



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในเซลล์
ตับและการทำลายเซลล์ติดเชื้อด้วยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน

โดย ผศ.ดร.คณิตส์ เสงี่ยมสุนทร

เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ
มิถุนายน พ.ศ. 2560

สัญญาเลขที่ TRG58800087

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในเซลล์
ตับและการทำลายเซลล์ติดเชื้อด้วยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน

ผู้วิจัย ผศ.ดร.คณิตส์ เสี่ยมสุนทร
สังกัด คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและ
ต้นสังกัด

ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
(สกว.และต้นสังกัดไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ประสบความสำเร็จตามวัตถุประสงค์ที่ตามวางไว้ทุกประการ เพราะได้รับความร่วมมือจากผู้ร่วมวิจัยทุกท่าน ที่ให้ความร่วมมือในการศึกษาทดลองและแก้ไขข้อผิดพลาดที่เกิดขึ้น กลุ่มผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล และ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ ครุภัณฑ์ในการดำเนินโครงการวิจัยรวมทั้งสาธารณูปโภคต่าง ๆ และบุคลากรทุกท่านในหน่วยงานที่ให้ความร่วมมือในการทำวิจัย ผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี ในการเอื้อเฟื้อครุภัณฑ์สำหรับใช้ในงานวิจัย และ ภาควิชาพยาธิวิทยา ที่เอื้อเฟื้อการตรวจหาปริมาณไวรัสตับอักเสบนิตปี ความสำเร็จของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัย ขออุทิศให้ผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบนิตปีทุกท่านมา ณ โอกาสนี้

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่สนับสนุนทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่รหัสโครงการ TRG58800087 ร่วมกับทางมหาวิทยาลัยมหิดลและเป็นส่วนผลักดันให้งานวิจัยประสบความสำเร็จด้วยดี

ดร.คณิสส์ เสี่ยมสุนทร

30/06/2560

บทคัดย่อภาษาไทย

รหัสโครงการ : TRG5880087

ชื่อโครงการ : การศึกษาการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในเซลล์ตับและการทำลายเซลล์ติดเชื้อด้วยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร.คณิสส์ เสงี่ยมสุนทร ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address: khanit.san@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี (1 กรกฎาคม 2558 – 30 มิถุนายน 2560)

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV) เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคตับอักเสบริ่งจนในที่สุดพัฒนาเป็นโรคมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) วิธีศึกษาด้านชีววิทยาของไวรัสและความสัมพันธ์ระหว่างไวรัสกับเซลล์เจ้าบ้านมีข้อจำกัดเนื่องจากขาดเซลล์ตับที่รองรับการติดเชื้อไวรัสภายนอกร่างกาย ดังนั้นการพัฒนาเซลล์ตับที่มีคุณสมบัติเป็นเซลล์ปกติและสามารถรองรับการติดเชื้อและการเพิ่มจำนวนของไวรัสในระยะยาวย่อมเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการศึกษาไวรัสตับอักเสบบี ในการศึกษานี้ได้พัฒนาเซลล์คล้ายเซลล์ตับจากเซลล์ต้นกำเนิดไพอีเอสและตรวจวัดการแสดงออกของรีเซปเตอร์ที่จำเป็นสำหรับการติดเชื้อและทดสอบการติดเชื้อในเซลล์ด้วยไวรัสที่แยกมาจากพลาสมาของผู้ป่วยหรือจากเซลล์ HepG2.2.15 จากการศึกษาพบว่าเซลล์คล้ายเซลล์ตับที่พัฒนาขึ้นมีการแสดงออกของรีเซปเตอร์ของไวรัส เช่น NTCP HSPG และ clathrin ด้วยวิธีการวิเคราะห์โปรตีนทางชีววิทยาภูมิคุ้มกันและวิธีพีซีอาร์ นอกจากนี้ไวรัสยังสามารถสังเคราะห์โครงสร้าง cccDNA เพื่อเพิ่มจำนวนอนุภาคของไวรัสใหม่เมื่อได้รับการติดเชื้อจากซีรัมของผู้ป่วยหรือ HepG2.2.15 ซึ่งการติดเชื้อดังกล่าวทำให้ตรวจพบ HBcAg HBeAg และ HBV cccDNA ในปริมาณที่สูงในเซลล์และเมื่อเก็บตัวอย่างไวรัสจากอาหารเลี้ยงเซลล์ติดเชื้อมาเลี้ยงร่วมกับเซลล์ปกติสามารถทำให้เซลล์ปกติติดเชื้อได้ นอกจากนี้ตรวจพบการเพิ่มการแสดงออกของระดับ TNF- γ , IFN- α IFN- β TGF- β และ miR-122 ในเซลล์ HLC เมื่อติดเชื้อผ่านไป 1 สัปดาห์ เมื่อนำเซลล์ติดเชื้อมาเลี้ยงร่วมกับเซลล์ซีไอเค สามารถทำลายเซลล์ติดเชื้อได้มากถึงร้อยละ 90 และไม่มีผลต่อเซลล์ปกติ จากการศึกษาข้างต้นเซลล์คล้ายเซลล์ตับสามารถพัฒนาเป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับศึกษาวงจรชีวิตของไวรัสตับอักเสบบีและปฏิสัมพันธ์ระหว่างไวรัสกับเซลล์เจ้าบ้านรวมทั้งการเกิดมะเร็งในเซลล์ติดเชื้อในอนาคตได้

คำสำคัญ: เซลล์ต้นกำเนิดไพอีเอส, ไพอีเอสเซลล์, เซลล์คล้ายเซลล์ตับ, ไวรัสตับอักเสบบี, เฮปบีวี, การเพาะเลี้ยงเซลล์, เอ็นทีซีพี, เซลล์ซีไอเค

Abstract

Project Code: TRG5880087
 Project Title: The study of hepatitis B virus infection to hepatocyte-like cells and their susceptibility to cytolysis using cytokine-induced killer cells
 Investigator: Assist. Prof. Khanit Sa-ngiamsuntorn, Ph.D.
 E-mail Address: khanit.san@mahidol.ac.th
 Project Period: 2 years (1 July 2015 – 30 June 2017)

Hepatitis B virus (HBV) infects induces chronic liver inflammation which could eventually develop into hepatocellular carcinoma. The study of HBV biology and virus-host cell interaction have been hindered by the limitation of the available host cells. The long-term cultured functional hepatocyte that supports a complete HBV life cycle for a long term is essential for this task. In this study, hepatocyte-like cells (HLC) derived from human iPSCs were examined for HBV associated receptors, infectivity with HBV isolated from patient serum or HepG2.2.15. The HBV receptors for example; HSPG, NTCP and clathrin were highly expressed in mature HLC as evaluated by immunofluorescent and real-time qPCR. HLCs sustained viral covalently closed circular DNA (cccDNA) replication and produced HBV particles after challenging with HBV from patient serum. The generation of HBV virions from HLCs outperformed those from HepaRG cell. Infection of HLCs with HBV from patient serum or HepG2.2.15 resulted in the expression of HBcAg, HBeAg and HBV cccDNA that was consistent with higher HBV protein synthesis and replication. The conditioned medium from infected HLCs was able to infect naïve HLCs and HepaRG cells. The HLCs upregulated the expression of TNF- γ , IFN- α IFN- β TGF- β and miR-122 after the HBV infection. The co-culture of HBV-infected HLCs with cytokine-induced killer (CIK) cell exhibited 90% infected cell lysis whereas the non-infected HLCs exhibited 0% lysis. In summary, HLC could serve as an effective host for the study of HBV life cycle, virus-host interaction with a potential to develop hepatocellular carcinoma.

Keywords: induced pluripotent stem cell, iPSC, hepatocyte-like cell, hepatitis B virus, HBV, cell culture model, NTCP, CIK cell

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ii
Abstract (English)	iii
สารบัญ	iv
สารบัญรูปภาพ	v
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
เครื่องมือและวิธีการดำเนินงาน	2
ผลการทดลอง	4
สรุปผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลองที่ได้	19
เอกสารอ้างอิงโครงการวิจัย	20
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	22
ภาคผนวก	23
ภาคผนวก I	REPRINTS
ภาคผนวก II	Poster Abstract

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
1 แผนภาพสรุปแสดงวิธีการทดลองการพัฒนาเซลล์ตับจากเซลล์ต้นกำเนิด	4
2 iPS cell เริ่มต้นการ differentiation	5
3 การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ iPS เมื่อได้รับกระตุ้นให้เจริญพัฒนาไป	5
4 รูปร่างของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปเป็น hepatic endoderm	6
5 ผลการย้อมเซลล์ด้วย immunofluorescence ที่จำเพาะกับเซลล์ตับ	6
6 รูปร่างของเซลล์ตับที่ผ่านกระบวนการ maturation	7
7 Gel electrophoresis แสดงผลการแสดงออกของ hepatocyte-specific marker	7
8 Gel electrophoresis แสดงผลการแสดงออกของ cytochrome P450	8
9 เซลล์ HepG2.2.15 เลี้ยงในอาหาร DMEM 10% FBS และ 300 µg/mL G418	8
10 รูปร่างของเซลล์ HLC เมื่อบ่มร่วมกับไวรัสตับอักเสบบีจากพลาสมา	9
11 ผล gel electrophoresis ของยีน 3 ชนิด คือ HBV DNA cccDNA และ HBV RNA	10
12 ผลการย้อมโปรตีน HBV core antigen และ HBV surface antigen ในเซลล์ HLC	10
13 ลักษณะของเซลล์ HepaRG และเซลล์ HLC เมื่อผ่านการบ่มร่วมกับ 2% DMSO	11
14 gel electrophoresis แสดง PCR product ของ rcDNA cccDNA	12
15 electrophoresis แสดง PCR product ของ rcDNA cccDNA ที่แยกจากเซลล์	12
16 ระดับของ HBV DNA ในเซลล์ HepaRG และ HLC	13
17 ระดับของ cccDNA ในเซลล์ HepaRG และ HLC ที่ติดเชื้อ HBV	14
18 การแสดงออกของกลุ่ม inflammatory cytokines ไวรัสตับอักเสบบี	14
19 ระดับการแสดงออกของยีน microRNA 122 (miR-122) ในเซลล์ตับ	15
20 ปริมาณของ hepatitis B e antigen และ hepatitis B surface antigen	16
21 ระดับของ HBV DNA และ HBsAg เมื่อได้รับยาต้านไวรัส	17
22 รูปร่างของเซลล์ PBMC ที่แยกมาจากเลือดของอาสาสมัครสุขภาพดี	17
23 การทำลายเซลล์มะเร็งตับที่ติดเชื้อไวรัสอย่างเฉพาะเจาะจงของเซลล์ CIK	18

1. บทนำ

ไวรัสตับอักเสบบี (human hepatitis B, HBV) เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคตับเรื้อรัง ปัจจุบันประชากรมากกว่า 360 ล้านคนทั่วโลกติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี นอกจากนั้นผู้ป่วยจะมีการพัฒนาเป็นโรคตับที่ร้ายแรงมากขึ้นในระยะหลัง เช่นโรคตับแข็ง (cirrhosis) และโรคมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) แม้ว่าองค์ความรู้ทางด้านชีววิทยาของไวรัสตับอักเสบบีมีการศึกษาอย่างละเอียดและยาวนาน อย่างไรก็ตามความเข้าใจเกี่ยวกับวงจรชีวิต (life cycle) ของไวรัสและการมีปฏิสัมพันธ์กับระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ยังขาดความรู้ ความเข้าใจที่สมบูรณ์ เนื่องมาจากการขาดแบบจำลองที่ดีในการศึกษาไวรัสในระดับเซลล์ แม้ว่าปัจจุบันมีรายงานถึงความสามารถในการใช้เซลล์ตับเพาะเลี้ยงทดสอบการติดเชื้อแต่ยังไม่มีรายงานถึงความสำเร็จในการผลิตไวรัสออกมาจากเซลล์ตับเพาะเลี้ยง

เซลล์ตับเป็นเซลล์เป้าหมายในการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบี เซลล์ตับที่พัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิดชนิดโอพีเอส (IPS cell) มีความเหมาะสมที่จะนำมาศึกษาการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในระยะพักตัวเนื่องจากเซลล์ชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็นเซลล์ปกติและมีการรายงานถึงความสามารถในการติดเชื้อไวรัสในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามกลไกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและการตอบสนองของเซลล์ อาจจะมีส่วนเสริมการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาทดลองอย่างชัดเจนในประเด็นที่กล่าวมา ความเข้าใจกระบวนการติดเชื้อไวรัสในเซลล์ตับและการตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายอาจจะนำไปสู่เป้าหมายใหม่ๆ ในการป้องกันหรือกำจัดไวรัสตับอักเสบบีในอนาคต

Cytokine-induced killer cell หรือ CIK cell เป็นเซลล์ที่พัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดขาว PBMC (peripheral blood mononuclear cell) ด้วยการให้ cytokine ชักนำให้เจริญไปเป็น CIK cell เซลล์ชนิดนี้ประกอบด้วยกลุ่มประชากรของ T cell และ NK cell ($CD3^+CD56^+$) ซึ่ง CIK cell สามารถทำลายเซลล์เป้าหมายหรือเซลล์ติดเชื้อไวรัสโดยไม่ต้องอาศัยการจดจำแอนติเจนจาก MHC กลไกนี้เรียกว่า adoptive immune transfer หรือภูมิคุ้มกันที่ได้รับการถ่ายทอดมาและยังมีความสำคัญในการลดปริมาณของไวรัสตับอักเสบบีในเลือดของผู้ป่วยไวรัสบีเรื้อรัง (chronic hepatitis B patients) ปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกที่ชัดเจนว่าเพราะเหตุใด CIK เซลล์จึงมีส่วนในการลดปริมาณของไวรัสในผู้ป่วยเรื้อรัง โดยคาดว่าอาจจะเกิดจาก CIK เซลล์ไปทำลายเซลล์ตับที่ติดเชื้อไวรัสที่กำลังเกิดกระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัส ดังนั้นเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการทำลายเซลล์ตับที่ติดเชื้อไวรัสด้วย CIK cell

โครงการศึกษาวิจัยนี้มุ่งเน้นในการพัฒนาแบบจำลองศึกษาการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและจากนั้นทดสอบผลในการตอบสนองของภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ โดยเซลล์ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ได้แก่เซลล์ตับที่พัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิด (hepatocyte-like cell) และเซลล์มะเร็งตับ HepaRG เริ่มจากนำเซลล์ทั้งสองชนิดมาทดสอบการติดเชื้อด้วยการบ่มร่วมกับพลาสมาของผู้ป่วยที่มีปริมาณไวรัสมากกว่า 1 ล้าน IU/mL ทดสอบยืนยันผลการติดเชื้อในเซลล์ตับด้วยวิธีการตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสในเซลล์ HBV DNA / cccDNA โปรตีนของไวรัส HBV core antigen และ HBV surface antigen สามารถตรวจวัดปริมาณสารพันธุกรรมและโปรตีนของไวรัสทั้งในเซลล์และในอาหารเลี้ยงเซลล์ติดเชื้อ และเมื่อทดสอบยาต้านไวรัสสามารถยับยั้ง HBV DNA และ HBsAg ในอาหารเลี้ยงเซลล์ติดเชื้อ ตรวจพบการตอบสนองของเซลล์ติดเชื้อด้วยการเพิ่มระดับของ TNF- γ , IFN- α IFN- β TGF- β และ miR-122 เมื่อนำเซลล์ติดเชื้อมาเลี้ยงร่วมกับเซลล์ CIK ด้วยอัตราส่วน 1.5:1 / 3:1 / 6:1 / 12:1 พบว่า CIK สามารถฆ่าเซลล์ที่ติดเชื้อได้ 80% 20% 5% และ 0% ในเซลล์ HepaRG ที่ติดเชื้อ HepaRG กลุ่มควบคุม HLC ติดเชื้อ และ HLC ปกติ ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความจำเพาะในการฆ่าเซลล์มะเร็งที่ติดเชื้อและ CIK ไม่ทำลายเซลล์ตับปกติ การทดสอบเบื้องต้นแสดงถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนา CIK เป็น HBV-infected cell therapy

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์ตับที่พัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิด HLCs เซลล์มะเร็งตับ HepaRG
2. เพื่อประเมินผลการทำลายเซลล์ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีด้วยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิด CIK cell และหาอัตราส่วนระหว่าง effectors cell (CIK) และเซลล์เป้าหมาย (infected-hepatocyte cell)

3. เครื่องมือและวิธีการดำเนินงาน (Materials and Methods)

3.1 การพัฒนา hepatocyte-like cell จากเซลล์ hiPS

นำเซลล์ iPS ที่ผ่านการตรวจสอบการแสดงออกของยีนแล้ว มาพัฒนาให้เป็นเซลล์ตับ ด้วยการนำมาเลี้ยงในภาชนะ 6 well-plate ที่เคลือบด้วย Geltrex ใน E8 medium ให้เจริญ 80% ของภาชนะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นใส่สารเคมีตามช่วงเวลาดังต่อไป เลี้ยงเซลล์ iPS ให้เป็น endoderm ด้วย DMEM/F12 : IMDM (1:1), 100 ng/mL activin A, 10 ng/mL bFGF, 10 ng/mL BMP-4, 1 μ M LY294002 และ 3 μ M CHIR99021 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น DMEM/F12: IMDM (1:1), 100 ng/mL activin A, 100 ng/mL bFGF, 10 ng/mL BMP-4 และ 1 μ M LY294002 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเซลล์พัฒนาเป็นเนื้อเยื่อชั้นในแล้ว พัฒนาเซลล์ให้ให้เป็นเนื้อเยื่อชั้นในส่วนหน้า (anterior definitive endoderm) ด้วยอาหาร RPMI/B27 with 50 ng/mL activin A เป็นเวลา 3 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกวัน พัฒนาเซลล์ให้เป็นเนื้อเยื่อตับด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI/B27, 20 ng/mL BMP-4 และ 10 ng/mL FGF10 เป็นเวลา 4 วัน โดยเปลี่ยนอาหารทุกวัน ขั้นตอนสุดท้ายพัฒนาเซลล์เป็นเซลล์ตับในอาหารเลี้ยงเซลล์ HBM, 30 ng/mL oncostatin M and 50 ng/mL HGF เป็นเวลา 10 วัน เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน

