

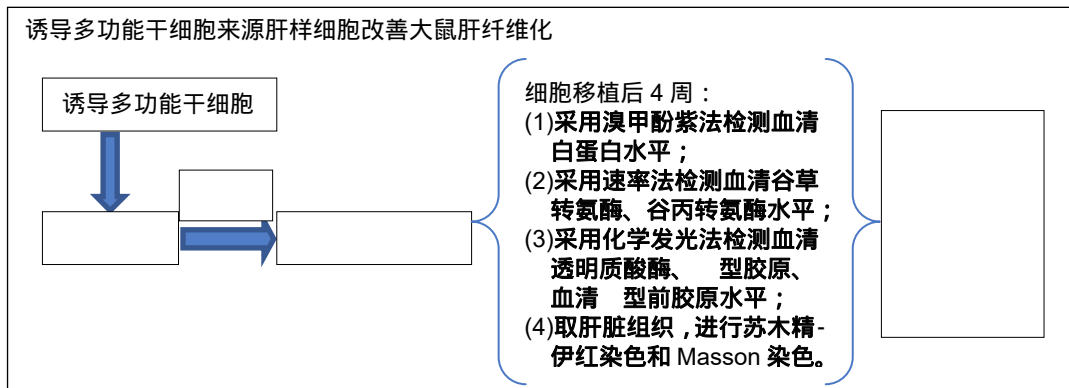
诱导多功能干细胞来源肝样细胞体内抗肝纤维化

程 钢, 黄邓高, 梁 颖(中南大学湘雅医学院附属海口医院肿瘤放疗科, 海南省海口市 570208)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1607

ORCID: 0000-0002-0355-918X(程钢)

文章快速阅读:



程钢, 男, 1981 年生, 吉林省吉林市人, 2015 年北华大学医学院毕业, 主治医师, 主要从事肿瘤放疗方面的研究。

通讯作者: 梁颖, 主治医师, 硕士研究生, 中南大学湘雅医学院附属海口医院肿瘤放疗科, 海南省海口市 570208

文献标识码: B

稿件接受: 2018-11-16



文题释义:

诱导多功能干细胞: 2006 年, Takahashi 等发现小鼠成纤维细胞可诱导分化为干细胞, 并且该干细胞具有与胚胎干细胞相似的特征与功能, 被命名为诱导多功能干细胞。2007 年, Takahashi 等通过反转录病毒可将 Oct3/4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 基因导入人体皮肤细胞转化为诱导多功能干细胞。2009 年, Song 等通过模拟人体的肝脏胚胎发育过程, 在诱导分化的不同阶段添加细胞因子, 首次将人诱导多功能干细胞定向诱导分化为肝细胞。

人诱导多功能干细胞向肝细胞的分化: 目前获取人诱导多功能干细胞来源肝样细胞主要分 3 个阶段, 第一阶段为内胚层分化阶段, 第二阶段为内胚层向肝细胞发展阶段, 第三阶段为成熟肝细胞阶段。现阶段应用较多的方法是在不同的诱导分化阶段添加生长因子、细胞因子或者小分子化合物, 促进人诱导多功能干细胞分化为肝样细胞。在肝细胞生长与分化过程中, 多种生长因子与细胞因子参与其中, 主要包括肝细胞生长因子、表皮生长因子、转化生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、胰岛素、胰岛素样生长因子和抑瘤素 M 等。

摘要

背景: 诱导多功能干细胞具有与胚胎干细胞相似的自我更新、增殖及分化能力, 无来源限制, 又不存在伦理问题, 有望成为治疗肝病的细胞来源。

目的: 观察诱导多功能干细胞来源肝样细胞体内移植对肝纤维化的改善作用。

方法: 采用三步法将诱导多功能干细胞诱导分化为肝样细胞, 采用糖原染色、LDL 摄取实验、免疫组织化学法检测诱导分化细胞合成糖原能力、摄取 LDL 能力和甲胎蛋白、白蛋白、CK18 蛋白表达。取成年雄性 SD 大鼠 45 只(由中南大学湘雅医学院附属海口医院医学实验动物中心提供), 随机分为 3 组, 分别为正常对照组、模型组、细胞移植组, 每组 15 只。模型组、细胞移植组以腹腔注射四氯化碳方法建立肝纤维化模型, 造模后第 3 天, 细胞移植组尾静脉注射 0.5 mL 诱导分化 21 d 的肝样细胞, 细胞浓度为 $2 \times 10^9 L^{-1}$ 。细胞移植后 4 周, 取静脉血与肝组织标本, 分析肝功能及肝纤维化指标变化与肝病理改变。

