

• 生物技术与方法 •

肝细胞体外培养去分化过程中转录因子表达谱分析

李瑞阳¹, 王云之¹, 葛蕊¹, 石文昊², 丁琛^{1,2}

1 复旦大学 生命科学学院, 上海 200438

2 国家蛋白质科学中心·北京 北京蛋白质组研究中心 蛋白质组学国家重点实验室, 北京 102206

李瑞阳, 王云之, 葛蕊, 等. 肝细胞体外培养去分化过程中转录因子表达谱分析. 生物工程学报, 2018, 34(2): 294–302.

Li RY, Wang YZ, Ge R, et al. Analysis of transcriptional factors expression profile during dedifferentiation of liver cell cultured *in vitro*. Chin J Biotech, 2018, 34(2): 294–302.

摘要: 原代肝实质细胞被广泛应用到药物代谢和毒性评估中, 但其体外培养呈现去分化状态, 表现为逐渐失去正常形态和代谢解毒功能, 到目前为止对去分化的分子机制并不清楚。在肝实质细胞体外去分化过程中转录因子 (Transcription factor, TF) 起重要作用, 而且非实质细胞可以在体外维持肝实质细胞功能。然而目前的技术手段不能有效地鉴定和定量分析大量 TFs。本文建立了单层肝实质细胞单独培养以及肝实质细胞与非实质细胞共培养系统, 细胞培养到 24、48、72 h。利用 TF 富集技术 (Transcription factor response elements on tip, TOT) 和质谱技术研究在肝实质细胞体外培养过程中 TFs 变化。本研究 3 次重复实验共鉴定到 219 个 TFs, 分析发现肝实质细胞培养过程中与细胞增殖、死亡、免疫等通路相关的 TFs 表达增高, 而与代谢通路相关的 TFs 表达减弱。我们建立的肝细胞培养-TFs 鉴定系统对揭示肝实质细胞去分化的分子机制以及肝实质与非实质细胞间相互作用具有重要意义。

关键词: 肝细胞培养, 肝实质细胞去分化, TOT 技术, 质谱

Analysis of transcriptional factors expression profile during dedifferentiation of liver cell cultured *in vitro*

Ruiyang Li¹, Yunzhi Wang¹, Rui Ge¹, Wenhao Shi², and Chen Ding^{1,2}

1 School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China

2 State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, National Center for Protein Sciences-Beijing, Beijing 102206, China

Abstract: Primary hepatocytes are widely used in drug metabolism and toxicity assessment. As the culture of primary hepatocytes *in vitro* is a process of dedifferentiation, hepatocytes lose normal metabolic detoxification function gradually. The mechanism of

Received: April 21, 2017; **Accepted:** May 19, 2017

Supported by: Grant for Shanghai Prior Promotion Program (No. 16JC1400500).

Corresponding author: Chen Ding. Tel: +86-21-51630742; E-mail: chend@fudan.edu.cn

上海市优先启动项目 (No. 16JC1400500) 资助。

hepatocyte dedifferentiation has been not clear so far. TFs play an important role in the dedifferentiation and non-parenchymal cells can maintain the function of hepatocytes *in vitro*. However, the current methods cannot be used in effective identification and quantitative analysis of a large number of TFs. In this paper, the mono-culture system (only primary hepatocytes) and co-culture system (primary hepatocytes and non-parenchymal cells) were established. The cells were cultured for 24 h, 48 h, 72 h as monolayer. The changes of TFs during the culture were obtained by TOT (Transcription factor response elements on tip) transcription factor enrichment method and mass spectrometry. A total of 219 TFs were identified in three individual replicates. The result revealed that up-regulated TFs were enriched in cell proliferation, death and immune response pathways, and down-regulated TFs were involved in metabolism pathway. The establishment of such culture-TFs identification system is of great significance to reveal the mechanism of primary hepatocyte dedifferentiation and crosstalk between hepatocytes and non-parenchymal cells.

Keywords: liver cell culture, hepatocyte dedifferentiation, TOT method, mass spectrometry

肝脏是由许多高度特化的细胞组成的代谢器官。肝细胞包括肝实质细胞和非实质细胞(肝窦内皮细胞、星形细胞、kupffer 细胞)。肝实质细胞承担大量的代谢、调节和毒理功能^[1], 因此肝实质细胞的体外肝脏模型对于药物研发至关重要^[2-3]。但是肝实质细胞在体外培养过程中发生去分化, 代谢解毒功能逐渐丧失, 这为其广泛应用带来极大的不便^[4]。研究人员试图通过改善培养条件从而达到维持体外肝实质细胞功能的目的。细胞共培养技术可以模拟体内微环境, 在体外建立细胞共培养模型, 这对于研究细胞之间相互作用、改善单层细胞培养等方面具有重要意义^[5]。目前与肝实质细胞共培养的细胞多是细胞系, 有结果显示大鼠肝实质细胞与小鼠 NIH3T3 共培养促进白蛋白分泌, 提升氨清除速率和 CYP1A1 活性^[6-7]。非实质细胞可能延缓去分化过程, 保持肝实质细胞的表型^[8]。肝实质细胞在体外和非实质细胞共培养对于模拟肝的体内环境、维持肝的功能及细胞间的相互作用优势明显。为了充分发挥共培养作为器官模型的优势, 肝实质细胞与来自相同器官的非实质细胞共培养是最好的选择。Bale 等分离出肝实质细胞和富集非实质细胞, 并在 transwell 中按一定的比例混合共培养, 观察每种细胞在共培养过程中的变化, 通过脂多糖 (Lipopolysacchride, LPS) 刺激捕获肝实质细胞和非实质细胞之间的相互作用^[9]。

