

【综述】

人类多能干细胞用于中药毒性和疗效评价的研究进展

袁鑫[#], 吴玉新, 于婷婷[#], 李钰鑫, 张章, 滕菲, 李森*

北京中医药大学 生命科学学院, 北京 100029

摘要: 中药毒性和疗效评价是评价中药药物安全性评估的重要项目。人类多能干细胞(hPSCs)在疾病建模、药物筛选、分子机制研究以及安全性评价等方面是有力的研究工具。虽然hPSCs作为体外先进研究材料,应用广泛,但在中医药相关领域的研究积累却十分有限。通过调研hPSCs及其分化衍生物在中医药领域的相关应用,讨论hPSCs在中医药领域最大限度利用的可能性以及阻碍,同时展望hPSCs的应用前景,以期hPSCs在中药毒性和疗效评价领域的相关应用提供一定的理论参考,推进中医药安全性的现代化发展。

关键词: 中药; 人类多能干细胞; 毒性评价; 药物筛选; 分子机制; 疗效评价

中图分类号: R287.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2023)03-0671-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.03.028

Research progress of human pluripotent stem cells in toxicity and efficacy evaluation of traditional Chinese medicine

YUAN Xin, WU Yuxin, YU Tingting, LI Yuxin, ZHANG Zhang, TENG Fei, LI Sen

School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: The evaluation of toxicity and efficacy of traditional Chinese medicine (TCM) plays an important part in evaluating the safety of TCM. Human pluripotent stem cells (hPSCs) are a powerful research tool in disease modeling, drug screening, molecular mechanism research and safety evaluation. As one of the advanced experimental materials, hPSCs are limitedly used in the field of TCM research. This review discusses the possibility and obstacles of the utilization of hPSCs in the field of TCM by investigating the relevant applications of hPSCs and their derivatives in the research field of TCM, and looks forward to the application prospect of hPSCs, in order to provide certain theoretical reference for the field of toxicity and efficacy evaluation of TCM, and promote the modern development of the safety of TCM.

Key words: traditional Chinese medicine; human pluripotent stem cells; toxicity assessment; drug screening; molecular mechanism; therapeutic evaluation

人类多能干细胞(hPSCs)包括人胚胎干细胞(hESCs)和人诱导多能干细胞(hiPSCs),可以利用自己的体细胞进行重新编程,使其回到具有多功能细胞的状态。hPSCs可以结合目前的基因编辑技术进行靶向基因组修饰,在疾病建模、药物筛选以及安全性评价方面是强大而有力的研究工具^[1-2],因此,可被用于构建正常和特定疾病的细胞模型。

在中医药领域,现阶段基于hPSCs的研究积累十分有限,现有研究中基于hPSCs的中药疗效评价和临床试验评价方法也多采用西药相关的评价体系^[3-4],作为最接近人体的研究材料,应用于中医药的研究还处于初级阶段。而且实验室细胞水平研究多使用非人类的细胞或人类癌细胞,前者具有一定的种间差异性^[5-6],且由于复制性衰老^[7-9]无法传代培养

收稿日期: 2022-10-31

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81973698);国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81703942)

*共同第一作者: 袁鑫,研究方向为利用生物学技术研究中药活性及机制。E-mail: yuanxin54321@126.com

于婷婷,中西医结合药理学专业,中药药理研究。E-mail: ytt20200931187@163.com

*通信作者: 李森,博士,副教授,研究方向为中药药理研究。E-mail: senli@bucm.edu.cn

而需要不断的供应;后者虽然容易获得和培养,但由于是异常细胞不能反映正常的生理过程^[10]。近年来随着诱导多能干细胞技术趋于成熟,hPSCs已逐渐成为中医药研究领域的新选择,并应用于中药毒性评价、药效评价以及机制研究中^[11-12]。因此本文通过系统综述近年来hPSCs应用的不同研究,阐释中药毒性评价、药效评价的研究进展,结合本课题组相应的研究关于在人源细胞中检测不同中药的效果^[13-15],从而进一步探讨在hPSCs中药临床前研究应用的安全性与有效性。

