

· 综 述 ·

人诱导多能干细胞在药物肝损伤研究中的应用

陈洁, 汤纳平, 马璟

(中国医药工业研究总院, 国家上海新药安全评价研究中心, 上海 201203)

摘要: 人诱导多能干细胞具有自我更新和分化的多潜能性, 其诱导分化的肝样细胞可应用于药物发现、筛选以及药物肝毒性评价研究。药物性肝损伤是导致上市药物被召回和药物研发失败的主要原因之一。临床前动物实验因其种属差异等方面的不足导致药物临床研究失败, 浪费了大量人力物力。本文全面总结了人诱导多能干细胞诱导分化的肝细胞在药物肝毒性评价中的研究应用, 希望有助于在药物研发过程中准确把握肝毒性, 保证人体用药安全。

关键词: 多能干细胞; 肝损伤; 安全评价

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1000-3002-(2016)11-1219-06

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2016.11.014

在药物研发过程中, 药物性肝损伤 (drug induced liver injury, DILI) 是药物开发终止的首要原因, 也是药物上市后被撤回的主要因素^[1]。因此, DILI 已成为药物在研发阶段最为关心的问题之一。虽然在过去几十年里药物靶器官毒性研究作为毒理学研究的重要内容已得到了足够的重视, 但药源性肝毒性的发生频率在过去 15 年并未显著减少^[2]。一个主要原因是动物和人类之间的种属差异使得药物在进入临床研究阶段出现非预期的肝毒性而使药物研发失败。因此, 开发安全、有效的临床前肝毒性早期评价的人源化细胞模型显得尤为重要。合适的细胞模型不仅可用于药物安全性评价, 也可用于肝毒性药物的高通量筛选和药效学研究等。

干细胞技术得到迅速发展, 如是由成熟体细胞重编程而制备诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSC)。与胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESC) 相比, 不受伦理道德约束且来源充足, 在新药研发、毒性筛选和药物安全性评价中有广泛的应用前景。

1 人诱导多能干细胞概述

2006 年, Yamanaka 研究团队^[3]首次通过逆转

录病毒载体将 4 种转录因子 Oct3/4, Sox2, c-Myc 和 Klf4 引入到小鼠胚胎成纤维细胞, 发现可诱导其发生转化, 产生一类与 ESC 有极其类似功能的细胞。这类细胞具有不断自我更新和分化的多潜能性, 从而被命名为 iPSC。2007 年他们又利用相同的 4 种转录因子成功将人皮肤成纤维细胞重编程为多能性状态的细胞^[4]。此后, 这一研究成果在全世界被广泛应用。2009 年, 周琦课题组和高绍荣课题组^[5-6]几乎同时成功获得完全由 iPSC 制备的活体小鼠, 首次证明了 iPSC 具有真正的全能性。该研究成果被评为 2009 年《时代周刊》十大医学突破之一。随着培养条件和转化效率不断提高, 包括小鼠、人在内的不同种属动物的各种类型的体细胞均被成功诱导为 iPSC。

长久以来, ESC 避免不了其细胞来源、伦理道德和宗教信仰的阻碍。而体细胞重编程技术的出现正好解决了这一难题, 是干细胞领域的一次巨大革新, 同时也为再生医学、新药发现、药物筛选及药物安全性评价等开辟了新的途径。因而, 日本 Yamanaka 和英国 John Gurdon 共同获得 2012 年诺贝尔生理学或医学奖。

2 人诱导多能干细胞来源的肝细胞样细胞 (hepatocyte-like cells, HLC) 的优点

目前, 用于肝毒性评价的体外细胞模型主要有原代肝细胞、肝癌细胞系和干细胞系。原代肝细胞一直被视为是最好的用于毒性和代谢研究的体外模型^[7]。实际上, 原代肝细胞, 特别是人源的, 通

基金项目: 国家自然科学基金 (81273603); “科技创新行动计划”实验动物研究领域科技支撑项目 (14140900901)

作者简介: 陈洁, 硕士研究生, 主要从事肝分子毒理学研究; 马璟, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事药物毒理学研究。

