

## · 综述 ·

## 诱导性多能干细胞与肝脏疾病研究进展

王建军 万志红 辛绍杰 赵平

肝脏疾病是危害我国人民的重大疾病之一。目前对重症肝病及肝功能衰竭尚无特效的治疗手段,且病死率高。而某些遗传代谢性肝病只能通过家族谱系或疾病动物模型的建立来研究其发生机制,研究手段的局限性制约了新药物的筛选和应用。

诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC)的发现为肝脏疾病的研究提供了新的思路和方法。iPS细胞是将转录因子转入体细胞中,使其重编程为类似胚胎干细胞的一种细胞类型。其与胚胎干细胞同样具有自我更新、增殖和分化的全能性,却绕开了胚胎干细胞研究一直面临的伦理和法律等诸多障碍,可能成为细胞替代治疗新的研究热点。此外从患者体细胞获得的iPSCs,可以了解遗传性疾病的发病机制和临床疾病表现的关系,以利于筛选新的治疗药物和发现药物新的药理作用。

## 一、iPS细胞的发展历史

2006年8月,Takahashi和Yamanaka<sup>[1]</sup>通过某些特定转录因子Oct-4、Sox-2、c-Myc和KLF-4(也称为Yamanaka因子)在分化的胎鼠成纤维细胞中成功表达,诱导体细胞的重编程而获得与ES细胞相似的细胞。这些细胞具有可不断自我更新和发育多潜能性,因此被命名为诱导性多能性干细胞(iPSC)。2007年11月,他们又利用这4种转录因子将人的皮肤成纤维细胞诱导为iPSC<sup>[2]</sup>。2007年12月Yu等<sup>[3]</sup>筛选出了另外一套用于诱导的基因组合——Oct-4、Sox-2、Nanog和Lin-28,成功建立了人iPS细胞。

2009年,先后有多个科研小组报道了通过四倍体囊胚注射iPSC可以获得存活并具有繁殖能力的iPS小鼠<sup>[4-6]</sup>,进一步证实了通过表达Yamanaka因子可诱导分化细胞形成具有真正发育多潜能性的干细胞。应用相似的方法,也很快地建立了人iPSC。日本东京大学研究人员证实采用iPSC培育人类红细胞和白细胞都是可以实现的。Nagy研究组和Kaji课题组<sup>[7-8]</sup>通过应用转座子介导的方法高效率制备了virus-free鼠的iPSC。获得iPSC后,又成功将先前导入的转录因子基因从iPSC中移除。Jaenisch课题组<sup>[9]</sup>将移除外源基因的人iPSC成功诱导成多巴胺神经元,并且神经元细胞的基本功能不受影响。目前,除了小鼠和人的iPSCs,其他动物包括猴、大鼠和猪的iPSCs也已成功建立<sup>[10-13]</sup>。

我国干细胞研究发展迅速,在iPSC研究的多个领域也取得了重大突破。2008年邓宏魁研究组<sup>[14]</sup>首次报道建立了恒河猴iPSC细胞系,2009年该小组成功地将人iPS细胞分化成能分泌胰岛素的成熟胰岛细胞<sup>[15]</sup>。随后又成功地将人iPS细胞分化成肝细胞<sup>[16]</sup>。2009年中国科学院生化细胞所肖磊研究员课题组<sup>[17-18]</sup>报道建立了大鼠iPSC细胞系和猪iPSC细胞系。裴端卿教授课题组<sup>[19]</sup>报道建立了西藏小型猪的iPSC细胞系。由于猪的许多生理指标更接近于人类,因此这两项研究具有极大的应用前景。中国科学院健康科学研究所金颖研究员课题组<sup>[20]</sup>以人成纤维细胞作为滋养层细胞,在不添加白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)的情况下,诱导神经前体细胞重编程为iPSC。接着该实验室人员利用人羊水来源的细胞作为重编程的起始细胞,报道了一种高效快速建立iPSC细胞系的方法<sup>[21]</sup>。2009年9月,中国科学院北京生命科学研究所以高绍荣课题组<sup>[22]</sup>成功建立了 $\beta$ 型地中海贫血患者的iPSC细胞系,为研究该病的发病机制、筛选治疗药物及细胞移植治疗提供了有力的工具。同年,该小组和中国科学院动物研究所周琪研究员的课题组<sup>[23-24]</sup>同时报道了世界上第一次获得完全由iPS细胞制备的活体小鼠,有力地证实了iPSC具有真正的全能性。