1 hPSCs用于中药的毒性评价

药物毒性评价是临床试验前必须考量的重要指标,在中药的临床安全规范应用中扮演着重要的角色,对中药新药的研发至关重要。一般传统的药物的毒性评价,首先需要通过动物实验,然后再开始开展临床试验^[16]。然而由于种间差异的存在,在人体临床试验完成之前,仅通过动物实验就想更为全面地获取中药对人体的一些副作用是存在一定困难的,这将需要消耗大量的人力、物力与时间,需要付出昂贵的代价。因此,在中药毒性评价发展领域引入hPSCs分化细胞进行体外药物研究显得极其重要:一方面hPSCs更接近人体的遗传以及生理特性,能更为准确地评价新药候选药物的毒性,提高准确性;另一方面,hPSCs的引入能减少药物开发所需要的时间以及成本。

1.1 心脏毒性

目前国际上将hPSCs分化成心肌细胞(hiPSC-CMs)已有较成熟的技术,基于此技术并结合实时无标记细胞分析、高内涵成像、微电极阵列、膜片钳等实验手段,检测hiPSC-CMs的电生理指标、收缩功能、钙信号及其他相关的生物标志物,这些综合应用于中药领域,也将加快中药体外心脏毒性高通量筛选评价方法的发展。

Baburin等^[17]研究表明在hiPSC-CMs中,吴茱萸的甲醇提取物、去氢吴茱萸碱和荷蒂芸香胺呈剂量相关地延长动作电位持续时间(APD),并且 $3\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的去氢吴茱萸碱和荷蒂芸香胺会诱导早期去极化(EADs),去氢吴茱萸碱在慢性房室传导阻滞的犬中观察到有致心律失常的风险。

Yu等^[18]研究采用实时细胞分析(RTCA)心脏系统,可用于实时监测心肌细胞的收缩,并结合药物对钙信号的影响,利用hiPSC-CMs建立药物心脏毒性的评价方法。测试结果表明莲心碱和甲基莲心碱对人诱导多能干细胞衍生心肌细胞的抑制作用

也呈浓度相关,且都能引起钙稳态的破坏,均具有潜在的肝脏毒性。此外,莲心碱和甲基莲心碱对人诱导多能干细胞衍生心肌细胞的半数抑制浓度(IC_{50})分别为 3.69 、 $1.29\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。提示人诱导多能干细胞衍生心肌细胞对莲心碱和甲基莲心碱的敏感性高于新生大鼠心肌细胞。

Wang等^[19]研究采用心脏无标记细胞功能分析和培养系统(Cardio-NLCS)记录hiPSC-CMs的阻抗和细胞外场电位(EFP),并通过各类指标综合评价药物对hiPSC-CMs的影响,包括24 h心肌细胞活力的测试、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)和心肌钙蛋白I(CTn-I)的水平、抗氧化活性、活性氧(ROS)和丙二醛(MDA)的产生以及细胞内钙稳态的影响。结果表明苦参碱、氧化苦参碱、金雀花碱和槐果碱这4种生物碱均具有明显剂量相关、并且伴随心肌功能改变的结构性的肝脏毒性。

1.2 肝毒性

药物性肝损伤(DILI)是导致新药临床晚期和上市后停药的原因之一。药物代谢和毒性研究的金标准是人原代肝细胞^[20],但人原代细胞具有生命周期短、变异性复杂、成本高等局限性。人多能干细胞来源的肝细胞样细胞(iPSC-HLCs)在药物开发早期有望预测药物性肝损伤的发生情况。事实上已有许多研究小组与金标准进行了对比,报道了hPSC来源的肝细胞用于肝毒性试验的可能性^[21-23]。

胡秋燕等^[24]研究发现雷公藤冻干粉(1 、 2 、 4 、 $8\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)作用24 h后会诱导人类iPS-HLCs的MDA浓度明显升高,谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)活性明显降低,细胞通透性指标谷氨酸氨基转移酶(AST)、天冬氨酸氨基转移酶(ALT)活性升高,引起DILI。该结果与对人正常肝细胞作用结果一致,可用作中药肝毒性筛选的细胞模型。

2 hPSCs用于中药药效评价和机制研究

hPSCs被广泛用于建立人类疾病的模型,用于筛选新的药物制剂以及机制研究。在首次报道体细胞重编程^[25]后不到5年时间,已经为43种疾病建立了63个hiPSCs模型,包括心脏、平滑肌、骨骼肌、免疫系统、皮肤、中枢神经系统等多器官多系统疾病,与此同时,可以预计的是,可用的hiPSCs线路数量在未来几年内将呈指数增长^[2]。

