

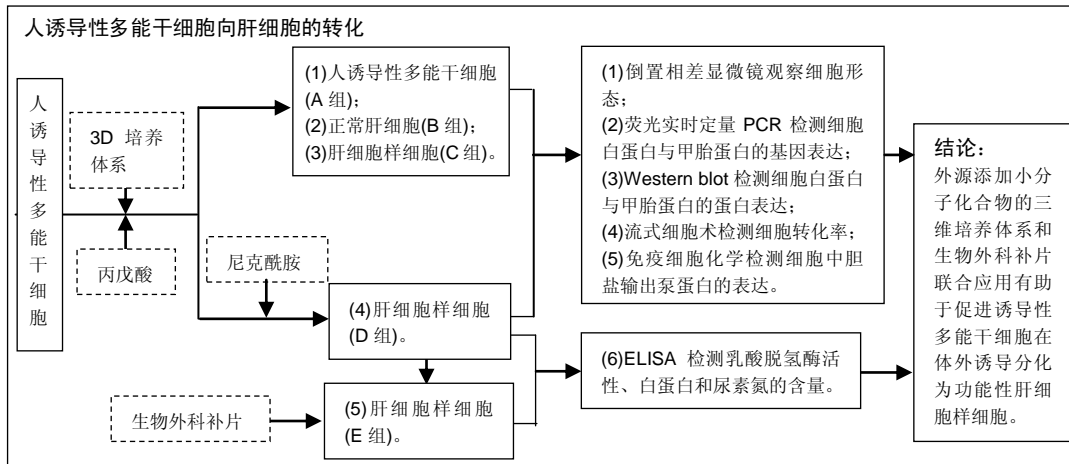
3D培养体系下人来源诱导性多能干细胞向肝细胞的转化

李嘉晋^{1,2}, 王荣丽¹, 李婷婷², 何东³, 石伟² (¹西南医科大学临床医学院, 四川省泸州市 646000; 绵阳市人民医院, ²重症医学科, ³肾病内科, 四川省绵阳市 621000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0627

ORCID: 0000-0002-8103-3116(李嘉晋)

文章快速阅读:



李嘉晋, 男, 1981年生, 四川省北川县人, 羌族, 2005年泸州医学院毕业, 主治医师, 主要从事重症医学及血液净化的临床工作。

通讯作者: 王荣丽, 硕士, 教授, 西南医科大学临床医学院, 四川省泸州市 646000

中图分类号: R394.2

文献标识码: B

稿件接受: 2018-05-31



文题释义:

生物型人工肝的构建: 将人工培养的有生物活性的肝细胞填充在生物反应器内, 构建体外生物反应装置模拟正常人体肝脏, 以代替受损肝脏发挥解毒、合成与代谢功能。

诱导性多能干细胞: 对完全分化的体细胞的多个基因进行重新编程, 使其逆向分化为与胚胎干细胞类似的具有自我更新能力和多向分化潜能的多能干细胞, 理论上可以转化为人体内任何类型的细胞。

摘要

背景: 生物型人工肝的构建有望成为治疗急性肝衰竭的有效方法, 但构建人工肝的种子细胞来源、培养模式、营养获取等方面仍存在较多难题, 制约血液净化-人工肝的发展与临床应用。

目的: 探讨在不添加外源血清等异种来源物质的条件下将人诱导性多能干细胞诱导分化为肝细胞样细胞的可行性。

方法: 应用含 Transwell 小室的 6 孔板构建 3D 培养体系, 外源添加丙戊酸和尼克酰胺对人诱导性多能干细胞进行诱导分化, 并将分化的肝细胞样细胞与生物补片共培养。实验分为 5 组: 人诱导性多能干细胞为 A 组、正常肝细胞为 B 组、不添加尼克酰胺诱导分化的肝细胞样细胞为 C 组、添加尼克酰胺诱导分化的肝细胞样细胞为 D 组、在生物外科补片上培养的肝细胞样细胞为 E 组。倒置相差显微镜下观察 D 组肝细胞样细胞的形态; 免疫荧光检测 D 组细胞中肝细胞核因子 4 α 和甲胎蛋白的表达; 荧光实时定量 PCR 和 Western blot 检测 A、B、C、D 组细胞中甲胎蛋白与白蛋白的 mRNA 和蛋白表达; 流式细胞术检测 A、C、D 组细胞的分化效率; 免疫细胞化学检测 B 组和 E 组细胞中胆盐输出泵蛋白的表达; ELISA 检测 D 组和 E 组上清液中乳酸脱氢酶活性、白蛋白和尿素氮含量。

结果与结论: ①D 组细胞由梭形逐渐转变成多边形; ②D 组细胞中肝细胞核因子 4 α 和甲胎蛋白呈阳性表达; ③D 组细胞中甲胎蛋白、白蛋白的基因和蛋白表达明显高于 A 组和 C 组 ($P < 0.01$); ④B 组和 E 组细胞中胆盐输出泵蛋白呈明显阳性表达; ⑤E 组细胞乳酸脱氢酶活性、白蛋白和尿素氮的含量明显高于 D 组 ($P < 0.01$); ⑥结果表明, 外源添加小分子化合物的三维培养体系和生物外科补片联合应用有助于促进诱导性多能干细胞在体外诱导分化为功能性肝细胞样细胞。

