

单细胞测序分析小鼠肝卵圆细胞的分化

张峻华*, 范 涵, 董永新, 张 平, 毛建华, 陈奕明[#]

大理大学临床医学院, 云南 大理

收稿日期: 2024年4月15日; 录用日期: 2024年5月11日; 发布日期: 2024年5月15日

摘 要

目的: 探讨肝卵圆细胞HOCs分化为胆管上皮细胞的分化过程和分子机制, 肝卵圆细胞(Hepatic oval cells, HOCs)是肝脏中具有双向分化潜能的干细胞样细胞, 能够在肝脏严重损伤时分化为肝细胞和胆管上皮细胞以恢复肝脏。为系统性地明确HOCs在肝脏再生中的分化作用机制, 本研究由小鼠肝卵圆细胞培养诱导分化为胆管上皮细胞的高通量单细胞转录组测序揭示HOCs分化为胆管上皮细胞中特定状态的细胞亚群和调控分化的关键作用机制。方法: HOCs在体外条件下联合表皮生长因子、干细胞生长因子、白血病抑制因子的诱导方案培养细胞, 定向诱导分化为胆管上皮细胞。进行单细胞测序检测, 整合测序数据进行质量控制、PCA降维分析、细胞聚类分群和t-SNE。结果: 呈卵圆形、折光性强的HOCs诱导分化后细胞形态变为长梭形、铺路石样生长。单细胞测序数据的PCA降维分析将HOCs分化的细胞分为17个cluster, 由HOCs的特异性marker基因Twf1和胆管细胞特异性标记物Krt19在各个亚群中的表达量异同和细胞分化的clustertree重新将HOCs分为6个细胞亚群。结论: 由HOCs分化为胆管上皮细胞的单细胞测序数据鉴定出5种具有异质性的细胞类型, 分别为肝卵圆细胞1 (Hepatic Oval Cell 1)、前胆管细胞1 (Pre-Cholangiocytes 1)、前胆管细胞2 (Pre-Cholangiocytes 2)、前胆管细胞3 (Pre-Cholangiocytes 3)、肝卵圆细胞2 (Hepatic Oval Cell 2), 还有一群未能鉴定明确的细胞类型未知细胞(Unknown)。

关键词

肝卵圆细胞, 细胞分化, 单细胞测序

Single-Cell Sequencing Analysis of the Differentiation of Mouse Hepatic Oval Cells

Junhua Zhang*, Han Fan, Yongxin Dong, Ping Zhang, Jianhua Mao, Yiming Chen[#]

School of Clinical Medicine, Dali University, Dali Yunnan

Received: Apr. 15th, 2024; accepted: May 11th, 2024; published: May 15th, 2024

*第一作者。

[#]通讯作者。

Abstract

Objective: This study aims to investigate the differentiation process and molecular mechanisms of hepatic oval cells (HOCs) into bile duct epithelial cells. HOCs, known as hepatic oval cells, are stem cell-like cells in the liver with bidirectional differentiation potential, capable of differentiating into hepatocytes and bile duct epithelial cells to restore liver function under severe liver injury conditions. To systematically elucidate the differentiation mechanisms of HOCs in liver regeneration, this study utilizes high-throughput single-cell transcriptome sequencing of cultured mouse hepatic oval cells induced to differentiate into bile duct epithelial cells. The findings reveal specific cellular subpopulations and key regulatory mechanisms involved in the differentiation of HOCs into bile duct epithelial cells. **Methods:** Hepatic oval cells (HOCs) were cultured under in vitro conditions with a combination of epidermal growth factor, stem cell growth factor, and leukemia inhibitory factor to induce cell differentiation into bile duct epithelial cells. Single-cell sequencing was performed to detect cellular transcription profiles. Integrated sequencing data underwent quality control, principal component analysis (PCA) for dimensionality reduction, cell clustering, and t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) analysis. **Results:** Following induction, the morphology of HOCs changed from oval-shaped with strong birefringence to elongated spindle-shaped cells with cobblestone-like growth pattern. Principal component analysis (PCA) of single-cell sequencing data separated the differentiated cells into 17 clusters. Re-evaluation of HOCs differentiation using cluster tree analysis based on the expression levels of specific marker genes, such as *Twf1* for HOCs and *Krt19* for bile duct cells, resulted in the classification of HOCs into 6 distinct cellular subpopulations. **Conclusion:** Single-cell sequencing data identified five distinct heterogeneous cell types derived from the differentiation of HOCs into bile duct epithelial cells. These cell types were designated as Hepatic Oval Cell 1, Pre-Cholangiocytes 1, Pre-Cholangiocytes 2, Pre-Cholangiocytes 3, and Hepatic Oval Cell 2. Additionally, there was a group of cells that could not be definitively identified, labeled as “Unknown” cells.

Keywords

Hepatic Oval Cells, Cell Differentiation, Single-Cell Sequencing

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

肝卵圆细胞(Hepatic Oval Cells, HOCs)是肝脏中的一类特殊细胞亚群,具有双向分化潜能,也被称为是肝干细胞的子代,当肝细胞增殖受到抑制时可分化为肝细胞或胆管细胞[1] [2] [3]。哺乳动物的肝脏具有非凡的再生能力[4] [5]。肝脏具有“双层”再生系统,其中肝细胞在急性肝损伤时增殖、再生肝脏,但当肝细胞增殖受损时,肝祖细胞或卵圆细胞在慢性肝损伤期间协调再生过程[6] [7]。再生组织可能来源于肝细胞或肝祖细胞(Hepatic Progenitor Cells, HPCs)的自我复制,在啮齿类动物中也称为肝卵圆细胞(Hepatic Oval Cells, HOCs),也有研究认为肝细胞亚群和胆管细胞也是重要的来源细胞[8]。