通讯作者: 马璟, E-mail: jma@ncdser.com

常被认为是药物肝毒性的“金标准”^[8-9]。原代肝细胞虽然能更好地模拟生物肝的功能,但因其获得耗时费力,且不能进行传代,不适用于长期反复给药的研究^[10]。另外,肝移植的严格流程使得肝细胞来源几乎不可能是正常人。肝细胞来源于严重肝损伤患者或多药联用患者,使得肝细胞的质量低劣^[11]。这些不足导致人原代肝细胞的质量和供应数量都难以保证。同样,人肝癌细胞系也并不能充分代表正常人肝细胞的多样性。人肝癌细胞系取材于原发肝癌组织,其主要特点是可无限传代,但随着传代次数的增多,其基因型和表现型均发生变化^[12]。其次,人ESC具有正常二倍体核型,能在体外长时间培养和传代,但其来源有很大争议,在取材上饱受道德伦理压力。基于人原代肝细胞、肝癌细胞系和人ESC的不足,人iPSC(human iPSC,hiPSC)就成为了人们关注的热点。hiPSC有望提供一个可扩展的、基因类型明确的、来源一致的肝细胞类型。目前已有许多iPSC分化为肝细胞的方法^[13-14]。近年来,分析hiPSC来源的HLC特征主要包括形态学和功能学2个方面^[15]。形态学分析显示,该细胞有圆的细胞核且核仁明显,有高的质核比,有的还能观察到双核和胆微管结构等。在功能学方面,hiPSC来源的HLC能表现出与原代肝细胞类似的关键功能,包括细胞膜极性、糖原、脂质、尿素和关键肝蛋白(白蛋白、脱唾液酸蛋白受体和 α 1-抗胰蛋白)的合成。此外,它们还能表达和诱导主要的细胞色素P450酶。因此,利用hiPSC来源的HLC作为药物肝毒性评价的体外模型,可减少动物实验带来的种属差异^[16],降低药物研发成本,缩短研发周期,提高药物毒性预测的准确性。

3 诱导多能干细胞定向诱导为肝样细胞

近年来,对于iPSC定向分化为肝细胞的研究有很多。其中报道最多的是利用肝细胞增殖分化过程中密切相关的细胞因子来诱导。2009年,Song等^[17]首次将iPSC诱导分化为肝样细胞。整个诱导过程通常需要3~4周,总共分为4个阶段,分别采用激活素A、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors, FGF)和骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein 2, BMP2)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)和角质化细胞生长因子作为添加物,最后一个阶段添加含有含有抑瘤素M(oncostatin M, OSM)和地塞米松(dexamethasone, DEX)的N2B27培养基促进细胞成

熟。经过一系列的诱导分化,iPSC最终分化为类似肝细胞的上皮样细胞,这些细胞能分泌糖原、白蛋白和合成尿素,具有可诱导的细胞色素P450酶活性。目前,已有多个研究团队报道用类似的方法得到肝样细胞,例如2010年,Rashid等^[18]和Si-Tayeb等^[19]用类似的方法获得了肝样细胞。2012年,Chen等^[13]用激活素A、Wnt3a蛋白、HGF、FGF、OSM和二甲亚砷等诱导因子分阶段处理iPSC,同样获得了和成熟肝细胞有类似功能的细胞。

鉴于iPSC向肝细胞分化的不同阶段会表达一些特异基因^[20],因此可通过基因过表达来诱导iPSC向肝细胞分化。2011年,Takayama等^[21]将内胚层标志基因Sox17通过腺病毒转入到iPSC中,促进了iPSC向内胚层细胞分化,同年该研究团队又利用过表达HEX基因将iPSC诱导为肝样细胞^[22]。目前研究热门的还有肝富集转录因子,它可通过调控特异基因的表达控制肝细胞的分化方向,并维持分化表型^[23]。

