

胚胎干细胞和诱导多能干细胞源性肝细胞样细胞研究进展

陈银银¹ 薛志刚¹ 谢渭芬² 范国平^{1*}

同济大学医学院¹(200092) 第二军医大学长征医院消化内科²

摘要 肝硬化、原发性肝癌、代谢性肝病等终末期肝病的治疗正成为全球棘手的医疗问题。肝细胞移植(HT)有望成为终末期肝病的替代疗法,但肝细胞来源紧缺、体外增殖困难等限制了HT的临床应用。干细胞的发现为解决上述问题提供了新的思路。胚胎干细胞(ESCs)和诱导多能干细胞(iPSCs)分化为肝细胞样细胞(HLCs)的研究,可为临床细胞替代治疗提供合适的细胞来源,亦在药物评估和肝脏发生等基础研究方面起重要作用。本文就近年ESCs和iPSCs体外定向分化为HLCs的研究进展作一综述。

关键词 胚胎干细胞; 多能干细胞; 肝细胞; 干细胞移植; 分化

Advances in Study of Hepatocyte-like Cells Derived from Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells CHEN Yinyin, XUE Zhigang, XIE Weifen, FAN Guoping. Tongji University School of Medicine, Shanghai (200092)

Correspondence to: FAN Guoping, Email: GFan@mednet.ucla.edu

Abstract The treatment of end-stage liver diseases such as cirrhosis, primary liver cancer, metabolic liver diseases is becoming a serious issue of healthcare worldwide. Hepatocyte transplantation (HT) is a promising alternative treatment for these diseases. However, because of limited availability and difficulty of *in vitro* proliferation of hepatocytes, the clinical application of HT is severely limited. Research on stem cells opens up a whole new approach for these problems. Hepatocyte-like cells (HLCs) derived from embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs) provides a suitable source of hepatocytes for cell replacement therapy in clinics, and may have potential roles in drug evaluation and basic studies of hepatogenesis. This article reviewed the advances in study of directed differentiation of ESCs and iPSCs to HLCs *in vitro*.

Key words Embryonic Stem Cells; Multipotent Stem Cells; Hepatocytes; Stem Cell Transplantation; Cell Differentiation

目前,肝硬化、原发性肝癌、代谢性肝病等终末期肝病的治疗主要依赖于原位肝移植,但供肝来源严重缺乏和移植排斥等问题限制了原位肝移植的广泛开展。肝细胞移植(HT)作为原位肝移植的辅助治疗手段,可部分缓解上述难题,但亦面临着肝细胞来源紧缺、体外增殖困难(特别是随着培养时间的延长)等问题。因此,寻找合适的肝细胞来源已成为一个十分紧迫的课题。

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)是来源于囊胚内细胞团的一种高度未分化细胞,具有无限增殖和发育全能性等特点,可自发分化为多种细胞,特定诱导条件下可定向分化为某一特定细胞。目前已知ESCs可分化为神经细胞、心肌细胞、造血细胞、平滑肌细胞、软骨细胞等。2001年,Hamazaki等^[1]首次报道成功诱导小鼠ESCs分化为肝细胞样细胞(hepatocyte-like cells, HLCs),迄今已有多个研究中心成功开展了ESCs源性HLCs的体外研究。2003年,Rambhatla等^[2]成功诱导人ESCs(hESCs)分化为HLCs。目前已明确可由ESCs获得表达肝脏特异性标记物的HLCs,但至今尚未建立统一、高效的诱导分化体系。

2006年,Takahashi等^[3]首次于小鼠成纤维细胞内导入特定转录因子(Oct3/4, Sox2, c-Myc和Klf4),重编程为具有ESCs特征的诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)。此后诸多研究人员将特定基因、基因产物或小分子化合物以类似方法导入不同来源的动物或人类体细胞,重编程以获得iPSCs。此类细胞在形态、表面标记物、功能等方面和ESCs相似,但避免了ESCs研究中所涉及的伦理问题。且来源于患者的体细胞可大大降低细胞移植中可能出现的免疫排斥反应。因而,iPSCs已成为干细胞研究领域炙手可热的话题。本文就ESCs和iPSCs诱导分化为HLCs的研究进展作一综述。