目前,研究 HOCs 在肝脏再生中的分化机制成为了研究热点,明确 HOCs 的分化过程为终末期肝胆疾病病人进行再生肝脏治疗提供了可能。本文基于小鼠再生肝脏中提取的肝卵圆细胞定向培养诱导分化为胆管细胞,利用单细胞测序(Single Cell Sequencing, scRNA-seq)技术,在单个细胞水平上进行全面检测,

探索 HOCs 分化过程中细胞类型的转变化, 揭示肝脏再生过程中各细胞亚群的分化和增殖动态, 从而深入了解肝再生的机制。

2. 材料与方法

2.1. 材料

1) 小鼠再生肝脏中的肝卵圆细胞 HOCs 进行细胞培养和 SCF + EGF + LIF 联合诱导方案, 定向诱导分化为胆管上皮细胞[9], 并选取在细胞传代的中间代次 P4 的肝卵圆细胞制备成的单细胞悬液, 进行单细胞测序。

2) 使用 10 × Genomics Chromium Controller (10 × Genomics) 平台, 将准备好的单细胞悬液单个细胞与带有有形条码和引物的凝胶珠(Gel Beads)包裹在油滴中, 细胞裂解释放 mRNA 与引物结合产生 cDNA, 构建 cDNA 文库, 使用 Illumina Navaseq 6000 平台完成测序检测。原始测序下机的 fastq 数据采用 Cell Ranger7 进行分析, 整理数据分为记录每个细胞 cell barcode 标记的 barcodes.csv 文件; 记录每个基因 ID 和基因名的 features.csv 文件; 坐标格式存储基因表达量结果的 matrix.mtx (格物致和生物科技(北京)有限公司)。

2.2. 方法

2.2.1. 质控、数据过滤、标准化

本次针对 HOCs P4 细胞样本的单细胞测序数据采用 R 语言(4.3.1), 安装 Seurat 包(4.3.0.1)、clustree (0.5.0)、monocle (2.28.0)、GSVA (1.49.3)、GSEABase (1.62.0) R 包对单细胞测序数据进行读取和标准化校正。

根据矩阵创建 seurat 对象, 并过滤掉已经死亡的细胞、线粒体基因表达异常的或多个细胞相互结合的异常细胞, 具体过滤条件: 1) 线粒体基因 < 5%; 2) 每个基因 Feature 至少在三个细胞中表达, 每个细胞至少表达 200 个 feature。

2.2.2. HOCs 单细胞转录组 PCA 降维分析

绘制 PC 基因表达: 选取前 20 个 PC, 每个主成分包含 8 个基因, 分别绘制 PCA 基因热图。

2.2.3. 细胞聚类分群分析

通过 R 语言处理细胞数据: 根据选定的主成分和 clustertree 进行细胞分群。绘制各个细胞群的 marker 基因小提琴图

2.2.4. 注释细胞类型和可视化

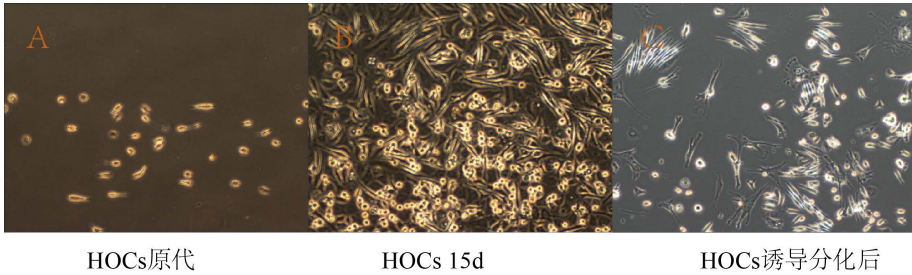
绘制 marker 基因的点阵图进行细胞群分类: 将定义分析的细胞亚群根据细胞特异性 marker 基因对细胞群进行注释, 并通过 t-SNE 降维可视化细胞亚群。

3. 结果

3.1. 肝卵圆细胞细胞形态变化

培养的原代 HOCs, 细胞增殖, 细胞数量大量增加, 细胞形态学上随着分化的进程逐渐演变。同时我们使用干细胞生长因子(SCF)、表皮生长因子(EGF)、白血病抑制因子(LIF)的联合方案, 定向诱导原代肝卵圆细胞发分化为胆管上皮细胞。细胞形态由原代的卵圆形, 细胞核折光很强, 呈现为光亮小圆点, 分化形成长梭形的细胞, 呈铺路石样生长, 胞质进一步扩大, 最后演变成多伪足, 细胞核折光性逐渐降低, 并同时逐渐失去了分化的能力[9]。

细胞形态变化结果如图 1，提取出 24 h 后的 HOC，呈卵圆形，细胞核折光性强，细胞数量稀少。培养 15 d 后，细胞不断增殖，聚集生长，细胞数目增加，经过诱导因子联合方案进行向胆管上皮细胞诱导分化后，HOC 细胞质逐渐呈梭形，并且围绕相邻的 HOCs 进行细胞增殖，可见长梭形细胞进一步增多，同一个近亲细胞增殖分裂出来的新生细胞聚集在一起，类似“铺路石”样生长。



注：A 为提取再生肝脏后的原代 HOCs，1 d、14 d 和诱导分化后的细胞形态学表现。A 提取 24 h 后的 HOCs，呈卵圆形，细胞核折光性强，细胞数量稀少。B 细胞质呈梭形，相邻 HOC 进行细胞增殖，细胞数量增加。C 诱导分化后的 HOCs，长梭形细胞进一步增多，新生细胞互相聚集，呈类似“铺路石”样生长。(×100)

