波棱茺酮促进诱导多能干细胞向肝样细胞分化及其协同抗药源性肝损伤作用

刘馨雅，罗秋林，艾柯代·艾地汗，张仲瑞，龚普阳*，顾　健*

西南民族大学药学与食品学院，四川 成都　610041

摘　要：目的 探讨波棱茺酮促进诱导多能干细胞（induced pluripotent stem cells，iPSCs）向肝样细胞（hepatocyte-like cells，HLCs）分化及其协同修复药源性肝损伤（drug-induced liver injury，DILI）的作用。**方法** 通过碱性磷酸酶染色鉴定 iPSCs，CCK-8 法确定波棱茺酮安全浓度后，使用波棱茺酮和细胞生长因子分别诱导 iPSCs 分化，通过免疫荧光染色、qRT-PCR 等考察波棱茺酮对 iPSCs 的诱导作用。构建 DILI 小鼠模型，设置对照组、模型组、iPSCs 组和 iPSCs＋波棱茺酮（80 mg/kg）组，采用苏木素-伊红染色观察肝组织病理变化，检测血清中肝功能相关生化指标水平，采用免疫荧光染色检测人甲胎蛋白和增殖细胞核抗原的表达。**结果** 体外实验结果显示，在波棱茺酮的诱导下，iPSCs 中肝脏标志物白蛋白、甲胎蛋白、α1-抗胰蛋白酶、细胞角蛋白 18、精氨琥珀酸合成酶 1、氨甲酰磷酸合成酶 1、细胞色素 P450 3A4、细胞色素 P450 3A7 等基因的表达显著升高（$P<0.01$），八聚体结合转录因子 4 的表达降低（$P<0.01$），糖原和脂质的储存能力增强（$P<0.01$）。体内实验结果显示，波棱茺酮与 iPSCs 的联合治疗改善了 DILI 模型小鼠肝脏损伤，显著降低了丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶、碱性磷酸酶、总胆红素、直接胆红素、总胆汁酸的水平（$P<0.05$），升高白蛋白水平（$P<0.05$）；波棱茺酮能够促进 DILI 小鼠 iPSCs 细胞的定向迁移和分化，升高人甲胎蛋白的水平，上调增殖细胞核抗原的表达（$P<0.01$）。**结论** 波棱茺酮能够有效诱导 iPSCs 向 HLCs 分化，并能够在体内与 iPSCs 协同发挥改善 DILI 作用。

关键词：波棱茺酮；诱导多能干细胞；肝样细胞；药源性肝损伤；细胞分化

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2026)21 - 8536 - 12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.21.013

Promoting effect of herpetfluorenone on differentiation of induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells and their synergistic anti-drug-induced liver injury activities

LIU Xinya, LUO Qiulin, AKIDA Adiham, ZHANG Zhongrui, GONG Puyang, GU Jian

College of Pharmacy and Food, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective To investigate the role of herpetfluorenone in promoting the differentiation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) into hepatocyte-like cells (HLCs) and their synergistic effects in repairing drug-induced liver injury (DILI). **Methods** iPSCs were identified by alkaline phosphatase staining, and the safe concentration of herpetfluorenone was determined by CCK-8 method. Then, herpetfluorenone and cell growth factor were used to induce differentiation of iPSCs. The induction effects of herpetfluorenone on iPSCs was investigated by immunofluorescence staining, qRT-PCR and other methods. A mouse DILI model was constructed, control group, model group, iPSCs group and iPSCs + herpetfluorenone (80 mg/kg) group were set up. The pathological changes of liver tissue were observed using hematoxylin eosin staining, the levels of liver function related biochemical indicators in serum were detected, the expressions of human alpha fetoprotein and proliferating cell nuclear antigen were detected using immunofluorescence staining. **Results** The results of the *in vitro* experiments showed that under the induction of herpetfluorenone, the expressions of liver-related genes such as albumin, alpha fetoprotein, alpha-1-antitrypsin, cytokeratin 18, argininosuccinate synthase 1, carbamoyl phosphate synthetase 1, cytochrome P450 3A4, and cytochrome P450 3A7 in iPSCs were significantly increased ($P < 0.01$), while the

收稿日期：2026-05-18

基金项目：四川省中医药管理局中医药科研专项（2024ZD026）；国家自然科学基金面上项目（82174083）；西南民族大学青藏高原研究科技创新团队（2024CXTD16）

作者简介：刘馨雅，硕士研究生，研究方向为中药药理学。E-mail: 13908282563@163.com

***通信作者：**龚普阳，硕士生导师，副教授，主要从事中药（藏药）防治消化系统疾病机制研究。E-mail: gongpuyang1990@163.com

顾　健，博士生导师，教授，研究方向为中药（民族药）基础研究与开发。E-mail: gujiancd@163.com

expression of octamer-binding transcription factor 4 was decreased ($P < 0.01$), the storage capacity of glycogen and lipids has been enhanced ($P < 0.01$). The results of the *in vivo* experiments showed that the combined treatment of herpetfluorenone and iPSCs improved liver injury in DILI model mice, significantly reduced the levels of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, total bilirubin, direct bilirubin and total bile acid ($P < 0.05$), and increased the level of albumin ($P < 0.05$). Herpetfluorenone promoted the directed migration and differentiation of iPSCs in DILI mice, increased the level of human alpha-fetoprotein, and upregulated the expression of proliferating cell nuclear antigen ($P < 0.01$). **Conclusion** Herpetfluorenone could effectively induce the differentiation of iPSCs into HLCs and synergistically improve DILI *in vivo* with iPSCs.

Key words: herpetfluorenone; induced pluripotent stem cells; hepatocyte-like cells; drug-induced liver injury; differentiation of cells

药源性肝损伤（drug-induced liver injury，DILI）是由生物制剂、化学药物、中成药等处方或非处方药物，以及中药材、保健品或膳食补充剂等引起的肝损伤，是导致急性肝衰竭（acute liver failure，ALF）的主要原因之一[1-3]。对乙酰氨基酚（acetaminophen，APAP）是常用解热镇痛药，也是临床上 DILI 常见诱因。过量服用 APAP 使其有毒代谢物 *N*-乙酰对苯醌亚胺（*N*-acetyl-p-benzoquinone imine，NAPQI）消耗肝脏中的谷胱甘肽（glutathione，GSH）导致肝细胞坏死[4-6]。在美国及部分欧洲国家，近半数 ALF 病例与 APAP 过量使用有关，尤其发展至重度 ALF 时，原位肝移植成为主要治疗手段，但此方法面临供体短缺、费用高昂以及免疫排斥反应等诸多问题[8-11]。因此，探索和发现 DILI 治疗的新策略具有重要的临床意义。

间充质基质细胞（mesenchymal stromal cells，MSCs）、胚胎干细胞（embryonic stem cells，ESCs）和诱导多能干细胞（induced pluripotent stem cells，iPSCs）等多种类型干细胞已被证实可分化为肝样细胞（hepatocyte-like cells，HLCs），这种通过诱导干细胞定向分化为肝样细胞的治疗方法已成为再生医学领域里用于肝病治疗的一种有效手段，为 ALF 患者提供了再生医学治疗方案[12]。其中，iPSCs 作为一类可从患者自身获取的干细胞，能有效避免肝移植相关的免疫排斥和伦理问题[13]。然而，iPSCs 向 HLCs 的多阶段分化依赖激活素 A（activin A，Act A）、成纤维细胞生长因子-4（fibroblast growth factor-4，FGF-4）等诱导因子和骨形态发生蛋白-4（bone morphogenetic protein-4，BMP-4）等细胞因子干预[14-16]。该过程步骤繁琐且成本高昂，故寻找高效促 iPSCs 分化为 HLCs 的天然活性小分子已成为该领域的研究热点。