结果与结论: 诱导分化 21 d 后, 人诱导多功能干细胞克隆团已经松散, 以类圆形或多角形为主, 呈铺路石样分布并密集排列, 糖原染色可见细胞胞浆内有大量聚集的粉红色糖原, 具备摄取 LDL 的能力, 免疫组织化学法观察甲胎蛋白、白蛋白与 CK18 呈阳性表达; 细胞移植后 4 周, 与正常组比较, 模型组白蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$), 直接胆红素、间接胆红素、谷草转氨酶、谷丙转氨酶及型胶原、血清透明质酸酶、血清型前胶原水平均显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 细胞移植组白蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$), 直接胆红素、间接胆红素、谷草转氨酶、谷丙转氨酶及型胶原、血清透明质酸酶、血清型前胶原水平均显著降低 ($P < 0.05$); 细胞移植后 4 周, 细胞移植组炎性细胞浸润、肝细胞变性与坏死程度较模型组均有不同程度的改善; 结果表明, 诱导多功能干细胞来源的肝样细胞对大鼠肝纤维化具有明显改善作用。

关键词:

肝纤维化; 诱导多功能干细胞; 干细胞来源肝样细胞; 细胞移植; 海南省自然科学基金

主题词:

肝硬化; 诱导多功能干细胞; 肝细胞; 组织工程

中图分类号: R459.9; R394.2

基金资助:

2016 年度海南省自然科学基金(20168315), 项目负责人: 梁颖

Cheng Gang, Attending physician, Department of Radiation Oncology, Affiliated Haikou Hospital, Xiangya School of Medicine, Central South University, Haikou 570208, Hainan Province, China

Corresponding author: Liang Ying, Master candidate, Attending physician, Department of Radiation Oncology, Affiliated Haikou Hospital, Xiangya School of Medicine, Central South University, Haikou 570208, Hainan Province, China

Hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells inhibit liver fibrosis in rats

Cheng Gang, Huang Denggao, Liang Ying (Department of Radiation Oncology, Affiliated Haikou Hospital, Xiangya School of Medicine, Central South University, Haikou 570208, Hainan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Induced pluripotent stem cells have similar self-renewal, proliferation and differentiation abilities to embryonic stem cells. They have no source limitations, no ethical problems, and no current problems of cell xenogenesis, which are expected to be the source of cells for the treatment of liver diseases.

OBJECTIVE: To observe the effect of induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells on liver fibrosis.

METHODS: The three-step method *in vitro* was used to induce the differentiation of induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells. Glycogen staining, immunohistochemistry and low-density lipoprotein uptake assay were used to detect the ability of induced cells to synthesize glycogen, alpha-fetoprotein, albumin, CK18 protein and low-density lipoprotein uptake. Forty-five Sprague-Dawley rats (provided by the Experimental Animal Center, the Affiliated Haikou Hospital, Xiangya School of Medicine, Central South University) were randomized into three groups: normal control group, model group and cell transplantation group ($n=15$ per group). The rats in the latter two groups were intraperitoneally injected with carbon tetrachloride to establish liver fibrosis models. Cell transplantation group was given intravenous injection of hepatocyte-like cells (induced for 21 days), $0.5\text{ mL}, 2 \times 10^9/\text{L}$, at 3 days after modeling. Four weeks after cell transplantation, venous blood and liver tissue samples were taken to analyze the changes of liver function, liver fibrosis index and liver pathology.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) After 21 days of induction, human induced pluripotent stem cell clonal clusters became loose, mainly round or polygonal in shape, and presented with a dense paving stone-like arrangement. A large amount of pink glycogens could be seen in the cytoplasm, indicating that induced pluripotent stem cells have the ability to synthesize glycogen. Low-density lipoprotein uptake test showed that induced pluripotent stem cells had the ability to uptake low-density lipoprotein. Immunohistochemistry detection showed that the cells were positive for alpha fetoprotein, albumin and CK18. (2) At 4 weeks after cell transplantation, the level of albumin in the model group was significantly lower than that in the normal control group ($P < 0.05$), while the levels of direct bilirubin, indirect bilirubin, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, type IV collagen, serum hyaluronidase, serum type III procollagen in the model group were significantly higher than those in the normal control group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the level of albumin in the cell transplantation group was significantly increased ($P < 0.05$), while the levels of direct bilirubin, indirect bilirubin, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, type IV collagen, serum hyaluronidase, serum type III procollagen in the cell transplantation group were significantly decreased ($P < 0.05$). (3) Four weeks after cell transplantation, inflammatory cell infiltration, hepatocyte degeneration and necrosis in the cell transplantation group were improved to different extents. Therefore, hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells could significantly improve liver fibrosis in rats.

