

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.02.005

人源诱导多能干细胞体外定向分化为功能性肝细胞的方法研究 *

邵文桂¹ 张 阳² 阮海文² 窦金辉² 张雪峰^{2Δ} 赵树立^{1Δ}

(1 中国药科大学南京市第一医院 江苏 南京 201106; 2 江苏鼎泰药物研究股份有限公司 江苏 南京 211800)

摘要 目的:研究开发一种简易、快速在体外使多能诱导干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)定向分化为功能性肝样细胞的培养方法。**方法:**根据正常肝细胞在体内的发育规律,设计简化诱导方法使 iPS 细胞定向分化为内胚层细胞,应用 qPCR 和流式细胞术鉴定其纯度后进一步诱导分化为肝样细胞,并通过 qPCR、ELISA、免疫荧光等技术鉴定肝细胞的性状和功能。**结果:**iPS 细胞诱导 7 天后, OCT4 和 NANOG 的表达水平显著下降,内胚层细胞相关基因 CXCR4、FOXA2 和 HNF4A 表达水平明显升高。内胚层细胞继续诱导培养 15 天后,肝细胞特异性标志基因 ALB、TDO2、RBP4、G6PC 和肝药酶基因 CYPs 等显著上调,同时产生高水平的白蛋白和尿素;PAS 糖原染色为阳性,能主动摄取和释放吲哚菁绿,证实诱导成的肝样细胞具备正常肝细胞的部分功能。**结论:**该诱导方案能够在体外使 iPS 细胞遵循正常肝脏发育通路简易、高效地分化为功能性肝细胞。本研究为大量获得 iPS 来源的肝细胞及其在细胞疗法和药筛模型中的运用提供了可能性。

关键词:多能诱导干细胞;内胚层;定向分化;肝细胞;药筛模型

中图分类号:R-33;R329.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)02-225-07

Study on the Method of Directional Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Functional Hepatocytes *in Vitro**

SHAO Wen-gui¹, ZHANG Yang², RUAN Hai-wen², DOU Jin-hui², ZHANG Xue-feng^{2Δ}, ZHAO Shu-li^{1Δ}

(1 Nanjing First Hospital, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu, 201106, China;

2 Jiangsu Dingtai Pharmaceutical Research Co., LTD., Nanjing, Jiangsu, 211800, China)

ABSTRACT Objective: This study is to research and develop a simple and rapid method to directly differentiate the induced pluripotent stem cells (iPS) into functional hepatocytes in vitro. **Methods:** According to the development of normal hepatocytes in vitro, a simplified method was designed for differentiation of iPS cells into endodermal cells. The phenotypes of endodermal cells was identified by qPCR and flow cytometry, and then these cells were further differentiated into hepatocyte-like cells. The characteristics and functions of hepatocytes were identified by qPCR, ELISA and immunofluorescence. **Results:** The results showed that the mRNA/protein expression of OCT4 and NANOG were decreased significantly, and the mRNA/protein expression of endodermal cell-related genes, CXCR4, FOXA2 and HNF4A, were increased significantly at day 7 after iPS cell induction. Hepatocyte specific marker genes ALB, TDO2, RBP4, G6PC and hepatocyte drug enzyme genes CYPs were significantly upregulated at day 15, and high levels of albumin and urea were produced simultaneously. Positive PAS glycogen staining and active uptake and release of indocyanine green were observed in the induced hepatocytes. It was confirmed that the hepatocyte-like cells had the partial functions of primary hepatocytes. **Conclusion:** This easy and efficient induction method can be used in differentiation of iPS cells into functional hepatocytes by mimicking the process of liver organogenesis in vitro. This study provides the possibility for massive production of iPS-derived hepatocytes and their applications in cellular therapy and drug screening models.

Key words: Pluripotent induced stem cells; Endoderm; Directional differentiation; Hepatocytes; Drug screening model

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R329.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)02-225-07

前言

肝细胞作为肝脏功能最基本的单位,在药物代谢、药物相互作用以及毒理药理研究领域被广泛应用^[1]。临床治疗终末期

* 基金项目:南京市科技计划项目(201911001)

作者简介:邵文桂(1995-),女,硕士研究生,主要研究方向:基础医学与临床药学方向,E-mail: 1015036848@qq.com

Δ 通讯作者:张雪峰(1979-),男,博士,主要研究方向:主要从事于药物毒理研究及安全药理方向,

电话:025-58196598, E-mail: zhangxuefeng@tri-apex.com;

赵树立(1979-),男,博士,副研究员;研究方向:主要从事于肿瘤微环境成分分析及其介导的免疫逃逸机制和天然免疫介导的肿瘤免疫治疗技术开发,电话:025-52887003, E-mail: shulizhao79@163.com

(收稿日期:2022-06-15 接受日期:2022-07-10)

肝病需要进行器官移植,但由于器官来源困难且可能有免疫排斥反应,所以肝细胞移植(Hepatocyte transplantation, HT)是治疗以肝脏为基础的代谢性疾病和急性肝衰竭(Acute liver failure, ALF)的一种有前途的替代方案^[2]。但肝细胞来源非常有限,且无法在体外长期培养,亟需寻找新的来源并可长期体外培养的肝细胞,以期建立人肝脏代谢的体外模型并满足临床需求。

