

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.53.001 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

李铸, 陈娟, 李学华, 刘志恒, 刘桂杰, 张学利, 高延超, 孙会东, 纪丕友, 张金良, 李立. 应用 SRY 原位杂交技术检测肝脏干细胞移植肝内种植情况[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(53): 9881-9886.

## 应用SRY原位杂交技术检测肝脏干细胞移植肝内种植情况☆

李铸<sup>1</sup>, 陈娟<sup>1</sup>, 李学华<sup>1</sup>, 刘志恒<sup>1</sup>, 刘桂杰<sup>1</sup>, 张学利<sup>1</sup>, 高延超<sup>1</sup>, 孙会东<sup>1</sup>, 纪丕友<sup>1</sup>, 张金良<sup>1</sup>, 李立<sup>2</sup>

**文章亮点:** 应用雌雄性别交叉的方法, 将受体来源的肝脏干细胞在肝移植过程中种植到供体肝脏内, 移植后使用 Y 染色体原位杂交技术成功检测到种植在移植肝脏中的雄性肝脏干细胞及其分化细胞, 客观分析了干细胞在移植肝脏中的定位、分布、形态特征及细胞替代情况。

**关键词:** 肝移植; 大鼠; 肝脏干细胞; 细胞种植; SRY 原位杂交

### 摘要

**背景:** 以往干细胞种植后的定植示踪技术有磁探针标记、荧光示踪标记法、慢病毒感染荧光标记法及性别交叉 Y 染色体原位杂交检测法, 各有优缺点。

**目的:** 应用 SRY 原位杂交技术观察受体来源肝脏干细胞(肝卵圆细胞)在移植肝内的定植情况。

**方法:** 二袖套法建立大鼠原位肝移植模型。供体为雌性 DA 大鼠, 受体为雌性 Lewis 大鼠, 设受体大鼠 60 只, 肝卵圆细胞为 Lewis 大鼠来源的雄性细胞, 移植中供肝种植肝卵圆细胞悬液。应用 SRY 原位杂交染色技术观察受体来源的雄性肝卵圆细胞在雌性移植肝内的定植情况。

**结果与结论:** 经门静脉和肝动脉注射种植的肝卵圆细胞及其分化细胞主要定植在移植肝内中央静脉及汇管区周围, 应用 SRY 原位杂交染色技术可以有效观察到受体来源肝脏干细胞在移植肝内的定植情况。

### Y-chromosome *in situ* hybridization technology for detection of transplanted hepatic stem cells in the liver graft

Li Zhu<sup>1</sup>, Chen Juan<sup>1</sup>, Li Xue-hua<sup>1</sup>, Liu Zhi-heng<sup>1</sup>, Liu Gui-jie<sup>1</sup>, Zhang Xue-li<sup>1</sup>, Gao Yan-chao<sup>1</sup>, Sun Hui-dong<sup>1</sup>, Ji Pi-you<sup>1</sup>, Zhang Jin-liang<sup>1</sup>, Li Li<sup>2</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** The colonization tracer technology after stem cells transplantation includes magnetic probe labeling, fluorescent tracer method, lentivirus infections fluorescent labeling and Y chromosome *in situ* hybridization technology, and each method has its own disadvantages and advantages.

**OBJECTIVE:** To observe the transplantation conditions of hepatic stem cells (hepatic oval cells) in the liver graft by Y-chromosome *in situ* hybridization technology.

**METHODS:** Rat orthotopic liver transplantation models were established by using Kamada two-cuff technique. Female DA rats served as donors, and 60 female Lewis rats were used as recipients. Hepatic oval cells was originated from male Lewis rats and implanted to the liver graft during liver transplantation. Y-chromosome *in situ* hybridization technology was used to detect hepatic stem cells transplantation conditions in the liver graft.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Hepatic oval cells and differentiated cells mainly distributed around central vein area and portal area in the liver graft. The transplantation conditions of recipient derived hepatic stem cells in the liver graft were effectively detected by Y-chromosome *in situ* hybridization technology.

Li Z, Chen J, Li XH, Liu ZH, Liu GJ, Zhang XL, Gao YC, Sun HD, Ji PY, Zhang JL, Li L. Y-chromosome *in situ* hybridization technology for detection of transplanted hepatic stem cells in the liver graft. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(53): 9881-9886.

