

网络出版时间:2017-11-06 13:53

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2017.12.003

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20171106.1353.006.html>

# 多能干细胞来源的肝细胞诱导分化及其 应用研究进展

王 洋<sup>1</sup>, 彭莹莹<sup>1</sup>, 段星祥<sup>1</sup>, 余 娟<sup>2</sup>, 孙 懿<sup>1,2</sup>

(1 中南大学 基础医学院生殖与干细胞工程研究所, 湖南 长沙 410078; 2 人类干细胞国家工程研究中心, 湖南 长沙 410205)

**[摘 要]** 胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)是一类具有多能性和自我更新能力的多能干细胞, 这些细胞具有无限增殖能力, 并有潜能分化为机体三胚层所有类型的细胞。多能干细胞来源的肝细胞能够作为肝细胞的替代物应用于体外药物筛选和肝脏疾病的治疗。文章对多能干细胞向肝细胞的诱导研究、多能性干细胞来源肝细胞的鉴定方案研究及其在药物筛选和疾病治疗方面的研究进行了综述分析, 并对未来的研究方向进行了总结与展望。

**[关键词]** 多能干细胞; 分化; 肝细胞

**[中图分类号]** Q25; Q245

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2017)12-0015-08

## Research progress on differentiation and application of pluripotent stem cells derived hepatocyte-like cells

WANG Yang<sup>1</sup>, PENG Yingying<sup>1</sup>, DUAN Xingxiang<sup>1</sup>, YU Juan<sup>2</sup>, SUN Yi<sup>1,2</sup>

(1 *Institute of Reproduction and Stem Cell Engineering, School of Basic Medical Science, Central South University, Changsha, Hunan 410078, China*; 2 *National Engineering Research Center of Human Stem Cells, Changsha, Hunan 410205, China*)

**Abstract:** Embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs) are pluripotent stem cells with the characteristics of self-renewal and pluripotency. They have the ability of infinite proliferation and forming all types of cells in the three germ layers. The pluripotent stem cells derived hepatocyte-like cells could serve as alternative to liver cells applied in early pharmaceutical screening and treatment of liver diseases. In this paper, we review the strategies of producing hepatocyte-like cells from pluripotent stem cells, the assessment of pluripotent stem cells derived hepatocyte-like cells, and the application of pluripotent stem cells derived hepatocyte-like cells in pharmaceutical screening and treatment of liver diseases. Future research directions are also prospected.

**Key words:** pluripotent stem cells; differentiation; hepatocytes

肝脏是人体最关键的代谢中枢, 参与多种生理学调控过程。原代肝细胞被广泛应用于肝脏病理及生理学方面的研究, 主要包括肝脏药物代谢和药物

筛选的研究、在生物人工肝支持系统中的应用研究以及对肝脏疾病进行细胞治疗的研究, 但研究实践中对肝细胞的需求量较大, 而原代肝细胞的来源有

**[收稿日期]** 2016-10-16

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81101510); 湖南省自然科学基金项目(14JJ2004, 09JJ4009); 湖南省科学技术厅科技计划项目(2014SK3066)

**[作者简介]** 王 洋(1988—), 女, 山西太谷人, 硕士, 主要从事干细胞与再生医学研究。E-mail: wyang36566@163.com

**[通信作者]** 孙 懿(1979—), 女, 湖南邵阳人, 副研究员, 博士, 硕士生导师, 主要从事干细胞与再生医学研究。E-mail: sunyi66@csu.edu.cn

限,这极大限制了原代肝细胞在临床及研究领域的应用<sup>[1-2]</sup>。因此,有必要寻找一种能够替代原代肝细胞的细胞资源。胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和诱导多能干细胞(induced pluripotent stem, iPSCs)是一类具有多能性及自我更新能力的多能干细胞,其具有无限增殖能力,具有分化为机体三胚层所有类型细胞的潜能,是再生医学研究的“种子细胞”,通过体外诱导方式将多能干细胞定向诱导为肝细胞是获得原代肝细胞替代产品的有效途径<sup>[3-4]</sup>。在多能性干细胞向肝细胞诱导分化的研究中,如何将多能干细胞高效地诱导为能够替代原代肝细胞发挥作用的肝细胞,以及如何将多能干细胞来源的肝细胞有效地应用于临床及实践中是研究的主要内容。本文就目前多能干细胞向肝细胞定向诱导分化的方法、检测方案以及多能干细胞来源的肝细胞在临床及研究中的应用进展进行了总结。

