

肝胆类器官在中药研究中的应用进展

丁明宁, 薛晓勇, 李晓骄阳*

北京中医药大学生命科学院, 北京 100029

摘要: 类器官作为一种新型体外研究系统, 可高度模拟体内组织、器官的功能结构和遗传特征等生物学特性。目前, 肠道、视网膜、脑、肾、胰腺和肺等健康组织的类器官模型已逐渐建立。近年来, 肝胆类器官也成为相关领域的研究热点。相较于传统的原代肝细胞、人源肝细胞系和动物模型, 肝胆类器官能在维持一定遗传稳定性的前提下, 在体外长期增殖并具备成熟的肝胆系统功能, 具有开发为临床前药物肝脏效毒评价平台的潜力。就近年来肝胆类器官建立的来源途径、分化方法优化、分化效果评价, 以及利用肝胆类器官平台对中药药效/毒效的评估展开论述, 以期建立一种可准确、高效反映药物作用机制的模型, 并用于大规模药物筛选、疾病机制研究及个体化精准医疗, 为新药开发、药物评价及临床用药等提供新的策略方案。

关键词: 肝胆类器官; 干细胞; 中药; 药效评价; 药物筛选

中图分类号: R28

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)18-5789-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.18.034

Advances in study of hepatobiliary organoids and their application in traditional Chinese medicine research

DING Ming-ning, XUE Xiao-yong, LI Xiao-jiaoyang

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

Abstract: Organoids are *in vitro* cell models with specific organ functions and genetic characteristics, which are induced and differentiated from stem cells. Recently, the organoids obtained from healthy tissues such as the gut, retina, brain, kidney, pancreas and lung have gradually been established. In the meanwhile, hepatobiliary organoids have become a research hotspot in related fields. Compared with primary hepatocytes, human liver cell lines and animal models, hepatobiliary organoids are able to maintain genetic stability, achieve long-term proliferation and possess the characteristics of a mature hepatobiliary system *in vitro*, which gives them the potential to be developed as a model for liver efficacy/toxicity evaluation of pre-clinical drugs. In this review, we summarize the source of hepatobiliary organoids, the optimization of differentiation methods and the evaluation of differentiation effects, comprehensively introduce the pharmacological and toxic research of hepatobiliary organoids-based traditional Chinese medicine to establish an accurate and efficient model reflecting the mechanism of drug action. Further hepatobiliary organoids research will contribute to the investigation of the pathogenesis of diseases and the development of large-scale drug screening and individualized precision medicine, providing new strategies for novel drug development, drug evaluation and therapeutic medication with an alluring prospect in the clinical application.

Key words: hepatobiliary organoid; stem cell; traditional Chinese medicine; drug evaluation; drug screening

类器官是一类由干细胞诱导培养生成, 可高度模拟体内组织和器官生物学特性的体外研究平台, 可应用于不同组织和器官生理、病理及药物作用过程的研究。目前有研究发现, 通过对多能干细胞(pluripotent stem cell, PSC), 包括胚胎干细胞

(embryonic stem cell, ESC) 和诱导多能干细胞(human-induced pluripotent stem cell, iPSC), 以及部分特定来源的成体干细胞进行诱导^[1-2], 可形成具有特定组织功能的类器官。这些类器官在维持组织器官的功能和修复其损伤等方面具有巨大的应用

收稿日期: 2021-01-25

基金项目: 北京市科技新星课题(Z191100001119088); 北京市双一流课题(1000041510168)

作者简介: 丁明宁, 硕士研究生, 研究方向为中药治疗非酒精性脂肪肝及类器官评价平台构建。

*通信作者: 李晓骄阳, 教授, 博士生导师。E-mail: xiaojiaoyang.li@bucm.edu.cn

潜力。相较于传统研究中广泛使用的永生细胞系和原代细胞,类器官不仅具有细胞系增殖能力强的特点,而且其表型类似于从体内分离而来的不可增殖的原代细胞。同时,研究人员从健康人或病人身上获取体细胞,通过不同的诱导分化方法,将其进一步培养分化成为特定的类器官,以更好地模拟器官的生物学功能。目前,已有肠道^[3]、视网膜^[4]、脑^[5]、肾^[6]、胰腺^[7]和肺^[8]等健康组织,甚至包括一些肿瘤组织^[9]的类器官被建立,这为基础研究、新药筛选及药物开发提供了更多体外研究平台以供选择。