近年来蛋白质组学在细胞分辨率水平揭示细

胞特异功能的优势越来越明显。为了了解去分化机制, 研究人员从培养了 1、3、7 d 肝实质细胞以及 Hepa 1-6 细胞系中提取蛋白, 质谱检测并获得细胞的蛋白表达谱^[10]。通过定量分析蛋白质的动态变化, 发现在 1 周的测量时间内肝原代细胞逐渐趋向于典型的细胞系。新鲜分离与培养的原代细胞和 Hepa 1-6 细胞系之间的蛋白质组相关性显示蛋白水平相似性逐渐降低。另外研究人员利用组学技术发现 4 种肝细胞在代谢、凝血和补体途径中具有明显分工。从蛋白质组学的角度提出实质细胞构成通路的下游组件、非实质细胞触发通路的概念^[11]。4 种肝细胞之间的协同作用解释了肝脏如何有效地执行受精精确控制的功能。

TF 是一类直接调节基因转录活性的蛋白^[12]。这些特殊的反式作用蛋白与顺式调控 DNA 序列相互作用, 位于基因启动子和增强子或沉默子区域内, 激活或抑制基因转录^[13]。它们通过促进或阻碍 RNA 聚合酶 II 结合 DNA, 并通过与多种共活化因子或辅助抑制因子、染色质重塑因子和组蛋白修饰酶相互作用而发挥作用。除了作为一般转录起始复合物组分的 TFs, 组织特异性转录因子例如肝脏富集转录因子 (Liver enriched transcription factor, LETF) 负责调节特定基因的表达, 决定细胞命运^[14]。在肝脏中, LETF 通过控制整个肝细胞中广泛基因的表达发挥作用, 包括编码中间代谢、尿素循环以及血浆蛋白和凝血因子效应物的基因^[15-16]。另外整套和药物代谢相关的

基因转录也受到 LETF 的调控。原代肝细胞培养期间细胞特异性功能的丧失可以通过 LETF 的蛋白表达水平的下降表现出来。HNF-1 α 和 HNF-1 β 、HNF-4 α 、CEBP α 和 CEBP β 蛋白表达水平下降是原代肝实质细胞特异功能消失的重要指标^[17-18]。

如今人们开始利用蛋白质组学技术研究肝实质细胞体外培养过程中蛋白的变化, 试图描绘去分化过程中蛋白质尤其 TFs 的动态变化, 进而了解肝实质细胞去分化过程的分子机制。但是 TFs 在细胞内属于低丰度蛋白, 利用质谱技术直接鉴定 TFs 比较困难。本实验室前期开发了一种富集鉴定内源性 TFs 的方法, 该方法设计出串联转录因子效应元件 (Transcription factor response elements, TFREs) 作为亲和试剂富集 TFs, 然后利用质谱技术鉴定分析内源性 TFs^[19]。但是这种方法不能满足快速鉴定微量样品内源性 TFs 的需求。因此我们在此方法基础上, 开发出具有高灵敏度、高效率、高通量的新型富集内源性 TFs 的方法, 即 TOT 方法^[20]。结合此技术, 本文开发出肝细胞的培养和转录因子表达谱分析系统, 为以后研究细

胞体外培养过程中 TFs 的变化提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与器材

6-8 周雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 (斯莱克实验动物有限公司), 蠕动泵 (保定兰格公司, BT100-1F), 输液器 (山东安得新华医疗公司, TPE 型), 移液枪头 (Axygen, TR-222-C), C18 固相萃取膜 (3M, 329574), M280 磁珠 (Invitrogen, 00324960)。

1.2 方法

1.2.1 灌流与细胞培养

利用两步法进行小鼠肝门静脉灌流^[21], 首先灌流去血 3-4 min, 然后开始用酶液灌流消化, 直至肝脏没有弹性, 颜色发白。剪下肝脏后, 细胞经过 150 目筛子过滤, 通过 50 \times g 离心分离得到肝实质细胞沉淀, 剩余非实质细胞通过密度梯度离心分离获得, 最后肝实质细胞和非实质细胞以 1:4 比例进行混合, 接种到 6 孔板中进行培养, 单独培养只含有肝实质细胞。流程见图 1。