Subject headings: Liver Cirrhosis; Induced Pluripotent Stem Cells; Hepatocytes; Tissue Engineering

Funding: the Natural Science Foundation of Hainan Province in 2016, No. 20168315 (to LY)

0 引言 Introduction

肝纤维化是一种或多种病因(乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒等)长期或反复作用下应激反应的过程,是一种常见的慢性进行性肝病。慢性肝病多伴有肝纤维化,其中20%-40%最终发展为肝硬化,甚至肝癌^[1-3],即肝纤维化是肝硬化的前期表现与必经途径。目前对肝纤维化的发病及发展机制仍不明确,因此探索治疗肝纤维化的有效途径对防治肝硬化和肝癌具有重要意义。

近年来,动物研究发现干细胞移植对肝纤维化具有改善作用^[4-6],应用的干细胞主要有骨髓间充质干细胞、脐血间充质干细胞等。骨髓间充质干细胞的增殖和分化潜能随着供者年龄的增长而下降,而且骨髓来源和数量有限,使其广泛应用受到限制。脐血间充质干细胞分离和培养方式存在一些争议。诱导多能干细胞的出现既解决了成体干细胞增殖分化能力有限的问题,又不存在伦理问题^[7-8],有望成为治疗肝病的细胞来源。

实验以诱导多功能干细胞为来源,采用三步法将其诱导分化为肝样细胞,然后移植于肝纤维化大鼠体内,观察诱导多功能干细胞来源肝样细胞对肝纤维化的改善作用。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外与体内观察实验。

1.2 时间与地点 实验于2015年1月至2016年7月在中南大学湘雅医学院附属海口医院完成。

1.3 材料 人诱导多能干细胞(北京赛贝生物技术有限公司提供); Knockout™ DMEM培养基(南京信帆生物技术有限公司); Knockout™血清替代物、非必需氨基酸、β-巯基乙醇(上海索宝生物科技有限公司); HBM培养基、RPMI 1640培养基、碱性成纤维细胞生长因子(北京泽平科技有限责任公司); 胎牛血清、Wnt3a、激活素A(浙江天杭生物科技有限公司); 鼠抗人甲胎蛋白、白蛋白及CK18单克隆抗体(北京奥维亚生物技术有限公司); 免疫组织化学试剂盒(欣博盛生物科技有限公司); DiI-AC-LDL(广州奕源生物科技有限公司); 四氯化碳(天津东旺科技发展有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 人诱导多能干细胞的培养 取液氮冻存的人诱导多能干细胞,复苏后,加入含有24%Knockout™血清替代物、1×谷氨酰胺替代物、1×非必需氨基酸、0.1 mmol/L β-巯基乙醇、100 U/mL青霉素/链霉素和4.8 μg/L碱性成纤维细胞生长因子的Knockout™ DMEM培养基,接种于24孔培养板,放置于37℃,含体积分数5%的CO₂培养箱中培养。

1.4.2 人诱导多能干细胞向肝样细胞的诱导分化 当人诱导多能干细胞贴壁后,去除原有的培养基,换为含有1×谷氨酰胺替代物、体积分数0.5%胎牛血清、20 μg/L

Wnt3a、100 μg/L激活素A的RPMI 1640培养基, 培养6 d, 此阶段诱导其分化为特定性内胚层; 然后更换为含1×谷氨酰胺替代物、0.5 g/L牛血清白蛋白、10 μg/L人成纤维生长因子4的HBM培养基, 培养5 d, 此阶段诱导其分化为肝祖细胞; 最后更换为含体积分数5%胎牛血清、10 μg/L人成纤维生长因子4、10 μg/L肝细胞生长因子、10 μg/L重组抑瘤素M、10⁻⁷ mol/L地塞米松的HBM培养基, 培养10 d, 此阶段诱导其分化为肝细胞^[9]。倒置显微镜下观察细胞形态。

1.4.3 诱导分化结果的鉴定

糖原染色检测糖原合成能力:取诱导分化21 d的细胞, 制备细胞爬片24 h后, 以无菌PBS洗涤3次, 3 min/次; 去除PBS, 加入40 g/L多聚甲醛固定15 min, 以无菌PBS洗涤3次, 3 min/次; 去除PBS, 加入高碘酸氧化10 min; 去除高碘酸, 蒸馏水洗涤细胞5次, 3 min/次; 雪夫试剂染色15 min; 取出盖玻片, 温和流水冲洗, 显微镜下观察染色情况。

