

# 细胞间相互作用影响iPSc来源肝细胞的成熟

王 鼎<sup>1,2\*</sup> 郭丽媛<sup>1</sup> 李伟强<sup>2</sup>

<sup>1</sup>广州医科大学附属第三医院妇产科研究所实验部, 广东省生殖与遗传重点实验室, 广州 510150;

<sup>2</sup>中山大学干细胞与组织工程中心教育部重点实验室, 广州 510080)

**摘要** 获得功能性的肝细胞可用于研究肝细胞再生机理, 并可为细胞移植和药物筛选提供生物材料。该研究采用四步法诱导多能干细胞分化成肝细胞, 比较传代和不传代分化细胞的形态和肝细胞特异标志的差异表达。结果发现, 利用诱导多能干细胞分化可获得白蛋白(albumin, ALB)阳性的成熟肝细胞, 不传代法获得的细胞更接近于肝细胞形态, 两组均获得甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)和ALB阳性表达的细胞; GATA6(GATA binding protein 6)和HNF4A(hepatocyte nuclear factor 4 alpha)表达水平没有显著性差异, 但不传代法分化细胞的AFP和ALB表达量高于传代法, 存在显著性差异。结果提示, 细胞因子与细胞间、多细胞间相互作用等因素影响多能干细胞的分化, 细胞间相互作用有利于肝细胞定向诱导分化过程中肝细胞的成熟。

**关键词** 诱导多能干细胞; 诱导分化; 细胞连接; 肝细胞; 肝细胞成熟

## Cell Interaction Influences Maturation of Induced Pluripotent Stem Cell Derived Hepatocyte

Wang Ding<sup>1,2\*</sup>, Guo Liyuan<sup>1</sup>, Li Weiqiang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory for Major Obstetric Diseases of Guangdong Province, Experiment Department of Gynaecology and Obstetrics Institute, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, China;

<sup>2</sup>Key Laboratory for Stem Cells and Tissue Engineering, Ministry of Education, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract** Study of pluripotent stem cell hepatocyte committed differentiation would be helpful to understand the mechanism of liver regeneration and obtain the biomaterials for regeneration medicine and drug screening. We established four stage inductions and compared the cell morphology and hallmarks of each differentiation stage between passage and no-passage. By committed differentiation, we derived ALB (albumin) positive mature hepatocyte from iPSc (induced pluripotent stem cell). The phenotype of cells with no-passage was closer to mature hepatic cells. The two groups had AFP (alpha-fetoprotein) and ALB positive cells. There was no significant difference between the expression of GATA6 and HNF4A, but expression of AFP and ALB were significant higher in no-passage group than passage group. It concluded that pluripotent stem cell hepatocyte committed differentiation was one comprehensive process, which involving cytokine single, cell-to-cell and cell-to-matrix communication, keep the established cell interaction would benefit the hepatocyte mature.

**Keywords** induced pluripotent stem cell; committed differentiation; cell interaction; hepatocyte; hepatocyte mature

收稿日期: 2016-07-17 接受日期: 2016-10-11

高等学校博士学科点专项科研基金新教师类(批准号: 20134423120005)、广州市科技计划项目(批准号: 2014J4100024)和国家自然科学基金(批准号: 81401205)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 020-81292662, E-mail: largestone\_1984@163.com

Received: July 17, 2016 Accepted: October 11, 2016

This work was supported by the New Teacher Project of Education Ministry (Grant No.20134423120005), Scientific Research Project of Guangzhou Science and Information Bureau (Grant No.2014J4100024) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81401205)

\*Corresponding author. Tel: +86-20-81292662, E-mail: largestone\_1984@163.com

网络出版时间: 2016-11-17 11:36:46 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161117.1136.002.html>

多能干细胞可以自我更新并分化成各类成体细胞,常用的多能干细胞主要是废弃胚胎来源的胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES<sub>c</sub>)<sup>[1]</sup>和重编程成体细胞获得的诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSc)<sup>[2]</sup>。iPSc是通过过表达胚胎期的多能性标志,将已经分化的终末细胞重编程至多能状态获得的,因其不需要破坏胚胎,又具ES<sub>c</sub>相近的生物学特性,是近期医学和生物研究的热点。iPSc通过定向诱导分化,可以获得各类成熟的、有功能的细胞,这一方面是研究生物发育的忠实体外模型,另一方面为再生医学提供了优良的种子细胞。肝脏是重要的代谢脏器,肝细胞如何再生、肝细胞代谢功能障碍疾病的病理机制以及肝细胞移植治疗肝脏类疾病的种子细胞都可以通过研究诱导iPSc的肝细胞定向诱导分化解决。