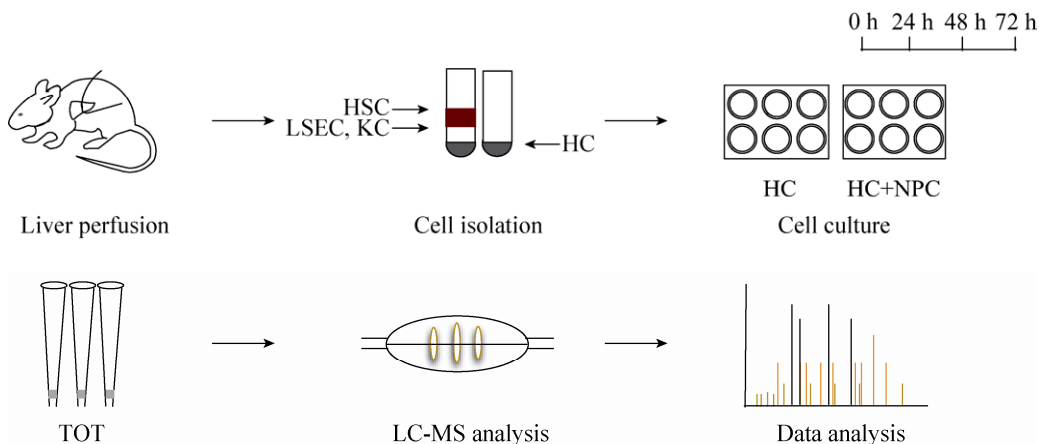


图 1 实验流程图 (HSC 代表星形细胞; LSEC 代表肝窦内皮细胞; KC 代表 kupffer 细胞; HC 代表肝实质细胞; NPC 代表肝非实质细胞; LC-MS 代表液相色谱-质谱联用技术)

Fig. 1 Experimental workflow. HSC stands for hepatic stellate cell; LSEC stands for liver sinusoidal endothelial cell; KC stands for kupffer cell; HC stands for hepatocyte; NPC stands for non-parenchymal cell; LC-MS stands for liquid chromatograph-mass spectrometer.

1.2.2 收集细胞与提取 NE

细胞在培养至 24、48、72 h 时, 共培养和单独培养只收获肝实质细胞。胰蛋白酶消化细胞, $50\times g$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 3 min, 重复 3 次, 保留肝实质细胞沉淀, 去除共培养的非实质细胞。细胞沉淀用低渗溶液重悬, 冰置 30 min, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻。冰上融化细胞后, 于 $3715\times g$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 弃上清, 依次加入低盐、高盐溶液, 垂直混匀 30 min。 $16\,000\times g$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 弃沉淀。

1.2.3 TOT

$0.1\text{ }\mu\text{g}$ TFRE 和 $2\text{ }\mu\text{L}$ M280 磁珠垂直混匀孵育 30 min, 之后加入到 TOT 枪头底部, 将 $5\text{ }\mu\text{g}$ NE 转移到 TOT 枪头中, 混匀, NE 中 TFs 与 TFRE 通过离心结合。用 NETN、PBS、 NH_4HCO_3 去除非特异性蛋白。将 $0.1\text{ }\mu\text{g}$ 的胰蛋白酶加入到枪头中, 用胰蛋白酶酶解富集到的 TFs 蛋白, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 酶解 1 h。乙腈洗脱酶解后肽段, 抽干样品, 流程见图 2。

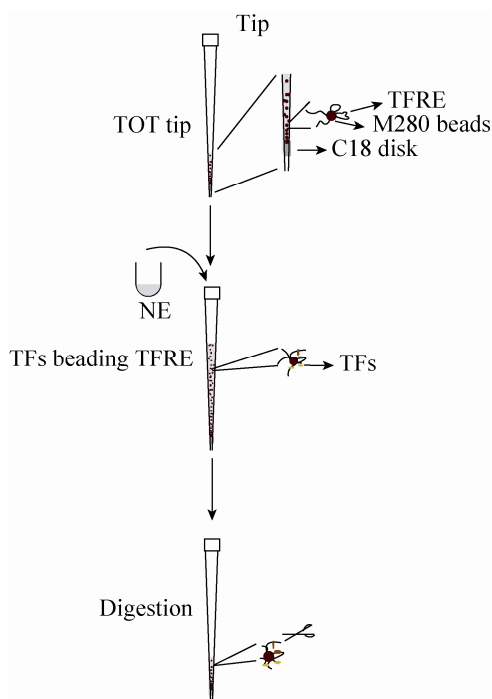


图 2 TOT 实验图

Fig. 2 TOT experiment.