免疫组织化学法观察甲胎蛋白、白蛋白及CK18的表达:取诱导后7, 14, 21 d的细胞, 以40 g/L多聚甲醛固定20 min, PBS清洗细胞3次, 5 min/次; 68 ℃烤片20 min, 常规二甲苯脱蜡, 梯度乙醇脱水; 加入体积分数3% H₂O₂孵育10 min, PBS清洗细胞; 以0.01 mol/L枸橼酸缓冲液进行抗原修复; 正常羊血清工作液封闭10 min; 滴加一抗(鼠抗人甲胎蛋白、白蛋白及CK18单克隆抗体), 4 ℃冰箱孵育过夜, PBS清洗细胞, 以PBS代替一抗作阴性对照, 滴加生物素标记二抗, 37 ℃孵育30 min, PBS清洗细胞; 滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液孵育30 min, PBS清洗细胞; DAB/H₂O₂反应染色, 自来水充分冲洗, 苏木精复染, 常规脱水, 透明, 干燥, 封固。显微镜下观察染色情况。每张切片随机选择9个视野, 每个视野观察100个细胞, 计数阳性细胞数。

LDL摄取实验:取诱导前及诱导分化后21 d的细胞, 弃原培养基, 以PBS清洗2次; 将含有20 mg/L Dil-AC-LDL的DMEM完全培养基加入细胞中, 孵育4 h; 弃掉含有Dil-AC-LDL的培养基, 以PBS清洗细胞3次, 5 min/次; 显微镜下观察染色情况。

1.4.4 动物体内移植实验

肝纤维化模型的建立和细胞移植:取成年雄性SD大鼠(SPF级, 体质量200-220 g, 常规饲养, 自由进食水, 由中南大学湘雅医学院附属海口医院医学实验动物中心提供)45只, 随机分为3组, 分别为正常组、模型组、细胞移植组, 每组15只。模型组和细胞移植组腹腔注射1 mL/kg的40%四氯化碳橄榄油溶液, 2次/周, 共注射4周, 经病理组织学观察, 肝组织出现典型的肝细胞坏死、空泡化和大量胶原纤维沉积等肝纤维化病理特征, 判定造模成功。如造模过程中有动物死亡, 采用相同方法造模。动物实验中对动物的处理严格依照动物伦理学标准进行。造模成功后第3天, 细胞移植组尾静脉注射0.5 mL诱导分化21 d的人诱

导多能干细胞, 细胞浓度为2×10⁹ L⁻¹, 模型组注射等量生理盐水。

标本采集:细胞移植后4周, 常规麻醉大鼠, 抽取静脉血3 mL, 同时打开腹腔, 取肝组织。

肝功能及肝纤维化指标检测:取静脉血分离血清, 采用溴甲酚紫法检测血清白蛋白水平^[10], 采用重氮法检测直接胆红素、间接胆红素水平^[11], 采用速率法检测谷草转氨酶、谷丙转氨酶水平^[12], 采用化学发光法检测血清透明质酸酶、Ⅲ型胶原、血清Ⅰ型前胶原水平^[13]。

肝脏病理观察:取肝脏组织, 体积分数10%甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, 进行苏木精-伊红染色和Masson染色, 光学显微镜下观察肝脏组织病理改变。

1.5 主要观察指标 诱导多功能干细胞来源肝样细胞移植后4周, 各组大鼠肝功能、肝纤维化指标变化及肝脏组织病理形态。

1.6 统计学分析 采用SPSS 22.0进行统计学处理, 计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 形式表示, 进行组间独立的t检验, 检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果 Results

2.1 人诱导多能干细胞向肝样细胞诱导分化的形态变化 经肝向诱导分化至第21天, 人诱导多能干细胞克隆团已经松散, 以类圆形或多角形为主, 呈铺路石样分布并密集排列, 见图1A; 糖原染色可见细胞胞浆内有大量聚集的粉红色糖原, 见图1B; LDL摄取实验显示细胞胞质内有大量红色的荧光, 见图1C; 免疫组织化学法观察甲胎蛋白、白蛋白与CK18呈阳性表达, 见图1D-F。人诱导多能干细胞向肝细胞诱导分化过程中的甲胎蛋白、白蛋白与CK18表达阳性率, 见表1。

表1 人诱导多能干细胞诱导分化后不同时间点的白蛋白、甲胎蛋白及CK18表达阳性率 ($\bar{x}\pm s$, %)

Table 1 Positive rates of albumin, alpha-fetoprotein and CK18 expression at different time points after induced differentiation of human induced pluripotent stem cells

蛋白	诱导分化 7 d	诱导分化 14 d	诱导分化 21 d
白蛋白	14.92±3.21	64.30±4.53	90.25±6.74
甲胎蛋白	82.57±3.9	39.28±2.15	12.46±3.17
CK18	12.36±1.19	61.29±6.48	89.82±3.26