## 1 肝脏的发育过程与信号调控

肝脏发育是一个高度动态的过程,肝细胞的分化和成熟要经历一系列复杂的调控过程<sup>[5-6]</sup>。肝脏的发育主要包括内胚层细胞向肝脏谱系细胞特化、肝祖细胞形成和肝细胞成熟 3 个阶段<sup>[6]</sup>。肝细胞起源于内胚层,研究表明肝细胞核因子 3 (hepatocyte nuclear factor 3, HNF3)、肝细胞核因子 1 $\beta$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\beta$ , HNF1 $\beta$ )和 GATA 结合蛋白 4 (GATA binding protein 4, GATA4)在内胚层细胞向肝脏谱系细胞发育的起始过程中发挥作用,同时肝脏谱系细胞特化的过程还受到来自心肌中胚层的成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF)和来自横隔间充质(septum transversum mesenchyme, STM)的骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP)等信号因子的正向调控<sup>[7-8]</sup>。在肝细胞特化之后,多种信号因子继续联合发挥作用,特化的内胚层细胞向肝祖细胞分化,肝芽形成。在此过程中,同源异性框因子 (haematopoietically expressed homeobox, HEX)决定肝芽的形成, GATA4 通过反式激活 HEX 启动子促进肝祖细胞发育<sup>[9-11]</sup>。肝祖细胞同时具有向肝细胞和胆管细胞分化的能力,此过程同样受到诸多信号因子的调控,其中肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF)、抑瘤蛋白 M (oncostatin M, OSM)、CCAAT 增强子结合蛋白  $\alpha$  (CCAAT/enhancer binding protein alpha, C/BEP $\alpha$ )等可促进肝细胞的成熟<sup>[12-13]</sup>。Y 染色体的性决定区框 9 蛋白质 (RY-related high

mobility group-box gene 9, SOX9)和 Notch2 信号通路的激活等因素可促进肝祖细胞向胆管细胞的分化<sup>[14-15]</sup>。

## 2 多能干细胞向肝细胞的定向诱导分化

现有的研究中,多能干细胞向肝细胞的定向诱导分化策略多是模拟肝细胞在体内的发育过程,根据肝细胞在体内不同阶段的发育调控机制,人为创造相似发育环境、添加相关外源性诱导物质或者向细胞内转入相关基因,以使获得的细胞尽可能类似于原代肝细胞。再通过对获得的细胞进行一系列肝细胞特异性标记及功能鉴定,以确定其能够替代原代肝细胞在研究及应用中发挥作用。

### 2.1 多能干细胞向肝细胞的定向诱导方案

2.1.1 自发分化和体内诱导途径 Choi 等<sup>[16]</sup>通过脾脏注射方式将鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells, mESCs)植入免疫缺陷鼠体内,这些 mESCs 形成具有肝细胞抗原 (HEP-PAR1)、苯丙氨酸羟化酶等一些肝细胞特异性标记的细胞,此方式虽然形成了肝细胞样细胞,但最终产生了畸胎瘤,限制了此方式的临床应用。Hamazaki 等<sup>[17]</sup>利用 ESCs 形成拟胚体 (embryoid body, EB),将 EB 重新贴壁培养后加入 HGF、OSM、Insulin、Transferrin、Selenious acid 等因子促进其分化,获得的细胞表达肝细胞特异性基因。Chinzei 等<sup>[18]</sup>同样利用 ESCs 形成 EB,一方面将 EB 重新贴壁培养后通过加入因子的方式进行体外诱导分化,另一方面将细胞分离并植入动物体内进行体内分化,两种途径都获得类似的能够分泌白蛋白 (albumin, ALB)和合成尿素的肝细胞,但是由于分化的不确定性,EB 中只存在小部分能够分化为肝细胞的细胞群体,自发分化途径获得的肝细胞不纯且数量有限,限制了其实际应用。

2.1.2 添加外源性生长因子的诱导途径 体外诱导分化模式多是通过模拟肝脏在体内发育过程中所涉及的多种调控网络来实现,大致可分为内胚层诱导阶段、肝谱系细胞特异性分化阶段和肝细胞成熟阶段。Hay 等<sup>[19]</sup>在人胚胎干细胞 (human embryonic stem cells, hESCs) 诱导过程中先后加入二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、HGF、表皮细胞生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 和 OSM 诱导肝细胞成熟,获得的细胞可表达部分肝细胞标记,具有部分肝细胞功能,但该方法诱导效率较低;改进诱导方案后,在使用 DMSO 诱导肝脏谱系

细胞分化前加入丁酸钠(sodium butyrate, NaB)、激活素 A(activin A)等促进细胞向限定性内胚层分化,再通过 HGF 和 OSM 诱导肝细胞成熟,诱导效率从改进方案前的 10% 提高至 70%<sup>[20]</sup>。Chen 等<sup>[21]</sup>的研究指出,在多能干细胞向肝细胞诱导的起始阶段加入 HGF,能够协同 Activin A 和 Wnt 家族蛋白 3a(Wnt3a)提高内胚层的分化效率,且获得的肝细胞与成熟肝细胞表达模式类似。但 Baxter 等<sup>[22]</sup>在对多能干细胞来源的肝细胞、成熟肝细胞及胎肝细胞的表型及功能进行比较后指出,目前获得的肝细胞更接近于胎肝细胞,而不是成体肝细胞。

**2.1.3 添加小分子物质的诱导途径** 利用生长因子诱导多能干细胞分化为肝细胞是替代原代肝细胞的一种有效途径,但由于生长因子价格昂贵,在一定程度上限制了大规模诱导的开展,因此选择一种相对低价且有效的诱导方式,将有助于多能干细胞来源的肝细胞的应用。Touboul 等<sup>[23]</sup>在限定性内胚层形成过程中,在加入骨形态发生蛋白 4(bone morphogenetic protein, BMP4)的同时加入小分子物质 LY294003,在肝谱系细胞特化阶段添加成纤维细胞生长因子 10(fibroblast growth factor, FGF10)、视黄酸(retinoic acid, RA)和小分子物质 SB431542,在肝细胞成熟阶段则加入成纤维细胞生长因子 4(fibroblast growth factor, FGF4)、HGF 和 EGF,获得了具有一定肝细胞表型和代谢功能的肝细胞。Tasnim 等<sup>[24]</sup>利用小分子物质 LY294002、bromoindirubin-3'-oxime 联合 activin A 诱导多能干细胞分化至内胚层,利用 DMSO、NaB 诱导肝谱系细胞形成,在肝细胞成熟阶段加入 SB431542 和 DMSO,获得具有一定肝细胞表型和代谢功能的肝细胞,并指出小分子诱导途径的成本比生长因子诱导途径降低大约 67%。

