

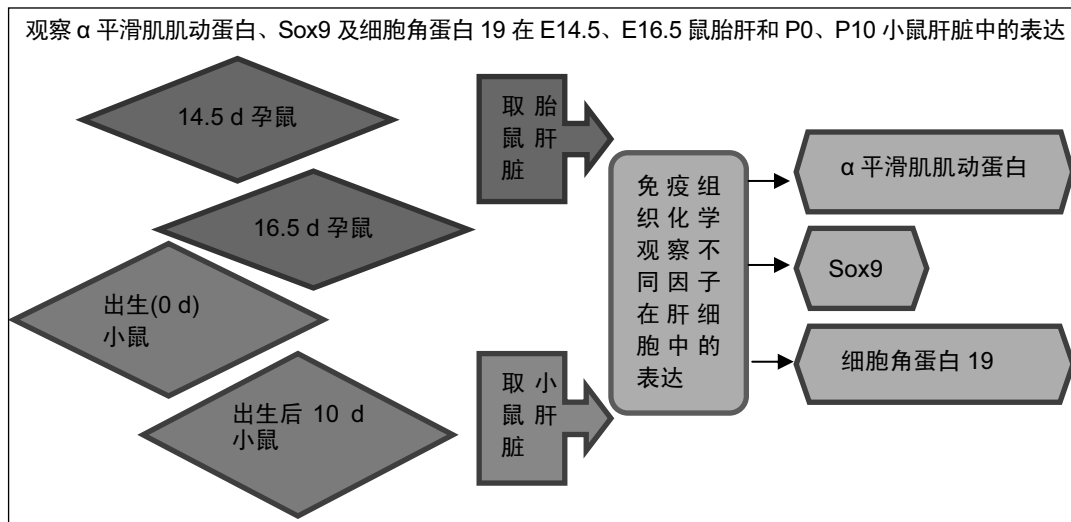
# 肌成纤维细胞在小鼠肝内胆管发育过程中的作用

杨均均<sup>1</sup>, 李德卫<sup>2</sup>, 王伟<sup>2</sup>, 冯渊<sup>1</sup> (<sup>1</sup>川北医学院第二临床学院·南充市中心医院感染科, 四川省南充市 637000; <sup>2</sup>重庆医科大学附属第一医院肝胆外科, 重庆市 400016)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1317

ORCID: 0000-0002-5282-0129(杨均均)

文章快速阅读:



杨均均, 女, 1985 年生, 湖南省绥宁县人, 苗族, 2012 年重庆医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事肝病及感染性疾病方面的研究。

通讯作者: 李德卫, 博士, 教授, 重庆医科大学附属第一医院肝胆外科, 重庆市 400016

文献标识码: B  
稿件接受: 2019-03-08



## 文题释义:

**细胞角蛋白 19(cytokeratin19, CK19):** 通常作为胆管细胞的标志, 在人类肝祖细胞中低表达, 但在鼠类肝祖细胞中不表达, 在胆管细胞分化早期检测细胞角蛋白 19 存在技术上的困难。

**肌成纤维细胞:** 是指含有肌动蛋白、肌球蛋白和其他肌肉蛋白的成纤维样细胞。收缩蛋白质排列成可具有收缩功能的形式。成纤维细胞及其表达的细胞因子是肿瘤组织重要的微环境成分, 在促进肿瘤的增殖、转移和新生血管形成方面起着非常重要的作用

## 摘要

**背景:** 研究表明肌成纤维细胞具有促进肝祖细胞分化为胆管细胞作用, 但对于肌成纤维细胞在体内胆管发育中作用仍不清楚。

**目的:** 观察小鼠肝内胆管发育的特点, 以及肌成纤维细胞在胆管发育过程中的作用。

**方法:** SPF 级 C57 小鼠购自重庆医科大学实验动物中心, 实验方案经重庆医科大学动物实验伦理委员会批准, 批准号为 2017-182。采用 14.5 d、16.5 d 孕鼠及刚出生(0 d)和出生后 10 d 的小鼠, 麻醉后取其胎鼠肝脏(E14.5、E16.5)和出生后小鼠肝脏(P0、P10), 采用免疫组织化学技术观察 α 平滑肌肌动蛋白、Sox9 及细胞角蛋白 19 在 E14.5、E16.5 小鼠胎肝和 P0、P10 小鼠肝脏中的表达。