此外,基于hPSCs通过药理学方法进行数据量化,可以从一系列健康和具有遗传疾病背景的细胞系中测量其功能反应。中药制剂对某些难治性疾

病有显著疗效,但其成分复杂,在大多数研究中其治疗作用的分子机制没有得到充分阐述,因此,鉴定制剂中有效活性成分及相关作用的分子机制是必不可少的。

2.1 心血管系统

研究中 hiPSC-CMs 在药物筛选中应用最多。HiPSC-CMs 中的许多关键离子通道(钾 I_{Ks} 、 I_{Kr} 、 I_T 、 I_{to} 、 I_{K1} , 钠 I_{Na} , 钙 I_{Ca-L} ; SERCA2a)和调节分子(毒蕈碱受体、肾上腺素能受体、乙酰胆碱受体、兰尼碱受体)的功能已被证明存在于细胞膜或肌质网中,相比较表达单个离子通道的中国仓鼠卵巢细胞(CHO)细胞更具有优势。

Zhang 等^[26]分析益心舒胶囊肠吸收液中化合物成分,并采用生物信息学方法建立化合物-靶点-功能网络,以 $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内皮素-1(ET-1)诱导 hiPSC-CMs 作为心肌功能障碍的细胞模型,在以波生坦为阳性对照时发现,五味子苷 A 和五味子苷 B 能改善 ET-1 引起的收缩功能障碍、同时抑制脑利钠肽(BNP)含量升高和 hiPSC-CMs 的形态学改变,证实了五味子苷 A 和五味子苷 B 是益心舒胶囊的活性成分,对内皮素诱导的 hiPSC-CMs 功能障碍具有保护作用,并揭示了它们的有效靶点和途径。

Zhang 等^[27]利用 ET-1 刺激人诱导多能干细胞衍生心肌细胞获得体外心衰模型,评估丹红注射液对心衰的治疗作用。采用 RTCA 系统、高内涵分析(HCA)技术、钙信号高通量筛选(HTS)等技术,结合实验数据发现丹红注射液可调节心肌收缩力、抑制心肌细胞面积增大和下调 ET-1 诱导的 BNP、肌动蛋白 $\alpha 2$ (ACTN2)和心肌肌钙蛋白 T(TNNT2)的表达。内皮素 B 受体(ETBR)和血管紧张素 II 1 型受体(AT1R)可能是丹红注射液治疗心肌肥大的直接靶标。应用膜片钳技术在参松养心^[28]存在下记录 hiPSC-CMs 离子电流,结果表明参松养心通过加速钙通道的失活以及延长失活后的恢复时间,且可明显降低钙电流,并与在体家兔相关基因表达改变结果相互佐证。

2.2 神经系统

人类神经系统相关疾病可以利用 hPSCs 进行建模^[29]。Tao 等^[30]在探讨丹酚酸 B 保护 iPSC 来源的神经干细胞免受 H_2O_2 诱导损伤的潜在机制中发现,在 H_2O_2 处理下,丹酚酸 B 显著提高了 iPSC 来源的神经干细胞的活力和线粒体膜电位的稳定性,也明显降低了细胞凋亡率。此外,丹酚酸 B 能显著降低 H_2O_2 诱导的 iPSC 来源的神经干细胞中基质金属蛋

白酶-2(MMP2)和金属蛋白酶-9(MMP9),磷酸化信号传导子及转录激活子 3(p-STAT3)的表达,以及提高基质金属蛋白酶组织抑制剂-2(TIMP)的表达水平。这些结果表明,丹酚酸 B 对 H_2O_2 诱导的 iPSC 来源的神经干细胞氧化应激损伤具有保护作用。这种耐受机制可能与调节 MMP/TIMP 系统和抑制 STAT3 信号通路有关。

Tao 等^[31]另 1 项研究表明丹参能促进诱导多能干细胞向神经干细胞分化,并对植入的神经细胞有保护作用。同时,丹参中化合物丹酚酸 B 具有促进诱导多能干细胞向神经干细胞分化,进而向神经元分化的作用,研究发现丹酚酸 B 显著提高了 iPSC 来源的神经干细胞和神经元的增殖,而磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)抑制剂 LY294002 能减弱丹酚酸 B 所诱导的磷脂酰肌醇 3-激酶/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶/糖元合成酶激酶 $3\beta/\beta$ -连环蛋白(PI3K/AKT/GSK3 β /catenin)通路上调,表明丹酚酸 B 是通过上调该通路表达从而增强 iPSCs 的神经分化^[32]。