早在2004年,就有对人多能干细胞进行肝分化的研究报道<sup>[3]</sup>。当时终末分化所得的白蛋白(albumin, ALB)阳性细胞仅为4%。随着技术的改进和对肝细胞分化过程中信号通路研究的日益透彻,诱导分化多能干细胞至成熟肝细胞的效率也日益提高,Duncan研究组<sup>[4-5]</sup>提出了四步法诱导多能干细胞分化获得成熟肝细胞的方案。该方案总结了各个提高分化效率的细胞因子的效果并进行优化,还提出每一步的分化结果的质控,有效地将肝细胞核因子4A(hepatocyte nuclear factor 4 alpha, HNF4A)和ALB阳性细胞获得率提高到了70%以上。我们按照Duncan的分化方案进行iPSc的肝细胞诱导分化,发现肝细胞核因子4A阳性率可以达到70%,但是ALB阳性细胞获得率仅为20%,而且历时20 d,在第三和第四阶段诱导分化时,因为细胞形成复层,很容易在换液时造成培养皿中的细胞整片飘起,最终引起分化失败。我们在第二和第三阶段分化结束时行细胞传代,探讨传代破坏细胞之间的连接是否对第三和第四阶段分化的结果产生影响,能否优化方案,促进多能干细胞向肝细胞的定向诱导分化。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

将iPSc接种在基质胶(matrigel)包被的细胞培养皿上,用经典多能干细胞无滋养层培养基培养<sup>[6]</sup>。细胞达70%汇合后,先用4型胶原酶消化,然后机械切割成小的细胞团块传代。

### 1.2 诱导iPSc肝分化

1.2.1 经典四步法诱导iPSc肝分化 从生长状态良好的iPSc中去除分化的细胞,用胰蛋白酶消化成单细胞,接种至基质胶包被好的细胞培养皿上,用Duncan的四步法<sup>[4-5]</sup>进行肝细胞定向诱导分化。第一阶段为内胚层诱导阶段,分为a诱导和b诱导,a诱导过程2 d,培养基为1640中添加2% B27、100 ng/mL Activin A、10 ng/mL BMP4(bone morphogenetic protein 4)和20 ng/mL FGF2(fibroblast growth factor 2)。b诱导过程2 d,培养基与a诱导所用相似,不再添加BMP4和FGF2。第二阶段为肝细胞定向诱导阶段,共5 d,培养基为1640中添加2%的B27、100 ng/mL Activin A、20 ng/mL BMP4和10 ng/mL FGF2。第三阶段为不成熟肝细胞诱导阶段,共5 d,培养基为1640中添加2% B27和20 ng/mL HGF。第四阶段为成熟肝细胞诱导阶段,培养基为商品化成熟肝细胞培养基(Invitrogen公司)加入20 ng/mL的抑瘤素M(oncostatin-M, OSM)。每阶段分化后收获细胞,免疫荧光检测蛋白质水平,RT-PCR检测mRNA水平。

1.2.2 消化传代破坏细胞连接 分别在第二阶段和第三阶段诱导结束,胰蛋白酶消化破坏细胞连接。再次接种至基质胶包被的细胞皿中,分别进行第三和第四阶段诱导。阶段诱导分化结束后收获细胞,免疫荧光检测蛋白质水平,RT-PCR检测mRNA水平,比较经典诱导成熟和消化传代处理细胞间的差异。

### 1.3 免疫荧光和RT-PCR检验分化指标

将未分化的iPSc接种至24孔板中,免疫荧光检测胚胎阶段特异性抗原4(stage-specific embryonic antigen 4, SSEA4)和肿瘤识别抗原-1-81(tumor recognition antigen-1-81, TRA-1-81)。免疫荧光检测分化蛋白质变化。在分化过程中,每一分化阶段结束时收获细胞,一部分固定于玻片上,进行免疫荧光染色(计数 $1 \times 10^5$ 细胞,使用cytospin离心机于1 500 r/min室温离心4 min,细胞贴附于玻片上,行固定、染色)。在第一阶段和第二阶段结束时,分别检测SOX17(sex determining region Y-box 17)和HNF4A的表达,通过SOX17和HNF4A的阳性率鉴定本次分化的效果,第二阶段结束时两者阳性率大于60%,AFP和ALB的表达为阴性,进行下阶段诱导分化。第三和第四阶段分化结束时,比较2种方法所得细胞AFP和ALB阳性细胞百分率的差异。RT-PCR检验分化过程中