**结果与结论:** ①E14.5 小鼠胎肝中, α 平滑肌肌动蛋白阳性肌成纤维细胞环绕门静脉周围, Sox9 阳性胆管细胞紧靠 α 平滑肌肌动蛋白阳性肌成纤维细胞, 并形成单层细胞排列的胆管板; ②E16.5 小鼠胎肝中, 紧靠 α 平滑肌肌动蛋白阳性肌成纤维细胞的细胞角蛋白 19 阳性胆管细胞形成双层胆管细胞结构; ③P0 小鼠肝脏中, 细胞角蛋白 19 阳性胆管细胞发育形成具有管腔的胆管结构, 并且 α 平滑肌肌动蛋白阳性肌成纤维细胞开始包绕胆管; ④P10 小鼠肝脏中, 胆管进一步发育扩张, 门静脉周围未形成胆管的胆管细胞开始消失。并且 α 平滑肌肌动蛋白阳性肌成纤维细胞环绕胆管, 胆管旁发育形成肝动脉; ⑤结果表明了小鼠肝内胆管发育的特点, 发现 α 平滑肌肌动蛋白阳性肌成纤维细胞与肝内胆管发育的关系密切, 且在肝内胆管发育中发挥了重要作用。

## 关键词:

肌成纤维细胞; 胆管; 发育; 肝脏; 小鼠; 细胞角蛋白 19; 国家自然科学基金

中图分类号: R446; R318

## 基金资助:

国家自然科学基金面上项目(81470898), 项目负责人: 李德卫

## 缩略语:

α 平滑肌肌动蛋白: α-smoothmuscle actin, α-SMA

Yang Junjun, Master, Attending physician, Department of Infections, the Second Clinical College of North Sichuan Medical College, Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000, Sichuan Province, China

Corresponding author: Li Dewei, MD, Professor, Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

## Role of myofibroblasts in the development of mouse intrahepatic bile ducts

Yang Junjun<sup>1</sup>, Li Dewei<sup>2</sup>, Wang Wei<sup>2</sup>, Feng Yuan<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Infections, the Second Clinical College of North Sichuan Medical College, Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000, Sichuan Province, China; <sup>2</sup>Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Existing evidence has shown that myofibroblasts can promote hepatic progenitor cells to differentiate into bile duct cells. But, the role of myofibroblasts in the development of bile duct in vivo remains unclear.

**OBJECTIVE:** To investigate the developmental features of intrahepatic bile duct in mice and role of myofibroblasts in the development of bile duct.

**METHODS:** C57 mice, SPF grade were proved by the Laboratory Animal Center of Chongqing Medical University, and the study was approved by the Ethics Committee of Experimental Animal Ethics of Chongqing Medical University, approval number: 2017-182. The mice in gestational day 14.5 and 16.5, postnatal 0 and 10 days (P0, P10) mice were selected. After anesthesia, the liver was removed from fetal mice of embryonic day 14.5 and 16.5 (E14.5, E16.5) and P0 and P10 mice. The expression levels of  $\alpha$  smooth muscle actin, Sox9 and cytokeratin 19 in liver were examined by immunocytochemical method.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) In the fetal liver of E14.5 mice, myofibroblasts positive for  $\alpha$  smooth muscle actin were main located around the portal vein, which was adjacent to the bile duct cells positive for Sox9, and single layered ring called ductal plate formed. (2) In the fetal liver of E16.5 mice, the ductal plate positive for cytokeratin 19, which neared the myofibroblasts positive for  $\alpha$  smooth muscle actin, became focally bilayered. (3) In the liver of P0 mice, the cholangiocytes positive for cytokeratin 19 formed bile ducts, which were surrounded by myofibroblasts positive for  $\alpha$  smooth muscle actin. (4) In the liver of P10 mice, the bile duct expanded further, and cholangiocytes that could not form bile duct surrounding the portal vein disappeared. The bile duct was encircled by myofibroblasts positive for  $\alpha$  smooth muscle actin, and a well-formed hepatic artery was found near the bile duct. (5) The developmental characteristics of intrahepatic bile ducts are systematic displayed. Myofibroblasts positive for  $\alpha$  smooth muscle actin are closely related to intrahepatic bile duct development, and play critical role.