Figure 1. Morphology of HOCs cell differentiation
图 1. HOCs 细胞分化的形态

3.2. HOCs 单细胞测序数据质量

本研究通过根据单细胞测序数据中的基因数、基因分子总数和线粒体基因数分别设置过滤阈值，过滤掉多个细胞相互结合细胞、空泡细胞，筛选基因表达大于 200 并小于 7500 的细胞、线粒体基因占比小于 5%的细胞(图 2)。

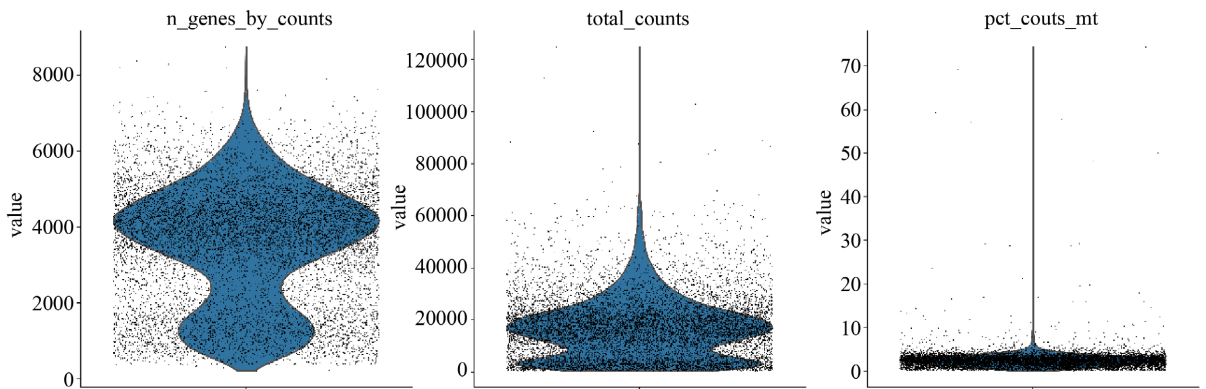


Figure 2. HOCs single-cell sequencing data: number of expressed genes per cell, total number of molecules per cell, percentage of mitochondrial genes

图 2. HOCs 单细胞测序数据：细胞表达基因数、基因分子总数、线粒体基因占比

3.3. PCA 降维分析

基于分析得到的基因表达量矩阵，在进行质控和筛选过滤异常细胞后，需要进一步对细胞聚类分群分析。首先需主成分分析(principal components analysis, PCA)对表达量数据进行降维处理，然后利用降维后的结果数据选择聚类分析[10]，使用 t-SNE (t-distributed Stochastic Neighbor Embedding)对 PCA 降维后的数据进行处理，并实现结果的可视化。

R 语言进行 PCA 降维分析，绘制前 20 个 PC 的基因热图。图 3 可见，前五个 PC 的数据基因表达量有明显差异，在第 17 个 PC 之后，变化不明显，故选择 17 个 PC，进行后续分析。