目前体外诱导肝样细胞的种子细胞来源主要有胚胎干细胞(ESCs)和多能干细胞(iPSCs)^[3],其中 iPSCs 开始越来越多受到研究者的关注^[3]。2006 年,日本科学家 Yamanaka 的研究小组发现,通过转导 Oct-3/4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 这 4 个转录因子将小鼠的皮肤细胞重编码为具有胚胎干细胞功能的干细胞,被称为多能诱导干细胞^[4]。后用类似的方法,又将人类成纤维细胞,以及脐带和外周血细胞成功诱导为 iPS 细胞^[5,6]。干细胞可以在体外重新分化,产生有助于药物发现的新模型,包括基于 iPS 的药物发现、毒性评估和疾病建模模型^[7,8]。另外 iPS 细胞相比胚胎干细胞来说,没有伦理压力和人类白细胞抗原(Human leukocyte antigen, HLA)不匹配的问题,提供了可避免免疫排斥的潜在可行的细胞替代疗法,成为新的肝细胞的理想可能来源^[9]。

在胚胎发育过程中,肝细胞来自于内胚层^[10]。体外培养可诱导细胞分泌白蛋白(Albumin, ALB),同时其发挥作用也必须建立在内胚层细胞诱导的基础上^[11]。IPS 细胞向肝样细胞的诱导分化主要是通过模拟肝脏在体内的发育过程,根据肝细胞在体内发育不同时期的调控机制,人为在体外创造肝细胞所需的体内微环境,经过内胚层发育、内胚层肝脏特异化和肝脏成熟三个阶段来获得肝细胞样细胞(Hepatic-like cells, HLCs)^[12]。

在诱导分化肝细胞过程中,细胞因子的作用不可或缺^[13]。细胞因子是一类由免疫细胞和某些非免疫细胞经刺激而合成、分泌的具有广泛生物活性的小分子蛋白质^[14]。在以往大部分研究方案中,研究者通常将 HLC 的分化方案分为三个步骤:内胚层分化、肝母细胞分化以及肝样细胞分化^[15],所用到的细胞因子包括肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor, HGF)、磷酸肌醇 3-激酶(Phosphoinositide 3-kinase, PIK3)以及 Wnt3a 在内的内胚层诱导因子^[16];成纤维细胞生长因子(Fibroblast growth factors, FGF)^[13]、骨形成蛋白(bone morphogenetic Proteins, BMP)以及抑瘤素(Oncostatin M, OsM)在内的肝细胞诱导因子^[17]。以往方案步骤繁琐,耗费的细胞因子种类多,数量大,价格昂贵,所以寻找更为简易的方案,减少细胞因子的耗费是研究建立大量诱导分化肝样细胞工艺必不可少的环节^[18]。

在本研究中,研究者在前人研究基础上,通过缩短诱导周期、减少诱导因子的两步法诱导方案,短期高效诱导出具备良好肝功能的功能性肝细胞,获得的这些功能性肝细胞可用于药物筛选及用药安全评估等方面的研究,为其在药物研究及再生医学领域中的应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

mTeSR™1 (STEMCELL) 多能干细胞培养基, ROCK inhibitor Y27632、ICG 粉末(均购于 MCE), B27 添加剂、血清 FBS、细胞解离试剂 Accutase(均购于 Gibco), Matrigel™ 基质胶(购于 Corning), RIMP1640 培养基(购于 WAKO), Activin

A、ChiR 99021(均购于 BioTechne), Sodium Butyrate、Dexamethasone(Dex, 均购于 Sigma), HCM/EGM 培养基(购于 LONZA), Oncostatin M(OSM, 购于 R&D), RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、Quantifast SYBR Green PCR 试剂盒(均购于 Vazyme); 流式抗体 C-KIT-BV421、EpCAM-APC、CXCR4-PE(均购于 BD); 尿素检测试剂盒(购于 Bioassay systems), ELISA 白蛋白分泌试剂盒(购于碧云天), 抗人 ALB 单克隆抗体、抗兔 IgG 抗体(均购于 Abcam), 糖原染色 PAS 试剂盒(购于碧云天); 人源 iPS 细胞(购于 iCell 公司, DYR0100); 永生代肝细胞 HL7702(来自实验室留存)。

1.2 方法

1.2.1 人源 iPS 细胞培养 人源 iPS 细胞系以 4×10^4 细胞/cm² 细胞浓度接种于铺有基质胶的直径 6 cm 的培养皿中, 置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中, 每天换液, 6-7 天传代一次。培养基成分为: mTeSR™1 干细胞完全培养基, ROCK inhibitor Y27632(10 μM)。