2.2 动物体内移植实验结果 入选45只SD大鼠, 其中30只大鼠建立肝纤维化模型, 3只造模失败, 造模成功率为90%, 随后采用相同方法造模, 将实验动物补齐。

2.2.1 肝功能指标检测结果 与正常组比较, 模型组、细胞移植组白蛋白显著降低, 直接胆红素、间接胆红素、谷草转氨酶、谷丙转氨酶水平均显著升高, 差异均有显著性意义($P < 0.05$)。与模型组比较, 细胞移植组白蛋白显著升

高,直接胆红素、间接胆红素、谷草转氨酶、谷丙转氨酶水平均显著降低,差异均有显著性意义($P < 0.05$),见表2。

表2 各组大鼠肝功能指标检测结果 ($\bar{x} \pm s, n=15$)
Table 2 Liver function indexes in each group of rats

指标	正常组	模型组	细胞移植组
白蛋白(g/L)	22.35±0.62	14.36±0.38 ^a	18.89±0.85 ^{ab}
直接胆红素(μmol/L)	1.87±0.56	4.65±0.98 ^a	2.61±0.38 ^{ab}
间接胆红素(μmol/L)	2.65±0.97	8.29±0.76 ^a	4.35±1.09 ^{ab}
谷草转氨酶(U/L)	66.82±26.57	298.37±42.55 ^a	185.69±52.77 ^{ab}
谷丙转氨酶(U/L)	57.37±16.64	154.25±22.54 ^a	108.75±19.54 ^{ab}

表注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.2.2 肝纤维化指标检测结果 与正常组比较,模型组型胶原、血清透明质酸酶、血清型前胶原水平均显著升高,差异均有显著性意义($P < 0.05$)。与模型组比较,细胞移植组型胶原、血清透明质酸酶、血清型前胶原水平均显著降低,差异均有显著性意义($P < 0.05$)。细胞移植组型胶原、血清透明质酸酶水平仍高于正常组,差异均有

显著性意义($P < 0.05$),见表3。

表3 各组大鼠肝纤维化指标检测结果 ($\bar{x} \pm s, n=15, \mu\text{g/L}$)
Table 3 Liver fibrosis indexes in each group of rats

指标	正常组	模型组	细胞移植组
型胶原	14.19±5.21	49.82±10.27 ^a	21.28±5.61 ^{ab}
血清透明质酸酶	101.54±15.72	326.29±36.84 ^a	141.27±10.46 ^{ab}
血清型前胶原	16.45±2.04	50.44±5.12 ^a	19.82±2.16 ^b

表注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.2.3 肝脏病理观察结果 细胞移植后4周苏木精-伊红染色、Masson染色显示,正常组肝组织肝小叶轮廓清晰,未见炎性细胞浸润,肝细胞形态正常,肝细胞索排列规则,肝窦无扩张;模型组肝小叶轮廓模糊不清,肝细胞疏松、肿胀,可见大量炎性细胞浸润,大量脂肪细胞呈空泡状改变,呈典型的肝纤维化改变;细胞移植组可见炎性细胞浸润、肝细胞变性与坏死,但程度较对照组明显减轻,病理改变介于正常组与对照组之间,见图2。

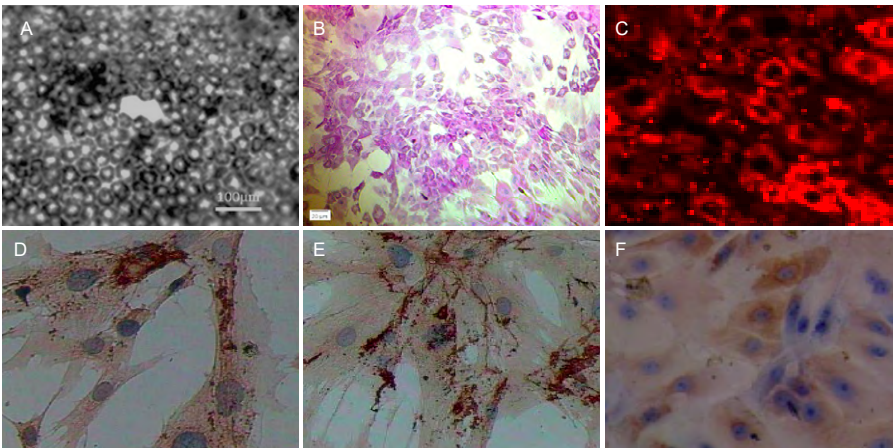
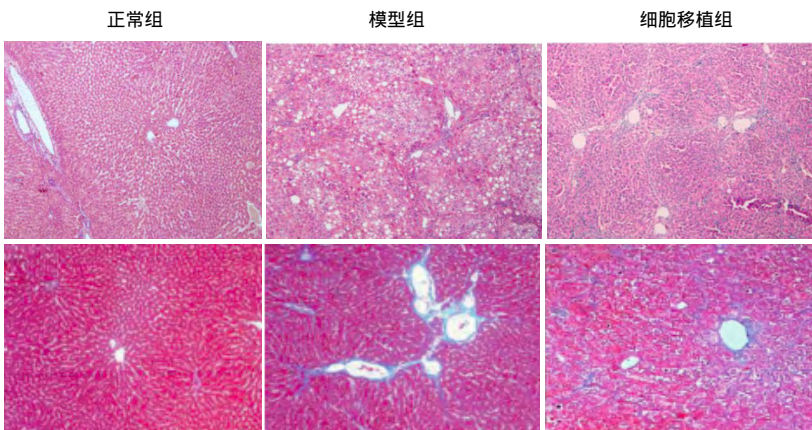