<sup>1</sup>聊城市人民医院 (泰山医学院附属聊城医院)肝胆外科, 山东省聊城市 252000; <sup>2</sup>昆明市第一人民医院 (昆明医学院附属甘美医院)肝胆胰一病区, 云南省昆明市 650011

李铸☆, 男, 1976 年生, 陕西省镇巴县人, 博士, 主治医师, 主要从事肝胆胰外科及肝移植的基础与临床的研究。  
llllzhu@126.com

通讯作者: 李立, 教授, 博士生导师, 昆明市第一人民医院 (昆明医学院附属甘美医院)肝胆胰一病区, 云南省昆明市 650011  
ynkmlili@yahoo.com.cn

中图分类号: R617  
文献标识码: A  
文章编号: 2095-4344 (2012)53-09881-06

收稿日期: 2012-04-06  
修回日期: 2012-06-12  
(20120406022/W · C)

<sup>1</sup>Department of Hepatobiliary Surgery, the People's Hospital of Liaocheng (Liaocheng Hospital Affiliated to Taishan Medical University), Liaocheng 252000, Shandong Province, China; <sup>2</sup>First Ward, Department of Hepatobiliary Surgery, the First People's Hospital of Kunming (Ganmei Hospital Affiliated to Kunming Medical University), Kunming 650011, Yunnan Province, China

Li Zhu<sup>\*</sup>, Doctor, Attending physician, Department of Hepatobiliary Surgery, the People's Hospital of Liaocheng (Liaocheng Hospital Affiliated to Taishan Medical University), Liaocheng 252000, Shandong Province, China  
lllzhu@126.com

Corresponding author: Li Li, Professor, Doctoral supervisor, First Ward, Department of Hepatobiliary Surgery, the First People's Hospital of Kunming (Ganmei Hospital Affiliated to Kunming Medical University), Kunming 650011, Yunnan Province, China  
ynkmlili@yahoo.com.cn

Received: 2012-04-06  
Accepted: 2012-06-12

## 0 引言

肝脏干细胞是体内存在的一种具有自我更新能力和多向分化潜能的成体干细胞,可分化为肝细胞及胆管上皮细胞等多种细胞,肝脏干细胞在肝内的表现形式为肝卵圆细胞,目前这个观点得到了普遍认可<sup>[1-3]</sup>。肝卵圆细胞的发现最早要追溯到1956年, Farber在研究大鼠肝细胞癌变机制时,观察到一类体积较小,核浆比例大,核呈卵圆形的细胞,将该类细胞命名为卵圆细胞<sup>[4]</sup>。近些年随着肝卵圆细胞增殖、分离及培养技术的不断成熟,细胞分子生物学的快速发展,肝卵圆细胞的研究在多方面取得了突破<sup>[5-7]</sup>,并且可以预见将会有越来越多的研究涉及到肝卵圆细胞。

应用干细胞治疗疾病是当前比较热门的研究方向<sup>[8-9]</sup>,研究已经证实,在受损的肝脏内种植干细胞,可以促进受损肝脏的肝细胞再生和肝脏修复,所涉及的干细胞多为骨髓间质干细胞、脐血造血干细胞等<sup>[10-12]</sup>,也有少量应用肝脏干细胞对受损肝脏种植的报道<sup>[13]</sup>,但肝脏干细胞应用到肝移植领域的研究报道少见<sup>[14-15]</sup>。

在干细胞种植的基础和临床研究中,最关键、最困难的问题是客观准确地追踪目的细胞在种植区域的定植、增殖及分化情况<sup>[16-17]</sup>。以往的示踪技术有磁探针标记、荧光示踪标记法、慢病毒感染荧光标记法及性别交叉Y染色体原位杂交检测法,前3种方法具有操作复杂、标记物衰减等缺点,只有性染色体具备长期稳定传代的优点,检测方法简单易行,可靠性高<sup>[16-17]</sup>。性别交叉方案可以详细阐述为:应用雄性细胞种植到雌性个体中,再应用Y染色体染色技术(sry原位杂交技术)明确鉴定出组织内种植后的雄性细胞,该项技术可以客观显示细胞种植后的组织内分布、分化情况<sup>[18]</sup>。实验拟将雄性受体来源的肝卵圆细胞种植到雌性的移植肝内,再应用SRY原位杂交技术检测肝脏干细胞移植肝内种植情况,为后续研究做好关键技术准备。