2.3 肝脏

HESC^[33]和 hiPSC^[34]均可分化出具有正常代谢功能的干细胞,中药扶正化瘀不仅可以促进 hESC 来源的肝细胞的分化、成熟和肝细胞增殖,这种促进作用可能是通过激活典型 Wnt 基因和胞外信号调控激酶(ERK)通路介导的,以及通过抑制 Notch 基因通路抑制胆管细胞的形成。此外,该药还可以通过降低上皮细胞向间充质细胞转化来抑制间充质细胞的形成,提示扶正化瘀促进肝细胞分化和成熟的另外的可能机制是通过抑制间充质细胞的形成。同时该研究的体外实验结果似乎证实了在啮齿动物和人类体内的发现。该研究结果解释了中药扶正化瘀恢复肝功能和抑制肝纤维化的可能机制^[35]。

3 hPSC 的应用现状及待解决问题

3.1 hPSC 的应用现状

目前 hPSC 技术可以为大多数人类疾病建立模型^[36-39],这些 hPSC 可用于药物毒性评价、药物治疗反应和分子靶点研究等,为研究人类疾病提供有前途的药物筛选和体外疾病模型(包括基于 hPSC 的人类遗传疾病模型)^[2]。此外,一些细胞库,如英国 Wellcome Trust/Sanger Institute 倡导下的人类诱导多能干细胞计划(HipSci),使得许多 hiPSC 相关的系列基因组学和流式细胞分析数据公开可用^[40]。

hPSC 目前在中医药的应用并不广泛,仅在少数疾病上有所应用。目前研究主要集中于以下 2 个方面:(1)在中药毒性评价方面,如心脏毒性评价方面

该技术应用相对较多,也应用于肝毒性评价,但文献浏览量不高,说明研究相对较少;(2)在疾病中药治疗的研究方面,其在心血管疾病方面应用较多,主要包括心力衰竭、心肌肥大等,而对肝脏、神经系统评价应用相对较少。目前国际上已有神经系统^[41]、肾脏^[42]等方面应用,但中医药在神经系统方面所涉及疾病类型却很少。

在中医药领域,hPSC有望被广泛应用于大多数疾病的研究。随着技术的不断成熟,结合基因编辑技术进行靶向的基因组修饰,可使hPSCs造模更接近于人体自然状态下的生理环境,也可以获得更接近并反映人体结构、功能的生理反应。目前在hPSC中hiPSC-CMs的应用最为成熟,已经进行的主要包括长期培养(2D培养)、三维组织工程(3D培养)、机械负荷、电刺激、基底刚度调节和神经激素因子处理等技术研究^[43],这些研究同时可以结合其他研究手段,如高通量筛选、基因组学、蛋白质组学、网络药理学、生物信息学等,这些技术可以同时为基于hiPSC-CMs的中药研究提供客观数据支持。

3.2 hPSC应用待解决的问题

虽然hPSC在技术上已经取得了一定的成功,但是该技术在人类的应用还需进一步完善,其安全性问题也有待进一步被解决。(1)hPSCs虽然包括hESC和hiPSCs 2种,但hESC可能之前涉及诸多的伦理道德问题^[44],虽然现在已经取得很大进展,也有被应用于临床的案例^[45],但并非涉及的所有问题都得到普遍的认可与支持^[46],人类从中获益与风险也尚不了解。HiPSCs虽然有很大的突破,但目前多处于实验室的科研阶段,现有的研究也仅基于动物体得到细胞、组织和器官,并未能培育出完全由hiPSCs发育而来的完整的活体哺乳动物,所以hiPSCs距离应用于人类的疾病治疗,服务于人类还有很长一段路要走。(2)hiPSCs虽然也具备一定的全能性,但是对其全能性大部分人抱有怀疑态度,即使能通过体外技术手段像胚胎干细胞一样具有完全的分化能力,但机体发育是一个复杂且精密的过程,其所获取的器官组织以及培育的动物体具备的机能反应能否如正常生物体一样精确也是需要进一步考量与验证的。(3)最为重要的一点,虽然目前已有用于研究目的的人类胚胎干细胞系的相应组织和指南^[47],也有为临床应用的倡议^[48],但关于hPSCs诱导技术所应用的中药领域研究目前尚无统一的技术标准和行为准则,而且中国对于hPSCs用于中药研究仍处于初步探索阶段,在研究各个阶段