1.2.2 内胚层和肝细胞的定向分化诱导 将 iPS 细胞以 1×10^6 个细胞/孔的浓度接种于铺有基质胶的六孔板中, 不同时间段培养基成分分别如下, 第 0 天: RIMP 1640 培养基, 其中含 B27 添加剂(0.5X)、Activin A(10 μM)、CHIR99021(2 μM)和 Rock Inhibitor(10 μM); 第 1-3 天: RIMP 1640 培养基, 其中含 B27 添加剂(0.5X)、Activin A(10 μM)、CHIR99021(2 μM)和 Sodium Butyrate(0.5 μM)。第 4-6 天: RIMP 1640 培养基, 其中含 B27 添加剂(0.5X)、Activin A(10 μM)和 CHIR99021(2 μM), 每天换液。第 7 天, 将每孔细胞消化后用 HCM/EGM 培养基进行重悬, 培养基成分为: HCM/EGM 培养基、FBS、Dex(100 nM), OSM(10 ng/mL), 铺于 24 孔板 4 个孔中, 分别于第 8、9、10、12、14、16、18 和 20 天进行换液, 直到第 22 天, 回收上清并收集肝细胞。

1.2.3 流式检测 在第 7 天消化并收集细胞, 经 PBS 洗两遍后, 分装到流式管中, 每管约 2×10^5 个细胞, 分别用 C-KIT, EpCAM, CXCR4 的抗体标记细胞, 4℃ 冰箱避光孵育 30 min, PBS 清洗两遍, 重悬细胞后, 用流式细胞仪(SONY SA3800)检测。

1.2.4 总 RNA 提取, cDNA 合成以及荧光定量 PCR 检测 消化并收集各时间点的细胞, 包括 iPS 细胞组、内胚层细胞组以及 HLC 细胞组。总 RNA 用诺唯赞试剂盒提取, 用核酸蛋白检测仪检测 RNA 浓度和纯度, 取 1 μg RNA 反转录成 cDNA, 然后采用荧光定量 PCR 试剂盒进行扩增, 结果用 Δ CT 法进行分析, 得到各目的基因的相对表达量。荧光定量 PCR 所用的引物序列^[19,20]见表 1。

1.2.5 ELISA 检测细胞上清中 ALB 分泌水平 收集 iPS 细胞、HLC 细胞以及原代肝细胞的 24 h 上清, 3000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液进行 ELISA 检测, 按照人 ALB ELISA 试剂盒说明书进行操作。

1.2.6 免疫荧光 用 4% 的多聚甲醛对细胞进行固定 30 min, PBS 漂洗后, 用 1% Triton X-100 进行细胞破膜 15 min, 再用 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 再用 3% 的 BSA 室温封闭 30 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 加入相应的一抗 ALB(1:100 稀释), 4℃ 冰箱过夜孵育, PBS 漂洗 3 次, 再加入相应二抗(1:500 稀释)室温孵育 1 h, 加入 DAPI 后在共聚焦显微镜下拍摄。

表 1 荧光定量 PCR 所用的引物序列

Table 1 Primers for real-time PCR

Gene	Primer sequences
NANOG	F: ATGCCTCACACGGAGACTGT R: CAGGGCTGTCCTGAATAAGC
OCT4	F: CTTCGCAAGCCCTCATTTT R: GAGAAGGCGAAATCCGAAG
FOXA2	F: AGACGGTGTTCAGAGACG R: CGGGTGAAGAAGACTGCTG
HNF4A	F: AGCAACGGACAGATGTGTGA R: TCAGACCCTGAGCCACCT
CER1	F: GCCATGAAGTACATTGGGAGA R: CACAGCCTTCGTGGGTATAG
CXCR4	F: GGATATAATGAAGTCACTATGGGAAAA R: AGTAGTGGGCTAAGGGCACA
AFP	F: TGTACTGCAGATAAGTTTAGCTGAC R: TCCTTGTAAGTGGCTTCTTGAAC
ALB	F: AATGTTGCCAAGCTGCTGA R: CTTCCCTTCATCCGAAGTT
TDO2	F: AAGAGGAATTCATAAGGATTCAGG R: AGCACCTCTTTTGCTTCTGA
G6PC	F: CCCTGTAACTGTGAGACTGG R: AAAGAGTAGATGTGACCATCACGTA
TTR	F: GCCGTGCATGTGTTTCAGA R: CAGCTCTCCAGACTCACTGGT
RBP4	F: TTTCTTTCTGATCTGCCATCG R: CCAGAAGCGCAGAAGATTG
CYP2C9	F: TGGATGAAGGTGGCAATTTT R: AGGAATAAAAACAGCTCCATGC
CYP2C19	F: ACTATTGAAAACCTTGGTAATCACTGC R: TCTCAGGGTTGTGCTTGTGTG
CYP3A4	F: GATGGCTCTCATCCAGACTT R: AGTCCATGTGAATGGGTTC
GAPDH	F: GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT R: GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

1.2.7 PAS 染色和 ICG 释放摄取 根据制造商说明,使用 PAS 染色试剂盒(碧云天)来检测糖原。用 PBS 洗涤细胞,并在室温下用 4%多聚甲醛固定 15 min,PBS 洗涤后,细胞用 0.5% 周期酸溶液氧化 7 min,PBS 洗涤,入 Schiff 试剂加盖阴暗处孵育 15 min。在亚硫酸钠溶液中孵育三轮 2 min 后,用 PBS 洗涤细胞,显微镜观察。将吡啶菁绿(ICG)粉(MCE)(10 mg)溶解在 10 mL 肝细胞培养基中,获得 1 mg/mL 的原液。细胞在 ICG 培养基中以 37℃培养 4 h 后弃去含有 ICG 的培养基,PBS 洗涤 3 次,显微镜下观察细胞对 ICG 的摄取的情况并拍照;再在细胞中加入新鲜的培养基,培养 4 h,显微镜下观察细胞释放 ICG