**2.1.4 转基因方式的诱导途径** 一些研究通过转入特定的基因来促进肝细胞的诱导分化,如 Takayama 等<sup>[25]</sup>和 Inamura 等<sup>[26]</sup>在诱导过程中将 SOX17、HEX 基因转入多能干细胞中,有效地促进了多能干细胞向肝细胞的分化。Takayama 等<sup>[27]</sup>进一步研究发现,通过 SOX17 和 HEX 基因将多能干细胞诱导至肝母细胞阶段后,再转入 HNF4 $\alpha$  基因,能够进一步促进肝细胞的成熟。但由于经过基因改造的细胞存在潜在风险,研究者对该种方式所获肝细胞的应用将更为慎重。

**2.1.5 共培养方式的诱导途径** 与体外培养的原代肝细胞相似,诱导所得的肝细胞在体外培养过程

中同样存在丧失其功能的现象<sup>[28]</sup>。为了获得功能更加全面的肝细胞,将诱导过程中特定阶段的细胞与其他类型的细胞共培养,可提升诱导获得的肝细胞的功能。Takebe 等<sup>[29-30]</sup>将 iPSC 诱导至肝脏内胚层后将其与人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)和间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)共培养,3 d 后即可自发形成三维球状结构,Takebe 称其为肝芽(liver bud, LB),将 LB 移植入 NOD/SCID 鼠体内后,能与周围组织融合形成有功能的血管,这种培养方式为多能干细胞培养至功能性组织的研究提供了新方向。Pfeiffer 等<sup>[28]</sup>的研究指出,在体外培养过程中,若能模拟体内肝脏结构,创造肝细胞在体内所处的环境,包括肝细胞与肝脏附属细胞之间的相互作用,将有利于肝细胞在体外培养过程中功能的维持。

**2.1.6 肝细胞大规模诱导培养途径** 普通的二维培养条件下难以获得大量细胞来满足临床和其他应用研究对细胞的需求,大规模培养是获得大量细胞的一种有效途径。Zhang 等<sup>[31]</sup>在 mESCs 向肝细胞诱导的过程中应用微重力培养体系,将胚胎干细胞成功诱导并扩增为表达肝细胞标记且具有一定功能的肝细胞,通过 21 d 的诱导培养,每个生物反应器中可获得  $(3.2 \pm 1.1) \times 10^9$  个肝细胞。Park 等<sup>[32]</sup>的研究采用一种微载体培养体系,实现了大量细胞的培养,并证实在这种培养模式下,可以实现 ESCs 向功能性肝细胞的诱导分化。

## 2.2 多能干细胞来源肝细胞的鉴定

肝脏是机体内重要的代谢器官,参与多项生理学代谢过程,包括对营养物质的代谢和对非营养物质的生物转化<sup>[33]</sup>。对诱导获得的肝细胞的检测评估,不仅包括对肝细胞标记基因和蛋白表达的检测,还包括对肝细胞功能的检测,此外多能干细胞来源的肝细胞要应用于临床,还应该进行使用安全性检测<sup>[34-35]</sup>。

**2.2.1 肝谱系细胞特异性标记检测** 肝脏谱系相关标记随着肝细胞的形成发生时序性的改变,在多能干细胞向肝细胞诱导的过程中,需要检测这些特异性标记的表达。以 ESCs 向肝细胞诱导为例,在肝细胞发生的最初阶段,ESCs 分化至限定性内胚层,该阶段的细胞可以检测到 FoxA2、Sox17、GATA4、Brachyury、E-cadherin 和 Goosecoid 等限定性内胚层标记基因的表达<sup>[22,36]</sup>。之后,细胞向着肝脏谱系细胞分化,早期肝谱系细胞标记基因逐渐表达,这些标记基因包括 HNF1 $\alpha$ 、HNF1 $\beta$ 、HNF4 $\alpha$ 、

*HNF3 $\beta$* 、*HNF6*、*PROX1*、*AFP* 和 *TTR* 等<sup>[13,21,30,36]</sup>。最后,肝细胞特异性标记如 *ALB*、*AAT*、*CYP450*、*TAT*、*Transferrin*、*ASGPR1*、*con-*