1.2.4 鉴定 TFs

干燥后的肽段重新溶解到 0.1% 甲酸溶液中, 溶解后样品在 Easy-nLC 1000 nano-HPLC 系统 (Thermo Fisher Scientific) 和 Orbitrap Fusion 质谱仪 (Thermo Fisher Scientific) 上进行分离和质谱检测。利用 MaxQuant 对蛋白进行定量, 蛋白和肽段水平错误发现率 (False discover rate, FDR) 小于 0.01。利用 Excel 和 R 语言进行生物学分析。

2 结果与分析

2.1 建立肝细胞培养系统

小鼠经过灌流获取的肝实质细胞有 6×10^7 个, 密度梯度离心获得非实质细胞总数为 1.5×10^7 个。细胞经过台盼蓝染色, 统计活细胞数可知肝实质细胞的活性达到 80% 以上, 非实质细胞的活性达到 90% 以上。

肝实质细胞单独培养: 从图 3 可以看出, 培养 6 h 后肝实质细胞呈现出角边缘, 细胞贴壁很好并有伸展的趋势。培养 24 h, 细胞之间的空间变小, 细胞接触增多。培养 48 h, 细胞扁平化更加明显, 肝实质细胞多个细胞核聚集在一起, 细胞之间的界限变得模糊。培养 72 h, 细胞已经分离并且在一些区域中可见凝聚的凋亡细胞, 细胞死亡导致细胞间空间变大与细胞接触变少。

肝实质细胞与非实质细胞共培养: 共培养 6 h 后肝实质细胞也呈现出角边缘; 非实质细胞由于体积小, 还没有呈现出细胞形态。共培养 24 h, 实质细胞开始伸展, 但伸展性弱于单独培养, 且细胞死亡率增高。非实质细胞伸展比较明显, 可以看到肝窦内皮细胞占非实质细胞的比重较大, 实质细胞和非实质细胞的相互作用主要以实质细胞和肝窦内皮细胞相互作用为主。共培养 48 h, 细胞扁平化明显, 肝实质细胞呈现多个细胞核聚集状态, 细胞之间的界限变得模糊。细胞活力相对于单独培养时更好, 非实质细胞更加伸展, 和实质细胞接触增多。共培养 72 h, 可见凝聚的

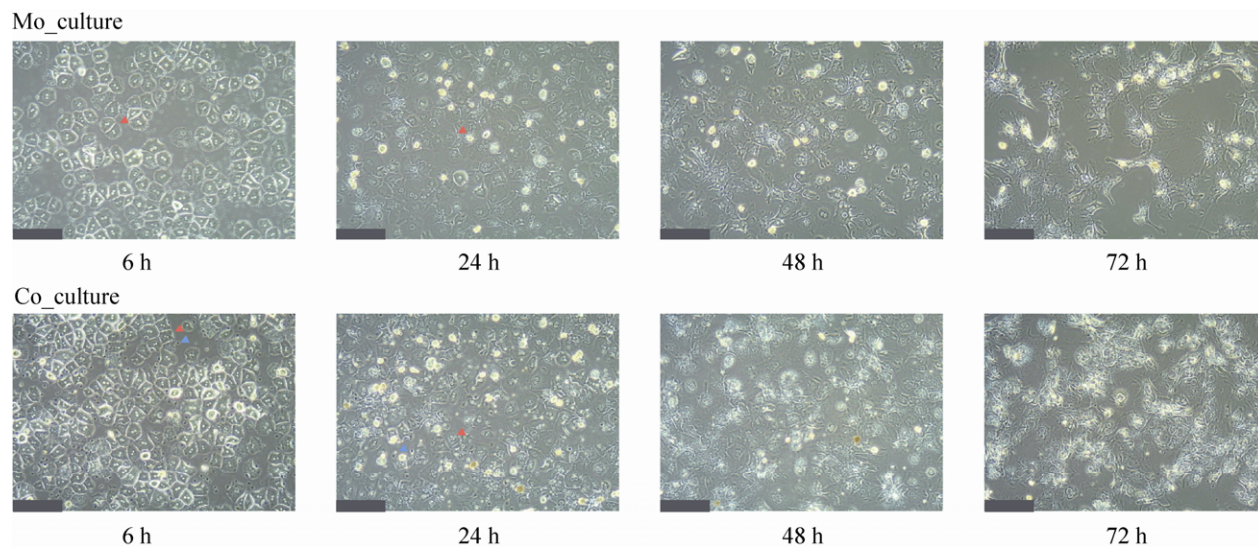


图3 肝细胞单独培养和共培养 (红色箭头指向肝实质细胞; 蓝色箭头指向非实质细胞)

Fig. 3 Liver cell mo-culture and co-culture. Red arrows point to hepatocyte; blue arrows point to non-parenchymal cells. Scale bar=115.1 μm .