图1 人诱导多能干细胞肝向分化及鉴定

Figure 1 Hepatocyte differentiation and identification of human induced pluripotent stem cells

图注:图中A为诱导分化第21天,有大量的肝样细胞;B为糖原染色可见细胞胞浆内有大量聚集的粉红色糖原;C为诱导分化21 d的人诱导多能干细胞具备摄取LDL的能力($\times 200$);D-F为免疫组化染色可见甲胎蛋白、白蛋白与CK18的表达($\times 200$)。



图注:模型组大鼠肝组织呈典型的肝纤维化病理表现;细胞移植组肝纤维化程度较模型组显著减轻。
图2 各组大鼠肝脏组织病理观察结果($\times 100$)
Figure 2 Pathological observation of the rat liver tissues in each group ($\times 100$)

3 讨论 Discussion

2006年, Takahashi等^[14]发现小鼠成纤维细胞可分化为干细胞, 并且该干细胞具有与胚胎干细胞相似的特征与功能, 被命名为诱导多功能干细胞。2007年, Takahashi等^[15]发现通过反转录病毒可将Oct3/4、Sox2、Klf4和c-Myc基因导入人体皮肤细胞转化为诱导多功能干细胞。2009年, Song等^[16]通过模拟人体的肝脏胚胎发育过程, 在诱导分化的不同阶段添加细胞因子, 首次将人诱导多功能干细胞定向诱导分化为肝细胞。此后, 研究者采用细胞因子、特定基因、三维培养、细胞分选或共培养方法, 不断提高人诱导多功能干细胞来源肝样细胞的诱导效率及诱导分化后肝样细胞功能^[17-19]。

目前获取人诱导多功能干细胞来源肝样细胞主要分3个阶段, 第一阶段为内胚层分化阶段, 第二阶段为内胚层向肝细胞发展阶段, 第三阶段为成熟肝细胞阶段。现阶段应用较多的方法是在不同的诱导分化阶段添加生长因子、细胞因子或者小分子化合物, 促进人诱导多能干细胞分化为肝样细胞。在肝细胞生长与分化过程中, 多种生长因子与细胞因子参与其中, 主要包括肝细胞生长因子、表皮生长因子、转化生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、胰岛素、胰岛素样生长因子和抑瘤素M等^[17-22]。早期有研究发现Wnt家族成员直接参与调节内胚层的形成, 尤其是Wnt3a信号^[23-24]。另外, 有研究证实在肝脏的不同发育阶段均有Wnt3a的表达, 并且Wnt3a也被诱导表达在肝细胞再生过程中^[25-26]。因此, 该研究将激活素A与Wnt3a在诱导分化的首阶段合用, 以更有效地将人诱导多功能干细胞诱导分化为肝样细胞。研究显示诱导21 d后, 倒置显微镜下可见人诱导多能干细胞呈现肝样细胞形态, 初步断定肝样细胞形成。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。因此接下来对诱导分化的肝样细胞特征及功能进行了分析。一般来说, 评价肝样细胞特征的指标主要包括细胞形态、特异性基因及蛋白表达、细胞色素P450s酶及酶代谢活性等^[27], 对肝细胞功能的评价主要有尿素合成、糖原合成、脂储存、吲哚青绿等^[28-29]。实验主要进行了甲胎蛋白、白蛋白、CK18蛋白检测, 糖原染色实验, 结果显示: 诱导21 d后的肝样细胞阳性表达肝细胞特征性蛋白甲胎蛋白、白蛋白、CK18蛋白, 具备合成糖原能力, 以上结果提示诱导分化的细胞具有肝样细胞功能。下一步需要与其他诱导方式作比较, 以评价其诱导分化效果, 以更进一步优化人诱导多功能干细胞来源肝样细胞的诱导分化效率。同时对于各细胞因子在诱导分化中的分子机制还需更进一步的研究。