*nexin 32* 等开始表达并达到峰值,表明肝脏谱系细胞走向成熟<sup>[13,20,37]</sup>(表 1)。

表 1 多能干细胞来源肝细胞的标记检测

Table 1 Markers to measure pluripotent stem cells derived hepatocyte-like cells

检测项目 Categories of assays	相关检测内容 Cells measured
内胚层标记 Endoderm markers	<i>FoxA2</i> 、 <i>Sox17</i> 、 <i>GATA4</i> 、 <i>Brachyury</i> 、 <i>E-cadherin</i> 、 <i>Gooseoid</i> <sup>[22,36]</sup>
肝谱系细胞标记 Hepatic specified markers	<i>HNF1<math>\alpha</math></i> 、 <i>HNF1<math>\beta</math></i> 、 <i>HNF4<math>\alpha</math></i> 、 <i>HNF3<math>\beta</math></i> 、 <i>HNF6</i> 、 <i>PROX1</i> 、 <i>AFP</i> 、 <i>TTR</i> <sup>[13,21,30,36]</sup>
成熟肝细胞标记 Adult hepatocyte markers	<i>ALB</i> 、 <i>AAT</i> 、 <i>CYP450</i> 、 <i>TAT</i> 、 <i>Transferrin</i> 、 <i>ASGPR1</i> 、 <i>connexin 32</i> <sup>[13,22,37]</sup>

2.2.2 肝细胞功能检测 肝脏是机体物质代谢的核心器官,参与机体对营养物质的合成、分解和对非营养类物质的生物转化<sup>[33]</sup>。体外获得的肝细胞不仅应具有肝细胞的形态和表型,还应具有肝细胞功能,这样才能替代肝细胞发挥其研究和应用价值。

作为维持血糖平衡的重要器官,肝脏具有糖原储存和糖原分解能力,同时也是糖异生的重要场所,研究中对于肝细胞糖类代谢功能的检测主要包括通过葡萄糖 6 磷酸酶活性检测糖代谢能力<sup>[38]</sup>和通过 PAS(periodic acid-Schiff stain,PAS)法检测糖原储存能力<sup>[21]</sup>。肝细胞具有代谢脂类物质的能力,可通过检测肝细胞摄取低密度脂蛋白(low density lipoprotein,LDL)的能力<sup>[39]</sup>、检测 LDL 受体(low density lipoprotein receptor,LDL-R)<sup>[40]</sup>以及通过油红 O 染色,鉴定获得的肝细胞对脂类物质的代谢功能<sup>[37]</sup>。白蛋白是肝细胞合成最丰富的蛋白,出现于早期胎肝细胞和成熟肝细胞<sup>[41]</sup>,是干细胞来源肝细胞最重要的检测指标之一,并且诸多研究显示多能干细胞来源的肝细胞具有白蛋白合成能力<sup>[22]</sup>。此

外,肝脏还能将蛋白代谢过程中产生的氨基转化为尿素,因此尿素合成功能也是检测多能干细胞来源的肝细胞是否具有功能的一项重要指标<sup>[42]</sup>。

肝细胞还是非营养类物质进行生物转化的最重要器官,细胞色素 P450(cytochromes P450,CYP450)是生物转化过程中最重要的酶之一,也是目前已知底物最广泛的生物转化酶类<sup>[43]</sup>。CYP3A4 亚族是 CYP450 酶家族中最具活性和分布最广泛的一种,参与了 CYP450 酶系 50%底物的代谢,是检测肝细胞药物代谢能力的首选指标,CYP2D6、CYP2C9、CYP1A2 分别占 CYP450 酶系代谢底物的 30%、10%和 4%,CYP2A6、CYP2C19 均约占 CYP450 酶系代谢底物的 2%,包括上述 CYP450 酶在内的其他多数 CYP450 亚型酶类,均是评估肝细胞生物转化功能的常用指标<sup>[23-24,44]</sup>。研究中常用的检测方法主要为加入特定药物刺激后,检测相应 CYP450 亚型的基因表达、酶活性,或者检测特定药物代谢产物<sup>[45]</sup>(表 2)。

表 2 多能干细胞来源肝细胞的功能检测

Table 2 Function detection of pluripotent stem cells derived hepatocyte-like cells

检测项目 Categories of assays	相关检测内容 Functions measured
糖代谢能力 Glucose metabolism	葡萄糖-6-磷酸活性 <sup>[38]</sup> 、PAS 染色 <sup>[21]</sup> Glucose-6-phosphatase activity <sup>[38]</sup> ,Periodic acid-schiff stain <sup>[21]</sup>
脂肪代谢能力 Lipid metabolism	LDL 摄取 <sup>[39]</sup> 、LDL 受体表达 <sup>[40]</sup> 、油红 O 染色 <sup>[37]</sup> LDL uptake <sup>[39]</sup> ,LDL-R expression <sup>[40]</sup> ,Oil red O staining <sup>[37]</sup>
蛋白代谢能力 Protein metabolism	白蛋白合成 <sup>[22]</sup> 、尿素合成 <sup>[42]</sup> Albumin production <sup>[22]</sup> ,Urea production <sup>[42]</sup>
药物代谢能力 Drug metabolism	CYP450 酶基因表达检测 Assays for gene expression of CYP450; CYP1A1、CYP2A1、CYP3A1、CYP3A4、CYP1A2、CYP2A6、CYP7A1、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C12、CYP2C19、CYP2C7、CYP2C8、CYP2D6、CYP2E1 <sup>[27,37,39,44]</sup> CYP450 酶活性检测 Assays for enzyme activities of CYP450; CYP3A、CYP2D6、CYP3A4、CYP2C19、CYP2C9 <sup>[13,21-22,33,46]</sup> CYP450 药物代谢产物检测 Assays for metabolite of CYP450; CYP1A2、CYP2A6、CYP3A4、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C19、CYP2D6 <sup>[2,24,38,44]</sup>