此外,一些小分子化合物也被用来诱导iPSC形成肝样细胞。Shan等^[24]通过高通量筛选出2个类别的化合物,一类为促进功能增殖化合物,主要起到促进原代肝细胞在体外增殖的作用;另一类为促进功能化合物,它可促进iPSC向成熟样细胞的分化以及功能的强化。鉴于小分子化合物具有合成简单、保存方便、细胞通透性好、无细胞免疫性等优点,成为了诱导iPSC分化的一种新途径。如今,三维细胞培养技术的高速发展也在干细胞诱导分化的过程扮演了越来越重要的角色^[25],相较于二维细胞培养系统,它能最大程度地在体外模拟体内组织的结构和功能,为细胞提供更好的生存环境,这种技术的发展极大提高了细胞实验的准确性。Takayama等^[26]对三维微球培养的人ESC和hiPSC来源的肝样细胞和二维培养的肝细胞的功能进行比较,发现各项功能指标均优于二维培养的肝细胞,并且细胞的功能活性保持时间也更长。

定向诱导分化肝细胞方法日渐成熟,为iPSC在药物肝毒性评价中体外模型的选择提供了更多的选择,提示可利用体细胞重编程技术获取有增殖分化能力的iPSC,进而再诱导分化iPSC得到成熟肝样细胞,在药物开发早期有效筛查药物的肝毒性。

4 hiPSC来源的HLC在DILI评价中的应用

由于人源肝细胞不易获得,而hiPSC来源的HLC在体外可大量获得,因此,其在药物肝毒性评

价中具有广阔的应用前景。2009 年, Song 等^[17]首次证明了 hiPSC 能在体外有效地分化为肝细胞, 在某种程度上表明 hiPSC 来源的 HLC 很可能适用于 DILI 评价。Rodrigues 等^[27]通过对人皮肤前体细胞 (human skin-derived precursors, hSKP) 进行诱导分化, 成功分化出人肝细胞, 该肝细胞不仅能表达肝祖细胞标志物如上皮细胞黏附分子和成人肝细胞标志物白蛋白, 还能表达关键的生物转化酶和药物转运蛋白。该实验运用毒理基因组学的方法, 通过检测肝损伤、肝细胞增殖、坏死以及肝脂肪变性等指标, 证明了在对乙酰氨基酚诱导的肝损伤模型中 hSKP 诱导的人肝细胞和人原代肝细胞的结果几乎一致。更值得注意的是, 他们还发现 hSKP 诱导的人肝细胞中细胞毒性、细胞凋亡相关的基因也普遍上调, 而这些基因很有可能是潜在的肝毒性生物标志物。由此看来, hiPSC 来源的 HLC 作为肝毒性模型预测 DILI 的价值越来越大。

4.1 hiPSC 来源的 HLC 的预测灵敏性

目前已有报道阐述 hiPSC 来源的 HLC 的预测灵敏性。通过多毒性终点和读数, 从明显影响肝的物质中区分出已知的肝毒性物质^[29-30]。hiPSC 来源的 HLC 对不同种类的化合物, 不同毒性机制的药物靶点都有敏感性, 最重要的是能对已知毒性的化合物产生相关的毒性代谢物, 如黄曲霉素 B₁, 在足够浓度条件下可揭示对细胞毒性的影响^[28]。Ware 等^[29]建立了一个 hiPSC 来源的 HLC 和胚胎成纤维细胞共培养模型, 利用这个模型检测了 47 种药物, 其中 37 种有明确肝毒性, 10 种无肝毒性。通过多功能终点指标 (如白蛋白、尿素和 ATP) 的判断, 该模型成功鉴别出 24 个肝毒性药物, 敏感性达到 65%, 且成功鉴别出 10 个无肝毒性化合物。Sirenko 等^[30]利用 hiPSC 来源的 HLC 进行高通量筛选药物肝毒性, 他们选用了 240 个不同肝毒性化合物, 其中包括 208 个有肝毒性的物质, 30 个无肝毒性物质, 2 个随机空白。评价终点包括细胞活性、细胞完整程度、细胞核形态和线粒体膜电位等。实验中采用了高通量成像法评估精细的表型变化并提供多参数输出, 如细胞形态、细胞黏附和传播、核固缩、脂质聚集、线粒体膜电位等。实验中观察到绝大多数参数的改变有剂量依赖性, 随浓度增加而增加, 且随浓度增加能采集到的点也越来越多。数据分析显示, 大部分无毒性物质在相对活性指数排名较高 (细胞活力越大相对活性指数越高, 代表物质毒性越低), 而大部分有肝毒性的物质排名相对较低。尽管所有的分析参数都同等重要, 但在数据整合过程中还应