特异指标mRNA变化。在每一阶段完成时,收获细胞提取mRNA,检测AFP(alpha-fetoprotein)、ALB、GATA结合蛋白6(GATA binding protein 6, GATA6)和HNF4A变化情况,以原代肝细胞为对照,统计2种方法所得细胞mRNA水平的差异。*AFP*引物-F: 5'-GCA GAG GAG ATG TGC TGG ATT G-3', *AFP*引物-R: 5'-CGT GGT CAG TTT GCA GCA TTC TG-3'; *ALB*引物-F: 5'-GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG C-3', *ALB*引物-R: 5'-CAC GAC AGA GTA ATC AGG ATG CC-3'; *GATA6*引物-F: 5'-GCC ACT ACC TGT GCA ACG CCT-3', *GATA6*引物-R: 5'-CAA TCC AAG CCG CCG TGA TGA A-3'; *HNF4A*引物-F: 5'-GGT GTC CAT ACG CAT CCT TGA C-3', *HNF4A*引物-R: 5'-AGC CGC TTG ATC TTC CCT GGA T-3'。

#### 1.4 数据统计

对于免疫荧光染色结果,每分化组随机计数3个视野中阳性细胞所占比率,用均值±标准差来表示最终结果,用均值进行卡方检验比较组间差异, $P<0.05$ 为存在显著性差异。对于RT-PCR结果, $t$ 检验比较组间差异, $P<0.05$ 为存在显著性差异。

## 2 结果

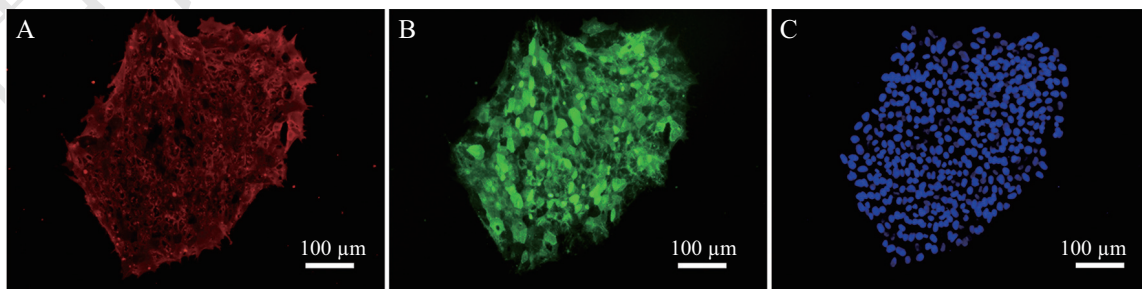
### 2.1 iPSc分化为肝细胞

iPSc在无滋养层的培养体系中,呈克隆样生长,克隆边界清晰,表达多能型特异标志SSEA4和TRA-1-81(图1)。经典的四步诱导法可以诱导iPSc肝细胞分化。终末分化细胞呈铺路石样,胞内含有大量囊泡样结构。免疫荧光结果显示,通过内胚层定向诱导分化(第一阶段)5 d后,80%以上细胞表达SOX17,少量细胞表达HNF4A。通过肝细胞定向诱导5 d后(第二阶段),细胞持续表达SOX17,70%以上细胞

表达HNF4A,这一阶段结束时细胞不表达AFP和ALB(图2)。经过不成熟肝细胞诱导分化5 d后(第三阶段),分化细胞开始表达AFP,但是不表达ALB(图3)。最后通过成熟肝细胞诱导5 d后(第四阶段),得到部分ALB免疫荧光染色阳性的肝细胞,但是分化细胞持续高表达AFP(图4)。RT-PCR结果显示,*AFP*在分化过程中被诱导表达,在第三阶段表达为顶峰,第四阶段表达降低。*ALB*在整个过程中呈现上升趋势,在第四阶段明显被诱导表达,但是表达量明显低于原代肝细胞。*GATA6*在第一和第二阶段诱导分化过程中被持续诱导表达,第三阶段开始下降。*HNF4A*被诱导表达,在第二阶段达到顶峰,第三和第四阶段表达量持续下降(图5)。