波棱瓜子 *Herpetospermum caudigerum* Wall.是藏医治疗肝病的常用药材，其主要活性组分木脂素类成分可抑制转化生长因子-β1（transforming growth factor-β1，TGF-β1）表达减轻小鼠肝纤维化，并可通过调节 Toll 样受体 4（Toll-like receptor 4，TLR4）/髓样分化因子 88（myeloid differentiation factor 88，MyD88）/核因子-κB（nuclear factor-κB，NF-κB）、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3（NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3，NLRP3）及 c-Jun 氨基末端激酶（c-Jun *N*-terminal kinase，JNK）/p38 丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）等信号通路降低机体炎症因子水平，增强抗氧化功能进而缓解肝损伤[17-18]。此外，已有研究显示，部分天然木脂素类成分如五味子乙素具有促干细胞分化为 HLCs 的功能，且这类成分本身兼具抗炎、抗氧化及减轻肝损伤等活性[19-20]。波棱茄酮是从波棱瓜子中提取出的一种木脂素类成分，其可通过减少乙型肝炎病毒（hepatitis B virus，HBV）DNA 的复制率，抑制乙型肝炎表面抗原和乙型肝炎 e 抗原等表达，控制 HBV 进展[21]。半乳糖化的波棱茄酮脂质体可以增强其在肝脏部位的靶向性，降低四氯化碳诱导的急性肝损伤小鼠模型丙氨酸氨基转移酶（alanine aminotransferase，ALT）和天门冬氨酸氨基转移酶（aspartate aminotransferase，AST）水平，缓解氧化应激，有效缓解急性肝损伤[22]。这些研究结果提示了波棱茄酮的保肝效用及其作为干细胞定向分化诱导剂的潜在功能。

为探究波棱茄酮是否具有诱导 iPSCs 向 HLCs 分化作用及其体内抗 DILI 协同药效，本研究培养了 iPSCs 细胞并利用波棱茄酮对其进行诱导分化，在不同阶段检测了 HLCs 特异性标志物的表达，同时测定了诱导过程中细胞的尿素含量及葡萄糖消耗量，以明确其是否具有促分化作用。此外，本研究建立了 APAP 诱导的 DILI 小鼠模型，结合苏木素-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色、血清生化指标检测、免疫荧光染色等方法探究波棱茄酮协同 iPSCs 的修复肝损伤药效作用，为其作为干

细胞小分子诱导剂用于肝脏疾病治疗提供一定的科学依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 24 只，6～8 周龄，体质量 20～22 g，购自北京华阜康生物科技有限公司，实验动物生产许可证号 SCXK（川）2018-119，动物质量合格证号 110322251103682648。动物饲养于 SPF 级实验动物房，温度 18～22 ℃，相对湿度 40%～70%，适应性喂养 1 周。动物实验方案经西南民族大学学术道德与伦理委员会批准（批准号 2023MDLS057）。

1.2 细胞

iPSCs 购自上海安为生物科技有限公司，为 DYR0100 人诱导型多能干细胞。

1.3 药品与试剂

波棱茏酮（质量分数＞98%，批号 CB-1034）购自成都康邦生物科技有限公司；APAP（批号 A9421）、油红 O 染色试剂盒（批号 G1262）、PAS 染色试剂盒（批号 G1360）、ALP 染色试剂盒（批号 G1480）购自北京索莱宝科技有限公司；地塞米松（批号 D4902）购自美国 Sigma-Aldrich 公司；ALT 试剂盒（批号 C009-2-1）、AST 试剂盒（批号 C010-2-1）、碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）试剂盒（批号 A059-2-2）、白蛋白（albumin，ALB）试剂盒（批号 A028-2-1）、总胆汁酸（total bile acid，TBA）试剂盒（批号 E003-1-1）、总胆红素（total bilirubin，T-BIL）试剂盒（批号 C019-1-1）、直接胆红素（direct bilirubin，DBIL-Z）试剂盒（批号 BC5175）、尿素试剂盒（批号 C013-1-1）、葡萄糖试剂盒（批号 A154-1-1）购自南京建成生物工程研究所；Act A（批号 CYT-569）购自 ProSpec 公司；BMP-4（批号 HY-P7007）、FGF-4（批号 HY-P7014）、抑瘤素 M（oncostatin M，OSM，批号 HY-P70465）、生长因子 B27（批号 HY-P7121）购自美国 MedChemExpress 公司；八聚体结合转录因子（octamer-binding transcription factor 4，OCT4）抗体（批号 bs-0830R）、ALB 抗体（批号 bs-2256R）、甲胎蛋白（α-fetoprotein，AFP）抗体（批号 bsm-51467M）、角蛋白 18（cytokeratin 18，CK18）抗体（批号 bs-1339R）购自北京博奥森生物技术有限公司；人甲胎蛋白（human α-fetoprotein，hAFP）抗体（批号 14550-1-AP）、肝脏增殖细胞核抗原（proliferating cell nuclear antigen，PCNA）抗体（批号 10205-2-AP）、二抗（批号 SA00001-2）购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.4 仪器

TGL-16M 型低温高速离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）；CKX53 型倒置生物显微镜（日本 Olympus 公司）；FQD-96C 型实时荧光定量 PCR 分析仪（杭州博日科技有限公司）；K5600 型超微量分光光度计（北京凯奥科技发展有限公司）；CYT5M 型多功能全波长酶标仪（美国 BioTek 公司）；12003154 型化学发光显影系统（美国 Bio-Rad 公司）。

2 方法

2.1 ALP 染色鉴定 iPSCs 及免疫荧光染色检测 OCT4 蛋白表达

2.1.1 ALP 染色　将复苏的 iPSCs 培养至第 3 代，待细胞融合度达到 80%时，将其传代接种至 6 孔板中，继续培养 2 d。随后弃去培养基，使用 PBS 洗涤细胞 3 次，再加入多聚甲醛溶液对细胞进行固定，室温静置 30 min。固定结束后，弃去多聚甲醛，使用 PBS 洗涤细胞 3 次，每次洗涤时需将培养板置于摇床上摇晃 15 min，进行 ALP 染色。将已稀释的 BCIP 与 NBT 混合，加入孔板中，确保液体覆盖细胞层，于避光条件下孵育 30 min，PBS 洗涤 2 次，随后在显微镜下观察并拍照。

2.1.2 免疫荧光染色　取“2.1.1”项下经固定和洗涤的 iPSCs 放置于载玻片上，加入 0.2% TritonX-100 和 5%牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA）置于 37 ℃封闭 30 min；加入 OCT4 抗体，4 ℃孵育过夜；PBS 清洗后加入相应二抗，室温孵育 1 h；用 DAPI 染色 5 min，PBS 清洗 3 遍，随后在荧光显微镜下观察并拍照。

2.2 CCK-8 法检测波棱茏酮对 iPSCs 活力的影响

用二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO）溶解波棱茏酮配制母液。将培养皿中融合度达到 80%的 iPSCs 以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中，培养过夜。设置对照组、DMSO 组和波棱茏酮（0.1、1.0、5.0、10.0、20.0、50.0 μmol/L）组。对照组加入新鲜培养基，DMSO 组加入含 0.1% DMSO 的培养基，波棱茏酮组分别加入相应浓度的含药培养基，分别孵育 24、48、72 h。加入 CCK-8 溶液后，在 37 ℃的培养箱中培养 2 h，采用酶标仪测定 460 nm 处的吸光度（A）值，计算细胞存活率。

$$细胞存活率=(A_{波棱茏酮}-A_{对照})/(A_{DMSO}-A_{对照})$$

2.3 波棱茺酮诱导 iPSCs 分化实验

2.3.1 诱导过程中细胞尿素含量和葡萄糖消耗的检测 将融合度达到 80%的 iPSCs 以 5×10³ 个/孔接种于 6 孔板中，设置对照组、波棱茺酮组和浓缩生长因子（concentrated growth factors，CGF）组，波棱茺酮组前 10 d 用含 1.0 μmol/L 波棱茺酮、2% B27 的 RPMI 1640 培养基诱导，第 11～21 天用 5%胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）替代 B27；CGF 组前 5 d 用含 100 ng/mL Act A、2% B27 的 RPMI 1640 培养基诱导，第 5～10 天添加 10 ng/mL FGF-4、20 ng/mL BMP-4 和 2% B27，第 11～21 天添加 10 ng/mL 波棱茺酮、20 ng/mL OSM、100 nmol/L 地塞米松和 5% FBS。分别于第 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 天收集各组培养液，并保存在−80 ℃冰箱中。在第 21 天时，按照试剂盒说明书测定尿素含量和葡萄糖消耗量。