## 二、iPSC与肝脏疾病研究

1. iPSC分化为肝细胞:应用类似诱导胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)分化为肝细胞的方法,鼠<sup>[25-26]</sup>和人<sup>[27-29]</sup>的iPSC已经被证实可以分化为功能性肝细胞。Li等<sup>[26]</sup>发现,由iPSC分化出的胚胎与含有肝细胞、内皮细胞和窦间隙细胞的胎肝细胞相似,可以表达同样水平的肝脏特定基因和标志物。此外,他们发现人类包皮成纤维细胞通过转导携带Oct-3/4、Sox-2、Nanog和Lin-28的慢病毒产生的iPSC可通过4个步骤,在低氧的环境下实现向肝细胞分化的能力。进一步研究结果证实,这些由iPS诱导分化的肝细胞移植到小鼠体内可增殖7 d。Song等<sup>[28]</sup>报道人iPSC向功能性肝细胞的分化可能为多阶段的过程,60%分化的肝细胞可产生AFP和白蛋白,与hESC分化为肝细胞类似。Sullivan等<sup>[29]</sup>通过携带Oct-4、Sox-2、KLF-4和c-Myc逆转录病毒诱导成纤维细胞而获得了3株人iPSC细胞系,所有细胞株可以分化为具有产生白蛋白和上皮细胞钙粘蛋白,表达甲胎蛋白、肝细胞核因子-4A和细胞色素P450 7A1为特点的肝胚层。

Espejel等<sup>[30]</sup>将野生鼠的iPSC转染入延胡索酰乙酰乙酸水解酶(aumarylacetoacetate hydrolase, FAH)缺陷鼠(人酪氨酸血症I的模型之一),证实iPSC在体内可发展为正

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.02.036

基金项目:军队十二五重点大课题(No. BWS11J075)

作者单位:解放军第302医院国际肝病诊疗中心(王建军、赵平),肝衰竭研究诊疗中心(万志红、辛绍杰)

通讯作者:赵平, Email: zhaop9262@sina.com

常肝细胞,并且可以保护FAH缺陷鼠使其免于发展为肝功能衰竭。该研究小组将表达Oct-4、Sox-2、c-Myc和KLF-4基因的质粒重复转染小鼠胚胎成纤维细胞而获得iPSC,由此产生的iPSC中无外源DNA整合,避免了外源性病毒基因导入可能带来的风险。随后将iPSC注入到FAH缺陷囊胚而产生一些嵌合子的后代小鼠。由于FAH缺陷鼠来源的肝细胞的生长是依赖药物2-(2-硝基-4-三氟甲基苯甲酰基)-1,3-环己二酮[2-(2-Nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione, NTBC]的存在,去除NTBC后,这些小鼠的肝细胞主要由iPSC衍生的肝细胞所组成。因此,在缺乏NTBC的嵌合子后代的肝脏细胞几乎完全是由iPS衍生细胞构成的,而非iPSC衍生细胞和原来的肝细胞融合组成的。具有iPSC衍生嵌合子肝脏的动物可以免于出现因NTBC缺乏引起的肝功能衰竭,并且iPS源性肝细胞能够与肝细胞一样对后天的肝损伤具有相同的反应效率。此研究明确阐明iPSC在体内可分化为具有完全功能的肝细胞。

