

项目名称：人源肝系细胞体内功能评价动物模型及相关体系的建立与应用

申报奖项类别：科学技术奖

主要完成单位（含排序）：上海市东方医院(同济大学附属东方医院)、中国科学院分子细胞科学卓越创新中心

主要完成人（含排序）：何志颖、王欣、刘中民、刘长城、蔡永超、张文成、王喜城、鲁凤凤、李秀花、潘欣、杨羊

项目简介：

利用多能性干细胞如 ESCs/iPSCs 诱导分化为肝系细胞，利用谱系重编程将皮肤成纤维细胞转分化为肝系细胞，或从肝脏中分离培养成体肝干细胞再分化为肝系细胞，是获得非供体肝细胞来源的主要途径。开展肝细胞相关体外、体内功能的鉴定，是获得非供体来源肝系细胞后首要进行的生物学特性评价内容，建立理想的、稳定可行的人肝系细胞体内功能评价的动物模型具有十分重要的意义。

项目组将模拟肝衰竭的 $Fah^{-/-}$ 小鼠和 T、B 免疫细胞缺陷的 $Rag2^{-/-}$ 小鼠杂交获得 $Fah^{-/-}Rag2^{-/-}$ 小鼠模型；移植时提前停药诱导宿主肝细胞损伤形成容易接受移植细胞的微环境、注射 NK 细胞抗体去除 NK 细胞以及应用 FK506 加强抑制免疫反应并促进移植细胞增殖，从而建立了人肝系细胞体内功能评价的动物模型及诱导方案。同时，项目组采用小鼠存活状态、体重曲线、肝功能指标、人肝细胞特异功能蛋白表达及 HBV 感染能力等评价方案，建立了基于 $Fah^{-/-}Rag2^{-/-}$ 小鼠模型的人源肝系细胞体内功能评价方案。本项目还建立了人源化肝脏嵌合体小鼠的制备方案，人源化肝脏嵌合体小鼠将为药物代谢及病毒性肝炎防治研究提供理想的动物模型 (American Journal of Pathology 2010; 177(3): 1311-1319)。基于上述建立的模型及评价方案，项目组开展应用于包括 ESCs、谱系重编程、基因修饰等不同来源肝系细胞体内功能的研究、开展肝细胞移植和细胞移植活体示踪研究、开展干细胞肝向分化及肝细胞衰老研究等，研究成果发表在 Cell Stem Cell、Gastroenterology、Hepatology 等杂志。项目相关工作发表论文 18 篇，其中 SCI 论文 14 篇，影响因子 102.354，其中影响因子 5 分以上 11 篇，最高 22.151。申请专利 10 项，授权 6 项，PCT 专利 1 项。

利用该模型及建立的评价方案，项目组开展了系列科研合作和使用推广的工作，在评价非供体来源人肝系细胞体内功能方面取得了系列突出成绩，对推动人肝系细胞的产业化具有重要的支撑作用。典型应用成绩包括：国内外首次报道通过转染肝脏转录因子 FOXA3, HNF1A 和 HNF4A 可以将人成纤维细胞谱系重编程为具有体内外功能的肝细胞，获得的诱导型人肝细胞在生物医学研究和制药工业上具有极大应用价值 (Cell Stem Cell 2014; 14(3): 370-84. IF:

22.268), 以此为作为肝细胞来源构建了全新的人源性生物人工肝系统并已开展临床研究 (2017 中国十大医学进展)。发现通过转染肝脏转录因子 FOXA3, HNF1A 和 HNF4A 还能将人肝癌细胞诱导为肝细胞样细胞 (Cell Research 2019; 29(2):124-135. IF: 20.507)。发现以人 ES 细胞分化的肝祖细胞移植 Fah^{-/-}Rag2^{-/-}小鼠, 可作为 HCV 感染研究的理想模型 (Hepatology 2017; 66(3): 717-735. IF: 13.246)。发现经胆管化策略可将人原代肝细胞诱导为胆管样肝前体细胞, 诱导的人肝前体细胞可在体内外分化为成熟的肝细胞, 实现了肝细胞的规模化培养 (Cell Research 2019; 29(1): 8-22. IF: 20.507)。证明采用生物 3D 打印构建的含有 HepaRG 细胞的三维肝脏类器官具有治疗肝衰竭的功能 (Gut 2021; 70(3): 567-574. IF: 19.82)。