## 1 材料和方法

**设计:** 单一样本,重复测量实验。

**时间及地点:** 实验于2009年1月至2010年6月在昆明医学院口腔重点实验室完成。

**材料:**

**实验动物:** 健康、成年、SPF级雌性DA大鼠60只购于哈尔滨医科大学实验动物中心,体质量200-250 g。健康、成年、SPF级雌性Lewis大鼠60只购于北京维通利华实验动物公司,实验动物许可证号: SCXK(京)2007-001,体质量250-300 g。所有动物在层流动物室普通饲料喂养,室内温度波动于22-25 °C,在实验前12 h禁食,不禁水。实验过程中对动物的处置参照国家科学技术部2006年发布的《关于善待实验动物的指导性意见》<sup>[19]</sup>。

**细胞、药品、试剂及仪器:**

| 细胞、药品、试剂及仪器                        | 来源                      |
|------------------------------------|-------------------------|
| 雄性 Lewis 大鼠肝卵圆细胞                   | 由前期实验提供 <sup>[20]</sup> |
| 他克莫司胶囊(0.5 mg/1.0 mg)              | 日本藤泽药厂                  |
| 乙醚分析纯                              | 常熟杨圆化工有限公司              |
| 大鼠 SRY DNA 生物素标记 (POD)原位杂交双染色系统试剂盒 | 天津灏洋生物技术公司              |
| APIAS-1000 高清晰度彩色病理图文报告分析系统        | 深圳华海电子有限公司              |

**实验方法:**

**大鼠原位肝移植模型的建立:** 应用二袖套法建立大鼠原位肝移植模型<sup>[21]</sup>,供体为雌性DA大鼠,受体为雌性Lewis大鼠,设受体大鼠60只。肝移植中供肝经门静脉和肝动脉分别注射 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 肝卵圆细胞(第4-10代)悬液各1 mL<sup>[22]</sup>。受体大鼠均给予治疗剂量的他克莫司(0.05 mg/kg,灌胃,2次/d,连续8 d,移植前1d开始,移植后第8天开始每日半量减药,第13天停止给药<sup>[23]</sup>)。将受体鼠置于室温控制在24-27 °C的层流动物饲养间,单笼恒温饲养,注意保持笼舍清洁,垫料干燥。移植后1 h后即恢复自由饮食葡萄糖水,24 h后恢复进食,移植后当天肌注 $10^4 \text{ U}$ 青霉素,移植后不再给予静脉补液,除他克莫司外不使用其他药物。

**取材:** 移植后7, 14, 21, 28, 35及42 d按时点处死大鼠,经门静脉灌注体积分数10%中性甲醛液,至移植肝脏变成土黄色及质地变硬,获取移植肝脏肝组织 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ ,继续用体积分数10%中性甲醛液保存标本。各时点处死活力较强大鼠数量小于5只,在两时点间因