### 2.2 破坏细胞连接影响肝前体细胞分化至不成熟干细胞

肝细胞定向分化阶段(第二阶段)结束后,细胞呈现复层生长。一组应用经典法继续更换第三阶段培养基进行下一阶段诱导分化,完成下一阶段分化后,细胞继续保持复层生长,少量细胞开始呈现肝细胞样细胞形态(“铺路石”样,胞内可见囊泡)。另一组用胰蛋白酶破坏细胞连接,三分之一的细胞再次接种于基质胶包被的细胞皿上以减少细胞间相互作用,加入第三阶段培养基进行诱导分化,这一过程会出现部分细胞死亡、不贴壁,更换培养基时丢弃这部分细胞。分化完成后,细胞少量增殖,保持单层生长,但收获细胞数少于接种细胞数,也出现肝细胞结构样细胞(图3)。免疫荧光结果显示,经典法分化组和传代组中AFP阳性细胞分别为 $59.43\% \pm 14.87\%$ 和 $71.27\% \pm 9.12\%$ ,两者不存在显著性差异( $P>0.05$ )。经典法分化组可见少量ALB阳性细胞,传代组未发现ALB阳性细胞(图3)。RT-PCR

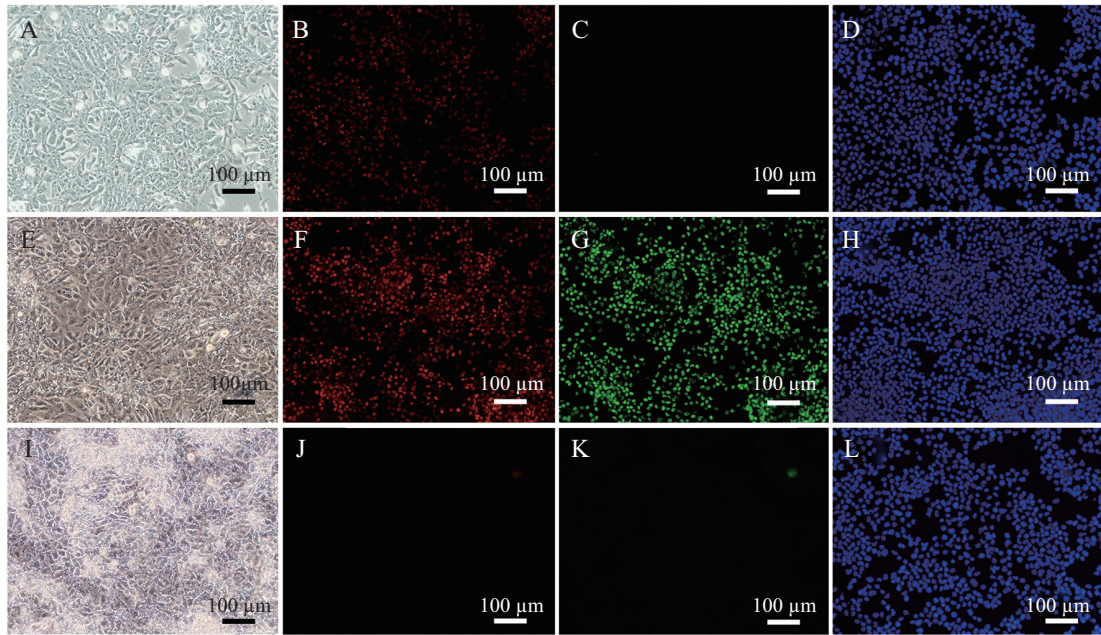


A: iPSc表达多能性相关指标SSEA4; B: iPSc表达多能性相关指标TRA-1-81; C: 细胞核染色。

A: iPSc expresses pluripotent associated markers SSEA4; B: iPSc expresses pluripotent associated markers TRA-1-81; C: cell nucleus staining.

