-223,37]. Fausto等研究显示c-fos和c-jun在早期表达增加[239]。一些肝细胞转录因子接收到多种共同的信号被激活，而使细胞通过G1期进入到S期。如上所述，更早期的活化作用主要通过Notch，β-catenin和整合素完成。我们越来越关注miRNA 总体的变化在这个阶段的作用。很多种类

miRNA的变化都可以观察到，但是它们的作用并不清楚[224]。下面是在肝再生中被广泛研究的转录因子：

1. NF-ҡB转录因子是一个两个亚基(p65和p50)和另一个蛋白（ҡB，IκB-α抑制剂）的复合物。IκB-β激酶（IKK）激活引起IκB-α磷酸化，与p65/p50复合体分离，而使NF-ҡB活化。这个复合物迁移入核，作用于特异基因启动子序列的靶位点，提高与细胞周期相关的靶基因转录[146]。PH后30 min内出现NF-ҡB的激活[225]。给小鼠注射腺病毒可引起一种对IKK-b（super-IκB）活性抵抗的IκB的表达，而使NF-ҡB不能完全激活，PH导致大片肝细胞凋亡[226]。然而，另外一个实验方法显示，诱导肝内super-IκB的表达可以使NF-ҡB激活受阻。此时，KH不会引起肝细胞凋亡和再生过程[227]。总的来说，NF-ҡB 在肝细胞进入细胞周期的过程中起到了非常重要的作用。NF-ҡB在PH后迅速的激活主要受到TNF的影响，小鼠

TNF受体1纯合子缺失可以引起NF-ҡB激活的急剧的下降[225]。TNF信号缺失，其它涉及生长因子的信号通路就会接管这个功能。受体酪氨酸激酶配体包括EGF和HGF能够引起多种细胞内NF-ҡB快速激活，这个活化作用对这些生长因子的靶基因保护作用相关[228-229]。去甲肾上腺素也可以活化NF-ҡB [146]。

2. CCAAT/增强子-连接蛋白α和β（CCAAT/enhancer-binding protein alpha and beta, C/EBPαandβ）是含有一个亮氨酸拉链修饰的转录因子，参与鸟氨酸循环、

糖类和类脂化合物的代谢相关基因的调控。C/EBPα主要在肝脏和脂肪组织表达。C/EBPβ在大部分组织中表达。C/EBPα纯合子缺失小鼠糖类和鸟氨酸循环酶表达明显下降，而使小鼠在出生后不久由于血糖过低而死亡[230]。PH后C/EBPα水平下降而C/EBPβ水平上升[231]。C/EBPβ以LIP和LAP两种形式表达。目前还不清楚为什么C/EBPβ缺乏可以使再生增强，但是通过小鼠研究显示HGF的作用需要C/EBPβ参与[232]。

3. Stat3 Stat3是一个由7各成员组成的蛋白家族，作为Jak酪氨酸磷酸化的目标，随后激活一系列的细胞膜受体。Stat家族至少包括5个成员。PH后1 h之内Stat3就会被激活，可以持续到8 h [233-234]. Stat3迁移入核内，触发很多调控细胞周期的基因的表达，包括AP1转录因子组件（Jun和Fos复合物）。IL-6纯合子删除可引起Stat3无法激活[126]。除了IL-6，去甲肾上腺素信号也可以激活Stat3 [235]。一些细胞因子和生长因子可以激活不同细胞内的Stat3。在培养的肝细胞可以观察到HGF和EGF激活Stat家族成员1和5，Stat3和Stat5能够形成二聚体[127-128]。定点消除小鼠肝脏内的Stat3, PH后的再生反应总体上减少。PH后，一般看不到

Stat1被激活，在一些再生反应结束的小鼠可以观察到Stat1的活化[236]。Stat家族成员之间在肝细胞生长调节时的的互动是非常复杂的，脑垂体的GH可能在这个过程中起到一定的作用[237]。有趣的是，肝细胞内活化的STAT3可以通过酪氨酸残基去磷酸化失活，这主要由受体酪氨酸磷酸酶PTPRD介导，在肝细胞癌中可以看到后者缺失[238]。

4. Cyclin D1。目前这一邻域大多数的研究支持以上所提到的这些信号最终导致Cyclin D1的激活，并迁移进入细胞核。这可以确保肝细胞进入S期。Cyclin D1，

D2和D3的过表达引起肝细胞增殖以及肝细胞的增大，D1，D2比D3更为活跃

[218]. 肝细胞内Cyclin D1短暂的过表达可以使细胞增殖[239-240]. cyclin D1转基因小鼠基因表达模式分析显示，PH后由大量重复的基因表达模式[218]。

（五）肝再Th的停止

除了肝再生的起始过程，最终在肝脏恢复其原始大小后就会终止的现象也令我们很感兴趣。对再生过程的停止这一复杂的过程，并没有像对起始过程那样研究透彻。有证据显示一些肝细胞在再生结束时其数量要多于原始的肝脏，同时会有小规模的凋亡在再生后期出现，以纠正最终肝细胞的数量[241]。

1 ECM和整合素连接激酶

如上面所提到的，肝脏再生的起始存在着ECM 的重塑和崩解，通过提高尿激酶的活性和蛋白质水解级联反应作为起始，通过尿激酶激活纤维蛋白溶酶原转变为纤维蛋白溶酶，后者激活金属蛋白酶（metalloproteinases, MMP9），导致包括葡糖氨基葡聚糖在内的特异蛋白质的降解，释放和激活基质内生长因子(HGF, HB-EGF)，并由整合素产生信号。大量的蛋白形成相互作用的网络(TIMP, PAI1等)激活或抑制基质重塑，它们共同调控再生的起始和进展[242-244]。在再生的最后，有新合成的ECM成分，包括葡糖氨基葡聚糖和不同类型的的胶原[79]。整个过程是通过整合素激活这些复杂的信号通路[245]。通过这些过程激活了哪些具体的通路目前还不是非常明确，但是包括整合素连接激酶（integrin linked kinase, ILK），与它相关的Parvin和PINCH，以及PINCH相关蛋白RSU1. ILK信号复合体在肝细胞生长中起到了抑制的作用。消除肝细胞内ILK基因可以导致在出生后前3个月肝细胞和胆管上皮细胞增殖的增加。同时，肝细胞相关基因的表达减少。这些发现与体外培养肝细胞所见一致，当基质缺乏可以看到肝细胞相关基因表达下降，以及作为对HGF和EGF反应，肝细胞增殖增加[110,246]。在3个月结束的时候，肝脏重量明显的增加，个别的肝细胞周围ECM积聚以及肝细胞相关基因表达增加[247]。在培养基中添加ECM（比如基底膜基质和胶原凝胶）可以修复肝细胞相关基因表达以及抑制肝细胞对生长因子的反应[248]。当ILK缺陷小鼠遭受PH，再生会延长，最终肝脏的重量会明显的超过手术前的肝脏，几乎是之前的两倍大小

[39]. 以上发现证实ECM在调节再生终止方面起了一个关键性的作用。ECM，除了通过整合素传递信号，也可以充当生长因子和细胞因子的仓库。

2 TGF-β和核心蛋白聚糖

TGF-β在再生或者终止过程中潜在的作用如之前讨论的那样。正如前面提到的，TGF-β在起始和再生的时候被排除肝脏，在再生的最后阶段，在肝细胞内通过与核心蛋白聚糖结合而被重新合成和修复。核心蛋白聚糖自身是一个与肝细胞相连的GPI链接蛋白，对MET和EGFR有直接的抑制作用[249-252]，并平衡TGF-β和MET、EGFR之间的相互作用，在再生终止中也起到了作用。

3磷脂酰肌醇聚糖-3(Glypican-3, GPC3)

这个蛋白被引起关注是以因为它是一种在肝细胞癌中高度表达的蛋白之一[252-255]。这个发现直观的给我们一个观念，就是GPC3是一个生长刺激物。然而，在人类通过对GPC3遗传的功能缺失研究显示，这个蛋白缺失可以与器官增大有关[256]。这提示GPC3并不是一个生长刺激物，事实上是生长抑制系统的一部分。

GPC3 表达出现在肝再生结束时，在体外培养的肝细胞也是在生长阶段结束时出现[257]。GPC3是一个结合于肝细胞胞浆膜上的GPI连接蛋白。它的作用可能是通过与特殊的搭档结合来实现。之前的一些研究证实GPC3可以绑定于Hedgehog家族成员，而且绑定到Hedgehog可以阻止它对很多类型肝细胞刺激生长的作用[258-260]. GPC3也可以与CD81相结合，CD81是一个，自身在细胞质膜上形成一个浓缩的四次跨膜蛋白微结构域[183]。很有趣的是，CD81是一个与丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)进入有关的蛋白[261]。HCV与肝细胞癌的促进有关。HCV，CD81 GPC3之间潜在的相互作用，以及Hedgehog通路需要进一步更好地了解。不管它们的作用机制是什么，GPC3缺失抑制了肝细胞的生长和肝再生。GPC3转基因表达在小鼠肝脏，抑制再生，并且在肝再生结束时肝脏重量减轻[262-263]。