濒临死亡而处死大鼠所获取的标本计入后时点, 在靠后的时点(如术后35 d和42 d)若该组大鼠已全部死亡, 则按数据缺失处理, 不进行该时点统计学处理。

**基因组sry DNA Bio(POD)探针染色过程:** ①石蜡切片的复水, 梯度乙醇复水, 用纯水配制体积分数95%–80%–60%–30%的梯度乙醇(3–5 min/次)完成。②滴加3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>去离子水室温10 min; 滴加SRY试剂B(复合消化工作液), 覆盖组织表面, 37 °C 10 min, pH 7.8, 0.1 mol TBS, 洗3–5次, 洗涤5 min/次。③95–100 °C 0.1 mol (pH 8.9)TBS溶液孵育20 min, 迅速以0.1 mol冷TBS冲洗3次, 5 min/次, 0.2XSSC洗1次, 5 min/次, 0 °C洗涤。④滴加SRY试剂A(杂交工作液)覆盖组织37 °C湿盒孵育4–8 h。⑤杂交后的洗涤, 2Xssc 37 °C洗3次, 洗涤3 min/次, 0.2xssc 37 °C洗3次, 洗涤3 min/次, 0.1 mol pH 7.8 TBS 37 °C洗3–5次, 洗涤2 min/次。⑥滴加SRY试剂C (POD转化剂)覆盖组织, 37 °C 45 min, 0.01 mol PBS冲洗3次, 洗涤5 min/次。⑦SRY试剂F(DAB)显色, 光学显微镜下观察至细胞内胞浆阳性颜色与细胞外背景颜色对比度反差明显时蒸馏水洗终止反应(显色时间10–20 min), 细胞浆及细胞核显棕黄色颗粒为阳性反应。⑧苏木精复染。⑨体积分数80%、90%乙醇、无水乙醇及二甲苯脱水, 每步须3–5 min, 中性树胶封固保留。⑩200×视野下观察SRY染色阳性细胞, 并采图, 每张切片分区域随机采图10次, 计算SRY染色阳性细胞所占百分率。×100视野下观察SRY染色阳性细胞大致分布区域, ×400及×1 000视野下观察SRY染色阳性细胞形态特征、局部定位及其与周围细胞之间的关系。

**主要观察指标:** ①SRY阳性肝卵圆细胞种植后染色结果。②受体来源肝卵圆细胞在移植肝脏中的细胞替代结果。

## 2 结果

**2.1 实验动物数量分析** 实验选用受体大鼠60只, 实验过程中受体大鼠发生自发死亡6只, 进入结果分析54只。

**2.2 SRY阳性肝卵圆细胞种植后染色结果** SRY原位杂交染色可见阳性细胞为细胞核及细胞浆中有棕色颗粒出现, 染色阴性细胞胞浆、胞膜及细胞核均无棕染颗粒出现, 选取雌性大鼠卵巢组织和肝脏组织作阴性对照, 见图1, 2, 选取雄性Lewis大鼠肾脏作SRY染色阳性对照, 见图3。同时对雌性Lewis大鼠脾脏进行SRY阳

性肝卵圆细胞局灶注射, 1周后取脾脏组织行SRY染色见SRY阳性细胞形态不规则, 核大, 胞浆较少, 核浆比例大, 有局灶性增生的表现, 见图4。

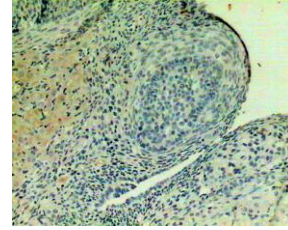


Figure 1 SRY staining of female Lewis rat ovary was negative (x100)  
图1 雌性 Lewis 大鼠卵巢 SRY 染色阴性(x100)

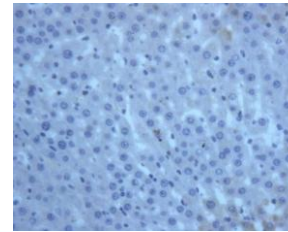


Figure 2 SRY staining of female Lewis rat liver was negative (x200)  
图2 雄性大鼠来源雌性 Lewis 大鼠肝脏 SRY 染色阴性 (x200)

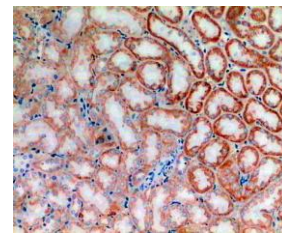


Figure 3 SRY staining of male Lewis rat kidney was positive (x100)  
图3 雄性 Lewis 大鼠肾脏 SRY 染色阳性(x100)

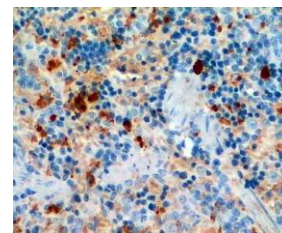


Figure 4 Male rat hepatic oval cells proliferated in female rat spleen (x200)  
图4 雄性大鼠来源肝卵圆细胞在雌性大鼠脾脏中的增殖 (x200)