3.2 ตรวจสอบความสามารถในการสร้าง glycogen ด้วยวิธี Periodic acid-Schiff

เลี้ยงเซลล์คล้ายเซลล์ตับ (HLC) และเซลล์ hMSC ในภาชนะขนาด 35 มิลลิเมตรเป็นเวลา 3 วัน จากนั้น fix เซลล์ในสารละลาย 5 % formaldehyde, 95 % ethanol เป็นเวลา 1 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำประปาด้วยการปล่อยไหลผ่าน 1 นาที จุ่มในสารละลาย periodic acid solution เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จากนั้นนำไปจุ่มในสารละลาย Schiff's reagent เป็นเวลา 15 นาทีและนำมาล้างด้วยน้ำประปาด้วยการปล่อยไหลผ่าน 10 นาที นำมาย้อมนิวเคลียสด้วย Mayer's hematoxylin เป็นเวลา 1 นาทีก่อนตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.3 การตรวจสอบ marker ของเซลล์ตับและ Cytochrome P450

ทำการแยก mRNA ออกจากเซลล์ iPS HLC และ HepaRG ด้วยชุดสกัด RNA สำเร็จรูป นำ RNA ที่สกัดได้ มาสังเคราะห์เป็น cDNA ด้วยชุดทำ reverse transcription สำเร็จรูป (ImProm-II reverse transcription system) marker ของเซลล์ตับที่ตรวจสอบได้แก่ cytochrome P450 markers รวมทั้ง albumin, α -fetoprotein, cytokeratin18, G-6-PD, HNF-4 α , tyrosine aminotransferase นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการทำ PCR มาตรวจสอบความถูกต้องของ product size ด้วยวิธี gel electrophoresis

3.4 การย้อมเซลล์ด้วยเทคนิคภูมิโนวิทยา

เลี้ยงเซลล์ HLC และเซลล์ชนิดอื่นๆ ใน 24 well-plate จนเต็มผิวภาชนะ นำมา fix ด้วย 4% paraformaldehyde เป็นเวลา 10 นาที นำมาล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ทำการ block และ permeabilize เซลล์ด้วยสารละลาย 0.2 % Triton X-100, 3 % BSA เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นย้อมแอนติบอดีแต่ละชนิดดังต่อไปนี้ แอนติบอดีสำหรับ pluripotent markers TRA-1-60, SSEA4, NANOG, OCT4. แอนติบอดี สำหรับตรวจสอบ HCV cell receptors ได้แก่ claudin-1, occluding, CD81, SR-BI และ hepatitis C core antigen แอนติบอดีสำหรับ non-structural proteins of HCV ได้แก่ NS3, NS5A และ NS5B ย้อมเซลล์ด้วยการบ่มแอนติบอดีร่วมกับเซลล์ที่ 4°C ทิ้งไว้ข้ามคืน นำมาล้างด้วย PBS 3 ครั้ง และย้อมสีด้วย secondary

แอนติบอดี Alexa fluor 488 conjugated goat anti-mouse IgG หรือ Alexa fluor 488 conjugated goat anti-rabbit IgG หรือ Alexa fluor 488 conjugated rabbit anti-goat IgG เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 37°C จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS 3 ครั้ง นำไปย้อมด้วย DAPI และ mount ด้วย coverslip นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.5 ตรวจสอบการแสดงออกของ HBV receptor ในเซลล์ HLC

รีเซปเตอร์ของไวรัสตับอักเสบนิตซีที่นำมาทดสอบคือ NTCP, HSPG และ LDL-R การแสดงออกของรีเซปเตอร์ ด้วยวิธี RT-PCR และวิธีย้อมด้วยอิมมูโนวิทยา นำเซลล์ HLC มาเลี้ยงในภาชนะ 24-well plate และเลี้ยงเซลล์ให้เจริญถึง 80% ของภาชนะ นำเซลล์มา fix และย้อมด้วยแอนติบอดีตามรายละเอียดที่แสดงไว้ข้างต้น

3.6 การเก็บตัวอย่างไวรัส HBV จากอาหารเลี้ยงเซลล์ HepG2.2.15

อนุภาคไวรัสตับอักเสบนิตซีสามารถเก็บรวบรวมมาจากอาหารเลี้ยงเซลล์ของ HepG2.2.15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะใส่ G418 เป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้คัดเลือกเซลล์ที่มีพลาสมีดของ HBV อยู่ในเซลล์และสามารถผลิตอนุภาคของไวรัสออกสู่อาหารเลี้ยงเซลล์ได้ ก่อนเก็บรวบรวมอาหารเลี้ยงเซลล์มาตกตะกอนไวรัสให้มีความเข้มข้นมากขึ้นด้วย concentrator ให้เข้มข้นขึ้น 100 เท่าก่อนนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -70°C

3.7 ทดสอบการติดเชื้อของไวรัสตับอักเสบนิตซีในเซลล์ HLC

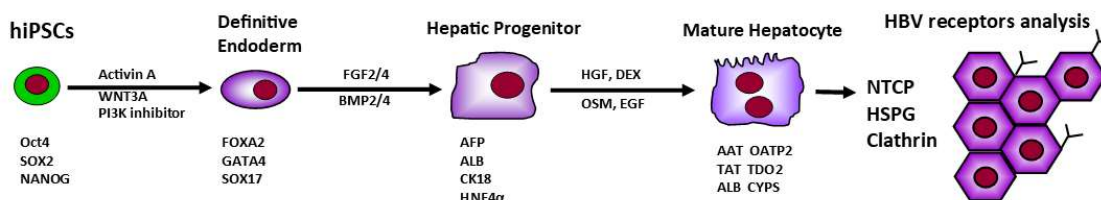
นำตัวอย่างไวรัสตับอักเสบนิตซีที่ใช้ทดสอบเซลล์ติดเชื้อนำมาจากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่เหลือจากการตรวจหาปริมาณไวรัสที่ รพ. รามาธิบดี การใช้ตัวอย่างเลือดได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี ตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วยที่มีปริมาณไวรัสมากกว่า 10⁶ IU/mL จะถูกนำมาใช้ทดสอบการติดเชื้อในเซลล์หรือใช้ตัวอย่างไวรัสที่ได้จากเซลล์ HepG2.2.15 ขั้นตอนการทดสอบเริ่มจากเลี้ยงเซลล์ Huh7 และ HLC ในภาชนะ 6 well-plateจนมีปริมาณเซลล์มากกว่า 80% นำพลาสมาที่มีไวรัสตับอักเสบนิตซี 50 µL หรือตัวอย่างไวรัสจาก HepG2.2.15 ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1 มล. จากนั้นนำไปบ่มร่วมกับเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจหาปริมาณไวรัสและทดสอบการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง ด้วย absolute real-time PCR assay

3.8 การเตรียมเซลล์ CIK เพื่อทดสอบความสามารถในการกำจัดเซลล์ติดเชื้อ HBV

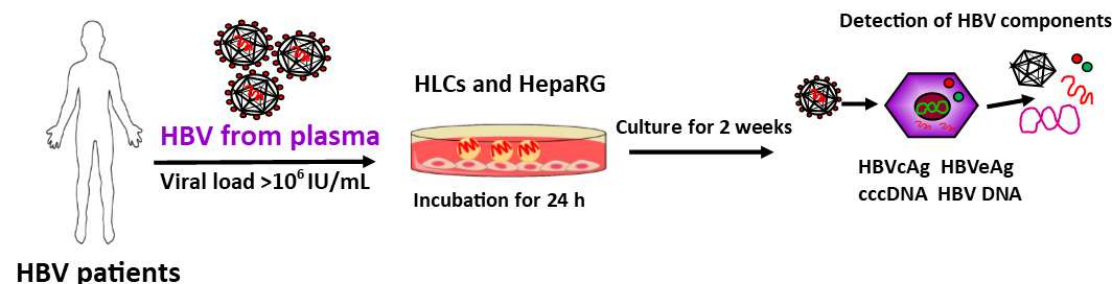
เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้บริจาคปริมาณ 10 มล. นำมาแยก PBMC ด้วยวิธี gradient centrifugation จะได้เซลล์ lymphocytes นำมาเลี้ยงในอาหาร RPMI ที่ผสม IFN-γ ในช่วงวันแรก จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหาร RPMI ที่ผสม OKT-3 และ IL-2 อีก 1 วัน และเลี้ยงเซลล์ที่อาหารที่มีเฉพาะ IL-2 จนครบ 21 วัน จะได้เซลล์ CIK นำเซลล์ที่ได้มาเลี้ยงร่วมกับเซลล์ติดเชื้อ HBV ในอัตราส่วน CIK : hepatocyte (E:T ratio) 12.5:1 6.25:1 3.125 และ 1.5625 เซลล์ เมื่อครบ 1 วันนำมาหาอัตราการกำจัดเซลล์ติดเชื้อด้วยวิธี PI assay

แผนภาพสรุปการทดลองทั้งหมดแสดงไว้ในรูปที่ 1

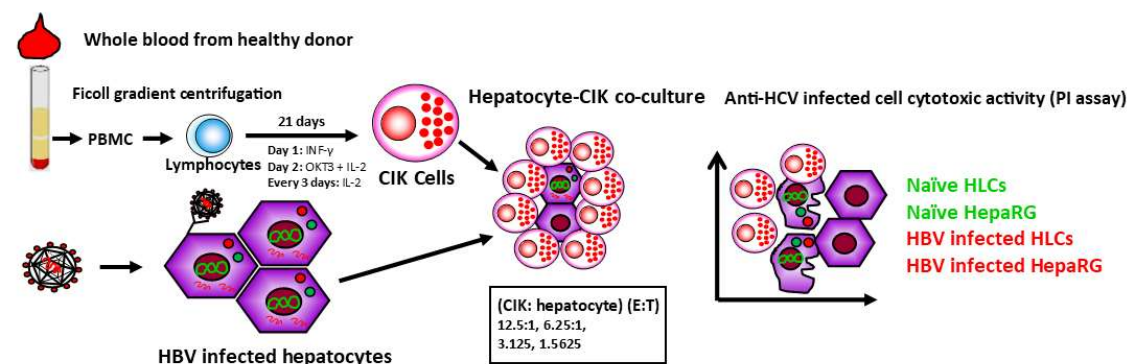
1. Differentiation of hiPSCs to hepatocyte-like cells



2. Infection of HBV from patient serum to hepatocyte-like cells



3. Generation of CIK cell and co-culture with HBV infected hepatocytes

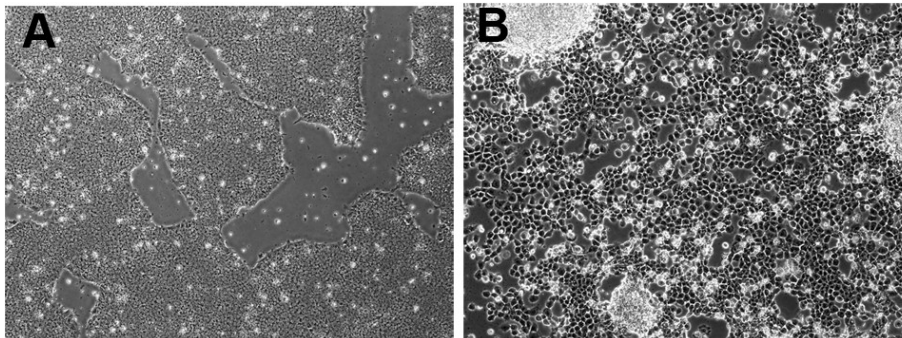


รูปที่ 1 แผนภาพสรุปแสดงวิธีการทดลองการพัฒนาเซลล์ตับจากเซลล์ต้นกำเนิด การทดสอบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและการทดสอบความสามารถในการกำจัดเซลล์ตับติดเชื้อไวรัสด้วยเซลล์ CIK

4. ผลการทดลอง

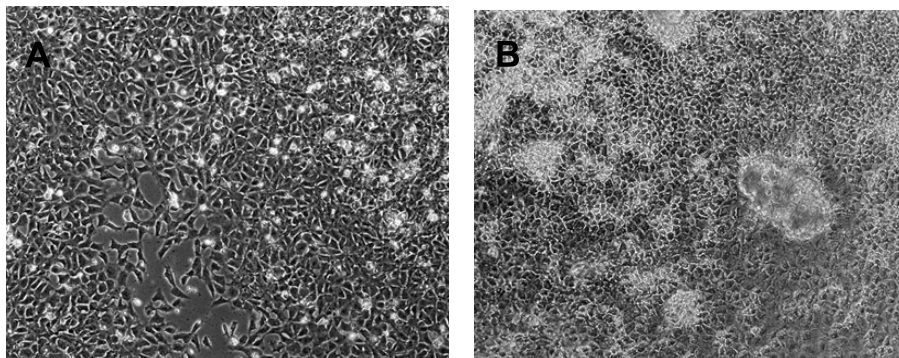
4.1 การพัฒนาเซลล์ตับ hepatocyte-like cell จาก iPS cell

การพัฒนาเซลล์ตับเริ่มจากการชักนำให้เซลล์ iPS เปลี่ยนไปเป็นเซลล์ endoderm ด้วย growth factors กลุ่มของ cytokines และสารเคมีดังนี้ วันที่ 1 ใช้ CDM-PVA + 100 ng/ml Activin A and bFGF, 10 ng/mL BMP4, 10 μM LY294002, 3 μM CHIR99021 และวันที่ 2 ใช้ cytokines ดังต่อไปนี้ CDM-PVA + 100 ng/ml Activin A and bFGF, 10ng/mL BMP-4, 10 μM LY294002 เมื่อครบกำหนดเวลา 2 วันเซลล์ iPS มีการเปลี่ยนรูปร่างเป็นไปตามรูปที่ 2



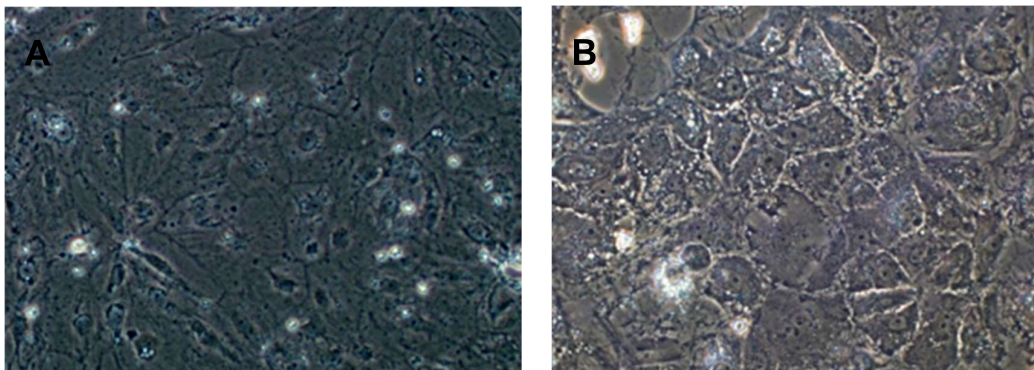
รูปที่ 2 iPS cell เริ่มต้นการ differentiation (A) และหลังจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเนื้อเยื่อ endoderm เมื่อชักนำให้เกิดการพัฒนาด้วย cytokine และสารเคมี วันที่ 1-2 (B)

วันที่ 3 ของการเจริญพัฒนาเซลล์ iPS ให้เปลี่ยนเป็นเซลล์ตับ ใช้ growth factors และกลุ่มของ cytokines ดังต่อไปนี้ RPMI-B27 + 100 ng/ml Activin A and bFGF, 10 ng/mL เป็นเวลา 1 วันจากนั้นเปลี่ยนสารในการชักนำเซลล์เป็น RPMI-B27 + 50 ng/ml Activin A เป็นระยะเวลา 3 วัน. ในขั้นตอนนี้มุ่งเน้นที่จะเปลี่ยนแปลงเซลล์จากเนื้อเยื่อ endoderm ให้กลายเป็น Anterior Definitive Endoderm เป็นลำดับการเจริญพัฒนาของเซลล์ตับรูปร่างลักษณะของเซลล์เป็นไปตามรูปที่ 3 เซลล์เปลี่ยนรูปร่างจากลักษณะกลม เป็นลักษณะเรียวยาวขึ้นมีการเคลื่อนที่ออกมาบริเวณรอบ ๆ อย่างหลวม จากนั้นมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้นจนเต็มผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์และเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อในชั้น hepatic endoderm



รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ iPS เมื่อได้รับกระตุ้นให้เจริญพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อ Anterior definitive endoderm เซลล์รูปร่างคล้าย mesenchymal cell (A) และเปลี่ยนแปลงเป็น hepatic endoderm (B)

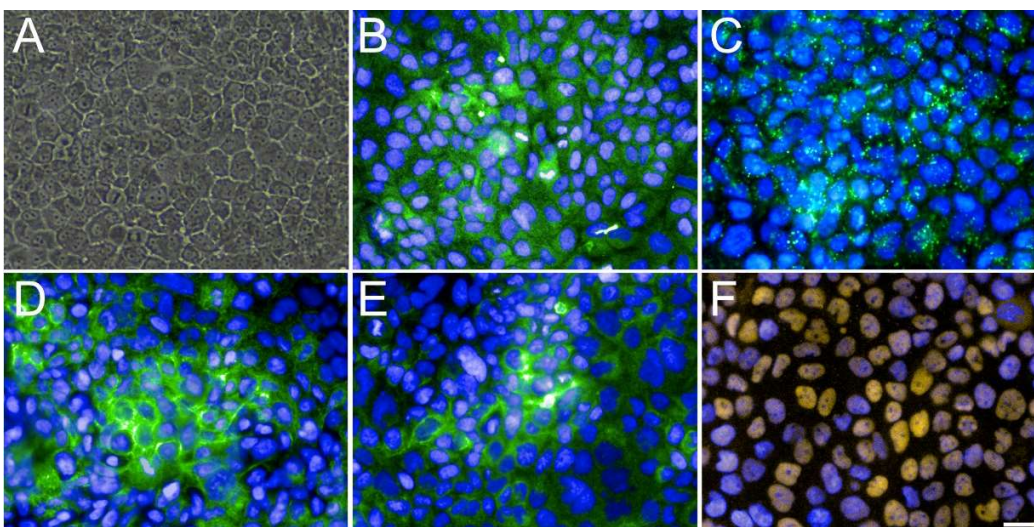
ขั้นตอนต่อไปคือการเปลี่ยนแปลงเซลล์ Anterior Definitive Endoderm ให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ตับในระยะเริ่มต้นหรือ hepatic endoderm ในการทดลองเราใช้สารที่ชักนำการเปลี่ยนแปลงดังต่อไปนี้ RPMI-B27 + 20 ng/ml BMP-4 and FGF10, 10 ng/mL และเมื่อครบกำหนดเวลา 4 วัน เราสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างเซลล์ได้ในลักษณะตามรูปที่ 4