2. iPSC在疾病模型建立中的应用:动物模型常应用于疾病模型的建立和疾病机制的研究。许多用于疾病病理生理机制研究的动物模型是通过基因改造产生的,而人和动物的生物差异性限制了这些模型在临床上的应用<sup>[31]</sup>。通过诱导患者特异性iPSC成为疾病相关体细胞可以提供关于疾病更全面的新信息,使对疾病的病理生理机制的研究更有意义,以利于新药的筛选和药物毒性的评价。目前已经从某些神经系统疾病和青少年糖尿病患者中获得iPSC来研究疾病的致病机制<sup>[32]</sup>。肝脏是许多代谢过程的起始器官,从遗传代谢性疾病患者中获得iPSC,并且将其分化为肝细胞受到特别关注。Rashid等<sup>[33]</sup>从 $\alpha_1$ 抗胰蛋白酶缺乏症( $\alpha_1$  antitrypsin deficiency, A1ATD)、1A型糖原累积病(glycogenic thesaurismosis 1a, GSD1a)、家族性高胆固醇血症患者(familial hypercholesterolemia, FH)、1型Crigler-Najjar综合征和遗传性高酪氨酸血症患者的成纤维细胞中获得iPSC,然后iPSC细胞系通过3个步骤分化为肝细胞,这些分化的肝细胞具有相应疾病表型的属性。这种iPS源性肝细胞与疾病的相关性表明,遗传性疾病的表型特征只有在其他相关细胞类型的特定蛋白质背景下才能显现。因此,如何将这些细胞的基因表达谱与人肝细胞的基因表达谱进行比较非常重要的。针对A1ATD,作者证明多聚合的AAT蛋白在家族性高胆固醇血症患者的肝细胞内质网累积,通过免疫荧光和流式分析,iPS诱导的肝细胞可以降低低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)的摄取;对于糖原累积症1a,iPS源性肝细胞可产生高水平的细胞内糖原、脂肪和乳酸。该研究进一步阐明,通过胰高血糖素的刺激,标准的胰高血糖素靶基因表达上调。这项研究是首次从肝脏的代谢紊乱疾病中创建的iPSC细胞系,更进一步的研究需要关注更多体外肝脏疾病模型的建立。

3. iPSC在细胞替代治疗中的应用:各种原因所致的肝脏功能不全与肝功能衰竭严重威胁着人类的健康,病死率

较高。目前认为最理想的人工肝为生物人工肝(bioartificial liver, BAL),其具有解毒功能,由于肝细胞的引入,尚具有代谢和合成能力,但目前全世界尚未有一套成熟的生物人工肝装置上市,其发展受限的瓶颈问题就是肝细胞来源问题。iPSC与胚胎干细胞同样具有自我更新、增殖和分化的全能性,却绕开了胚胎干细胞研究一直面临的伦理和法律等诸多障碍,可避免目前常用的异种及肿瘤肝细胞应用于生物人工肝的主要缺点,可能成为治疗终末期肝功能衰竭新的细胞来源。理论上,可以从同一患者身上获得iPSC并用于器官移植或基因治疗。目前,以iPS为基础的细胞治疗已经建立了许多动物病理模型,并获得了令人鼓舞的结论,并且人源的iPSC已经证实可和ESCs一样具有向肝细胞系分化的潜质。尽管仍存在一些局限性(如存在致畸胎瘤的风险),iPSC分化的肝细胞应用于肝脏疾病的治疗仍是很有希望的。

综上所述,iPSC衍生的肝细胞在研究代谢性肝病的病理生理学,发现新的药物和制定再生组织的策略方面有巨大的应用潜能。iPSC分化的肝细胞应用于肝脏疾病的治疗仍很有希望。但目前仍存在一些需要解决的问题,如iPSC的诱导方法和产量;如何提高iPSC来源肝细胞的功能(如白蛋白、P450表达水平等);移植细胞的定植、分化及功能等。iPSC技术研究方面的进展对于肝脏疾病机制的探讨和新治疗措施的开发具有重要意义。