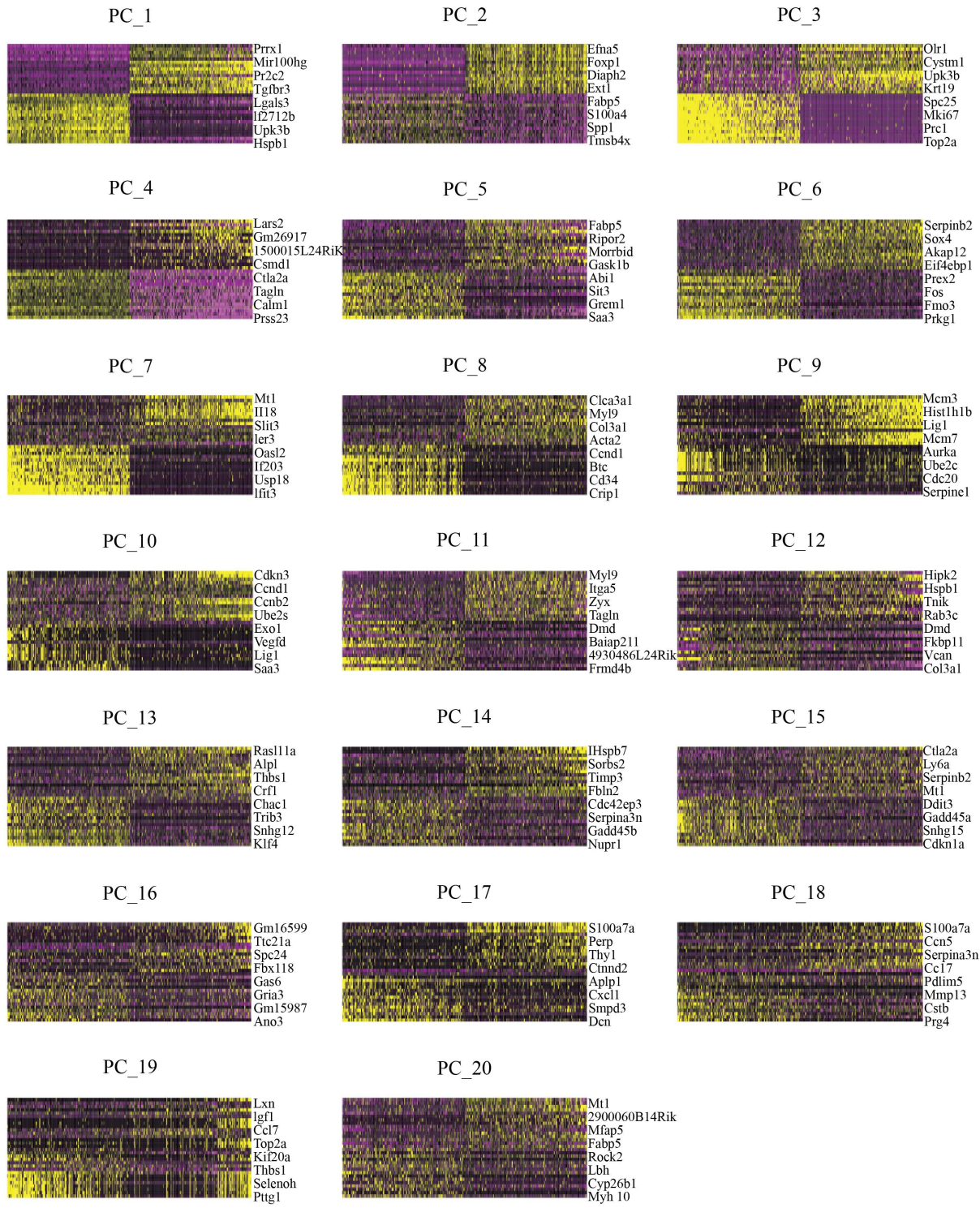


Figure 3. Heatmap of the top 20 principal component genes in HOCs single-cell sequencing data
图 3. HOCs 单细胞测序前 20 主成分基因热图

3.4. 细胞聚类分群分析

将确定的 17 个 PCA 设置为 dims,在通过不同的分辨率 clustertree 可视化细胞的分群情况,在分辨率为 1 时,一共分为 17 个 cluster, t-SNE 显示不同 cluster 的相对位置进行可视化(图 4)。由 17 个细胞亚群各自上调的前 10 个最具显著性的基因热图(图 5),结合肝卵圆细胞特异性 marker 基因 A6 (Twf1)、Tfrc、Pkm 和胆管上皮细胞的特异性 marker 基因 Krt19、Krt18 在细胞亚群中基因表达量的小提琴(图 6),发现 cluster0、1、2、3、6, cluster4、5、10, cluster9、13、14, Cluster7、8、11, cluster15、16 各自前 10 基因在细胞亚群间互相表达,具有相似性;结合 clustertree 向上追溯到分辨率为 0.1 时,提示它们能够分别共同聚类为同一类细胞(图 7)。最后将 17 个 cluster 聚类为 cluster0、1、2、3、6, cluster7、8、11, cluster4、5、10, cluster9、13、14, cluster12, cluster15、16 这 6 个细胞亚群。

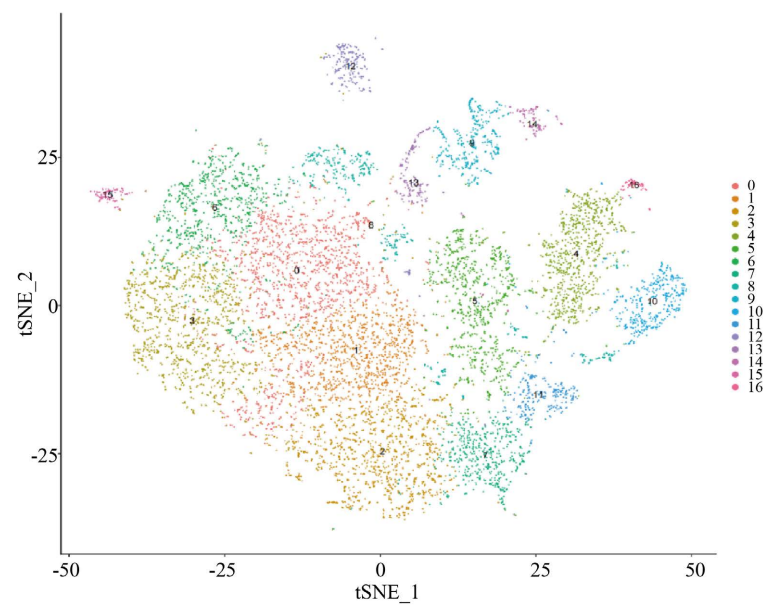


Figure 4. Cell t-SNE clustering plot
图 4. 细胞 t-SNE 聚类图

3.5. marker 基因细胞注释

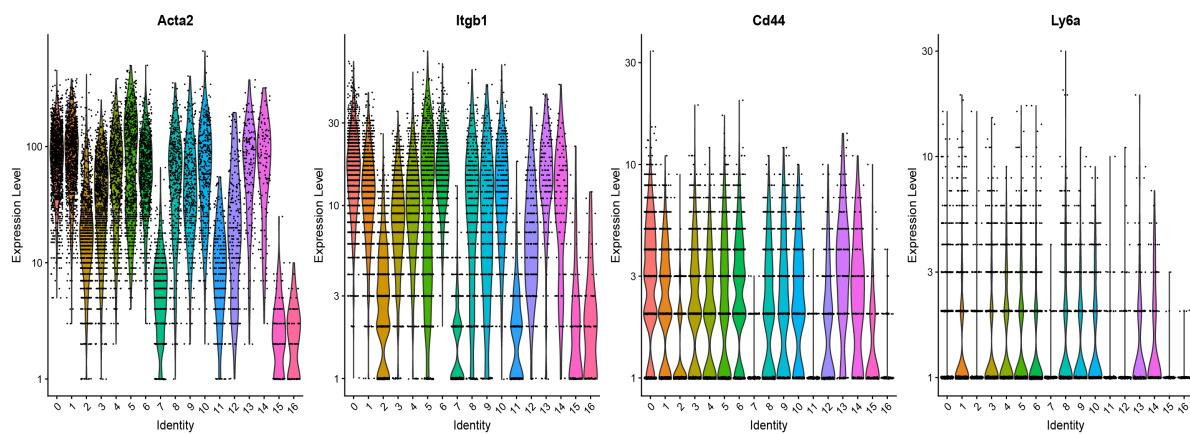
结合相关文献和 Cellmarker2.0 数据库(<http://117.50.127.228/CellMarker/>)利用 R 语言小提琴图可视化 marker 基因的表达量(图 8),基本所有细胞亚群都表达代表干细胞特性的 marker 基因 Itgb1、Cd44、Ly6a 而不表达肝细胞的代表基因 Alb、Afp,高表达肝卵圆细胞特异性 marker 基因的 Twf1、Tfrc、Pkm 注释为 Hepatic Oval Cell 1、Hepatic Oval Cell 2;高表达胆管上皮细胞的特异性 marker 基因的 Krt19、Krt18,但是低表达成熟胆管上皮细胞分泌胆汁的相关基因 Ass1、Asl、Cps1,注释为胆管上皮细胞的过渡态细胞 Cholangiocytes 1、Cholangiocytes 2、Cholangiocytes 3,其中 Cholangiocytes 3 同时高表达代表增殖状态的基因 Top2a、Pcna、Mki67;最后的 cluster15、16 部分细胞高表达干细胞特性基因,但又不具有肝卵圆细胞 marker 基因,暂时标注为 Unknown。