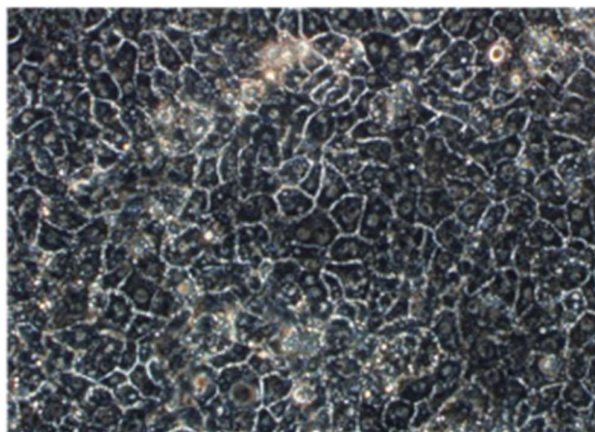
รูปที่ 4 รูปร่างของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปเป็น hepatic endoderm หรือเซลล์ตับในระยะเริ่มต้น (A) เซลล์มีนิวเคลียสที่ขยายขนาดเพิ่มขึ้นและเริ่มเปลี่ยนรูปร่างเป็น cord-like structure (B)

เมื่อเซลล์มีการพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อ hepatic endoderm ได้อย่างถูกต้องแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการเปลี่ยนแปลงให้เซลล์เป็นเซลล์ตับที่สมบูรณ์ เราจะใช้สารเคมีและกลุ่มของ cytokines ดังต่อไปนี้ HBM + 50ng/ml HGF and OSM, 30ng/mL เมื่อครบกำหนดเวลา 15 วันเราสามารถตรวจพบลักษณะของเซลล์ตับที่สมบูรณ์ได้ดังรูปที่ 5-6

เพื่อเป็นการยืนยันว่าเซลล์ iPS เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ตับได้อย่างถูกต้อง จะทำการย้อมเซลล์ขณะเจริญพัฒนาด้วย antibody ที่มีความจำเพาะกับ endoderm marker ได้แก่ SOX17 และ AFP ซึ่งเมื่อพิจารณาจากผล immunofluorescence ในรูปที่ 4-5 พบว่าเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อ endoderm ได้สมบูรณ์นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบการแสดงออกของโปรตีนที่มีความจำเพาะกับเซลล์ตับคือพบว่าเซลล์ที่พัฒนาสามารถสร้าง albumin ในปริมาณมากกว่า 90% เมื่อพิจารณาจากรูปที่ 4-5 เมื่อเราย้อมเซลล์ด้วย antibody ที่มีสามารถจับกับ tight junction สามารถตรวจสอบโปรตีน NTCP ที่เป็น transporter ที่มีการแสดงออกเฉพาะในเซลล์ตับและ tight junction ดังกล่าวมีความจำเป็นสำหรับการติดเชื้อ HBV ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง



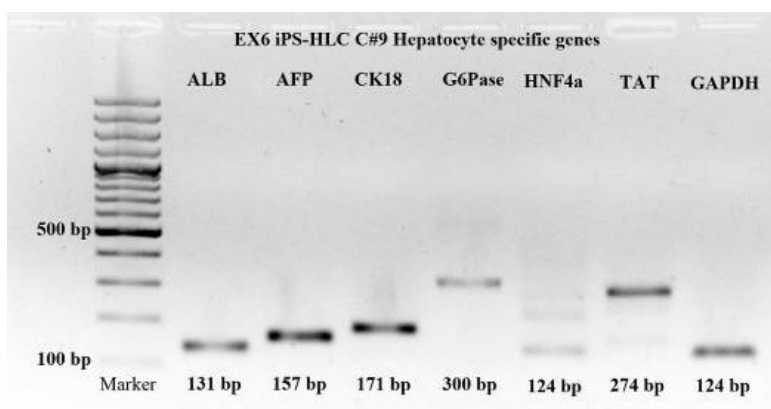
รูปที่ 5 ผลการย้อมเซลล์ด้วย immunofluorescence ที่จำเพาะกับเซลล์ตับ phase contrast (A), albumin (B), alpha-fetoprotein (C), sodium taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP (D), Multi drug resistant protein 2, MRP2 (E) และ HNF4alpha (F) สีน้ำเงินคือลักษณะของนิวเคลียสของเซลล์ที่ย้อมสี DAPI



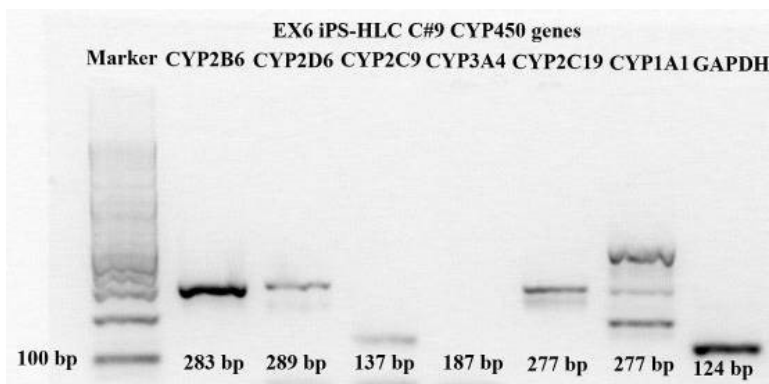
รูปที่ 6 รูปร่างของเซลล์ตับที่ผ่านกระบวนการ maturation มีลักษณะเซลล์หลายนิวเคลียส multi-nucleated cell ที่มีความเฉพาะนอกจากนั้นรูปร่างของเซลล์เหมือนกับ primary hepatocyte ที่แยกออกมาจากตับของคนปกติ ยังตรวจพบโครงสร้างของทางเดินน้ำดีหรือ cord-like structure บริเวณรอบ ๆ เซลล์

4.2 การตรวจสอบการแสดงออกของ hepatocyte-specific marker ในระดับยีนหรือ mRNA

การติดตามการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ตับ เราสามารถตรวจสอบได้จากระดับของ mRNA โดยวิธีการทำ real-time PCR เริ่มจากการสกัด mRNA จาก hepatocyte-like cell จากนั้นสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA และทำ PCR ด้วย primer ที่จำเพาะกับ hepatocyte specific genes ได้ที่ได้เป็นไปตามรูปที่ 6-7 เราสามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน albumin, AFP, CK18, G6Pase, HNF4alpha, TAT นอกจากนี้เรายังสามารถตรวจสอบการแสดงออกของ CYP450 ที่มีความสำคัญในการ metabolite ยาอีกด้วย ดังรูปที่ 7-8



รูปที่ 7 Gel electrophoresis แสดงผลการแสดงออกของ hepatocyte-specific marker genes



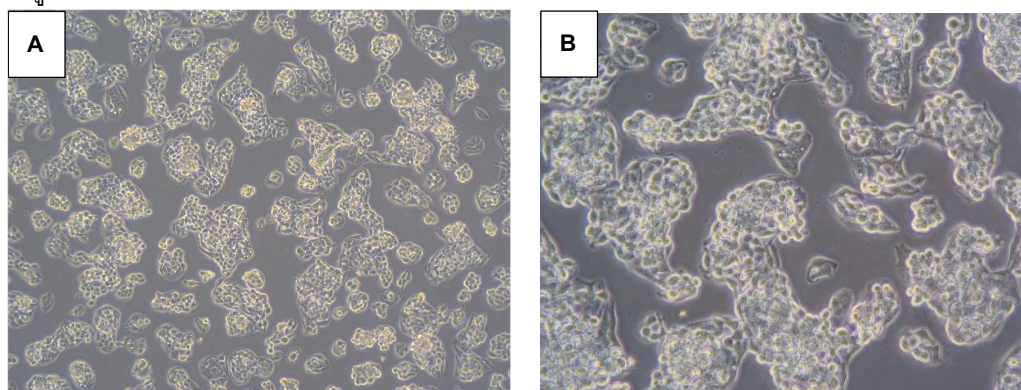
รูปที่ 8 Gel electrophoresis แสดงผลการแสดงออกของ cytochrome P450 (CYP450)

4.3 การเก็บตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วย Hepatitis B

ผู้วิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วยที่เข้ามารักษาไวรัสตับอักเสบบี โดยเก็บจากตัวอย่างเลือดที่เหลือจากการตรวจหาปริมาณไวรัส ภายหลังจากทราบปริมาณของไวรัส (viral load) เป็นที่เรียบร้อยแล้ว และเลือกตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่มีปริมาณไวรัสมากกว่า 1×10^6 IU/mL เพื่อ infect เซลล์ตับ สามารถเก็บตัวอย่างพลาสมาได้มากกว่า 20 ตัวอย่างและปริมาณไวรัสสูงสุดที่เก็บได้คือมากกว่า 1×10^8 IU/mL เพียงพอที่จะใช้ทดสอบการติดเชื้อในเซลล์

4.4 ผลิตอนุภาคไวรัส HBV จากเซลล์ HepG2.2.15

เนื่องจากไวรัสตับอักเสบบีจากพลาสมาของผู้ป่วยมีความแตกต่างกันในแต่ละราย ทั้งทางปริมาณของไวรัสและความสามารถในการติดเชื้อในเซลล์ตับ ผู้วิจัยวางแผนการทดลองเพื่อเก็บไวรัสจากเซลล์ที่ผลิต HBV คือ HepG2.2.15 เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการติดเชื้อเปรียบเทียบกับไวรัสที่แยกได้จากพลาสมาของผู้ป่วย เซลล์ HepG2.2.15 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.พญ. ญัฐธิยา หิรัญกาญจน์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในขั้นตอนการเก็บตัวอย่างไวรัสจากเซลล์ HepG2.2.15 เลี้ยงเซลล์ในอาหาร DMEM 10% FBS และ 300 μ g/mL G418 โดยรูปร่างของเซลล์ในระหว่างผลิตไวรัส แสดงไว้ในรูปที่ 9



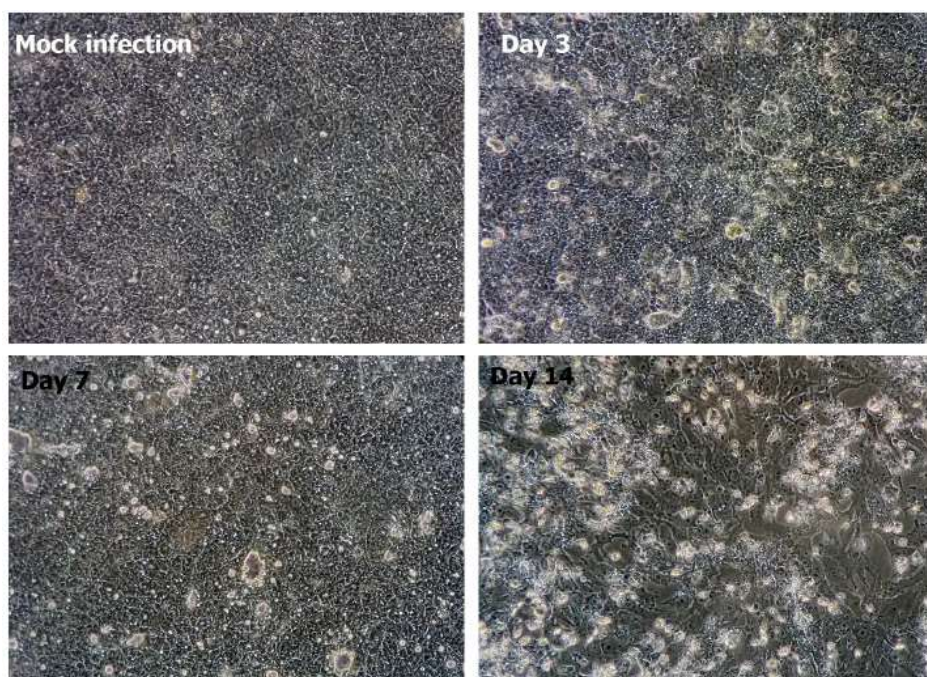
รูปที่ 9 เซลล์ HepG2.2.15 เลี้ยงในอาหาร DMEM 10% FBS และ 300 μ g/mL G418 ความหนาแน่น 50% confluence ที่กำลังขยาย 10x (A) และ 20x (B) ตามลำดับ

อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเลี้ยง HepG2.2.15 เป็นเวลา 3 วันหรือ condition medium จะถูกนำมาปั่นเพื่อแยกไวรัส HBV ด้วยวิธี gradient ultracentrifugation หรือปั่นแยกด้วย Concentrator (clontech) เพื่อ

ทำให้ความเข้มข้นของไวรัสเพิ่มขึ้น 100 เท่า นำตัวอย่างไวรัสไปแช่แข็งที่ -80°C หรือนำมาทดสอบการติดเชื้อในเซลล์ HLC และ HepaRG

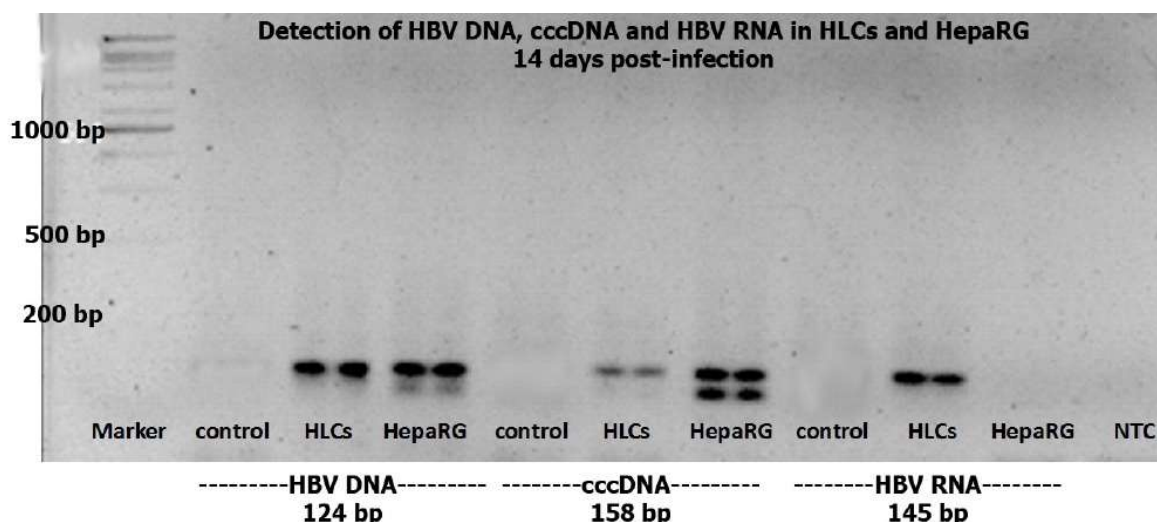
4.5 การทดสอบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในเซลล์ HLC และ HepaRG

นำเซลล์คล้ายเซลล์ตับ (HLC) ที่พัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิด iPSC และเซลล์มะเร็งตับ HepaRG มาเลี้ยงในภาชนะขนาด 12 well plate เป็นเวลา 2 วัน จนเต็มผิวภาชนะ จากนั้นใส่ตัวอย่างไวรัสในพลาสมาลงไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ 10% และ 20% โดยปริมาตร จำนวนไวรัสต่อ 1 หลุมมากกว่า 1 ล้าน UI/mL รูปร่างของเซลล์เมื่อได้รับการบ่มร่วมกับไวรัส ดังแสดงไว้ในรูปที่ 10 และเมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน สังเกตเห็นลักษณะเซลล์ตับที่ผิดปกติ เช่น syncytial cell พบ CPE จากเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่บ่มร่วมกับพลาสมาที่ปราศจากเชื้อไวรัส เมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน จะตรวจพบความผิดปกติของเซลล์มากขึ้นดังรูปที่ 10



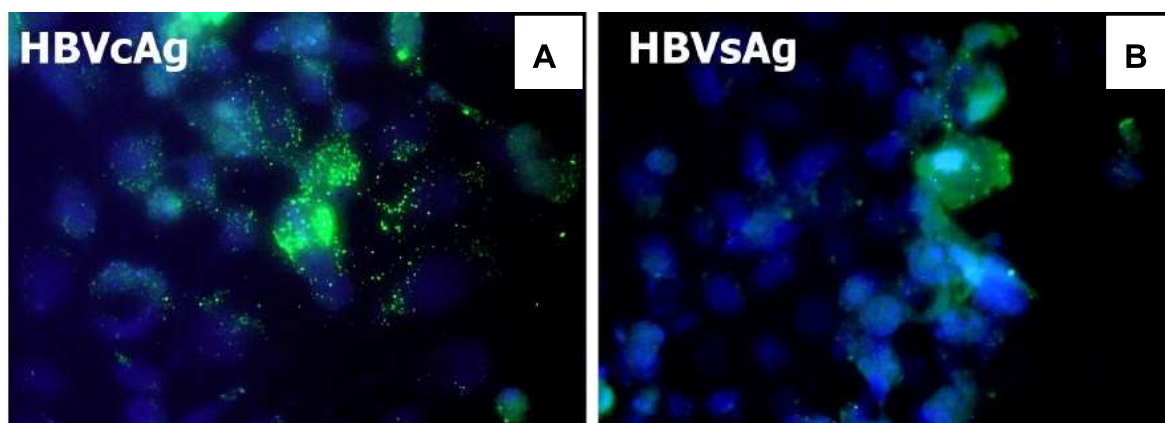
รูปที่ 10 รูปร่างของเซลล์ HLC เมื่อบ่มร่วมกับไวรัสตับอักเสบบีจากพลาสมาเป็นระยะเวลา 3 7 และ 14 วัน เปรียบเทียบกับเซลล์ที่บ่มร่วมกับพลาสมาของคนที่ระยะเวลา 14 วัน (mock infection)