**二化学损伤后的肝再生**

虽然PH后的肝脏再生是一个分析肝再生通路调控的非常有用的模型，很多肝脏疾病由于化学的或者病毒的作用，引起弥漫的或者局限性的肝脏损伤而引起再生反应。除了肝再生的信号通路，很多炎症信号通路在这种情况下也参与再生启动之前受损肝组织的清除。肝切除术模型不能够观察由生长因子和细胞因子介

导的再生，与炎症细胞介导的信号之间的相互作用。另外，虽然PH 后的再生影响了所有的肝小叶组件，由化学损伤引起的再生通常是由于肝实质缺失引起，有一个带状区域。根据大量的文献研究我们只能提供一个简单的总结，强调化学性损伤和肝脏切除手术后的反应之间主要的差别。多数与化学物质诱导的肝损伤的研究集中于肝细胞。很少有文献报道化学性损伤给星状细胞带来的急性效应[264]。很多文献提到化学性损伤慢性效应可以导致形状细胞激活，肝纤维化，这些可以在与肝纤维化和肝硬化的综述中看到[265-266]。延长肝细胞的死亡可以导致细胞凋亡，激活的星状细胞，吞噬凋亡的肝细胞[267]。最常见的由于化学物质引起的损伤是小叶中心的坏死（图3）。肝小叶中心区域的肝细胞高度的表达共同的酶家族，比如细胞色素p450（cytochrome P450, CYP）。这些血红素蛋白是多功能氧化酶大家族的成员，代表性的催化反应是羟基的一部分附着于一个异性生物质或者一个生物学自然分子的复合体。这个反映通常跟随于其它附件与羟基的附着后发生，使最终的产物更好溶解，从而可以通过血液或者胆汁进行消除。在许多情况下，附着于羟基带来的结果是对肝细胞产生自由基毒性。在毒性较高的情况下，肝细胞在小叶中心区域由于坏死表达CYP家族成员。乙酰氨基酚和四氯化碳这些化学物质经常被用于这些现象的实验研究[268-272]。



**图 3** **四氯化碳引起的肝小叶中央区域的坏死**

损伤的程度依赖于化学剂量，包括大约1/3肝小叶坏死经常在研究中看到。在肝细胞坏死之后，由于中心粒细胞和巨噬细胞的作用，在受影响区域就会有渗出，使坏死细胞被清除。在没有受到影响的肝小叶区域内肝细胞进入DNA 合成

证实肝脏再生已近开始。增殖的肝细胞迁移，恢复完整的肝小叶结构并对损伤进行修复。在肝小叶修复区域肝细胞基因表达模式很快就会转变为和正常肝脏一样

[273]. 很多证据证实在PH后起作用的信号通路（HGF和它的受体MET, EGF和EGFR, TNF和IL6等）也参与了这个过程。这些配体和信号的来源可能是和PH后一样，但是非常可能浸润的巨噬细胞也起到了很重要的作用。

门静脉周围坏死的实验模型限制了烯丙醇的使用[274-275]。这个化学试剂激活的模型并不清楚，但确实引起了门静脉的损伤。这个损伤的修复比小叶中心需要的时间长。同时也可以看到受损的胆道的增殖。如上面所提到的，门静脉周围基质中HGF和EGF任然被关注，很可能烯丙醇损伤的消除了与肝脏增殖起始有关的至关重要的生长因子。

不管损伤的区域是哪里，在使用单一的化学试剂之后肝小叶的修复迅速的出现，很少引起受影响区域肺实质细胞的坏死。长期使用足够的剂量的化学试剂引起修复延长，坏死的肝细胞不能够修复，以及随后沉积物是ECM改变，激活肝星状细胞，导致纤维化，甚至瘢痕的形成，最终形成肝硬化[91, 276]。

**三总结**

肝脏生长调控是一个非常复杂的过程，允许肝脏对不同来源的可能导致肝功能下降的潜在因素引起的损伤作出应答，使之能够满足机体稳态需要。肝体重比适当地调整时各种事件引起再生的最终结果。控制这些过程的信号非常复杂，通过促有丝分裂生长因子、细胞因子、转录因子和代谢改变级联触发事件紧密的协调在一起。生长和细胞坏死之间的动态交互作用确保肝脏在各种条件下能够保持基本的功能。值得注意的是，每一个与肝再生相关的信号通路都是非常复杂的。目前，没有任何一个信号通路被鉴别，一旦缺失可以使肝再生反应完全的消失。当由生长因子和细胞因子介导的信号通路不起作用时，通过内皮信号在再生中起作用，并最终完成再生。

**6** 参考文献

[1]. Michalopoulos G K. Liver regeneration after partial hepatectomy: Critical analysis of mechanistic dilemmas [J]. *The American Journal of Pathology*, 2009, 176(1): 2-13.

[2]. Higgins G M, R M Anderson. Experimental pathology of the liver, 1: Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal [J]. *Arch Pathol*, 1931, 12: 186-202.

[3]. Marubashi S, M Sakon, H Nagano, et al. Effect of portal hemodynamics on liver regeneration studied in a novel portohepatic shunt rat model [J]. *Surgery*, 2004, 136(5): 1028-1037.

[4]. Reinehr R, A Sommerfeld, D Haussinger. Insulin induces swelling-dependent activation of the epidermal growth factor receptor in rat liver [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(34): 25904-25912.

[5]. Olsen P S, S S Poulsen, P Kirkegaard. Adrenergic effects on secretion of epidermal growth factor from Brunner's glands [J]. *Gut*, 1985, 26(9): 920-927.

[6]. Skov Olsen P, S Boesby, P Kirkegaard, et al. Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in rats [J]. *Hepatology*, 1988, 8(5): 992-996.

[7]. Francavilla A, T E Starzl, K Porter, et al. Screening for candidate hepatic growth factors by selective portal infusion after canine Eck's fistula [J]. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 1991, 14(4): 665-670.

[8]. Gock M, C Eipel, M Linnebacher, et al. Impact of portal branch ligation on tissue regeneration, microcirculatory response and microarchitecture in portal blood-deprived and undeprived liver tissue [J]. *Microvascular Research*, 2011, 81(3): 274-280.

[9]. Yang A D, A Brouquet, J N Vauthey. Extending limits of resection for metastatic colorectal cancer: Risk benefit ratio [J]. *Journal of Surgical Oncology*, 2010, 102(8): 996-1001.

[10]. Kim T H, W C Bowen, D B Stolz, et al. Differential expression and distribution of focal adhesion and cell adhesion molecules in rat hepatocyte differentiation [J]. *Experimental Cell Research*, 1998, 244(1): 93-104.

[11]. Kim T H, W M Mars, D B Stolz, et al. Expression and activation of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 during rat liver regeneration [J]. *Hepatology*, 1999, 31(1): 75-82.

[12]. Kim T H, W M Mars, D B Stolz, et al. Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat [J]. *Hepatology*, 1997, 26(4): 896-904.

[13]. Liu M L, W M Mars, R Zarnegar, et al. Uptake and distribution of hepatocyte growth factor in normal and regenerating adult rat liver [J]. *the American Journal of Pathology*, 1994, 144(1): 129-140.

[14]. Mars W M, T H Kim, D B Stolz, et al. Presence of urokinase in serum-free primary rat hepatocyte cultures and its role in activating hepatocyte growth factor [J]. *Cancer Research*, 1996, (56): 2837-2843.

[15]. Mars W M, M L Liu, R P Kitson, et al. Immediate early detection of urokinase receptor after partial hepatectomy and its implications for initiation of liver regeneration [J]. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 1995, 21(6): 1695-1701.

[16]. Mars W M, R Zarnegar, G K Michalopoulos. Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA [J]. *the American Journal of Pathology*, 1993, 43(3): 949-958.

[17]. Drixler T A, J M Vogten, M F Gebbink, et al. Plasminogen mediates liver regeneration and angiogenesis after experimental partial hepatectomy [J]. *British Journal of Surgery*, 2003, 90(11): 1384-1390.

[18]. Roselli H T, M Su, K Washington, et al. Liver regeneration is transiently impaired in urokinase-deficient mice [J]. *The American Journal of Pathology*, 1998, 275: G1472- G1479.