凋亡细胞, 剩余的实质细胞出现片状伪足与迁移的特征。细胞存活率相对于单独培养时较高。单独培养和共培养 of 细胞在体外进行去分化, 共培养时肝实质细胞生存率更高。

2.2 TFs 富集及鉴定

利用 TOT 方法对肝实质细胞内 TFs 进行富集, 然后进行质谱检测。3 次试验总共富集鉴定到 3 014 个蛋白, 其中在每个时间点都鉴定到 1 542 个。新鲜分离的肝实质细胞鉴定到的蛋白数最少, 为 2 099 个。而共培养 72 h 鉴定到蛋白数最多, 为 2 533 个。3 次试验总共鉴定到 219 个 TFs, 其中在每个时间点都鉴定到 114 个。不管是单独培养还是共培养, 随着培养时间的增加, TFs 数目是逐渐增加的, 共培养在每个时间点鉴定到的 TFs 数目都多于单独培养, 结果见图 4。

2.3 TFs 在去分化过程中的变化

将鉴定到的 TFs 进行热图聚类分析, 和新鲜分离的肝细胞 (0 h) 相比, TFs 在其他时间点的

蛋白表达水平均表现出明显的差异。一些控制肝细胞主要代谢功能的 TFs 在 0 h 高表达的 TFs 随着时间的推移表达水平变低, 如 HNF-1 α 、HNF-4 α 、MLXIPL、PROX1 等。而与细胞增殖相关的 TFs, 如 HMGA2、SMARCC2、SOX4、RBPJ 等表达呈现上调趋势。在肝实质细胞培养过程中, 肝脏特异性功能的丢失体现在肝脏特异转录因子的表达下调^[9]。质谱结果表明肝脏特异转录因子 HNF-1 α 与 HNF-4 α 的蛋白水平表达分别下调为原来的 7.4% 和 22.2%。另外肝实质细胞体外培养过程中伴随着免疫通路的激活, 质谱结果显示 NF- κ B1 上调了 13.9 倍。TFs 整体变化见图 5。

相对于 0 h, 将 TFs 在其他时间点的蛋白水平上下调为原来的 25% 以及显著性水平 (P value) 0.05 作为阈值, 进行 TFs 通路聚类分析。图 6A 可知, 24 h 时, 细胞周期、DNA 复制以及免疫相关的通路在单独培养和共培养条件下都被激活; 48 h 时, 细胞周期在两种培养条件下都很活跃, 共培养更

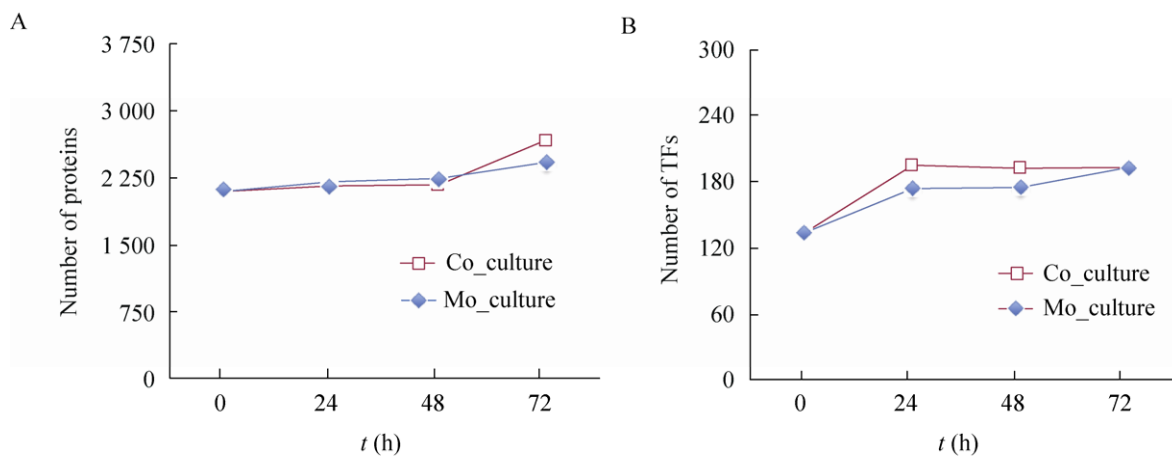


图 4 质谱鉴定结果 (A: 蛋白数目; B: TFs 数目)
Fig. 4 Identification results by mass spectrum. (A) Number of protein. (B) Number of TFs.