เมื่อครบ 14 วัน นำเซลล์ที่ผ่านการบ่มร่วมกับไวรัสและเซลล์กลุ่มควบคุมมาสกัด genomic DNA และตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสในเซลล์ที่ติดเชื้อได้แก่การตรวจหา cccDNA และ HBV DNA และ HBV RNA ด้วยวิธี real-time PCR จากผลการทดลองสามารถตรวจพบการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัส HBV DNA และ cccDNA ในเซลล์ HLC และ HepaRG แต่สามารถตรวจพบเฉพาะ HBV RNA ในเซลล์ HLC เท่านั้น ดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 ผล gel electrophoresis ของยีน 3 ชนิด คือ HBV DNA cccDNA และ HBV RNA จาก real-time PCR products จากตัวอย่างเซลล์ HLC และ HepaRG ที่ติดเชื้อเป็นเวลา 14 วันหลังจากบ่มร่วมกับพลาสมาของผู้ป่วย

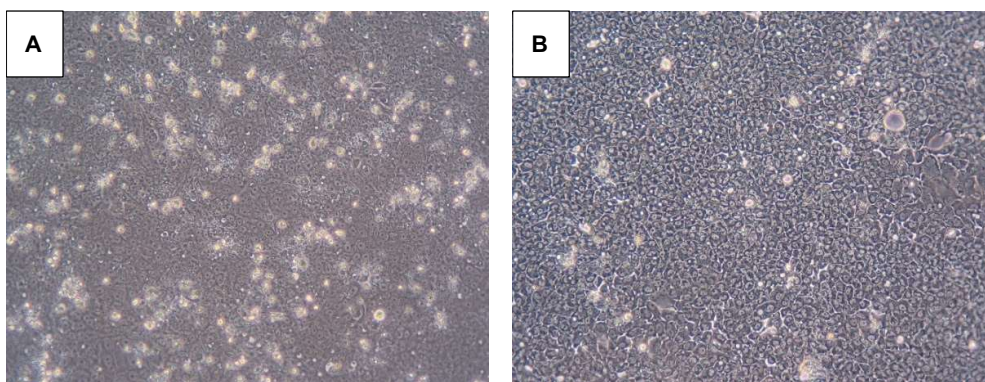
เมื่อนำตัวอย่างเซลล์ HLC ที่ผ่านการบ่มร่วมกับไวรัสเป็นเวลา 14 วันมาตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน HBV core antigen และ HBV surface antigen จะสามารถตรวจพบโปรตีนของไวรัสในไซโตพลาสซึมของเซลล์ติดเชื้อ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 12 จากผลการทดลองสามารถยืนยันได้ว่าเซลล์ HLC และเซลล์ HepaRG สามารถติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่แยกมาจากพลาสมาของผู้ป่วย โดยมีการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสและมีการผลิตโปรตีน การทดลองในขั้นตอนต่อไปคือทดสอบการสร้างอนุภาคไวรัสในเซลล์และการปลดปล่อยไวรัสออกจากเซลล์ในอาหารหรือเรียกว่า viral load



รูปที่ 12 ผลการย้อมโปรตีน HBV core antigen (A) และ HBV surface antigen (B) ในเซลล์ HLC ที่ผ่านการบ่มร่วมกับตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบี รูปแสดงนิวเคลียส (DAPI) HBVcAg และ HBVsAg (Alexa flour 488)

4.6. เพิ่มความสามารถในการติดเชื้อไวรัส HBV ในเซลล์ HLC และ HepaRG

การทดลองเบื้องต้นพบว่าความสามารถในการติดเชื้อ HBV ในเซลล์ HLC และ HepaRG จากพลาสมาของผู้ป่วยมีประสิทธิภาพต่ำ ผู้วิจัยปรับปรุงวิธีการติดเชื้ออีกครั้งด้วยการบ่มเซลล์ทั้ง 2 ชนิดในอาหารเลี้ยงเซลล์ William medium E 10% FBS และ 2% DMSO เพื่อกระตุ้นให้เซลล์ตับ maturation เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนการ infect ด้วยไวรัส ลักษณะของเซลล์ที่ผ่านการบ่มใน 2% DMSO แสดงไว้ในรูปที่ 13

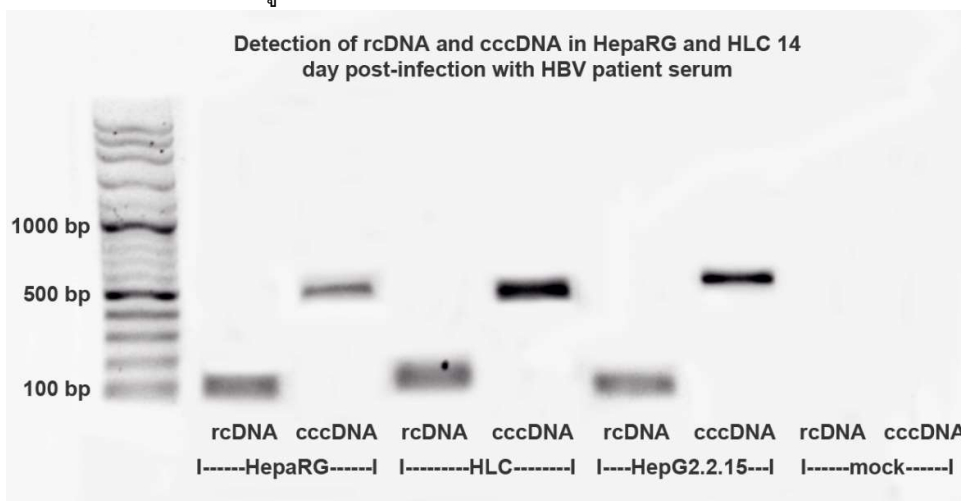


รูปที่ 13 แสดงลักษณะของเซลล์ HepaRG (A) และเซลล์ HLC (B) เมื่อผ่านการบ่มร่วมกับ 2% DMSO เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อพัฒนาให้เซลล์มีลักษณะคล้าย hepatic triad เพิ่มประสิทธิภาพการติดเชื้อ HBV

พัฒนาขั้นตอนการ infect ไวรัส ประกอบด้วยการใส่ตัวอย่างไวรัสลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับ polyethylene glycol 8000 (PEG8000) ความเข้มข้น 4% บ่มร่วมกับไวรัสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ก่อนเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องเป็นเวลา 7 โดยเปลี่ยนอาหารอีกครั้งในวันที่ 7 เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อตรวจหาปริมาณไวรัสที่เพิ่มจำนวนในเซลล์

4.7 การตรวจหา HBV DNA และ cccDNA ในเซลล์ HLC และ HepaRG ที่ผ่านการติดเชื้อ HBV

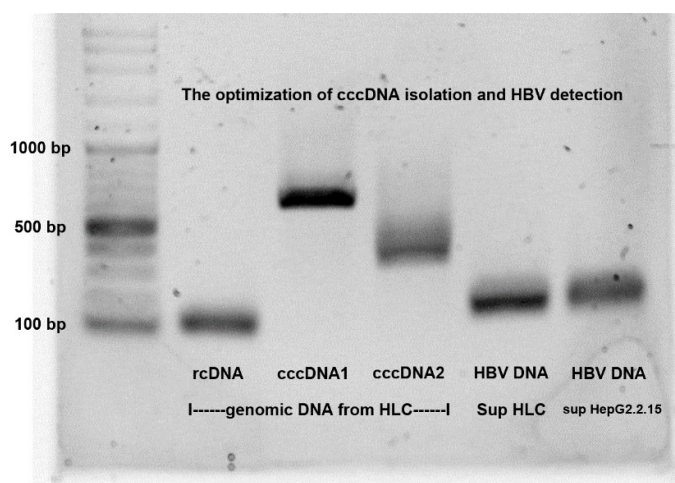
เนื่องจาก cccDNA เป็นสารพันธุกรรมที่แสดงถึงความสามารถในการติดเชื้อ HBV และการเพิ่มจำนวนในเซลล์ตับทางผู้วิจัยได้ ออกแบบ primer ชุดใหม่เนื่องจากชุดเดิมสามารถจับกับสารพันธุกรรมของเซลล์เจ้าบ้าน ทำให้ไม่สามารถแยกความเฉพาะของ PCR product ของไวรัสได้ นอกจากนั้นยังพัฒนาวิธีการแยก cccDNA ของไวรัสออกจากเซลล์ด้วยการย่อยสลาย DNA ของเซลล์เจ้าบ้านและแยก cccDNA ด้วยวิธีเดียวกับการสกัด plasmid จากแบคทีเรีย ผลการทดลองตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสด้วยการตรวจหา cccDNA และ HBV DNA แสดงไว้ในรูปที่ 14



รูปที่ 14 รูป gel electrophoresis แสดง PCR product ของ rcDNA cccDNA ที่แยกจากเซลล์ติดเชื้อ HLC HepaRG เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม HepG2.2.15 และ mock infection

เมื่อนำเซลล์ HLC ที่ผ่านการติดเชื้อไวรัสเป็นเวลา 2 สัปดาห์มาสกัด cccDNA ด้วยชุดสกัด plasmid DNA และเปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของ cccDNA ที่ได้โดยใช้ primer ชุดใหม่ที่ให้ขนาดของ product size

580 bp และของเดิม 350 bp พบว่าไม่มี band ที่เกิด non specific เกิดขึ้น ดังรูปที่ 15 นอกจากนั้นยังสามารถตรวจพบ HBV DNA ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่บ่มไว้กับเซลล์ติดเชื้อเวลา 14 วัน แสดงถึงการผลิตไวรัสขึ้นใหม่จากเซลล์ HLC

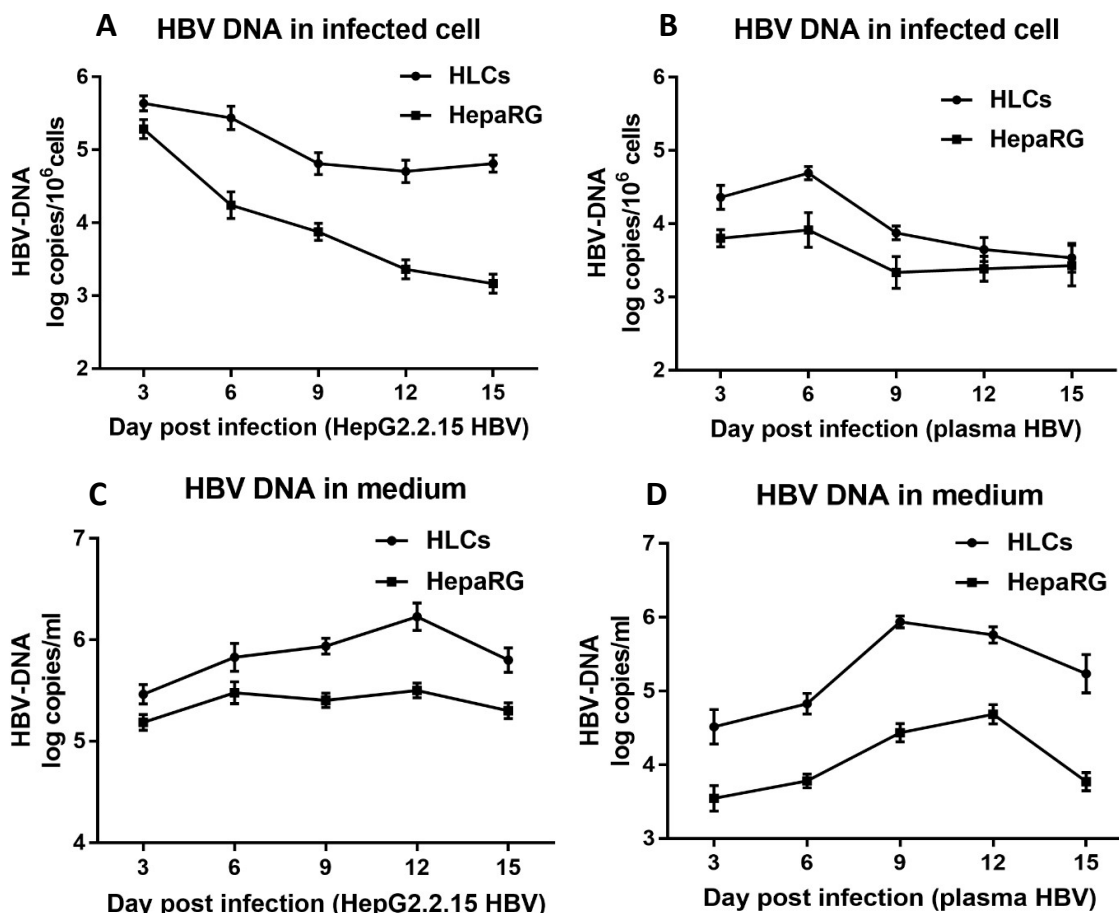


รูปที่ 15 รูป gel electrophoresis แสดง PCR product ของ rcDNA cccDNA ที่แยกจากเซลล์ติดเชื้อ HLC และสกัดจากอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน เปรียบเทียบกับไวรัสในอาหารเลี้ยงเซลล์ HepG2.2.15

4.8. การตรวจหาปริมาณไวรัสในเซลล์และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส Hepatitis B

เพื่อยืนยันความสามารถในการติดเชื้อไวรัสบีและความสามารถในการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์รวมทั้งปลดปล่อยไวรัสลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ หลังจากบ่มเซลล์ HLC และ HepaRG ร่วมกับไวรัสตับอักเสบบีชนิดบีจากตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วยหรือจากเซลล์ HepG2.2.15 นำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์และเซลล์ที่ติดเชื้อมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณไวรัสด้วยวิธี absolute real-time PCR ทุก ๆ วันที่ 3 6 9 12 และวันที่ 15 หลังการติดเชื้อไวรัส ตัวอย่างที่มาจากอาหารเลี้ยงเซลล์จะมาสกัดด้วยชุดสกัด DNA จากตัวอย่างเลือด ส่วนเซลล์ดับที่ติดเชื้อจะมาสกัดด้วยชุดสกัด genomic DNA จากเซลล์เพาะเลี้ยง ผลการทดลองที่ได้เป็นไปตามรูปที่ 16 A-D ถ้าพิจารณาจากผลการทดลองจะพบว่าเซลล์ HLC ที่ติดเชื้อไวรัสมีระดับ DNA ของ HBV อยู่ในเซลล์อยู่ประมาณ 10^5 - 10^6 copies ต่อจำนวนเซลล์ 10^6 เซลล์ ส่วนเซลล์ HepaRG มีระดับ HBV DNA อยู่ในเซลล์ตั้งแต่ 10^3 - 10^5 copies ต่อจำนวนเซลล์ 10^6 เซลล์ โดยระดับ HBV DNA จะสูงในช่วง 3 วันหลังจากติดเชื้อ จากนั้นระดับ DNA จะลดลงสู่ 10^3 ในช่วงวันที่ 15 หลังการติดเชื้อในรูป 15A ส่วนตัวอย่างเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจากพลาสมาของผู้ป่วยเซลล์ทั้งสองชนิดจะมีระดับ HBV DNA ในเซลล์ในช่วง 10^3 - 10^5 copies ต่อจำนวนเซลล์ 10^6 เซลล์ โดยเซลล์ HLC จะมีระดับของ HBV DNA สูงกว่าในช่วง 3-9 วันหลังติดเชื้อ หลังจากนั้นระดับของ HBV DNA จะลดลงมาใกล้เคียงกับ HepaRG ที่ระดับ 10^3 copies ต่อจำนวนเซลล์ 10^6 เซลล์ดังรูป 15B

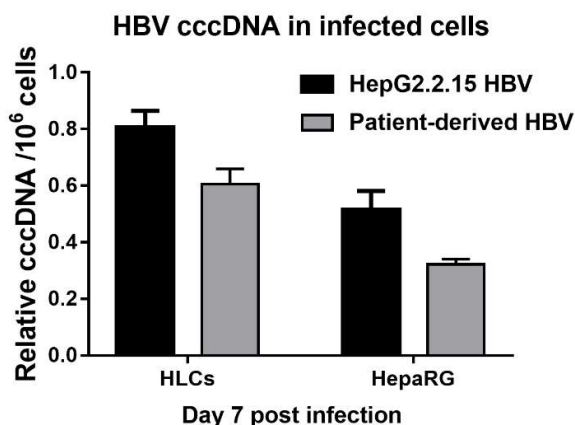
ในส่วนของระดับ HBV DNA ในอาหารเลี้ยงเซลล์ในเซลล์ดับที่ติดเชื้อไวรัส HBV จากเซลล์ HepG2.2.15 อยู่ในช่วง 10^5 - 10^6 copies ต่อปริมาตร 1 mL ทั้งเซลล์ HepaRG และเซลล์ HLC จะมีปริมาณไวรัสในอาหารเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 3-12 หลังการติดเชื้อ จากนั้นปริมาณของไวรัสจะลดลงเล็กน้อยในวันที่ 15 ในกลุ่มอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการติดเชื้อมาแสดงไว้ในรูป 16C เมื่อพิจารณาจากกลุ่มเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจากพลาสมาของผู้ป่วยระดับของ HBV DNA จะอยู่ในช่วง 10^3 - 10^4 copies ต่อปริมาตร 1 mL ในช่วง 3-6 วันหลังจากติดเชื้อ หลังจากนั้นปริมาณไวรัสจะเพิ่มขึ้นถึงระดับ 10^6 copies ต่อปริมาตร 1 mL ในเซลล์ HLC และลดลงเล็กน้อยในวันที่ 15 ส่วนเซลล์ HepaRG ระดับของ HBV DNA จะลดลงต่ำกว่า 10^4 /mL ในวันที่ 15 หลังการติดเชื้อมาแสดงไว้ในรูปที่ 16D



รูปที่ 16 ระดับของ HBV DNA ในเซลล์ HepaRG และ HLC ที่ผ่านการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบนชนิดบี ในช่วงระยะเวลา 3 6 9 12 และ 15 วัน ระดับ HBV DNA ในเซลล์ที่ติดเชื้อ HBV จากเซลล์ HepG2.2.15 และจากพลาสมาของผู้ป่วย (A, B) ระดับ HBV DNA ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ติดเชื้อ HBV จากเซลล์ HepG2.2.15 และจากพลาสมาของผู้ป่วย (C, D)