关键词:

诱导性多能干细胞; 肝衰竭; 人工肝; Transwell 小室; 三维培养体系; 生物外科补片; 尼克酰胺; 丙戊酸; 生物人工肝; 干细胞

主题词:

诱导多功能干细胞; 肝, 人工; 烟酰胺; 丙戊酸; 肝细胞; 组织工程

Li Jia-jin, Attending physician, School of Clinical Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; Department of Critical Care Medicine, Mianyang People's Hospital, Mianyang 621000, Sichuan Province, China

Corresponding author: Wang Rong-li, Master, Professor, School of Clinical Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Transformation of human induced pluripotent stem cells into hepatocytes in 3D culture system

Li Jia-jin^{1,2}, Wang Rong-li¹, Li Ting-ting², He Dong³, Shi Wei² (¹School of Clinical Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; ²Department of Critical Care Medicine, ³Department of Nephropathy, Mianyang People's Hospital, Mianyang 621000, Sichuan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: The construction of bioartificial liver is expected to be an effective method for the treatment of acute liver failure. However, there are still many problems in seed cell source, culture mode and nutrient acquisition, which restrict the development and clinical application of blood purification-artificial liver.

OBJECTIVE: To investigate the feasibility of inducing the differentiation of induced pluripotent stem cells from human skin into hepatocyte-like cells without addition of exogenous sources such as exogenous serum.

METHODS: A 3D culture system was constructed by using a three-dimensional culture system containing 6-well plates of the Transwell chamber. The induction and differentiation of human induced pluripotent stem cells were performed by addition of valproic acid and nicotinamide. The differentiated hepatocyte-like cells were co-cultured with biological patches. There were five groups in the experiment: human induced pluripotent stem cells were set as group A, normal hepatocytes as group B, hepatocyte-like cells without induction by nicotinamide as group C, hepatocyte-like cells with induction by nicotinamide as group D, and hepatocyte-like cells cultured on the biological patch as group E. The morphology of hepatocyte-like cells in group D was observed under inverted phase contrast microscope. The expression of nuclear factor 4 α and alpha-fetoprotein in hepatocytes of group D was detected by immunofluorescence. Real-time quantitative PCR and western blot were used to detect mRNA and protein expressions of alpha-fetoprotein and albumin in the cells of groups A, B, C and D. Flow cytometry was used to detect the differentiation efficiency of cells in groups A, C and D. Immunocytochemistry detection was used to detect the protein expression of bile salt export pump in groups B and E. ELISA assay was used to detect lactate dehydrogenase activity, albumin and urea nitrogen contents in the supernatants of the groups D and E.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The cells of group D changed from fusiform to polygon in shape. (2) Positive expression of hepatocyte nuclear factor 4 alpha and alpha fetoprotein was found in the cells of group D. (3) The gene and protein expressions of alpha fetoprotein and albumin in group D was significantly higher than those in groups A and C ($P < 0.01$). (4) The protein expression of bile salt export pump in the cells was remarkably positive in groups B and E. (4) The activity of lactate dehydrogenase and the contents of albumin and urea nitrogen in cultured cells of group E were significantly higher than those in group D ($P < 0.01$). To conclude, the combination of 3D culture system with exogenous small molecules and biological surgical patch helps to induce induced pluripotent stem cells to differentiate into functional hepatocyte-like cells *in vitro*.

Subject headings: Induced Pluripotent Stem Cells; Liver, Artificial; Niacinamide; Valproic Acid; Hepatocytes; Tissue Engineering

0 引言 Introduction

肝衰竭是由多种原因引起的肝细胞大量坏死和肝小叶结构紊乱导致的肝脏合成代谢、生物转化与解毒功能障碍, 一些患者可发展为多器官受累, 导致病情危重, 预后极差, 以上即是肝衰竭患者死亡率居高不下的主要原因^[1]。肝衰竭的主要治疗方法包括药物治疗、肝脏移植和人工肝支持系统^[2]。除了肝移植, 其他方法均不能治愈肝衰竭^[3]。缺乏靶向药物、缺少移植肝源、高额移植费用而使人工肝支持系统成为当前治疗肝衰竭的重要手段^[4]。最初的人工肝支持系统(artificial liver support system, ALSS)通过模拟人工肾脏的透析方式, 发挥改善肝功能的作用, 在一定程度上缓解肝性脑病等临床症状, 维持患者生命以延长供肝的等待时间, 为肝移植争取更多机会^[5]。