根据使用者的需求进行修改, 这个分析结果也只能作为半定量分析。

4.2 hiPSC 来源的 HLC 用于长期肝毒性评价

和原代肝细胞相比, hiPSC 来源的 HLC 在培养基中能长期维持其基本活性和功能, 这一模型的应用对发现临床相关性更大、低剂量长期给药的化合物毒性作用有重要意义。这种类型的细胞长期给药方式能更准确地反映人体内药物的暴露类型, 并进一步提高体外毒性测试的预测能力。Ulvestad 等^[31]比较了干细胞 (人 ESC 和 hiPSC) 来源的肝细胞与人原代肝细胞以及 HepG2 细胞中 CYP450 酶和转运蛋白的表达水平, 他们发现干细胞来源的肝细胞 CYP450 酶活性虽不如原代细胞, 但其酶活性维持时间更长, 可至少维持 1 周。Holmgren 等^[32]发现, hiPSC 来源的 HLC 在长达 14 d 毒性化合物的暴露下, 细胞变得更加敏感。实验中选用了 4 个肝毒性化合物 (胺碘酮、黄曲霉素 B₁、曲格列酮和希美拉加群 (ximelagatran)), 以一定的浓度梯度重复给药 2, 7 和 14 d, 整个实验周期监测细胞形态, 每个时间点检测细胞活力以及脂肪变性和磷脂诱导。数据结果显示, hiPSC 来源的 HLC 模型是稳定的, 足以满足至少 2 周的药物暴露, 且能在机制水平评估肝毒性反应的特异性。hiPSC 来源的 HLC 在本实验的优势在于其可再生性以及长期培养条件下也不会丢失肝细胞表型。上述研究结果提示, hiPSC 来源的 HLC 模型可用于长期肝毒性评价。

4.3 hiPSC 来源的 HLC 用于个体差异毒性评价研究

HiPSC 为个性化细胞治疗和候选药物的筛选提供了一个特异性疾病的肝细胞模型^[33]。使用 hiPSC 的另一优点在于, 它们能用于研究细胞对药物的遗传学作用。临床捐赠者的 iPSC 表现出对不同的药物敏感性和代谢酶活性, 增加了毒性的预测能力^[34-35]。Medine 等^[35]发现, 不同遗传背景的 hiPSC 来源的 HLC 与人 ESC 来源的肝细胞相比, 只对 CYP2D6 活化的化合物敏感, 而对 CYP2C9 代谢的化合物不敏感, 这是由于 hiPSC 来源的 HLC 中 CYP2C9 基因表达和功能的下降。这表明人群中常见的代谢差异模型的应用或许有一定的可行性。Sjogren 等^[36]比较了 hiPSC 来源的 HLC、原代冻存干细胞和肝肿瘤细胞系 (Huh7 和 HepaRG) 这 3 种类型的细胞在给予细胞凋亡诱导剂星孢菌素和对乙酰氨基酚处理后的毒性反应。结果发现, 当研究直接诱导细胞凋亡类的药物时, hiPSC 来源的 HLC 是一个优于 Huh7 和 HepaRG 及原代冻存干细胞的体外模型。一方面是由于原代冻存干细胞

中CYP基因表达和活性能力的维持仅仅48 h,而hiPSC来源的HLC却能维持1周。另一方面,hiPSC来源的HLC在调控和执行细胞凋亡通路分析方面优于肝肿瘤细胞系HepaRG,更接近于原代冻存干细胞。然而对于具有更复杂毒性机制的化合物而言,如对乙酰氨基酚,细胞死亡的机制依赖于细胞死亡信号的控制因素和药物代谢能力之间的平衡,需要考虑选择一个合适的体外模型。