诱导多功能干细胞的建立与应用不存在伦理限制, 在条件允许的情况下, 甚至可以建立自身诱导多功能干细胞, 通过诱导使其定向分化, 产生特定类型的细胞, 用于各器官的组织工程或细胞移植, 可以避免免疫排斥现象^[30-37]。

体外实验已经成功地采用三步诱导法获得了人诱导多功能干细胞来源肝样细胞, 接下来进行了动物体内移植实验, 进一步观察人诱导多功能干细胞来源肝样细胞对肝纤维化的改善作用。该研究结果发现细胞移植后4周, 肝纤维化大鼠肝细胞变性、坏死等情况较对照组明显减轻, 炎症细胞浸润明显减少, 同时肝功能指标直接胆红素、间接胆红素、谷草转氨酶、谷丙转氨酶及肝纤维化指标 型胶原、血清透明质酸酶、血清 型前胶原水平均较模型组有明显改善, 这些结果表明人诱导多功能干细胞来源肝样细胞对肝纤维化大鼠的肝功能及肝纤维化具有一定的改善作用, 提示诱导多功能干细胞来源肝样细胞有望成为临床肝脏疾病治疗的细胞产品。但是对于人诱导多功能干细胞来源肝样细胞的作用机制还有待进一步研究。同样Asgafi等^[38]研究也认为诱导多功能干细胞来源肝样细胞对肝损伤具有治疗作用, 可明显提高肝损伤大鼠存活率与肝功能。

尽管实验采用三步诱导法成功诱导分化出诱导多功能干细胞来源肝样细胞, 并证实其对肝纤维化具有明显改善作用, 但距离其应用于临床还有很长的路要走, 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, 是诱导多能干细胞向肝细胞诱导分化研究的努力方向。

作者贡献: 实验设计为程钢、梁颖, 实验实施为程钢、黄邓高, 实验评估为黄邓高, 资料收集为程钢。

经费支持: 该文章接受了“2016年度海南省自然科学基金(20168315)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经中南大学湘雅医学院海口医院动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南: 该研究遵守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: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊投稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过中南大学湘雅医学院海口医院生物统计学专家审核。

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4.0”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] Zoubek ME, Trautwein C, Strnad P. Reversal of liver fibrosis: From fiction to reality. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2017;31(2):129-141.
- [2] Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP. Reversibility of liver fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5(Suppl 1):S26.