**Key words:** myofibroblasts; bile duct; development; liver; mice; cytokeratin 19; the National Natural Science Foundation of China

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China (General Program), No. 81470898 (to LDW)

## 0 引言 Introduction

胆道系统是由肝内胆管和肝外胆管组成,负责运输肝脏分泌的胆汁至小肠。肝脏的发育起源于腹侧壁前肠末端内胚层,在胚胎发育到14-20体节期腹侧壁上皮细胞迅速增生向外突起形成肝芽,构成肝芽的这些细胞称之为肝祖细胞,是构成肝脏的主要原始细胞。多数胆管疾病是由于胆管发育异常所致。因此,胆管发育的研究越来越引起临床胆道医生的重视。了解胆道的正常发育,为临床胆道疾病的发生的机制及治疗有着非常重要的意义<sup>[1-2]</sup>。胎肝发育过程中,门静脉周围区域的胚胎肝祖细胞分化为胆管细胞,而远离门静脉区域的胚胎肝祖细胞分化为肝细胞<sup>[3-4]</sup>。研究表明门静脉周围间质细胞可分泌转化生长因子 $\beta$ 1、Jagged1等细胞因子,诱导胚胎肝祖细胞分化为胆管细胞<sup>[5-7]</sup>。Clotman等<sup>[5]</sup>发现门静脉区域转化生长因子 $\beta$ 信号高表达,而作者前期研究发现肌成纤维细胞主要围绕门静脉区域,并且证实转化生长因子 $\beta$ 信号调控门静脉周围间质细胞激活转化为肌成纤维细胞<sup>[8]</sup>。在胆管发育中,在胆管形成后门静脉间质细胞围绕胆管<sup>[9]</sup>。然而,门静脉周围间质细胞在胆管形成后围绕胆管的过程尚不清楚。因此,文章探索肌成纤维细胞在小鼠胆管发育过程中各个阶段的分布特点,以明确肌成纤维细胞在胆管发育中的作用。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 组织学实验观察。

1.2 时间及地点 实验于2016年11月至2017年4月在重

庆医科大学附属第一医院实验研究中心完成。

### 1.3 材料

1.3.1 实验动物 SPF级C57小鼠购自重庆医科大学实验动物中心,许可证号为:SCXK(渝)2012-0001。自由饮水和进食,雌雄按2:1合笼过夜,次日晨查,以雌鼠出现阴栓为受孕标志,以发现阴栓的当天上午计为孕0.5 d。采用14.5 d、16.5 d孕鼠及刚出生(0 d)和出生后10 d的小鼠,取其胎鼠肝脏(E14.5、E16.5)和出生后小鼠肝脏(P0、P10)作为实验材料。实验方案经重庆医科大学动物实验伦理委员会批准,批准号为2017-182。

1.3.2 实验用主要试剂和仪器 兔抗小鼠Sox9单克隆抗体(Merck Millipore公司);兔抗小鼠细胞角蛋白19(CK19)单克隆抗体(Abcam公司);Dylight 488标记的山羊抗兔IgG、Dylight 594标记的山羊抗小鼠IgG(美国Abbkine公司);冰冻切片机(Leica, Heidelberg, Germany);激光共聚焦荧光显微镜(Nikon, Tokyo, Japan)由重庆医科大学生命科学研究院提供;普通荧光显微镜(Olympus, Tokyo, Japan)由重庆医科大学实验研究中心提供。

### 1.4 实验方法

1.4.1 冰冻切片的制备 麻醉后分别解剖取出E14.5、E16.5胎肝和P0、P10小鼠肝脏,置于4 °C的杜氏磷酸缓冲液(DPBS)中冲洗2次,置于-80 °C冰箱保存。取出肝脏标本,用冰冻切片机制备10  $\mu$ m厚连续切片,置于-20 °C冰箱保存。