50多年来, 人工肝支持系统历经人与动物间的血液透析、体外离体肝灌注、人与人之间的交叉循环、游离肝细胞悬液透析和混合型生物人工肝支持系统几个阶段, 技术已日臻成熟, 主要分为非生物型和生物型人工肝, 其中非生物型人工肝是目前临床上广泛应用的治疗技术, 主要以血浆置换、血浆置换联合血液透析、血浆灌流等方式清除血液中的毒性物质, 但血浆的需求量很大, 患者往往由于血浆供应紧张不能得到及时有效的救治^[6]。尽管有学者根据分子吸附再循环系统原理构建出了多循环血液净化系统, 明显降低了血浆的使用量, 但这项技术所面临的主要问题是不能恢复受损肝脏的生物作用^[7]。生物人工肝(bioartificial liver system, BAL)是将功能性肝细胞装填在生物反应器里, 模拟人体的正常肝脏, 代替受损肝脏行使功能^[8]。因此, 生物人工肝有效应用的关键因素是功能性肝细胞和生物反应器, 其中功能性肝细胞质量的优劣、获得的

难易程度、使用的安全性决定了生物人工肝的应用前景^[9]。

生物人工肝先后使用了人的原代肝细胞、猪的肝细胞和人肝癌细胞系, 但来源有限、异种动物免疫排斥、病毒携带、功能下降和潜在致癌风险等问题阻碍了生物人工肝的临床推广^[10]。如何获得大量优质安全的功能性肝细胞成为人工肝亟待解决的关键问题。迄今为止, 国内外已有多种生物人工肝技术进入临床试验阶段, 但肝细胞体外扩增困难和功能欠佳等问题尚未完全解决^[11]。干细胞的体外扩增能力较强。Gu等^[12]将猪原代肝细胞与骨髓间充质干细胞三维共培养解决了肝细胞体外培养功能不良的问题。Mazzoccoli等^[13]将人成纤维细胞转分化为肝细胞样细胞并实现了细胞的体外扩增, 进而开展了生物人工肝的临床治疗试验, 效果良好。随着干细胞的深入研究, 诱导性多能干细胞较其他来源干细胞的优势逐渐显现^[14]。有研究也证实生物补片可以促进有功能的肝细胞的体外增殖^[8]。因此, 实验应用三维培养体系在不添加外源血清、饲养层细胞和肝细胞的条件下只添加小分子化合物将人诱导性多能干细胞诱导分化为肝细胞样细胞, 观察细胞的转化效率, 并将细胞接种到生物外科补片中, 观察细胞合成分泌的乳酸脱氢酶活性、白蛋白和尿素氮水平, 探讨诱导性多能干细胞向有功能的肝细胞样细胞高效转化的实验方法。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞实验。

1.2 时间及地点 于2016年1月至2017年6月在西南医科大学临床医学院实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验细胞 人诱导性多能干细胞购于北京赛贝生

物技术有限公司, 人肝细胞购于中国科学院细胞库。

1.3.2 实验试剂与仪器 PSCeasy[®]人诱导性多能干细胞无饲养层基础培养基、EDTA人多潜能干细胞传代工作液(北京赛贝生物技术有限公司);

丙戊酸、尼克酰胺和胰蛋白酶(美国Sigma公司); 肝细胞生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、表皮细胞生长因子(美国Gibco公司); 玻璃粘连蛋白(加拿大STEMCELL公司); Transwell小室(美国Corning公司); Trizol、引物和Hepatozyme-SFM培养基(美国Invitrogen公司); PrimeScript[®]High Fidelity RT-PCR Kit和SYBR[®]Premix DimerEraser[®] Perfect Real Time-qPCR试剂盒(大连宝生物工程有限公司); 乳酸脱氢酶检测试剂盒、白蛋白检测试剂盒、尿素氮检测试剂盒、ECL增强型化学发光试剂盒(南京建成生物科技有限公司); 鼠抗人血清白蛋白(HAS)单克隆抗体、鼠抗人甲胎蛋白(AFP)单克隆抗体、鼠抗人SOX17多克隆抗体、鼠抗人肝细胞特异性抗原(HSA)单克隆抗体、鼠抗人胆盐输出泵(BSEP)多克隆抗体、山羊抗人肝细胞核因子4 α (HNF4 α)单克隆抗体、鼠抗人 β -actin多克隆抗体和辣根酶标记山羊抗鼠IgG(美国Abcam公司); 二氧化碳培养箱(美国SHELLAB公司); 超净工作台(新加坡艺思高科技有限公司); 倒置相差显微镜、光学显微镜、全自动显微照相系统和透射电镜(日本Olympus公司); 全自动生化分析仪(北京奕瑞祥科技有限公司)。

1.3.3 补片 生物外科补片购于广东冠昊生物科技公司, 生物相容性高, 能逐渐被自身组织替代, 消除排异反应; 不致突、致癌和致畸, 安全性高; 力学顺应性好, 稳定性好。

1.4 实验方法

1.4.1 分组 实验分6组: ①不进行诱导分化的诱导性多能干细胞作为阴性对照组(A组); ②正常肝细胞作为阳性对照组(B组); ③不添加尼克酰胺诱导分化的肝细胞样细胞为C组; ④添加尼克酰胺诱导分化的肝细胞样细胞为D组; ⑤应用生物补片培养的肝细胞样细胞为E组。