4.9 การตรวจหาระดับ cccDNA ในเซลล์ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบนชนิดบี

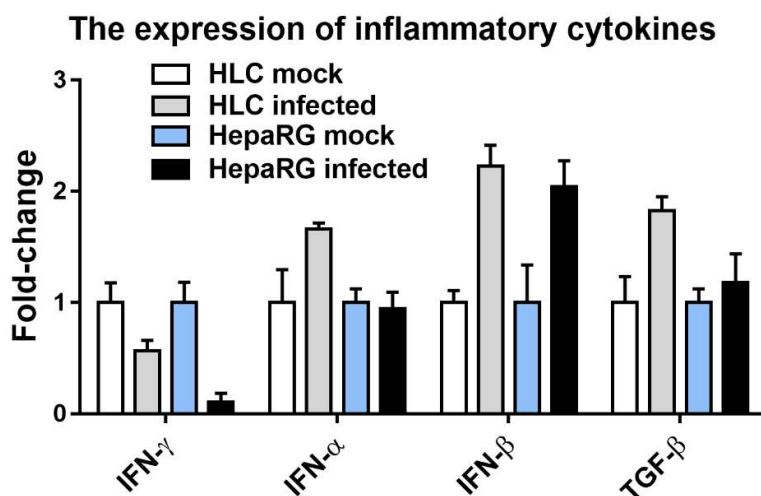
covalently closed circular DNA หรือ cccDNA เป็นโครงสร้าง DNA ที่พบในนิวเคลียสของเซลล์ตับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบนชนิดบี ทำหน้าที่เป็น DNA แม่แบบในการสังเคราะห์สารพันธุกรรมของไวรัสชนิดต่าง ๆ เช่น HBV DNA และส่วนประกอบของโปรตีนที่สำคัญของไวรัส ได้แก่ HBVsAg HBVeAg และ HBV core antigen รวมทั้งอนุภาคของไวรัส ในการทดลองนี้ต้องการเปรียบเทียบปริมาณของ cccDNA ที่สร้างขึ้นในเซลล์ HepaRG และ HLC ที่ผ่านการติดเชื้อระยะเวลา 7 วัน เพื่อเปรียบเทียบระดับของ cccDNA ในเซลล์ทั้งสองชนิดและเปรียบเทียบความสามารถในการติดเชื้อไวรัสที่ได้จากเซลล์ HepG2.2.15 และไวรัสที่ได้จากพลาสมาของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ จากการทดลองพบว่าระดับของ cccDNA ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสบีจาก HepG2.2.15 จะสูงกว่าเซลล์ที่ติดเชื้อจากตัวอย่างซีรัมจากผู้ป่วยและเซลล์ระดับของ HBV cccDNA ในเซลล์ HLC จะสูงกว่าในเซลล์ HepaRG ที่ผ่านการติดเชื้อไวรัสในทั้งสองกลุ่มทดลองดังรูปที่ 17



รูปที่ 17 ระดับของ cccDNA ในเซลล์ HepaRG และ HLC ที่ติดเชื้อ HBV จาก HepG2.2.15 และ patient-derived HBV เป็นเวลา 7 วัน โดยเทียบกับจำนวน HBV RNA ในเซลล์ที่ติดเชื้อจากเซลล์จำนวน 10⁶ cells

4.10 การตรวจหาระดับของ TNF- γ , IFN- α , IFN- β และ TGF- β ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส HBV

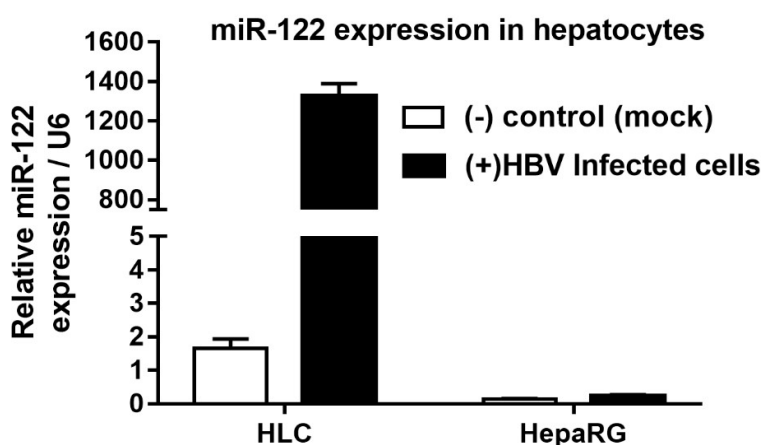
ความสามารถในการตอบสนองของ innate immune response ของเซลล์ตับเมื่อติดเชื้อไวรัสเป็นกลไกที่สำคัญในการยับยั้งการแพร่กระจายของไวรัสไปยังเซลล์ข้างเคียง เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติดังกล่าวนี้ นำเซลล์ HLC และเซลล์ HepaRG ที่ผ่านการติดเชื้อไวรัสเป็นเวลา 7 วัน มาสกัด RNA และตรวจวัดการแสดงออกของกลุ่ม cytokine ด้วยวิธี real-time PCR จากการทดลองพบว่าการแสดงออกของยีน IFN- α , IFN- β และ TGF- β ในเซลล์ HLC เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ 1.5 – 2 เท่าเทียบกับกลุ่ม mock ส่วนในเซลล์ HepaRG พบการเพิ่มขึ้นยีน IFN- β และ TGF- β 2 เท่าและ 1.2 เท่าตามลำดับและยีนที่ลดการแสดงออกเมื่อเซลล์ติดเชื้อไวรัสคือ IFN- α ในเซลล์ HLC และ HepaRG ลดลงเท่ากับ 0.5 และ 0.1 เท่าตามลำดับแสดงไว้ในรูป 18



รูปที่ 18 การแสดงออกของกลุ่ม inflammatory cytokines ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีหลังติดเชื้อเป็นเวลา 7 วันเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (mock infection)

4.11 การตรวจหาระดับ miR-122 ในเซลล์ที่ติดไวรัส HBV

ไมโครอาร์เอ็นเอ 122 หรือ miR-122 เป็น RNA เป็น RNA ที่มีความสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมของไขมันในเซลล์ตับ นอกจากนั้นมีการรายงานถึงผลกระทบของไวรัสต่อการแสดงออกของ miR-122 ว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ HBV และ HCV จะพบการลดลงของ miR-122 ในกลุ่มของเซลล์มะเร็งตับเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ และจะเพิ่มการแสดงออกขึ้นเมื่อเซลล์ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี การทดลองส่วนนี้ต้องการทดสอบความสามารถในการเพิ่มระดับ miR-122 ในเซลล์ HLC เมื่อติดเชื้อไวรัสเป็นเวลา 7 วัน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของ miR-122 ในกลุ่มเซลล์ติดเชื้อมากถึง 1300 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อ เมื่อตรวจวัดการแสดงออกของ miR-122 ในเซลล์ HepaRG จะไม่พบการแสดงออกเนื่องจากเซลล์ HepaRG มีคุณสมบัติเป็นเซลล์มะเร็ง การทดลองนี้เปรียบเทียบการแสดงออกของ RNA กับ U6 RNA ซึ่งจัดเป็น housekeeping RNA ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 19

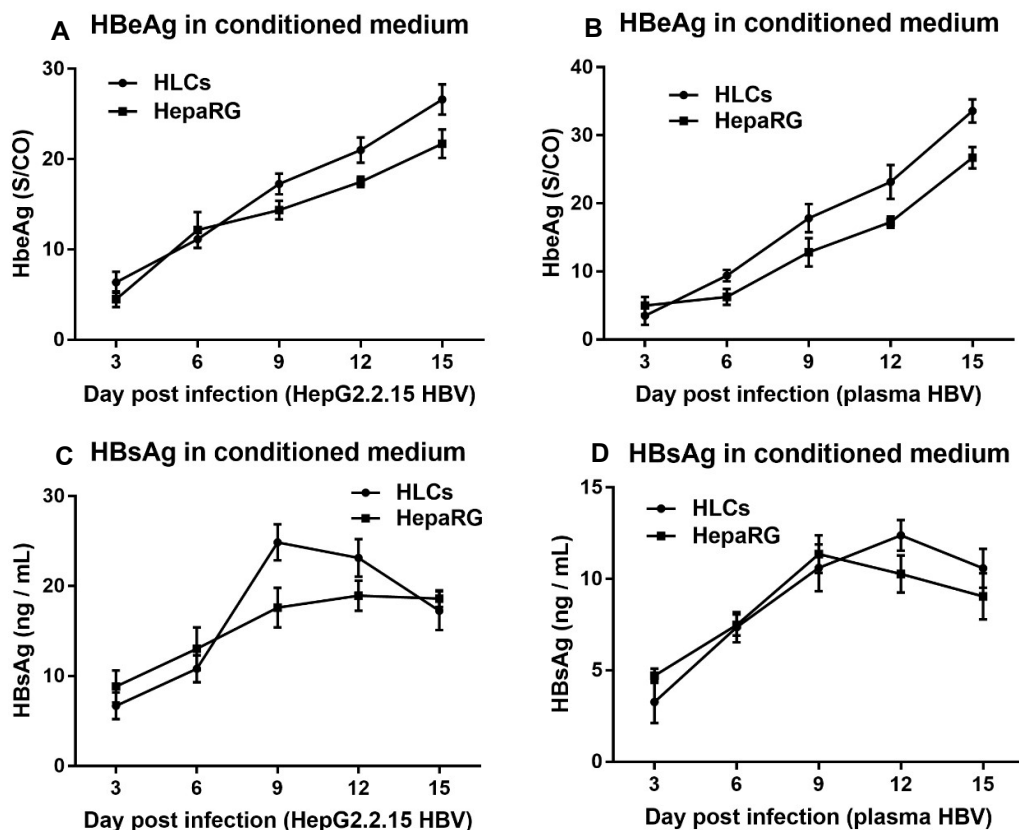


รูปที่ 19 ระดับการแสดงออกของยีน microRNA 122 (miR-122) ในเซลล์ตับทั้งสองชนิดที่ติดเชื้อไวรัสเป็นเวลา 7 วันเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติและเทียบการแสดงออกของยีนด้วยปริมาณ RNA ของ U6

4.12 ระดับของโปรตีน hepatitis B surface antigen (HBsAg) และ hepatitis e antigen

(HBeAg) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการติดเชื้อไวรัส

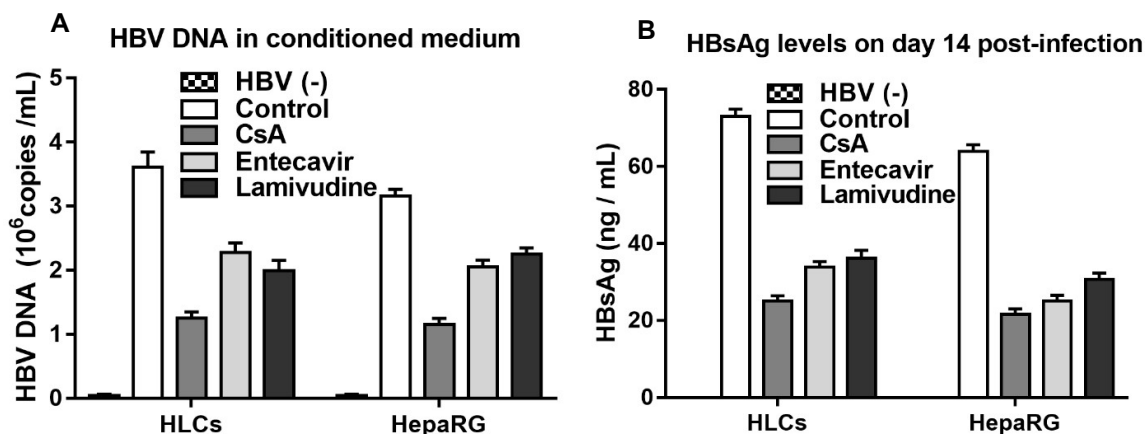
โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นแอนติเจนของไวรัสคือ HBsAg และ HBeAg เป็นดัชนีชี้วัดที่สำคัญในการติดเชื้อของเซลล์ตับและการปลดปล่อยไวรัสลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ นอกจากนั้น HBeAg เป็นตัวชี้วัดการติดเชื้อแบบเรื้อรังในเซลล์ตับ เพื่อเป็นการพิสูจน์ว่าเซลล์คล้ายเซลล์ตับ HLC มีความสามารถในการรองรับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและสามารถเป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ผลิตโปรตีนของไวรัสลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ การทดลองนี้ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสในวันที่ 3 6 9 12 และ 15 วันมาตรวจวัดปริมาณของโปรตีนแอนติเจนทั้ง 2 ชนิด ด้วยวิธี ELISA ผลการทดลองแสดงให้เห็นการเพิ่มขึ้นของระดับ HBsAg ในอาหารเลี้ยงเซลล์ HLC 5-18 S/CO (signal to cutoff ratio) ในช่วง 3 วันแรก 5 และสูงสุดในวันที่ 15 ซึ่งระดับใกล้เคียงกับเซลล์ HepaRG ในกลุ่มเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจาก HepG2.2.15 และ พลาสมาผู้ป่วยแสดงไว้ในรูปที่ 20A-B เมื่อพิจารณากระดับของ HBsAg อยู่ในช่วง 8–25 ng/mL โดยระดับในเซลล์ HepaRG จะสูงกว่า HLC เล็กน้อย ในวันที่ 9-12 ในกลุ่มเซลล์ติดเชื้อ HBV จาก HepG2.2.15 ส่วนในกลุ่มเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจากพลาสมาระดับของ HBsAg อยู่ในช่วง 4-13 ng/mL โดยเซลล์ทั้งสองชนิดมีระดับ HBsAg ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลองแสดงในรูป 20C-D



รูปที่ 20 ปริมาณของ hepatitis B e antigen (HBeAg) และ hepatitis B surface antigen (HBsAg) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดที่ระยะเวลาหลังการติดเชื้อไวรัสจากเซลล์ HepG2.2.15 และ plasma ของผู้ป่วย

4.13. ระดับของ HBV DNA และ HBeAg เมื่อได้รับยาด้านไวรัส HBV ชนิดต่าง ๆ

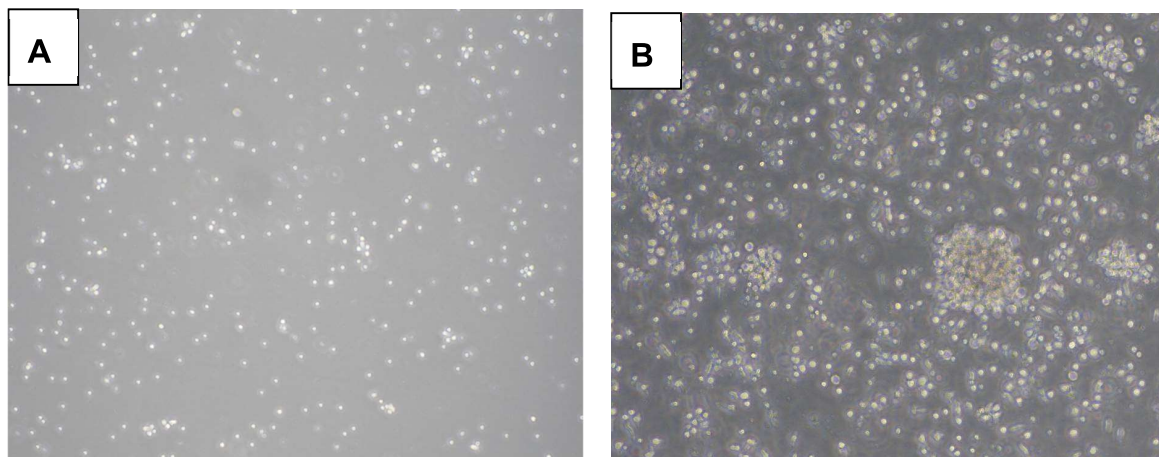
เพื่อตรวจสอบการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและ HBV DNA ของไวรัสและการสร้าง HBsAg ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เริ่มจากนำเซลล์ HepaRG และ HLC บ่มร่วมกับ cyclosporine A (CsA) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนการติดเชื้อเพื่อศึกษาผลการยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของไวรัสผ่าน receptor NTCP ส่วน entecavir และ lamivudine จะใส่ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์หลังจากการติดเชื้อ 3 วัน จนครบกำหนด 7 และ 14 วันตามลำดับ จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจหาปริมาณ HBV DNA ด้วยวิธี absolute real-time PCR และ HBsAg ด้วยวิธี ELISA ผลการทดลองพบว่า CsA ที่ความเข้มข้น 4 μM สามารถลดระดับ HBV DNA จาก 3.5×10^7 copies/mL ลงเหลือ 1×10^7 copies/mL ส่วน entecavir และ lamivudine ลดระดับ HBV DNA ลงเหลือ $2-2.5 \times 10^7$ copies/mL โดยระดับของ HBV DNA ในเซลล์ทั้งสองชนิดแตกต่างกันเล็กน้อย (รูป 19A) ถ้าพิจารณาถึงระดับของ HBsAg ในอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อได้รับยาด้านไวรัสทั้ง 3 ชนิด พบว่า CsA สามารถลดระดับ HBsAg จาก 78 ng/mL ลดลงเหลือ 22 ng/mL ส่วนยา entecavir และ lamivudine สามารถลดระดับของ HBsAg ในอาหารเลี้ยงเซลล์ลงมาในช่วง 20-30 ng/mL ตามลำดับ (รูปที่ 19B) จากข้อมูลข้างต้นแสดงถึงความสามารถในการตอบสนองต่อยาในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการใช้เซลล์ HLC เพื่อทดสอบหาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านไวรัสในอนาคต



รูปที่ 21 ระดับของ HBV DNA (A) และ HBsAg (B) เมื่อได้รับยาต้านไวรัสที่เฉพาะเจาะจงต่อกลไกชนิดต่าง ได้แก่ cyclosporine A, entecavir และ lamivudine ที่ระยะเวลา 7 วันและ 14 วันตามลำดับ