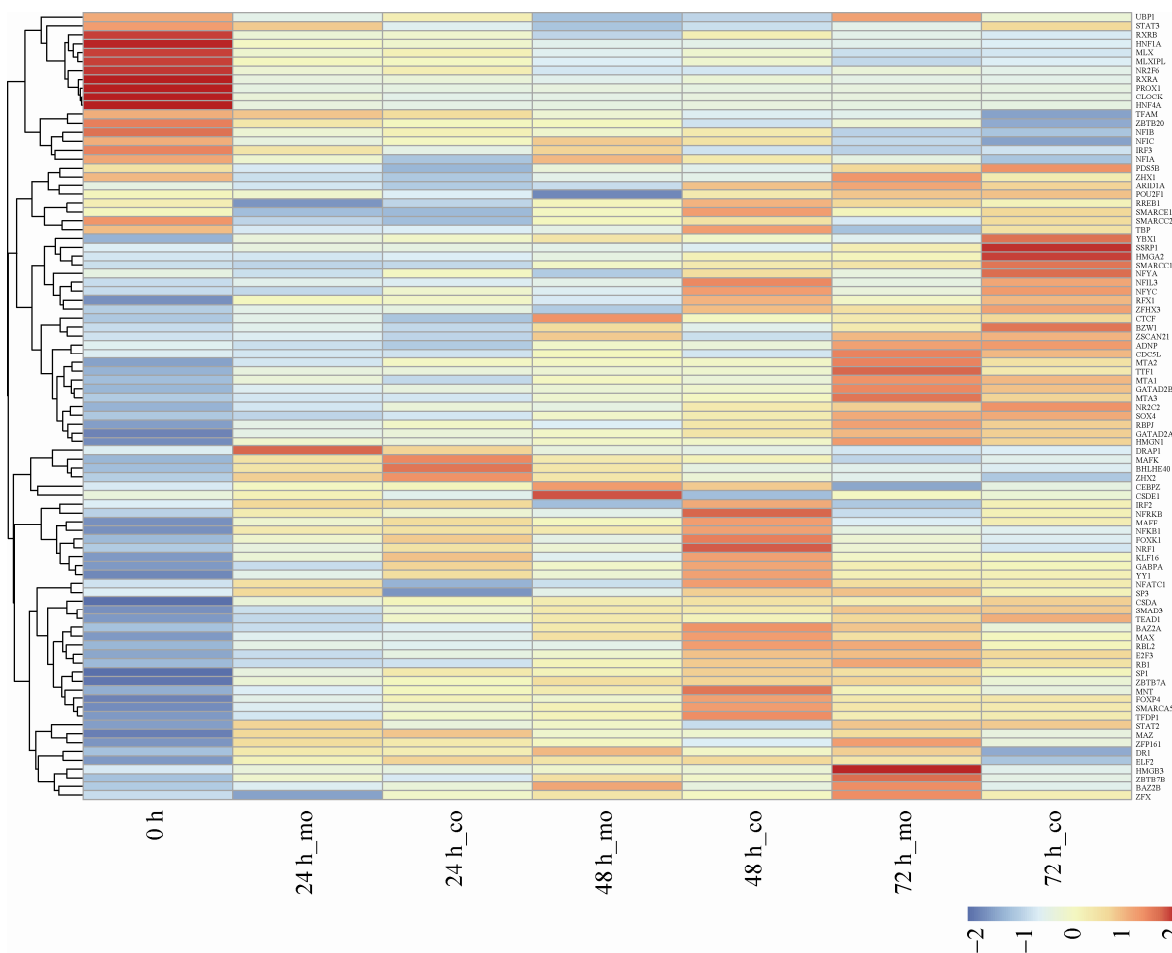


图 5 肝实质细胞 TFs 在不同条件下蛋白水平动态变化
Fig. 5 Transcriptional factors of hepatocytes change on protein level in different conditions.

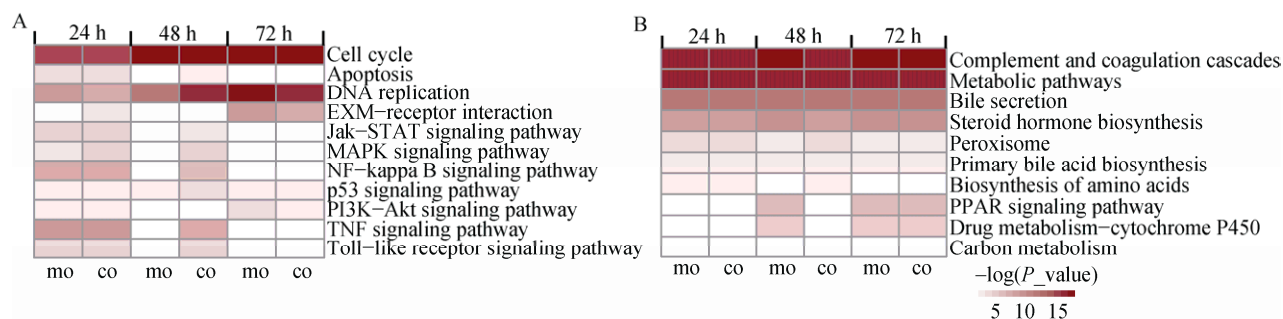


图6 肝实质细胞 TFs 在不同条件下通路富集 (A: 表达上调 TFs 的通路富集; B: 表达下调 TFs 的通路富集. mo 代表单独培养; co 代表共培养)

Fig. 6 Pathway enrichment of hepatocyte TFs in different conditions. (A) Pathway enrichment of up-regulated TFs. (B) Pathway enrichment of down-regulated TFs. mo stands for mo-culture; co stands for co-culture.