肝脏作为人体众多生理过程中的重要枢纽,在营养素以及外源性物质(如药物)的代谢,胆汁酸、脂质和胆固醇稳态的维持,生长信号通路的内分泌调控,造血系统和免疫系统功能的支持等生理活动中意义重大^[10]。肝脏由肝实质细胞(如肝细胞)以及多种非实质细胞(如胆管细胞、肝星状细胞、肝脏巨噬细胞等)组成。过去的研究多基于细胞系进行肝细胞体外研究,如可长期扩增的肝癌 HepG2 细胞,但其结果和体内试验不能完全一致;部分正常人肝细胞系(如 L02 细胞等)已不推荐使用;原代肝细胞相对肝脏细胞系,可较好反映体内肝细胞的实际功能,但其易凋亡且无法增殖,难以实现长期培养。虽然在 3D 胶原培养介质上培养原代肝细胞可在一定程度上延长其体外培养时间,但以上细胞模型仅涉及单一肝细胞,而忽视了肝脏中其他非实质细胞所发挥的重要功能,如胆管细胞等。在肝脏病生理及药理学的体外研究中,不同于肝原代细胞模型,干细胞可通过多种途径被诱导,在传代后仍保持染色体稳定的前提下,分化为细胞形态完整、功能完善的肝细胞或胆管细胞,并逐步形成肝胆类器官来模拟肝组织功能,解决了用原代肝细胞长时间培养费用较高,人肝组织难以获取等问题。

目前,药物筛选和后续药物体内评价的实验周期长、成本高,不利于药物开发的快速推进。因此,类器官作为一种可以有效评价药物药理毒理作用的体外细胞模型,受到了研究学者的广泛关注。近年来有研究学者发现,中药单体可在多种类器官模型上进行药物评价,Chen 等^[11]构建了小肠类器官,发现甘草次酸可通过提高人抗原 R (human antigen R, HuR) 以及下游增殖细胞核抗原 Ki67 (proliferation-associated nuclear antigen Ki67) 的水平促进小肠类器官的发育,维持肠上皮细胞稳态,利于药物吸收。Li 等^[12]构建了非小细胞性肺癌患者来源的肺癌类

器官,发现小檗碱对人肺癌类器官敏感,白屈菜红碱、甜菜碱、斑蝥素对人肺癌类器官有抗癌活性。由此可见,类器官体外模型作为一种中药药物筛选及毒性评价平台,具有很高的应用价值。中医认为,肝乃将军之官,具有生发,喜条达,恶抑郁,体阴而用阳的功能特点;主筋而藏血,其华在爪,开窍于目,主疏泄,并与胆相表里^[13-14]。中药药效的发挥离不开肝脏正常的生理功能,同时作为中药主要的代谢器官,药物的效毒作用也可影响肝脏的生理状态。因此,应用类器官模型作为药物筛选及临床前评价平台来考察药物对肝脏的保护及毒性作用意义重大。肝胆类器官模型作为一种肝脏系统的综合评价体系,在评价中药效毒作用方面具有天然的优势,该模型不仅可以模拟生理状态下肝脏中多细胞间的相互作用,还可以通过现代细胞生物学技术,准确、高效地反映药物的作用机制,为新药开发、药物评价及临床用药等提供新的策略方案。

1 不同来源肝或肝胆类器官的分化过程

干细胞分化形成肝或肝胆类器官通常需要以下 4 个步骤:内胚层细胞的诱导、内胚层向类肝细胞分化、类肝细胞的扩增和成熟。先由干细胞诱导生成定型内胚层细胞(definitive endoderm, DE),然后对 DE 进一步的诱导,使细胞分化发育为肝母/肝祖细胞,肝母/祖细胞可进一步增殖分化为成熟的类肝细胞或类胆管细胞,最后形成肝胆类器官体系。用于肝胆类器官分化研究的干细胞主要有 ESC、iPSC 以及成体干细胞,而不同来源的干细胞诱导分化的过程略有差异。

ESC 可进行自我复制并能无限增殖,不同的研究人员利用这一特性对 ESC 进行诱导分化,得到了肝类器官和具有双分化潜能的肝胆类器官。Cai 等^[15]通过在培养基中加入激活素 a (activin A, Act A),诱导 ESC 形成 DE,随后加入含有成纤维细胞生长因子 4 (fibroblast growth factor 4, Fgf4) 和骨形成蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, Bmp2) 的培养基,促进 DE 向肝细胞分化,最后给予肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, Hgf)、抑癌蛋白 M (oncostatin M, Osm) 和地塞米松 (dexamethasone, Dex) 等因子促进肝细胞的成熟。该细胞体外培养 10 d 后可表达人肝细胞的标志物白蛋白 (albumin, Alb)、甲胎蛋白 (alpha-fetoprotein, Afp)、角蛋白 8 (cytokeratin 8, CK8)、CK18 等,并且在移植到四氯化碳肝损伤的小鼠体内后,可表达人 α -抗胰蛋