2.3.2 qRT-PCR 检测诱导分化后 iPSCs 中 HLCs 特异性标志物的表达 按照“2.3.1”项下方法进行分组和处理，按照 Direct-zol RNA 提取试剂盒说明书方法提取 iPSCs 总 RNA 并合成 cDNA，进行 qRT-PCR 分析，引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5’-3’)
β-actin	F: AATCTGGCACCACACCTTCTACAA
	R: GGATAGCACAGCCTGGATAGCAA
ALB	F: ACATGTGTTGCTGATGAGTCAGC
	R: GGTTGTCATCTTTGTGTTGCAAG
AFP	F: CCAGTTTGTTCAAGAAGCCACTT
	R: GCTGCAGCAGTCTGAATGTCC
AAT	F: TTCACTGTCAACTTCGGGGAC
	R: CTCTTCCTCGGTGTCCTTGACT
CK18	F: AGAAGGAGACCATGCAAAGCC
	R: GTCCACAGTATTTGCGAAGATCT
CPS1	F: AGGACAGATTCTCACAATGGCC
	R: TCTTCCTGTAGCCATTGCCCT
ASS1	F: TGTATGAGGACCGCTACCTCCT
	R: AGGGAGCAATGACCTTTATCTGG
CYP3A4	F: CGATCATTGCTGTCTCCAACC
	R: GTGGATTGTTGAGAGAGTCGATG
CYP3A7	F: TAGTGATGGATCTCATCCCAAACT
	R: GTTGACAGTCATAAATACCCCAGAC
OCT4	F: AAACGACCATCTGCCGCTT
	R: CGATACTGGTTCGCTTTCTCTTT

AAT-α1-抗胰蛋白酶；*CPS1*-氨基甲酰磷酸合成酶 1；*ASS1*-精氨酸琥珀酸合酶 1；*CYP3A4*-细胞色素 P450 3A4。

AAT-alpha-1 antitrypsin; *CPS1*-aminoformyl phosphate synthase 1; *ASS1*-arginine succinate synthase 1; *CYP3A4*-cytochrome P450 3A4.

2.3.3 免疫荧光检测诱导分化后 iPSCs 中 ALB 和 AFP 的表达 按照“2.3.1”项下方法进行分组和处理，用 4%多聚甲醛固定 12 孔板 30 min，PBS 洗涤 3 次；加入 0.2% Triton-X100，室温渗透 30 min，PBS 洗涤 3 次；加入 3% BSA，室温封闭 2 h；加入特异性一抗。盖上密封膜，4 ℃湿箱孵育过夜，PBS 洗涤 3 次；加入二抗，孵育 2 h，PBS 洗涤；加入经 PBS 稀释的 DAPI 染色液，室温染色 5 min，PBS 洗涤，于荧光显微镜下观察并拍照。DAPI 染色的细胞核在激发光下显示为蓝色，而特异性标记则显示为绿色。

2.3.4 油红 O 染色与 PAS 染色 按照“2.3.1”项下方法进行分组和处理，弃去培养基，用 4%多聚甲醛溶液，在摇床上孵育 10 min 固定细胞。按照试剂盒说明书进行染色，于显微镜下观察并拍照。

2.4 动物实验

2.4.1 分组、造模与给药 小鼠适应性喂养 1 周后，随机分为对照组、模型组、iPSCs 组和 iPSCs＋波棱茺酮组，每组 6 只。除对照组 ip 生理盐水外，其余小鼠 ip APAP（300 mg/kg）建立 DILI 模型。造模 12 h 后，对照组和模型组尾 iv PBS 溶液，iPSCs 组小鼠尾 iv iPSCs 细胞悬液 200 μL（2×10⁶ 个细胞/只），iPSCs＋波棱茺酮组尾 iv iPSCs 细胞同时 ip 波棱茺酮。参考前期相关药效学研究结果[37]，波棱茺酮剂量设置为 80 mg/kg。

2.4.2 样本采集 给药治疗 72 h 后，异氟烷麻醉小鼠，眼静脉丛取血，室温静置 1～2 h，3 000 r/min 离心 10 min，分离血清，−80 ℃保存。取小鼠肝组织，于 4%多聚甲醛中固定，进行肝组织病理观察和免疫荧光染色，剩余肝组织置于−80 ℃保存备用。

2.4.3 HE 染色 肝组织经 4%多聚甲醛固定 24 h 以上，梯度乙醇脱水后放入石蜡中包埋，切成 3 μm 厚切片，用 40 ℃温水摊平后用烘箱在 60 ℃烤片，将切片依次放入二甲苯I、二甲苯II、二甲苯III中 10 min，无水乙醇I、无水乙醇II中 5 min，梯度乙醇中 5 min、水中 5 min 脱蜡，使用苏木素染色，盐酸乙醇分化，梯度乙醇脱水，二甲苯I、二甲苯II、二甲苯III分别浸泡 5 min，最后中性树胶封片，于显微镜下观察。

2.4.4 血清生化指标检测 根据试剂盒说明书测定小鼠血清中 ALT、AST、ALP、ALB、TBA、T-BIL、DBIL-Z 水平。

2.4.5 免疫荧光染色检测肝组织中 hAFP 和 PCNA 表达 取肝组织石蜡切片，分别孵育一抗和二抗，

于显微镜下观察并拍照。

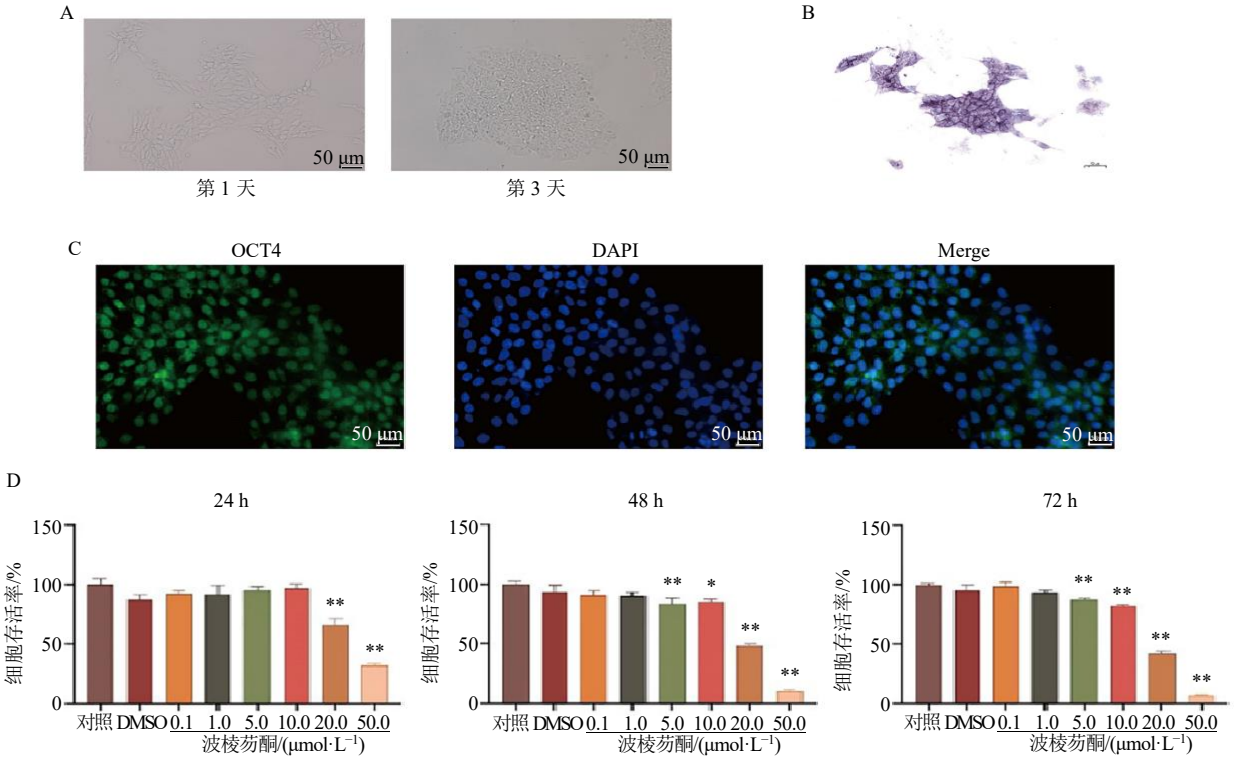
2.5　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，使用 GraphPad 10.0.2 软件进行数据处理。采用单因素方差分析进行统计分析。