情况,拍照记录。

1.2.8 直接比色法检测细胞上清尿素产量 按照 2.5 中取各细胞上清的方法,吸取上清液,按照说明书方法,进行显色反应后,于酶标仪上检测 430 nm 处吸光度值,线性分析各种细胞的尿素产量。

1.3 数据处理

两组均数采用 Mann-WhitneyU 检验或非配对 t 检验进行比较。 $P < 0.05$,认为差异有统计学意义。数据来自至少三个独立的生物重复,并使用 GraphPadPrism 软件进行分析。

2 结果

2.1 简易方法由 iPS 细胞诱导为内胚层细胞及其鉴定

为了获得高效诱导分化的肝细胞,遵循其生理规律,应该先将人源诱导干细胞诱导分化为肝谱系内胚层(Endoderm)。经过 7 天的诱导培养后进行鉴定,流式结果显示:该细胞 CXCR4+EpCAM+ 细胞达 97.3%,CXCR4+C-KIT+ 细胞达 93.5%,如图 1A。在内胚层的分化环境中,iPS 细胞迅速下调了干细胞基因:NANOG 下调 100 倍以上,OCT4 下调 10 倍以上,并且上调了内胚层的相关基因:CER1 上调 70 倍,CXCR4 上调 25 倍,FOXA2 上调 2000 倍以上以及 HNF4A 上调 1000 倍以上,如图 1B。这些结果显示人源诱导干细胞可以有效分化为具有高度纯度的内胚层,与文献报道的内胚层特点相符^[20],保障了后续肝细胞可靠的内胚层诱导来源。

2.2 诱导完全内胚层高效分化为肝样细胞

将内胚层的分化培养环境换成肝谱系肝细胞的分化环境,分化的时段细胞如图 2A。内胚层朝着肝细胞的方向分化,与 iPS 细胞来源的 Endoderm 相比,分化的肝细胞 HLC 显示肝脏基因 ALB、G6PC、RBP4、TAT 和 TDO2 表达显著上调;同时,对于肝药酶 CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4 的表达也显著上调,显示一定的肝脏水平。值得注意的是,HLC 同时也高表达 AFP,AFP 提示一个持续的未成熟表型,显示 HLC 的肝功能还没有达到原代肝细胞的水平,如图 2B;另外,与 iPS 细胞相比,分化而来的肝细胞分泌 ALB 的能力上调,较之增加了 9 倍以上,更接近于原代肝细胞分泌白蛋白的能力,如图 2C。

2.3 肝细胞的功能鉴定

为了证明分化形成的肝细胞的功能特征,研究者利用免疫荧光染色检测了细胞表达 ALB 的水平,结果显示由内胚层分化而来的肝细胞表现出 ALB 阳性,如图 3A。后又进行了 PAS 染色证实了这些肝细胞的糖原储存能力,并做了 ICG 的摄取和释放证实了其肝功能,结果如图 3B,3C;另外,继续测试了肝细胞的尿素产量,与 iPS 细胞相比,体外诱导肝细胞尿素产量增加了 40 倍左右,接近原代肝细胞水平,如图 3D。这些结果显示,人源诱导干细胞分化成的内胚层可以简易高效地分化成为肝细胞。

3 讨论

多能诱导干细胞(induced pluripotent stem cells,iPSCs)与胚胎干细胞(embryonic stem cells,ESCs)类似,是一类具有自我更新和无限增殖潜能的细胞,并且能经诱导分化为机体各种类型的细胞^[21];而且 iPSCs 来源于机体本身,规避了 ESCs 的免疫