白酶 2 周以上。此外,培养环境的变化也会影响肝胆类器官的分化过程。早期研究多采用平面培养,后来发现 3D 培养可以进一步完善类器官的功能并提高类器官的肝分化成熟度。Ogawa 等^[16]发现通过 3D 培养和激活环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)通路可以促进 ESC 诱导形成的肝母细胞向类肝细胞转化,且 cAMP 在分化早期通过内胚层的激活素节点对肝母细胞进行调节。Rashidi 等^[17]发现采用 2D 培养诱导 ESC 得到的类肝组织类似于胚胎肝细胞,其肝脏特异性基因表达不稳定,实际应用价值较差。在应用 3D 培养技术后,得到了稳定表达肝脏特异性基因的 3D 肝类器官,该类器官不仅可以在体外稳定培养,还能促进肝部分切除小鼠的肝功能恢复。相比 2D 培养,3D 培养得到的类器官更加成熟且功能稳定。Wang 等^[18]通过 Act A 和 MMTV 整合位点家族成员 3A(wingless-type MMTV integration site family, member 3A, Wnt3A)诱导 ESC 分化生成 DE 后,加入含 Bmp4 和 Fgf4 的培养基,在 2D 培养的条件下限制诱导分化为肝细胞谱系的细胞,并表达肝祖细胞的多个标志物。另外,该研究团队首次发现,这种肝胆类器官不仅具有双分化潜能,其中的单细胞还能重构形成新的具有双分化潜能的肝胆类器官。

iPSC 是由体细胞通过细胞融合^[19]、核移植^[20]、多潜能因子表达^[21]进行重编程而成,类似于 ESC 的干细胞^[22]。Zhao 等^[23]从成人包皮提取出成纤维细胞用以诱导 iPSC 细胞,以碱性磷酸酶染色阳性和质粒转染的绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)表达阳性为标准,鉴定由成纤维细胞重编程形成的 iPSC 细胞成功分化。一般来说, iPSC 可诱导分化为高纯度的 DE,并产生由多能干细胞衍生的单层肝细胞。Song 等^[22]将含有八聚体结合转录因子 4(octamer-binding transcription factor-4, Oct-4)、性别决定区 Y 框蛋白 2(sex-determining region Y-box 2, Sox2)、Kruppel 样因子 4(kruppel-like factor 4, Klf4)和未分化胚胎细胞转录因子 1(undifferentiated embryonic cell transcription factor-1, Utl1)的质粒转染到成人包皮提取出来的成纤维细胞中^[23],进行体细胞重编程并建立 iPSC 细胞系。随后他们首次在 iPSC 细胞分化的不同阶段:内胚层诱导(Act A)、肝分化(Fgf4、Bmp2)、肝母细胞增殖[Hgf、角质细胞生长因子

(keratinocyte growth factor, Kgf)]与肝成熟(Osm、Dex、N2B27)加入相应的诱导剂,诱导 iPSC 分化生成肝样细胞。但以上方法分化得到的肝样细胞类型单一,难以模拟肝脏中细胞和组织间复杂的信号通路。Vyas 等^[24]通过胚胎肝祖细胞和肝细胞外基质共培养得到了具有胆管样结构的肝细胞,提出了多细胞共培养分化肝胆类器官的研究方向。近年来也有研究采用了内胚层细胞、上皮细胞和间叶细胞祖细胞共同培养的方式,得到了功能更为完善的肝芽样结构^[25]。Gieseck 等^[26]还发现通过 3D 培养和高通量筛选的方式,可提高 iPSC 所诱导的肝细胞的成熟度。通过对患者的体细胞进行重编程形成 iPSC,利用 CRISPR/Cas9 系统进行基因编辑并移植到患者体内后,可用于遗传性疾病的治疗,同时避免了伦理学争议和排异反应的发生^[27]。Wu 等^[28]在最近的一项研究中,首次在不使用其他基因或外源性细胞的情况下,仅用含有 25%的 mTeSR 的肝分化培养基对内胚层细胞和小部分中胚层细胞共同诱导的方式,将 iPSC 诱导形成具有肝胆功能的类器官,且这种分化方式可推迟早期肝细胞分化,而在激活 Notch2 和转化生长因子- β (transforming growth factor- β , Tgf- β)信号通路后,可促进 iPSC 向胆管细胞分化的过程。

此外,还有直接来源于肝胆细胞的类器官。Sato 等^[29]发现提取自小肠隐窝的亮氨酸重复序列 G 蛋白偶联受体 5⁺(leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5⁺, Lgr5⁺)的肝干细胞可在体外诱导形成肠绒毛样上皮所有类型的细胞,形成具有层级结构的 Lgr5⁺肠上皮类器官。随后发现 Lgr5⁺胆管来源的具有祖细胞潜能的肝干细胞不仅能在体内外分化形成功能性肝细胞,还能在体外形成上皮类器官^[30]。