一、肝脏发育过程中的信号调节

1. 细胞因子为主的信号通路调节: 肝脏发育涉及多种信号因子,最早期的前肠内胚层发育需高浓度转化生长因子(TGF)- β 家族成员Nodal信号参与。在由早期心源中胚层产生的成纤维细胞生长因子(FGF)作用下,肝脏胚胎原基细胞增殖并迁移至横膈间充质,在由后者产生的骨形态发生蛋白(BMP)信号刺激下进一步分化、发育。在随后肝细胞迅速增殖和功能分化过程中,间充质细胞分泌产生的肝细胞生长因子(HGF)、造血细胞分泌的制瘤素(OSM)、糖皮质激素

DOI: 10.3969/j.issn.1008-7125.2011.01.015

*本文通讯作者,Email: GFan@mednet.ucla.edu

素、血管内皮细胞等均发挥重要作用。此外,细胞外基质和细胞间信号亦在肝脏的发育过程中起重要作用。

2. 表观遗传修饰:表观遗传修饰是广泛存在于真核细胞的一种转录后调控机制,可在染色质水平调节基因的激活和沉默,但不改变基因序列。ESCs 向肝细胞诱导分化过程中常见的表观遗传修饰物质包括丁酸钠(SB)、5-氮杂胞嘧啶(5-AzaC)、二甲基亚砜(DMSO)、曲古抑菌素 A(TSA)。SB 是一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂,可致核组蛋白超乙酰化激活某些转录因子,进而激活某些基因表达,从而诱导细胞分化。5-AzaC 是一种 DNA 甲基转移酶抑制剂,是研究 DNA 甲基化对细胞分化和基因活化的重要工具,其去甲基化作用可促进肝脏相关基因的表达。DMSO 和 TSA 的作用机制与 SB 类似。

二、ESCs 和 iPSCs 诱导分化为 HLCs 的研究进展

1. 小鼠 ESCs 诱导分化为 HLCs:2001 年,Hamazaki 等^[1]经拟胚体(EBs)细胞因子分阶段诱导法连续诱导小鼠 ESCs,早期(第 9~12 d)予酸性 FGF(aFGF)、中期(第 12~18 d)予 HGF,晚期(第 15~18 d)予 OSM、地塞米松、胰岛素、转铁蛋白和亚硒酸混合物,并于第 18 d 检测成熟肝细胞相关基因的表达,结果示肝细胞成熟标记物白蛋白(ALB)、葡萄糖-6-磷酸酶和酪氨酸氨基转移酶表达增加,提示该方法可成功诱导小鼠 ESCs 以获得 HLCs。随后的研究中,科研人员在如何提高诱导效率和获得功能更强的 HLCs 方面作了进一步探索,采用的方法主要有:①加入各种肝脏发育过程中所需的细胞因子,如 HGF、FGF、BMP、血管内皮细胞生长因子(VEGF)、肝细胞核因子(HNF)等;②添加表观遗传修饰物质,如 SB、DMSO、TSA 等;③导入与肝脏发育相关的基因或启动子;Heo 等^[4]将白蛋白启动子导入小鼠 ESCs,使其表达绿色荧光蛋白,可有利于后续 HLCs 的分选、纯化和移植;④与其他细胞共培养;Nishiofuku 等^[5]将小鼠 ESCs 和 EBs 与大鼠肝星状细胞共培养,结果发现肝星状细胞可促进 EBs 诱导分

化为 HLCs;⑤与细胞外基质共培养,常用细胞外基质有型胶原和基质胶。

2. hESCs 诱导分化为 HLCs:目前已建立多种 hESCs 诱导分化为 HLCs 的方法,常用的早期诱导因子有激活素 A、SB、Wnt3α 等。激活素 A 可通过激活 activin/nodal 信号通路诱导 ESCs 向内胚层分化^[6]。Wnt/β-catenin 信号途径参与内胚层后续阶段的肝脏发育。Hay 等^[7]以激活素 A 结合 Wnt3α 成功诱导 hESCs 分化为具有肝细胞功能的 HLCs。常用的中期诱导因子有 HGF、FGF、BMP、DMSO 等。HGF 可通过激活 c-Jun 通路促进肝脏发育。FGF 家族中与肝脏发育相关的主要因子有 FGF2、FGF4、FGF7,来源于横隔间充质的 BMP2 和 BMP4 可与 FGF 联合诱导肝脏分化^[8]。晚期促成熟因子主要包括 OSM 和地塞米松,前者通过 gp130 信号转导通路诱导肝脏成熟,后者参与肝脏糖异生。近年 hESCs 诱导分化为 HLCs 方面取得了突破性进展,通过优化培养诱导体系,可使诱导分化率明显提高(见表 1)。