3　结果

3.1　iPSCs 鉴定及波棱劳酮对其活力的影响

将复苏的 iPSCs 传代至第 3 代，观察到细胞在第 1 天迅速增殖，细胞形态和密度均匀，边缘长且扁平；第 3 天细胞集落的形态变得平坦紧凑，形状更规则，接近圆形（图 1-A）。ALP 染色可以评估 iPSCs 的分化状态，如图 1-B 所示，iPSCs 的 ALP 染色呈紫色，表明 iPSCs 具有干细胞特征，即处于未分化状态。免疫荧光染色结果（图 1-C）显示，iPSCs 细胞能够表达典型的 iPSCs 特有核标记物 OCT4。通过 CCK-8 实验检测不同浓度波棱劳酮对 iPSCs 生长的调控作用，如图 1-D 所示，与对照组比较，0.1～10.0 μmol/L 波棱劳酮处理 24 h 对 iPSCs 细胞生长无明显影响，0.1、1.0 μmol/L 波棱劳酮处理 48、72 h 对 iPSCs 细胞生长亦无明显影响，故选择浓度为 1.0 μmol/L 进行后续实验。



A-iPSCs 传代第 1 天和第 3 天形态（×200）；B-iPSCs 的 ALP 染色结果（×200）；C-免疫荧光染色检测 OCT4 的表达（×200）；D-不同浓度的波棱劳酮对 iPSCs 细胞存活率的影响；与对照组比较：$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$。

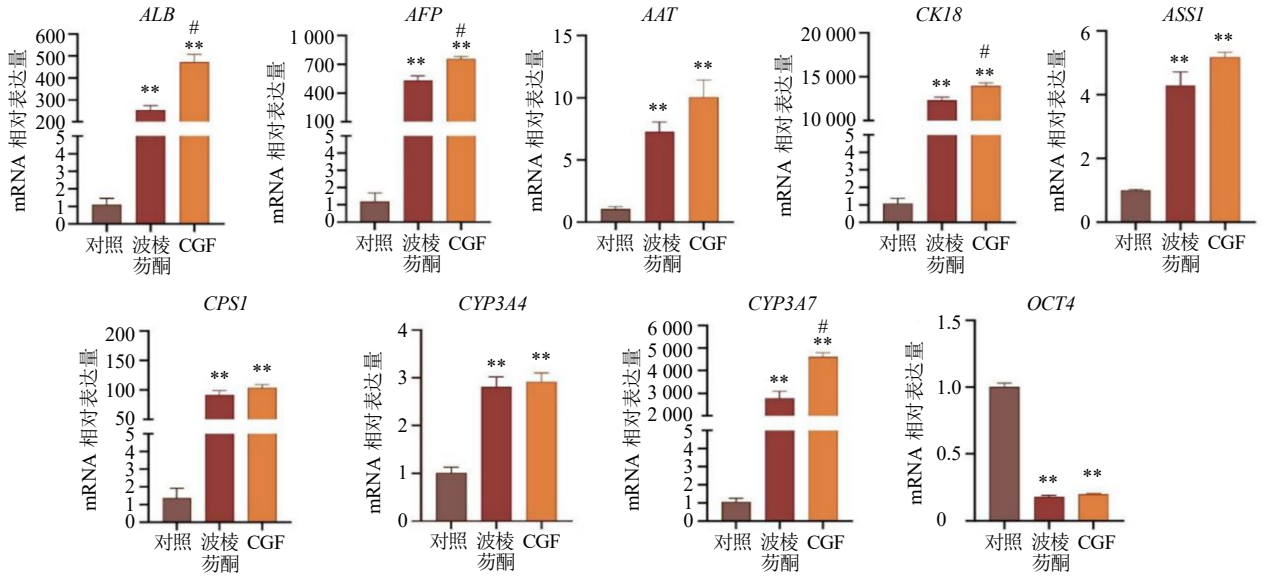
A-morphology of iPSCs on 1st and 3rd day of passage (× 200); B-results of ALP staining of iPSCs (× 200); C-OCT4 expression detected by immunofluorescence staining (× 200); D-effect of different concentrations of herpetfluorenone on survival rate of iPSCs cells; $^{*}P < 0.05$　$^{**}P < 0.01$ *vs* control group.

图 1　iPSCs 的鉴定及波棱劳酮的细胞毒性（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

Fig. 1　Identification of iPSCs and cytotoxicity of herpetfluorenone ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.2　波棱劳酮促进 HLCs 肝脏标志物的表达

为了探讨波棱劳酮是否能促进 iPSCs 向 HLCs 的分化，采用 qRT-PCR 检测 iPSCs 中成熟 HLCs 基因、尿素循环相关基因、药物代谢相关基因、干细胞基因的表达。结果如图 2 所示，与对照组比较，波棱劳酮组和 CGF 组肝脏成熟基因（*ALB*、*AFP*、*AAT*、*CK18*）以及尿素循环基因（*ASS1*、*CPS1*）和药物代谢相关基因（*CYP3A4*、*CYP3A7*）的表达均显著上调（$P<0.01$），干细胞特异性基因 *OCT4* 的表达明显下调（$P<0.01$）；与波棱劳酮组比较，CGF 组 *ALB*、*AFP*、*CK18*、*CYP3A7* 的表达水平显著升高（$P<0.05$）。采用免疫荧光染色进一步检测 HLCs 特异性标志物的表达，结果如图 3 所示，与对照组比较，波棱劳酮组和 CGF 组 ALB 和 AFP 的表达均增加（$P<0.05$），表明波棱劳酮具有促进 iPSCs 向 HLCs 分化的作用。

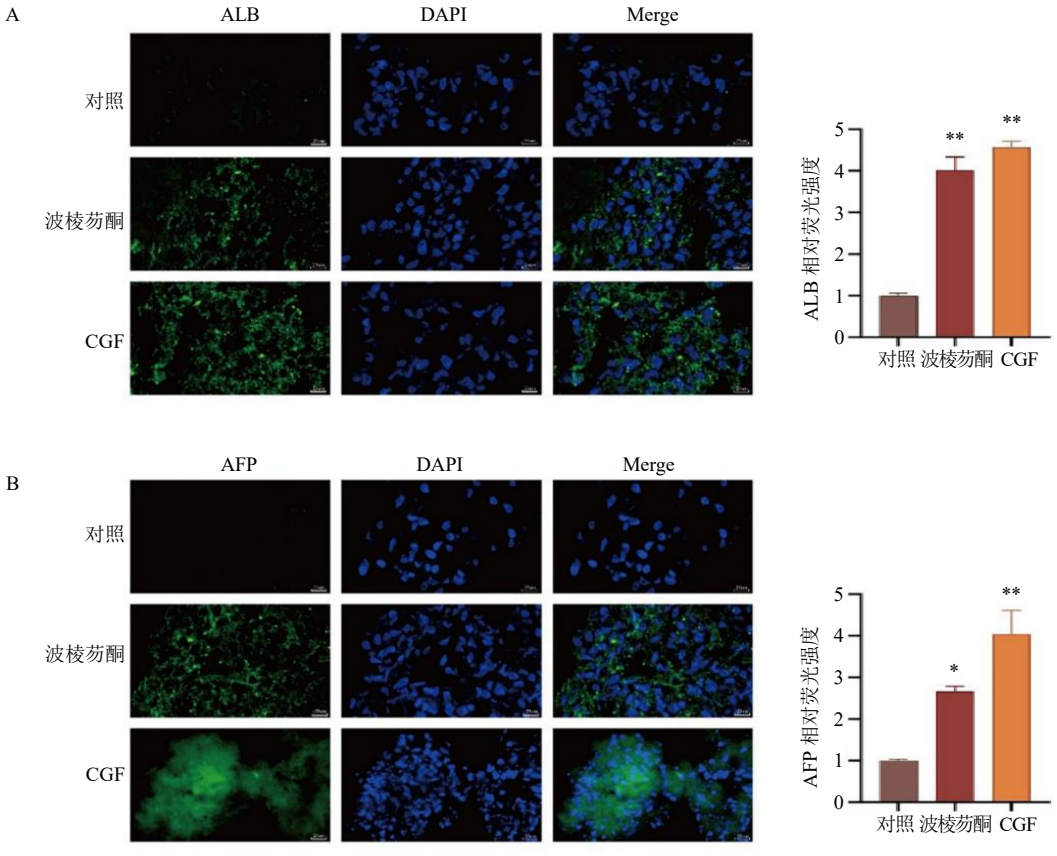


与对照组比较：$^{**}P<0.01$；与波棱苟酮组比较：$^{\#}P<0.05$。

$^{**}P < 0.01$ *vs* control group; $^{\#}P < 0.05$ *vs* herpetfluorenone group.