1.4.2 免疫荧光实验 免疫荧光检测E14.5、E16.5胎肝和P0、P10小鼠肝脏中 $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smoothmuscle

actin,  $\alpha$ -SMA)、Sox9和细胞角蛋白19的表达情况。冰冻切片标本用40 g/L多聚甲醛固10 min 4 °C, PBS洗3次, 0.4% Triton 透膜10 min, PBS洗2次, 10% BSA室温封闭1 h, 加 $\alpha$ -SMA、Sox9和细胞角蛋白19一抗, 4 °C过夜, PBS洗3次, 加入适量相应二抗, 室温孵育1 h, 避光操作。在荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察并收集图像。

1.5 主要观察指标 ①E14.5胎肝中胆管板的形成; ②E16.5胎肝中胆管板发育形成双层胆管细胞; ③P0肝脏中发育形成胆管及胆管发育扩张,  $\alpha$ -SMA+肌成纤维细胞包绕胆管。

## 2 结果 Results

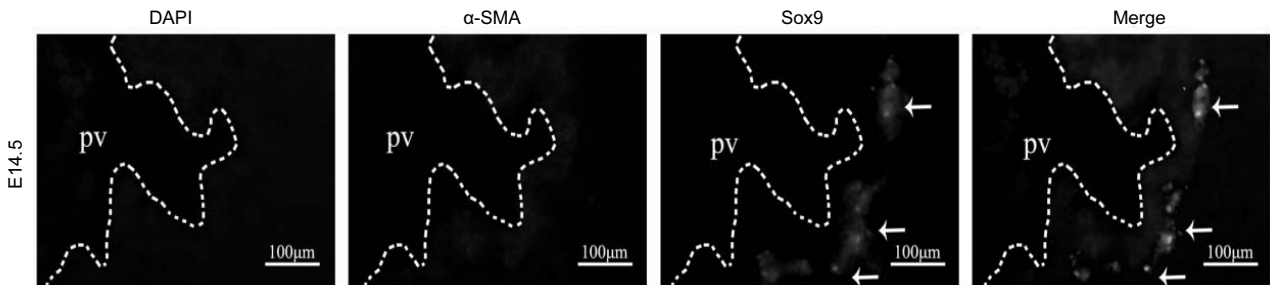
2.1 E14.5胎肝中胆管板的形成 胆管发育起始于一层排列的胆管细胞, 也称为胆管板<sup>[9]</sup>。E14.5胎肝的免疫荧光结果提示: Sox9<sup>+</sup>的胆管细胞主要表达在门静脉周围, 多个胆管细胞排列形成单层的胆管板。此外,  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>肌成纤维细胞环绕在门静脉周围, 胆管板紧靠 $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>肌成纤维细胞的外侧, 见图1。说明 $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>肌成纤维细胞可能诱导相邻的胚胎肝祖细胞分化为胆管细胞。

2.2 E16.5胎肝中胆管板发育形成双层胆管细胞 胆管板进一步发育形成双层胆管细胞结构<sup>[9]</sup>。在E16.5胎肝中,

紧邻 $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>肌成纤维细胞外侧出现双层结构的细胞角蛋白19阳性胆管细胞, 见图2。说明胆管板进一步发育形成双层胆管细胞。此阶段的 $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>肌成纤维细胞仍主要环绕门静脉, 与双层胆管细胞结构相邻。