3. iPSCs 诱导分化为 HLCs:除 ESCs 外,间充质干细胞、脂肪干细胞、造血干细胞亦是 HLCs 的可能来源。近年随着 iPSCs 概念的提出,对 iPSCs 诱导分化为 HLCs 的关注亦明显增加。Iwamuro 等^[18]以高浓度激活素 A、bFGF 和 HGF 分阶段成功诱导小鼠 iPSCs 获得 HLCs。Song 等^[19]首次应用分阶段细胞因子诱导法获得人 iPSCs 来源的 HLCs,第 7 d 约有 60%的细胞表达 AFP 和 ALB。之后陆续有研究^[20-22]报道由人 iPSCs 诱导分化为 HLCs,所用诱导方案多效仿 hESCs。Si-Tayeb 等^[23]在诱导中期采用低氧以提高诱导效率。这些探索为 iPSCs 来源的 HLCs 进行临床细胞移植提供了实践基础。

三、展望

迄今,各因子分阶段组合可实现 ESCs 和 iPSCs 诱导分化为 HLCs,但获得 HLCs 所需各诱导因子的剂量和作用时间尚无定论,且诱导获得的 HLCs 是否具有功能、能否用于临床细胞移植仍待研究。如需诱导获得临床级 HLCs,需保

表 1 hESCs 诱导分化为 HLCs 的研究进展

研究者	早期阶段	中期阶段	后期阶段	结果
Rambhatla 等 ^[2]	EBs、SB 或 DM-SO×4 d	SB、DMSO×(6~7) d	SB、HGF×4 d	首次报道 hESCs 诱导分化为 HLCs,70%~80%的细胞表达肝脏相关蛋白
Lavon 等 ^[9]	EBs、肝细胞条件培养基×20 d		aFGF、bFGF、HGF、BMP4×10 d	首次报道经流式纯化获得 HLCs
Schwartz 等 ^[10]	EBs×7 d	HGF、OSM、aFGF、bFGF、FGF4×14 d		无血清培养体系、细胞因子、细胞外基质组合可优化分化效率
Baharvand 等 ^[11]	EBs×5 d	三维培养体系,FGF、HGF、OSM、Dex、ITS [△] ×20 d		三维培养体系较二维培养体系更易获得功能性 HLCs
Hay 等 ^[12]	SB、激活素 A×3 d	DMSO×7 d	HGF、OSM×7 d	激活素 A 结合 SB 的起始诱导方案可获得分泌肝细胞相关蛋白的 HLCs
Pei 等 ^[13]	EBs、激活素 A×2 d	肝脏胚胎原基细胞培养×5 d	HGF、OSM、Dex×6 d	与肝脏胚胎原基细胞共培养可获得 HLCs
Touboul 等 ^[14]	激活素 A、FGF2×2 d	Ly294002、激活素 A、BMP4、FGF2×8 d	FGF10、RA [*] 、SB431542、HGF、FGF4、EGF*×10 d	多阶段、多因子诱导体系获得均质性 HLCs 并移植入免疫缺陷小鼠
Duan 等 ^[15]	激活素 A、B27、SB×(5~8) d	FGF4、HGF、BMP2、BMP4、DMSO×(11~15) d	FGF4、HGF、OSM、Dex、DMSO×14 d	90%的 HLCs 表达 ALB
Farzaneh 等 ^[16]	激活素 A、ITS×3 d	HGF、FGF4×6 d	HGF、FGF4、OSM、Dex×9 d	三维纳米纤维共培养有利于 HLCs 功能的体现
胡智兴等 ^[17]	激活素 A×5 d	FGF1、BMP4×6 d	HGF、OSM×(6~7) d	利用较为简单的诱导步骤获得功能性 HLCs

[△]ITS: 硒; ^{*}RA: 维甲酸; ^{*}EGF: 表皮生长因子

证诱导效率、细胞活力、纯度、细胞移植数量等。此外,应尽量避免病毒等渗入诱导体系致基因突变,需优化培养体系以避免血清等残留;诱导获得的 HLCs 在培养过程中如何保持增殖潜力和表型,能否保证冻存后的存活率,移植细胞体内能否长期存活等问题尚需进一步研究予以解答,以帮助制定较为完善的临床级 HLCs 生产和移植标准。