[19]. Lieber A, M J Vrancken Peeters, L Meuse, et al. Adenovirus-mediated urokinase gene transfer induces liver regeneration and allows for efficient retrovirus transduction

Of hepatocytes in vivo [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(13): 6210-6214.

[20]. Delannoy-Courdent A, V Mattot, V Fafeur, et al. The expression of an Ets1 transcription factor lacking its activation domain decreases uPA proteolytic activity and cell motility, and impairs normal tubulogenesis and cancerous scattering in mammary epithelial cells [J]. *Journal of cell science*, 1998, 111 (Pt 11): 1521-1534.

[21]. De Petro G, D Tavian, A Copeta, et al. Expression of urokinase-type plasminogen activator (u-PA), u-PA receptor, and tissue-type PA messenger RNAs in human hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Research*, 1998, (58): 2234-2239.

[22]. Tavian D, G De Petro, A Benetti, et al. u-PA and c-MET mRNA expression is co- ordinately enhanced while hepatocyte growth factor mRNA is down-regulated in human hepatocellular carcinoma [J]. *International Journal of Cancer*, 2000, 87(5): 644-649.

[23]. Tavian D, A Salvi, G De Petro, et al. Stable expression of antisense urokinase mRNA inhibits the proliferation and invasion of human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cancer Gene Therapy*, 2003, 10(2): 112-120.

[24]. Monga S P. Role of Wnt/beta-catenin signaling in liver metabolism and cancer [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2011, 43(7): 1021-1029.

[25]. Apte U, G Zeng, P Muller, et al. Activation of Wnt/beta-catenin pathway during hepatocyte growth factor-induced hepatomegaly in mice [J]. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 2006, 44(4): 992-1002.

[26]. Monga S P, W M Mars, P Pediaditakis, et al. Hepatocyte growth factor induces Wnt-independent nuclear translocation of beta-catenin after Met-beta-catenin dissociation in hepatocytes [J]. *Cancer Research*, 2002, 62(7): 2064-2071.

[27]. Behrens J, L Vakaet, R Friis, et al. Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1993, 120(3): 757-766.

[28]. Shibamoto S, M Hayakawa, K Takeuchi, et al. Tyrosine phosphorylation of beta- catenin and plakoglobin enhanced by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor in human carcinoma cells [J]. *Cell Communication and Adhesion*, 1994, 1(4): 295-305.

[29]. Monga S P, P Pediaditakis, K Mule, et al. Changes in WNT/beta-catenin pathway during regulated growth in rat liver regeneration [J]. *Hepatology*, 2001, 33(5): 1098- 1109.

[30]. Tan X, J Behari, B Cieply, et al. Conditional deletion of beta-catenin reveals its role in liver growth and regeneration [J]. *Gastroenterology*, 2006, 131(5): 1561-1572.

[31]. Kohler C, A W Bell, W C Bowen, et al. Expression of Notch-1 and its ligand Jagged-1 in rat liver during liver regeneration [J]. *Hepatology*, 2004, 39(4): 1056-1065.

[32]. Weymann A, E Hartman, V Gazit, et al. p21 is required for dextrose-mediated inhibition of mouse liver regeneration [J]. *Hepatology*, 2009, 50(1): 207-215.

[33]. Haber B A, K L Mohn, R H Diamond, et al. Induction patterns of 70 genes during nine days after hepatectomy define the temporal course of liver regeneration [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 1993, 91(4): 1319-1326.

[34]. Lee J, L Greenbaum, B A Haber, et al. Structure and localization of the IGFBP-1 gene and its expression during liver regeneration [J]. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 1994, 19(3): 656-665.

[35]. Mohn K L, T M Laz, A E Melby, et al. Immediate-early gene expression differs between regenerating liver, insulin-stimulated H-35 cells, and mitogen-stimulated Balb/c 3T3 cells. Liver-specific induction patterns of gene 33, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and the jun, fos, and egr families [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(35): 21914-21921.

[36]. Taub R. Liver regeneration 4: Transcriptional control of liver regeneration [J]. Faseb J(S0892-6638), 1996, 10(4): 413-427.

[37]. Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism [J]. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2004, 5(10): 836-847.

[38]. Haber B, L Naji, D Cressman, et al. Coexpression of liver-specific and growth- induced genes in perinatal and regenerating liver: Attainment and maintenance of the differentiated state during rapid proliferation [J]. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 1995, 22(3): 906-914.

[39]. Apte U, V Gkretsi, W C Bowen, et al. Enhanced liver regeneration following changes induced by hepatocyte-specific genetic ablation of integrin-linked kinase [J]. *Hepatology*, 2009, 50(3): 844-851.

[40]. Moolten F L, N L Bucher. Regeneration of rat liver: Transfer of humoral agent by cross circulation [J]. *Science*, 1967, 158(3798): 272-274.

[41]. Leong G F, J W Grisham, B V Hole, et al. Effect of partial hepatectomy on DNA synthesis and mitosis in heterotopic partial autografts of rat liver [J]. *Cancer Research*, 1964, 24: 1496-1501.

[42]. Jirtle R L, G Michalopoulos. Effects of partial hepatectomy on trans-planted hepatocytes [J]. *Cancer Research*, 1982, 42(8): 3000-3004.

[43]. Nakamura T, T Nishizawa, M Hagiya, et al. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor [J]. *Nature*, 1989, 342(6248): 440-443.

[44]. Nakamura T, H Teramoto, A Ichihara. Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1986, 83(17): 6489-6493.

[45]. Zarnegar R, G Michalopoulos. Purification and biological characterization of human hepatopoietin A, a polypeptide growth factor for hepatocytes [J]. *Cancer Reserach*, 1989, 49(12): 3314-3320.

[46]. Zarnegar R, S Muga, J Enghild, et al. NH2-terminal amino acid sequence of rabbit hepatopoietin A, a heparin- binding polypeptide growth factor for hepatocytes [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1989, 163(3): 1370-1376.

[47]. Benvenuti S, P M Comoglio. The MET receptor tyrosine kinase in invasion and metastasis [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2007, 213(2): 316-325.

[48]. Boccaccio C, P M Comoglio. Invasive growth: A MET-driven genetic programme for cancer and stem cells [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2006, 6(8): 637-645.

[49]. Comoglio P M. Pathway specificity for Met signaling [J]. *Nature Cell Biology*, 2001, 3(7): E161-E162.

[50]. Gentile A, L Trusolino, P M Comoglio. The Met tyrosine kinase receptor in development and cancer [J]. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2008, 27(1): 85-94.

[51]. Matsumoto K, T Nakamura. Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 119(4): 591-600.

[52]. Matsumoto K, T Nakamura. Hepatocyte growth factor (HGF) as a tissue organizer for organogenesis and regeneration [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 239(3): 639-644.

[53]. Matsumoto K, T Nakamura. HGF: Its organotrophic role and therapeutic potential [J]. *Ciba Foundation symposium*, 1997, 212: 198-211; discussion 211-214.

[54]. Nakamura T. Hepatocyte growth factor as mitogen, motogen and morphogen, and its roles in organ regeneration [J]. *Princess Takamatsu symposia*, 1994, 24: 195-213.

[55]. Nakamura T, S Mizuno. The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine [J]. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 2010, 86(6): 588-610.

[56]. Fafalios A, J Ma, X Tan, et al. A hepatocyte growth factor receptor (Met) -insulin receptor hybrid governs hepatic glucose metabolism [J]. *Nature Medicine*, 2011, 17(12): 1577-1584.

[57]. Wang X, M C DeFrances, Y Dai, et al. A mechanism of cell survival: Sequestration of Fas by the HGF receptor Met [J]. *Molecular Cell*, 2002, 9(2): 411-421.

[58]. Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, B E Petersen, E W Scott. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion [J]. *Nature*, 2002, 416(6880): 542-545.

[59]. Schuppan D, M Schmid, R Somasundaram, et al. Collagens in the liver extracellular matrix bind hepatocyte growth factor [J]. *Gastroenterology*, 1998, 114(1): 139-152.

[60]. Rabes H M. Kinetics of hepatocellular proliferation as a function of the microvascular structure and functional state of the liver [J]. *Ciba Foundation Symposium*, 1977, (55): 31-53.

[61]. Stolz D B, W M Mars, B E Petersen, et al. Growth factor signal transduction immediately after two-thirds partial hepatectomy in the rat [J]. *Cancer Reserach*, 1999, 59(16): 3954-3960.

[62]. Lindroos P M, R Zarnegar, G K Michalopoulos. Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration [J]. *Hepatology*, 1991, 13(4): 743-750.

