

폐쇄성 담관질환에서 관찰되는 담소관증식의 기원에 관한 면역조직화학적 연구

성현정 · 안병철¹ · 이재태¹ · 금윤섭
박재복 · 박관규

대구가톨릭대학교 의과대학 병리학교실
경북대학교 의과대학 핵의학교실

접 수 : 2008년 5월 19일
게재승인 : 2008년 12월 17일

책임저자 : 박 관 규
우 705-718 대구광역시 남구 대명4동
3056-6
대구가톨릭대학교 의과대학 병리학교실
전화: 053-650-4151
Fax: 053-653-8672
E-mail: kkpark@cu.ac.kr

Immunohistochemical Study about the Origin of Bile Ductules Proliferation in Obstructive Liver Disease

Hyun-Jung Sung, Byung-Chul Ann¹, Jae-Tae Lee¹, Yoon-Seup Kum,
Jae-Bok Park and Kwan-Kyu Park

Department of Pathology, Daegu Catholic University School of Medicine, Daegu; ¹Department of Nuclear Medicine, Kyungpook National University School of Medicine, Daegu, Korea

Background : The relationship between bile duct proliferation and portal fibrosis in obstructive liver diseases remains unclear. The purpose of this study is to analyze the relationship between hepatic stellate cells (HSC), hepatocytes and bile ductule proliferation in obstructive liver disease using immunoreactivity for α -SMA (α -smooth muscle actin), CK7, and CK19. **Methods :** We used 20 human tissue samples with hepatic fibrosis due to intrahepatic stones and liver cirrhosis. Immunohistochemical staining was performed using the streptavidin-biotin method. **Results :** Proliferations of bile ductules at the periphery of the hepatic lobules, and diffuse HSC activation in the perisinusoidal spaces were observed in all cases. Immunoreactivity of the hepatocytes for CK7 and CK19 suggested a possible phenotypic transformation into bile duct epithelium during fibrogenesis. Immunohistochemical-analyses of α -SMA expression profiles showed that intralobular HSCs and some hepatocytes underwent early phenotypic changes, and that the accumulation of collagen coincides with that of α -SMA-labeled myofibroblasts around portal/septal ductular structures. **Conclusions :** Our results showed the possibility of a phenotypic transformation of hepatocytes into bile ductular epithelium. It is suggested that hepatocytes might play a role in bile ductule proliferation in obstructive liver disease.

Key Words : Obstructive liver disease; Bile ductule; Hepatocyte

간경화는 간섬유증의 여러 가지 주요 임상적 문제를 야기하고 높은 사망률을 나타낸다. 간섬유증은 만성적인 자극에 대한 창상 치유 반응 과정이며, 세포외기질단백인 당단백질(glycoprotein), 교원섬유(collagen), 프로테오글라이칸(proteoglycan) 등을 과도하게 축적하면서 진행된다.¹

간에서 만성적으로 담관이 폐쇄될 때 간섬유증 및 염증세포 침윤과 함께 담소관증식이 관찰된다. 지금까지 담소관증식의 이유와 기원이 되는 세포를 찾기 위한 연구가 많았는데, Slott 등²은 담관계 내의 물리적 압력의 증가가 가장 중요하며 담관계 압력의 증가가 담관 세포의 분열을 촉발시키는 것으로 보고하였으며, Desmet 등³은 간세포가 담소관으로 화생이 된다고 보고하였다. 또 다른 연구자들은 간세포삭(hepatocyte cord)이 소관(ductule)으로 변환을 일으켜 세담관(cholangiole)이나 담소관(bile ductule)으로 된다는 설과, 기존의 담관이나 담소관이 늘어나고 꼬여서 세담관의 증식을 일으킨다는 설 등을 주장하였다.⁴ 증식이 일어

난 세담관이나 담소관 주위에 나타나는 미분화 세포들에 대하여서는, Faber가 “난원세포(oval cell)”라고 처음 보고하였으며 그 이후 Shiojiri 등⁵, Schaffner와 Popper⁶, Grisham과 Porta⁷, Germain⁸ 등은 이 난원세포가 담상피 세포, 간세포로 분화한다고 하였다. 난원세포는 간 손상으로 인해서 광범위한 괴사가 발생하거나, 간 독소, 발암 물질에 의해 간세포의 증식억제가 발생하는 경우에 문맥역 주위(periportal area)에 나타나기 시작하며 간세포와 담도세포로 분화할 수 있다.