SRY阳性肝卵圆细胞在肝移植时经门静脉和肝动脉注入移植肝内, 术后其在肝内定位和形态表现为:①主要围绕汇管区定植于汇管区周围的肝组织内, 尚不能排成规则的条索状, 也可见散在分布于肝小叶内, 但在中央静脉周围未发现大量的SRY阳性细胞定植, 部分SRY阳性细胞残留在肝血窦内, 已出现细胞凋亡或死亡, 未发现胆管上皮细胞中出现SRY阳性细胞, 见图5, 图6。②SRY阳性细胞在肝内的细胞形态以短梭形和椭圆形居多, 多边形较规则细胞数量较少, 核大, 核浆比较大, 处于分裂状态的细胞少见, 见图7。③SRY阳性细胞之间连接稍疏松, SRY阳性细胞及其相邻的SRY阳性细胞和SRY阴性细胞有变性坏死, 局部偶见炎细胞浸润, 见图8-10。

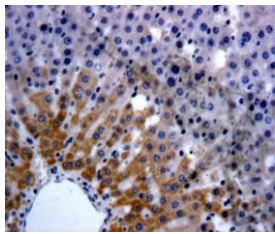


Figure 5 SRY positive cells distributed around central vein area at 21 d after male rat hepatic oval cells transplantation (x200)  
图 5 雄性大鼠来源肝卵圆细胞移植后 21d SRY 阳性细胞在中央静脉周围定植(x200)

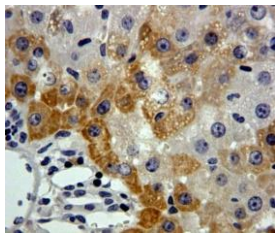


Figure 6 SRY positive cells distributed around portal area at 21 d after male rat hepatic oval cells transplantation (x400)  
图 6 雄性大鼠来源肝卵圆细胞移植后 21d SRY 阳性细胞在汇管区周围定植(x400)

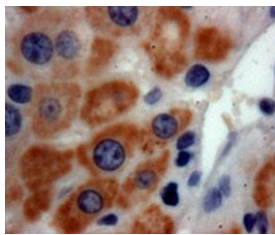


Figure 7 Morphology of SRY positive cells (x1 000)  
图 7 SRY 阳性细胞形态(x1 000)

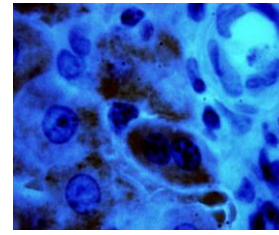


Figure 8 Intercellular junctions between SRY positive cells and SRY negative cells were relatively loose (x1 000)  
图 8 SRY 阳性细胞之间及其与周围阴性细胞间的连接较疏松(x1 000)

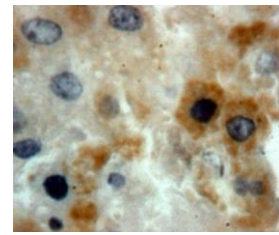


Figure 9 SRY positive cells showed degeneration and necrosis, while SRY negative cells did not show degeneration and necrosis (x1 000)  
图 9 SRY 阳性细胞有变性坏死, 其周围的 SRY 阴性细胞变性坏死不明显(x1 000)

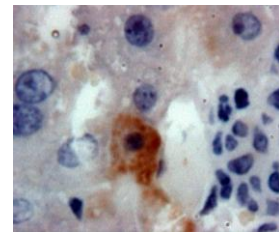


Figure 10 Inflammatory cells infiltrating could be seen around SRY positive cells after cell necrosis (x1 000)  
图 10 SRY 阳性细胞变性坏死后周围出现炎细胞浸润(x1000)

### 2.3 受体来源肝卵圆细胞在移植肝脏中的细胞替代结果 见表1。

表 1 移植后不同时段 SRY 阳性细胞比率  
Table 1 Ratio of SRY positive cells at different times after transplantation

| Time after transplantation (d) | Case number (n) | Positive rate ( $\bar{x} \pm s$ , %) |
|--------------------------------|-----------------|--------------------------------------|
| 7                              | 8               | 14.0 $\pm$ 3.7                       |
| 14                             | 10              | 18.1 $\pm$ 3.4                       |
| 21                             | 8               | 21.9 $\pm$ 3.7                       |
| 28                             | 11              | 29.0 $\pm$ 5.5                       |
| 35                             | 8               | 31.4 $\pm$ 5.9                       |
| 42                             | 9               | 30.6 $\pm$ 3.8                       |