[63]. Pediaditakis P, J C Lopez-Talavera, B Petersen, et al. The processing and utilization of hepatocyte growth factor/scatter factor following partial hepatectomy in the rat [J]. *Hepatology*, 2001, 34(4 pt 1): 688-693.

[64]. Saegusa S, S Isaji, Y Kawarada. Changes in serum hyaluronic acid levels and expression of CD44 and CD44 mRNA in hepatic sinusoidal endothelial cells after major hepatectomy in cirrhotic rats [J]. *World Journal of Surgery*, 2002, 26(6): 694-699.

[65]. Burr A W, K Toole, C Chapman, et al. Anti-hepatocyte growth factor antibody inhibits hepatocyte proliferation during liver regeneration [J]. *The Journal of pathology*, 1999, 185(3): 298-302.

[66]. Paranjpe S, W C Bowen, A W Bell, et al. Cell cycle effects resulting from inhibition of hepatocyte growth factor and its receptor c-Met in regenerating rat livers by RNA interference [J]. *Hepatology*, 2007, 45(6): 1471-1477.

[67]. Borowiak M, A N Garratt, T Wustefeld, et al. Met provides essential signals for liver regeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101: 10608-10613

[68]. Zarnegar R, M C DeFrances, D P Kost, et al. Expression of hepatocyte growth factor mRNA in regenerating rat liver after partial hepatectomy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 177: 559-565.

[69]. Schirmacher P, A Geerts, A Pietrangelo, 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 [J]. *Hepatology*, 1992, 15: 5-11.

[70]. LeCouter J, D R Moritz, B Li, et al. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: Role of VEGFR-1 [J]. *Science*, 2003, 299: 890-893.

[71]. Avruch J, D Zhou, J Fitamant, et al. Mst1/2 signalling to Yap: Gatekeeper for liver size and tumour development [J]. *Br J Cancer*, 2011, 104: 24-32.

[72]. Yanagita K, M Nagaike, H Ishibashi, et al. Lung may have an endocrine function producing hepatocyte growth factor in response to injury of distal organs [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 182: 802-809.

[73]. Skrtic S, V Wallenius, S Ekberg, et al. Insulin-like growth factors stimulate expression of hepatocyte growth factor but not transforming growth factor beta1 in cultured hepatic stellate cells [J]. *Endocrinology*, 1997, 138: 4683-4689.

[74]. Broten J, G Michalopoulos, B Petersen, et al. Adrenergic stimulation of hepatocyte growth factor expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 262: 76-79.

[75]. Cruise J L, S J Knechtle, R R Bollinger, et al. Alpha 1-adrenergic effects and liver regeneration [J]. *Hepatology*, 1987, 7: 1189-1194.

[76]. Grisham J. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating liver; autoradiography with thymidine-H3 [J]. *Cancer Res*, 1962, 22: 842-849.

[77]. Michalopoulos G K, Z Khan. Liver regeneration, growth factors, and amphiregulin [comment] [J]. *Gastroenterology*, 2005, 128: 503-506.

[78]. Fausto N, J S Campbell, K J Riehle. Liver regeneration [J]. *Hepatology*, 2006, 43: S45-S53.

[79]. Michalopoulos G K. Liver regeneration [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 213: 286-300.

[80]. Natarajan A, B Wagner, M Sibilia. The EGF receptor is required for efficient liver regeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104: 17081-17086.

[81]. Paranjpe S, W C Bowen, G C Tseng, et al. RNA interference against hepatic epidermal growth factor receptor has suppressive effects on liver regeneration in rats [J]. *Am J Pathol*, 2010, 176: 2669-2681.

[82]. Bursch W, B Grasl-Kraupp, U Wastl, et al. Role of apoptosis for mouse liver growth regulation and tumor promotion: Comparative analysis of mice with high (C3H/He) and low (C57Bl/6J) cancer susceptibility [J]. *Toxicol Lett*, 2004, 149: 25-35.

[83]. McGowan J A, A J Strain, N L Bucher. DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes in a defined medium: Effects of epidermal growth factor, insulin, glucagon, and cyclic-AMP [J]. *J Cell Physiol*, 1981, 108: 353-363.

[84]. Bucher N L, U Patel, S Cohen. Hormonal factors concerned with liver regeneration [J]. *Ciba Found Symp*, 1977, 55: 95-107.

[85]. St. Hilaire R J, A L Jones. Epidermal growth factor: Its biologic and metabolic effects with emphasis on the hepatocyte [J]. *Hepatology*, 1982, 2: 601-613.

[86]. Reddy C C, A Wells, D A Lauffenburger. Receptor-mediated effects on ligand availability influence relative mitogenic potencies of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha [J]. *J Cell Physiol*, 1996, 166: 512-522.

[87]. Luetteke N C, D C Lee. Transforming growth factor alpha: Expression, regulation and biological action of its integral membrane precursor [J]. *Semin Cancer Biol*, 1990, 1: 265-275.

[88]. Lee D C, S W Sunnarborg, C L Hinkle, et al. TACE/ADAM17 processing of EGFR ligands indicates a role as a physiological convertase [J]. *AnnNYAcadSci*, 2003, 995: 22- 38.

[89]. Webber E M, M J FitzGerald, P I Brown, et al. Transforming growth factor-alpha expression during liver regeneration after partial hepatectomy and toxic injury, and potential interactions between transforming growth factor-alpha and hepatocyte growth factor [J]. *Hepatology*, 1993, 18: 1422-1431.

[90]. Mead J E, N Fausto. Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86: 1558-1562.

[91]. Russell W E, W K Kaufmann, S Sitaric, et al. Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor-alpha-targeted mice [J]. *Mol Carcinog*, 1996, 15: 183-189.

[92]. Berasain C, E R Garcia-Trevijano, J Castillo, et al. Amphiregulin: An early trigger of liver regeneration in mice [see comment] [J]. *Gastroenterology*, 2005, 128: 424-432.

[93]. Zhang J, J Y Ji, M Yu, et al. YAP-dependent induction of amphiregulin identifies a non-cell-autonomous component of the Hippo pathway [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11: 1444-1450.

[94]. Dong J, G Feldmann, J Huang, et al. Elucidation of a universal size-control mechanism in Drosophila and mammals [J]. *Cell*, 2007, 130: 1120-1133.

[95]. Ito N, S Kawata, S Tamura, et al. Heparin-binding EGF-like growth factor is a potent mitogen for rat hepatocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 198(1): 25-31.

[96]. Mitchell C, M Nivison, L F Jackson, et al. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor links hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration [J]. *JBiolChem*, 2005, 280: 2562-2568.

[97]. Akerman P, P Cote, S Q Yang, et al. Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy [J]. *Am J Physiol*, 1992, 263: G579- G585.

[98]. Yamada Y, N Fausto. Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor [J]. *Am J Pathol*, 1998, 152: 1577-1589.

[99]. Yamada Y, I Kirillova, J J Peschon, et al. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: Deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94: 1441-1446.

[100]. Yamada Y, E M Webber, I Kirillova, et al. Analysis of liver regeneration in mice lacking type 1 or type 2 tumor necrosis factor receptor: Requirement for type 1 but not type 2 receptor [comment] [J]. *Hepatology*, 1998, 28: 959-970.

[101]. Hatano E, Bennett BL, Manning AM, et al. NF-kappaB stimulates inducible nitric oxide synthase to protect mouse hepatocytes from TNF-alpha- and Fas-mediated apoptosis [J]. *Gastroenterology*, 2001, 120: 1251-1262.

[102]. Hatano E, D A Brenner. Akt protects mouse hepatocytes from TNF-alpha- and Fas-mediated apoptosis through NK-kappa B activation [J]. *Am J Physiol*, 2001, 281: G1357-G1368.

[103]. Iimuro Y, T Nishiura, C Hellerbrand, et al. NFkappaB prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration [J]. *J Clin Invest*, 1998, 101(7): 1541.

[104]. Leist M, F Gantner, I Bohlinger, et al. Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF-alpha requires transcriptional arrest [J]. *J Immunol*, 1994, 153: 1778-1788.

[105]. Leist M, F Gantner, I Bohlinger, et al. Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models [J]. *Am J Pathol*, 1995, 146: 1220-1234.

[106]. Leist M, F Gantner, S Jilg, et al. Activation of the 55 kDa TNF receptor is necessary and sufficient for TNF-induced liver failure, hepatocyte apoptosis, and nitrite release [J]. *J Immunol*, 1995, 154: 1307-1316.

[107]. Leist M, F Gantner, G Kunstle, et al. The 55-kD tumor necrosis factor receptor and CD95 independently signal murine hepatocyte apoptosis and subsequent liver failure [J]. *Mol Med*, 1996, 2: 109-124.