1.4.2 人诱导性多能干细胞向肝细胞的诱导分化

诱导分化: 参照文献报道的3D培养体系^[15], 制备质量浓度为10 μ g/L玻璃粘连蛋白工作液, 无菌条件下将Transwell小室放置于6孔板的各孔内, 每孔加入200 μ L玻璃粘连蛋白工作液, 固化24 h后加入PSCeasy[®]人诱导性多能干细胞无饲养层基础培养基, 37 $^{\circ}$ C孵育30 min后更换新鲜培养基, 将人诱导性多能干细胞接种至Transwell小室表面, 加入Hepatozyme-SFM培养基, 其中添加质量浓度均为10 μ g/L的肝细胞生长因子、表皮细胞生长因子和碱性成纤维细胞生长因子, 10 μ mol/L丙戊酸和5 μ mol/L尼克酰胺, 于37 $^{\circ}$ C、体积分数为5% CO₂条件下常规培养, 每日换液, 倒置相差显微镜下观察细胞形态, 于第21天时, 取培养细胞进行下列检测。

免疫荧光检测细胞中肝细胞核因子4 α 和甲胎蛋白的表达: 用40 g/L多聚甲醛将细胞固定30 min, 漂洗后用

0.2% Triton X100透膜5 min, 滴加山羊抗人肝细胞核因子4 α 单克隆抗体(工作浓度为1:100)和鼠抗人甲胎蛋白单克隆抗体(工作浓度为1:100), 4 $^{\circ}$ C过夜, 次晨室温平衡30 min后加入荧光标记的山羊抗鼠IgG, 室温孵育30 min, 用荧光显微镜观察并摄片。

流式细胞术检测诱导性多能干细胞向肝细胞样细胞的分化效率: 用0.25%胰蛋白酶消化待测细胞制成细胞悬液, 预冷的体积分数为70%乙醇固定24 h, 漂洗后分别加入抗转录因子SOX17抗体(稀释度1:2)和鼠抗人肝细胞特异性抗原(稀释度1:4), 室温孵育1 h, 加入荧光标记的二抗, 室温孵育30 min, 流式细胞仪检测, 根据阳性区间的细胞数计算细胞分化率。

荧光实时定量PCR法检测肝细胞特异性基因白蛋白与甲胎蛋白的mRNA表达: 采用Trizol法提取肝细胞样细胞的总RNA^[16], 反转录获取cDNA, 取20 μ L反应体系进行实时荧光定量PCR检测。引物序列如下: 白蛋白, 上游引物: 5'-ACG GCG CGC CGA TTA CTA CG-3', 下游引物: 5'-TCC GTA GTC ACG CAT CAC GG-3', 产物长度539 bp; 甲胎蛋白, 上游引物: 5'-CGG CTC TAC TGA TCA TTA CAC G-3', 下游引物: 5'-ATA CCG TCG TCC CAG TTC G-3', 产物长度417 bp; β -actin, 上游引物: 5'-CAT GGG TAC AGA CGT CAA TGC CAA CCG-3', 下游引物: 5'-ATG GAC CCA GCG ATC GAG T-3', 产物长度279 bp。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C预变性60 s \rightarrow 95 $^{\circ}$ C变性15 s \rightarrow 65 $^{\circ}$ C退火30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C延伸60 s, 共42个循环。 β -actin为内参照, 用相对定量值计算基因表达的变化。

Western blot法检测肝细胞样细胞中白蛋白与甲胎蛋白的表达: 用预冷的细胞裂解液冰浴裂解肝细胞样细胞, 取上清液应用考马斯亮蓝法进行蛋白定量, 将各电泳道的上样量调整为30 μ g, 10%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶进行电泳分离并电转至0.22 μ m聚偏二氟乙烯膜上, 3%牛血清白蛋白室温封闭1 h, 加入白蛋白(1:200)、甲胎蛋白(1:500)和 β -actin(1:1000)抗体, 4 $^{\circ}$ C过夜, 次日室温平衡1 h, 加入辣根酶过氧化物标记的山羊抗鼠IgG(1:500), 室温避光孵育1 h, ECL试剂盒化学发光显影, 凝胶成像系统摄像, 以 β -actin条带为内参照, 用Quantity One软件定量分析条带灰度。

1.4.3 人工肝组织构建

支架的准备: 无菌条件下, 将聚碳酸酯膜平铺于Transwell小室底部, 将生物外科补片平铺在聚碳酸酯膜表面备用。

人工肝组织构建: 将肝细胞样细胞以 1×10^5 的密度接种于预先准备好的支架上常规培养。

1.4.4 人工肝组织评价

免疫细胞化学法检测肝细胞样细胞中肝细胞极化膜标志蛋白胆盐输出泵蛋白(bile salt export pump, BSEP)的表达: 于培养第5天, 取生物补片上的肝细胞样细胞, 预