图1 免疫荧光鉴定iPSc多能性指标

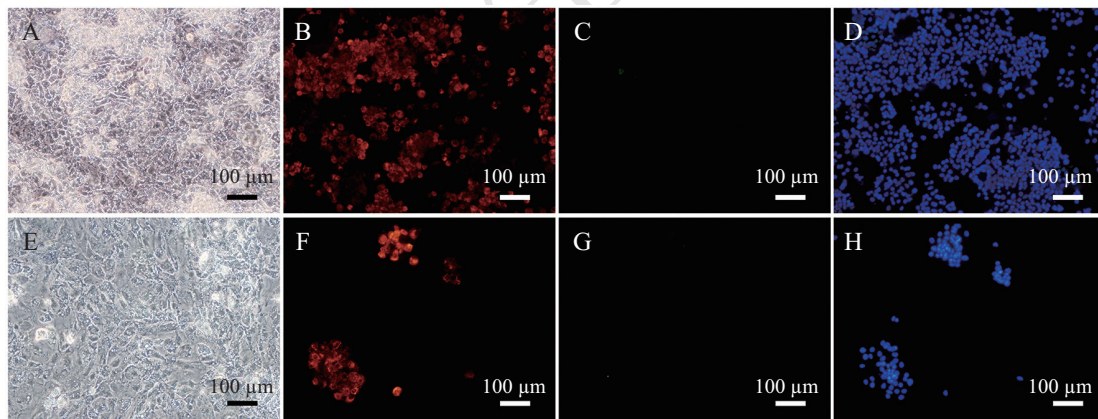
Fig.1 Immunofluorescence staining of pluripotency markers of iPSc



A: 第一阶段a诱导; B~E: 第一阶段b诱导(E), 第一阶段结束, 细胞表达SOX17(B), 不表达HNF4A(C), 细胞核染色(D); F~L: 第二阶段诱导(I), 第二阶段结束, 细胞表达SOX17(F)和HNF4A(G), 不表达AFP(J)和ALB(K), 细胞核染色(H、L)。  
A: cell morphology after stage1 a induction; B-E: stage1 b induction (E), after stage1 induction, cells were SOX17 positive (B) and HNF4A negative (C), cell nucleus staining (D); F-L: cell morphology of stage2 induction (I), after stage2 induction, cells were SOX17 (F) and HNF4A (G) positive but AFP (J) and ALB (K) negative, cell nucleus staining(H,L).

图2 经典法诱导iPSc获得不成熟肝细胞

Fig.2 Classic differentiation of iPSc into immature hepatocytes



A~D: 经典法诱导不成熟肝细胞分化; E~H: 传代法诱导不成熟肝细胞分化。A、E: 白光观察细胞形态差异; B、F: 荧光染色比较AFP的阳性细胞率; C、G: 荧光染色比较ALB的阳性细胞率; D、H: 细胞核染色。

A-D: induce immature hepatocytes differentiation by classic method; E-H: induce immature hepatocytes differentiation by passage method. A,E: compare the morphology difference by bright field observation; B,F: the rate of AFP+ by immunofluorescence staining; C,G: the rate of ALB+ by immunofluorescence staining; D,H: cell nucleus staining.

图3 传代法对iPSc向不成熟肝细胞分化的影响

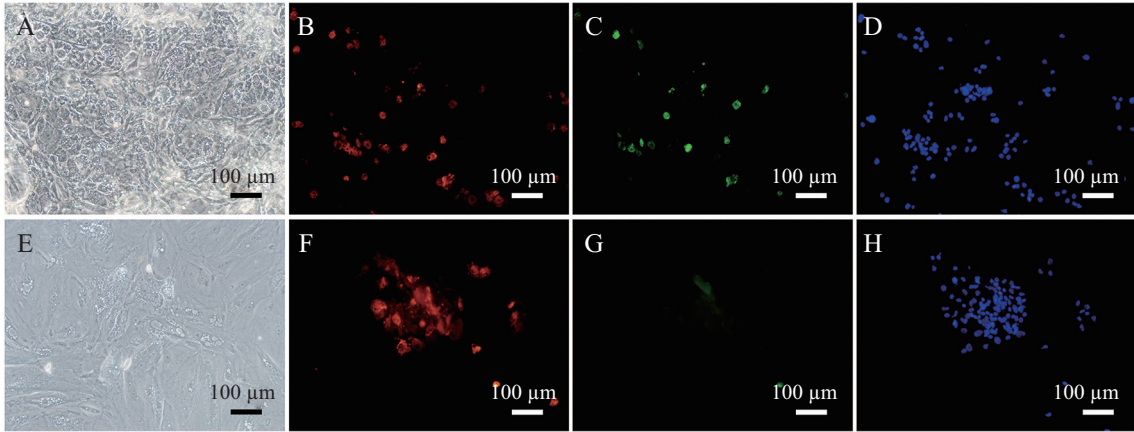
Fig.3 Passage method influences the differentiation of iPSc into immature hepatocytes