在研究细胞发育类的单细胞数据集中,细胞并不会直接分成相互离散的细胞簇,而是遵循连续的轨迹,因此可以在对单细胞数据的降维可视化图中可以展示出来,经过分析,还可以推断出每个簇中的关键标记基因[11]。将细胞数据注释后的结果采用非线性降维 t-SNE 可视化(图 9),分为 Hepatic Oval Cell 1、Pre-Cholangiocytes 1、Pre-Cholangiocytes 2、Pre-Cholangiocytes 3、Hepatic Oval Cell 2、Unknow 6 个细胞亚



Figure 5. Heatmap of the top 10 significant genes for each cell subtype

图 5. 各个细胞亚群前 10 个显著性基因热图



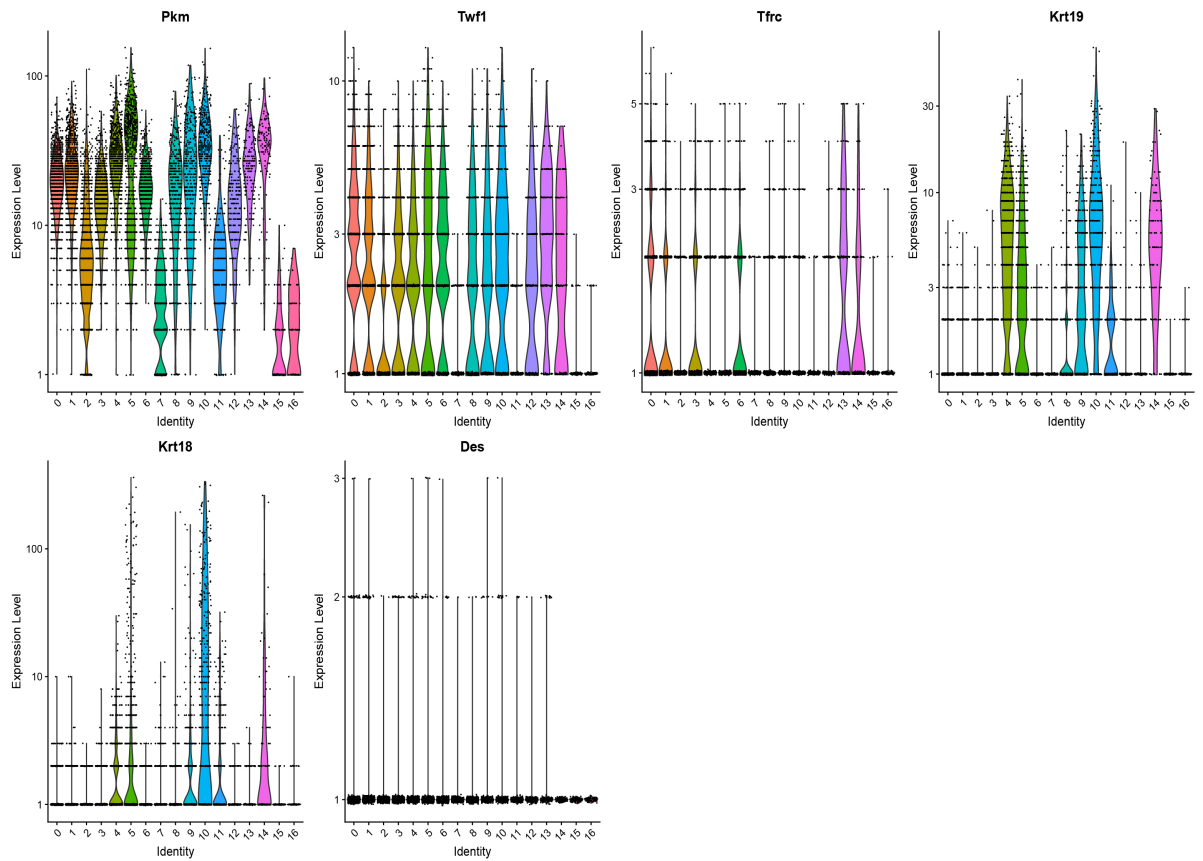


Figure 6. Violin plot of cell marker gene expression levels
图 6. 细胞 marker 基因表达量的小提琴图