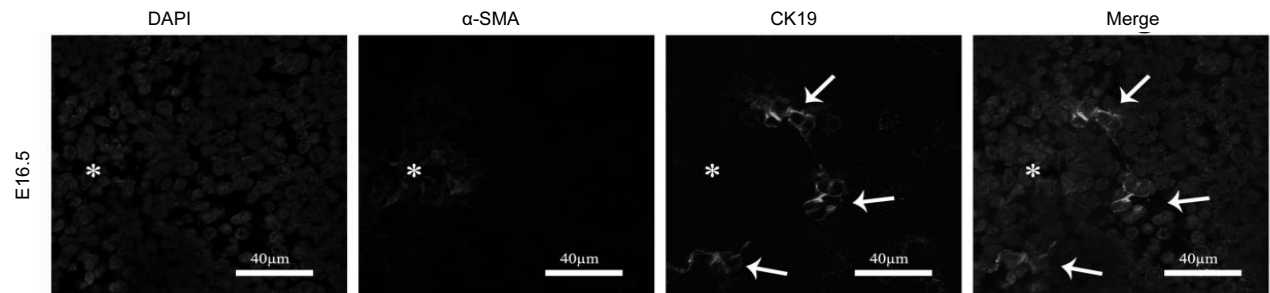
2.3 P0肝脏中发育形成胆管,  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>肌成纤维细胞开始包绕胆管 双层胆管细胞结构进一步发育形成具有官腔的胆管结构<sup>[9]</sup>。在P0肝脏中, 门静脉周围的细胞角蛋白19阳性胆管细胞形成管道, 说明胆管细胞进一步发育形成成熟的胆管(粗箭头)。此时期, 门静脉周围胆管的 $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>肌成纤维细胞开始包绕细胞角蛋白19阳性胆管(细箭头)。见图3。

2.4 P10肝脏中胆管发育扩张,  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>肌成纤维细胞围绕胆管 胆管结构在出生后重塑成成熟的胆管, 门静脉周围的间质细胞开始包绕胆管。在P10肝脏中, 门静脉周围形成规则圆形胆管, 管径变大, 胆管细胞形态变为柱状, 说明胆管发育进一步成熟。 $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>肌成纤维细胞进一步围绕胆管, 将胆管完全包围。值得注意的是, 门静脉周围未形成胆管的胆管细胞大部分消失, 残留少量胆管细胞在门静脉周围(细箭头), 残留细胞角蛋白19阳性胆管细胞同时表达 $\alpha$ -SMA, 见图4。说明胆管细胞可能向肌成纤维细胞转化。同时, 此期可见胆管周围发育出肝动脉, 肝动脉周围可见少量 $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>肌成纤维细胞。



图注: pv: 门静脉。Sox9<sup>+</sup>的胆管细胞主要表达在门静脉周围, 形成单层的胆管板(箭头所指);  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>肌成纤维细胞环绕在门静脉周围。  
图1 免疫荧光实验检测 $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)及Sox9在E14.5胎肝中的表达(标尺=100  $\mu$ m)

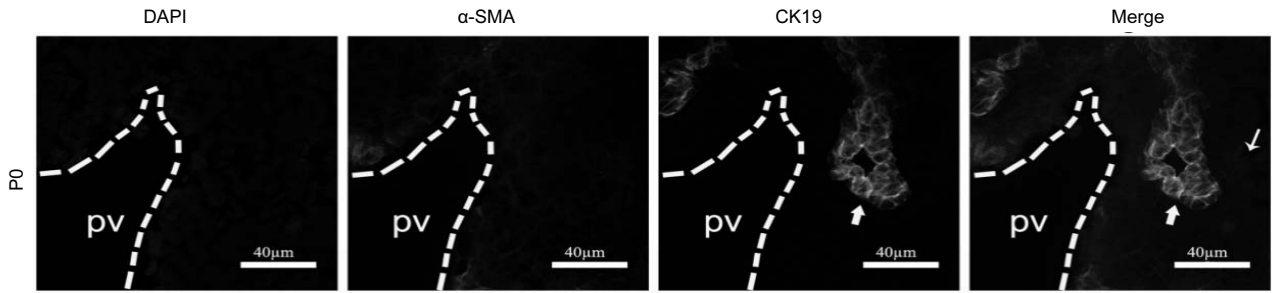
Figure 1 Expression of  $\alpha$  smooth muscle actin and Sox9 in liver of E14.5 mice examined by immunofluorescence (scale bar=100  $\mu$ m)



图注: \*: 门静脉。E16.5胎肝中, 紧邻 $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>肌成纤维细胞外侧出现双层结构的细胞角蛋白19<sup>+</sup>胆管细胞(箭头所指)。

图2 免疫荧光实验检测 $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)及细胞角蛋白19在E16.5胎肝中的表达(标尺=40  $\mu$ m)