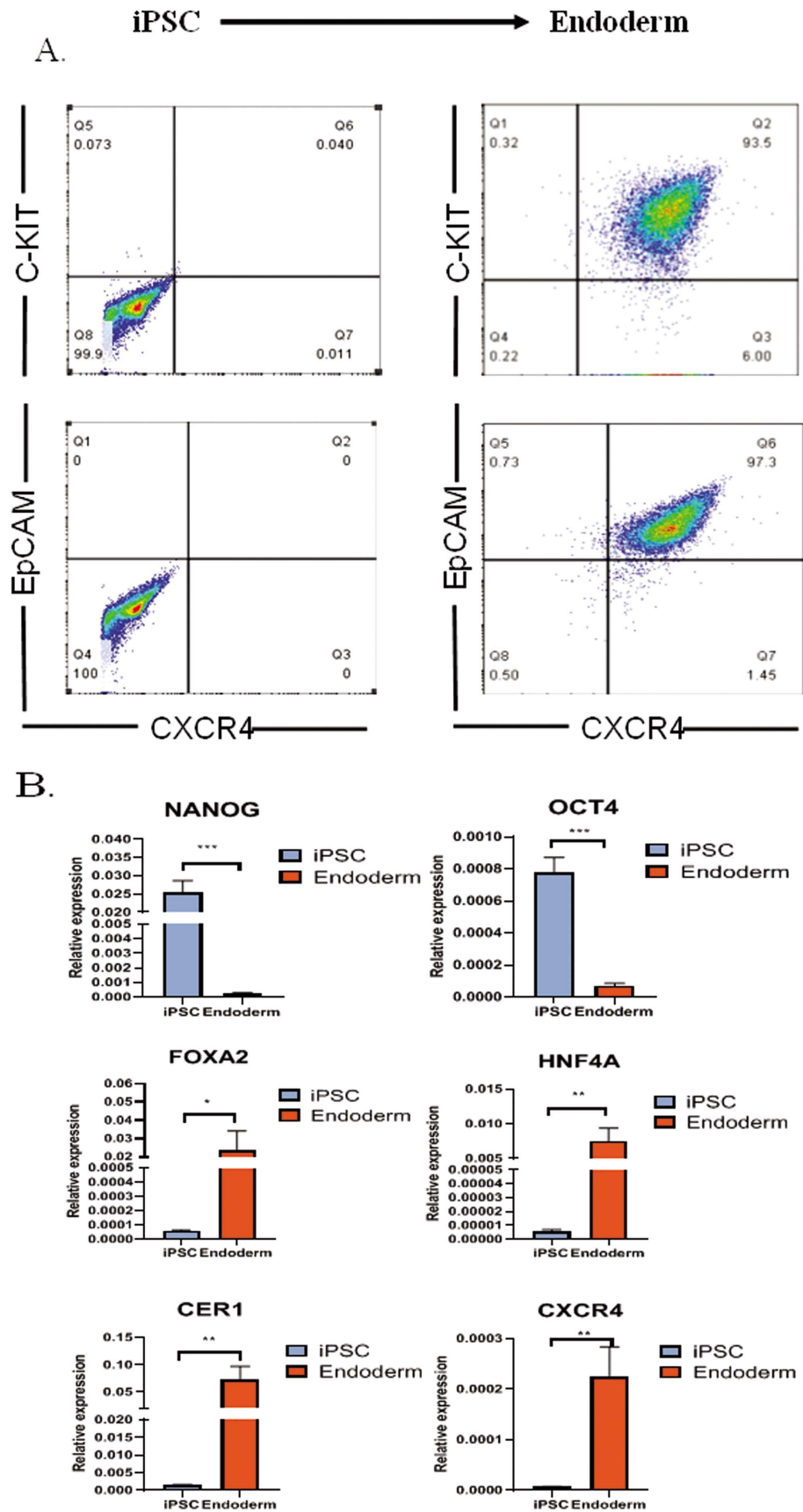


图 1 由人源 iPSC 分化为完全内胚层

Fig.1 Differentiation of definitive endoderm from hiPSC

图 A 为流式检测 CXCR4、EpCAM、C-KIT 在 iPSC 和内胚层中的表达(Flow cytometry analysis of cells expressing EpCAM, CXCR4, and C-KIT among EC-hiPSC-derived definitive endoderm.);

图 B 为荧光定量 PCR 检测干性基因和内胚层相关基因在 iPSC 细胞和内胚层的表达。P<0.05 (Expression of pluripotency factors (OCT4 and NANOG), definitive endoderm-related genes (CER1, CXCR4, FOXA2 and HNF4A), as determined by qPCR, P<0.05).