图 2　波棱苟酮对 iPSCs 相关基因表达的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 2　Effect of herpetfluorenone on expressions of genes related to iPSCs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



与对照组比较：$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$。

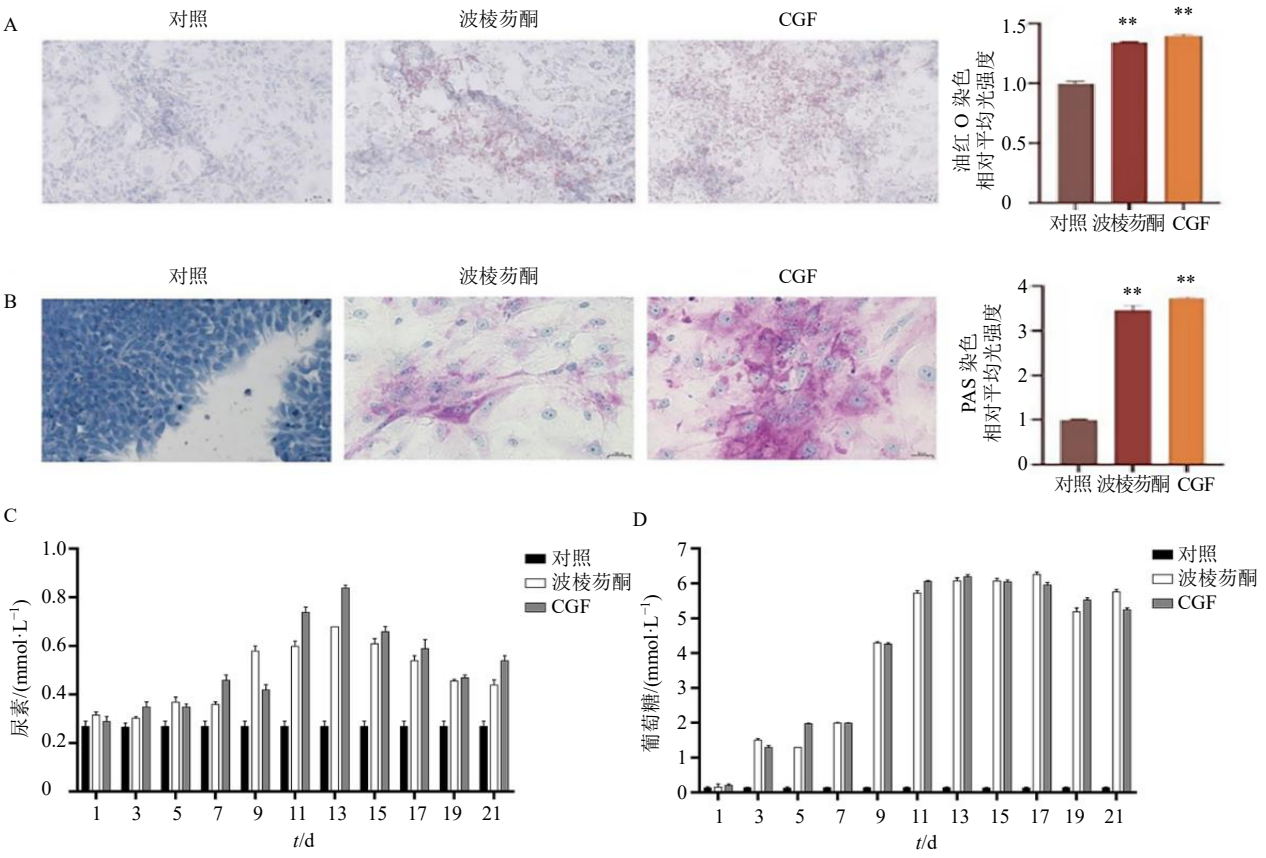
$^{*}P < 0.05$　$^{**}P < 0.01$ *vs* control group.

图 3　波棱苟酮对 iPSCs 中 ALB (A) 和 AFP (B) 表达的影响（×200；$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 3　Effect of herpetfluorenone on expressions of ALB (A) and AFP (B) in iPSCs (× 200; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.3　波棱茏酮对 iPSCs 中肝细胞相关功能的影响

为了进一步检测波棱茏酮诱导的 iPSCs 是否具有 HLCs 的功能，采用油红 O 染色和 PAS 染色评价诱导后 iPSCs 的脂质和糖原储存能力。油红 O 染色结果（图 4-A）显示，对照组未见明显的红色油滴，诱导给药后可清晰观察到细胞周围分泌的红色油滴（$P<0.01$），表明 iPSCs 在波棱茏酮诱导后具有储存脂质的能力。PAS 染色结果（图 4-B）显示，与对照组比较，波棱茏酮组和 CGF 组可见明显的红色或紫红色阳性染色（$P<0.01$），表明诱导给药后 iPSCs 具有储存糖原的能力。收集细胞上清液以测定 HLCs 的尿素合成和葡萄糖消耗，结果如图 4-C、D 所示，诱导给药组尿素含量随时间逐渐升高，分泌量在第 13 天达到峰值；葡萄糖消耗量随时间逐渐增加，11 d 后基本持平，表明诱导给药后 iPSCs 具有正常的葡萄糖消耗能力，间接反映细胞具有正常的肝糖原合成功能。以上结果表明波棱茏酮诱导的 iPSCs 分化的 HLCs 具有储存糖原和脂质的功能。



A-油红 O 染色（×200）；B-PAS 染色（×200）；C-诱导过程中培养液尿素含量；D-诱导过程中培养液葡萄糖消耗量；与对照组比较：$^{**}P<0.01$。
A-Oil Red O staining (× 200); B-PAS staining (× 200); C-urea content in cell culture medium during induction process; D-glucose consumption in cell culture medium during induction process; $^{**}P < 0.01$ *vs* control group.