实验在200×视野下随机计数实验组SRY阳性细胞占所计数细胞的比率, 获取各时点的均值, 统计结果见表1, 从移植后7 d开始至实验结束时点即移植后42 d, SRY阳性细胞所占百分率逐渐升高。至移植后35 d, SRY阳性细胞比率达到了(31.4±5.9)%, 至移植后42 d SRY阳性细胞替代率仍大于30%。

### 3 讨论

**3.1 SRY原位杂交染色技巧分析** 在雌性肝脏组织内找到SRY染色阳性的雄性细胞是本实验的关键环节, 要求熟练掌握SRY染色技术, 在实验中成功实施了SRY原位杂交染色技术, 经验体会如下: ①标本获取时不能按照常规的方法直接切取带血液的肝脏组织, 带血液的肝脏组织在做后期原位杂交时肝血窦汇管区内的红细胞会影响染色结果, 造成假阳性染色, 故在本实验中肝脏标本获取前经门静脉注射中性甲醛溶液, 驱除肝脏内的血液, 并保证肝脏内甲醛均匀分布, 有利于组织标本的较长时间保存。②原位杂交对石蜡切片厚度要求较高, 一般切片厚度应小于3 μm, 若切片厚度大于5 μm则易出现消化液对切片消化不完全, 杂交工作液及显色剂不能充分作用于重叠的细胞层, 后期观察阳性细胞计数不准确。③SRY原位杂交染色使用了DAB和苏木精复染, DAB显色为胞浆和细胞核内出现棕褐色染色颗粒, 而苏木精将阴性细胞染成蓝色, 两种颜色对比显色, 便于确认和计数SRY染色阳性细胞, 但要求严格观察DAB染色的程度, 若出现胞内与细胞外背景色对比明显时, 立即用蒸馏水终止染色, 否则将造成假阳性染色。④原位杂交染色属于基因组染色, 通常使用杂交液进行切片孵育, 要求严格控制孵育时间和温度。⑤原位杂交染色常用DAB染色和荧光标记染色两种, 由于荧光标记染色价格昂贵、操作复杂及荧光显色会随时间延长而消失, 本实验采用DAB显色, 操作类似于免疫组织化学染色, 价格较为低廉且可以长期有效显色, 便于切片长期保存。

**3.2 受体来源肝脏干细胞在移植肝内定植情况分析** 肝卵圆细胞作为肝脏起源的肝脏干细胞, 主要起源于Hering管(终末胆管和细胞间胆管的过度部位)或胆小管管壁的胚样细胞, 具有无限增殖及分化为成熟肝细胞和胆管上皮细胞的能力<sup>[24-25]</sup>。在前期实验中也证实肝卵圆细胞体外培养能过分为肝细胞和胆管上皮细胞<sup>[20]</sup>。在实验中, 经移植肝脏的肝动脉和门静脉注射肝卵圆细胞, 希望种子细胞能均匀分布于肝脏的门静脉系统和肝内动脉系统, 既分布到肝小叶又分布到毛细胆管周围,

对受损的肝细胞和胆管上皮细胞进行细胞替代修复。实验结果显示, 肝卵圆细胞经双途径进入肝脏后, 主要分布在汇管区和中央静脉周围, 在胆管上皮细胞间未发现染色阳性细胞, 肝卵圆细胞及其分化细胞不能进入肝内毛细胆管上皮层内可能跟毛细胆管的基底膜阻隔有关。

Lewis大鼠个体之间的基因差别很小, 属于同基因大鼠<sup>[26]</sup>, 应用受体来源的肝脏肝细胞对移植肝脏进行种植, 有助于干细胞在移植肝内增殖分化, 而不会受到受体对种子细胞的免疫攻击。实验过程中虽然建立了经典的大鼠肝移植急性排斥反应模型<sup>[27]</sup>(DA大鼠做供体, Lewis大鼠做受体), 但在围手术期对受体饲喂了治疗剂量的他克莫司, 抑制了受体对移植肝脏的急性排斥, 使术后大鼠能够顺利渡过围手术期, 便于种子细胞在环境稳定的移植肝脏内增殖和分化, 进一步发挥其干扰排斥和细胞替代的能力。