所需要的参考评价的关键时间点、关键评价指标以及研究评价方法并不完全相同,且存在一定的差异性。除此之外,中医证候本身的多样性与人类本身基因多态性之间的复杂关系^[49]也为hPSCs体外培养带来一定的技术难度,所以未来仍需要大量的研究与论证。

4 结语

现阶段基于hPSCs研究中药毒性和疗效评价,虽然处在初级阶段,存在一定的局限性,但现阶段的研究探索却可以为未来的研究者提供一定的理论参考。而且目前每个中医药科研工作者都在不断的挖掘,致力于突破,以求推进中医药的安全性和现代化的发展。现阶段中医药的数据库(如TCMSP、TCMGeneDIT等)的搭建与完善为中医药的发展提供有力支撑,而hPSCs技术的日臻完善则为建立患者与某些特异性疾病提供了有效途径。

此外,与hPSCs有关的先进技术手段在未来中药毒性和疗效评价以及中药新药的开发领域中发挥桥梁作用。hPSCs技术将在中医药领域开启全新的应用,前景广阔,但由于中药具有多组分、多靶点等特点,因此在hPSCs应用于中医药的研究过程中要充分考虑中药本身特点,建立和选择与之相适应的模型系统,在发挥中医药辨证论治思想的同时推动中药安全性的进一步发展。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Apáti Á, Varga N, Berecz T, et al. Application of human pluripotent stem cells and pluripotent stem cell-derived cellular models for assessing drug toxicity [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2019, 15(1): 61-75.
- [2] Rajamohan D, Matsa E, Kalra S, et al. Current status of drug screening and disease modelling in human pluripotent stem cells [J]. Bioessays, 2013, 35(3): 281-298.
- [3] 赵丹,任现志.中医药疗效评价方法的现状与思考[J].中华中医药学刊,2011,29(3): 623-624.
Zhao D, Ren X Z. The status quo of TCM effect evaluation method and thinking [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2011, 29(3): 623-624.
- [4] 任现志,汪受传.中医药疗效评价方法研究现状与思考[J].中华中医药学刊,2007,25(2): 266-267.
Ren X Z, Wang S C. The present research and thinking on curative effect evaluation method of Chinese medicine [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2007, 25(2): 266-267.
- [5] 陈欣欣,刘珠媛,顾寰宇,等.人类胚胎干细胞来源的心