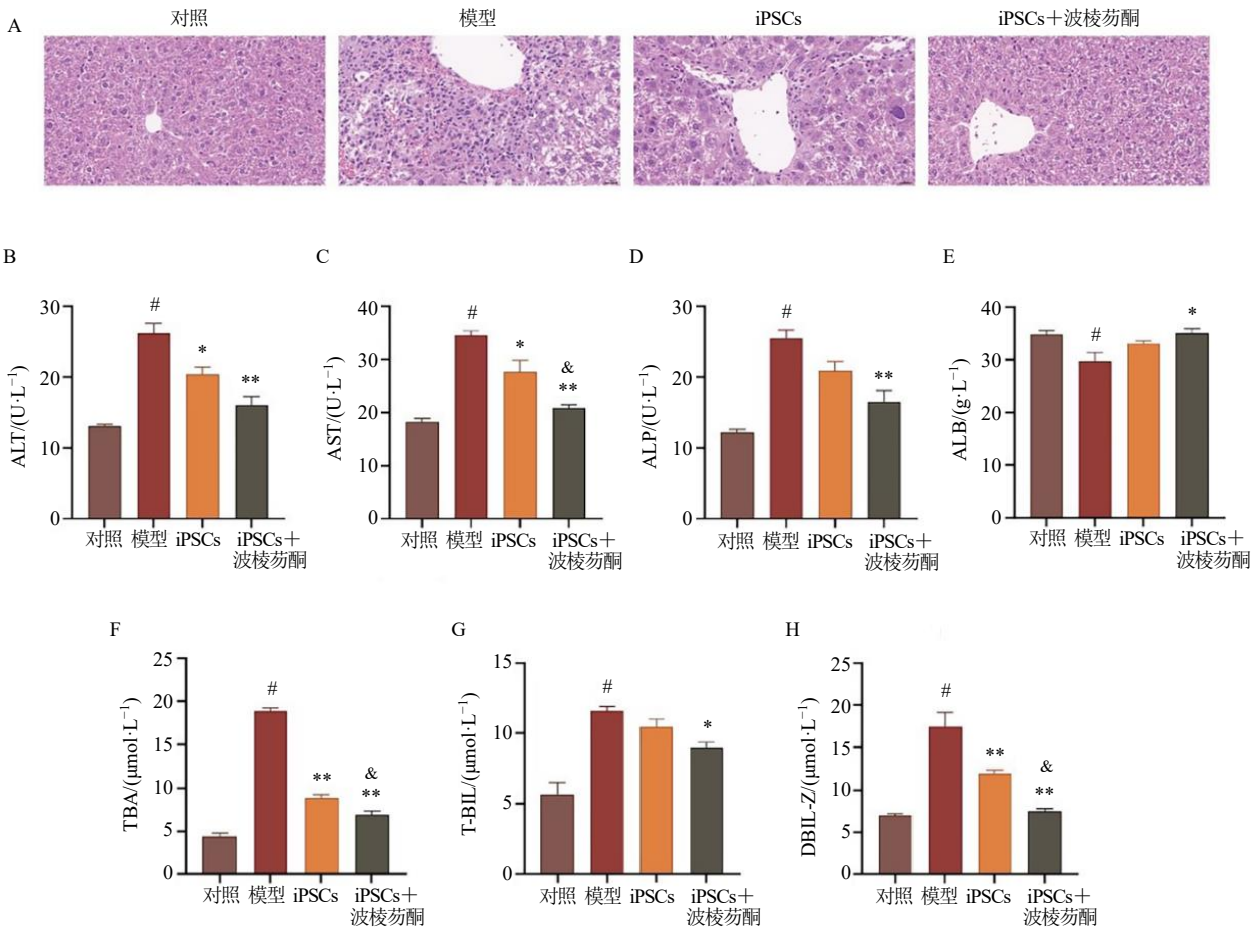
图 4　波棱茏酮对 iPSCs 中肝细胞相关功能的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 4　Effect of herpetfluorenone on hepatocyte-related function in iPSCs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.4　波棱茏酮联合 iPSCs 对 DILI 小鼠的改善作用

肝组织 HE 染色结果（图 5-A）显示，与对照组比较，模型组小鼠肝脏出现明显病变和坏死，有水肿变性、炎症细胞浸润等情况；与模型组比较，给药组肝组织病理变化改善，尤其 iPSCs＋波棱茏酮组肝组织损伤明显减轻，肝细胞大小均匀，坏死减少，表明 iPSCs 能改善小鼠肝损伤，波棱茏酮联合 iPSCs 处理可显著增强治疗效果。

为了进一步评价肝损伤修复情况，检测了小鼠血清中肝细胞损伤标志物（ALT、AST、ALP）以及胆汁排泄功能评估指标（T-BIL、DBIL-Z、TBA）和肝脏合成功能指标（ALB），结果如图 5-B～H 所示。与对照组比较，模型组小鼠血清中 ALT、AST、ALP 活性和 T-BIL、DBIL-Z、TBA 水平均显著升高（$P<$



与对照组比较：#P＜0.05；与模型组比较：*P＜0.05 **P＜0.01；与 iPSCs 组比较：&P＜0.05，图 6 同。

#P < 0.05 *vs* control group; *P < 0.05 **P < 0.01 *vs* model group; &P < 0.05 *vs* iPSCs group, same as fig. 6.

图 5 波棱劳酮联合 iPSCs 对 APAP 诱导的 DILI 小鼠肝组织病理 (A, ×200) 和肝功能 (B～H) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 6)

Fig. 5 Effects of herpetfluorenone combined with iPSCs on liver histopathology (A, × 200) and liver function (B—H) in APAP-induced DILI mice ($\bar{x} \pm s$, n = 6)

0.05），ALB 水平显著降低（P＜0.05）；与模型组比较，iPSCs 组小鼠血清中 ALT、AST 活性和 DBIL-Z、TBA 水平均显著降低（P＜0.05）；iPSCs＋波棱劳酮组小鼠血清中 ALT、AST、ALP 活性和 T-BIL、DBIL-Z、TBA 水平均显著降低（P＜0.05），ALB 水平显著升高（P＜0.05）；与 iPSCs 组比较，iPSCs＋波棱劳酮组 AST 活性和 DBIL-Z、TBA 水平显著降低（P＜0.05）。以上结果表明单用 iPSCs 对 ALP、ALB、T-BIL 无显著性影响，而 iPSCs 与波棱劳酮联用对 ALT、AST、ALP、ALB、T-BIL、DBIL-Z、TBA 这 7 个指标的改善均有显著性差异，提示二者可能具有一定的协同保肝作用。

3.5 波棱劳酮增强 iPSCs 在体内的分化和增殖能力

为了验证波棱劳酮是否在体内也有促进 iPSCs 分化的作用，对 DILI 小鼠肝组织中 HLCs 分化过程中的阶段标志物 hAFP 和人/小鼠共享 CK18（m&hCK18）进行免疫荧光染色，结果如图 6 所示。与模型组比较，iPSCs 组 hAFP 的表达显著增加（P＜0.01）；与 iPSCs 组比较，iPSCs＋波棱劳酮组 hAFP 的表达进一步显著增加（P＜0.05）。通过免疫荧光染色检测肝组织中细胞增殖标志物 PCNA 的表达，结果如图 6-B 所示，与模型组比较，iPSCs 组 PCNA 的表达显著增加（P＜0.01）；与 iPSCs 组比较，iPSCs＋波棱劳酮组 PCNA 的表达进一步显著增加（P＜0.05）。以上结果表明，iPSCs 注入肝损伤小鼠体内后具有分化为 HLCs 能力，并促进肝细胞的增殖，且波棱劳酮和 iPSCs 的联合使用比 iPSCs 单独使用的分化和促增殖能力更强。