由基因遗传多态性引起肝代谢的个体差异,对个体药物疗效和不良反应均有很大影响。hiPSC来源的HLC有潜力预测的个体在药物代谢和药物反应能力的差异性。Takayama等^[37]从hiPSC分化出肝细胞,而hiPSC是从人原代肝细胞中转化而来的。作者比较了hiPSC来源的HLC和起始来源的人原代肝细胞的药物代谢能力,CYP2D6代谢的个体差异和CYP2D6编码的基因的多态性引起的药物的反应性差异均在hiPSC来源的HLC中重现,这表明它们对个性化药物治疗有重要意义。Alpers Huttenlocher (AHS)综合征是一种神经系统代谢紊乱疾病,由线粒体DNA聚合酶突变引起,并且和丙戊酸肝毒性增加的风险有关。最近有研究表明,从2名AHS患者获得hiPSC来源的HLC对丙戊酸诱导线粒体依赖性细胞凋亡更敏感,这种效应受线粒体通透性转换孔开放调节。此外,与正常hiPSC来源的HLC相比,用丙戊酸孵化的AHS患者hiPSC来源的HLC表现出能激活更多的胱天蛋白酶9和细胞色素c的释放^[38]。这升高的敏感性可解释AHS患者患丙戊酸毒性的风险提高,也为hiPSC来源的HLC降低丙戊酸毒性提供有效的治疗策略^[38]。患者来源的iPSC提供了一种遗传病的毒性模型,同时能对明确治疗靶点的药物进行评价^[38]。

5 问题与展望

尽管iPSC细胞系的建立技术已发展得相对成熟,但重编程仍然是一个含有很多未知因素且低效的过程,具体机制尚不明确。iPSC的出现,解决了异源ESC涉及到的伦理问题,对药物研发也发挥了很大的作用。值得关注的是,hiPSC来源的HLC,为体外药物肝毒性评价细胞模型提供了更广泛的选择,但到真正成熟广泛应用还要做大量的工作。hiPSC来源的HLC还有很多问题需要解决,如改进iPSC诱导方法,提高其产生效率和安全性;提高iPSC向肝样细胞分化的效率和纯度;制定检测iPSC来源肝样细胞的标准等。鉴于hiPSC来源的HLC的

药物肝毒性评价更接近于人肝细胞对药物的反应,国内外许多生物制药公司都非常重视,近年来与学术界投资或联合开发基于hiPSC的体外系统^[39-40]。如法国生物公司Collectis于2012年就宣布推出源于hiPSC的肝细胞产品,该产品具有同质性、生命周期长、可再生且细胞色素P450活性稳定的优点,对新药研发和毒性测试等体外研究提供了理想平台。

欧洲委员会和欧盟制药企业联合倡议的“创新药物引起的肝损伤”,将可能促进hiPSC来源的HLC在新药研发中的应用。综上所述,虽然iPSC技术仍存在许多瓶颈,不过相信在研究者和政府部门的共同努力下,它必会发展得越来越好,并将在药物发现、筛选、早期毒性评价中扮演越来越重要的角色。

参考文献:

- [1] Watkins PB. Drug safety sciences and the bottleneck in drug development [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2011, **89**(6):788-790.
- [2] Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC, Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data [J]. *J Hepatol*, 2013, **58**(3):593-608.
- [3] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, **126**(4):663-676.
- [4] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors [J]. *Cell*, 2007, **131**(5):861-872.
- [5] Zhao XY, Li W, Lv Z, Liu L, Tong M, Hai T, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation [J]. *Nature*, 2009, **461** (7260): 86-90.
- [6] Kang L, Wang JL, Zhang Y, Kou ZH, Gao SR. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, **5**(2):135-138.
- [7] Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Castell JV, Jover R. Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism [J]. *Curr Drug Metab*, 2003, **4**(4): 292-312.
- [8] Gomez-Lechon MJ, Lahoz A, Gombau L, Castell J. *In vitro* evaluation of potential hepatotoxicity induced by drugs [J]. *Curr Pharm Des*, 2010, **16** (17): 1963-1977.