분화능력을 가지는 간 내 세포들에 대한 보고들 중에서, 지난 30여년간 간섬유증, 간경화에서 가장 중요한 역할을 담당하는 세포로서 간 별 세포(hepatic stellate cell) 및 근섬유모세포(myofibroblast)에 대한 연구가 많았으며 간 별 세포는 만성 간손상에 있어서 세포외기질단백을 생성하는 세포성 근원으로서 매우 중요한 역할을 담당한다.⁹ 정상 간에서 간 별세포는 디세강(space of Disse)내에 존재하며 비타민 A를 저장하고 있다가 여러 원인

에 의한 간손상이 일어나면 간 별 세포가 활성화되고 α -smooth muscle actin (α -SMA)이 발현되면서 굴모양 혈관의 수축을 일으키게 된다.⁹ Beausier 등¹⁰은 쥐실험의 경우에 간섬유증을 초래하는 세포는 문맥역/문맥역 주위 중배엽성 세포(portal/periportal mesenchymal cell)에서 기원한 근섬유모세포이며, 간 별 세포는 파손된 간세포 주변에서 세포외기질을 생성하는 근섬유모세포로 교차분화(transdifferentiation, phenotype change)하여 창상 치유과정을 담당한다고 주장하였다. 그러나 최근에는 이러한 간 별 세포가 간세포로 분화할 수 있다는 가능성에 관한 연구도 있다.²⁷

Cassiman 등¹¹은 인체와 쥐의 간을 대상으로 하여 간경화에서 세가지의 다른 중배엽기원의 근섬유모세포양 세포, 즉 문맥역/중격 근섬유모세포(portal/septal myofibroblast), 경계영역 근섬유모세포(interface myofibroblast), 굴모양 혈관 주위(perisinusoidally located) 간 별 세포를 면역조직화학법을 통해서 동물 실험과 인체조직 실험의 면역조직화학적 결과에 차이를 보여 주었다. 즉, 인체의 간경화조직에서는 간 별 세포가 α -SMA, N-CAM에 면역반응을 보이며, CCl₄로 유도된 쥐의 간경화조직에서는 GFAP, desmin에 양성반응을 보였다. 따라서 기존의 연구들이 대부분 동물실험에서 기초한 것이 많으므로 인체조직을 이용한 우리의 실험이 어느 정도 가치가 있다고 본다.

본 연구에서 사용하고자 하는 면역 염색의 일차 항체로 α -SMA는 평활근세포, 근섬유모세포 관여하는 세포내 단백질이며, CK7과 CK19는 상피세포의 세포질내 세포골격을 담당하는 사이토크라틴의 종류이다. 그리고 Hepatocyte paraffin 1 (Hep)은 간세포의 미토콘드리아와 관계되는 단백질에 염색되며 간세포 분화를 진단하는데 가장 민감하고 특이한 항체이다. 본 연구는 간 내 결석에 의한 담관계 폐쇄와 간경화시 세담관 또는 담소관증식이 관찰되는 인체의 간 조직 파라핀 블록을 이용하였으며, 면역조직화학적 방법으로 간 별 세포, 간세포, 담소관 세포의 특성을 관찰하여 증식성 담소관 상피세포의 기원에 대해 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

2003년 1월부터 2007년 12월까지 간 내 결석, 담즙 정체와 소견과 함께 폐쇄성 간질환의 소견이 같이 있었던 간섬유증, 간경화증 환자의 간 조직 파라핀 블록 총 20개를 본 실험에 사용하였다. 환자들의 나이는 최저 37세, 최고 76세였으며 평균 나이는 58.15세였다. 남녀 구성은 각각 10명씩이었다. 대조군은 간에 병리학적 이상이 없으며 단순 사고에 의한 간 파열의 경우인 2예(여자, 38세, 43세)를 이용하였다.

조직학적 검사

22개의 파라핀 블록을 5 μ m 두께로 연속절편을 제작하여 일부는 통상적인 헤마톡실린-에오신 염색을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다. 그리고 일부는 면역조직화학 염색을 위해 준비해 두었다.

면역조직화학 염색

미리 준비된 파라핀 블록 절편으로 면역조직화학 염색을 실시하였다. 일차 항체로 mouse anti-human α -SMA (1A4, Dakopatts, Copenhagen, Denmark), CK7 (RCK108, BioGenex, Netherlands), CK19 (OV-TL12/30, BioGenex, Netherlands), Hep (OCH1E5, Dakopatts, Copenhagen)을 사용하였고, 면역조직화학 염색은 labelled streptavidin biotin (LSAB) 방법으로 시행하였다. 조직 절편을 자일렌으로 탈파라핀한 후 알코올로 합수시키고, 0.3% 과산화수소로 5분간 반응시켜서 내재성 과산화효소와 비오틴을 억제시킨 다음 PBS 완충액으로 10분간 세척하고 정상 면양 혈청을 가하여 20분간 반응시켰다. 정상 면양 혈청을 제거한 다음 희석한 일차항체들(α -SMA, 1:200, CK7, 1:200, CK19, 1:200, Hep, 1:200)을 첨가하여 4°C 항온기에 하룻밤 두었다가 다음날 PBS 완충액으로 10분간 세척하고 비오틴과 결합된 항 생쥐 면양 혈청인 이차 항체와 20분간 반응시켰다. 세척 후 streptavidin과 결합한 과산화효소 복합체를 가하여 20분간 반응시킨 후 amino-ethyl carbazole (AEC)로 발색하고 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 염색 결과 판독은 세포질에 전체적으로 또는 부분적으로 붉은 갈색으로 착색이 되면 면역반응이 있는 것으로 보고 양성으로 판독하였다.