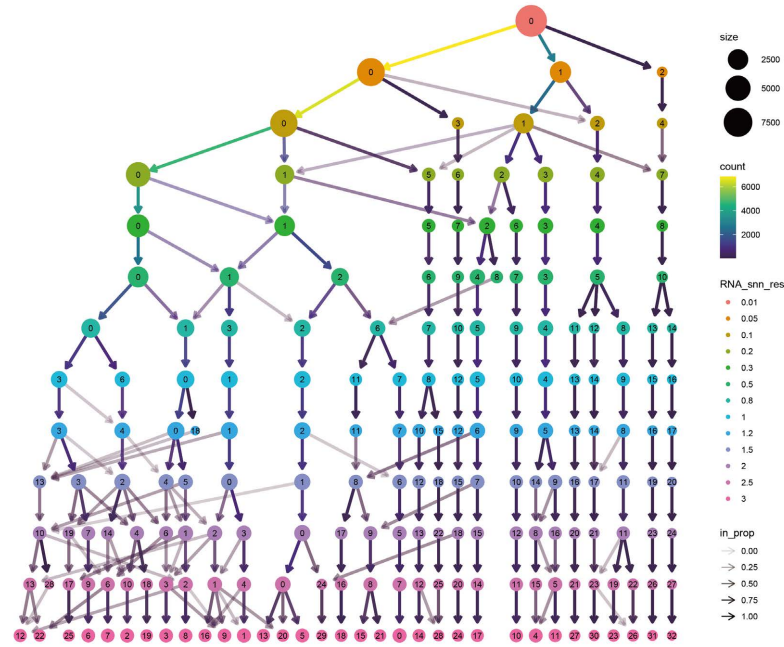


Figure 7. Clustertree plot of HOCs cell differentiation
图 7. HOCs 细胞分化 clustertree 图

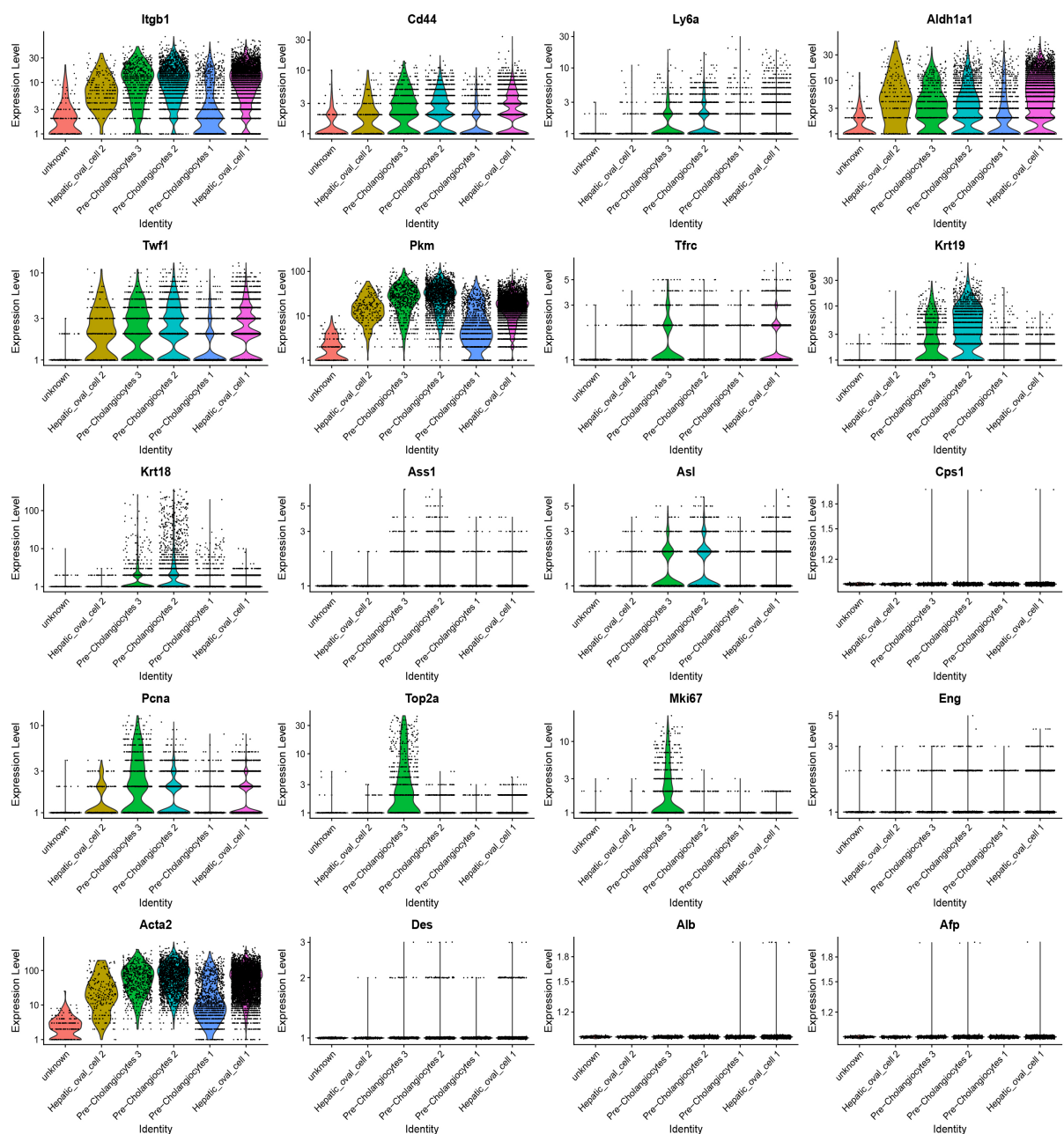


Figure 8. Violin plot of marker gene expression levels after cell annotation
图 8. 细胞注释后 marker 基因表达量的小提琴图