- 肌细胞模型的建立及系统鉴定方案 [J]. 上海大学学报: 自然科学版, 2017, 23(3): 378-386.
- Chen X X, Liu Z Y, Gu H Y, et al. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes model establishment and systemic identification scheme [J]. J Shanghai Univ Nat Sci Ed, 2017, 23(3): 378-386.
- [6] 赵增明, 何俊, 束玉磊, 等. 基于人多能干细胞(hPSCs)的药物毒性测试 [A]// 2014线粒体毒性与基于毒性通路的安全性评价新策略学术研讨会暨中国毒理学会毒理学替代法与转化毒理专业委员会成立大会 [C]. 北京: 中国毒理学会, 2014: 58-59.
- Zhao Z M, He J, Shu Y L, et al. Drug toxicity testing based on human pluripotent stem cells (HPSCs) [A]// 2014 Workshop on Mitochondrial Toxicity and Pathway-Based Chemical Safety Assessment An Inaugural Symposium of the Society of Toxicological Alternatives and Translational Toxicology [C]. Beijing, Chinese Society of Toxicology, 2014, 58-59.
- [7] Hayflick L. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains [J]. Exp Cell Res, 1965, 37: 614-636.
- [8] Hayflick L, Moorhead P S. The serial cultivation of human diploid cell strains [J]. Exp Cell Res, 1961, 25: 585-621.
- [9] Shay J W, Wright W E. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase [J]. Carcinogenesis, 2005, 26(5): 867-874.
- [10] Martínez-Reyes I, Chandel N S. Cancer metabolism: Looking forward [J]. Nat Rev Cancer, 2021, 21(10): 669-680.
- [11] 黄永霞, 陈超群, Zheng M, 等. 用人类诱导多能干细胞来源的心肌细胞快速检测中药毒性的方法 [J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(23): 2768-2770.
- Huang Y X, Chen C Q, Zheng M, et al. Method for rapidly detecting the toxicity of traditional Chinese medicine by using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2018, 34(23): 2768-2770.
- [12] 陈晓南, 朱彦. HiPSC-CM在中药早期心脏毒性筛选和上市后安全性再评价中的应用展望 [J]. 天津中医药, 2017, 34(2): 76-81.
- Chen X N, Zhu Y. Application potentials of hiPSC-derived cardiomyocytes in preclinical cardiotoxicity screening and post-marketing safety reevaluation of Chinese medicine [J]. Tianjin J Tradit Chin Med, 2017, 34 (2): 76-81.
- [13] Yu T, Li Y, Yan M, et al. Mechanism of Danhong Injection in the treatment of arrhythmia based on network pharmacology, molecular docking, and *in vitro* experiments [J]. Biomed Res Int, 2022, 2022: 4336870.
- [14] Li Y, Zhang Z, Hao X, et al. Qiliqiangxin Capsule modulates calcium transients and calcium sparks in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. Evid Based Compl Altern Med, 2022, 2022: 9361077.
- [15] 张章, 于婷婷, 李森. 参麦注射液对人诱导多能干细胞衍生心肌细胞钙信号的影响 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(12): 2458-2463.
- Zhang Z, Yu T T, Li S. Effects of Shenmai Injection on calcium signaling in HiPSC-CM [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(12): 2458-2463.
- [16] Kumar D, Baligar P, Srivastav R, et al. Stem Cell based preclinical drug development and toxicity prediction [J]. Curr Pharm Des, 2021, 27(19): 2237-2251.
- [17] Baburin I, Varkevisser R, Schramm A, et al. Dehydroevodiamine and hortiamine, alkaloids from the traditional Chinese herbal drug Evodia rutaecarpa, are IKr blockers with proarrhythmic effects *in vitro* and *in vivo* [J]. Pharmacol Res, 2018, 131: 150-163.
- [18] Yu Y, Sun S, Wang S, et al. Liensinine-and neferine-induced cardiotoxicity in primary neonatal rat cardiomyocytes and human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(2): 186.
- [19] Wang R, Wang M, Wang S, et al. An integrated characterization of contractile, electrophysiological, and structural cardiotoxicity of *Sophora tonkinensis* Gapnep. in human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. Stem Cell Res Therapy, 2019, 10(1): 20.
- [20] LeCluyse E L. Human hepatocyte culture systems for the *in vitro* evaluation of cytochrome P450 expression and regulation [J]. Eur J Pharma Sci, 2001, 13(4): 343-368.
- [21] Takayama K, Morisaki Y, Kuno S, et al. Prediction of interindividual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocytes [J]. Proceed Nation Acad Sci USA, 2014, 111(47): 16772-16777.
- [22] Holmgren G, Sjögren A K, Barragan I, et al. Long-term chronic toxicity testing using human pluripotent stem cell-derived hepatocytes [J]. Drug Metab Dispos, 2014, 42(9): 1401-1406.
- [23] Kim J H, Wang M, Lee J, et al. Prediction of hepatotoxicity for drugs using human pluripotent stem cell-derived hepatocytes [J]. Cell Biol Toxicol, 2018, 34 (1): 51-64.
- [24] 胡秋艳, 谭庆龙, 徐雯星, 等. 通过hiPS细胞诱导生成类肝细胞建立肝毒性检测模型及其初步评价 [J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(1): 91-96.
- Hu Q Y, Tan Q L, Xu W X, et al. Establishment and preliminary evaluation of hepatotoxicity testing model generated by hiPS cells-derived hepatocytes [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2018, 29(1): 91-96.
- [25] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors [J]. Cell, 2007, 131(5): 861-872.
- [26] Zhang M, Wu H, Guo F, et al. Identification of active