4.14. การเตรียมเซลล์ CIK จากเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (PBMC)

ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ CIK เพื่อใช้ในการเลี้ยงร่วมกับ hepatocyte ที่ติดเชื้อเริ่มต้นจากการแยกเซลล์ peripheral blood mononuclear cell (PBMC) จากเลือดของผู้บริจาค โดยลักษณะของเซลล์ที่แยกได้จะมีรูปร่างดังรูปที่ 11ก และเมื่อแยกเซลล์ lymphocyte มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI ที่ผสม INF- γ เป็นเวลา 1 วัน ในวันที่ 2 บ่มร่วมกับ OKT3 และ IL-2 หลังจากนั้นทุก ๆ 3 วันบ่มเซลล์ร่วมกับ IL-2 จนครบ 21 วันจะได้เซลล์ CIK พร้อมทั้งจะนำไปเลี้ยงร่วมกับเซลล์ตับปกติและเซลล์มะเร็งตับที่ติดเชื้อไวรัส รูปร่างของเซลล์ CIK แสดงไว้ในรูปที่ 21B ในบางบริเวณของเซลล์มีการแบ่งตัวเป็นกลุ่มโคโลนีขนาดเล็กเนื่องจากเซลล์มีความสามารถในการแบ่งตัวสูง

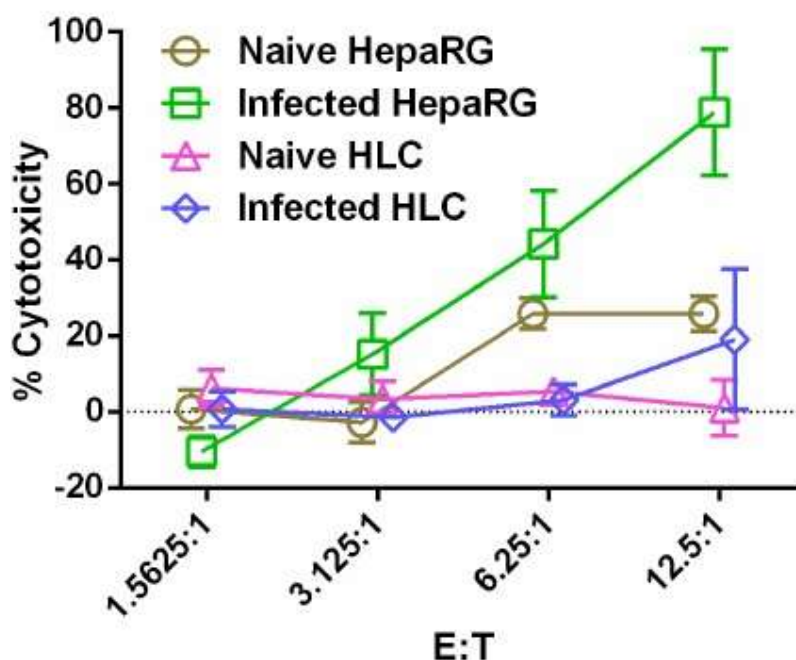


รูปที่ 22 รูปร่างของเซลล์ PBMC ที่แยกมาจากเลือดของอาสาสมัครสุขภาพดี (A) หลังจากบ่มร่วมกับ cytokine เป็นระยะเวลา 21 วัน จะได้เซลล์ CIK ที่พร้อมใช้งานโดยมีลักษณะดังรูป (B)

4.15. ทดสอบความสามารถในการทำลายเซลล์ติดเชื้อไวรัสด้วยการเลี้ยงร่วมกับเซลล์

CIK

การทดลองเริ่มจากการนำเซลล์ HLC และ HepaRG ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบนชนิดบีมาเลี้ยงร่วมกับเซลล์ CIK โดยเซลล์ติดเชื้อเรียกว่า target cells ส่วนเซลล์ CIK เรียกว่า effectors เซลล์ ในการทดลองนี้เลี้ยงเซลล์ 2 กลุ่มทดสอบคือเซลล์มะเร็งตับ HepaRG เซลล์ HLC ที่ไม่ติดเชื้อมีเซลล์มะเร็งตับ HepaRG และ เซลล์ HLC ที่ติดเชื้อไวรัสโดยบ่มร่วมกับ CIK โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง effectors cell (E) ต่อ target cells (T) เท่ากับ 1.5625:1 / 3.125:1 / 6.25:1 และ 12.5:1 เมื่อบ่มเซลล์ติดกับเซลล์ CIK เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะนำตัวอย่างเซลล์มาทดสอบหาการทำลายเซลล์ด้วยวิธีย้อมเซลล์ด้วย propidium iodide (PI) โดยใช้เซลล์ติดที่ผ่านการบ่มกับ isopropanol เป็นกลุ่ม 100% cell lysis จากผลการทดลองพบว่า CIK สามารถทำลายเซลล์มะเร็งตับ HepaRG ที่ติดเชื้อได้เท่ากับ 0% 10% 40% 80% เรียงตามลำดับ ของ (E:T ratio) และทำลายเซลล์ HepaRG ที่ไม่ติดเชื้อไวรัสประมาณ 20% ส่วนเซลล์ HLC ที่ติดเชื้อจะถูกทำลายด้วยเซลล์ CIK ประมาณ 20% และไม่พบการทำลายเซลล์ตับ HLC ที่ไม่ติดเชื้อ ดังรูปที่ 22



รูปที่ 23 ความสามารถในการทำลายเซลล์มะเร็งตับที่ติดเชื้อไวรัสอย่างเฉพาะเจาะจงของเซลล์ CIK เปรียบเทียบกับการทำลายเซลล์มะเร็งตับที่ไม่ติดเชื้อไวรัส เซลล์ตับปกติที่ติดเชื้อไวรัสและเซลล์ตับปกติที่ไม่ติดเชื้อไวรัส

5. สรุปผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลองที่ได้

การพัฒนาเซลล์คล้ายเซลล์ตับจากเซลล์ iPS ที่เปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์ร่างกายประสบความสำเร็จ เซลล์ iPSC สามารถพัฒนาไปเปลี่ยนเซลล์เนื้อเยื่อชั้นใน endoderm และเจริญไปเป็นเซลล์ตับ ผลการทดสอบ marker ของเซลล์สามารถยืนยันถึงการแสดงออกของโปรตีนและ mRNA ที่สำคัญและมีความจำเพาะกับเซลล์ตับ นอกจากนั้นเซลล์คล้ายเซลล์ตับที่พัฒนาขึ้นมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการ metabolite ยา ได้แก่ CYP450 isozymes หลายชนิด เซลล์ตับที่ผ่านการเจริญพัฒนามาจนสมบูรณ์แล้วตรวจพบการแสดงออกของโปรตีนรีเซปเตอร์ที่มีส่วนช่วยในการติดเชื้อไวรัส เช่น NTCP MRP2 และ HNF4alpha เมื่อนำเซลล์คล้ายเซลล์ตับมาทดสอบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่แยกมาจากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยหรือตัวอย่างไวรัสจากเซลล์ HepG2.2.15 สามารถตรวจพบการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมของไวรัสในเซลล์ติดเชื้อ ได้แก่ HBV DNA cccDNA และ HBV RNA รวมทั้งยังสามารถพบโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัส เช่น HBVcAg และ HBVsAg ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ติดเชื้อ ตรวจพบการเพิ่มขึ้นของไวรัสตับอักเสบบีในอาหารเลี้ยงเซลล์ภายหลังเซลล์ติดเชื้อเป็นเวลา 3 วันและเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 15 นอกจากนั้นพบระดับของ cccDNA ในเซลล์ติดเชื้อ 0.8 อนุภาคต่อ 1 เซลล์ ในเซลล์ HLC แสดงถึงความสามารถในการเป็นเซลล์ที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนของไวรัส อีกทั้งยังสามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของ TNF- γ , IFN- α , IFN- β และ TGF- β ในเซลล์ติดเชื้อ สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของ miR-122 เป็น micro RNA ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสและไม่พบการแสดงออกของ miR-122 ในเซลล์มะเร็ง ระดับของ HBsAg และ HBeAg โปรตีนที่ตรวจพบในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเป็นสิ่งที่ยืนยันถึงความสามารถในการเป็นเซลล์เจ้าบ้านของไวรัสได้อย่างดีและการติดเชื้อในเซลล์คล้ายการติดเชื้อแบบเรื้อรังในผู้ป่วย การทดลองใส่ยาต้านไวรัสชนิดต่าง ๆ เช่น cyclosporine A, lamivudine หรือ entecavir ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ติดเชื้อพบว่าสามารถลดระดับของ HBV DNA ปริมาณไวรัสในอาหารเลี้ยงเซลล์ นอกจากนั้นยังสามารถลดระดับของ HBeAg และ HBsAg เมื่อนำเซลล์ตับที่ติดเชื้อมาเลี้ยงร่วมกับเซลล์ CIK ที่พัฒนามาจากเซลล์ lymphocyte พบว่า เซลล์ CIK มีความสามารถในการทำลายเซลล์มะเร็งตับที่ติดเชื้อไวรัสสูงถึง 80% เทียบกับเซลล์มะเร็งตับที่ไม่ติดเชื้อ 20% และเซลล์ตับปกติที่ติดเชื้อ 20% ตามลำดับ นอกจากนั้นยังพบว่าเซลล์ CIK ไม่ทำลายเซลล์ตับปกติแต่อย่างใด จากการทดลองเบื้องต้นสามารถสรุปได้ว่าเซลล์ CIK มีความปลอดภัยในการพัฒนาเป็นเซลล์ที่ใช้ในกำจัดเซลล์มะเร็งตับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีได้ เนื่องจากงานวิจัยชิ้นนี้ใช้เวลาส่วนใหญ่ในการพัฒนาและทดสอบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในเซลล์ตับและพิสูจน์ความสมบูรณ์ของแบบจำลองในการเลี้ยง วัตถุประสงค์ในข้อที่สองผู้วิจัยได้ทำการทดสอบความสามารถในการกำจัดเซลล์ติดเชื้อด้วย CIK เบื้องต้นพบว่ามีความสามารถในการกำจัดเซลล์ติดเชื้ออย่างเฉพาะเจาะจง ส่วนกลไกในการกำจัดเซลล์ติดเชื้อผู้วิจัยวางแผนที่จะศึกษาในอนาคตถ้าได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากทาง สกว ต่อเนื่องในปีต่อไป

6. เอกสารอ้างอิงโครงการวิจัย

1. Allweiss L, Dandri M. Experimental in vitro and in vivo models for the study of human hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2016;64(1 Suppl):S17-31.
2. Allweiss L, Dandri M. The Role of cccDNA in HBV Maintenance. *Viruses.* 2017;9(6).
3. Allweiss L, Volz T, Giersch K, Kah J, Raffa G, Petersen J, et al. Proliferation of primary human hepatocytes and prevention of hepatitis B virus reinfection efficiently deplete nuclear cccDNA in vivo. *Gut.* 2017.
4. Cai D, Wang X, Yan R, Mao R, Liu Y, Ji C, et al. Establishment of an inducible HBV stable cell line that expresses cccDNA-dependent epitope-tagged HBeAg for screening of cccDNA modulators. *Antiviral Res.* 2016;132:26-37.
5. Daito T, Watashi K, Sluder A, Ohashi H, Nakajima S, Borroto-Esoda K, et al. Cyclophilin inhibitors reduce phosphorylation of RNA-dependent protein kinase to restore expression of IFN-stimulated genes in HCV-infected cells. *Gastroenterology.* 2014;147(2):463-72.
6. Hao J, Jin W, Li X, Wang S, Zhang X, Fan H, et al. Inhibition of alpha interferon (IFN-alpha)-induced microRNA-122 negatively affects the anti-hepatitis B virus efficiency of IFN-alpha. *J Virol.* 2013;87(1):137-47.
7. Kaneko S, Kakinuma S, Asahina Y, Kamiya A, Miyoshi M, Tsunoda T, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived hepatic cell lines as a new model for host interaction with hepatitis B virus. *Sci Rep.* 2016;6:29358.
8. Lebosse F, Testoni B, Fresquet J, Facchetti F, Galmozzi E, Fournier M, et al. Intrahepatic innate immune response pathways are downregulated in untreated chronic hepatitis B. *J Hepatol.* 2017;66(5):897-909.
9. Levrero M, Zucman-Rossi J. Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2016;64(1 Suppl):S84-101.
10. Li W, Urban S. Entry of hepatitis B and hepatitis D virus into hepatocytes: Basic insights and clinical implications. *J Hepatol.* 2016;64(1 Suppl):S32-40.
11. Lucifora J, Protzer U. Attacking hepatitis B virus cccDNA--The holy grail to hepatitis B cure. *J Hepatol.* 2016;64(1 Suppl):S41-8.
12. Ma YJ, He M, Han JA, Yang L, Ji XY. A clinical study of HBsAg-activated dendritic cells and cytokine-induced killer cells during the treatment for chronic hepatitis B. *Scand J Immunol.* 2013;78(4):387-93.
13. Maini MK, Gehring AJ. The role of innate immunity in the immunopathology and treatment of HBV infection. *J Hepatol.* 2016;64(1 Suppl):S60-70.
14. Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut.* 2015;64(12):1972-84.
15. Qiao Y, Han X, Guan G, Wu N, Sun J, Pak V, et al. TGF-beta triggers HBV cccDNA degradation through AID-dependent deamination. *FEBS Lett.* 2016;590(3):419-27.
16. Sakurai F, Mitani S, Yamamoto T, Takayama K, Tachibana M, Watashi K, et al. Human induced-pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells as an in vitro model of human hepatitis B virus infection. *Sci Rep.* 2017;7:45698.

17. Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, et al. The RNA sensor RIG-I dually functions as an innate sensor and direct antiviral factor for hepatitis B virus. *Immunity*. 2015;42(1):123-32.
18. Shimura S, Watashi K, Fukano K, Peel M, Sluder A, Kawai F, et al. Cyclosporin derivatives inhibit hepatitis B virus entry without interfering with NTCP transporter activity. *J Hepatol*. 2017;66(4):685-92.
19. Shlomai A, Schwartz RE, Ramanan V, Bhatta A, de Jong YP, Bhatia SN, et al. Modeling host interactions with hepatitis B virus using primary and induced pluripotent stem cell-derived hepatocellular systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(33):12193-8.
20. Tajiri K, Shimizu Y. New horizon for radical cure of chronic hepatitis B virus infection. *World J Hepatol*. 2016;8(21):863-73.
21. Watashi K, Urban S, Li W, Wakita T. NTCP and beyond: opening the door to unveil hepatitis B virus entry. *Int J Mol Sci*. 2014;15(2):2892-905.
22. Xia Y, Carpentier A, Cheng X, Block PD, Zhao Y, Zhang Z, et al. Human stem cell-derived hepatocytes as a model for hepatitis B virus infection, spreading and virus-host interactions. *J Hepatol*. 2017;66(3):494-503.
23. Xia Y, Protzer U. Control of Hepatitis B Virus by Cytokines. *Viruses*. 2017;9(1).
24. Xia Y, Stadler D, Lucifora J, Reisinger F, Webb D, Hosel M, et al. Interferon-gamma and Tumor Necrosis Factor-alpha Produced by T Cells Reduce the HBV Persistence Form, cccDNA, Without Cytolysis. *Gastroenterology*. 2016;150(1):194-205.
25. Zhang E, Kosinska A, Lu M, Yan H, Roggendorf M. Current status of immunomodulatory therapy in chronic hepatitis B, fifty years after discovery of the virus: Search for the "magic bullet" to kill cccDNA. *Antiviral Res*. 2015;123:193-203.
26. Zoulim F, Lebosse F, Levrero M. Current treatments for chronic hepatitis B virus infections. *Curr Opin Virol*. 2016;18:109-16.

7. Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ

1. Sa-Ngiamsumtorn K, Wongkajornsilp A, Phanthong P, Borwornpinyo S, Kitiyanant N, Chantratita W, et al. A robust model of natural hepatitis C infection using hepatocyte-like cells derived from human induced pluripotent stem cells as a long-term host. Virol J. 2016;13:59.
2. Wongkajornsilp A, Numchaisersuk N, Sa-Ngiamsumtorn K, Akarasereenont P, Wamanuttajinda V, Kasetinsombat K, et al. Effects of the Ayurved Siriraj Wattana recipe on functional and phenotypic characterization of cytokine-induced killer cells and dendritic cells in vitro. BMC Complement Altern Med. 2016;16(1):489.

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)
สร้างเครือข่ายนักวิจัยโรคไวรัสตับอักเสบกับประเทศญี่ปุ่นและสาธารณรัฐประชาชนจีน
- เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
นักศึกษาที่ร่วมวิจัยในโครงการสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีและเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท และทำวิทยานิพนธ์ในสาขาที่ได้รับทุนวิจัย

3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

1. Sa-ngiamsumtorn K, Wongkajornsilp A., Yasawong M., Borwornpinyo S., Hongeng S. Immortalized hepatocyte-like cells derived from human mesenchymal stem cell allow complete propagation of hepatitis C virus. Abstract book: ISSCR Annual meeting, June 24-26, 2014, Stockholm, Sweden, p.244.
2. Sa-ngiamsumtorn K, Wongkajornsilp A., Kongsomboonchoke P., Thongsri P., Hongeng S. HBV-infected human hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells allowed long-term viral propagation and was specifically targeted by cytokine-induced killer cells. Abstract book: ISSCR Annual meeting, June 22-25, 2016, San Francisco CA, USA, p.28.
3. Sa-ngiamsumtorn K, Wongkajornsilp A., Kongsomboonchoke P., Thongsri P., Hongeng S. Hydrogen peroxide upregulated antioxidant enzymes and maintained the pluripotent stage in human iPS cell through enhancing Nrf2 expression. Abstract book: ISSCR Annual meeting, June 14-17, 2017, San Boston MA, USA, p.335.