결 과

조직학적 결과

정상군

간 소엽의 문맥역내에서 간세동(portal triad)와 간 세포삭 사이의 경계는 명확하였다. 문맥역내에는 1-2개의 담관과 간동맥과 문맥정맥이 있고 섬유모세포가 드물게 관찰되었다. 간세포들은 간 세포삭을 잘 유지하였고 굴모양 혈관을 따라 소수의 내피세포가 관찰되는 것 외에 특이한 세포는 관찰되지 않았다.

폐쇄성 담관 질환군

문맥역과 접한 간 소엽 부위에서 내강을 형성하는 담소관 상피세포의 증식이 관찰되었으며 문맥역내에서 간 소엽쪽으로 증식이 진행되는 양상을 보였다. 담소관 상피세포들 중 일부는 내

강 형성이 안 된 상태로 한개 또는 수 개의 세포가 군을 이루고 있기도 하고 수 개의 담소관 상피세포와 간세포가 공동의 내강을 형성하는 것도 일부 관찰되었다(Fig. 1A). 또, 담소관 상피세포군의 핵에 간세포처럼 핵소체가 보이거나 세포질이 풍부한 소견이 관찰되었다(Fig. 1B). 전반적으로 간섬유증과 함께 담소관 증식으로 문맥역 부위가 확장되는 양상을 보였다. 심한 경우 간 소엽 조직이 감소되고 담상피세포군이 대부분을 차지하며 간 세포삭이 파괴되었다.

면역조직화학염색 결과

대조군

담소관 세포는 CK7에만 강한 양성반응을 보이고, 간세포는 Hep에 양성반응을 나타내며, α -SMA 염색시에는 문맥역내 간동맥 근섬유, 문맥정맥벽에서 주로 양성반응을 나타내었다.

CK7, CK19 면역조직화학염색

CK7은 염기성 사이토케라틴이고, CK19는 산성 사이토케라틴이지만 둘 다 담관 상피세포와 소장의 선 상피세포에 양성으로 반응하며 반대로 간세포에는 음성으로 반응한다. 염색결과 실험군 20예에서 섬유증의 정도에 따른 차이를 보였지만, 대체로 담관 상피세포에 선택적으로 강하게 양성으로 반응하였고 그 외의 간세포, 간 별 세포, 섬유모세포에는 음성으로 반응하였다(Fig. 2A). 그런데 문맥역과 멀리 떨어진 간 소엽 부위의 증식성 담소관 상피세포 주위 간세포에서만 염색 반응을 나타냈고 염색된 간세포가 동시에 담소관 상피세포와 연결하여 군을 이루거나 내강을 형성하는 소견을 나타냈다(Fig. 2B). 염색정도는 간세포 세포질의 일부만 염색되거나 대부분이 염색되는 등 다양하였으며 CK7 및 CK19의 염색결과는 비슷하였다.

Hep 면역조직화학염색

간 세포질에 과립성 또는 균일하게 양성 반응을 나타내며 문

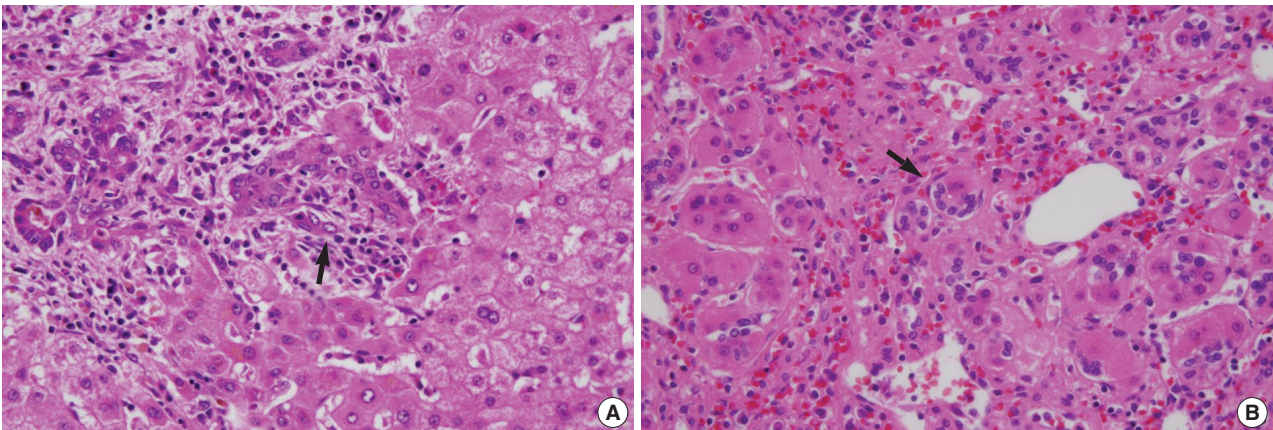


Fig. 1. (A) The ductular cells (arrow) are aggregated with hepatocytes. (B) The ductular cells (arrow) form a luminal structure with the hepatocytes. The nucleoli appears in the proliferating bile ductular cells with abundant cytoplasm.