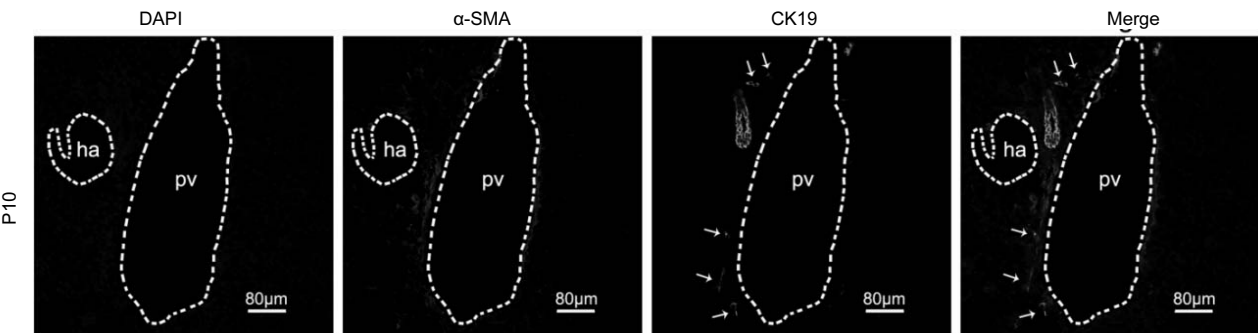
Figure 2 Expression of  $\alpha$  smooth muscle actin and cytokeratin 19 in liver of E16.5 mice examined by immunofluorescence (scale bar=40  $\mu$ m)



图注: pv: 门静脉。在 P0 肝脏中, 门静脉周围的细胞角蛋白 19 阳性胆管细胞形成管道(粗箭头); 门静脉周围胆管的  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>肌成纤维细胞开始包绕细胞角蛋白 19 阳性胆管(细箭头)。

图 3 免疫荧光实验检测  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)及细胞角蛋白 19 在 P0 胎肝中的表达(标尺=40  $\mu$ m)

Figure 3 Expression of  $\alpha$  smooth muscle actin and cytokeratin 19 in liver of P0 mice examined by immunofluorescence (scale bar=40  $\mu$ m)



图注: pv: 门静脉; ha: 肝动脉。 $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>肌成纤维细胞进一步围绕胆管, 门静脉周围未形成胆管的胆管细胞大部分消失, 残留少量胆管细胞在门静脉周围(细箭头)。

图 4 免疫荧光实验检测  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)及细胞角蛋白 19 在 P10 胎肝中的表达(标尺=80  $\mu$ m)

Figure 4 Expression of  $\alpha$  smooth muscle actin and cytokeratin 19 in liver of P10 mice examined by immunofluorescence (scale bar=80  $\mu$ m)

### 3 讨论 Discussion

实验从小鼠胎儿(E14.5)至出生后10 d(P10)的不同阶段时间点, 系统的探索肌成纤维细胞在肝内胆管发育各个阶段的特点。研究表明, 门脉周围的间质细胞对肝内胆管的发育成熟发挥重要作用<sup>[5-7]</sup>。然而, 门脉周围的具体哪种间质细胞对胆管发育发挥作用仍不清楚<sup>[10-11]</sup>。有体外共培养实验研究表明肌成纤维细胞具有促进肝祖细胞分化为胆管细胞作用<sup>[12]</sup>。但对于肌成纤维细胞在体内胆管发育中作用仍不清楚。

实验免疫荧光结果表明,  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>肌成纤维细胞在胆管发育形成时位于门脉周围, 紧靠Sox9<sup>+</sup>/CK19<sup>+</sup>胆管细胞。在P0肝脏中,  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>肌成纤维细胞开始包绕胆管, 在P10肝脏中,  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>肌成纤维细胞完全环绕胆管。因此, 以上结果说明 $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>肌成纤维细胞与胆管发育的关系密切。然而,  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>肌成纤维细胞包绕胆管的具体过程及机制仍不清楚。有学者提出胆管融入胆管周围间质细胞, 但具体过程不清楚<sup>[13]</sup>。实验结果表明, 在P0肝脏 $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>肌成纤维细胞开始包绕胆管, 在P10胎肝 $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>肌成纤维细胞重叠环绕胆管。研究表明肌成纤维细胞可分泌基质金属蛋白酶等, 说明 $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>肌成纤维细胞可能迁徙方式至胆管周围。近来研究发现胚胎肝祖细胞在一定条件下向肌成纤维细胞分化<sup>[14-15]</sup>, 提示胆管周围的肌成纤维细胞可能由胆管