ภาคผนวก I

Reprints

RESEARCH

Open Access



A robust model of natural hepatitis C infection using hepatocyte-like cells derived from human induced pluripotent stem cells as a long-term host

Khanit Sa-ngiamsuntorn¹, Adisak Wongkajornsilp^{2*}, Phetcharat Phanthong³, Suparerk Borwornpinyo⁴, Narisorn Kitiyanant³, Wasun Chantratita⁵ and Suradej Hongeng^{6*}

Abstract

Background: Hepatitis C virus (HCV) could induce chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma in human. The use of primary human hepatocyte as a viral host is restrained with the scarcity of tissue supply. A culture model restricted to HCV genotype 2a (JFH-1) has been established using Huh7-derived hepatocyte. Other genotypes including the wild-type virus could not propagate in Huh7, Huh7.5 and Huh7.5.1 cells.

Methods: Functional hepatocyte-like cells (HLCs) were developed from normal human iPS cells as a host for HCV infection. Mature HLCs were identified for selective hepatocyte markers, CYP450s, HCV associated receptors and HCV essential host factors. HLCs were either transfected with JFH-1 HCV RNA or infected with HCV particles derived from patient serum. The enhancing effect of α -tocopherol and the inhibitory effects of INF- α , ribavirin and sofosbuvir to HCV infection were studied. The HCV viral load and HCV RNA were assayed for the infection efficiency.

Results: The fully-developed HLCs expressed phase I, II, and III drug-metabolizing enzymes, HCV associated receptors (claudin-1, occludin, CD81, ApoE, ApoB, LDL-R) and HCV essential host factors (miR-122 and SEC14L2) comparable to the primary human hepatocyte. SEC14L2, an α -tocopherol transfer protein, was expressed in HLCs, but not in Huh7 cell, had been implicated in effective HCVser infection. The HLCs permitted not only the replication of HCV RNA, but also the production of HCV particles (HCVcc) released to the culture media. HLCs drove higher propagation of HCVcc derived from JFH-1 than did the classical host Huh7 cells. HLCs infected with either JFH-1 or wild-type HCV expressed HCV core antigen, NS5A, NS5B, NS3 and HCV negative-stand RNA. HLCs allowed entire HCV life cycle derived from either JFH-1, HCVcc or wild-type HCV (genotype 1a, 1b, 3a, 3b, 6f and 6n). Further increasing the HCVser infection in HLCs was achieved by incubating cell with α -tocopherol. The supernatant from infected HLCs could infect both naïve HLC and Huh7 cell. Treating infected HLC with INF- α and ribavirin decreased HCV RNA in both the cellular fraction and the culture medium. The HLCs reacted to HCVcc or wild-type HCV infection by upregulating TNF- α , IL-28B and IL-29.

Conclusions: This robust cell culture model for serum-derived HCV using HLCs as host cells provides a remarkable system for investigating HCV life cycle, HCV-associated hepatocellular carcinoma development and the screening for new anti HCV drugs.

Keywords: Induced pluripotent stem cell, iPSC, Hepatocyte, Hepatocyte-like cell, Differentiation, Cytochrome P450, Drug metabolism, Hepatitis C virus, HCV, JFH-1, Cell culture model

* Correspondence: adisak.won@mahidol.ac.th; suradej.hon@mahidol.ac.th

²Department of Pharmacology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, 2 Wanglang Road, Bangkoknoi, Bangkok 10700, Thailand

⁶Department of Pediatrics, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, 270 Rama VI Road, Ratchatewi, Bangkok 10400, Thailand

Full list of author information is available at the end of the article



Background

Human primary hepatocytes should have served as ideal host cells for liver-targeting pathogens, e.g., malarial parasite, hepatitis B, hepatitis C and dengue viruses. The shortcoming in the procurement of these cells and their limited life span have limited the study of host-pathogen relationships and their sequential developments, e.g., xenobiotic screening, and biotransformation. A cellular substitute that closely mimics primary hepatocyte but circumvents these shortcoming would greatly extend our understanding of host-pathogen interactions and the corresponding treatment strategies.

Hepatitis C virus (HCV) [1] is a single positive-stranded RNA virus in the genus of *Hepacivirus* and *Flaviviridae* family [2]. Chronic HCV infection led to cirrhosis and hepatocellular carcinoma [3]. The self-renewal capability of liver cell was disrupted that eventually required liver transplantation or bio-artificial liver device [4]. Liver transplantation were faced with serious and faster HCV reinfection to the graft [5, 6]. An alternative for liver transplant was the hepatocyte transplant that might alleviate the demand of donor organs [7]. Direct-acting antivirals (DAA) targeting HCV enzymes was hampered with eventual drug resistance [8–10]. The development of suitable culture models for HCV is critical for designing efficacious anti-HCV strategies.

The studies on HCV life cycle relied heavily on human hepatocellular carcinoma cells (Huh7 and their derivatives) [11]. HCV genotype 2a (JFH-1), but not others, could be generated from Huh7 derived cells [12, 13]. The use of hepatocellular carcinoma as cellular host could not completely mimic primary human hepatocyte. The cancer cells actively entered cellular division while the primary hepatocytes were mostly in quiescent stage [14]. Most hepatoma cell lines usually lack various functional enzymes such as CYP450s and other phase I, II and III drug metabolizing enzymes that make them not suitable for the assessment of anti-HCV drug interaction and metabolism [15, 16]. Huh7.5.1 was derived from Huh7.5 [17], which in turn was originated from Huh7 [18]. These cells carried a mutation in the retinoic-inducible gene I (RIG-I) [19]. RIG-I played a central role in viral genome recognition and host immune response. Primary human hepatocytes have been endorsed by several groups as the major host cells for HCV [20–22]. However, the handling primary human hepatocytes faced several limitations: 1) The mature hepatocytes could not be readily proliferated in culture condition; 2) The donor supply was limited; and 3) The batch to batch variation was substantial [23].

Human induced pluripotent stem (iPS) cells could be generated from somatic cell through exogenous expression of Oct4, Sox2, KLF4 and c-MYC [24, 25]. Human iPS cells actively entered cellular division and could be

differentiated into hepatocyte-like cells (HLCs) [26] and others. The use of HLCs derived from either iPS or embryonic stem cells as cellular hosts for HCV were recently reported [27–30]. These differentiated cells displayed essential liver functions and achieved nearly mature hepatocytes [31], including α -fetoprotein, albumin, phase I and phase II drug metabolizing enzymes. HLCs also expressed known HCV host receptors involved in HCV entry (Claudin-1, Occludin, SR-BI, CD81) and supported complete life cycle of HCV genotype 2a up to 21 days [30]. Nevertheless, the maturity, homogeneity and long-term stability of these HLCs have not been revealed. The HLCs not only carried less CYP450 expression than that of primary hepatocytes, but retained several fetal hepatocyte markers.

In this studies, human iPS cells generated from hMSCs using polycistronic OSKM reprogramming factors [32] were differentiated into HLCs. The CYP expressions were readily inducible upon the exposure to the prototypic inducers in a similar fashion to the primary hepatocytes. Since the HCV cell receptors and cell host factors were highly expressed, these HLCs were promptly taken as HCV hosts. The infected cells were studied for viral life cycle after the transfection/infection with HCVcc and HCVser. HLCs could sustain the replication of not only JFH-1 HCV but several wild-type HCV's from patients' sera. High HCV titers were detected in culture medium for at least 6 months. The released HCV virions could infect naïve HLCs and were susceptible to the treatment with interferon, ribavirin or sofosbuvir.

Methods

Generation of human induced pluripotent stem cell (hiPSC) from hMSC

The mononuclear cells were separated from bone marrow using IsoPrep (Robbins Scientific, Canada) density gradient centrifugation. Isolated cells were seeded at 2×10^6 cells on T-75 cell culture flask in Minimum Essential Medium (MEM) α (Gibco Invitrogen, NY), 10 % FBS (HyClone, GE Healthcare Life Sciences, Singapore), 100 units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin at 37 °C in 5 % CO₂. Lentiviral particles were produced by co-transfection of packaging psPAX2 packaging plasmid, pMD2.G vesicular stomatitis virus G envelope, and the polycistronic plasmid encoding human OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC and dTomato [32] using X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche Diagnostics, USA). hMSCs were transduced with concentrated lentivirus (MOI = 0.5). Production of dTomato was observed 48 h post-transduction. The transduced cells were seeded on MEF in hES medium to promote reprogramming process and colony formation. Reprogrammed colonies were identified with StainAlive TRA-1-60 Antibody (Stemgent,

MA). Positive colonies were manually picked and passaged until stable iPS cells established.

Maintaining and characterization of hiPSC

Human iPS cells were maintained in a feeder free condition on Geltrex-coated dish in E8 medium at 37 °C in 5 % CO₂. The E8 medium consisted of DMEM/F12 supplemented with 64 mg/L L-ascorbic acid-2-phosphate, 14 µg/L sodium selenite, 100 µg/L FGF2, 19.4 mg/L insulin, 543 mg/L NaHCO₃, 10.7 mg/L transferrin and 2 µg/L TGF-β1. The medium was changed daily. Human iPS cell colonies were split at a ratio of 1:8 every 5 - 7 d and passaged onto a new Geltrex-coated dish. The iPS colonies after the tenth passage were characterized for pluripotent markers, e.g., alkaline phosphatase, OCT4, SOX2, NANOG, TRA-1-60, TRA-1-81, and SSEA4 using alkaline phosphatase ES characterization kit (MERCK Millipore, USA), fluorescent antibody staining and quantitative RT-PCR analysis.

Teratoma formation

Approximately 2×10^6 iPS cells were subcutaneously injected into nude mice (BALB/cMlac-nu). The tumor-like tissue was collected within 8–12 weeks after injection. The tissue was fixed in 10 % formalin and underwent histological processes. The tissue sections were stained with hematoxylin and eosin and examined under a light microscope for the presence of the specialized cells derived from three germ layers. All experiments performed on laboratory animals were reviewed and approved by the Animal Care and Use Committee, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University.

Differentiation of hiPSC to homogeneous hepatocyte-like cell

The characterized iPS cells were taken for hepatic induction. They were seeded on Geltrex-coated 6 well plate in E8 medium until 80 % confluence and differentiated using a modified hepatic lineage development protocol [31]. Briefly, the cultured cells were maintained in endoderm differentiation medium DMEM/F12 : IMDM (1:1) (Gibco Invitrogen, NY), 100 ng/mL activin A (Pepro-Tech, US), 10 ng/mL bFGF, 10 ng/mL BMP-4, 1 µM LY294002 and 3 µM CHIR99021 for 24 h. Cells were maintained in endoderm commitment medium DMEM/F12 : IMDM (1:1), 100 ng/mL activin A, 100 ng/mL bFGF, 10 ng/mL BMP-4 and 1 µM LY294002 for 24 h. The endoderm-like cells were further maintained in anterior definitive endoderm differentiation medium RPMI/B27 with 50 ng/mL activin A for 3 d with a daily medium replacement. The differentiated cells were maintained in hepatic lineage specification medium RPMI/B27, 20 ng/mL BMP-4 and 10 ng/mL FGF10 for 4 d with daily medium replacement. The differentiated

cells were cultured in hepatocyte basal medium (HBM, Lonza, UK), 30 ng/mL oncostatin M and 50 ng/mL HGF for 10 d with medium replacement every 2 d. For functional hepatocyte induction, the cells were cultured in Williams' Media E (Invitrogen, MD, 1 % DMSO for 3 d.

Periodic acid-Schiff staining of glycogen

HLCs and hMSCs were cultured on 35-mm dish for 3d. The cells were fixed in 5 % formaldehyde, 95 % ethanol for 1 min, rinsed for 1 min under running tap water, immersed in periodic acid solution for 5 min, rinsed thrice with dH₂O, immersed in Schiff's reagent for 15 min, and rinsed with running tap water for 5–10 min. Samples were counterstained with Mayer's hematoxylin for 1 min, rinsed with water, and assessed under light microscope.

Hepatocyte-specific markers and cytochrome P450 expressions

The total RNA was extracted from iPS cells, HLCs, or HepaRG (HPRGC10, Life Technologies) by illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare, Asia Pacific) following the manufacturer instruction. The total RNA was immediately used for reverse transcription to construct cDNA using the ImProm-II reverse transcription system (Promega, WI) following the manufacturer instruction. The hepatocyte markers and cytochrome P450 markers included albumin, α-fetoprotein, cytokeratin18, G-6-PD, HNF-4α, tyrosine aminotransferase and major 7 CYPs isozymes. All gene specific primers (Additional file 1) were designed using vector NTI version 11.5 (Invitrogen, MD). They were amplified using KAPA SYBR[®] FAST qPCR Kits (Kapa Biosystems). Each sample was measured in triplicate. PCR amplicons were confirmed using size and melting curve analysis. Expression levels were calculated using the ΔΔCt method and normalized to the endogenous GAPDH. ΔΔCt was transformed into fold change using the formula: fold change = $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Immunofluorescent staining

HLCs on 24-well plate were fixed with 4 % paraformaldehyde for 20 min at room temperature. The fixed cells were washed thrice with PBS, blocked and permeabilized with 0.2 % Triton X-100, 3 % BSA and 2 % normal goat serum for 1 h. Primary antibodies against pluripotent markers were TRA-1-60 (1:250, SC21705, Santa Cruz Biotechnology), SSEA4 (1:250, ab16287, Abcam), NANOG (1:250, SC33759, Santa Cruz Biotechnology), OCT4 (1:250, SC5279, Santa Cruz Biotechnology). Primary antibodies against HCV cell receptors were claudin-1 (1:100, ab15098), occluding (1:100, ab31721), CD81 (1:100, ab79559), SR-BI (1:200, ab106572) and hepatitis C core antigen (1:200, ab2740) ordered from Abcam. Primary antibodies against non-structural proteins of HCV were NS3 (1:200, SC69938), NS5A (1:200, SC52417) and NS5B

(1:200, SC58146) ordered from Santa Cruz Biotechnology. The cells were incubated with the primary antibody for overnight h at 4 °C in moist chamber. After washing thrice, samples were incubated with the secondary antibody; Alexa fluor 488 conjugated goat anti-mouse IgG (1:1000, A11001) or Alexa fluor 488 conjugated goat anti-rabbit IgG (1: 1000, A11003s) or Alexa fluor 488 conjugated rabbit anti-goat IgG (1: 1000, A1178) (Life Technologies) for 1 h at 37 °C. Fibroblasts or untreated hMSCs served as negative controls. After washing thrice, the cells were counterstained with DAPI and mounted with anti-fade mounting medium in coverslip and examined under a fluorescent microscope and photographed.

The induction of major CYP450 isozymes in HepaRG and HLCs using the enzyme inducer cocktail

The expression of CYP450 levels of hepatocyte-like cells responded to enzyme inducers was evaluated after incubate with cocktail of classical drugs [33]. HepaRG and hepatocyte-like cell derived from iPS cells were seeded on 6 well-plates for 3 d. These cells were maintained in Williams' Media E, 10 % FBS before exposure to the inducers. Both of hepatocyte cells were incubated for 72 h with the cocktail agent: 20 µM rifampicin, 50 µM omeprazole, 1 mM phenobarbital and 88 µM ethanol. The treated cells were washed with 2–3 mL PBS, detached using 0.025 % trypsin-EDTA, and neutralized with 10 % FBS in DMEM/F12. The cell pellets from hepatocyte-like cell and HepaRG were stored at -80 °C until analysis for CYP450 gene expression.

The detection of CYP450 activities

CYP1A1, CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 enzyme activities were evaluated directly in all cultured cells (HepaRG, HLCs and primary human hepatocytes) attaching to the collagen type IV-coated 6-cm dish at a density of 10^6 cell. All cultured cells were treated with a cocktail of 20 µM rifampicin, 50 µM omeprazole, 1 mM phenobarbital and 88 µM ethanol. All treated cells were incubated for 72 h with daily medium change. CYP450 activities were assessed based on luciferase activity using the P450-glo 1A1, 2B6, 2C9 and 3A4 assays (V8751, V8321, V8791, V9001; Promega, WI). After 3-d incubation period, cells were incubated with Williams' Media E supplemented with 100 µM Luciferin-CEE, Luciferin-2B6, Luciferin-H for 3–4 h or 3 µM Luciferin-IPA for 30–60 min. An aliquot (50 µL) of the medium was transferred to 96-well opaque white luminometer plate (Nunc, Denmark) and luciferin detection reagent was added to each well. After sitting at room temperature for 20 min, luminescence was measured with a SpectraMax M5 spectrofluorometer.

The detection of cellular hepatitis C receptors on HLCs

HCV infection requires several types of cellular receptors to permit viral entry [34]. Cellular receptors essential for HCV infection such as Claudin-1, Occludin, SR-BI, CD81 were detected using quantitative RT-PCR and immunofluorescent technique. Mature HLCs were seeded on 24-well plate and maintained until 80 % confluence in Williams' Media E, 10 % FBS. Cells were fixed and stained with fluorescent-conjugated antibodies raised against Claudin-1, Occludin, SR-BI or CD81.

Production of HCV from JFH-1 (HCVcc)

Cell culture based hepatitis C virus (HCVcc genotype 2a) was prepared from JFH-1 system [35]. The JFH-1 plasmid was propagated in *E Coli* and extracted using NucleoBond Xtra Midi plasmid (MN, Germany). The plasmids were purified and linearized by a restriction enzyme XbaI, and used as a template for JFH-1 RNA synthesis. The full length HCV RNA was synthesized by TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, MA) following the manufacturer's instruction. HCVcc was produced by transient transfection of JFH-1 RNA into Huh7 cell using either lipofectamine 3000 (Invitrogen, MA) or electroporation (Gene Pulser Xcell Electroporation Systems, Bio-Rad, CA). HCV in Huh7 supernatant was passed through 0.45 µm syringe filter, concentrated by sucrose gradient ultracentrifugation and stored at -80 °C for future use.

The infection of HCVser and HCVcc to HLCs

HCV-positive sera were collected from patients with chronic HCV infection at Ramathibodi Hospital, Mahidol University. The collection of leftover blood specimen was approved by the Ethics Committee on Research Involving Human Subjects (2556/250). All subjects are adults and provided written informed consent. Serum from individual patient with HCV load $>10^6$ IU/mL was selected to infect HLCs. These sera carried HCV genotypes 1a, 1b, 3a, 3b, 6f and 6n that were prevalent in Thailand. For HCVser and HCVcc infection, HLCs and Huh7 cells were seeded on 6-well plate in Williams' Media E, 10 % FBS until 80 % confluence. Some host cells were pretreated with 1 µM or 5 µM α -tocopherol for 24 h prior to HCVser infection. For HCVser infection, 50 µL of infected serum in 2 mL of medium was added to host cells. For HCVcc infection, concentrated JFH-1 HCV load at 10^7 IU/mL in 2 mL of medium was added to host cells. After 24 h incubation, the infected cells were washed 6–10 times with 0.1 % BSA in PBS and reconstituted with 2 mL complete growth medium.