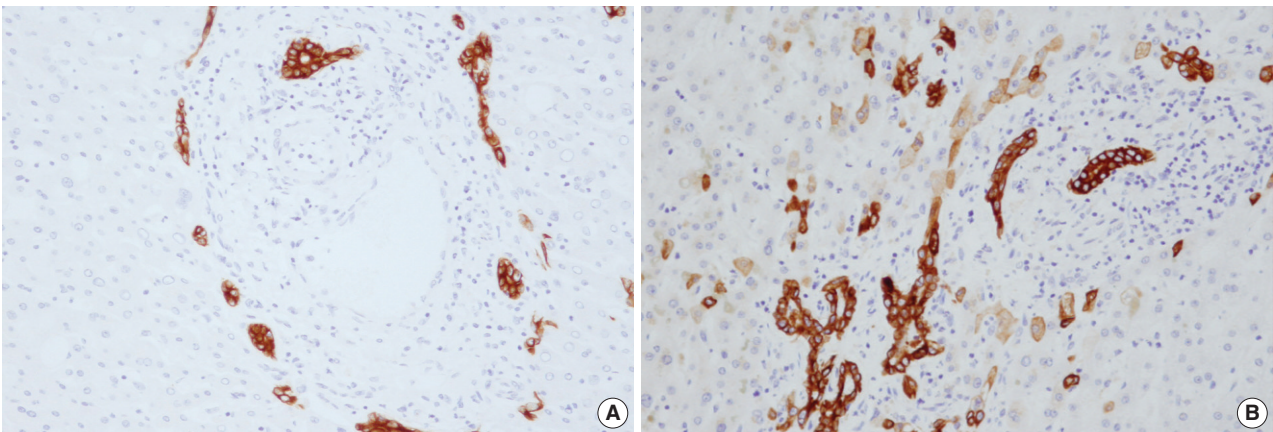


Fig. 2. (A) The proliferative bile ductules show positive immunoreactivity for CK7 and located at the portal area periphery. (B) The hepatocytes show positive immunoreactivity for CK19 around the proliferating bile ductules and form ductular structures.

맥역, 담관 상피세포 등은 음성으로 반응하였으나(Fig. 3A), 특
이하게 간 소엽 주위에서 증식하는 담소관 상피세포에서는 대부

분 양성반응을 나타냈다(Fig. 3B-D).