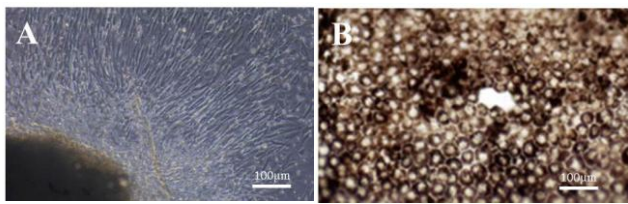


图1 诱导性多能干细胞三维培养诱导分化的肝细胞样细胞形态学变化(标尺为 100 μm)

Figure 1 Morphological changes of hepatocyte-like cells differentiated from induced pluripotent stem cells in 3D cultures (scale bars=100 μm)

图注: 图中 A 为诱导分化 1 d 的诱导性多能干细胞, 细胞呈梭形; B 为诱导分化 21 d 的肝细胞样细胞, 细胞轮廓变圆, 大多呈多边形。

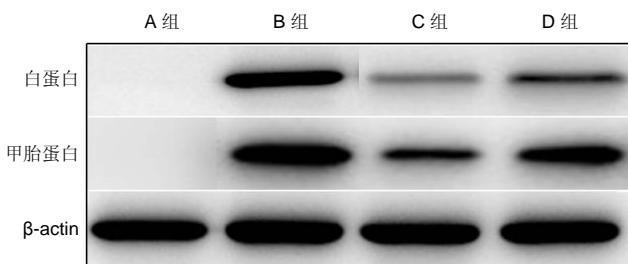


图3 Western blot 检测 4 组细胞中白蛋白与甲胎蛋白的表达

Figure 3 The expression of albumin and alpha fetoprotein in four groups of cells detected by western blot

图注: A 组细胞内未见白蛋白和甲胎蛋白的表达, B、C、D 组高于 A 组, B 组高于 C 组和 D 组, D 组高于 C 组。A 组: 不进行诱导分化的诱导性多能干细胞; B 组: 正常肝细胞; C 组: 不添加尼克酰胺诱导分化的肝细胞样细胞; D 组: 添加尼克酰胺诱导分化的肝细胞样细胞。

冷丙酮固定 10 min, 漂洗后用 0.2% Triton X100 透膜 5 min, 滴加鼠抗人 BSEP 多克隆抗体(工作浓度为 1:50)4 °C 过夜, 次晨室温平衡 30 min 后加入辣根酶标记山羊抗鼠 IgG, 室温孵育 30 min, 苏木精染液复染 3 min, 中性树胶封固, 光学显微镜下观察并摄片。

ELISA 法检测: 于培养第 10 天, 检测 D 组和 E 组培养上清液中乳酸脱氢酶活性、白蛋白和尿素氮的含量。从人工肝组织培养第 1 天开始换液时收集所有旧培养液 -80 °C 冻存备用。分别用溴甲酚绿比色法检测白蛋白含量^[17]、脲酶法检测尿素氮含量^[18]、丙酮酸二硝基苯胺法检测乳酸脱氢酶活性^[19], 参照试剂盒说明书操作, 在全自动生化仪上进行检测。

1.5 主要观察指标 ①D 组细胞形态; ②A、C、D 组细胞分化效率; ③D 组细胞中肝细胞核因子 4α 和甲胎蛋白的表达; ④A、B、C、D 组细胞中白蛋白和甲胎蛋白基因与蛋白的表达; ⑤B 组和 E 组细胞中胆盐输出泵蛋白的表达; ⑥D 组和 E 组培养上清中乳酸脱氢酶活性、白蛋白和尿素氮含量。

1.6 统计学分析 应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析和 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

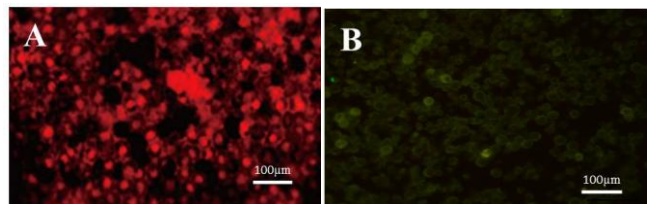


图2 肝细胞核因子 4α 和甲胎蛋白在肝细胞样细胞中的表达(标尺为 100 μm)

Figure 2 Expression of hepatocyte nuclear factor 4 alpha and alpha fetoprotein in hepatocyte-like cells (scale bars=100 μm)

图注: 图中 A 为肝细胞样细胞中肝细胞核因子 4α 呈阳性表达; B 为肝细胞样细胞中甲胎蛋白呈阳性表达。

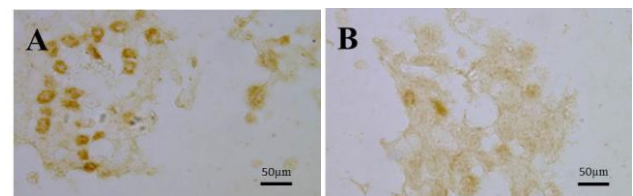


图4 胆盐输出泵蛋白在正常肝细胞与人工肝组织细胞中的表达(标尺为 50 μm)