结果显示, 经典法分化组的*AFP*、*GATA6*和*HNF4A*的表达量明显高于传代组( $P < 0.05$ ), *ALB*表达量没有显著性差异( $P > 0.05$ )(图5)。

### 2.3 破坏细胞连接影响肝细胞成熟分化

不成熟肝细胞定向诱导(第三阶段)结束后, 比

较经典法和传代法破坏细胞连接诱导不成熟肝细胞成熟的差异。在细胞形态学上, 如不进行传代, 只更换肝细胞商品化培养基诱导后5 d, 细胞保持复层生长, 细胞形态未见明显变化。如传代后再次接种于基质胶包被的细胞培养皿上, 部分细胞死亡, 细胞增

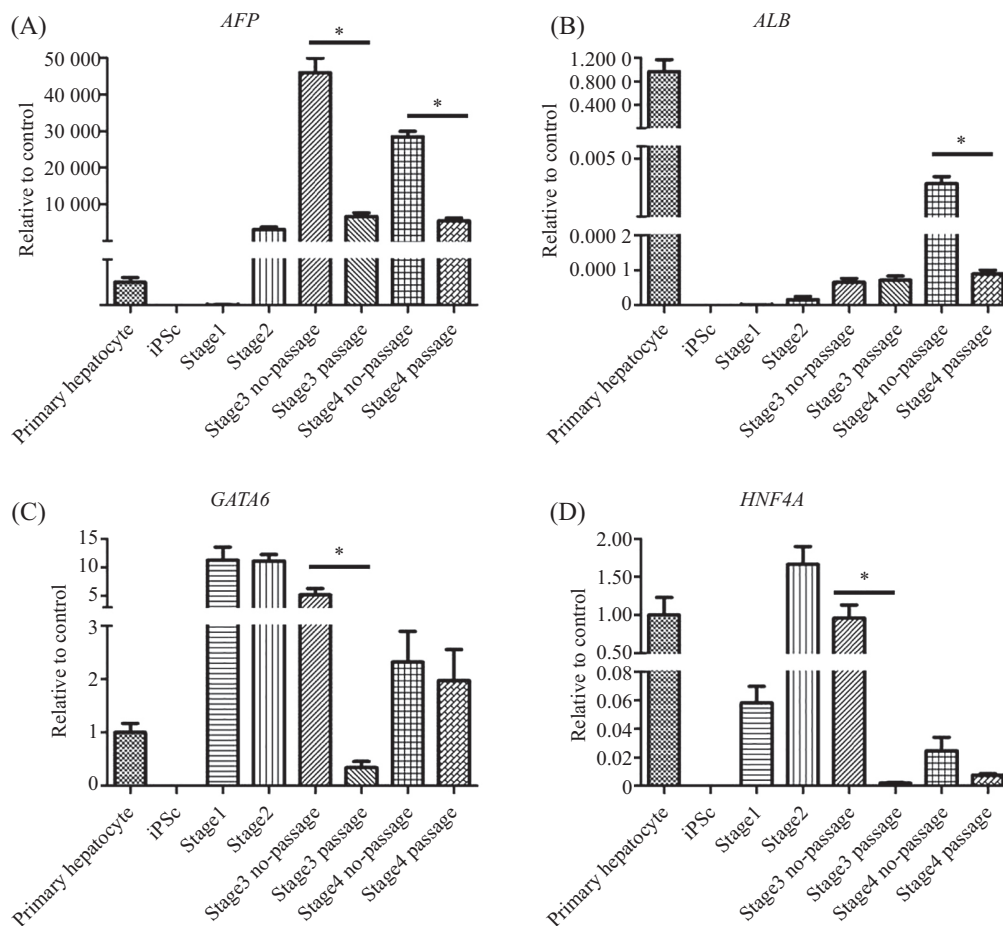


A~H: iPSc来源的不成熟肝细胞不传代(A~D)和传代(E~H)后进行第四阶段肝细胞成熟诱导。A、E: 白光观察细胞形态差异; B、F: 免疫荧光染色比较AFP的阳性细胞率; C、G: 免疫荧光染色比较ALB的阳性细胞率; D、H: 细胞核染色。