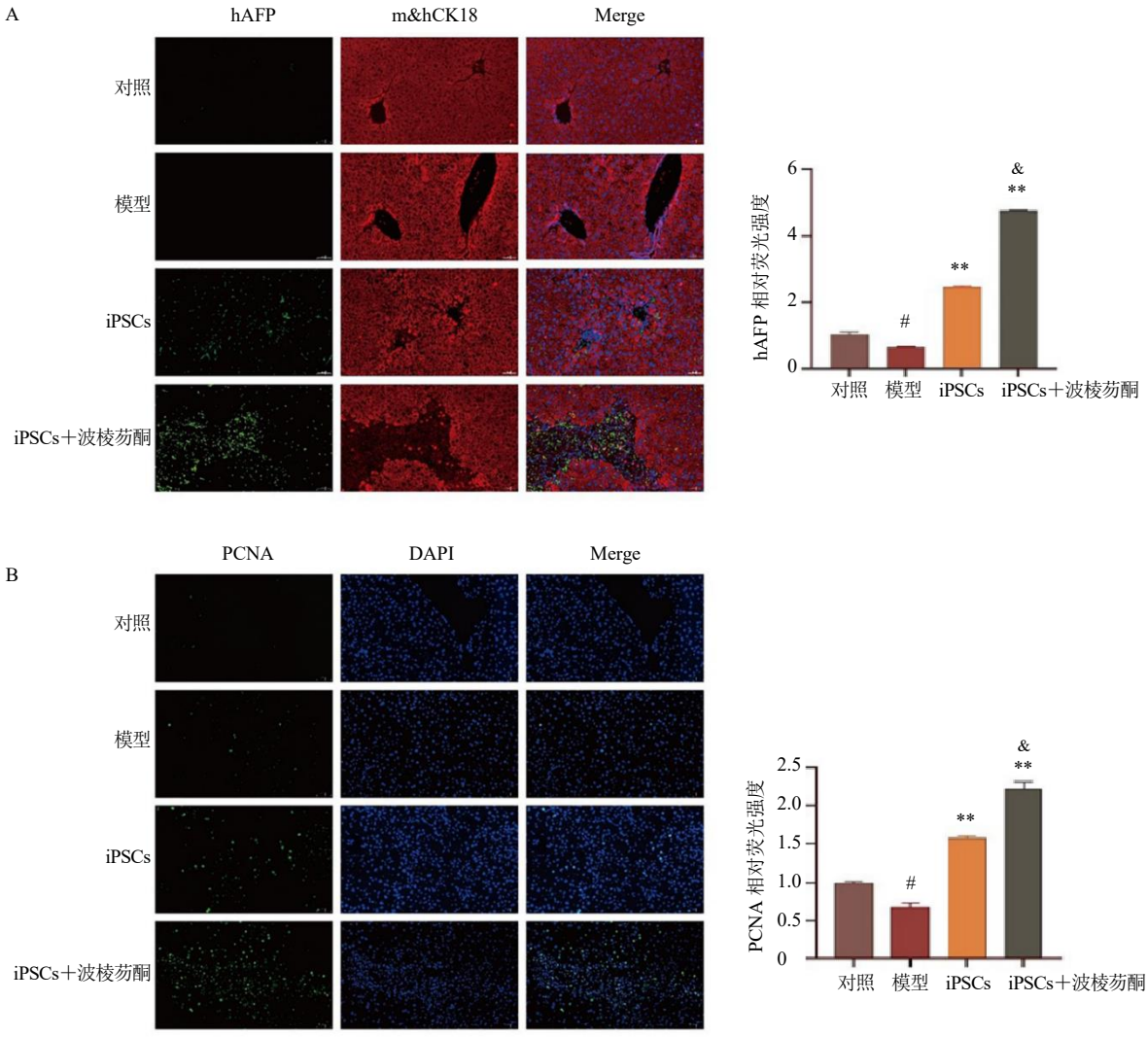


图 6　波棱莎酮联合 iPSCs 对 APAP 诱导的 DILI 小鼠肝组织中 hAFP (A) 和 PCNA (B) 表达的影响 (×200；$\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6　Effect of herpetfluorenone combined with iPSCs on expressions of hAFP (A) and PCNA (B) in liver tissues of APAP-induced DILI mice (× 200; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4　讨论

当前，干细胞已被用于多种肝病尤其是终末期肝病的治疗研究，包括失代偿性肝硬化、肝纤维化和急性慢性肝衰竭、肝癌等[23-24]。终末期肝病常伴随肝细胞的大量死亡与肝功能迅速恶化[25]。干细胞可作为“种子细胞”，通过迁移、归巢至受损肝脏，分化为功能性 HLCs，直接修复受损组织[26-27]。此外，其修复作用并非局限于简单的细胞替代，而是通过多种途径协同实现，例如调节免疫细胞功能恢复免疫稳态、分泌生长因子促进肝细胞增殖、抑制肝纤维化等[28-29]。因此，基于干细胞的体外人工肝脏构建或定向分化研究在肝病领域具有重要意义。然而，iPSCs 定向分化为 HLCs 通常需经历内胚层诱导、肝向特化、肝细胞扩展和肝细胞成熟 4 个阶段，这一过程须模拟胚胎肝脏发育的微环境，并分阶段添加多种诱导因子，不仅过程繁琐，而且成本高昂[30]。基于此，本研究旨在筛选能够高效促进 iPSCs 分化为 HLCs 的天然木脂素类活性小分子。前期研究证实了波棱瓜子木脂素成分波棱莎酮对小鼠肝损伤具有保护作用。本研究提出波棱莎酮可能诱导 iPSCs 分化为 HLCs 的假设，并通过体外实验对其进行验证。

OCT4 是维持干细胞多能性的关键调节因子，其过表达可诱导体细胞向原始多能性状态转变形成 iPSCs；ALP 则为膜结合酶，未分化的 iPSCs 可高表达 ALP，随着 iPSCs 分化，其基因表达被抑制，

因此常作为鉴定 iPSCs 的重要指标之一[31,38]。本研究通过检测这 2 种标志物对 iPSCs 进行初步鉴定，结果显示细胞核中高表达 OCT4，细胞表面 ALP 呈现显著阳性表达。随后，体外实验评价波棱茏酮促进 iPSCs 细胞向 HLCs 分化能力，检测了多种肝细胞标志物水平变化，如肝脏合成的维持机体营养和渗透压的重要蛋白质 ALB，胎肝细胞标志物 AFP，肝细胞细胞骨架的重要组成成分 CK18，主要在干细胞中分泌的蛋白酶抑制剂 AAT。结果表明，与对照组相比，经波棱茏酮或 CGF 诱导后的 iPSCs 中 ALB、AFP、AAT、CK18 的表达显著升高。其中，AFP 在未分化的 iPSCs 中不表达或低表达，在诱导分化为 HLCs 后高表达，而进一步成熟并表达 ALB 等标志物时，AFP 的表达则逐渐下降[34]。由于 AFP 是一种在胎肝细胞中高度表达的蛋白质，本研究结果表明诱导生成的 HLCs 可能处于介于胎肝细胞和成熟肝细胞之间的某个阶段。由于肝脏是重要的代谢器官，本研究还对细胞中药物代谢酶和尿素循环酶的水平进行了检测。CYP3A4 和 CYP3A7 是参与药物和大多数其他外源性物质代谢的主要酶，而 CPS1 是尿素循环中负责将氨基酸代谢产生的氨转化为尿素的关键酶。本研究结果显示，与对照组相比，波棱茏酮诱导生成的 HLCs 能够高表达 CYP3A4 和 CYP3A7，体现其具有一定的类似肝细胞的代谢功能，但 CPS1 的表达水平与 iPSCs 相比没有显著性差异。此外，PAS 染色和油红 O 染色测定结果还表明已分化的 iPSCs 具备了储存糖原和脂质的能力，并且尿素含量测定和葡萄糖消耗的测定间接证实了这些细胞具有分泌尿素合成肝糖原的功能。从上述结果可以看出，经过波棱茏酮处理诱导的 iPSCs 可表现出典型的肝细胞表型和功能。

APAP 引发肝损伤的机制涉及氧化应激、线粒体功能障碍、自噬紊乱及炎症等多个方面[32]。本研究通过注射高剂量 APAP 成功构建小鼠 DILI 模型。在肝细胞受损时，通常位于细胞质和线粒体中的 ALT、AST 与 ALP 会因细胞膜通透性增加而释放入血，因此这些指标可作为肝损伤的血清学标志物。而肝脏是合成 ALB 的唯一场所，因此 ALB 可用于检测成熟肝细胞的合成功能。当肝细胞病变或肝内或肝外阻塞发生时，胆汁酸代谢会受到抑制，并反流到血液中，血清中 TBA 的浓度升高。胆红素的合成与肝细胞清除之间的平衡决定了血液中胆红素的含量[33]。因此，血清 TBA 和胆红素水平的升高均提示胆汁酸代谢出现障碍。在体内实验中，ALT、AST、ALP 及胆红素（T-BIL、DBIL-Z）和 TBA 水平显著升高提示模型建立成功。治疗后，各给药组血清生化指标均有下降，其中 iPSCs 联合波棱茏酮组的改善最为显著，表明该联合方案能更有效地促进受损肝脏的功能恢复，该结果与肝脏组织 HE 染色的病理学改善相一致。

本研究结果显示，治疗 3 d 后，与模型组相比，iPSCs 组 hAFP 显著上调，iPSCs＋波棱茏酮联用组 hAFP 的表达相较于 iPSCs 组也显著增加，从体内层面进一步证实波棱茏酮可促 iPSCs 分化为 HLCs。同时，本研究还分析了 PCNA 的表达水平，用以反映细胞的增殖状态。PCNA 作为细胞增殖的指标，在分化前期高度增殖的干细胞中呈现高表达[35]。结果显示，与模型组和 iPSCs 相比，iPSCs 联合波棱茏酮组 PCNA 的表达显著上调。以上结果提示波棱茏酮可能对移植后的 iPSCs 在损伤部位的定位、增殖及分化过程具有一定的调控作用，并且可与 iPSCs 协同发挥治疗作用，共同促进肝损伤后的功能修复。然而，波棱茏酮对 iPSC 的最佳诱导条件（如剂量与作用时间）仍需进一步探索。有研究者发现，尾 iv iPSCs 后的肝损伤小鼠存活率更高，并且在 iPSCs 移植后 1 个月的随访观察中，其在肝脏中未发现类似肿瘤的结构[36]。鉴于直接注射未分化的 iPSCs 可能存在的致瘤风险，未来研究应系统观察波棱茏酮诱导前后 iPSCs 的体内成瘤风险及致癌基因辨识研究，为后续的临床转化应用提供安全性依据。

综上，本研究提示了波棱茏酮能够促进 iPSCs 向 HLCs 的分化，对 iPSCs 体内移植后的定位、增殖和分化具有潜在的诱导作用，同时能与 iPSCs 协同治疗，缓解 DILI，为肝损伤的治疗提供了新的思路，其安全性及临床转化潜力仍需在后续研究中进一步开展系统评估。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Fu L H, Qian Y H, Shang Z, *et al*. Antibiotics enhancing drug-induced liver injury assessed for causality using Roussel Uclaf Causality Assessment Method: Emerging role of gut microbiota dysbiosis [J]. *Front Med*, 2022, 9: 972518.