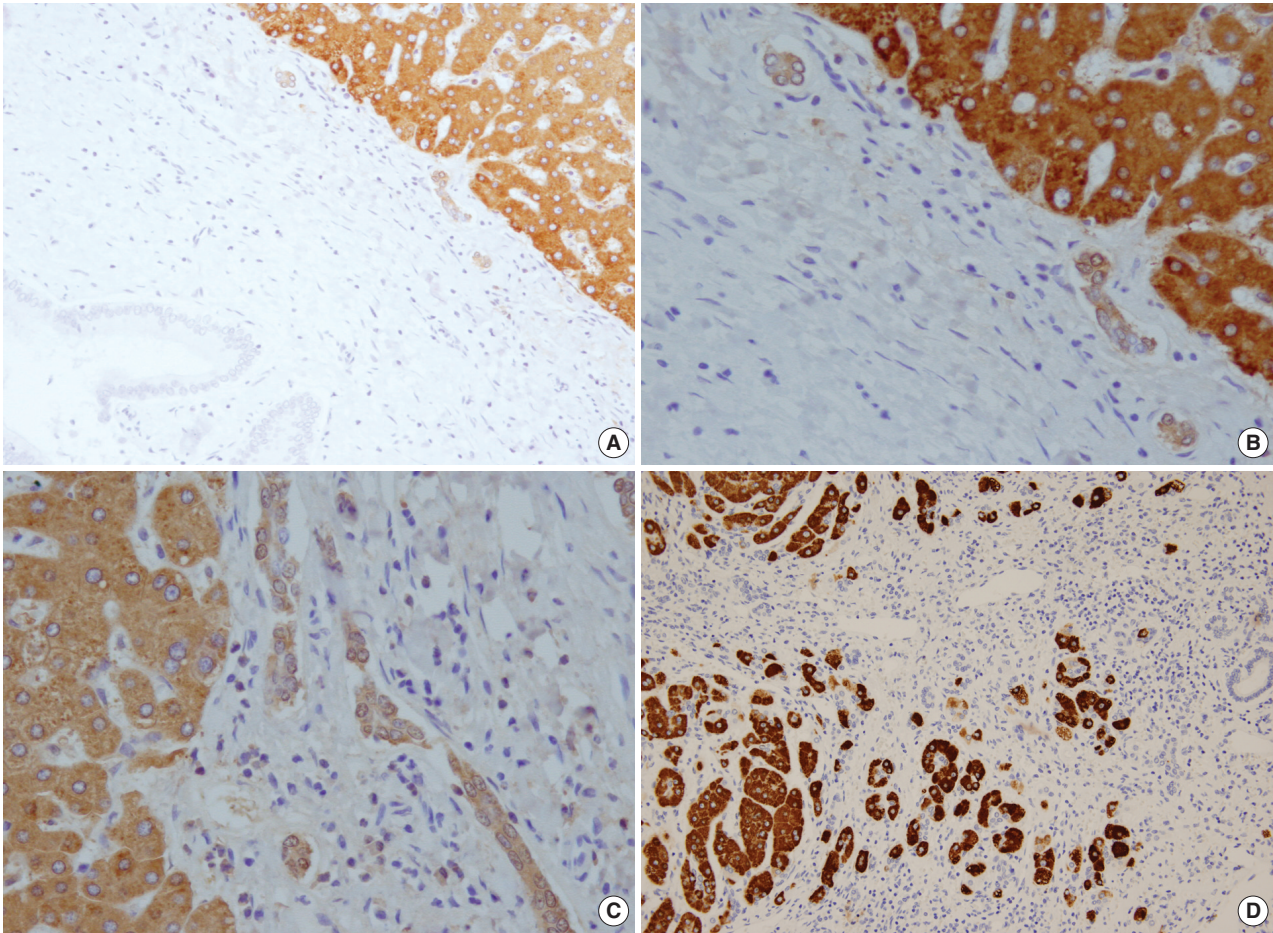


Fig. 3. (A) The mature bile duct (left lower portion of the picture) is not positive for Hep immunostain. (B, C) The biliary ductules around the liver parenchyma are positive for Hep immunostain. (D) The biliary epithelium shows positivity for Hep immunostain and form ductular structures.

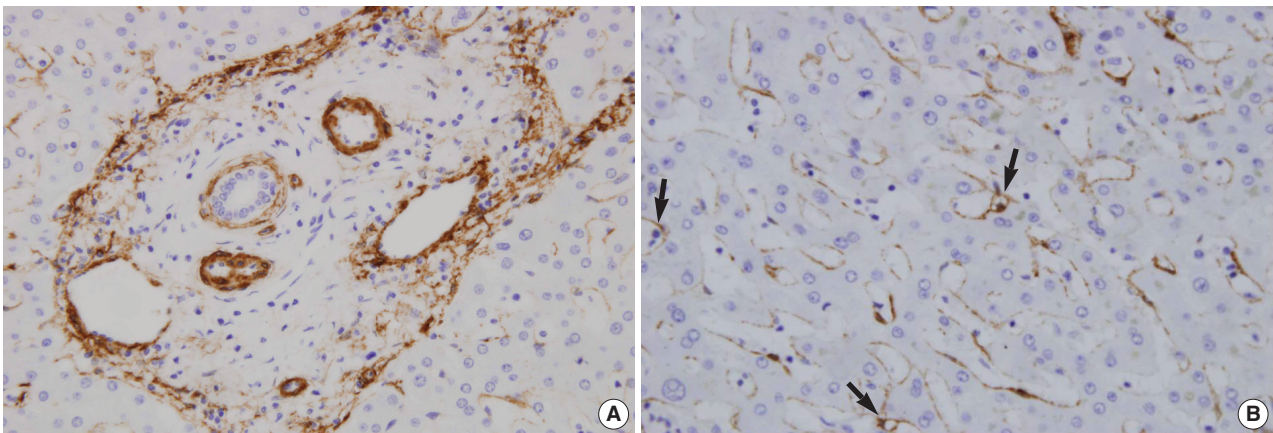


Fig. 4. (A) Portal areas show positivity for α -SMA immunostain around the bile ducts, in the arterial tunica media, in the wall of the portal veins and around portal areas. (B) Slight background staining was more predominant in the sinusoids compared to the control group. A positive hepatic stellate cell (arrow) contains one large vacuole and a dislocated nucleus.

α -SMA 면역조직화학염색

염색 결과 문맥역에서는 간 동맥의 근섬유, 문맥정맥벽, 담관 주위에서 양성반응을 나타내었다(Fig. 4A). 그리고 실험군의 간 실질 내에 굴모양 혈관 주위강을 따라서 점과 띠 양상으로 불규칙적인 염색 결과를 보였고, 굴모양 혈관 부위에서 간 별 세포로 추측되는 세포들이 관찰되었다(Fig. 4B).

고 찰

간섬유증은 B형, C형 간염바이러스 감염에 의한 만성 간염과 만성적인 알코올 소비가 주요인으로 증가하고 있다.¹² 또 다른 원인으로는 자가 면역 질환, 약물, 기생충, 철분과 구리의 과다 섭취, 담도계 폐쇄 등을 들 수 있다. 최근에는 비알콜성 지방간염도 간섬유증의 원인으로 증가하는 추세이다.¹² 여기에서 간 내 결석 등으로 인한 담관계 폐쇄시 간섬유증이 발생하며 이 경우 수많은 담소관의 증식을 관찰할 수 있다.