A-H: comparison of no-passage method (A-D) and passage method (E-H) derived immature hepatocytes committed hepatocyte mature differentiation by stage4 specific medium. A,E: cell morphology difference was identified by bright field observation; B,F: the rate of AFP+ by immunofluorescence staining; C,G: the rate of ALB+ by immunofluorescence staining; D,H: cell nucleus staining.

图4 传代法对iPSc分化的肝细胞成熟的影响

Fig.4 Passage method influences iPSc derived hepatocytes mature



A~D: iPSc分化过程中各阶段AFP(A)、ALB(B)、GATA6(C)和HNF4A(D)的mRNA表达情况, 在不成熟肝细胞分化和成熟肝细胞分化阶段, 比较传代诱导和不传代诱导引起的mRNA的差异表达, \*P<0.05。

A-D: detection of AFP (A), ALB (B), GATA6 (C) and HNF4A (D) expression during each iPSc differentiation stage, during immature and mature hepatocyte differentiation stage, comparison study of passage influence in mRNA level, \*P<0.05.

图5 RT-PCR检测诱导分化中相关指标mRNA水平变化

Fig.5 Detection of mRNA levels related to differentiation markers by RT-PCR

殖不明显, 贴壁细胞伸展, 铺满细胞皿, 不呈现肝细胞形态, 结束第四阶段培养后, 可见部分肝细胞样的细胞集落(图4)。收集第四阶段分化完成的成熟细胞, 传代法获得的细胞明显大于经典法, 经典法获得的细胞更接近于肝细胞形态。免疫荧光显示, 两组种均出现表达AFP和ALB的细胞, 经典法和传代法获得的阳性细胞率分别为: AFP 37.79%±9.87%和43.19%±12.34%( $P>0.05$ ); ALB 23.14%±11.87%和10.19%±2.34%( $P>0.05$ ), 都不存在显著性差异(图4)。RT-PCR结果显示, *GATA6*和*HNF4A*没有显著性差异( $P>0.05$ ), 经典分化组AFP和ALB表达量高于传代法, 存在显著性差异( $P<0.05$ )(图5)。

### 3 讨论

生物体肝脏的形成是受多条信号通路调控的复杂生物学过程, 通过生物信号模拟该过程的发生发展, 可以促进多能干细胞的肝细胞分化, 然而高效的分化方案也是通过模拟生物体肝脏形成的过程实现的。首先需要通过诱导多能细胞分化成内胚层细胞, 然后是肝脏细胞。SOX17是内胚层分化阶段的标志, SOX17缺失小鼠发生肠内胚层发育障碍<sup>[7]</sup>, 而且SOX17作为转录因子, 调控的基因可以促进早期分化<sup>[8]</sup>, 并被用于分化早期内胚层的筛选<sup>[9]</sup>。本研究结果显示, 在分化的第一和第二阶段, 分化细胞持续表达SOX17, 而且阳性率大约为70%。*GATA6*和*HNF4A*是肝脏形成早期重要的转录因子<sup>[10]</sup>。RT-PCR结果提示, *GATA6*在第一和第二阶段达到表达高峰, 第三和第四阶段持续下降。*HNF4A*被用来评价分化效率, mRNA表达在第二阶段达到高峰然后逐渐下降, 免疫荧光显示, 该时期阳性细胞率大于70%。这些结果再次提示, 本研究体外实验很好地模拟了肝脏的形成过程, 第一和第二阶段分化是成功的, 得到了大量的肝细胞样细胞。AFP和ALB是成熟肝细胞相关指标, 在肝脏发育过程中, 随着肝细胞成熟和生物学功能出现, AFP逐渐降低, ALB开始表达<sup>[10]</sup>。我们的分化实验中, 在第三和第四阶段, AFP持续表达, 虽然第四阶段检测到ALB的表达升高和ALB阳性细胞, 但是对比原代肝细胞, 表达量还是处于比较低的水平。而且我们发现, 在多次分化中, 复层生长的分化细胞很容易脱壁, 形成片状的组织样结构, 导致分化失败。我们设想, 是否可以通过消化传代提高iPSc向肝细胞的分化效率并进一步优

化分化方案?