- [3] Pinzani M, Romanelli RG, Magli S. Progression of fibrosis in chronic liver diseases: time to tally the score. *J Hepatol*. 2001;34(5):764-767.
- [4] 唐卫平,胡琦,戴小明,等.脂肪间充质干细胞移植对肝纤维化的治疗作用及其机制[J].中华肝病杂志,2018,26(1):28-33.
- [5] 薛改.脐带间充质干细胞对肝损伤的治疗作用及其机制研究[D].石家庄:河北医科大学,2017.
- [6] 刘卫,余森源,严和中,等.骨髓间质干细胞移植对肝纤维化模型大鼠治疗效果[J].临床军医杂志,2017,45(9):903-907.
- [7] Kim JH, Jang YJ, An SY, et al. Enhanced Metabolizing Activity of Human ES Cell-Derived Hepatocytes Using a 3D Culture System with Repeated Exposures to Xenobiotics. *Toxicol Sci*. 2015;147(1):190-206.
- [8] Imai K, Tanoue A, Nakamura K, et al. An attempt to in vitro embryotoxicity test using mouse ES cells and human hepatocytes. *Aatex*. 2013;18(1):33-38.
- [9] 杜盼,余江南,徐希明.人源多能干细胞体外定向诱导分化为肝细胞[J].江苏大学学报(医学版),2018,28(1):39-46.
- [10] 史德宝,吕礼应.血清白蛋白检测方法对糖化白蛋白的影响[J].安徽医科大学学报,2015,50(12):1805-1808.
- [11] 王杨,谷冬梅,陈京山,等.三种常规方法检测血清胆红素结果的可比性和偏倚评估[J].中国实验诊断学,2017,21(10):1744-1747.
- [12] 饶雅琪,张丽,曾金祥,等.禾叶风毛菊醇提取物对四氯化碳致小鼠肝损伤的保护作用[J].中国临床药理学杂志,2017,33(20):2058-2061.
- [13] 易梦秋,余旻,王鹏.多器官功能障碍综合征大鼠肺组织MMP-9、TIMP-1和Ⅲ型胶原的表达[J].中国病理生理杂志,2018,34(1):123-129.
- [14] 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.
- [15] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-872.
- [16] Song Z, Cai J, Liu Y, et al. Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Cell Res*. 2009;19(11):1233-1242.
- [17] Twaroski K, Mallanna SK, Jing R, et al. FGF2 mediates hepatic progenitor cell formation during human pluripotent stem cell differentiation by inducing the WNT antagonist NKD1. *Genes Dev*. 2015;29(23):2463-2474.
- [18] Takagi C, Yagi H, Hieda M, et al. Mesenchymal Stem Cells Contribute to Hepatic Maturation of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Eur Surg Res*. 2017;58(1-2):27-39.
- [19] Mallanna SK, Cayo MA, Twaroski K, et al. Mapping the Cell-Surface N-Glycoproteome of Human Hepatocytes Reveals Markers for Selecting a Homogeneous Population of iPSC-Derived Hepatocytes. *Stem Cell Reports*. 2016;7(3):543-556.
- [20] 刘国菊,李丛丛,李睿坤,等.转化生长因子 β 1在纤维化疾病发病中作用的研究进展[J].山东医药,2018,58(30):106-109.
- [21] 李梓豪,尹大龙,崔逸峰,等.肝硬化肝癌部分切除术后影响肝再生的抗纤维化因子研究[J].国际外科学杂志,2018,45(2):134-137.
- [22] 段佳悦,史清峰,王明光,等.血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子和内皮抑素在肝硬化中的表达及意义[J].临床荟萃,2018,33(5):427-430.
- [23] Sulzbacher S, Schroeder IS, Truong TT, et al. Activin A-induced differentiation of embryonic stem cells into endoderm and pancreatic progenitors-the influence of differentiation factors and culture conditions. *Stem Cell Rev*. 2009;5(2):159-173.
- [24] 李毅,李欣,孙涛. CDX2基因修饰的脐带间充质干细胞向杯状细胞分化的可行性研究[J].生物技术通讯,2014,25(4):515-519.
- [25] Kang SJ, Lee HM, Park YI, et al. Chemically induced hepatotoxicity in human stem cell-induced hepatocytes compared with primary hepatocytes and HepG2. *Cell Biol Toxicol*. 2016;32(5):403-417.
- [26] 张文成.细胞重编程与诱导内胚层多能干细胞的获取与鉴定[D].北京:中国人民解放军军事医学科学院,解放军军事医学科学院,2012.
- [27] Boulter L, Govaere O, Bird TG, et al. Macrophage-derived Wnt opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease. *Nat Med*. 2012;18(4):572-579.
- [28] Gieseck RL 3rd, Hannan NR, Bort R, et al. Maturation of induced pluripotent stem cell derived hepatocytes by 3D-culture. *PLoS One*. 2014;9(1):e86372.
- [29] Chen Y, Li Y, Wang X, et al. Amelioration of Hyperbilirubinemia in Gunn Rats after Transplantation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatocytes. *Stem Cell Reports*. 2015;5(1):22-30.
- [30] Roy-Chowdhury N, Wang X, Guha C, et al. Hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells. *Hepatol Int*. 2017;11(1):54-69.
- [31] Sakurai F, Mitani S, Yamamoto T, et al. Human induced-pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells as an in vitro model of human hepatitis B virus infection. *Sci Rep*. 2017;7:45698.
- [32] Huang CS, Lin HC, Lu KH, et al. Generation of high quality of hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells with Parp1 but lacking c-Myc. *J Chin Med Assoc*. 2018;81(10):871-877.
- [33] Cao YY, Zeng X. Research advances in hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells and their application. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2018;26(1):69-72.
- [34] Starokozhko V, Hemmingsen M, Larsen L, et al. Differentiation of human-induced pluripotent stem cell under flow conditions to mature hepatocytes for liver tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(5):1273-1284.
- [35] Takayama K, Akita N, Mimura N, et al. Generation of safe and therapeutically effective human induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells for regenerative medicine. *Hepatol Commun*. 2017;1(10):1058-1069.
- [36] Lorvellec M, Scottoni F, Crowley C, et al. Mouse decellularised liver scaffold improves human embryonic and induced pluripotent stem cells differentiation into hepatocyte-like cells. *PLoS One*. 2017;12(12):e0189586.
- [37] Kotaka M, Toyoda T, Yasuda K, et al. Adrenergic receptor agonists induce the differentiation of pluripotent stem cell-derived hepatoblasts into hepatocyte-like cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):16734.
- [38] Asgari S, Moslem M, Bagheri-Lankarani K, et al. Differentiation and transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells. *Stem Cell Rev*. 2013;9(4):493-504.