[108]. Leist M, F Gantner, G Kunstle, et al. Cytokine-mediated hepatic apoptosis [J]. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 1998, 133: 109-155.

[109]. Leist M, F Gantner, H Naumann, et al. Tumor necrosis factor induced apoptosis during the poisoning of mice with hepatotoxins [J]. *Gastroenterology*, 1997, 112: 923- 934.

[110]. Block G D, J Locker, W C Bowen, et al. Population expansion, clonalgrowth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium [J]. *J Cell Biol*, 1996, 132: 1133-1149.

[111]. Karin M, Y Yamamoto, Q M Wang. The IKK NF-kappa B system: A treasure trove for drug development [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3: 17-26.

[112]. Delehedde M, N Sergeant, M Lyon, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor stimulates migration of rat mammary fibroblasts through both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways [J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268: 4423-4429.

[113]. Greenbaum L E. Hedgehog signaling in biliary fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118: 3263-3265.

[114]. Heinrich P C, J V Castell, T Andus. Interleukin-6 and the acute phase response [J]. *Biochem*, 1990, J265: 621-636.

[115]. Webber E M, J Bruix, R H Pierce, et al. Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat [J]. *Hepatology*, 1998, 28(5): 1226-1234.

[116]. Webber E M, P J Godowski, N Fausto. In vivo response of hepatocytes to growth factors requires an initial priming stimulus [J]. *Hepatology*, 1994, 19: 489-497.

[117]. Argast G M, J S Campbell, J T Brooling, et al. Epidermal growth factor receptor transactivation mediates tumor necrosis factor-induced hepatocyte replication [J]. *J Biol-Chem*, 2004, 279: 34530-34536.

[118]. Haruyama T, I Ajioka, T Akaike, et al. Regulation and significance of hepatocyte- derived matrix metalloproteinases in liver remodeling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 272: 681-686.

[119]. Ren X, B Hu, L Colletti. Stem cell factor and its receptor, c-kit, are important for hepatocyte proliferation in wild-type and tumor necrosis factor receptor-1 knockout mice after 70% hepatectomy [J]. *Surgery*, 2008, 143: 790-802.

[120]. Gauldie J, W Northemann, G H Fey. IL-6 functions as an exocrine hormone in inflammation. Hepatocytes undergoing acute phase responses require exogenous IL-6 [J]. *J Immunol*, 1990, 144: 3804-3808.

[121]. Xiao G H, M Jeffers, A Bellacosa, et al. Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(1): 247-252.

[122]. Streetz K L, T Wustefeld, C Klein, et al. Mediators of inflammation and acute phase response in the liver [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2001, 47: 661-673.

[123]. Peters M, A M Muller, S Rose-John. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: Direct stimulation of gp130 and hematopoiesis [J]. *Blood*, 1998, 92: 3495- 3504.

[124]. Wang Y, J E Nesbitt, N L Fuentes, et al. Molecular cloning and characterization of the rat liver IL-6 signal transducing molecule, gp130 [J]. *Genomics*, 1992, 14: 666-672.

[125]. Benigni F, G Fantuzzi, S Sacco, et al. Six different cytokines that share GP130 as a receptor subunit, induce serum amyloid A and potentiate the induction of interleukin-6 and the activation of the hypothalamus-pituitary-adrenalaxis by interleukin-1 [J]. *Blood*, 1996, 87: 1851-1854.

[126]. Cressman D E, L E Greenbaum, R A DeAngelis, et al. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6- deficient mice [J]. *Science*, 1996, 274: 1379- 1383.

[127]. Runge D, D M Runge, S D Drenning, et al. Growth and differentiation of rat hepatocytes: Changes in transcription factors HNF-3, HNF-4, STAT-3, and STAT-5 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 250: 762-768.

[128]. Runge D M, D Runge, H Foth, et al. STAT 1alpha/1beta, STAT 3 and STAT 5: Expression and association with c-MET and EGF-receptor in long-term cultures of human hepatocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 265: 376-381.

[129]. Matsumoto K, H Fujii, G Michalopoulos, et al. Human biliary epithelial cells secrete and respond to cytokines and hepatocyte growth factors in vitro: Interleukin-6, hepatocyte growth factor and epidermal growth factor promote DNA synthesis in vitro [J]. *Hepatology*, 1994, 20: 376-382.

[130]. Maione D, E Di Carlo, W Li, et al. Coexpression of IL-6 and soluble IL-6R causes nodular regenerative hyperplasia and adenomas of the liver [J]. *Embo*, 1998, J17: 5588- 5597.

[131]. Streetz K L, F Tacke, L Leifeld, et al. Interleukin 6/gp130-dependent pathways are protective during chronic liver diseases [J]. *Hepatology*, 2003, 38: 218-229.

[132]. Huang W, K Ma, J Zhang, et al. Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration [J]. *Science*, 2006, 312: 233-236.

[133]. Uppal H, S P Saini, A Moschetta, et al. Activation of LXRs prevents bile acid toxicity and cholestasis in female mice [J]. *Hepatology*, 2007, 45: 422-432.

[134]. Columbano A, M Simbula, M Pibiri, et al. Triiodothyronine stimulates hepatocyte proliferation in two models of impaired liver regeneration [J]. *Cell Prolif, 2008*, 41: 521-531.

[135]. Jang J H, A Rickenbacher, B Humar, et al. Serotonin protects mouse liver from cholestatic injury by decreasing bile salt pool after bile duct ligation [J]. *Hepatology*, 2012, 56: 209-18.

[136]. Lesurtel M, C Soll, B Humar, et al. Serotonin: A double-edged sword for the liver[J]. *Surgeon*, 2012, 10: 107-113.

[137]. Keitel V, D Haussinger. TGR5 in the biliary tree [J]. Dig Dis, 2011, 29: 45-47.

[138]. Yang J I, J H Yoon, S J Myung, et al. Bile acid-induced TGR5-dependent c-Jun-N terminal kinase activation leads to enhanced caspase 8 activation in hepatocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 361: 156-161.

[139]. Oben J A, A M Diehl. Sympathetic nervous system regulation of liver repair [J]. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2004, 280: 874-883.

[140]. Oben J A, T Roskams, S Yang, et al. Sympathetic nervous system inhibition increases hepatic progenitors and reduces liver injury [J]. *Hepatology*, 2003, 38: 664- 673.

[141]. Oben J A, T Roskams, S Yang, et al. Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters [J]. *Gut*, 2004, 53: 438-445.

[142]. Cruise J L, K A Houck, G K Michalopoulos. Induction of DNA synthesis in cultured rat hepatocytes through stimulation of alpha 1 adrenoreceptor by norepinephrine [J]. *Science*, 1985, 227: 749-751.

[143]. Demetris A J, E C Seaberg, A Wennerberg, et al. Ductular reaction after submassive necrosis in humans. Special emphasis on analysis of ductular hepatocytes [J]. *Am J Pathol*, 1996, 149: 439-448.

[144]. Cruise J L, S J Muga, Y S Lee, et al. Regulation of hepatocyte growth: Alpha-1 adrenergic receptor and ras p21 changes in liver regeneration [J]. *J Cell Physiol*, 1989, 140: 195-201.

[145]. Houck K A, J L Cruise, G Michalopoulos. Norepinephrine modulates the growth- inhibitory effect of transforming growth factor-beta in primary rat hepatocyte cultures [J]. *J Cell Physiol*, 1988, 135: 551-555.

[146]. Kanamaru C, H Yasuda, M Takeda, et al. Smad7 is induced by norepinephrine and protects rat hepatocytes from activin A-induced growth inhibition [J]. *JBiolChem*, 2001, 276: 45636-45641.

[147]. Houck K A, G K Michalopoulos. Altered responses of regenerating hepatocytes to norepinephrine and transforming growth factor type beta [J]. *J Cell Physiol*, 1989, 141: 503-509.

[148]. Lesurtel M, R Graf, B Aleil, et al. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration [J]. *Science*, 2006, 312: 104-107.

[149]. Furrer K, A Rickenbacher, Y Tian, et al. Serotonin reverts agerelated capillarization and failure of regeneration in the liver through a VEGF-dependent pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 2945-2950.

[150]. Matondo R B, C Punt, J Homberg, et al. Deletion of the serotonin transporter in rats disturbs serotonin homeostasis without impairing liver regeneration [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009, 296: G963-G968.

[151]. Marzioni M, S Glaser, H Francis, et al. Autocrine/paracrine regulation of the growth of the biliary tree by the neuroendocrine hormone serotonin [J]. *Gastroenterology*, 2005, 128: 121-137.