2 不同来源肝或肝胆类器官的分化评价

在肝胆类器官诱导形成的过程中,可在转录水平、细胞水平及功能水平上,通过检测特异性基因的表达、细胞形态及功能、移植后再生能力等方面对肝胆类器官的分化效率进行评价。

无论是 ESC、iPSC 或肝胆细胞来源的肝或肝胆类器官,在进入肝分化诱导阶段后,对类器官形态和功能的评价指标相类似。在分化的早期阶段,通过定型内胚层特异性蛋白叉头框蛋白 A2(forkhead box protein A2, FOXA2)和 Sox17 确定干细胞是否成功分化为 DE;在肝分化诱导阶段,可检测肝细胞核受体 4a(hepatocyte nuclear factor 4a, Hnf4a)、

T-框转录因子 3 (T-box transcription factor 3, TBX3)、CCAAT/增强子结合蛋白 α (CCAAT enhancer binding protein alpha, CEBPA)、CEBPB、Sox9、CK19 和钙调蛋白 (calmodulin, CAM) 等基因的表达, 来确定肝细胞是否分化; 在肝成熟和扩增阶段, 通过检测组成型雄甾烷受体 (constitutive androstane receptor, CAR)、法尼酯 X 受体 (farnesoid X receptor, FXR)、孕甾烷 X 受体 (pregnane and xenobiotic receptor, PXR)、细胞色素 P450 家族 2 亚家族 C 成员 9 (cytochrome P450 family 2 subfamily C member 9, CYP2C9)、CYP3A4、CYP1A2、CYP2E1 等特异性基因的表达, 来判断细胞是否被诱导分化为成熟肝细胞。此外, 原代肝细胞作为成熟肝细胞, 其表达的多种药物代谢标志物 (CYP3A4、CYP1A2、CYP2E1、CYP2A6、CYP2C8、CYP2C9 和 CYP2D6), 常用以评估诱导分化所得的类器官模型是否诱导为成熟的肝细胞。肝胆类器官具有双分化潜能, 可分化成肝细胞和胆管细胞^[31], 在检测肝细胞特异性基因表达的基础上, 通过检测胆管细胞标志物如上皮黏附因子 (epithelial cell adhesion molecule, EPCAM)、囊性纤维化跨膜传导调节蛋白 (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)、谷氨酰胺转移酶 (glutamine transferase, GGT)、水通道蛋白 (aquaporin-2, AQP)、 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶 (alpha1-antitrypsin, AAT)、CK8、CK18 和 CK19、转运蛋白如顶膜钠依赖性胆盐转运体 (apical sodium-dependent bile acid transporter, ASBT)、脂肪酸结合蛋白 6 (fatty acid binding protein 6, FABP6) 和多药耐药相关蛋白 (multidrug resistance-associated protein, MRP3) 和胆管细胞相关转录因子如 SOX9、发状分裂相关增强子 1 (hairly enhancer of split 1, HES1)、Hnf6 和 Hnf 1b 的表达水平来确定肝胆类器官中胆管细胞的功能水平和分化程度。在 2D 培养条件下, Wang 等^[18]在肝分化诱导阶段使用了肝特异性培养基对 DE 进行诱导, 通过鉴定肝干/母细胞的特异性的基因表达 (Hnf 4a、CK19、EPCAM、SOX9、Afp), 确定类器官成功进行类肝分化。为了确定类器官的分化阶段及并建立基因表达谱, 从而建立类器官发育阶段的评价体系, 研究人员对 ESCs 来源的肝系细胞、肝母细胞、成人肝细胞诱导形成的类器官和人源胚胎干细胞诱导的肝类器官 (human embryonic stem cell-derived expandable hepatic organoids, hEHO) 进行聚类分析。

研究发现所得 hEHO 会上调转录因子和早期肝脏发育调节因子如 prospero 相关盒蛋白 1 (prospero homeobox 1, PROX1)、单切域家族 2 (One cut domain family member 2, ONECUT2)、SOX9、FGF 受体 4 (FGF receptor 4, FGFR4)、FOXA1 和 FOXA3; 上调 Wnt 信号通路的成分如 LGR5、锌指蛋白 3 (zinc and ring finger 3, ZNRF3)、环指蛋白 43 (ring finger protein 43, RNF43)、AXIN2、CD44、dickkopf Wnt 信号通路抑制剂 1 (dickkopf Wnt signaling pathway inhibitor 1, Dkk1)、Wnt7A 和 Wnt7B, 并且肝母细胞表达标志物 (SOX9、EPCAM、CK19、Hnf4a、TBX3 和 Afp) 呈阳性, 其多能标志物有 OCT4 和 SOX2 则阴性表达。所以, 根据该基因表达谱认为 hEHO 的 1~3 代的表型类似于新生阶段的肝细胞: ESCs 来源的肝系细胞和肝母细胞, 具有肝干/母细胞的分化潜力, 而 hEHO 移植进免疫缺陷的老鼠的附睾后, 能分化形成肝系的肝母细胞、成熟肝细胞和早期的胆管上皮细胞, 且不会产生畸胎瘤。