从实验结果可以看出, 肝脏干细胞及其分化细胞在移植肝内能够和异基因的移植肝脏肝细胞共存, 仅观察到细胞之间的间隙较为疏松, 种子细胞在肝小叶内也见散在分布, 未见明显破坏肝小叶的正常结构, 肝脏干细胞周围未出现异基因肝细胞的大片坏死。肝脏干细胞在移植肝内主要分布在汇管区和中央静脉周围, 并随着移植后时间的延长, 在这两个区域大量增殖分化(既有体积较小的肝卵圆细胞, 又有体积和形态与正常肝细胞类似的分化细胞), 从不同时间段的阳性细胞比率, 也可以看出肝卵圆细胞及其分化细胞在移植肝内持续增殖, 进行有效的细胞替代, 将异基因的肝脏进行同基因化, 阳性细胞分布的两个区域也正是急性排斥反应过程中的受体进行抗原识别及淋巴细胞浸润、免疫攻击的部位<sup>[28-29]</sup>, 大量的同基因细胞在该区域分布势必影响受体对异基因移植肝脏的抗原识别, 进而减轻排斥反应。

总之, 在本实验中应用SRY原位杂交染色技术成功地观察到受体来源的雄性肝脏干细胞在雌性移植肝脏内的定植分化情况, 为后期研究受体来源肝脏干细胞对移植肝脏的影响做好了关键技术准备。

### 4 参考文献

- [1] Sigal SH, Brill S, et al. The liver as a stem cell and lineage system. *Am J Physiol.* 1992;263(2 Pt 1):G139-148.
- [2] Fellous TG, Islam S, et al. Locating the stem cell niche and tracing hepatocyte lineages in human liver. *Hepatology.* 2009; 49(5):1655-1663.
- [3] Forbes S, Vig P, Poulsom R, et al. Hepatic stem cells. *J Pathol.* 2002 ;197(4):510-518.
- [4] Petersen BE. Hepatic: "stem" cells: coming full circle. *Blood cells Mol Dis.*2001; 27(3):590.