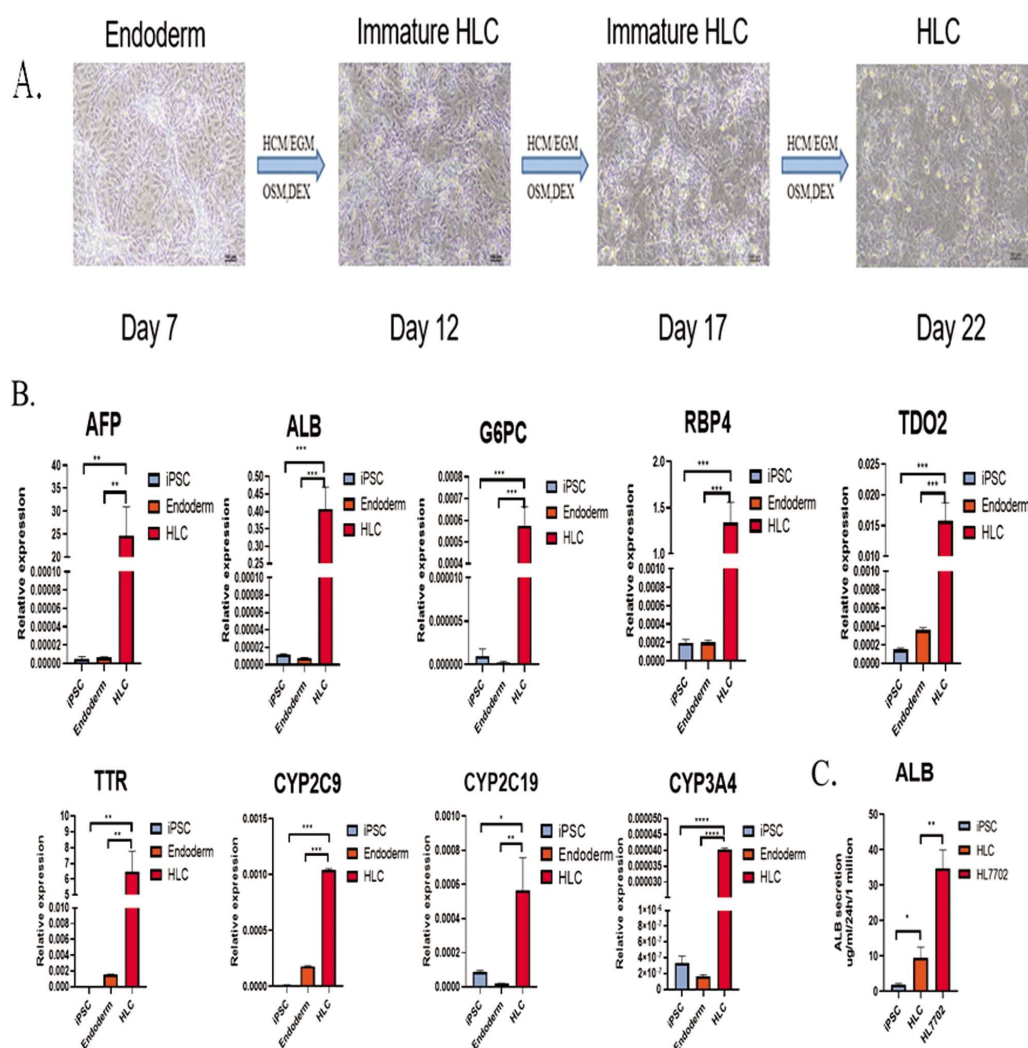


图 2 由内胚层诱导分化为肝细胞

Fig. 2 Induction of definitive endoderm into hepatocyte

图 A 为内胚层到肝细胞的诱导过程细胞图片(Schematic illustration of the hepatic differentiation process and morphology of EC-hiPSCs, definitive endoderm, immature HLCs, and HLCs during differentiation. Scale bars, 100 μ m);

图 B 为荧光定量 PCR 检测肝细胞相关标志基因在 iPSC 细胞、内胚层和肝细胞的表达。P<0.05(d Expression of an immature HLC-related gene (AFP), and an HLC-related gene (ALB, G6PC, RBP4, TDO2, TTR, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4,) in EC-hiPSCs, definitive endoderm and HLCs, as determined by qPCR, P<0.05).

图 C 为白蛋白的分泌检测(ALB production in EC-iPSC, EC-iPSC-HLCs and primary human hepatocytes (HL7702); data normalized to 1 million cells).

排斥和医学伦理等问题,具有极大的研究前景及应用潜能。目前,再生医学领域的进步正在推动治疗某些疾病的方法研究进展,进行器官移植并不总是第一治疗选择^[2]。大量研究表明,诱导多能干细胞分化的肝样细胞 (iPS-derived hepatocyte-like cells, iHLCs) 已广泛运用于 HCV 体内外感染模型的建立,并用于研究其发病机制、宿主基因在 HCV 致病机制和筛选新型抗 HCV 药物及疫苗的研发^[19]。在肝细胞移植方面,由于肝脏细胞分离质量差,细胞解冻后细胞生存能力低、同种异体细胞移植到受体肝脏有致畸免疫风险等^[2],体外培养肝细胞技术已经广泛进入大众视野,由 iPSC 来源的经过基因匹配的肝细胞使细胞移植治疗代谢或危及生命的肝脏疾病不再需要密集的免疫抑制治疗^[21,23]。自 2006 年通过逆转率病毒向小鼠皮肤细胞成功建立了第 1 株 iPSC 细胞系,1 年后以同样的方法成功建立人 iPSC 细胞系。iPS 细胞是细胞治疗的理想来源,对于肝脏疾病的细胞治疗, iPS 细胞具有巨大优势^[24]。

本研究证明 iPSC 细胞可以在体外简易定向地诱导分化为内胚层细胞,再进一步分化为具备部分成熟肝功能的肝细胞,由白蛋白阳性表达观察,大约有 80% 以上的诱导成功率。本研究证实了体外可以遵循体内肝细胞发育路径分化诱导肝细胞,也可为后续的肝脏类器官的研究奠定基础。

目前,多种肝细胞诱导方法已被报道^[15]。以往诱导方式,在由内胚层向肝样细胞诱导过程中,FGF 和 BMP 发挥重要作用,而后又需要 HGF、OSM 和表皮生长因子(EGF)在肝样细胞的成熟过程发挥作用^[10]。本研究的诱导方法有两个明显特点,一是本研究遵循肝脏体内发育方式,使 iPSC 细胞在体外按照体内路径定向分化为肝细胞^[25];二是本研究一改以往多阶段多步骤多细胞因子的诱导方法,在诱导为完全内胚层后,采用简易方法和稳定的培养体系,不需要用到 FGF、BMP、EGF 和 HGF 等就可以高效大量且稳定地诱导肝样细胞。