Figure 4 Expression of bile salt export pump proteins in normal hepatocytes and artificial liver tissue (scale bars=50 μm)

图注: 图中 A 为正常肝细胞中胆盐输出泵蛋白的阳性表达; B 为人工肝组织细胞中胆盐输出泵蛋白的阳性表达。

2 结果 Results

2.1 倒置相差显微镜观察诱导性多能干细胞和在三维培养体系中诱导分化为肝细胞样细胞的形态 倒置相差显微镜下, D 组诱导分化 1 d 时细胞聚集生长, 多呈梭形, 见图 1A; 分化 21 d 时细胞突起减少, 呈多边形, 见图 1B。

2.2 免疫荧光检测肝细胞样细胞中肝细胞核因子 4α 和甲胎蛋白的表达 荧光显微镜下, D 组肝细胞样细胞中肝细胞核因子 4α 的阳性表达呈红色, 甲胎蛋白的阳性表达呈绿色, 见图 2。

2.3 流式细胞术检测细胞转化率 A 组细胞转化率为 0%, C 组细胞转化率为 $(10.89 \pm 2.54)\%$, D 组细胞转化率为 $(24.67 \pm 3.71)\%$, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$), D 组转化率高于 A 组和 C 组。

2.4 荧光实时定量 PCR 检测各组细胞中白蛋白和甲胎蛋白的 mRNA 表达 A 组细胞内未见白蛋白与甲胎蛋白的 mRNA 表达, B 组、C 组、D 组细胞内白蛋白的 mRNA 表达率分别为 $(77.59 \pm 4.22)\%$, $(15.12 \pm 1.55)\%$, $(43.59 \pm 2.17)\%$, 甲胎蛋白的 mRNA 表达率分别为 $(81.39 \pm 3.86)\%$, $(23.69 \pm 2.43)\%$, $(56.78 \pm 1.52)\%$, 4 组间比较差异有显著性意义 ($P < 0.01$), B、C、D 组白蛋白和甲胎蛋白的 mRNA 表达高于 A 组, B 组白蛋白和甲胎蛋白的 mRNA 表达高于 C 组和 D 组, D 组白蛋白和甲胎蛋白的 mRNA 表达高于 C 组。

2.5 Western blot 检测各组细胞中白蛋白和甲胎蛋白的表达 A 组细胞内未见白蛋白和甲胎蛋白的表达, B 组、C 组、

D组细胞内白蛋白表达率分别为(65.24±6.38)%, (5.01±0.46)%, (21.78±3.25)%, 甲胎蛋白表达率分别为(69.22±5.93)%, (6.52±0.60)%, (39.94±4.66)%, 4组间比较差异有显著性意义($F=78.397$, $P=0.000$), B、C、D组白蛋白和甲胎蛋白的表达高于A组, B组白蛋白和甲胎蛋白的表达高于C组和D组, D组白蛋白和甲胎蛋白的表达高于C组, 见图3。

2.6 免疫细胞化学法检测构建的人工肝组织细胞中胆盐输出泵蛋白的表达 B组和E组细胞胞膜上均可见棕黄色颗粒的胆盐输出泵蛋白阳性表达, 见图4。

2.7 ELISA法检测构建的人工肝组织上清液中乳酸脱氢酶活性、白蛋白含量和尿素氮含量 培养10 d, E组培养上清液中乳酸脱氢酶活性、白蛋白和尿素氮水平均高于D组, 差异有显著性意义($P < 0.01$), 见表1。

表1 人工肝组织上清液中乳酸脱氢酶活性、白蛋白含量和尿素氮含量的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Changes of lactate dehydrogenase activity, albumin content and urea nitrogen content in the supernatant of artificial liver tissues

指标	E组	D组	t值	P值
乳酸脱氢酶活性(U/L)	39.85±1.76	21.34±1.25	14.385	0.000
白蛋白(mg/L)	1.62±0.07	0.49±0.05	36.427	0.000
尿素氮(mg/L)	3.57±0.03	1.29±0.04	28.938	0.000