在诱导形成类器官的过程中, 还可以通过观察细胞形态来评估类器官的分化效率。iPSC 呈圆形克隆团块生长, 团块内细胞形状大小不一致^[32]。在分化诱导后, 会形成肝细胞样粒状上皮细胞和扁平细胞透明细胞, 再分化形成胆管细胞和肝细胞^[33]。肝胆类器官中可观察到具有多边形轮廓、细胞质空泡以及圆形细胞核的肝细胞, 和空心囊状或空心管样结构的胆管细胞。肝脏具有分泌和排泄胆汁, 合成糖原、白蛋白及尿素等物质, 参与药物代谢等重要功能, 是维持人体正常生理循环和代谢的关键器官。因此, 多数研究通过检测白蛋白、尿素等的生成含量来评价肝胆类器官的功能。此外, 还可通过考察吲哚青绿染色来评价肝细胞的代谢能力, 检测 CDFDA 染料 (被转运蛋白 MRP2 水解成 CDF 后产生荧光) 产生的荧光强度来评价肝特异性转运蛋白的功能, 基于 PAS 染色评价肝糖原的储存能力等评价肝胆类器官功能。近年来, 也有学者^[15]在肝类器官培养的上清液中加入 HIV-HCV 假型病毒, 通过检测荧光素酶含量确认肝类器官对丙肝病毒的易感性, 用于考察肝类器官的功能。

肝胆类器官形成后可将其移植到小鼠体内来评价其是否具备成熟肝胆细胞的功能。有研究表明, ESC 细胞生成的类器官移植入免疫缺陷的 Fah^{-/-}/Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-}小鼠体后, 可以分化形成的成熟肝细胞来填充肝实质, 在移植到免疫缺陷小鼠的

附睾后上没有产生畸形瘤。若在该类器官中加入人胚胎肝间充质细胞,形成的衍生模型可用于模拟酒精性肝病,并在乙醇处理后可出现氧化应激、单纯脂肪变性、炎症介质释放和肝纤维化等酒精性肝病相关的生理病理变化^[18]。Rashidi 等^[17]将 3D 培养得到 ESC 源的肝类器官移植到 C57BL/6J 小鼠,以及免疫缺陷的 Rag2^{-/-}IL2rg^{-/-}小鼠体内后,发现接受移植的小鼠在手术 2 周后恢复到初始体重质量,同时检测到人白蛋白的分泌,天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)以及其他肝损伤标志物表达的下降,证明了该类器官具有成熟的肝组织功能。同时,该学者还采用具有良好耐受性和血管化的 PCL 电纺支架进行研究,通过给小鼠皮下注射含肝类器官的支架,发现小鼠肝损伤有所减轻。Takebe 等^[34]将 3D 培养下 iPSC 诱导的肝芽移植到先天免疫缺陷的小鼠体内后,通过活体成像检测到血流灌注功能的恢复以及其他肝功能逐渐完善。研究人员将 Lgr5⁺的胆管细胞分化形成的肝胆类器官移植到四氯化碳急性损伤的小鼠体内,通过人特异性抗体检测到人源 CK19⁺的胆管样细胞群和 Alb⁺/CK19⁻肝细胞群^[30]。

3 基于肝胆类器官评价体系研究中药的肝脏保护或损伤作用

随着中药在世界范围内的广泛使用和深入研究,中药肝保护及肝损伤作用受到广泛的关注。类器官作为一种由人干细胞诱导分化而来的体外模型,可模拟人体器官发育的完整生物信息,还可用于研究疾病发生发展等病理过程,适用于中药药效学和毒理学评价、临床前药物筛选和早期毒性评估等。目前,关于中医药对肝胆类器官的作用机制研究主要集中于中药单体和多种天然药物。

3.1 中药在肝胆类器官体系中保肝作用的研究

基于中药多成分、多靶点的作用特点,从分子水平上精准阐释中药复方多组分间药效机制,有助于推动中医药现代化和国际化发展。相关研究表明,保肝类中药具有提高类器官活性及增殖能力等方面的潜力。目前,针对中药促进肝胆类器官分化或成熟的研究较少。考虑到胆固醇在肝脏胆汁酸合成中发挥的重要作用,有研究创新性地筛选了多种中药活性成分,并与胆固醇按一定比例组合(即胆固醇+专利中药复方 MIX)。结果显示,不加胆固醇+中药 MIX 的肝胆类器官在分化 25 d 时会出现明显的细胞死亡,其余的肝细胞则发生形态改变或