담관상피의 증식 능력에 관하여 최근 담소관증식이라는 단어 사용이 제안되었는데 완전히 만족스럽지는 않다. 그 이유는 증식된 담소관이 단순히 기존의 담소관 세포의 증식이 아니라 분화된 간 전구세포이거나, 전신순환계에서 탈출해 나와서 간세포로 분화하는 세포, 또는 드물지만 간세포의 담관계 화생으로 인해서 생길 수 있다¹³고 보기 때문이다.

Alvero 등¹⁴은 담관계 세포 증식을 4가지 유형으로 정리하여 설명하는데, 첫째로 전형적인 담관계 세포 증식은 문맥역 공간내에 국한되어서 간 내 담관의 숫적 증가를 일으킨다.¹⁵ 인체의 경우 전형적 증식은 급성 폐쇄성 담즙울체(acute obstructive cholestasis), 간 외 담도 폐쇄증(extrahepatic biliary atresia), 만성 담즙울체성 간 질환의 초기단계(early phase of chronic cholestatic liver disease)¹⁵에서 관찰된다고 하였다. 둘째, 비전형적인 증식은 문맥역에 국한되지 않고 문맥역 주위, 간 실질까지 퍼져서 불규칙적으로 증식하며, 내강을 잘 형성하지 못하고, 주위에 부종, 염세포 침윤을 동반한다.¹⁵ 인체에서는 알콜성 간 질환(alcoholic liver disease), 장기간의 간 외 담도계 폐쇄, 초점성 결절성 과증식(focal nodular hyperplasia), 만성 담즙 울체성 간 질환(chronic cholestatic liver disease)에서 관찰된다.¹⁵ 비전형적 담소관증식은 간 세포상의 담소관으로의 화생 및 변형이며 기존의 담소관 세포의 증식이 아니라는 증거가 존재하지만,¹⁶ 대다수 연구들은 비전형적 증식이 기존의 담소관증식과 간 전구세포계통의 증식이라는 가설을 지지하고 있다.¹⁴ 셋째는 심한 간세포 괴사와 함께 간 내 전구세포 또는 소관형 간세포(ductular hepatocyte)가 증식하여 담소관증식을 일으킨다는 설이며, 마지막 네 번째는 쥐의 간에서 ethionin 같이 수많은 화학물질에 의해 유발되는 발암과정의 초기단계에서 난원세포에 의해 발생한다는 증식설이다.

본 연구의 결과에 의하면, 헤마톡실린-에오신 염색상에서는

문맥관의 담관계와 간 소엽내의 담소관 상피세포가 연결되는 양상을 보이면서 문맥역이 넓어지는 소견을 보이고, 간 실질과 인접한 부위에서 증식하는 담소관 상피세포가 세포질이 풍부한 간세포와 함께 내강을 형성하는 과정이 관찰되었다. 또한, 내강을 이루지 못한 담소관 상피세포군에 간세포처럼 핵소체가 관찰되고 간세포와 유사하고 풍부한 세포질을 보이는 등, 조직학적으로 담소관 상피세포와 간세포의 중간 단계 세포로 생각되는 소견도 보였다. 면역조직화학 염색 결과를 통해 헤마톡실린-에오신 염색에서 관찰되던 간세포의 특성을 가진 증식성 담소관 상피세포의 현미경적 소견을 확인할 수 있었다. CK7, CK19 면역염색 반응시 간 실질 주변부위에서 증식하고 있는 담소관 상피세포 뿐만 아니라 인접한 간세포에서도 부분적으로 양성 반응을 보이고 있었고, Hep 면역반응에서는 간세포 외에도 문맥역 중심의 성숙된 담관과 대조적으로 간 실질 주변부위의 증식성 담소관 상피세포에서 역시 양성반응을 보였다. 이러한 결과는 연구에 이용한 인체조직 20예 모두에서 나타났다. 간세포에 담관 상피세포의 표현형이 나타나면서 증식성 담소관 상피세포에 간세포 표현형이 남아있는 것으로 해석 되므로 간세포가 담소관 상피세포로 분화된 것으로 생각한다. Alvero 등¹⁴의 4가지 가설 중에 두번째 비전형적인 담소관증식의 설명과 거의 같은 결과를 보여주었다.