- [9] Greer ML, Barber J, Eakins J, Kenna JG. Cell based approaches for evaluation of drug-induced liver injury[J]. *Toxicology*, 2010, **268**(3,SI):125-131.
- [10] Fraczek J, Bolleyn J, Vanhaecke T, Rogiers V, Vinken M. Primary hepatocyte cultures for pharmacotoxicological studies: at the busy crossroad of various anti-dedifferentiation strategies[J]. *Arch Toxicol*, 2013, **87**(4):577-610.
- [11] Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A, *General Review on in vitro Hepatocyte Models and Their Applications* [M]. New Jersey:Humana Press, 2010: 1-40.
- [12] Gómez-Lechón MJ, Tolosa L, Conde I, Donato MT. Competency of different cell models to predict human hepatotoxic drugs[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2014, **10**(11):1553-1568.
- [13] Chen YF, Tseng CY, Wang HW, Kuo HC, Yang VW, Lee OK. 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.
- [14] Schwartz RE, Fleming HE, Khetani SR, Bhatia SN. Pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells [J]. *Biotechnol Adv*, 2014, **32**(2):504-513.
- [15] Lu J, Einhorn S, Venkatarangan L, Miller M, Mann DA, Watkins PB, *et al.* Morphological and functional characterization and assessment of iPSC-derived hepatocytes for *in vitro* toxicity testing [J]. *Toxicol Sci*, 2015, **147**(1):39-54.
- [16] Liu W, Deng Y, Liu Y, Gong W, Deng W. Stem cell models for drug discovery and toxicology studies[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2013, **27**(1): 17-27.
- [17] Song ZH, Cai J, Liu YX, Zhao DX, Yong J, Duo SG, *et al.* Efficient Generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells[J]. *Cell Res*, 2009, **19**(11):1233-1242.
- [18] Rashid ST, Corbinau S, Hannan N, Marciniak SJ, Miranda E, Alexander G, *et al.* Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells [J]. *J Clin Invest*, 2010, **120**(9):3127-3136.
- [19] Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, Li J, Battle MA, Duris C, *et al.* Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells[J]. *Hepatology*, 2010, **51**(1):297-305.
- [20] Morrison GM, Oikonomopoulou I, Migueles RP, Soneji S, Livigni A, Enver TA. Anterior definitive endoderm from ESCs reveals a role for FGF signaling [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, **3**(4): 402-415.
- [21] Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Tashiro K, Katayama K, Sakurai F, *et al.* Efficient and direct generation of two distinct endoderm lineages from human ESCs and iPSCs by differentiation stage-specific SOX17 transduction[J]. *PLoS One*, 2011, **6**(7):e21780.
- [22] Inamura M, Kawabata K, Takayama K, Tashiro K, Sakurai F, Katayama K, *et al.* Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX[J]. *Mol Ther*, 2011, **19**(2):400-407.
- [23] Schrem H, Klempnauer J, Borlak J. Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part I: the hepatocyte nuclear factor network and liver-specific gene expression [J]. *Pharmacol Rev*, 2002, **54**(1):129-158.
- [24] Shan J, Schwartz RE, Ross NT, Logan DJ, Thomas D, Duncan SA, *et al.* Identification of small molecules for human hepatocyte expansion and iPS differentiation [J]. *Nat Chem Biol*, 2013, **9**(8):U77-U514.
- [25] Lou YR, Kanninen L, Kuisma T, Niklander J, Noon LA, Burks D, *et al.* The use of nanofibrillar cellulose hydrogel as a flexible three-dimensional model to culture human pluripotent stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2014, **23**(4):380-392.
- [26] Takayama K, Kawabata K, Nagamoto YA, Tashiro K, Sakurai FA, Kanda K, *et al.* 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing [J]. *Biomaterials*, 2013, **34**(7):1781-1789.
- [27] Rodrigues RM, De Kock J, Branson S, Vinken M, Meganathan K, Chaudhari U, *et al.* Human skin-derived stem cells as a novel cell source for *in vitro* hepatotoxicity screening of pharmaceuticals [J]. *Stem Cells Dev*, 2014, **23**(1):44-55.
- [28] Mann DA. Human induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes for toxicology testing [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2015, **11**(1):1-5.
- [29] Ware BR, Berger DR, Khetani SR. Prediction of drug-induced liver injury in micropatterned co-cultures containing iPSC-derived human hepatocytes [J]. *Toxicol Sci*, 2015, **145**(2):252-262.
- [30] Sirenko O, Hesley J, Rusyn I, Cromwell EF. High-content assays for hepatotoxicity using induced pluripotent stem cell-derived cells [J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2014, **12**(1):43-54.
- [31] Ulvestad M, Nordell P, Asplund A, Rehnstrom M, Jacobsson S, Holmgren G, *et al.* Drug metabolizing enzyme and transporter protein profiles of hepatocytes derived from human embryonic and induced