## 参 考 文 献

- 1 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.
- 2 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.
- 3 Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*,2007,318(5858):1917-1920.
- 4 Zhao XY, Li W, Lv Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*,2009,461(7260):86-90.
- 5 Kang L, Wang J, Zhang Y, et al. iPS cells can support fullterm development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell*,2009,5(2):135-138.
- 6 Boland MJ, Hazen JL, Nazor KL, et al. Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature*,2009,461(7260):91-94.
- 7 Kaji K, Norrby K, Paca A, et al. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*,2009,458(7239):771-775.
- 8 Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*,2009,

- 458(7239):766-770.
- 9 Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*,2009,136(5):964-977.
- 10 Liu H, Zhu F, Yong J, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell*,2008;3(6):587-590.
- 11 Liao J, Cui C, Chen S, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell Stem Cell*,2009,4(1):11-15.
- 12 Esteban MA, Xu J, Yang J, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. *J Biol Chem*,2009,284(26):17634-17640.
- 13 Wu Z, Chen J, Ren J, et al. Generation of pig-induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system. *J Mol Cell Bio*,2009,1(1):46-54.
- 14 Liu HS, Zhu FF, Yong J, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell*,2008,3(6):587-590.
- 15 Zhang DH, Jiang W, Liu M, et al. Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Res*,2009,19(4):429-438.
- 16 Song ZH, Cai J, Liu YX, et al. Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Cell Res*,2009,19(11):1233-1242.
- 17 Li WL, Wei W, Zhu SY, et al. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell*,2009,4(1):16-19.
- 18 Wu Z, Chen JJ, Ren JT, et al. Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system. *J Mol Cell Biol*,2009,1(1):46-54.
- 19 Esteban MA, Xu JY, Yang JY, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. *J Biol Chem*,2009,284(26):17634-17640.
- 20 Li CL, Yu HY, Ma Y, et al. Germline-competent mouse-induced pluripotent stem cell lines generated on human fibroblasts without exogenous leukemia inhibitory factor. *PLoS One*,2009,4(8):e6724.
- 21 Li CL, Zhou JM, Shi GL, et al. Pluripotency can be rapidly and efficiently induced in human amniotic fluid-derived cells. *Hum Mol Genet*,2009,18(22):4340-4349.
- 22 Wang YX, Jiang YH, Liu S, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human  $\beta$ -thalassemia fibroblast cells. *Cell Res*,2009,19(9):1120-1123.
- 23 Zhao XY, Li W, Lv Z, et al. Production of mice using iPS cells and tetraploid complementation. *Nature*,2010,61(5):963-971.
- 24 Kang L, Wang JL, Zhang Y, et al. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell*,2009,5(2):135-138.
- 25 Gai H, Nguyen DM, Moon YJ, et al. Generation of murine hepatic lineage cells from induced pluripotent stem cells. *Differentiation*,2010,79(3):171-181.
- 26 Li W, Wang D, Qin J, et al. Generation of functional hepatocytes from mouse induced pluripotent stem cells. *J Cell Physiol*,2010,222(3):492-501.
- 27 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.
- 28 Song Z, Cai J, Liu Y, et al. Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Cell Research*,2009,19(11):1233-1242.
- 29 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.
- 30 Espejel S, Roll GR, McLaughlin KJ, et al. Induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes have the functional and proliferative capabilities needed for liver regeneration in mice. *J Clin Invest*,2010,120(9):3120-3126.
- 31 Rubin LL. Stem cells and drug discovery: the beginning of a new era? *Cell*,2008,132(4):549-552.
- 32 Kiskinis E, Eggan K. Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. *J Clin Invest*,2010,120(1):51-59.
- 33 Rashid ST, Corbinea S, Hannan N, et al. Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J Clin Invest*,2010,120(9):3127-3136.

(收稿日期: 2012-07-12)

(本文编辑: 孙荣华)

王建军, 万志红, 辛绍杰, 等. 诱导性多能干细胞与肝脏疾病研究进展[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2013, 7(2): 303-305.