群。随着 HOCs 的逐渐分化,在图上也可以发现,Hepatic Oval Cell 1、Pre-Cholangiocytes 1、Pre-Cholangiocytes 2、Pre-Cholangiocytes 3 各个亚群之间的相对位置也具有连续性,也一定程度上验证了我们 HOCs 在 SCF、EGF、LIF 方案下被定向诱导分化为胆管上皮细胞是一个连续性的过程。

4. 讨论

肝胆疾病是全世界成人因疾病死亡的主要原因之一,尽管器官移植是最有效的治疗方式,但严重受限于供体肝脏来源数量[12]。肝脏是唯一具有再生能力的器官,可以通过再生维持肝脏体重比,进而维持

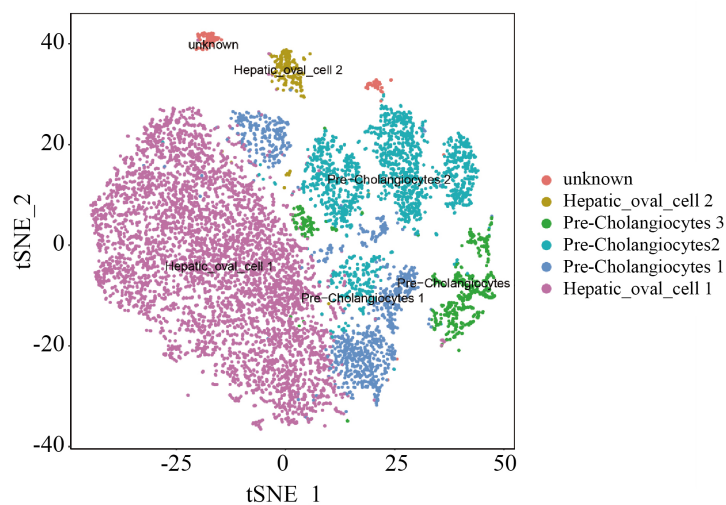


Figure 9. t-SNE visualization of clustering analysis after cell annotation
图 9. 细胞注释后聚类分析 t-SNE 可视化

集体稳态[13]。再生潜能主要是来源于肝脏中的分化的上皮细胞、肝细胞、胆管上皮细胞在损伤后能够进行增殖修复的能力[14]。对于肝脏再生的研究是应对移植器官来源不足，对终末期肝胆疾病治疗中最有潜力的治疗方式[12] [15]。

在过往对影响肝脏再生的各种因素进行的研究中，试图寻找肝脏中是否存在肝干细胞，期待以肝干细胞的细胞疗法治疗终末期肝胆疾病，解决肝脏供体不足的问题。然而目前对肝脏中是否存在肝干细胞还没有明确的结论，仅发现肝脏中有一群位于连接肝细胞管系统和胆道树的 *hering* 管附近，呈椭圆形、高核浆比的特殊亚群细胞 HOCs，具有双向潜能，可以分化为肝细胞和胆管上皮细胞[1] [2] [16]。本次研究对 HOCs 的单细胞测序，与以往对 HOCs 的研究仅仅停留在细胞形态学和表面标记物水平上不同[17] [18]，本研究进一步通过单细胞测序技术在 RNA 水平上对 HOCs 分化细胞进行分类，系统而全面地阐述 HOCs 的分化潜能和分化的相关作用机制。

通过对 HOCs P4 代次的单细胞测序结果进行整合细胞聚类分析，在对相关文献和各类细胞的经典标记物的鉴定后，我们解析了在分化过程中不同的细胞亚群及其分化状态。在对各个细胞亚群的相关 marker 基因可视化后进行细胞定义，几乎大部分亚群都有表达了在正常干细胞和癌症干细胞中的标记物 *Cd44* [19]、*Itgb1*、干细胞标记物 *Sca-1* (*Ly6a*)，表明我们提取并培养的基本都具有一定的干细胞特性，肝卵圆细胞 1 (Hepatic Oval Cell 1)、肝卵圆细胞 2 (Hepatic Oval Cell 2) 群细胞表达 HOCs 特异性标记物基因 *A6* (*Twf1*)、*Tfrc*、*Pkm*，而在前胆管细胞 1 (Pre-Cholangiocytes 1)、前胆管细胞 2 (Pre-Cholangiocytes 2)、前胆管细胞 3 (Pre-Cholangiocytes 3) 细胞群中表达胆管上皮细胞的标记物 *CK19* (*krt19*)、*CK18* (*Krt18*)，同时 *Pre-Cholangiocytes 3* 还高表达了代表增殖中的相关基因 *Pcna*、*Top2a*、*Mki67*，但是在各个细胞亚群中几乎不表达代表成熟胆管细胞能够分泌胆汁的相关基因 *Ass1*、*Asl* [20]，因此不能够将表达 *CK19* 的称为胆管上皮细胞，其本质上属于胆管上皮细胞的前体细胞，是 HOCs 分化过程中的过渡态细胞。本研究中的这一发现也与目前大多数肝再生的单细胞研究存在差异，不能仅根据细胞表达 *CK19* 就定义为胆管上皮细胞，而需要多个 marker 基因进行细胞鉴定。

本研究独特的运用 *clustertree* (R 包) 和 marker 基因相结合的方法，先分离出了 17 个细胞群，并根据对各个细胞亚群中分别显著表达的 marker 的基因热图和细胞特异性 marker 基因的小提琴图，寻找出了一部分亚群细胞之间具有明显的相似性，最后联合 *clustertree* 对各个细胞亚群进行向上溯源，最终将分

化中的 HOC 聚类分为肝卵圆细胞 1、肝卵圆细胞 2、前胆管细胞 1 (Pre-Cholangiocytes 1)、前胆管细胞 2 (Pre-Cholangiocytes 2)、前胆管细胞 3 (Pre-Cholangiocytes 3)、未知细胞群(Unknow)共 6 个细胞亚群。这一研究方法也为单细胞测序的人工细胞注释提供了新的思路, 加深解读运用单细胞测序技术去探索细胞之间的异质性。