- components in Yixinshu Capsule with protective effects against myocardial dysfunction on human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes by an integrative approach [J]. *Mol Biosyst*, 2017, 13(8): 1469-1480.
- [27] Zhang M Y, Guo F F, WU H W, et al. DanHong injection targets endothelin receptor type B and angiotensin II receptor type 1 in protection against cardiac hypertrophy [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(61): 103393-103409.
- [28] Liu Z, Huang J, Hu R, et al. Gene expression profile of increased heart rate in shensongyangxin-treated bradycardia rabbits [J]. *Evid-Based Compl Altern Med CAM*, 2014, 2014: 715937.
- [29] Hibaoui Y, Feki A. Human pluripotent stem cells: Applications and challenges in neurological diseases [J]. *Front Physiol*, 2012, 3: 267.
- [30] Shu T, Pang M, Rong L, et al. Protective effects and mechanisms of salvianolic acid B against H₂O₂-induced injury in induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells [J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(6): 1133-1143.
- [31] Shu T, Pang M, Rong L, et al. Effects of *Salvia miltiorrhiza* on neural differentiation of induced pluripotent stem cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153(1): 233-241.
- [32] Shu T, Liu C, Pang M, et al. Salvianolic acid B promotes neural differentiation of induced pluripotent stem cells via PI3K/AKT/GSK3 β /beta-catenin pathway [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 671: 154-160.
- [33] Duan Y, Ma X, Zou W, et al. Differentiation and characterization of metabolically functioning hepatocytes from human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2010, 28(4): 674-686.
- [34] Ma X, Duan Y, Tschudy-Seney B, et al. Highly efficient differentiation of functional hepatocytes from human induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2013, 2(6): 409-419.
- [35] Chen J, Gao W, Zhou P, et al. Enhancement of hepatocyte differentiation from human embryonic stem cells by Chinese medicine Fuzhenghuayu [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 18841.
- [36] Xu D, Alipio Z, Fink L M, et al. Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(3): 808-813.
- [37] Morizane R, Lam A Q, freedman B S, et al. Nephron organoids derived from human pluripotent stem cells model kidney development and injury [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(11): 1193-1200.
- [38] Protze S I, Lee J H, Keller G M. Human pluripotent stem cell-derived cardiovascular cells: From developmental biology to therapeutic applications [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 25(3): 311-327.
- [39] Shi Y, Kirwan P, Livesey F J. Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks [J]. *Nat Protoc*, 2012, 7(10): 1836-1846.
- [40] Sala L, Bellin M, Mummery C L. Integrating cardiomyocytes from human pluripotent stem cells in safety pharmacology: Has the time come? [J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(21): 3749-3765.
- [41] Jongkamonwiwat N, Noisa P. Biomedical and clinical promises of human pluripotent stem cells for neurological disorders [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 656531.
- [42] Tian P, Lennon R. The myriad possibility of kidney organoids [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2019, 28(3): 211-218.
- [43] Yang X, Pabon L, Murry C E. Engineering adolescence: Maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. *Circ Res*, 2014, 114(3): 511-523.
- [44] Johnson M H. Human ES cells and a blastocyst from one embryo: Exciting science but conflicting ethics? [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(2): 103-104.
- [45] Schwartz S D, Hubschman J P, Heilwell G, et al. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: A preliminary report [J]. *Lancet*, 2012, 379(9817): 713-720.
- [46] Hovatta O, Stojkovic M, Nogueira M, et al. European scientific, ethical, and legal issues on human stem cell research and regenerative medicine [J]. *Stem Cells*, 2010, 28(6): 1005-1007.
- [47] International Stem Cell Banking Initiative. Consensus guidance for banking and supply of human embryonic stem cell lines for research purposes [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2009, 5(4): 301-314.
- [48] Andrews P W, Baker D, Benvenisty N, et al. Points to consider in the development of seed stocks of pluripotent stem cells for clinical applications: International stem cell banking initiative (ISCBi) [J]. *Regen Med*, 2015, 10(2 Suppl): 1-44.
- [49] 于婷婷, 李钰鑫, 阎美卉, 等. 单核苷酸多态性与中医证候相关性研究进展 [J]. *世界科学技术: 中医药现代化*, 2022, 24(3): 1264-1271.
- Yu T T, Li Y X, Yan M H, et al. Research progress on the association between single nucleotide polymorphisms and TCM syndromes [J]. *World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med*, 2022, 24(3): 1264-1271.

[责任编辑 李红珠]