2.2.3 多能干细胞来源肝细胞的应用安全性检测 体外获得的肝细胞植入体内是否安全,是其能否投入应用必须考虑的问题。Chinzei 等<sup>[18]</sup>在体外诱导 EB 向肝细胞分化,分别在诱导过程中的不同阶段将细胞注入 C57/BL6 小鼠肝脏和脾脏内,发现注

射诱导初始的胚胎干细胞,无论在肝脏还是脾脏中畸胎瘤的形成率均达 86%;注射诱导后的细胞畸胎瘤形成率在肝、脾中均有下降,但脾脏中畸胎瘤的形成率高于肝脏,于诱导 9 d 后将 EB 注射到体内的结果是注射入脾脏的畸胎瘤形成率为 20%,而注射入

肝脏的畸胎瘤形成率为 0%。在 Zhang 等<sup>[31]</sup>的研究中,将三维培养诱导获得的肝细胞注入 6~8 周龄裸鼠脾脏中,经过 2 个月的观察未发现肿瘤形成,同时在移植鼠的肝脏中发现了标记的肝细胞。从已有的检测结果看,诱导后的细胞在致癌性方面是安全的,但这并不能充分说明诱导获得的细胞可应用于临床。《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》和《干细胞临床转化指南》中就指出,干细胞产品临床转化应用中需要进行细胞纯度、细胞内外源性致病因子、异常免疫学反应等一系列的检测<sup>[34-35]</sup>。

### 3 多能干细胞来源肝细胞的应用

体外分离培养的原代肝细胞可应用于多领域的研究,但受到肝细胞(尤其是人源性肝细胞)来源缺乏的限制,其临床应用尚未全面展开<sup>[3,47]</sup>。多能干细胞具有无限增殖能力,并且有潜力分化为包括肝细胞在内的多种体细胞,是获得原代肝细胞替代产品的有效细胞来源。

肝脏是机体内生物转化发生的主要器官,是药物毒性代谢研究中最重要靶器官,体外培养的肝细胞是体外药物筛选和药物代谢研究的较好选择<sup>[48-49]</sup>。目前体外应用的肝细胞主要有永生化的肝细胞、原代肝细胞等。永生化的肝细胞一般在表型和功能方面与正常肝细胞不一致。原代肝细胞是用于药物筛选和药物代谢研究的理想材料<sup>[50-51]</sup>,但原代培养的肝细胞容易在培养过程中丧失其形态结构和功能,同时其取材来源有限,限制了其在研究中的应用<sup>[52]</sup>。因此,多能干细胞来源的肝细胞在药物筛选和药物代谢研究中具有广阔的应用前景<sup>[46,53]</sup>。此外,多能干细胞来源的肝细胞在分化过程中模拟了肝谱系细胞的形成过程,因此是肝脏发育和肝细胞研究的良好材料。

肝移植是肝脏疾病最有效的治疗方式,但供体肝来源短缺限制了其在临床中的应用<sup>[54-55]</sup>。研究表明,肝细胞移植有助于功能衰竭的肝脏恢复功能,延长患者的生存期限<sup>[56-57]</sup>。多能干细胞来源的肝细胞表达肝细胞特异性标记,具有肝细胞功能<sup>[37,58]</sup>。Takebe 等<sup>[30]</sup>、Ramanathan 等<sup>[59]</sup>和 Nagamoto 等<sup>[60]</sup>利用体外获得的肝细胞,分别以不同形式(包括共培养获得的肝芽、单细胞形式、细胞片形式)对急性肝功能障碍疾病动物模型进行治疗,均取得了一定的治疗效果,提示多能干细胞来源的肝细胞有望成为临床肝脏疾病治疗的细胞产品。

生物人工肝或混合人工肝(hybrid artificial liv-

er, HAL)可作为一种肝移植过渡支持手段,功能性肝细胞是生物人工肝得以应用的关键材料,原代肝细胞是最佳的选择,但其应用仍受到来源短缺的限制。多能干细胞来源的肝细胞同样为生物人工肝的应用提供了广泛来源。Mizumoto 等<sup>[61]</sup>建立了一种 PUF-HAL(polyurethane foam, PUF)模块,该模块包含的 ESCs 来源的具有肝细胞功能的细胞,在动物试验中能够有效支持肝脏功能,表明 ESCs 来源的肝细胞可作为人工肝的一个有效组件,在肝脏疾病的治疗中发挥作用。

### 4 总结与展望

大量研究利用多能干细胞通过多种途径的诱导培养获得肝细胞,这些诱导方式各有优劣:自发分化和体内分化为细胞提供了一个相对接近于自然分化的细胞生长环境,但其分化方向难以严格控制;目前应用较多的转基因诱导、外源性生长因子诱导以及小分子定向诱导中,转基因途径可能存在潜在风险,而外源性细胞生长因子途径则存在成本昂贵的问题,使用价格相对低廉的小分子诱导方式也许是一种解决途径。虽然上述方法都能在培养中获得具有一定肝细胞表型和功能的肝细胞样细胞,但这些方法获得的多能干细胞来源的肝细胞尚未达到完全成熟,同时也尚不能完全满足未来的临床应用。研究者们正通过探索大规模诱导培养体系,以期获得大量的诱导肝细胞,同时也采用共培养等途径获得具有更加完善功能的肝细胞。总之,高效地获得肝细胞,是多能干细胞向肝细胞诱导研究的努力方向。