者凋亡。而加入胆固醇+中药 MIX 后,类器官的成熟肝细胞及胆管细胞标志物表达增加,其培养时间延长。同时发现,经中药复合物处理后的肝胆类器官具有更好的药物代谢能力、糖原储存能力和 Alb 分泌能力,在体内移植 4 周到 8 周后,胆固醇+中药 MIX 处理的肝胆类器官可以在体内存活更长时间,并形成肝、胆细胞^[28]。这一项研究提出了中药复方及活性成分对肝胆类器官的保护作用和潜在机制,为以后其他中药药物保肝研究指出了全新方向。

3.2 中药在肝胆类器官体系中毒性作用的研究

药物肝毒性是药物开发过程中药物安全性的重要评价指标,而肝胆类器官培养不仅是一种新型的细胞培养技术,更具有成为临床前药物肝毒性评价模型的潜力。李朋彦等^[33]采用 3D 培养技术培养具有干性潜能的 HepaRG 细胞株,并诱导生成肝实质细胞和胆管细胞,同时基于此种培养模型体系进行胺碘酮、环孢霉素的肝毒性评价。由于对中药的不良反应的忽略和不合理的超剂量滥用,中药已经成为我国药物性肝损伤的首要原因^[35-36]。随着对中药药物作用机制研究的深入,如何合理评价中药肝毒性成为亟需解决的科研问题,阐释中药肝毒机制有助于提高中药临床用药的安全性和合理性。目前,国内已有肝损伤案例报道的中药有雷公藤、何首乌、吴茱萸、千里光、柴胡等^[37-38],同时,常用的中药肝毒性评价模型有原代肝细胞、动物模型、类器官等。人肝原代细胞常用于药物肝毒性评价,但其无法增殖、存活时间短并且获取及培养成本较高;而动物模型由于种属差异,不能完全模拟中药在人体内的效毒作用,同时有研究表明动物对药物毒性有更高的耐受性,影响了临床前药物评估实验的准确度^[39]。人源干细胞诱导分化的肝胆类器官可大量增殖并实现体外长时间培养,且生物学特性类似于肝原代细胞,同时评价效率高,适用于急、慢性药物的药理及毒理评价。

肝胆类器官可用于中药成分低浓度、长时间暴露所产生的肝毒性评价和机制研究。Kang 等^[40]利用胚胎干细胞 QIA7 和诱导多能干细胞 WA01 诱导的肝细胞评价乙酰氨基酚和黄曲霉素 B2 的肝毒性。通过多参数比较发现,给予对乙酰氨基酚和黄曲霉素 B2 后,诱导多能干细胞形成的肝细胞和肝原代细胞,在线粒体膜电位、钙内流和氧化应激的表型变化相似。李婷婷等^[41]发现何首乌的主要活性成分为反式二苯乙烯苷(trans-SG),其体内造成肝损伤

的主要物质为顺式二苯乙烯苷 (*cis*-SG), 采用液滴重叠法对具有干性的 HepG2 和 L02 细胞系进行 3D 培养得到肝类器官, 在此肝类器官体系下验证了 *cis*-SG 的肝损伤作用显著高于 *trans*-SG, 同时发现 3D 培养肝类器官模型在重复给药后, 对药物毒性敏感性增加, 符合中药肝损伤的特点。胡秋艳^[32]采用 iPSC 诱导的肝类器官作为评价药物肝毒性的模型, 发现该模型可以很好评价雷公藤的肝毒性作用: 雷公藤冻干粉的剂量与肝细胞损伤标志物谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、AST 及肝细胞膜损伤标志物丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 的活性均具有一定正相关性, 同时, 也与抗氧化还原酶谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 的活性具有一定的负相关性, 以上雷公藤冻干粉的结果在 L02 细胞中得到验证, 说明了 iPSC 诱导的肝类器官具有评价中药肝毒性的潜能。Kim 等^[42]基于流式细胞分析技术, 发现采用 2 个 hESC 细胞系 BG01 和 SNUhES4 诱导形成肝胆类器官 98% 为肝细胞 (Alb⁺、HNF4a⁺) 和 2% 为胆管细胞 (EpCAM⁺、CK7⁺)。随后通过细胞增殖能力检测和生理功能分析 [PAS 糖原染色、吲哚菁绿 (indocyanine green, ICG) 摄取能力、低密度脂蛋白摄取能力] 等方面对此肝类器官进行评价, 结果发现其各项生理功能均与原代肝细胞类似。在类器官模型建立后, 给予参照药物曲格列酮和二甲双胍, 其细胞存活率变化趋势类似于原代肝细胞。随后采用肝胆类器官、人源原代肝细胞以及 HepG2 细胞 3 个体外评价平台对白术苷、大黄素、黄独乙素和没食子酸的肝细胞毒性进行评估。结果显示, 3 个体外评价系统均显示黄独乙素不具有肝细胞毒性; 显示白术苷对 HepG2 细胞具细胞毒性, 而对肝原代细胞和肝类器官模型则不具有细胞毒性; 显示大黄素和没食子酸仅对 HepG2 细胞有细胞毒性。以上研究证明了肝胆类器官对药物毒性的评价效果类似于肝原代细胞且优于 HepG2 细胞, 更适用于临床前药物筛选和药物评价。