我们对现有的分化方案进行改进, 首先希望克服复层生长引起的脱壁问题, 避免最后分化失败。通过细胞传代, 细胞贴壁后不再形成复层, 可以保证分化的顺利完成。然后我们探讨新方案的分化效率, 根据肝脏发育规律, 期望在肝细胞定向分化发生以后, 分化细胞的AFP表达升高, 然后随着肝细胞的成熟, AFP降低而ALB升高, 即第三阶段获得高表达AFP的分化细胞。第四阶段获得高表达ALB而低表达AFP的细胞, 但是在传代实验中并没有获得预期的实验结果, 证实细胞连接对肝细胞定向诱导分化至关重要。本研究检测分步诱导多能干细胞向肝细胞定向诱导分化过程中阶段性的标志蛋白(SOX17、HNF4A、AFP和ALB)表达, 若在此基础上检测各实验组细胞的转录组表达, 分析和聚类肝细胞发育和分化相关标志, 将能更全面地评价两种分化方法对肝细胞分化成熟的影响。

在保证细胞连接的前提下, 克服细胞复层生长、脱壁等问题将有利于提高iPSc肝细胞诱导分化的效率。已有研究表明, 三维(three-dimension, 3D)体系可以更好地模拟器官发育的细胞环境, 诱导多能干细胞分化获得成熟的成体细胞。现阶段, 已有关于多能干细胞在三维培养环境中分化为肌肉<sup>[11]</sup>和神经<sup>[12]</sup>终末细胞的研究, 但是未见肝脏分化的报道。根据我们的研究结果, 推测多能干细胞的3D分化, 将是获得成熟的肝脏细胞的有效途径。综上所述, 本研究建立了iPSc分化成肝脏细胞的技术, 针对分化后期, 尝试通过传代解决肝细胞成熟过程中形成复层结构、容易脱壁的问题。通过检测标志蛋白水平来评价破坏细胞连接对肝细胞成熟的影响, 发现保护细胞连接有利于获得成熟的肝细胞。

### 参考文献 (References)

- 1 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391): 1145-7.
- 2 Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858): 1917-20.
- 3 Lavon N, Yanuka O, Benvenisty N. Differentiation and isolation of hepatic-like cells from human embryonic stem cells. *Differentiation* 2004; 72(5): 230-8.
- 4 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. *Hepatology* 2010; 51(1): 297-305.
- 5 Mallanna SK, Duncan SA. Differentiation of hepatocytes from pluripotent stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2013; 26: Unit 1G 4.
- 6 Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, *et al.* Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2001; 19(10): 971-4.
- 7 Kanai-Azuma M, Kanai Y, Gad JM, Tajima Y, Taya C, Kurohmaru M, *et al.* Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice. *Development* 2002; 129(10): 2367-79.
- 8 Niakan KK, Ji H, Maehr R, Vokes SA, Rodolfa KT, Sherwood RI, *et al.* Sox17 promotes differentiation in mouse embryonic stem cells by directly regulating extraembryonic gene expression and indirectly antagonizing self-renewal. *Genes Dev* 2010; 24(3): 312-26.
- 9 Wang P, Rodriguez RT, Wang J, Ghodasara A, Kim SK. Targeting SOX17 in human embryonic stem cells creates unique strategies for isolating and analyzing developing endoderm. *Cell Stem Cell* 2011; 8(3): 335-46.
- 10 Spear BT, Jin L, Ramasamy S, Dobierzewska A. Transcriptional control in the mammalian liver: Liver development, perinatal repression, and zonal gene regulation. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63(24): 2922-38.
- 11 Shijun X, Junsheng M, Jianqun Z, Ping B. *In vitro* three-dimensional coculturing poly3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate with mouse-induced pluripotent stem cells for myocardial patch application. *J Biomater Appl* 2016; 30(8): 1273-82.
- 12 Yan Y, Song L, Tsai AC, Ma T, Li Y. Generation of neural progenitor spheres from human pluripotent stem cells in a suspension bioreactor. *Methods Mol Biol* 2016; 1502: 119-28.