进一步而言,全面鉴定多能干细胞来源的肝细胞是其能够应用于实践的保证,已有研究主要针对肝细胞谱系细胞特异性标记和肝细胞特异性功能两大方面进行鉴定,但不同研究中鉴定的标记和功能不尽相同,因此有必要制定出一套尽可能完善的肝细胞鉴定方案,这将有利于推进诱导方案的探索研究。此外,多能干细胞来源的肝细胞应用于疾病治疗的潜在风险,如成瘤性、免疫排斥反应等研究尚不充分,从临床应用出发,有必要制定出一系列诱导后细胞使用安全性的检测方案,这将有利于推进其临床应用研究。

关于多能干细胞来源的肝细胞的应用研究,主要包括肝毒性药物筛选、生物人工肝的研究以及对肝功能衰竭的治疗。但目前关于多能干细胞来源的肝细胞的应用研究尚处于发展阶段,虽然一些学者已经针对诱导获得肝细胞的药物代谢能力进行研

究,证明其具有一定的药物代谢敏感性,并指出其是药物毒性检测的潜在资源,但尚未见其广泛应用的报道<sup>[46,53]</sup>。目前已有多项研究表明,体外诱导培养获得的肝细胞能够应用于肝脏疾病的治疗,并在一些较大哺乳动物中得到验证,进一步临床试验的展开将会极大推进多能干细胞来源肝细胞在生物人工肝领域的应用<sup>[62]</sup>。在肝脏疾病治疗方面,也已经有数项试验研究了不同注射方式及移植途径下,多能干细胞来源的肝细胞对肝功能衰竭动物模型的治疗效果,但尚未对治疗途径和治疗效果进行全面比较评估的报道,因此多能干细胞来源的肝细胞如何得到有效应用,是其应用于肝脏疾病领域需要进一步研究的方向<sup>[59-60]</sup>。

总之,多能干细胞是获得肝细胞的理想来源,能实现多能干细胞向成熟肝细胞的高效转化,将有力推进干细胞与再生医学研究成果的应用<sup>[63]</sup>。如何高效获得更成熟的肝细胞以及合理有效地利用获得的肝细胞,是多能干细胞向肝细胞诱导分化研究的努力方向。

## [参考文献]

- [1] Best J, Dolle L, Manka P, et al. Role of liver progenitors in acute liver injury [J]. *Front Physiol*, 2013(4): 258.
- [2] Ballard T E, Wang S, Cox L M, et al. Application of a micropatterned co-cultured (MPCC) hepatocyte system to predict pre-clinical and human specific drug metabolism [J]. *Drug Metab Dispos*, 2016, 44(2): 172-179.
- [3] Jozefczuk J, Prigione A, Chavez L, et al. Comparative analysis of human embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells reveals current drawbacks and possible strategies for improved differentiation [J]. *Stem Cells Dev*, 2011, 20(7): 1259-1275.
- [4] Ilic D, Devito L, Miere C, et al. Human embryonic and induced pluripotent stem cells in clinical trials [J]. *Br Med Bull*, 2015, 116(1): 19-27.
- [5] Zaret K S, Watts J, Xu J, et al. Pioneer factors, genetic competence, and inductive signaling: programming liver and pancreas progenitors from the endoderm [J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2008, 73: 119-126.
- [6] Zaret K S. Genetic programming of liver and pancreas progenitors; lessons for stem-cell differentiation [J]. *Nat Rev Genet*, 2008, 9(5): 329-340.
- [7] Duncan S A. Mechanisms controlling early development of the liver [J]. *Mech Dev*, 2003, 120(1): 19-33.
- [8] Calmont A, Wandzioch E, Tremblay K D, et al. An FGF response pathway that mediates hepatic gene induction in embryonic endoderm cells [J]. *Dev Cell*, 2006, 11(3): 339-348.
- [9] Bort R, Martinez-Barbera J P, Beddington R S, et al. Hex homeobox gene-dependent tissue positioning is required for organogenesis of the ventral pancreas [J]. *Development*, 2004, 131(4): 797-806.
- [10] Hunter M P, Wilson C M, Jiang X, et al. The homeobox gene Hhex is essential for proper hepatoblast differentiation and bile duct morphogenesis [J]. *Dev Biol*, 2007, 308(2): 355-367.
- [11] Watt A J, Zhao R, Li J, et al. Development of the mammalian liver and ventral pancreas is dependent on GATA4 [J]. *BMC Dev Biol*, 2007(7): 37.
- [12] Lv Z, Du Y, Wen J. The methylation of ZHX2 gene promoter enhances AFP gene expression in hepatocellular carcinoma [J]. *Chinese Journal of Cellular & Molecular Immunology*, 2013, 29(7): 706-709.
- [13] Zhu S, Rezvani M, Harbell J, et al. Mouse liver repopulation with hepatocytes generated from human fibroblasts [J]. *Nature*, 2014, 508(7494): 93-97.
- [14] Delous M, Yin C, Shin D, et al. Sox9b is a key regulator of pancreaticobiliary ductal system development [J]. *LoS Genet*, 2012, 8(6): e1002754.
- [15] Falix F A, Weeda V B, Labryere W T, et al. Hepatic Notch2 deficiency leads to bile duct agenesis perinatally and secondary bile duct formation after weaning [J]. *Dev Biol*, 2014, 396(2): 201-213.
- [16] Choi D, Oh H J, Chang U J, et al. *In vivo* differentiation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes [J]. *Cell Transplant*, 2002, 11(4): 359-368.
- [17] Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, et al. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells *in vitro* [J]. *FEBS Lett*, 2001, 497(1): 15-19.
- [18] Chinzei R, Tanaka Y, Shimizu-Saito K, et al. Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes [J]. *Hepatology*, 2002, 36(1): 22-29.
- [19] Hay D C, Zhao D, Ross A, et al. Direct differentiation of human embryonic stem cells to hepatocyte-like cells exhibiting functional activities [J]. *Cloning Stem Cells*, 2007, 9(1): 51-62.
- [20] Hay D C, Zhao D, Fletcher J, et al. Efficient differentiation of hepatocytes from human embryonic stem cells exhibiting markers recapitulating liver development *in vivo* [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(4): 894-902.
- [21] 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.
- [22] Baxter M, Withey S, Harrison S, et al. Phenotypic and functional analyses show stem cell-derived hepatocyte-like cells better mimic fetal rather than adult hepatocytes [J]. *J Hepatol*, 2015, 62(3): 581-589.
- [23] Touboul T, Hannan N R, Corbinea S, et al. Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver develop-