[152]. Omenetti A, L Yang, R R Gainetdinov, et al. Paracrine modulation of cholangiocyte serotonin synthesis orchestrates biliary remodeling in adults [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011, 300: G303-G315.

[153]. Yang S Q, H Z Lin, A K Mandal, et al. Disrupted signaling and inhibited regeneration in obese mice with fatty livers: Implications for nonalcoholic fatty liver disease pathophysiology [J]. *Hepatology*, 2001, 34: 694-706.

[154]. Leclercq I A, M Vansteenberghe, V B Lebrun, et al. Defective hepatic regeneration after partial hepatectomy in leptin-deficient mice is not rescued by exogenous leptin [J]. *Lab Invest*, 2006, 86: 1161-1171.

[155]. Michalopoulos G, H C Pitot. Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. Morphological and biochemical observations [J]. *Exp Cell Res*, 1975, 94: 70-78.

[156]. Thompson J S, K A Porter, N Hayashida, et al. Morphologic and biochemical changes in dogs after portacaval shunt plus bile fistula or ileal bypass: Failure of bile fistula or ileal bypass to prevent hepatocyte atrophy [J]. *Hepatology*, 1983, 3: 581-587.

[157]. DeAngelis R A, M M Markiewski, J D Lambris. Liver regeneration: A link to inflammation through complement [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2006, 586: 17-34.

[158]. Strey C W, M Markiewski, D Mastellos, et al. The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration [J]. *JExpMed*, 2003, 198: 913-923.

[159]. Tsonis P A, J D Lambris, K Del Rio-Tsonis. To regeneration... with complement [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2006, 586: 63-70.

[160]. DeAngelis R A, M M Markiewski, I Kourtzelis, et al. A complement-IL-4 regulatory circuit controls liver regeneration [J]. *JImmunol*, 2012, 188: 641-648.

[161]. Hussain S Z, T Sneddon, X Tan, et al. Wnt impacts growth and differentiation in ex vivo liver development [J]. *Exp Cell Res*, 2004, 292: 157-169.

[162]. Monga S P, H K Monga, X Tan, et al. beta-catenin antisense studies in embryonic liver cultures: Role in proliferation, apoptosis, and lineage specification [J]. *Gastroenterology*, 2003, 124: 202-216.

[163]. Nejak-Bowen K, S P Monga. Wnt/beta-catenin signaling in hepatic organogenesis [J]. *Organogenesis*, 2008, 4: 92-99.

[164]. Ober E A, H Verkade, H A Field, et al. Mesodermal Wnt2b signalling positively regulates liver specification [J]. *Nature*, 2006, 442: 688-691.

[165]. Zeng G, F Awan, W Otruba, et al. Wnt'er in liver: Expression of Wnt and frizzled genes in mouse [J]. *Hepatology*, 2007, 45: 195-204.

[166]. Sodhi D, A Micsenyi, W C Bowen, et al. Morpholino oligonucleotide-triggered beta-catenin knockdown compromises normal liver regeneration [J]. *J Hepatol*, 2005, 43: 132-141.

[167]. Nejak-Bowen K N, S P Monga. Beta-catenin signaling, liver regeneration and hepatocellular cancer: Sorting the good from the bad [J]. *Semin Cancer Biol*, 2011, 21: 44-58.

[168]. Tan X, U Apte, A Micsenyi, et al. Epidermal growth factor receptor: A novel target of the Wnt/beta-catenin pathway in liver [J]. *Gastroenterology*, 2005, 129: 285-302.

[169]. Chari R S, D T Price, S R Sue, et al. Down-regulation of transforming growth factor beta receptor type I, II, and III during liver regeneration [J]. *Am J Surg169*: 126- 131; discussion, 1995, 131-122.

[170]. Frank S, M Madlener, S Werner. Transforming growth factors beta1, beta2, and beta3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing [J]. *JBiolChem*, 1996, 271: 10188-10193.

[171]. Gruppuso P A, J E Mead, N Fausto. Transforming growth factor receptors in liver regeneration following partial hepatectomy in the rat [J]. *Cancer Res*, 1990, 50: 1464- 1469.

[172]. Jirtle R L, B I Carr, C D Scott. Modulation of insulin-like growth factor- II/mannose 6-phosphate receptors and transforming growth factor-beta 1 during liver regeneration [published erratum appears in J Biol Chem 1991 Dec 25; 266(36): 24860] [J]. *JBiolChem*, 1991, 266: 22444-22450.

[173]. Roberts A B, U I Heine, K C Flanders, et al. Transforming growth factor-beta. Major role in regulation of extracellular matrix [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1990, 580: 225- 232.

[174]. Sporn M B, A B Roberts. The transforming growth factor-betas: Past, present, and future [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1990, 593: 1-6.

[175]. Sporn M B, A B Roberts. Transforming growth factor-beta: Recent progress and new challenges [J]. *J Cell Biol*, 1992, 119: 1017-1021.

[176]. Sugano Y, K Matsuzaki, Y Tahashi, et al. Distortion of autocrine transforming growth factor beta signal accelerates malignant potential by enhancing cell growth as well as PAI-1 and VEGF production in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Oncogene*, 2003, 22: 2309-2321.

[177]. Ikeda H, S Nagoshi, A Ohno, et al. Activated rat stellate cells express c-met and respond to hepatocyte growth factor to enhance transforming growth factor beta1 expression and DNA synthesis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 250: 769-775.

[178]. Stolz D B, G K Michalopoulos. Synergistic enhancement of EGF, but not HGF, stimulated hepatocyte motility by TGF-beta 1 in vitro [J]. *J Cell Physiol*, 1997, 170: 57- 68.

[179]. Stolz D B, G K Michalopoulos. Differential modulation of hepatocyte growth factor-stimulated motility by transforming growth factor beta1 on rat liver epithelial cells in vitro [J]. *J Cell Physiol*, 1998, 175: 30-40.

[180]. Russell W E, R J Coffey, A J Ouellette, et al. Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988, 85: 5126-5130.

[181]. Sanderson N, V Factor, P Nagy, et al. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92: 2572-2576.

[182]. Oe S, E R Lemmer, E A Conner, et al. Intact signaling by transforming growth factor beta is not required for termination of liver regeneration in mice [J]. *Hepatology*, 2004, 40: 1098-1105.

[183]. Braun L, J E Mead, M Panzica, et al. Transforming growth factor beta mRNA increases during liver regeneration: A possible paracrine mechanism of growth regulation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988, 85: 1539-1543.

[184]. Michalopoulos G K, W C Bowen, K Mule, et al. HGF-, EGF-, and dexamethasone- induced gene expression patterns during formation of tissue in hepatic organoid cultures [J]. *Gene Expr*, 2003, 11: 55-75.

[185]. Michalopoulos G K, W C Bowen, K Mule, et al. Histological organization in hepatocyte organoid cultures [J]. *Am J Pathol*, 2001, 159: 1877-188.

[186]. Michalopoulos G K, M C DeFrances. Liver regeneration [J]. *Science*, 1997, 276: 60-66.

[187]. Dudas J, I Kovalszky, M Gallai, et al. Expression of decorin, transforming growth factor-beta 1, tissue inhibitor metalloproteinase 1 and 2, and type IV collagenases in chronic hepatitis [J]. *Am J Clin Pathol*, 2001, 115: 725-735.

[188]. Webb D J, D W Roadcap, A Dhakephalkar, et al. A 16-amino acid peptide from human alpha2-macroglobulin binds transforming growth factor-beta and platelet- derived growth factor-BB [J]. *Protein Science*, 2000, 9: 1986-1992.

[189]. Roberts A B, B K McCune, M B Sporn. TGF-beta: Regulation of extracellular matrix [J]. *Kidney Int*, 1992, 41: 557-559.

[190]. Holifield J S, A M Arlen, R B Runyan, et al. TGF-beta1, -beta2 and -beta3 cooperate to facilitate tubulogenesis in the explanted quail heart [J]. *JVascRes*, 2004, 41: 491-498.

[191]. Pepper M S, J D Vassalli, L Orci, et al. Biphasic effect of transforming growth factor-beta 1 on in vitro angiogenesis [J]. *Exp Cell Res*, 1993, 204: 356-363.

[192]. Thenappan A, V Shukla, F J Abdul Khalek, et al. Loss of transforming growth factor beta adaptor protein beta-2 spectrin leads to delayed liver regeneration in mice [J]. *Hepatology*, 2011, 53: 1641-1650.

[193]. Ichikawa T, Y Q Zhang, K Kogure, et al. Transforming growth factor beta and activin tonically inhibit DNA synthesis in the rat liver [J]. *Hepatology*, 2001, 34: 918- 925.