- [5] Li Y, Zhao LJ, Xia FZ, et al. Transdifferentiation of hepatic oval cells into pancreatic islet b-cells. *Front Biosci.* 2012;17:2391-2395.
- [6] Lee JH, Park HJ, Kim YA, et al. The phenotypic characteristic of liver-derived stem cells from adult human deceased donor liver. *Transplant Proc.* 2012;44(4):1110-1112.
- [7] Sanders JA, Brilliant KE, Clift D, et al. The inhibitory effect of rapamycin on the oval cell response and development of preneoplastic foci in the rat. *Exp Mol Pathol.* 2012;93(1):40-49.
- [8] Hu Y, Fu L. Targeting cancer stem cells: a new therapy to cure cancer patients. *Am J Cancer Res.* 2012;2(3):340-356.
- [9] Xu H, Qian H, Zhu W, et al. Mesenchymal stem cells relieve fibrosis of *Schistosoma japonicum*-induced mouse liver injury. *Exp Biol Med (Maywood).* 2012;237(5):585-592.
- [10] Soland MA, Bego MG, Colletti E, et al. Modulation of Human Mesenchymal Stem Cell Immunogenicity through Forced Expression of Human Cytomegalovirus US Proteins. *PLoS One.* 2012;7(5):e36163.
- [11] Larijani B, Esfahani EN, Amini P, et al. Stem cell therapy in treatment of different diseases. *Acta Med Iran.* 2012;50(2):79-96.
- [12] Jin SZ, Liu BR, Xu J, et al. Ex vivo-expanded bone marrow stem cells home to the liver and ameliorate functional recovery in a mouse model of acute hepatic injury. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2012;11(1):66-73.
- [13] Kisseleva T, Gigante E, Brenner DA. Recent advances in liver stem cell therapy. *Curr Opin Gastroenterol.* 2010;26(4):395-402.
- [14] Lin SZ, Chang YJ, Liu JW, et al. Transplantation of human Wharton's Jelly-derived stem cells alleviates chemically induced liver fibrosis in rats. *Cell Transplant.* 2010;19(11):1451-63.
- [15] Kakinuma S, Nakauchi H, Watanabe M. Hepatic stem/progenitor cells and stem-cell transplantation for the treatment of liver disease. *J Gastroenterol.* 2009;44(3):167-172.
- [16] Van Keymeulen A, Blanpain C. Tracing epithelial stem cells during development, homeostasis, and repair. *J Cell Biol.* 2012;197(5):575-584.
- [17] Pribluda A, Hanna JH. Tracing the genesis of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2012;30(3):247-249.
- [18] Xia X, Rasmussen T, Alvarez X, et al. Fluorescence in situ hybridization using an old world monkey Y chromosome specific probe combined with immunofluorescence staining on rhesus monkey tissues. *J Histochem Cytochem.* 2007;55(11):1115-1121.
- [19] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部.关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [20] Li Z, Li L, Ran JH, et al. *Zhongguo Xiandai Yixue Zazhi.* 2010;20(5):663-666,671. 李铸,李立,冉江华等. 大鼠肝卵圆细胞的增殖模型建立和体外分离培养、诱导分化研究[J].中国现代医学杂志, 2010;20(5):663-666,671.
- [21] Peng Y, Gong JP, Yan LN, et al. Improved two-cuff technique for orthotopic liver transplantation in rat. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2004;3(1):33-37.
- [22] Li Z, Li L, Ran JH, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2011;15(7):1179-1185. 李铸,李立,冉江华,等. DA至Lewis大鼠肝移植急性排斥反应模型的建立:技术改良分析[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011;15(7):1179-1185.
- [23] Li Z, Li L, Ran JH, et al. *Zhongguo Puwai Jichu yu Linchuang Zazhi.* 2010;17(12):1253-1257. 李铸,李立,冉江华,等. 他克莫司撤药诱发大鼠肝移植急性排斥反应的病理学观察与分析[J].中国普外基础与临床杂志,2010,17(12):1253-1257.
- [24] Shupe TD, Piscaglia AC, Oh SH, et al. Isolation and characterization of hepatic stem cells, or "oval cells," from rat livers. *Methods Mol Biol.* 2009;482:387-405.
- [25] Zhang W, Chen XP, Zhang WG, et al. Hepatic non-parenchymal cells and extracellular matrix participate in oval cell-mediated liver regeneration. *World J Gastroenterol.* 2009;15(5):552-560.
- [26] Callejo J, Vilaseca S, Medina M, et al. Inhibin and follicular development in heterotopic ovary transplants without vascular pedicle in syngeneic Lewis rats. *Fertil Steril.* 2003;79 Suppl 1:743-748.
- [27] Jing MS, Han DE. *Zhonghua Shiyao Waikexue Zazhi.* 2004;21(4):428-429. 姜明山,韩德恩.不同品系大鼠之间原位肝移植的实验观察[J].中华实验外科杂志,2004,21(4):428-429.
- [28] Kunugi S, Shimizu A, Ishii E, et al. The pathological characteristics of acute antibody-mediated rejection in DA-to-Lewis rat orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc.* 2011;43(7):2737-2740.
- [29] Ma Y, Wang GD, He XS, et al. Clinical and pathological analysis of acute rejection following orthotopic liver transplantation. *Chin Med J (Engl).* 2009;122(12):1400-1403.

#### 来自本文课题的更多信息--

**作者贡献:** 第一作者和通讯作者设计实验, 实施为第一、二作者及通讯作者, 实验评估为通讯作者和第三作者, 资料收集为第六至十作者, 第一作者成文, 通讯作者审校, 第一作者对文章负责。盲法评估。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

**文章概要:** 使用 Y 染色体原位杂交技术成功检测到种植在移植肝脏中的雄性肝脏干细胞及其分化细胞, 客观分析了肝脏干细胞在移植肝脏中的定位、分布、形态特征及细胞替代情况。

**作者声明:** 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。