그러나, 서론에서 언급한 것처럼 간 줄기세포가 담소관증식에 관여한다는 등 여러 주장이 있었으며 본 연구와 연구 방향은 다르지만 비슷한 결과를 유도해 낸 연구결과도 보고되고 있었다. Noteboom 등¹⁷은 간세포의 담도계로의 분화를 체내로 연구하기 위해서 태생기 쥐의 간에서 간세포를 추출하여 쥐의 비장에 이식했을 때 이식된 간세포가 주위에 담관모양으로의 형성과 성숙을 보여주었고, 이들은 형태적 변화뿐 아니라 면역조직학적으로도 간세포의 표지자를 서서히 잃어 가면서 동시에 담관계 세포 표지자를 나타내는 것을 관찰하였다. 이런 실험 결과는 이번 연구결과에서도 관찰된 바 있다. 그리고 Nishikawa 등¹⁶은 배양된 간세포에서 CK19 등의 담관 상피세포 표지자를 발현하면서 작은 담소관 구조를 형성하는 것을 관찰하였다. 그 외 많은 연구자들의 보고에서도 간세포에서 담소관 상피세포로 표현형 변화의 가능성을 제시하고 있다.¹⁸⁻²⁰

이와 같이 간세포가 분화하여 담소관 상피세포로 되는 경우 두 가지의 기전으로 설명하고 있다.¹⁶ 즉, 교차분화처럼 역분화 과정을 거치지 않고 직접적 형질변환을 통하여 전이분화 하거나, 또는 주어진 세포 특성이 다시 미분화 상태로 역분화를 한 후 다른 세포로 분화하는 두 가지 가설이 대표적이다. 이 두 기전 중 주로 어느 방법에 의하는지는 좀 더 연구가 필요하지만, 대체로 성숙한 간세포는 교차분화 과정을 거쳐서 담소관 상피세포로 표현형을 바로 변화한다는 주장이 우세하다.¹⁶

본 연구에서는 그 의미를 찾지 못하였지만 간 별 세포의 분화 가능성도 제시되고 있다. Kodes 등²¹이 쥐에서 간 별 세포를 추출하여 배양하였으며, 그 결과 시토키인을 주입시 α -SMA 양성인 근섬유모세포, 내피세포 같은 세포(endothelial-like cell),

α -fetoprotein 양성인 간세포 같은 세포 등으로의 세포로 분화를 보였으며, 간세포 재생에 직접적으로 기여할 수 있음을 추론하고 있다. 또한, David 등²²은 인간 태아의 간세포에서 최근 줄기세포, 조혈세포 계통을 나타내는 표지자인 CD34+ CK7/8+인 세포를 추출하여 배양하였으며 이것은 간 별 세포가 줄기세포의 분화성을 나타낼 수 있음을 시사하는 것이다.

이외에 또 다른 가설로서 난원세포의 본체에 관하여 초기에 MacDonald와 Mallory²³는 섬유모세포로 오인하였고, Korpassy와 Kovacs²⁴는 조직구로 생각하였으나, 그 후 전자현미경적 연구, 조직화학적 연구 및 자동방사기록술 등 기술 발달에 의해 난원세포의 기원이 담관상피세포라고 알려지게 되었다.²⁵ 이런 난원세포가 간 줄기세포라는 것을 증명하고자 하는 실험이 많았으며, 그 중에서 Chen 등²⁶은 만성 B형 간염환자의 경우 비전형적 담소관증식이 관찰되고 이것이 간 재생에 기여하며, 또 면역조직화학법, 형태계측(morphometric analysis)을 통해 비전형적 담소관 증식세포가 담소관 상피, 간세포 두가지 모두의 표현형을 가지면서 난원세포의 형태계측상 특징도 가지므로 비전형적 담소관 증식세포는 간 줄기세포에서 기원한다고 주장하였다. 그러나, 광범위한 연구에도 불구하고 아직도 기능적, 유전적 조작이 가능한 무한한 능력을 가진 간 줄기세포를 발견하지 못하였으며 연구에 의한 가설과 주장만 부분하다. 최근 유전자 치료의 표적 세포로서 줄기세포의 부각과 간세포 이식술의 측면에서 다시 연구되고 있으며,¹⁴ 임상적용의 중요성으로 인해 앞으로도 지속적으로 연구되어야 할 분야이다.

이상 본 연구의 결과를 요약하면, 저자들은 광학현미경 소견에서 담소관 세포와 간세포와의 중간단계를 관찰하였고, 면역조직화학염색에 의해서 간세포의 표현형이 증식하고 있는 담소관상피세포에 남아있어서, 이들이 간세포에서 분화하였음을 확인하였다. 따라서 저자들은 인체내 만성 폐쇄성 담관질환의 경우 손상에 대한 반응으로 간 별 세포, 섬유모세포에 의한 간섬유증의 발생과 함께 간세포가 교차분화를 일으켜서 담소관 상피세포로 분화하고 증식한다는 결론을 내렸다. 인체의 간세포에서 담소관 상피세포로 변형하는 데 관여하는 유전자적 과정 또는 담관 주위 동맥층을 통해 이동했을 물질은 무엇인지 의문이 생기며, 또한 담소관의 증식이 간세포에서 기원하는 것으로 생각되지만, 담소관 세포나 간 줄기세포, 간 별 세포가 담소관증식에 일부 관여했을 가능성도 배제하기 어렵다. 따라서 담소관증식의 복합적인 분화 가능성에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