表注: D组: 添加尼克酰胺诱导分化的肝细胞样细胞; E组: 应用生物补片培养的肝细胞样细胞。

3 讨论 Discussion

成体干细胞的发现与深入研究使干细胞的临床应用成为可能^[20]。20余年的研究证实, 多种类型的干细胞包括成体干细胞可定向分化为功能性肝细胞, 而改善或者逆转肝功能的结果并不理想^[21]。如何提高功能性肝细胞的转化效率是目前肝衰竭治疗领域的研究重点和难点。自2012年日本学者Takahashi和Yamanaka^[22]通过导入外源基因将小鼠鼠尾来源的成纤维细胞重编程为诱导性多能干细胞开始, 越来越多的研究致力于降低诱导性多能干细胞的致瘤性并提高诱导效率。人皮肤来源的诱导性多能干细胞的提取成功给细胞疗法与器官移植带来希望。但最初大多学者认为骨髓间充质干细胞是优质细胞来源, 不仅可以募集到肝损伤部位, 还可以分化为类肝样细胞从而发挥保护肝脏的作用^[23]。经研究证实, 骨髓间充质干细胞主要通过分泌细胞因子或促进细胞间连接发挥保护作用, 只在肝组织中检测到极少量的骨髓间充质干细胞与肝细胞样细胞^[24]。因而, 学者们把人工肝细胞来源的关注点集中在骨髓间充质干细胞和诱导性多能干细胞上。Gu等^[12]研究证实将猪肝细胞与骨髓间充质干细胞进行三维共培养, 培养2 d可见肝细胞样细胞形态并检测到肝细胞的合成分泌功能, 但培养过程中仍然要外源添加动物源性血清, 无法避免去除异种细

胞、蛋白污染和病毒感染的风险。有学者在无血清培养基中加入丙戊酸, 成功将诱导性多能干细胞诱导为肝细胞样细胞, 也具有肝细胞的一定功能, 但距离人工肝对细胞功能的要求还有一定差距^[13]。侯相瑜等^[25]研究发现丙戊酸对肝细胞有一定毒性作用, 可以抑制肝细胞功能的发挥。另外, 三维培养多用于干细胞诱导分化、器官再生培养及组织工程研究, 是理想的组织支持结构, 可促进生长因子和细胞外基质相互作用, 使培养的细胞间建立恰当的细胞连接。杨晓蕾等^[26]研究发现尼克酰胺对人脐带间充质干细胞具有保护作用。因此, 该研究应用三维培养体系在无外源血清和饲养层细胞的条件下, 添加丙戊酸的同时添加尼克酰胺将诱导性多能干细胞诱导分化为肝细胞样细胞。胆盐输出泵蛋白是将胆汁酸盐转运至胆小管内的主要蛋白, 说明肝细胞具有分泌胆汁的功能^[27]。免疫细胞化学检测结果显示诱导分化的肝细胞样细胞的胞膜上有胆盐输出泵蛋白的阳性表达, 正常肝细胞的细胞膜上也可见胆盐输出泵蛋白的强阳性表达, 提示诱导分化的细胞具有肝细胞的功能特征。功能学检测结果显示, 诱导分化后的细胞具有分泌白蛋白和甲胎蛋白的功能, 同时乳酸脱氢酶活性升高, 提示诱导分化的细胞具有肝细胞的功能。

Cusick等^[28]在进行供受者年龄与移植后的肝细胞生存时间的关系研究中开始了人工肝组织的构建。自此, 人们也开始了人工肝构建的研究, 主要目的是优化人工肝支持系统。经过20余年的发展, Soto-Gutierrez等^[29]于2007年发现应用支架培养的肝细胞移植到急性肝衰竭裸鼠体内明显提高了裸鼠的存活率。俞建雄等^[30]研究证实生物外科补片在获得功能性肝细胞方面有更大的优越性。因此, 作者将诱导分化的肝细胞样细胞接种到生物外科补片上进行培养, 发现生物补片上培养的细胞上清液中乳酸脱氢酶活性、白蛋白含量和尿素氮含量明显高于未在生物补片上培养的肝细胞样细胞, 提示生物补片与肝细胞样细胞共培养可促进有功能肝细胞的生长。

总之, 外源添加小分子化合物的三维培养体系和生物外科补片联合应用有助于促进诱导性多能干细胞在体外诱导分化为功能性肝细胞样细胞, 接下来, 将选择恰当的急性肝衰竭动物模型进行人工肝支持系统的体内功能评价, 以期进一步完善研究内容。

作者贡献: 实验设计为李嘉晋、王荣丽, 实验实施为李嘉晋、李婷婷, 实验评估为何东、石伟, 资料收集为李嘉晋。

经费支持: 该文章没有接受任何经费支持。

利益冲突: 所有作者声明没有接受相关的经费支持, 不存在利益冲突。

伦理问题: 研究用细胞的实验方案符合相关伦理学要求, 文章的撰写与编辑修改后文章遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿

宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

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3.0”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] 赵紫烟,安雪青,史丽,等. 血清前白蛋白/总胆红素比值对肝衰竭患者预后的预测价值[J]. 中国现代医学杂志, 2017,27(21): 75-78.
- [2] Hayashi H, Takamura H, Gabata R, et al. Induction of Artificial Pancreas in Liver Transplant Recipients: Preliminary Experience with an Insightful Message. *Ann Transplant*. 2017; 22:590-597.
- [3] 丁义涛. 生物人工肝和肝移植: 肝衰竭治疗新模式[J]. 临床肝胆病杂志, 2017,33(9):1693-1698.
- [4] 高义萌,孙露露,惠利健. 生物人工肝研究进展[J]. 生命科学, 2016,28(8):915-920.
- [5] Struecker B, Raschzok N, Sauer IM. Liver support strategies: cutting-edge technologies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11(3):166-176.
- [6] Wu DB, Chen EQ, Bai L, et al. Propylthiouracil-induced liver failure and artificial liver support systems: a case report and review of the literature. *Ther Clin Risk Manag*. 2017;13:65-68.
- [7] Bhagavatula SK, Chick JF, Chauhan NR, et al. Artificial ascites and pneumoperitoneum to facilitate thermal ablation of liver tumors: a pictorial essay. *Abdom Radiol (NY)*. 2017; 42(2):620-630.
- [8] 顾劲扬,施晓雷,任昊帆,等. 体外生物人工肝支持系统治疗肝功能衰竭的系统评价[J]. 中国组织工程研究, 2013,17(18): 3374-3380.
- [9] Hoshiba T, Otaki T, Nemoto E, et al. Blood-Compatible Polymer for Hepatocyte Culture with High Hepatocyte-Specific Functions toward Bioartificial Liver Development. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(32): 18096-18103.
- [10] 郭恩玲,孔静,刘彬彬,等. 生物型人工肝模型的建立及其在实验中的应用[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2015,22(9):1137-1142.
- [11] 丛庆伟,朱英. 人工肝支持系统治疗肝衰竭的研究进展[J]. 医学与哲学, 2014,35(8B):70-73.
- [12] Gu J, Shi X, Zhang Y, et al. Heterotypic interactions in the preservation of morphology and functionality of porcine hepatocytes by bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Physiol*. 2009;219(1):100-108.
- [13] Mazzoccoli G, Longhitano C, Vinciguerra M. Cardio-hepatic metabolic derangements and valproic acid. *Curr Clin Pharmacol*. 2014;9(2):165-170.
- [14] Luo Y, Lou C, Zhang S, et al. Three-dimensional hydrogel culture conditions promote the differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocytes. *Cytherapy*. 2018;20(1):95-107.
- [15] 卫金花,曲强,杨阳,等. 体外三维培养骨髓间充质干细胞诱导分化为肝细胞及其极化特征[J]. 基础医学与临床, 2012,32(6): 639-643.
- [16] Hoekstra R, van Wenum M, Chamuleau RA. Pivotal preclinical trial of the spheroid reservoir bioartificial liver. *J Hepatol*. 2015; 63(4):1051-1052.
- [17] 肖晋,王立军,刘妙娥. 免疫透射比浊法与溴甲酚绿法检测血清白蛋白的结果对比分析[J]. 吉林医学, 2013,34(15):2893-2894.
- [18] 骆连妹,蔡萍金,黄胜起. 两种试剂测定血清尿素氮的方法对比及偏差评估[J]. 中国热带医学, 2005,5(8):1703-1704.
- [19] 李碧蓉,唐海林,曹妍群,等. 利拉鲁肽对1-甲基-4-苯基吡啶离子诱导的PC12细胞氧化损伤的影响[J]. 中国新药杂志, 2016,25(17):1994-1999.
- [20] 李华,文峰,漆仲春,等. 人脐带间充质干细胞与肝细胞共培养可分化为肝样细胞[J]. 中国组织工程研究, 2013,17(32): 5772-5777.
- [21] Glorioso JM, Mao SA, Rodysill B, et al. Pivotal preclinical trial of the spheroid reservoir bioartificial liver. *J Hepatol*. 2015; 63(2):388-398.
- [22] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676.
- [23] 袁淑芳,胡兰英,姜涛,等. 骨髓间充质干细胞移植肝衰竭大鼠 CD163和白细胞介素10的表达[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(6):919-925.
- [24] Radwan RR, Mohamed HA. Nigella sativa oil modulates the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells against liver injury in irradiated rats. *J Photochem Photobiol B*. 2018; 178: 447-456.
- [25] 侯相瑜,金晶,李宏亮,等. SIRT1 在丙戊酸对肝细胞毒性中的作用研究[J]. 中国药理学通报, 2015,31(1):31-34.
- [26] 杨晓蕾,陈智聪,廖继东,等. 尼克酰胺对人脐带间充质干细胞的保护效应[J]. 中国病理生理杂志, 2015,31(10):1756-1761.
- [27] 何文艳,刘静,刘树贤. 肝纤维化大鼠骨髓间充质干细胞体外诱导为类肝细胞[J]. 基础医学与临床, 2009,29(3):277-282.
- [28] Cusick RA, Lee H, Sano K, et al. The effect of donor and recipient age on engraftment of tissue-engineered liver. *J Pediatr Surg*. 1997;32(2):357-360.
- [29] Soto-Gutierrez A, Navarro-Alvarez N, Rivas-Carrillo JD, et al. Construction and transplantation of an engineered hepatic tissue using a polyaminourethane-coated nonwoven polytetrafluoroethylene fabric. *Transplantation*. 2007;83(2): 129-137.
- [30] 俞建雄,袁静,许瑞云. 三种大鼠骨髓间充质干细胞源性人工肝组织的构建与评价[J]. 中国组织工程研究, 2014,18(41): 6578-6584.