- pluripotent stem cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, **86**(5):691-702.
- [32] Holmgren G, Sjögren AK, Barragan I, Sabirsh A, Sartipy P, Synnergren J, *et al*. Long-term chronic toxicity testing using human pluripotent stem cell-derived hepatocytes[J]. *Drug Metab Dispos*, 2014 **42**(9):1401-1406.
- [33] Dianat N, Steichen C, Vallier L, Weber A, Dubart-Kupperschmitt A. Human pluripotent stem cells for modelling human liver diseases and cell therapy [J]. *Curr Gene Ther*, 2013, **13**(2):120-132.
- [34] Kia R, Sison RL, Heslop J, Kitteringham NR, Hanley N, Mills JS, *et al*. Stem cell-derived hepatocytes as a predictive model for drug-induced liver injury: are we there yet?[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2013, **75**(4):885-896.
- [35] Medine CN, Lucendo-Villarin B, Storck C, Wang FY, Szkolnicka D, Khan F, *et al*. Developing high-fidelity hepatotoxicity models from pluripotent stem cells[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2013, **2**(7):505-509.
- [36] Sjogren AK, Liljevald M, Glinghammar B, Sagemark J, Li XQ, Jonebring A, *et al*. Critical differences in toxicity mechanisms in induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes, hepatic cell lines and primary hepatocytes [J]. *Arch Toxicol*, 2014, **88**(7):1427-1437.
- [37] Takayama K, Morisaki Y, Kuno S, Nagamoto Y, Harada K, Furukawa N, *et al*. Prediction of interindividual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(47):16772-16777.
- [38] Li SB, Guo JY, Ying ZF, Chen S, Yang L, Chen KS, *et al*. Valproic acid-induced hepatotoxicity in Alpers syndrome is associated with mitochondrial permeability transition pore opening-dependent apoptotic sensitivity in an induced pluripotent stem cell model [J]. *Hepatology*, 2015, **61**(5):1730-1739.
- [39] Prescott C. The business of exploiting induced pluripotent stem cells[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2011, **366**(1575):2323-2328.
- [40] Bahadur G, Morrison M. Patenting human pluripotent cells: balancing commercial, academic and ethical interests[J]. *Hum Reprod*, 2010, **25**(1):14-21.

Application of human induced pluripotent stem cells in drug-induced hepatotoxicity study

CHEN Jie, TANG Na-ping, MA Jing

(China State Institute of Pharmaceutical Industry, National Shanghai Center for New Drug Safety Evaluation and Research, Shanghai 201203, China)

Abstract: Human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) possess self-renewing potency and pluripotency and can differentiate into virtually any somatic cell type, such as hepatocytes. The hiPSCs-derived hepatocyte-like cells (hiPSCs-derived HLCs) can be used in drug discovery, screening and drug induced hepatotoxicity assessment. Drug-induced liver injury is one of the main causes of drug withdrawals or failure of drug development. Due to species differences in hepatocellular function, unrepresentative results of preclinical animal experiments may lead to the failure of drug development and the waste of human effort and financial resources. This review describes the progress of hiPSCs-derived HLCs in drug-induced hepatotoxicity evaluation in the hope of helping to find out more about the liver toxicity in the process of drug development and ensure the safety of human drugs.

Key words: pluripotent stem cells; liver injury; safety evaluation

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation of China (81273603); "Technology Innovation Action Plan" Science and Technology Support Project in the Field of Experimental Animal Research (14140900901)

Corresponding author: MA Jing, E-mail: jma@ncdser.com

(收稿日期:2016-06-22 接受日期:2016-11-04)

(本文编辑:齐春会)