显著地富集到凋亡、免疫信号通路上; 72 h 时这些信号通路激活程度下降, 只有细胞周期、DNA 复制、胞外基质-受体相互作用依旧活跃。总之, 体外培养显著激活细胞周期、凋亡、免疫等通路。单独和共培养过程中细胞周期和 DNA 复制很活跃, 说明肝实质细胞在体外倾向于增殖。通过分析下调的 TFs 参与的通路可知, 两种培养条件都可以显著抑制代谢相关通路, 补体途径、胆汁分泌与体外类固醇激素的合成受到显著抑制。单独培养 48 h 和 72 h, PPAR 和药物代谢相关的细胞色素 P450 通路显著被抑制, 而这种情况只在共培养 72 h 时发生, 说明共培养可能延迟了肝实质细胞代谢失调的速度, 维持肝实质细胞的功能 (图 6B)。总之, 两种培养条件下, 肝实质细胞内代谢相关通路被抑制, 但共培养条件可能延缓这一情况的发生。

3 讨论

肝实质细胞在体外培养过程中会大量死亡, 导致只能获得少量的肝实质细胞, TFs 在细胞内属于低丰度蛋白, 监测 TFs 在细胞内蛋白水平上的动态变化变得非常困难。我们在 TFRE 方法的基础上, 开发出可以富集微量样品中 TFs 的 TOT

方法。这种方法允许提取培养在 6 孔板中细胞的 TFs, 解决样品量少的问题, 提高了实验通量。体外 TOT 富集联合质谱鉴定能在很短时间内获取 TFs 表达谱。从样品制备到数据采集整个过程可以在 3 h 内完成, 其中包含大约 1 h 的质谱检测时间。由于实验都是在 TOT 和离心机中进行, 所以可以一次处理多个样品。TOT 目前可以有效获得内源性 TFs 表达谱, 相信以后随着技术的改善, 会有越来越多的 TFs 被鉴定到。同时我们构建肝细胞的单独培养和共培养系统, 初步探究了非实质细胞在体外培养过程中对实质细胞的作用, 非实质细胞的存在可以改善实质细胞的存活和形态。

对单独培养和共培养的肝实质细胞 TFs 进行富集鉴定, 发现 0 h 鉴定到的 TFs 相对于其他时间点偏少, 原因可能是正常的肝实质细胞存在较多的高丰度蛋白 (比如白蛋白), 导致一些低丰度的 TFs 检测不到。另外相对于 0 h, 对其他时间点多出的 TFs 进行功能聚类分析发现, 这些 TFs 显著富集到 MAPK、细胞周期、NF- κ B 通路上。另外共培养在 24 h 和 48 h 鉴定到的 TFs 多于单独培养, 至于确切原因还不清楚, 需要进一步探索。肝原代细胞体外培养会下调重要的 LETF 蛋白水

平,例如 HNF-1 α 和 HNF-4 α ,其控制许多毒物动力学过程和肝实质细胞特有的其他特征。HNF-4 α 是在肝脏里面表达很丰富的 TF^[22],参与调控脂肪酸氧化、载脂蛋白代谢、葡萄糖代谢、氨基酸代谢、血液凝结等^[23]。HNF-4 α 可以结合到超过 40%的活性肝脏基因启动子上^[24],其对肝功能相关基因的转录调节极其重要。本实验也鉴定到 HNF-1 α 和 HNF-4 α 的下调,说明肝实质细胞的功能在体外培养过程中逐渐丧失。在小鼠灌流过程中,肝实质细胞会产生氧化胁迫,激活 NF- κ B 通路^[25-26]。本实验质谱检测结果显示上调的转录因子功能富集在 NF- κ B 通路上,NF- κ B1 呈现上调趋势。在小鼠灌流过程中,肝脏会出现缺血再灌注 (Ischemia reperfusion, I/R) 损伤,TNF- α 诱导活性氧的产生进一步促进转录因子 NF- κ B 的活化,NF- κ B 通路被激活,进而增强 NF- κ B 介导的 BCL-2 家族成员比如 BAK、BAX 和 BAD 的转录过程,导致细胞在培养过程中趋向凋亡。整体将差异显著的 TFs 进行功能聚类,发现共培养可以延缓代谢的失调。我们也鉴定到另外一些和代谢、增殖相关的重要的转录因子,如 HNF-1 α 、CEBP α 、E2F3、RB1 等。大规模监测这些转录因子的动态变化有助于进一步了解肝实质细胞体外去分化过程。应激诱导细胞存活通路的上调在肝实质细胞损伤和功能丢失过程中起重要作用,比如 MEK/ERK 和 NF- κ B 途径对肝实质细胞表型起负调控作用。因此在培养过程中的所有阶段,特别是在肝细胞分离过程中,减少细胞应激反应可能是体外维持细胞活性和肝实质细胞表型的最可行的方法。本研究中得到的一些结果可能对于单层培养系统是特异的,但使用这样简单的系统可以帮助我们鉴定已知的和未知的去分化机制,全面了解肝实质细胞去分化过程。未来对于肝实质细胞去分化的研究可以综合运用转录组学、蛋白质组学、代谢组学和其他组学方法,提供关于肝实