4 结语

由于肝胆类器官可高度模拟体内组织、器官的功能结构和遗传特征等生物学特性, 在中医药领域具有良好的研究前景。目前研究表明, 3D 培养技术^[16]的应用或特殊内源性小分子物质^[28]的加入, 可能会促进肝胆类器官的成熟分化; 通过对多胚层、不同来源的类器官或类器官与其他细胞进行共培养, 如

共培养干细胞诱导而成的不同胚层的细胞^[29], 共培养心肝肾 3 种来源的类器官^[43], 共培养 iPSC 诱导形成的肝星状细胞和 HepaRG 细胞^[44-45], 可提高类器官的诱导效率, 并用于研究多细胞间交流及疾病机制。复方中药、单味中药与中药单体相比, 在肝毒性机制研究上更为复杂, 需根据临床实际用药的情况, 基于中药复方进行药效毒性的精准评价。而肝胆类器官体外培养平台与大规模筛选系统的联用, 有望成为一种高精度、高灵敏度的中药体外筛选平台和肝毒性评价平台。随着相关技术的发展和体内外研究的不断完善, 肝胆类器官将为相关肝胆疾病的临床治疗提供有利条件。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sonntag K C, Song B, Lee N, *et al.* Pluripotent stem cell-based therapy for Parkinson's disease: Current status and future prospects [J]. *Prog Neurobiol*, 2018, 168: 1-20.
- [2] Drost J, Clevers H. Organoids in cancer research [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(7): 407-418.
- [3] Serra D, Mayr U, Boni A, *et al.* Self-organization and symmetry breaking in intestinal organoid development [J]. *Nature*, 2019, 569(7754): 66-72.
- [4] Achberger K, Probst C, Haderspeck J, *et al.* Merging organoid and organ-on-a-chip technology to generate complex multi-layer tissue models in a human retina-on-a-chip platform [J]. *Elife*, 2019, 8: e46188.
- [5] Kanton S, Boyle M J, He Z S, *et al.* Organoid single-cell genomic atlas uncovers human-specific features of brain development [J]. *Nature*, 2019, 574(7778): 418-422.
- [6] Wu H J, Uchimura K, Donnelly E L, *et al.* Comparative analysis and refinement of human PSC-derived kidney organoid differentiation with single-cell transcriptomics [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(6): 869-881.e8.
- [7] Broutier L, Andersson-Rolf A, Hindley C J, *et al.* Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation [J]. *Nat Protoc*, 2016, 11(9): 1724-1743.
- [8] Tan Q, Choi K M, Sicard D, *et al.* Human airway organoid engineering as a step toward lung regeneration and disease modeling [J]. *Biomaterials*, 2017, 113: 118-132.
- [9] Neal J T, Li X N, Zhu J J, *et al.* Organoid modeling of the tumor immune microenvironment [J]. *Cell*, 2018, 175(7): 1972-1988.
- [10] Trefts E, Gannon M, Wasserman D H. The liver [J]. *Curr Biol*, 2017, 27(21): R1147-R1151.
- [11] Chen G, Bei B, Feng Y, *et al.* Glycyrrhetic acid maintains intestinal homeostasis via HuR [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 535.
- [12] Li Y F, Gao Y, Liang B W, *et al.* Patient-derived organoids of non-small cells lung cancer and their