本项目曾获 2019 年第 31 届上海市优秀发明金奖; 2019 年作为浦东生物医药组唯一入选项目参加上海市“聚力新科技、奋进新时代”加快科创中心建设主题立功竞赛活动, 项目第一完成人荣获上海市五一劳动奖章; 2020 年该项目获上海医学科技奖二等奖。

代表性论文 (专著) 列表: (至少包含论文名称、刊名、年卷页码和作者)

1. He ZY, Zhang HB, Zhang X, Xie DF, Chen YX, Wangenstein KJ, Ekker SC, Firpo M, Liu CC, Xiang D, Zi XY, Hui LJ, Yang GS, Ding XY, Hu YP, Wang X. Liver Xeno-Repopulation with Human Hepatocytes in Fah^{-/-}Rag2^{-/-} Mice after Pharmacological Immunosuppression. *American Journal of Pathology*, 2010, 177(3): 1311-9.
2. Yu B[#], He ZY[#], You P, Han QW, Xiang D, Chen F, Wang MJ, Liu CC, Lin XW, Borjigin U, Zi XY, Li JX, Zhu HY, Li WL, Han CS, Wangenstein KJ, Shi YF, Hui LJ, Wang X, Hu YP. Reprogramming fibroblasts into bipotential hepatic stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell* 2013, 13(3):328-340.
3. Li FM, Liu PY, Liu CC, Xiang D, Deng L, Li WL, Wangenstein KJ, Song JG, Ma Y, Hui LJ, Wei LX, Li LS, Ding XY, Hu YP, He ZY*, Wang X*. Hepatoblast-like progenitor cells derived from embryonic stem cells can repopulate livers of mice. *Gastroenterology*, 2010, 139(6): 2158-2169. e8.
4. Wang MJ[#], Chen F[#], Li JX, Liu CC, ZhangHB, Xia Y, Yu B, You P, Xiang D, Lu L, Yao H, Borjigin U, Yang GS, Wangenstein KJ, He ZY*, Wang X*, Hu YP*. Reversal of hepatocytes senescence after continuous in vivo cell proliferation. *Hepatology* 2014, 60(1):349-61.
5. Lu FF[#], Pan X[#], Zhang WC[#], Su X, Gu YY, Qiu H, Shen SW, Liu CC, Liu W, Zhan ZZ, Liu ZM*, He ZY*. A Three-dimensional Imaging Method for the Quantification and Localization of Dynamic Cell Tracking Post-transplantation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2021; 9: 698795. doi: 10.3389/fcell.2021.698795.
6. Wang XC[#], Zhang WC[#], Yang Y, Wang JS, Qiu H, Liao LJ, Oikawa T, Wauthier E, Sethupathy P, Reid LM, Liu ZM*, He ZY*. A MicroRNA-Based Network Provides Potential Predictive Signatures and Reveals the Crucial Role of PI3K/AKT Signaling for Hepatic Lineage Maturation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2021, Front. Cell Dev. Biol. 9: 670059. doi: 10.3389/fcell.2021.670059.
7. Lu ZF^{#*}, Li XH[#], Xu YF, Chen MM, Chen W, Chen T, Tang QH*, He ZY*. microRNA-17