肝细胞诱导是二维水平的诱导方法,在建立药筛模型上由

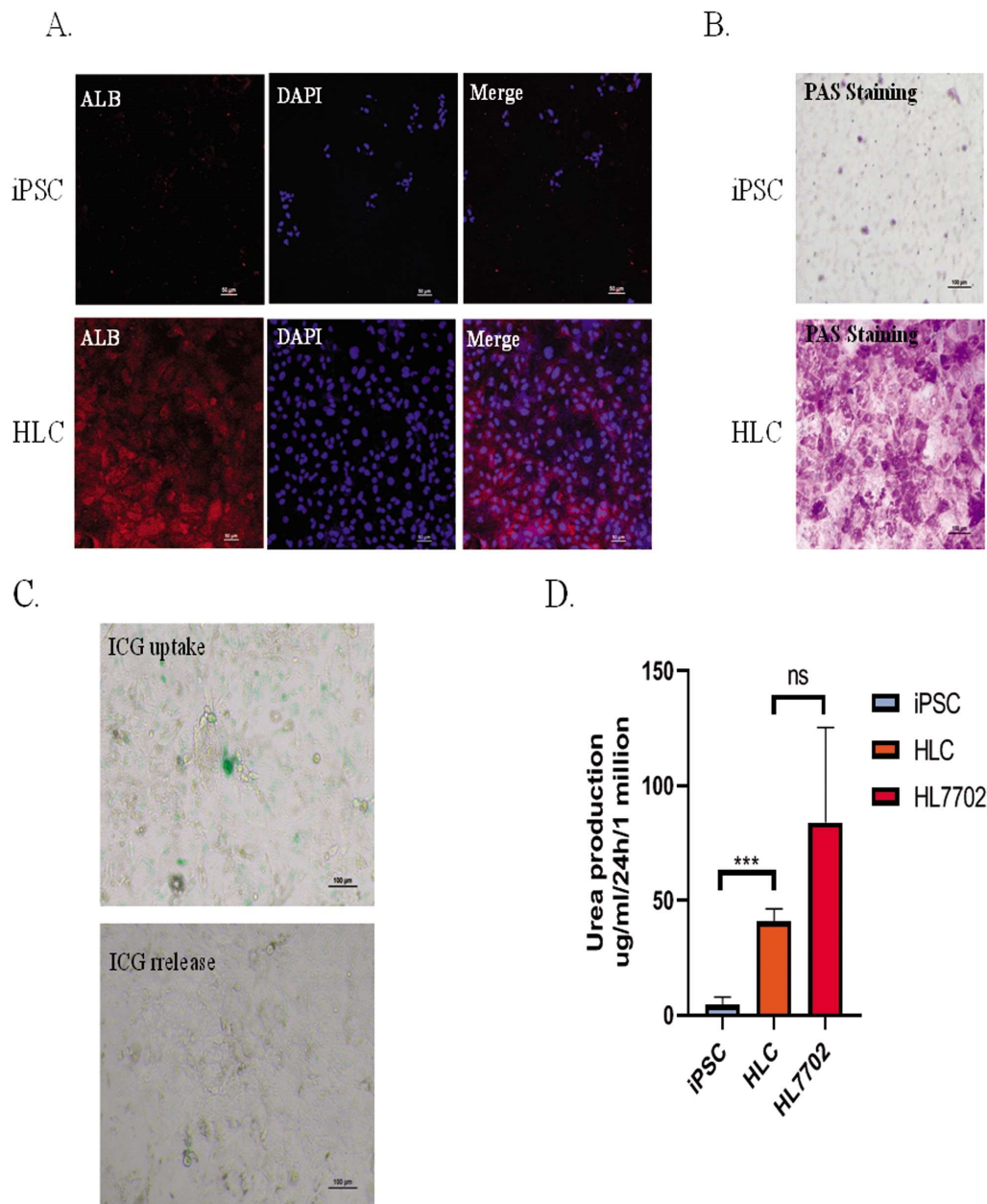


图3 由iPS诱导分化的肝细胞的功能鉴定

Fig. 3 Characterization of hiPSC derived hepatocyte

图A为免疫荧光检测ALB在HLC的表达(Immunocytochemical detection of the hepatic markers ALB in EC-hiPSC-derived HLCs. Scale bars, 50 μ m); 图B为PAS染色检测糖原储存(Glycogen storage was detected by PAS staining);

图C为吲哚菁绿摄取和释放实验,由图可见肝细胞具有摄取释放吲哚菁绿功能(ICG uptake and release were analyzed in EC-hiPSC-derived HLCs. Scale bars, 100 μ m); 图D为尿素产量测定,与iPS细胞相比,HLC细胞的产量提高40倍左右,接近于原代肝细胞HL7702(Urea production in EC-iPSC, EC-iPSC-HLCs and HL7702; data normalized to 1 million cells).