[2] Stravitz R T, Lee W M. Acute liver failure [J]. *Lancet*, 2019, 394(10201): 869-881.

[3] Katarey D, Verma S. Drug-induced liver injury [J]. *Clin*

Med, 2016, 16(6): s104-s109.

[4] Fisher E S, Curry S C. Evaluation and treatment of acetaminophen toxicity [M] // Ramachandran A, Jaeschke H. *Advances in Pharmacology*. Academic Press/Elsevier, 2019, 85: 263-272.

[5] 朱亚南, 何李生, 胡天翠, 等. 刺梨发酵液通过激活 Nrf2/ARE 信号通路缓解对乙酰氨基酚诱导的小鼠肝损伤研究 [J]. 中草药, 2026, 57(2): 527-540.

[6] Shu Y S, He D, Li W, *et al*. Hepatoprotective effect of *Citrus aurantium* L. against APAP-induced liver injury by regulating liver lipid metabolism and apoptosis [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(5): 752-765.

[7] Andrade R J, Chalasani N, Björnsson E S, *et al*. Drug-induced liver injury [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5: 58.

[8] Asrani S K, Devarbhavi H, Eaton J, *et al*. Burden of liver diseases in the world [J]. *J Hepatol*, 2019, 70(1): 151-171.

[9] Soltys K A, Setoyama K, Tafaleng E N, *et al*. Host conditioning and rejection monitoring in hepatocyte transplantation in humans [J]. *J Hepatol*, 2017, 66(5): 987-1000.

[10] Kuse Y, Taniguchi H. Present and future perspectives of using human-induced pluripotent stem cells and organoid against liver failure [J]. *Cell Transplant*, 2019, 28(1_suppl): 160S-165S.

[11] 中华医学会器官移植学分会, 中国医师协会器官移植医师分会移植免疫专业委员会, 刘剑戎, 等. 中国重症肝衰竭肝移植围手术期管理临床实践指南 [J]. 器官移植, 2025, 16(6): 819-832.

[12] Nikokiraki C, Psaraki A, Roubelakis M G. The potential clinical use of stem/progenitor cells and organoids in liver diseases [J]. *Cells*, 2022, 11(9): 1410.

[13] Aboul-Soud M A M, Alzahrani A J, Mahmoud A. Induced pluripotent stem cells (iPSCs)-roles in regenerative therapies, disease modelling and drug screening [J]. *Cells*, 2021, 10(9): 2319.

[14] Mun S J, Ryu J S, Lee M O, *et al*. Generation of expandable human pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like liver organoids [J]. *J Hepatol*, 2019, 71(5): 970-985.

[15] Shinozawa T, Kimura M, Cai Y Q, *et al*. High-fidelity drug-induced liver injury screen using human pluripotent stem cell-derived organoids [J]. *Gastroenterol*, 2021, 160(3): 831-846.

[16] Bin Ramli M N, Lim Y S, Koe C T, *et al*. Human pluripotent stem cell-derived organoids as models of liver disease [J]. *Gastroenterol*, 2020, 159(4): 1471-1486.

[17] 李娜芝, 师艺玮, 郭敏侠, 等. 藏药波棱瓜子总木脂素对 ANIT 诱导的小鼠肝损伤的保护作用及机制研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34(1): 49-56.

[18] 杭凌宇, 申宝德, 沈成英, 等. 藏药波棱瓜子抗肝病现代研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(2): 549-556.

[19] Jin M X, Yi X, Zhu X J, *et al*. Schisandrin B promotes hepatic differentiation from human umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. *iScience*, 2024, 27(2): 108912.

[20] 东光辉, 兴桂华, 焦宇, 等. 五味子乙素通过对抗氧化应激和炎症减轻小鼠急性肝损伤 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2025, 46(10): 901-906.

[21] Gong P Y, Yuan Z X, Gu J, *et al*. Anti-HBV activities of three compounds extracted and purified from *Herpetospermum* seeds [J]. *Molecules*, 2017, 22(1): 14.

[22] 符小红, 巴珂, 顾健, 等. 半乳糖化的波棱茏酮脂质体对四氯化碳致肝损伤小鼠的保护作用 [J]. 中药药理与临床, 2017, 33(6): 65-68.

[23] Wang Y X, Ren Y N, Zhang S S, *et al*. Application of stem cells in the precise diagnosis and treatment of liver diseases [J]. *World J Gastroenterol*, 2025, 31(46): 114415.

[24] Lv D J, Li T. Editorial: Stem cell research and therapy for liver and kidney diseases [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2025, 13: 1665821.

[25] 蒋丽娜, 赵景民. 肝衰竭的临床病理基础 [J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(9): 1916-1919.

[26] Jin W, Liang X W, Brooks A, *et al*. Modelling of the SDF-1/CXCR4 regulated *in vivo* homing of therapeutic mesenchymal stem/stromal cells in mice [J]. *PeerJ*, 2018, 6: e6072.

[27] Gupta S, Sharma A, Rajakannu M, *et al*. Small molecule-mediated stage-specific reprogramming of MSCs to hepatocyte-like cells and hepatic tissue for liver injury treatment [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2024, 20(8): 2215-2235.

[28] Li S Q, Wang Y C, Li S M, *et al*. Mesenchymal stem cell therapy for end-stage liver disease: Adversity and opportunity [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2025, 16(1): 666.

[29] Shi L, Zhang Z Y, Mei S, *et al*. Dose-escalation studies of mesenchymal stromal cell therapy for decompensated liver cirrhosis: Phase Ia/Ib results and immune modulation insights [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2025, 10(1): 238.

[30] Ju R B, Tian S Y, Shang Y L, *et al*. Hepatocyte-like cells and liver organoids: The application of iPSCs and their derivants for treating liver diseases [J]. *Mater Adv*, 2024, 5(21): 8419-8431.

[31] Štefková K, Procházková J, Pacherník J. Alkaline phosphatase in stem cells [J]. *Stem Cells Int*, 2015, 2015: 628368.

[32] Yan M Z, Huo Y Z, Yin S T, *et al*. Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions [J]. *Redox Biol*, 2018, 17: 274-283.

[33] Woreta T A, Alqahtani S A. Evaluation of abnormal liver tests [J]. *Med Clin N Am*, 2014, 98(1): 1-16.

[34] 冯婷婷, 陈娟, 叶英, 等. 人骨髓间充质干细胞分化为临床用肝样细胞的实验研究 [J]. 徐州医学院学报, 2015, 35(3): 166-170.

[35] 刘洪良, 刘晓智, 刘振林, 等. ts-SV40LT抗原转基因干细胞增殖活性的温度调控机制分析 [J]. 天津医药, 2012, 40(3): 247-250.

[36] Chiang C H, Chang C C, Huang H C, *et al*. Investigation of hepatoprotective activity of induced pluripotent stem cells in the mouse model of liver injury [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011: 219060.

[37] Yang B, Luo Q L, Wang N, *et al*. HPF modulates the differentiation of BMSCs into HLCs and promotes the recovery of acute liver injury in mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6): 5686.

[38] Radzisheuskaya A, Silva J C. Do all roads lead to Oct4? The emerging concepts of induced pluripotency [J]. *Trends Cell Biol*, 2014, 24(5): 275-284.

[责任编辑 李亚楠]