참고문헌

1. Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanism of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 33-60.
2. Slott PA, Liu MH, Tavoloni N. Origin, pattern, and mechanism of bile duct proliferation following biliary obstruction in the rat. *Gastroenterology* 1990; 99: 466-77.
3. Desmet V, Roskams T, Van Eyken P. Ductular reaction in liver. *Pathol Res Pract* 1995; 191: 513-24.
4. Dunsford HA, Maset BS, Salman J, Sell S. Connection of duct-like structures induced by a chemical hepatocarcinogen to portal bile ducts in the rat liver detected by injection of bile ducts with a pigmented barium gelatin medium. *Am J Pathol* 1985; 118: 213-24.
5. Shiojiri N, Lemire JM, Fausto N. Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver developments. *Cancer Res* 1991; 51: 2611-20.
6. Schaffner F, Popper H. Electron microscopic studies of normal and proliferated bile ductules. *Am J Pathol* 1961; 38: 393-410.
7. Grisham JW, Porta EA. Origin and fate of proliferated hepatic ductal cells in the rat: electron microscopic and autoradiographic studies. *Exp Mol Pathol* 1964; 6: 242-61.
8. Germain L, Blouin MJ, Marceau N. Biliary epithelial and hepatocytic cell lineage relationships in embryonic rat liver as determined by the differential expressions of cytokeratins, α -fetoprotein, albumin, and cell-surface exposed components. *Cancer Res* 1988; 48: 4909-18.
9. Mak KM, Lieber CS. Lipocytes and transitional cells in alcoholic liver disease: a morphometric study. *Hepatology* 1988; 8: 1027-33.
10. Beaussier M, Wendum D, Schiffer E, et al. Prominent contribution of portal mesenchymal cells to liver fibrosis in ischemic and obstructive cholestatic injuries. *Lab Invest* 2007; 87: 292-303.
11. Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, Deneff C, Roskams T. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J Hepatol* 2002; 36: 200-9.
12. Friedman SL. Liver fibrosis-from bench to bedside. *J Hepatol* 2003; 38(Suppl1): S38-53.
13. Desmet V, Roskams T, Van Eyken P. Pathology of the biliary tree in cholestasis: ductular reaction. In: Manns MP, Boyer JL, Jansen PLM, Reichen J, eds. *Cholestatic liver disease*. New York: Kluwer Academic Publishers; 1998: 143-54.
14. Alvero D, Mancino MG, Glaser S, et al. Proliferating cholangiocytes: A neuroendocrine compartment in the diseased liver. *Gastroenterology* 2007; 132: 415-31.
15. Alpini G, Prall RT, LaRusso NF. The pathobiology of biliary epithelia. *The liver: biology and pathobiology* 2001: 421-35.
16. Nishikawa Y, Doi Y, Watanabe H, et al. Transdifferentiation of mature rat hepatocytes into bile duct-like cells in vitro. *Am J Pathol* 2005; 166: 1077-88.
17. Notenboom RG, van den Bergh Weerman MA, Dingemans KP, et al. Timing and sequence of differentiation of embryonic rat hepatocytes along the biliary epithelial lineage. *Hepatology* 2003; 38: 683-91.
18. Block GD, Locker J, Bowen WC, et al. Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of

- hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium. *J Cell Biol* 1996; 132: 1133-49.
19. Jirtle RL, Biles C, Michalopoulos G. Morphologic and histochemical analysis of hepatocytes transplanted into syngeneic hosts. *Am J Pathol* 1980; 101: 115-26.
20. Hillan KJ, Burt AD, George WD, MacSween RN, Griffiths MR, Bradley JA. Intrasplenic hepatocyte transplantation in rats with experimental liver injury: morphological and morphometric studies. *J Pathol* 1989; 159: 67-73.
21. Kordes C, Sawitza I, Mueller-Marbach A, *et al.* CD133+ Hepatic stellate cells are progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 352: 410-7.
22. Suskind DL, Muench MO. Searching for common stem cells of the hepatic and hematopoietic systems in the human fetal liver: CD34+ cytokeratin 7/8+, cells express markers for stellate cells. *J Hepatol* 2004; 40: 261-8.
23. MacDonald RA, Mallory GK. Fibrous tissue in nutritional cirrhosis. *Arch Pathol* 1959; 67: 119-27.
24. Korpassy B, Kovacs K. Experimental liver cirrhosis in rats produced by prolonged subcutaneous administration of solutions of tannic acid. *Brit J Exp Pathol* 1949; 30: 266-72.
25. Jeong JY, Kang DY, Noh SM. A morphologic study on the bile duct changes induced by common bile duct ligation in rats. *Korean J Pathol* 1993; 27: 618-29.
26. Chen YK, Zhao XX, Li JG, Lang S, Wang YM. Ductular proliferation in liver tissues with severe chronic hepatitis B: an immunohistochemical study. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1443-6.