- ment [J]. *Hepatology*, 2010, 51(5): 1754-1765.
- [24] Tasnim F, Phan D, Toh Y C, et al. Cost-effective differentiation of hepatocyte-like cells from human pluripotent stem cells using small molecules [J]. *Biomaterials*, 2015, 70: 115-125.
- [25] Takayama K, Inamura M, Kawabata K, et al. Efficient and directive generation of two distinct endoderm lineages from human ESCs and iPSCs by differentiation stage-specific SOX17 transduction [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e21780.
- [26] Inamura M, Kawabata K, Takayama K, et al. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPSC cells by transient overexpression of homeobox gene HEX [J]. *Mol Ther*, 2011, 19(2): 400-407.
- [27] Takayama K, Inamura M, Kawabata K, et al. Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4alpha transduction [J]. *Mol Ther*, 2012, 20(1): 127-137.
- [28] Pfeiffer E, Kegel V, Zeilinger K, et al. Featured Article: isolation, characterization, and cultivation of human hepatocytes and non-parenchymal liver cells [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2015, 240(5): 645-656.
- [29] Takebe T, Zhang R R, Koike H, et al. Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant [J]. *Nat Protoc*, 2014, 9(2): 396-409.
- [30] Takebe T, Sekine K, Enomura M, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant [J]. *Nature*, 2013, 499(7459): 481-484.
- [31] Zhang S, Zhang Y, Chen L, et al. Efficient large-scale generation of functional hepatocytes from mouse embryonic stem cells grown in a rotating bioreactor with exogenous growth factors and hormones [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4(6): 145.
- [32] Park Y, Chen Y, Ordovas L, et al. Hepatic differentiation of human embryonic stem cells on microcarriers [J]. *J Biotechnol*, 2014, 174: 39-48.
- [33] Hengstler J G, Brulport M, Schormann W, et al. Generation of human hepatocytes by stem cell technology: definition of the hepatocyte [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2005, 1(1): 61-74.
- [34] 《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)》(征求意见稿)解读 [J]. *转化医学杂志*, 2013(6): 321-322. Analysis for the 《Guiding principles for the quality control and preclinical studies of stem cell preparation》[J]. *Translational Medicine Journal*, 2013(6): 321-322.
- [35] 《干细胞临床转化指南》: 干细胞临床应用标准与规则 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010(36): 6798-6799. 《Guidelines for clinical translation of stem cells》: standard and regulation for clinical application of stem cells [J]. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2010(36): 6798-6799.
- [36] Chistiakov D A, Chistiakov P A. Strategies to produce hepatocytes and hepatocyte-like cells from pluripotent stem cells [J]. *Hepato Res*, 2012, 42(2): 111-119.
- [37] Huang P, Zhang L, Gao Y, et al. Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable hepatocytes [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(3): 370-384.
- [38] Khuu D N, Scheers I, Ehnert S, et al. *In vitro* differentiated adult human liver progenitor cells display mature hepatic metabolic functions: a potential tool for *in vitro* pharmacotoxicological testing [J]. *Cell Transplant*, 2011, 20(2): 287-302.
- [39] Xu F, Liu J, Deng J, et al. Rapid and high-efficiency generation of mature functional hepatocyte-like cells from adipose-derived stem cells by a three-step protocol [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015(6): 193.
- [40] Cayo M A, Cai J, Delaforest A, et al. JD induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes faithfully recapitulate the pathophysiology of familial hypercholesterolemia [J]. *Hepatology*, 2012, 56(6): 2163-2171.
- [41] Sellem C H, Frain M, Erdos T, et al. Differential expression of albumin and alpha-fetoprotein genes in fetal tissues of mouse and rat [J]. *Dev Biol*, 1984, 102(1): 51-60.
- [42] Hay D C, Fletcher J, Payne C, et al. Highly efficient differentiation of hESCs to functional hepatic endoderm requires ActivinA and Wnt3a signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(34): 12301-12306.
- [43] Gonzalez F J, Gelboin H V. Human cytochromes P450: evolution, catalytic activities and interindividual variations in expression [J]. *Prog Clin Biol Res*, 1991, 372: 11-20.
- [44] Takayama K, Inamura M, Kawabata K, et al. Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1alpha transduction [J]. *J Hepatol*, 2012, 57(3): 628-636.
- [45] Sengupta S, Johnson B P, Swanson S A, et al. Aggregate culture of human embryonic stem cell-derived hepatocytes in suspension are an improved *in vitro* model for drug metabolism and toxicity testing [J]. *Toxicol Sci*, 2014, 140(1): 236-245.
- [46] 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.
- [47] Lehec S C, Hughes R D, Mitry R R, et al. Experience of microbiological screening of human hepatocytes for clinical transplantation [J]. *Cell Transplant*, 2009, 18(8): 941-947.
- [48] Guillouzo A, Guguen-Guillouzo C. Evolving concepts in liver tissue modeling and implications for *in vitro* toxicology [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2008, 4(10): 1279-1294.
- [49] Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A. General review on *in vitro* hepatocyte models and their applications [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 640: 1-40.
- [50] Damania A, Jain E, Kumar A. Advancements in *in vitro* hepatic models: application for drug screening and therapeutics [J]. *Hepato Int*, 2014, 8(1): 23-38.
- [51] Palakkan A A, Hay D C, Anil K P, et al. Liver tissue engineering and cell sources: issues and challenges [J]. *Liver Int*, 2013, 33(5): 666-676.
- [52] Ramboer E, De Craene B, De Kock J, et al. Strategies for im-