[194]. Houck K A, R Zarnegar, S J Muga, et al. Acidic fibroblast growth factor (HBGF-1) stimulates DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures [J]. *J Cell Physiol*, 1990, 143: 129-132.

[195]. Kan M, J S Huang, P E Mansson, et al. Heparin-binding growth factor type 1 (acidic fibroblast growth factor): A potential biphasic autocrine and paracrine regulator of hepatocyte regeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86: 7432-7436.

[196]. Yu C, F Wang, C Jin, et al. Role of fibroblast growth factor type 1 and 2 in carbon tetrachloride-induced hepatic injury and fibrogenesis [J]. *Am J Pathol*, 2003, 163: 1653- 1662.

[197]. Strain A J, G McGuinness, J S Rubin, et al. Keratinocyte growth factor and fibroblast growth factor action on DNA synthesis in rat and human hepatocytes: Modulation by heparin [J]. *Exp Cell Res*, 1994, 210: 253-259.

[198]. Luo Y, C Yang, W Lu, et al. Metabolic regulator betaKlotho interacts with fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) to induce apoptosis and inhibit tumor cell proliferation [J]. *The J Biol Chem*, 2010, 285: 30069-30078.

[199]. Russell W E. Growth hormone, somatomedins, and the liver [J]. *Semin Liver Dis*, 1985, 5: 46-58.

[200]. Moolten F L, N J Oakman, N L Bucher. Accelerated response of hepatic DNA synthesis to partial hepatectomy in rats pretreated with growth hormone or surgical stress [J]. *Cancer Res*, 1970, 30: 2353-2357.

[201]. Ekberg S, M Luther, T Nakamura, et al. Growth hormone promotes early initiation of hepatocyte growth factor gene expression in the liver of hypophysectomized rats after partial hepatectomy [J]. *J Endocrinol*, 1992, 135: 59-67.

[202]. Zerrad-Saadi A, M Lambert-Blot, C Mitchell, et al. GH receptor plays a major role in liver regeneration through the control of EGFR and ERK1/2 activation [J]. *Endocrinology*, 2011, 152: 2731-2741.

[203]. Jin J, G L Wang, X Shi, et al. The ageassociated decline of glycogen synthase kinase 3beta plays a critical role in the inhibition of liver regeneration [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29: 3867-3880.

[204]. Unterman T G, L S Phillips. Circulating somatomedin activity during hepatic regeneration [J]. *Endocrinology*, 1986, 119: 185-192.

[205]. Stocker E, W D Heine. [Proliferation and regeneration in liver and kidney of juvenile rats. Autoradiographic studies after continuous infusion of 3H-thymidine (author's transl)] [J]. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 1971, 55: 483-488.

[206]. Stocker E, W D Heine. Regeneration of liver parenchyma under normal and pathological conditions [J]. *Beitr Pathol*, 1971, 144: 400-408.

[207]. Stocker E, B Schultze, W D Heine, et al. [Growth and regeneration in parenchymatous organs of the rat. Autoradiographic investigations with 3 H-thymidin] [J]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 1972, 125: 306-331.

[208]. Schmucker D L, H Sanchez. Liver regeneration and aging: A current perspective [J]. *Curr Gerontol Geriatr Res*, 2011, 2011: 526379.

[209]. Wang L, X Wang, G Xie, et al. Liver sinusoidal endothelial cell progenitor cells promote liver regeneration in rats [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122: 1567-73.

[210]. Fausto N. Liver regeneration [J]. *J Hepatol*, 2000, 32: 19-31.

[211]. Kraizer Y, N Mawasi, J Seagal, et al. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin in liver regeneration [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 287: 209- 215.

[212]. Michalopoulos G K, M DeFrances. Liver regeneration [J]. *Adv Biochem Eng*, 2005, 93: 101-134.

[213]. Sato T, O N El-Assal, T Ono, et al. Sinusoidal endothelial cell proliferation and expression of angiopoietin/Tie family in regenerating rat liver [J]. *J Hepatol*, 2001, 34: 690-698.

[214]. Borkham-Kamphorst E, E Kovalenko, C R van Roeyen, et al. Platelet-derived growth factor isoform expression in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury [J]. *Lab Invest*, 2008, 88: 1090-1100.

[215]. Meng F, H Francis, S Glaser, et al. Role of stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor in remodeling during liver regeneration [J]. *Hepatology*, 2012, 55: 209-221.

[216]. Yoshida D, T Akahoshi, H Kawanaka, et al. Roles of vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase during revascularization and regeneration after partial hepatectomy in a rat model [J]. *Surg Today*, 2011, 41: 1622-1629.

[217]. Mollbrink A, P Holmstrom, M Sjostrom, et al. Iron-regulatory gene expression during liver regeneration [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2012, 47: 591-600.

[218]. Mullany L K, P White, E A Hanse, et al. Distinct proliferative and transcriptional effects of the D-type cyclins in vivo [J]. *Cell Cycle*, 2008, 7: 2215-2224.

[219]. Li J W, G P Wang, J Y Fan, et al. Eight paths of ERK1/2 signalling pathway regulating hepatocyte proliferation in rat liver regeneration [J]. *J Genet*, 2011, 90: 435- 442.

[220]. Cressman D E, L E Greenbaum, B A Haber, et al. Rapid activation of post- hepatectomy factor/nuclear factor kappa B in hepatocytes, a primary response in the regenerating liver [J]. *JBiolChem*, 1994, 269: 30429-30435.

[221]. Mohn K L, T M Laz, J C Hsu, et al. The immediate-early growth response in regenerating liver and insulin-stimulated H-35 cells: Comparison with serum-stimulated

3T3 cells and identification of 41 novel immediate-early genes [J]. *Mol Cell Biol*, 1991,11: 381-390.

[222]. Morello D, M J Fitzgerald, C Babinet, et al. c-myc, c-fos, and c-jun regulation in the regenerating livers of normal and H-2K/c-myc transgenic mice [J]. *Mol Cell Biol*, 1990, 10: 3185-3193.

[223]. Weir E, Q Chen, M C DeFrances, et al. Rapid induction of mRNAs for liver regeneration factor and insulin-like growth factor binding protein-1 in primary cultures of rat hepatocytes by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor [J]. *Hepatology*, 1994, 20: 955-960.

[224]. Chaveles I, A Zaravinos, I G Habeos, et al. MicroRNA profiling in murine liver after partial hepatectomy [J]. *IntJMolMed*, 2012, 29: 747-755.

[225]. Kirillova I, M Chaisson, N Fausto. Tumor necrosis factor induces DNA replication in hepatic cells through nuclear factor kappaB activation [J]. *Cell Growth Differ*, 1999, 10: 819-828.

[226]. Michalopoulos G K. Phenotypic fidelity (or not) ofepithelialcellsintheliver[J]. *Hepatology*, 2012, 55: 2024-7.

[227]. Chaisson M L, J T Brooling, W Ladiges, et al. Hepatocyte-specific inhibition of NF-kappaB leads to apoptosis after TNF treatment, but not after partial hepatectomy [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110: 193-202.

[228]. Fan S, M Gao, Q Meng, et al. Role of NF-kappaB signaling in hepatocyte growth factor/scatter factor-mediated cell protection [J]. *Oncogene*, 2005, 24: 1749-1766.

[229]. Maroni P, P Bendinelli, E Matteucci, et al. HGF induces CXCR4 and CXCL12- mediated tumor invasion through Ets1 and NF-kappaB [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28: 267-279.

[230]. Wang N D, M J Finegold, A Bradley, et al. Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice [J]. *Science*, 1995, 269: 1108-1112.

[231]. Greenbaum L E, D E Cressman, B A Haber, et al. Coexistence of C/EBP alpha, beta, growth-induced proteins and DNA synthesis in hepatocytes during liver regeneration. Implications for maintenance of the differentiated state during liver growth [J]. *J Clin Invest*, 1995, 96: 1351-1365.

[232]. Wang B, C Gao, K P Ponder. C/EBPbeta contributes to hepatocyte growth factor- induced replication of rodent hepatocytes [J]. *J Hepatol*, 2005, 43: 294-302.

[233]. Cressman D E, R H Diamond, R Taub. Rapid activation of the Stat3 transcription complex in liver regeneration [J]. *Hepatology*, 1995, 21: 1443-1449.

[234]. Taub R. Hepatoprotection via the IL-6/Stat3 pathway [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112: 978-980.

[235]. Han C, W C Bowen, G K Michalopoulos, et al. Alpha-1 adrenergic receptor transactivates signal transducer and activator of transcription- 3 (Stat3) through activation of Src and epidermal growth factor receptor (EGFR) in hepatocytes [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2008, 216(2): 486-497.