于缺乏完整的肝脏微环境,无法准确模拟出药筛环境^[26]。近年来,人们采用了3D细胞培养和共培养系统来维持和增强HLC的肝脏特异性功能。使用3D细胞培养装置,如中空的3D灌注生物反应器^[27]、纳米颗粒平板^[28]、微载体培养系统^[29]、微模板,可增强HLC肝功能^[15]。综上所述,本研究结果初步研发出体外简易高效诱导出肝样细胞,基于现有研究结果,可为后续大量体外制备肝样细胞,进一步进行肝脏类器官的诱导方法探索,建立稳定的肝脏类器官诱导体系,以器官水平探索建立更好的药筛模型和移植模型^[30]。

参考文献(References)

- [1] 邢谦哲,杜智. 胚胎干细胞/诱导多能干细胞向肝细胞诱导分化的研究进展[J]. 医学综述, 2016, 22(09): 1682-1686
- [2] NGUYEN M P, JAIN V, IANSANTE V, et al. Clinical application of hepatocyte transplantation: current status, applicability, limitations, and future outlook[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2020, 14(3): 185-196
- [3] INOUE T, IWAZAKI N, ARAKI T, et al. Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatocytes and their Culturing Methods to Maintain Liver Functions for Pharmacokinetics and Safety Evaluation of Pharmaceuticals[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2020, 21(9): 773-779

- [4] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676
- [5] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors [J]. *Cell*, 2007, 131(5): 861-872
- [6] OKITA K, YAMAKAWA T, MATSUMURA Y, et al. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells[J]. *Stem Cells*, 2013, 31(3): 458-466
- [7] GREENBAUM L E. From skin cells to hepatocytes: advances in application of iPS cell technology [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(9): 3102-3105
- [8] KISKINIS E, EGGAN K. Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(1): 51-59
- [9] ZHANG Q, YANG Y, ZHANG J, et al. Efficient derivation of functional hepatocytes from mouse induced pluripotent stem cells by a combination of cytokines and sodium butyrate [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124(22): 3786-3793
- [10] 孙超, 范建高. iPS 细胞向肝系细胞诱导分化的研究进展 [J]. *国际消化病杂志*, 2012, 32(01): 48-9+53
- [11] SI-TAYEB K, NOTO F K, NAGAOKA M, et al. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells[J]. *Hepatology*, 2010, 51(1): 297-305
- [12] 邱丹丹, 陆彩霞, 代解杰. 诱导多能干细胞来源的肝细胞在 HCV 感染模型中的应用 [J]. *中国生物工程杂志*, 2020, 40(11): 67-72
- [13] TOBA Y, KISO A, NAKAMAE S, et al. FGF signal is not required for hepatoblast differentiation of human iPS cells[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 3713
- [14] 李裕珍, 冯丽娟, 潘益巧, 等. 骨髓间充质干细胞诱导分化为肝细胞的研究进展[J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(09): 130-135
- [15] SAITO Y, IKEMOTO T, MORINE Y, et al. Current status of hepatocyte-like cell therapy from stem cells[J]. *Surg Today*, 2021, 51(3): 340-349
- [16] CHEN Y F, TSENG C Y, WANG H W, et al. Rapid generation of mature hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells by an efficient three-step protocol [J]. *Hepatology*, 2012, 55(4): 1193-1203
- [17] CAI J, ZHAO Y, LIU Y, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells [J]. *Hepatology*, 2007, 45(5): 1229-1239
- [18] MUN S J, RYU J S, LEE M O, et al. Generation of expandable human pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like liver organoids [J]. *J Hepatol*, 2019, 71(5): 970-985
- [19] NIE Y Z, ZHENG Y W, MIYAKAWA K, et al. Recapitulation of hepatitis B virus-host interactions in liver organoids from human induced pluripotent stem cells[J]. *EBioMedicine*, 2018, 35: 114-123
- [20] NIE Y Z, ZHENG Y W, OGAWA M, et al. Human liver organoids generated with single donor-derived multiple cells rescue mice from acute liver failure[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 5
- [21] GOULART E, DE CAIRES-JUNIOR L C, TELLES-SILVA K A, et al. Adult and iPS-derived non-parenchymal cells regulate liver organoid development through differential modulation of Wnt and TGF- β [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 258
- [22] PAREJA E, CORTÉS M, GÓMEZ-LECHÓN M J, et al. Current status and future perspectives of hepatocyte transplantation [J]. *Cir Esp*, 2014, 92(2): 74-81
- [23] KAJIWARA M, AOI T, OKITA K, et al. Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(31): 12538-12543
- [24] KIMURA K, HORIGUCHI I, KIDO T, et al. Enhanced Hepatic Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Gas-Permeable Membrane [J]. *Tissue Eng Part A*, 2019, 25(5-6): 457-467
- [25] IWAO T, MATSUNAGA T. Generation of human iPS cell-derived hepatocytes and enterocytes for application to drug disposition studies [J]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 2019, 154(2): 72-77
- [26] GAO X, LI R, CAHAN P, et al. Hepatocyte-like cells derived from human induced pluripotent stem cells using small molecules: implications of a transcriptomic study [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 393
- [27] MIKI T, RING A, GERLACH J. Hepatic differentiation of human embryonic stem cells is promoted by three-dimensional dynamic perfusion culture conditions[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2011, 17(5): 557-568
- [28] TAKAYAMA K, KAWABATA K, NAGAMOTO Y, et al. 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(7): 1781-1789
- [29] PARK Y, CHEN Y, ORDOVAS L, et al. Hepatic differentiation of human embryonic stem cells on microcarriers [J]. *J Biotechnol*, 2014, 174: 39-48
- [30] TAKAYAMA K. Pharmaceutical Research on Liver Diseases Using iPS Cell and Genome Editing Technologies [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2019, 139(10): 1219-1225