细胞分化而来。在P10胎肝中可见未形成胆管的胆管细胞消失, 门静脉周围仅残留少量细胞角蛋白19弱阳性的胆管细胞。在P10肝脏中发现共表达 $\alpha$ -SMA及细胞角蛋白19的细胞, 说明胆管细胞可能发生上皮间质转化。未形成胆管的胆管细胞消失的过程及机制仍不清楚。但是, 门静脉周围仅残留少量的胆管细胞细胞角蛋白19表达为弱阳性, 并且同时表达 $\alpha$ -SMA, 说明未形成胆管的胆管细胞可能通过横向分化为肌成纤维细胞或细胞凋亡的形式消失<sup>[16-17]</sup>。

研究表明, 胆管发育不良也可导致肝动脉的发育畸形。胆管发育中, 胆管细胞分泌血管内皮生长因子、Ang1等生长因子, 促进肝动脉发育<sup>[18-19]</sup>。的确, 在P0肝脏中未见明显发育良好肝动脉。但在P10肝脏中可见胆管旁发育形成肝动脉, 肝动脉周围可见少量 $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>肌成纤维细胞围绕, 说明胆管发育先于肝动脉发育, 并且说明胆管具有促进肝动脉发育的作用。

综上所述, 文章系统的阐明了小鼠肝内胆管发育的特点, 发现 $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>肌成纤维细胞与肝内胆管发育的关系密切, 且在肝内胆管发育中发挥了重要作用。胆管细胞分化和胆管形成的调控因子以及调控机制近年来被不断地认识深入<sup>[20-21]</sup>, 各种细胞因子以及细胞间的相互作用在肝内胆管发育过程的重要作用也逐渐被挖掘出来<sup>[22-24]</sup>。胆道功能障碍将会导致肝内胆汁淤积, 最终造成肝功能损伤, 而许

多胆道疾病是由于肝内胆管发育异常所致,通过了解胆管发育特点及调控机制,将有利于对临床胆管疾病病因及治疗提供理论基础。但是由于肝内胆管的发育具有时空性,调控机制涉及广泛且复杂,因此,将胆管细胞分化和胆管形成的不同调控途径串联整合起来以及彻底研究细胞与细胞之间的相互作用,是下一步研究肝内胆管发育的一个重要方向。