质细胞全方位的了解,提供更客观的分析结果。本研究比较了肝实质细胞的单独培养和共培养,开发出细胞培养-TFs 快速鉴定模型。该模型可以有效获得肝实质细胞体外培养 TFs 表达谱,并对其初步分析,发现与非实质细胞共培养可以改善实质细胞生存环境并延缓肝实质细胞代谢的下调。在两种培养系统中表达上调的 TFs 和细胞增殖、免疫、死亡等过程相关,而下调的 TFs 则与代谢过程相关。未来这一模型可以为探究肝实质细胞去分化机制提供更多的证据,共培养系统可以帮助我们了解各种细胞之间的相互作用。

REFERENCES

- [1] Falcon-Perez JM, Lu SC, Mato JM. Sub-proteome approach to the knowledge of liver. *Proteomics Clin Appl*, 2010, 4(4): 407-415.
- [2] Bale SS, Verneti L, Senutovitch N, et al. *In vitro* platforms for evaluating liver toxicity. *Exp Biol Med* (Maywood), 2014, 239(9): 1180-1191.
- [3] LeCluyse EL, Witek RP, Andersen ME, et al. Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing. *Crit Rev Toxicol*, 2012, 42(6): 501-548.
- [4] Elaut G, Henkens T, Papeleu P, et al. Molecular mechanisms underlying the dedifferentiation process of isolated hepatocytes and their cultures. *Curr Drug Metab*, 2006, 7(6): 629-660.
- [5] Langen RC, Schols AM, Kelders MC, et al. Enhanced myogenic differentiation by extracellular matrix is regulated at the early stages of myogenesis. *In vitro Cell Dev Biol Anim*, 2003, 39(3/4): 163-169.
- [6] Seo SJ, Kim IY, Choi YJ, et al. Enhanced liver functions of hepatocytes cocultured with NIH 3T3 in the alginate/galactosylated chitosan scaffold. *Biomaterials*, 2006, 27(8): 1487-1495.
- [7] Chia SM, Lin PC, Yu H. TGF- β 1 regulation in hepatocyte-NIH3T3 co-culture is important for the enhanced hepatocyte function in 3D microenvironment. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 89(5): 565-573.
- [8] Bale SS, Golberg I, Jindal R, et al. Long-term coculture strategies for primary hepatocytes and liver

- sinusoidal endothelial cells. *Tissue Eng Part C Methods*, 2015, 21(4): 413–422.
- [9] Bale SS, Geerts S, Jindal R, et al. Isolation and co-culture of rat parenchymal and non-parenchymal liver cells to evaluate cellular interactions and response. *Sci Rep*, 2016, 6: 25329.
- [10] Azimifar SB, Nagaraj N, Cox J, et al. Cell-type-resolved quantitative proteomics of murine liver. *Cell Metab*, 2014, 20(6): 1076–1087.
- [11] Ding C, Li Y, Guo F, et al. A cell-type-resolved liver proteome. *Mol Cell Proteomics*, 2016, 15(10): 3190–3202.
- [12] Latchman DS. Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997, 29(12): 1305–1312.
- [13] Roeder RG. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci*, 1996, 21(9): 327–335.
- [14] Cereghini S. Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J*, 1996, 10(2): 267–282.
- [15] Johnson PF. Transcriptional activators in hepatocytes. *Cell Growth Differ*, 1990, 1(1): 47–52.
- [16] Gonzalez FJ. Regulation of hepatocyte nuclear factor 4 α -mediated transcription. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2008, 23(1): 2–7.
- [17] Padgham CRW, Boyle CC, Wang XJ, et al. Alteration of transcription factor mRNAs during the isolation and culture of rat hepatocytes suggests the activation of a proliferative mode underlies their dedifferentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 197(2): 599–605.
- [18] Mizuguchi T, Mitaka T, Hirata K, et al. Alteration of expression of liver-enriched transcription factors in the transition between growth and differentiation of primary cultured rat hepatocytes. *J Cell Physiol*, 1998, 174(3): 273–284.
- [19] Ding C, Chan DW, Liu WL, et al. Proteome-wide profiling of activated transcription factors with a concatenated tandem array of transcription factor response elements. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(17): 6771–6776.
- [20] Shi WH, Li K, Song L, et al. Transcription factor response elements on tip: a sensitive approach for large-scale endogenous transcription factor quantitative identification. *Anal Chem*, 2016, 88(24): 11990–11994.
- [21] Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol*, 1976, 13: 29–83.
- [22] Drewes T, Senkel S, Holewa B, et al. Human hepatocyte nuclear factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(3): 925–931.
- [23] Chiang JYL. Hepatocyte nuclear factor 4 α regulation of bile acid and drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2009, 5(2): 137–147.
- [24] Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, et al. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science*, 2004, 303(5662): 1378–1381.
- [25] Ozaki M, Haga S, Zhang HQ, et al. Inhibition of hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress in HGF-stimulated antiapoptotic signaling: role of PI3-K and Akt kinase upon rac1. *Cell Death Differ*, 2003, 10(5): 508–515.
- [26] Paine AJ, Andreacos E. Activation of signalling pathways during hepatocyte isolation: relevance to toxicology *in vitro*. *Toxicol in Vitro*, 2004, 18(2): 187–193.

(本文责编 郝丽芳)