[236]. Li W, X Liang, C Kellendonk, et al. STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration [J]. *JBiol Chem*277: 28411-28417, 2002. Physiol, 2008, 216: 486-497

[237]. Cui Y, A Hosui, R Sun, et al. Loss of signal transducer and activator of transcription 5 leads to hepatosteatosis and impaired liver regeneration [J]. *Hepatology*, 2007, 46: 504-513.

[238]. Nalesnik M A, G Tseng, Y Ding, et al. Gene deletions and amplifications in human hepatocellular carcinomas: Correlation with hepatocyte growth regulation [J]. *Am J Pathol*, 2012, 180: 1495-508.

[239]. Albrecht J H, L K Hansen. Cyclin D1 promotes mitogen-independent cell cycle progression in hepatocytes [J]. *Cell Growth Differ*, 1999, 10: 397-404.

[240]. Nelsen C J, D G Rickheim, N A Timchenko, et al. Transient expression of cyclin D1 is sufficient to promote hepatocyte replication and liver growth in vivo [J]. *Cancer research*, 2001, 61: 8564-8568.

[241]. Sakamoto T, Z Liu, N Murase, et al. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy [J]. *Hepatology*, 1999, 29: 403- 411.

[242]. Hojilla C V, F F Mohammed, R Khokha. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development [J]. *Br J Cancer*, 2003, 89: 1817-1821.

[243]. Mohammed F F, C J Pennington, Z Kassiri, et al. Metalloproteinase inhibitor TIMP-1 affects hepatocyte cell cycle via HGF activation in murine liver regeneration [J]. *Hepatology*, 2005, 41: 857-867.

[244]. Mohammed F F, D S Smookler, S E Taylor, et al. Abnormal TNF activity in Timp3-/- mice leads to chronic hepatic inflammation and failure of liver regeneration [J]. *Nat Genet*, 2004, 36: 969-977.

[245]. Xu C, Y Yang, J Yang, et al. Analysis of the role of the integrin signaling pathway in hepatocytes during rat liver regeneration [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2012, 17(2): 274-288.

[246]. Gkretsi V, W C Bowen, Y Yang, et al. Integrin-linked kinase is involved in matrix- induced hepatocyte differentiation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 353: 638- 643.

[247]. Gkretsi V, U Apte, W M Mars, et al. Liver-specific ablation of integrin-linked kinase in mice results in abnormal histology, enhanced cell proliferation, and hepatomegaly [J]. *Hepatology*, 2008, 48: 1932-1941.

[248]. Rana B, D Mischoulon, Y Xie, et al. Cell-extracellular matrix interactions can regulate the switch between growth and differentiation in rat hepatocytes: Reciprocal expression of C/EBP alpha and immediate-early growth response transcription factors [J]. *Mol Cell Biol*, 1994, 14: 5858-5869.

[249]. Baghy K, R V Iozzo, I Kovalszky. Decorin-TGFbeta axis in hepatic fibrosis and cirrhosis [J]. *J Histochem Cytochem*, 2012, 60: 262-268.

[250]. Buraschi S, N Pal, N Tyler-Rubinstein, et al. Decorin antagonizes Met receptor activity and down-regulates {beta} -catenin and Myc levels [J]. *JBiolChem*, 2010, 285: 42075-42085.

[251]. Neill T, H Painter, S Buraschi, et al. Decorin antagonizes the angiogenic network: Concurrent inhibition of Met, hypoxia inducible factor 1alpha, vascular endothelial growth factor A, and induction of thrombospondin-1 and TIMP3 [J]. *JBiol Chem*, 2012, 287: 5492-5506.

[252]. Zhu J X, S Goldoni, G Bix, et al. Decorin evokes protracted internalization and degradation of the epidermal growth factor receptor via caveolar endocytosis [J]. *JBiolChem*, 2005, 280: 32468-32479.

[253]. Capurro M, J Filmus. Glypican-3 as a serum marker for hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res 65: 372; author reply*, 2005, 372-373.

[254]. Filmus J, M Capurro. Glypican-3 and alphafetoprotein as diagnostic tests for hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Diagn*, 2004, 8: 207-212.

[255]. Luo J H, B Ren, S Keryanov, et al. Transcriptomic and genomic analysis of human hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas [J]. *Hepatology*, 2006, 44: 1012-1024.

[256]. Pilia G, R M Hughes-Benzie, A MacKenzie, et al. Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome [J]. *Nat Genet*, 1996, 12: 241-247.

[257]. Liu B, S Paranjpe, W C Bowen, et al. Investigation of the role of glypican 3 in liver regeneration and hepatocyte proliferation [J]. *Am J Pathol*, 2009, 175: 717-724.

[258]. Beckett K, X Franch-Marro, J P Vincent. Glypican-mediated endocytosis of Hedgehog has opposite effects in flies and mice [J]. *Trends Cell Biol*, 2008, 18: 360-363.

[259]. Capurro M I, P Xu, W Shi, et al. Glypican-3 inhibits Hedgehog signaling during development by competing with patched for Hedgehog binding [J]. *Dev Cell*, 2008, 14: 700-711.

[260]. Kim M S, A M Saunders, B Y Hamaoka, et al. Structure of the protein core of the glypican Dally-like and localization of a region important for hedgehog signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 13112-13117.

[261]. Harris H J, M J Farquhar, C J Mee, et al. CD81 and claudin 1 coreceptor association: Role in hepatitis C virus entry [J]. *JVirol*, 2008, 82: 5007-5020.

[262]. Lin C W, W M Mars, S Paranjpe, et al. Hepatocyte proliferation and hepatomegaly induced by phenobarbital and 1, 4-bis [2-(3, 5-dichloropyridyloxy)] benzene is suppressed in hepatocyte-targeted glypican 3 transgenic mice [J]. *Hepatology*, 2011, 54: 620-630.

[263]. Liu B, A W Bell, S Paranjpe, et al. Suppression of liver regeneration and hepatocyte proliferation in hepatocyte-targeted glypican 3 transgenic mice [J]. *Hepatology*, 2010, 52: 1060-1067.

[264]. Anselmi K, D B Stolz, M Nalesnik, et al. Gliotoxin causes apoptosis and necrosis of rat Kupffer cells in vitro and in vivo in the absence of oxidative stress: Exacerbation by caspase and serine protease inhibition [J]. *J Hepatol*, 2007, 47: 103-113.

[265]. Friedman S L. Hepatic stellate cells: Protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver [J]. *Physiol Rev*, 2008, 88: 125-172.

[266]. Li D, S L Friedman. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: New insights and prospects for therapy [J]. *J Gastroenterol Hepato*, 1999, l14: 618-633.

[267]. Canbay A, P Taimr, N Torok, et al. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic [J]. *Lab Invest*, 2003, 83: 655-663.

[268]. DeCicco L A, L E Rikans, C G Tutor, et al. Serum and liver concentrations of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta following administration of carbon tetrachloride to male rats [J]. *Toxicol Lett*, 1998, 98: 115-121.

[269]. de Toranzo E G, M I Gomez, J A Castro. Carbon tetrachloride activation, lipid peroxidation and liver necrosis in different strains of mice [J]. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 1978, 19(2): 347-352.

[270]. Jaeschke H, M R McGill, C D Williams, et al. Current issues with acetaminophen hepatotoxicity-a clinically relevant model to test the efficacy of natural products [J]. *Life Sciences*, 2011, 88(17-18): 737-745.

[271]. Jaeschke H, C D Williams, A Farhood. No evidence for caspase-dependent apoptosis in acetaminophen hepatotoxicity [J]. *Hepatology*, 2011, 53: 718-719.

[272]. Jaeschke H, C D Williams, A Ramachandran, et al. Acetaminophen hepatotoxicity and repair: The role of sterile inflammation and innate immunity [J]. *Liver International*, 2012, 32(1): 8-20.

[273]. Hoehme S, M Brulport, A Bauer, et al. Prediction and validation of cell alignment along microvessels as order principle to restore tissue architecture in liver regeneration [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107: 10371-10376.

[274]. Lee J H, Z Ilic, S Sell. Cell kinetics of repair after allyl alcohol-induced liver necrosis in mice [J]. *International journal of experimental pathology*, 1996, 77(2): 63- 72.

[275]. Petersen B E, V F Zajac, G K Michalopoulos. Hepatic oval cell activation in response to injury following chemically induced periportal or pericentral damage in rats [J]. *Hepatology*, 1998, 27(4): 1030-1038.

[276]. Liu L, G R Yannam, Nishikawa T, et al. The microenvironment in hepatocyte regeneration and function in rats with advanced cirrhosis [J]. *Hepatology*, 2012, 55(5): 1529-1539.