本次 HOCs 单细胞测序的结果可以为研究 HOCs 的分化潜能提供重要参考依据, 加深对细胞分化过程中分化阶段的理解, 为 HOCs 向胆管上皮细胞分化的机制研究提供参考性的细胞图谱, 为后续的进一步研究开辟了道路。

基金项目

云南省科学技术厅青年项目: SETD2 调控 H3K36Me3 在小鼠肝卵圆细胞定向分化为胆管上皮细胞分化中的机制研究(编号: 202001AU070016)。

参考文献

- [1] Pu, W., Zhu, H., Zhang, M., *et al.* (2023) Bipotent Transitional Liver Progenitor Cells Contribute to Liver Regeneration. *Nature Genetics*, **55**, 651-664. <https://doi.org/10.1038/s41588-023-01335-9>
- [2] Li, Y., Lu, L. and Cai, X. (2021) Liver Regeneration and Cell Transplantation for End-Stage Liver Disease. *Biomolecules*, **11**, Article 1907. <https://doi.org/10.3390/biom11121907>
- [3] Szücs, A., Paku, S., Sebestyén, E., *et al.* (2020) Postnatal, Ontogenic Liver Growth Accomplished by Biliary/Oval Cell Proliferation and Differentiation. *PLOS ONE*, **15**, e0233736. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233736>
- [4] Del Rigual, M.M., Sánchez Sánchez, P. and Djouder, N. (2023) Is Liver Regeneration Key in Hepatocellular Carcinoma Development? *Trends in Cancer*, **9**, 140-157. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2022.10.005>
- [5] Hu, H., Gehart, H., Artegiani, B., *et al.* (2018) Long-Term Expansion of Functional Mouse and Human Hepatocytes as 3D Organoids. *Cell*, **175**, 1591-1606. E19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.013>
- [6] Tsuchiya, A. and Lu, W.-Y. (2019) Liver Stem Cells: Plasticity of the Liver Epithelium. *World Journal of Gastroenterology*, **25**, 1037-1049. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i9.1037>
- [7] Fausto, N., Campbell, J.S. and Riehle, K.J. (2012) Liver Regeneration. *Journal of Hepatology*, **57**, 692-694. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.04.016>
- [8] Wei, S., Tang, J. and Cai, X. (2020) Founder Cells for Hepatocytes during Liver Regeneration: From Identification to Application. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **77**, 2887-2898. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03457-3>
- [9] 黄山, 金礼权, 喻宇, 等. SOX9 在小鼠肝卵圆细胞定向分化为胆管上皮细胞过程中的表达[J]. 大理大学学报, 2023, 8(4): 22-27.
- [10] Ringnér, M. (2008) What Is Principal Component Analysis? *Nature Biotechnology*, **26**, 303-304. <https://doi.org/10.1038/nbt0308-303>
- [11] Wu, Y. and Zhang, K. (2020) Tools for the Analysis of High-Dimensional Single-Cell RNA Sequencing Data. *Nature Reviews. Nephrology*, **16**, 408-421. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-0262-0>
- [12] Hu, X.-H., Chen, L., Wu, H., *et al.* (2023) Cell Therapy in End-Stage Liver Disease: Replace and Remodel. *Stem Cell Research & Therapy*, **14**, Article No. 141. <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03370-z>
- [13] Michalopoulos, G.K. and Bhushan, B. (2021) Liver Regeneration: Biological and Pathological Mechanisms and Implications. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, **18**, 40-55. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0342-4>
- [14] Ko, S., Russell, J.O., Molina, L.M., *et al.* (2020) Liver Progenitors and Adult Cell Plasticity in Hepatic Injury and Repair: Knowns and Unknowns. *Annual Review of Pathology*, **15**, 23-50. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032824>
- [15] Margiana, R., Markov, A., Zekiy, A.O., *et al.* (2022) Clinical Application of Mesenchymal Stem Cell in Regenerative Medicine: A Narrative Review. *Stem Cell Research & Therapy*, **13**, Article No. 366. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-03054-0>
- [16] Gómez-Salineró, J.M., Izzo, F., Lin, Y., *et al.* (2022) Specification of Fetal Liver Endothelial Progenitors to Functional Zonated Adult Sinusoids Requires c-Maf Induction. *Cell Stem Cell*, **29**, 593-609. E7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2022.03.002>
- [17] Otieno, M.A., Bhaskaran, V., Janovitz, E., *et al.* (2017) Mechanisms for Hepatobiliary Toxicity in Rats Treated with an

-
- Antagonist of Melanin Concentrating Hormone Receptor 1 (MCHR1). *Toxicological Sciences*, **155**, 379-388.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw216>
- [18] Yin, L., Lynch, D., Ilic, Z., *et al.* (2002) Proliferation and Differentiation of Ductular Progenitor Cells and Littoral Cells during the Regeneration of the Rat Liver to CCl₄/2-AAF Injury. *Histology and Histopathology*, **17**, 65-81.
<https://doi.org/10.14670/HH-17.65>
- [19] Williams, K., Motiani, K., Giridhar, P.V., *et al.* (2013) CD44 Integrates Signaling in Normal Stem Cell, Cancer Stem Cell and (pre)Metastatic Niches. *Experimental Biology and Medicine*, **238**, 324-338.
<https://doi.org/10.1177/1535370213480714>
- [20] Liang, Y., Kaneko, K., Xin, B., *et al.* (2022) Temporal Analyses of Postnatal Liver Development and Maturation by Single-Cell Transcriptomics. *Developmental Cell*, **57**, 398-414. E5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.01.004>