- application for drug screening [J]. *Neoplasma*, 2020, 67(2): 430-437.
- [13] 唐·王冰. 重广补注黄帝内经素问 [M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2011: 77.
- [14] 王宇, 袁继丽, 赵长青, 等. 从肝脏储备功能与有效血流量探讨乙肝肝硬化中医证型特点 [J]. 世界中医药, 2020, 15(19): 2868-2872.
- [15] Cai J, Zhao Y, Liu Y X, *et al.* Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells [J]. *Hepatology*, 2007, 45(5): 1229-1239.
- [16] Ogawa S, Surapisitchat J, Virtanen C, *et al.* Three-dimensional culture and cAMP signaling promote the maturation of human pluripotent stem cell-derived hepatocytes [J]. *Development*, 2013, 140(15): 3285-3296.
- [17] Rashidi H, Luu N T, Alwahsh S M, *et al.* 3D human liver tissue from pluripotent stem cells displays stable phenotype *in vitro* and supports compromised liver function *in vivo* [J]. *Arch Toxicol*, 2018, 92(10): 3117-3129.
- [18] Wang S Y, Wang X, Tan Z L, *et al.* Human ESC-derived expandable hepatic organoids enable therapeutic liver repopulation and pathophysiological modeling of alcoholic liver injury [J]. *Cell Res*, 2019, 29(12): 1009-1026.
- [19] Blau H M, Chiu C P, Webster C. Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons [J]. *Cell*, 1983, 32(4): 1171-1180.
- [20] Chung Y G, Eum J H, Lee J E, *et al.* Human somatic cell nuclear transfer using adult cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(6): 777-780.
- [21] 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.
- [22] Song Z H, Cai J, Liu Y X, *et al.* Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells [J]. *Cell Res*, 2009, 19(11): 1233-1242.
- [23] Zhao Y, Yin X L, Qin H, *et al.* Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(5): 475-479.
- [24] Vyas D, Baptista P M, Brovold M, *et al.* Self-assembled liver organoids recapitulate hepatobiliary organogenesis *in vitro* [J]. *Hepatology*, 2018, 67(2): 750-761.
- [25] Lou Y R, Leung A W. Next generation organoids for biomedical research and applications [J]. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(1): 132-149.
- [26] Gieseck R L 3rd, Hannan N R, Bort R, *et al.* Maturation of induced pluripotent stem cell derived hepatocytes by 3D-culture [J]. *PLoS One*, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0086372.
- [27] Ben Jehuda R, Shemer Y, Binah O. Genome editing in induced pluripotent stem cells using CRISPR/Cas9 [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2018, 14(3): 323-336.
- [28] Wu F F, Wu D, Ren Y, *et al.* Generation of hepatobiliary organoids from human induced pluripotent stem cells [J]. *J Hepatol*, 2019, 70(6): 1145-1158.
- [29] Sato T, Vries R G, Snippert H J, *et al.* Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche [J]. *Nature*, 2009, 459(7244): 262-265.
- [30] Huch M, Gehart H, van Boxtel R, *et al.* Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver [J]. *Cell*, 2015, 160(1/2): 299-312.
- [31] Hu H L, Gehart H, Artegiani B, *et al.* Long-term expansion of functional mouse and human hepatocytes as 3D organoids [J]. *Cell*, 2018, 175(6): 1591-1606.
- [32] 胡秋艳. 人 iPSCs 诱导类肝细胞及其用于中药肝毒性评价的初步研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [33] 李朋彦, 李春雨, 陆小华, 等. 基于类器官 3D 培养和高内涵成像的药物肝毒性评价模型研究 [J]. 药学报, 2017, 52(7): 1055-1062.
- [34] Takebe T, Zhang R R, Koike H, *et al.* Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant [J]. *Nat Protoc*, 2014, 9(2): 396-409.
- [35] 张凯, 董晓敏, 王琦, 等. 常用中药肝毒性成分代谢与毒理研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(22): 5435-5447.
- [36] 宋培放, 潘秋莎, 杨凌. 药物性肝损伤生物标志物 [J]. 世界中医药, 2020, 15(23): 3553-3560.
- [37] 贾永堂, 马天翔, 石盘棋, 等. 中药引发肝损伤研究进展 [J]. 甘肃中医药大学学报, 2020, 37(2): 100-103.
- [38] 魏舒婷, 刘元乾, 黄坚, 等. 吴茱萸化学成分、药效及肝毒性的研究进展 [J]. 世界中医药, 2020, 15(23): 3580-3585.
- [39] Price P S, Keenan R E, Swartout J C. Characterizing interspecies uncertainty using data from studies of anti-neoplastic agents in animals and humans [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 233(1): 64-70.
- [40] Kang S J, Lee H M, Park Y I, *et al.* Chemically induced hepatotoxicity in human stem cell-induced hepatocytes compared with primary hepatocytes and HepG2 [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2016, 32(5): 403-417.
- [41] 李婷婷, 李瑞红, 刘振兴, 等. 基于类器官 3D 培养的何首乌易感物质肝毒性评价 [J]. 药学报, 2017, 52(7): 1048-1054.
- [42] 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.
- [43] Skardal A, Murphy S V, Devarasetty M, *et al.* Multi-tissue interactions in an integrated three-tissue organ-on-a-chip platform [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 8837.
- [44] Leite S B, Roosens T, El Taghdouini A, *et al.* Novel human hepatic organoid model enables testing of drug-induced liver fibrosis *in vitro* [J]. *Biomaterials*, 2016, 78: 1-10.
- [45] Coll M, Perea L, Boon R, *et al.* Generation of hepatic stellate cells from human pluripotent stem cells enables *in vitro* modeling of liver fibrosis [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(1): 101-113.

[责任编辑 王文倩]