- functions as an oncogene by down-regulating Smad3 expression in hepatocellular carcinoma. *Cell Death & Disease* 2019; Sep 26; 10(10):723.
8. Wang C[#], Chen WJ[#], You P[#], Wu YF[#], Zheng SY, Liu CC, Xiang D, Wang MJ[#], Cai YC, Zhao QH, Borjigin U, Liu W, Xiong WJ, Wangenstein KJ, Wang X, Liu ZM*, He ZY*. The extent of liver injury determines hepatocyte fate toward senescence or cancer. *Cell Death & Disease* 2018; 9(5): 575, DOI 10.1038/s41419-018-0622-x.
 9. Wang MJ[#], Chen F[#], Liu QG[#], Liu CC, Yao H, Yu B, Zhang HB, Yan HX, Ye YB, Chen T, Wangenstein KJ, Wang X, Hu YP*, He ZY*. Insulin-like growth factor 2 is a key mitogen driving liver repopulation in mice. *Cell Death & Disease* 2018; 9(2): 26, DOI 10.1038/s41419-017-0186-1.
 10. Xiang D, Liu CC, Wang MJ, Li JX, Chen F, Yao H, Yu B, Lu L, Borjigin U, Zhong L, Wangenstein KJ, He ZY*, Wang X*, Hu YP*. Non-viral FoxM1 gene delivery to hepatocytes enhances liver repopulation. *Cell Death & Disease* 2014; 5(5): e1252. doi: 10.1038/cddis.2014.230.
 11. Liu P[#], Tango QH[#], Chen MM, Chen WJ, Lu YL, Liu ZM*, He ZY*. Hepatocellular senescence: immunosurveillance and future senescence-induced therapy in hepatocellular carcinoma. *Frontiers in Oncology* 2020 Nov 27; 10: 589908. doi: 10.3389/fonc.2020.589908.
 12. He ZY, Deng L, Li YF, Xiang D, Hu JK, Chen YX, Wang MJ, Chen F, Liu CC, Li WL, Zi XY, Wu X, Li GP, Wangenstein KJ, Hu YP, Wang X. Murine Embryonic Stem Cell-derived Hepatocytes Correct Metabolic Liver Disease after Serial Liver Repopulation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2012; 44(4): 648-58.
 13. Li FM[#], He ZY[#], Li YF, Liu PY, Chen F, Wang MJ, Zhu HY, Ding XY, Wangenstein KJ, Hu YP, Wang X. Combined Activin A/LiCl/Noggin treatment improves production of mouse embryonic stem cell-derived definitive endoderm cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2011, 112(4):1022-34.
 14. Su BL, Liu CC, Xiang D, Zhang HB, Yuan SM, Wang MJ, Chen F, Zhu HY, He ZY*, Wang X, Hu YP*. Xeno-liver repopulation of human hepatocyte in Fah^{-/-}Nod/Scid mice. *Sci China Life Sci*, 2011, 54(3):227-234.
 15. Li XH[#], Yang Y[#], Liu W, Chen WJ, Hu KY, Wang WY, Wang C, Wu YF, Liu ZM*, He ZY*. Nanomaterials in liver regeneration: the prospect for application. *Nano Life* 2018; 8(4): 1841005.
 16. Yang Y[#], Li XH[#], Liu W, Chen JW, Liu CC, Cai YC, Song YX, Tang QH, Zhang C*, He ZY*. Generation of hepatocyte-like cells by different strategies for liver regeneration. *Nano Life* 2018; 8(4): 1841004.
 17. 苏宝亮, 刘长城, 向导, 张海斌, 袁斯明, 王敏君, 陈费, 朱海英, 何志颖*, 王欣, 胡以平*. 人成体肝细胞在 Fah^{-/-}Nod/Scid 小鼠肝脏中的显著增殖。中国科学 C 辑: 生命科学, 2010; 40 (10): 929-937。
 18. 苏宝亮, 刘长城, 李帅, 杨科, 何志颖*, 胡以平, 王欣*. Fah 基因剔除小鼠在肝细胞移植中的应用及其病理学变化。中国药科大学学报, 2009, 40 (6): 553-558。

专著：

1. 何志颖，王欣。第五章：肝脏干细胞和肝脏再生。肝脏疾病的前沿研究，田志刚主编，中国协和医科大学出版社，2012.8 出版，ISBN 978-7-81136-719-5/R.719]

主要知识产权证明目录：

1. 王欣，何志颖。稳定表达细胞周期因子FoxM1的体系及其医药用途，专利号：ZL200810042946.9。
2. 胡以平，何志颖，于兵，攸璞。一种成纤维细胞转分化为肝干细胞的方法，专利号：ZL201110165078.5。
3. 王欣，丁小燕，李福明。一种定型内胚层细胞的制备和分离方法，ZL200810200483.4。
4. 王欣，李阳芳。一种白蛋白/角蛋白双表达小鼠胚胎干细胞系及其建立方法，专利号：ZL200810202862.7
5. 王欣，胡晓。转基因构建物及其在制备时空可调性肝脏损伤模型中的应用，专利号：ZL200810200207.8。
6. 王欣，徐晨欢，吕晓雯。一种利用单层培养技术制备和分离定型内胚层细胞的方法，专利号：ZL200810202412.8。
7. 胡以平，何志颖，于兵，攸璞。一种成纤维细胞转分化为肝干细胞的方法，PCT申请号：PCT/CN2012/000826；国际公开号：WO2012/171334。