- mortalization of primary hepatocytes [J]. *J Hepatol*, 2014, 61(4):925-943.
- [53] Jensen J, Hyllner J, Bjorquist P. Human embryonic stem cell technologies and drug discovery [J]. *J Cell Physiol*, 2009, 219(3):513-519.
- [54] Heemann U, Treichel U, Looock J, et al. Albumin dialysis in cirrhosis with superimposed acute liver injury: a prospective, controlled study [J]. *Hepatology*, 2002, 36(1):949-958.
- [55] Miro J M, Laguno M, Moreno A, et al. Management of end stage liver disease (ESLD): what is the current role of orthotopic liver transplantation (OLT)? [J]. *J Hepatol*, 2006, 44(1 Suppl):S140-S145.
- [56] Gridelli B, Vizzini G, Pietrosi G, et al. Efficient human fetal liver cell isolation protocol based on vascular perfusion for liver cell-based therapy and case report on cell transplantation [J]. *Liver Transpl*, 2012, 18(2):226-237.
- [57] Esrefoglu M. Role of stem cells in repair of liver injury: experimental and clinical benefit of transferred stem cells on liver failure [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(40):6757-6773.
- [58] Xie P, Sun Y, Ouyang Q, et al. Physiological oxygen prevents frequent silencing of the DLK1-DIO3 cluster during human embryonic stem cells culture [J]. *Stem Cells*, 2014, 32(2):391-401.
- [59] Ramanathan R, Pettinato G, Beeston J T, et al. Transplantation of human stem cell-derived hepatocytes in an animal model of acute liver failure [J]. *Surgery*, 2015, 158(2):349-359.
- [60] Nagamoto Y, Takayama K, Ohashi K, et al. Transplantation of a human iPSC-derived hepatocyte sheet increases survival in mice with acute liver failure [J]. *J Hepatol*, 2016, 64(5):1068-1075.
- [61] Mizumoto H, Hayashi S, Matsumoto K, et al. Evaluation of a hybrid artificial liver module based on a spheroid culture system of embryonic stem cell-derived hepatic cells [J]. *Cell Transplant*, 2012, 21(2/3):421-428.
- [62] Shi X L, Gao Y, Yan Y, et al. Improved survival of porcine acute liver failure by a bioartificial liver device implanted with induced human functional hepatocytes [J]. *Cell Res*, 2016, 26(2):206-216.
- [63] Espejel S, Roll G R, Mclaughlin K J, et al. Induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes have the functional and proliferative capabilities needed for liver regeneration in mice [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(9):3120-3126.

(上接第 14 页)

- [28] 魏凤仙. 湿度和氨暴露诱导的慢性应激对肉仔鸡生长性能、肉品质、生理机能的影响及其调控机制 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- Wei F X. Effects of exposure to humidity and ammonia induced chronic stress on growth performance, meat quality, physiological function in broilers and its regulating mechanism [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest Agriculture & Forestry University, 2012.
- [29] 李如治. 家畜环境卫生学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- Li R Z. Animal environmental hygiene [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2003.
- [30] Weaver W D, Meijerhof R. The effect of different levels of relative humidity and air movement on litter conditions, ammonia levels, growth, and carcass quality for broiler chickens [J]. *Poultry Science*, 1991, 70(4):746-755.
- [31] Wei F X, Hu X F, Sa R N, et al. Antioxidant capacity and meat quality of broilers exposed to different ambient humidity and ammonia concentrations [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2013, 13(2):3117-3127.