对诱导获得的 HLCs,除检测肝脏特异基因、蛋白的表达外,还需行肝脏相关功能的检测,如 ALB 和 AFP 的分泌、肝糖原的储备、尿素的生产、低密度脂蛋白和吲哚青绿等的摄取等;此外,移植何种诱导分化阶段的 HLCs 亦有待探索,且植入方法、部位,植入细胞追踪,功能维持,不良反应等均需列入考察范围。今后,进一步深入探讨和解决此类问题将有望为 HT 开辟一条新的道路。

参考文献

- Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, et al. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells *in vitro*. FEBS Lett, 2001, 497 (1): 15-19.
- Rambhatla L, Chiu CP, Kundu P, et al. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. Cell Transplant, 2003, 12 (1): 1-11.
- 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.
- Heo J, Factor VM, Thorgeirsson SS. Rebuilding the liver with adult hepatic and embryonic stem cells. Int Congr Ser, 2007, 1302: 124-130.
- Nishiofuku M, Yoshikawa M, Ouji Y, et al. Modulated differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells by coculture with hepatic stellate cells. J Biosci Bioeng, 2010: 27.
- McLean AB, D'Amour KA, Jones KL, et al. Activin a efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed. Stem Cells, 2007, 25 (1): 29-38.
- Hay DC, Fletcher J, Payne C, et al. Highly efficient differentiation of hESCs to functional hepatic endoderm requires ActivinA and Wnt3a signaling. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105 (34): 12301-12306.
- Rossi JM, Dunn NR, Hogan BL, et al. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. Genes Dev, 2001, 15 (15): 1998-2009.
- Lavon N, Yanuka O, Benvenisty N. Differentiation and isolation of hepatic-like cells from human embryonic stem cells. Differentiation, 2004, 72 (5): 230-238.
- Schwartz RE, Linehan JL, Painschab MS, et al. Defined conditions for development of functional hepatic cells from human embryonic stem cells. Stem Cells Dev, 2005, 14 (6): 643-655.
- Baharvand H, Hashemi SM, Kazemi Ashtiani S, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems *in vitro*. Int J Dev Biol, 2006, 50 (7): 645-652.
- Hay DC, Zhao D, Fletcher J, et al. Efficient differentiation of hepatocytes from human embryonic stem cells exhibiting markers recapitulating liver development *in vivo*. Stem Cells, 2008, 26 (4): 894-902.
- Pei H, Yang Y, Xi J, et al. Lineage restriction and differentiation of human embryonic stem cells into hepatic progenitors and zone 1 hepatocytes. Tissue Eng Part C Methods, 2009, 15 (1): 95-104.
- Touboul T, Hannan NR, Corbinau S, et al. Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development. Hepatology, 2010, 51 (5): 1754-1765.
- Duan Y, Ma X, Zou W, et al. Differentiation and characterization of metabolically functioning hepatocytes from human embryonic stem cells. Stem Cells, 2010, 28 (4): 674-686.
- Farzaneh Z, Pournasr B, Ebrahimi M, et al. Enhanced functions of human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells on three-dimensional nanofibrillar surfaces. Stem Cell Rev, 2010, 6 (4): 601-610.
- 胡智兴, 罗敏, 梁道明. 单层分步法诱导人胚胎干细胞定向肝样细胞分化. 中国修复重建外科杂志, 2010, 24 (7): 838-842.
- Iwamuro M, Komaki T, Kubota Y, et al. Hepatic differentiation of mouse iPS cells *in vitro*. Cell Transplant, 2010, 19 (6): 841-847.
- 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.
- Sullivan GJ, Hay DC, Park IH, et al. Generation of functional human hepatic endoderm from human induced pluripotent stem cells. Hepatology, 2010, 51 (1): 329-335.
- Liu H, Ye Z, Kim Y, et al. Generation of endoderm-derived human induced pluripotent stem cells from primary hepatocytes. Hepatology, 2010, 51 (5): 1810-1819.
- Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, et al. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. Hepatology, 2010, 51 (1): 297-305.

(2010-09-20 收稿;2010-11-04 修回)