**作者贡献:** 实验设计者为杨均均(第一作者),实验实施者为杨均均(第一作者)、王伟(第二作者),实验评估者为李德卫(通讯作者),资料收集为冯渊(第三作者),是盲法评估。

**经费支持:** 该文章接受了“国家自然科学基金面上项目(81470898)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验方案经重庆医科大学动物实验伦理委员会批准,批准号为 2017-182。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] Strazzabosco M, Fabris L. Development of the bile ducts: essentials for the clinical hepatologist. *J Hepatol*. 2012;56(5): 1159-1170.
- [2] De Assuncao TM, Jalan-Sakrikar N, Huebert RC. Regenerative medicine and the biliary tree. *Semin Liver Dis*. 2017;37(1): 17-27.
- [3] Boulter L, Lu WY, Forbes SJ. Differentiation of progenitors in the liver: a matter of local choice. *J Clin Invest*. 2013;123: 1867-1873.
- [4] Si-Tayeb K, Lemaigre FP, Duncan SA. Organogenesis and development of the liver. *Dev Cell*. 2010;18:175-189.
- [5] Clotman F, Jacquemin P, Plumb-Rudewiez N. Control of liver cell fate decision by a gradient of TGF $\beta$  signaling modulated by Onecut transcription factors. *Genes Dev*. 2005;19(16): 1849-1854.
- [6] Antoniou A, Raynaud P, Cordi S, et al. Intrahepatic bile ducts develop according to a new mode of tubulogenesis regulated by the transcription factor SOX9. *Gastroenterology*. 2009; 136(7):2325-2333.
- [7] Hofmann JJ, Zovein AC, Koh H, et al. Jagged1 in the portal vein mesenchyme regulates intrahepatic bile duct development: Insights into Alagille syndrome. *Development*. 2010;137(23): 4061-4072.
- [8] Wang W, Feng Y, Aimaiti Y. TGF $\beta$  signaling controls intrahepatic bile duct development may through regulating the Jagged1-NotchSox9 signaling axis. *J Cell Physiol*. 2018;233: 5780-5791.
- [9] Lemaigre FP. Development of the biliary tract. *Mech Dev*. 2003; 120(1):81-87.
- [10] Lemaigre FP. Notch signaling in bile duct development: new insights raise new questions. *Hepatology* 2008; 48(2): 358-360
- [11] Raynaud P, Carpentier R, Antoniou A, et al. Biliary differentiation and bile duct morphogenesis in development and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011;43(2):245-256.
- [12] Wang Y, Yao H, Cui C. Paracrine Signals from Mesenchymal Cell Populations govern Expansion and Differentiation of Human Hepatic Stem cells to Adult Liver Fates. *Hepatology*. 2010 Oct, 52(4):1443-1454.
- [13] Quondamatteo F, Knittel T, Mehde M, et al. Matrix metalloproteinases in early human liver development. *Histochem Cell Biol*. 1999; 112(4):277-282.
- [14] Pan XR, Jing YY, Liu WT, et al. Lipopolysaccharide induces the differentiation of hepatic progenitor cells into myofibroblasts via activation of the Hedgehog signaling pathway. *Cell Cycle*. 2017; 16(14):1357-1365.
- [15] Chen J, Li X, Hu Y, et al. Gypenosides Ameliorate Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis by Inhibiting the Differentiation of Hepatic Progenitor Cells into Myofibroblasts. *Am J Chin Med*. 2017;45(5):1061-1074.
- [16] Carpentier R, Suner RE, van Hul N, et al. Embryonic ductal plate cells give rise to cholangiocytes, periportal hepatocytes, and adult liver progenitor cells. *Gastroenterology*. 2011; 141(4): 1432-1438, 1438.e1-4.
- [17] Ober EA, Lemaigre FP. Development of the liver: Insights into organ and tissue morphogenesis. *J Hepatol*. 2018;68(5): 1049-1062.
- [18] Fabris L, Cadamuro M, Libbrecht L, et al. Angiogenic growth factors secreted by liver epithelial cells modulate arterial vasculogenesis during human liver development. *Hepatology*. 2008; 47(2):719-728.
- [19] Lemaigre FP. Mechanisms of liver development: concepts for understanding liver disorders and design of novel therapies. *Gastroenterology* 2009(1);137: 62-79.
- [20] Gerard C, Tys J, Lemaigre FP. Gene regulatory networks in differentiation and direct reprogramming of hepatic cells. *Semin Cell Dev Biol*. 2017;66:43-50.
- [21] Ogawa M, Ogawa S, Bear CE, et al. Directed differentiation of cholangiocytes from human pluripotent stem cell. *Nat Biotechnol*. 2015;33(8):853-861.
- [22] Kamiya A, Ito K, Yanagida A, et al. MEK-ERK Activity Regulates the Proliferative Activity of Fetal Hepatoblasts Through Accumulation of P16/19(cdkn2a). *Stem Cells Dev*. 2015;24(21):2525-2535.
- [23] Kaylan KB, Ermilova V, Yada RC. Combinatorial microenvironmental regulation of liver progenitor differentiation by Notch ligands, TGF $\beta$ , and extracellular matrix. *Sci Rep*. 2016;6:23490.
- [24] Lua I, Li Y, Zagory JA, et al. Characterization of hepatic stellate cells, portal fibroblasts, and mesothelial cells in normal and fibrotic livers. *J Hepatol*. 2016;64(5):1137-1146.