The long-term maintenance of HCV infection

For long-term HCV infection assay, HLCs and Huh7 were infected with HCVcc or HCVser. After 24 h

incubation, the culture medium was renewed with 10 % FBS, DMEM/F12. The HCV-containing supernatant was collected ever 4–6 days and HCV RNA was detected using RT-PCR. During long-term cultivation process, HLCs and Huh7 cell were maintained in complete medium with 1 % concentrated lipids (Life Technologies, USA) and 1 μ M (α -tocopherol). The HCV production was confirmed using the Abbott real-time HCV assay (Abbott Diagnostics, Illinois, USA).

The detection of negative and positive stands of HCV RNA

HCV RNA in the supernatants was extracted with NucleoSpin RNA Virus isolation kit (MN, USA); while the intracellular RNA was extracted with illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare, Asia Pacific). The stand specific primers were designed using Vector NTI version 11.5 (Invitrogen, USA). The primers for positive strand are: 5'-CCCTGTGAGGAAGTACTGTCTTCACGCA-3' and 5'-CTCGCAAGCACCTATCAGG-CAGTAC-3'. The primers for the negative strand are: 5'-GATGTACCCCATGAGGTCGG-3' and 5'-GCGCGACAAG-GAAGACTTCG-3' [36]. The viral RNA and total RNA from infected host cells were converted to cDNA with the ImProm-II reverse transcription system (Promega, WI). For HCV (-) stand, one microgram of isolated RNA was incubated with 12.5 μ M HCV 'reverse' primers in a total volume of 5 μ L at 70 °C for 5 min and chilled on ice-water immediately for at least 5 min. The reverse transcription mix (15 μ L of 5 \times reaction buffer, 25 mM MgCl₂, 2 mM dNTP Mix, 40 U/ μ L RNasin ribonuclease inhibitor, and 200 U/ μ L Improm-II™ RT) was added to the RNA-primer mix to make a total volume of 20 μ L. The mixture was incubated at 25 °C for 5 min, and 42 °C for further 1 h. The RT reaction was terminated by heating at 70 °C for 15 min followed by chilling on ice. The HCV cDNA was amplified by KAPA SYBR® FAST qPCR Kits (Kapa Biosystems, UK) and 2.5 μ M HCV 'forward' primer at 95 °C for 30 s, 66 °C for 45 s and 70 °C for 90 s. Hepatitis C virus (+) stand was quantified by real-time RT-PCR using the m2000sp and m2000rt instruments and RealTime HCV kit (Abbott Diagnostics, Illinois, USA).

Statistical analysis

All results of experiments were performed in triplicated. Data were expressed as means \pm SD. Data from quantitative real-time RT-PCR were evaluated for statistical significance using either students' *t* test or ANOVA for difference followed by post-hoc tests (Tukey's HSD) between the treatments and their respective controls. * and ** represented statistically different data with *p* < 0.05 and *p* < 0.01 respectively.

Results

Reprogramming human bone marrow mesenchymal stem cell to iPS cells

hMSC isolated from aspirated bone marrow exhibited spindle-shaped morphology at 90–95 % confluence (Fig. 1a). After infecting hMSCs with polycistronic OSKM-dTomato lentivirus particles for 48 h, the transduced hMSCs expressing OCT4, SOX2, KLF4 and C-MYC were determined by positive dTomato (Fig. 1b and c). The dTomato-positive cells were detached and seeded on mitomycin c-treated MEF feeder at 2×10^5 cells/10-cm dish. Cell morphology of dTomato positive population transformed from spindle-shape to epithelial morphology around day 5 post-transduction (Fig. 1d). These cell populations divided and formed a small cluster of dTomato after 2–3 d (Fig. 1e). The transduced colonies expanded and transformed to a tightly packed colony with a high nucleocytoplasmic ratio (Fig. 1f). Upon reaching full reprogramming, dTomato expression was silenced and reprogramming colonies were negative for dTomato on day 13 as monitored under a fluorescence microscope (Fig. 1g). The transduced cells reached iPS as determined by their positive pluripotent surface marker TRA-1-60 using a live staining technique (Fig. 1h and i). The TRA-1-60 positive colonies were selected and picked into a new MEF-seeded plates for expansion and characterizations.

Identification of pluripotent markers in reprogramming cells and iPS cell characterizations

TRA-1-60-positive colonies were passaged and maintained on MEF in ES medium until reprogramming cells achieved a typical human ESC morphology. The cell morphology consisted of a sharp border, flat, dense colony, high nucleocytoplasmic ratio and prominent nucleoli (Fig. 1h). The karyotype analysis confirmed no chromosomal alteration (Fig. 1j). The establishment of human iPS cell was confirmed using alkaline phosphatase (AP) activity, immunofluorescent staining of pluripotent markers and the expression of pluripotent genes (Fig. 1k). The reprogramming cells were maintained in E8 medium with feeder-free condition on Geltrex-coated dishes (Invitrogen, USA) prior to the analysis (Fig. 1l). The colony of reprogramming cells highly expressed essential pluripotent marker proteins, OCT4 and SOX2, required for maintaining pluripotent status. The expressions of OCT4 and SOX2 targeted proteins such as the self-renewal transcription factor NANOG, transmembrane proteins TRA-1-60 and TRA-1-81, and a cell surface glycoprotein SSEA4 were also expressed in the reprogramming cells. Human fibroblasts were used as negative controls for non-iPS cells (Fig. 2a). Exogenous OCT4 and SOX2 produced from the lentivirus were active at the early stage of cell reprogramming. To confirm the maintenance of endogenous OCT4 and SOX2 expression, specific OCT4 and SOX2 primers

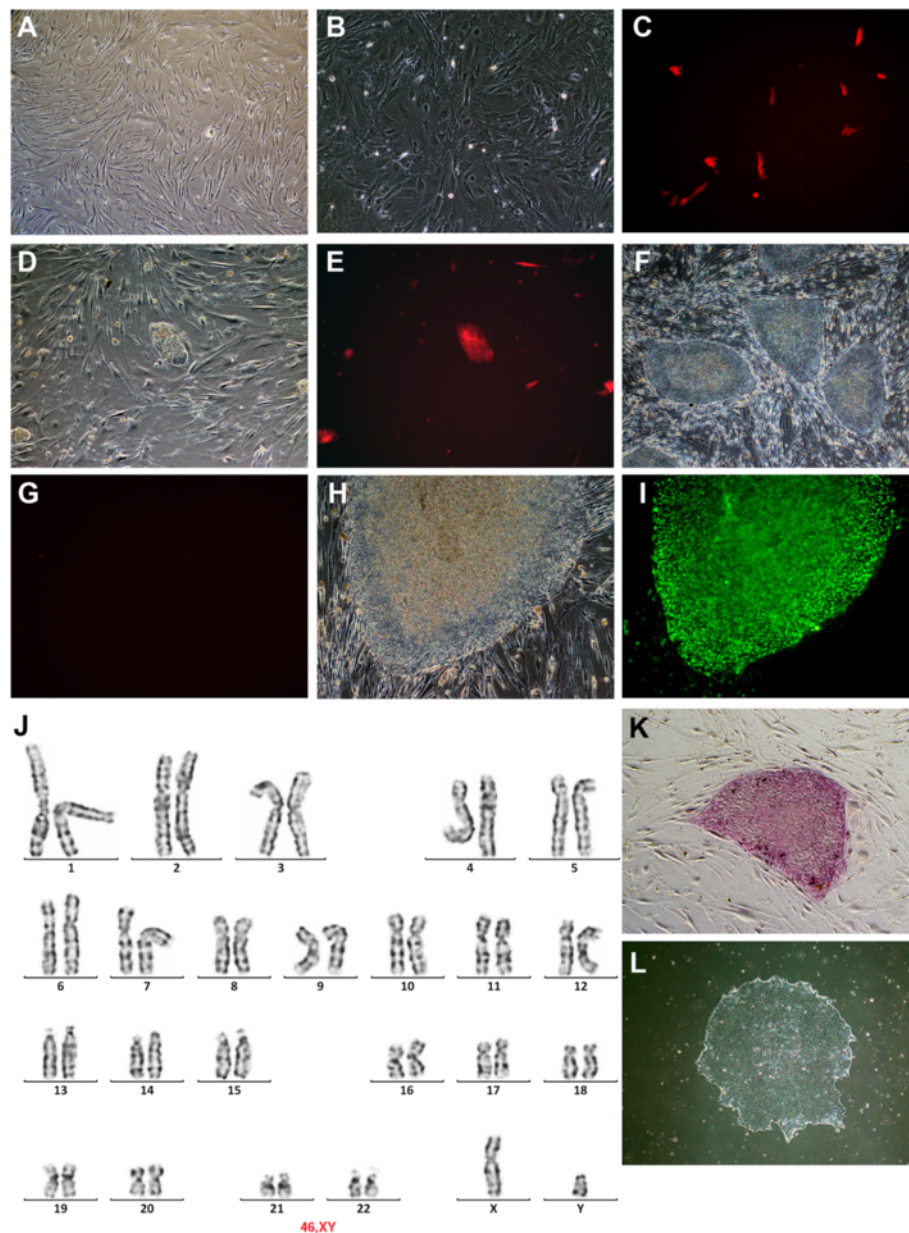


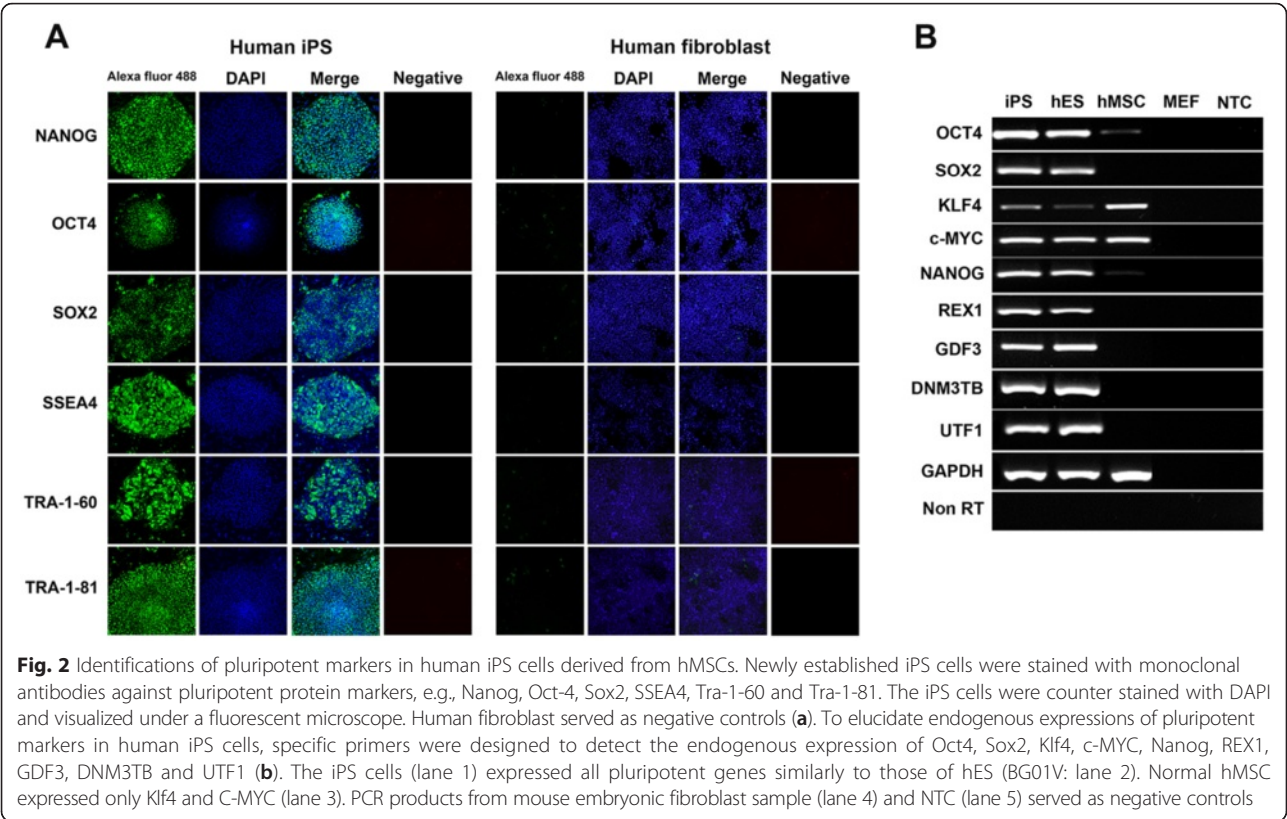
Fig. 1 The generation of human iPS cell from hMSC. hMSC isolated from healthy donor at 2nd passage had spindle-shape (a). hMSCs after transduced with polycistronic OSKM-dTomato lentivirus for 48 h was observed under a light microscope (b) and visualized for the staining of dTomato under a fluorescent microscope (c). Five days after the transduction, the transduced cells transformed to epithelial-like morphology forming clusters of dTomato-positive cells on day 7 (d, e). The cell colonies expanded and became tightly packed (f). The exogenous expression of OSKM were silenced and confirmed by negative dTomato (g). After achieving fully reprogramming, the stable colonies were observed (h) and expressed pluripotent surface marker TRA-1-60 (i). The iPS colonies were analyzed for karyotype (j). The colony was positive for alkaline phosphatase activity (k) and maintained in feeder-free condition (l)

were designed to detect only the mRNA from endogenous source. The RT-PCR analysis confirmed the transduced cells carried endogenous OCT4 and SOX2 (Fig. 2b). Other pluripotent markers such as REX1, NANOG, GDF3, DNMT3B and UFT1 were expressed in the transduced cells and compared with those in human ES cell (BG01V)

and non-transduced hMSCs (Fig. 2b). GAPDH and NTC served as positive and negative controls for PCR products.

Spontaneous differentiation and teratoma formation

To determine whether these newly established iPS cells could differentiate into all three germ layers, the iPS cells

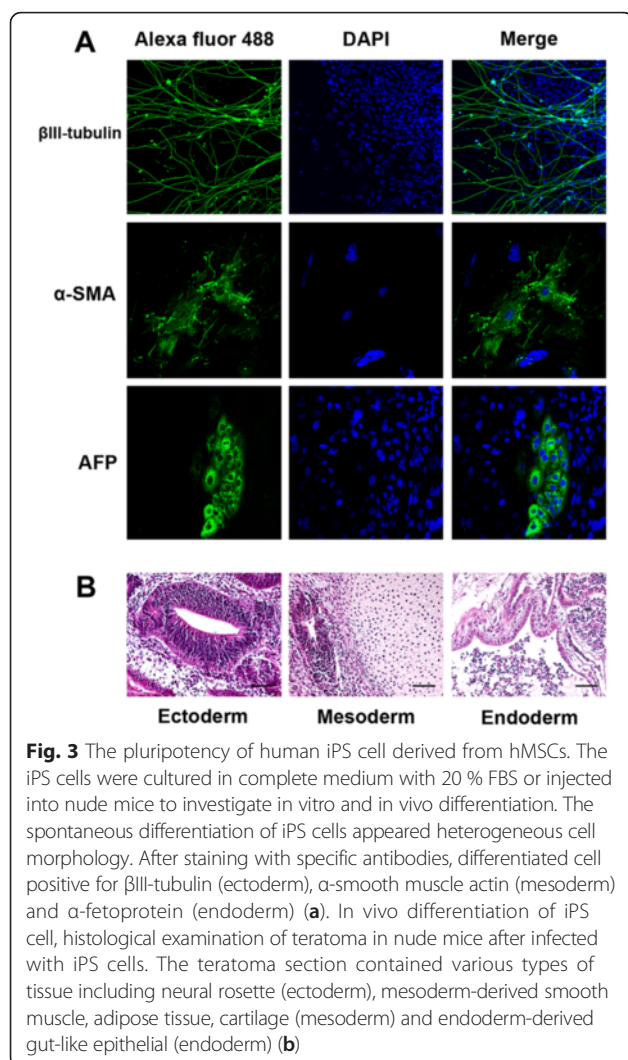


were evaluated for ex vivo and in vivo differentiation. For spontaneous ex vivo differentiation, iPS cells were maintained in suspension culture with embryoid bodies formation within a week. After 2 weeks, embryoid bodies were seeded on gelatin-coated culture plates to allow cell adhesion and migration. The adherent cells displayed various morphologies (Fig. 3a). Immunofluorescent staining revealed differentiated cell positive for β III-tubulin (ectoderm marker), vimentin (mesoderm marker) and α -fetoprotein (AFP, endoderm marker) (Fig. 3a). These indicated the differentiation to several lineages. For teratoma formation, one million iPS cells were resuspended in DMEM 10 % FBS and injected subcutaneously into nude mice. Four weeks after injection, teratoma was formed at the injection site. Histological examinations revealed that the teratoma contained several tissues (Fig. 3b), e.g., neural rosette (ectoderm) (Fig. 3b, left panel), mesoderm derived smooth muscle, adipose tissue, cartilage (mesoderm) (Fig. 3b, middle) and endoderm-derived gut-like epithelial (endoderm) (Fig. 3b, right). Taken together, iPS cells derived from hMSCs not only support the spontaneous ex vivo differentiation but they can form teratoma in vivo.

The hepatocyte-like cell derived from iPS cell expressed hepatic phenotypes

Human iPS cells were cultured in feeder free condition until reaching 70 % confluence before hepatic induction

(Fig. 4a). During hepatic differentiation, iPS cells were monitored daily for morphological changes. Initially, iPS cells were differentiated into definitive endoderm (DE) cells (Fig. 4b) that shared the same precursor with all endodermal organs (pancreas, liver, lung, thyroid and gut) [37]. The differentiated cell transformed into round-shaped morphology (Fig. 4b) with positive staining for SOX17, an endoderm differentiation marker (Fig. 4c). The second stage, definitive endoderm cells were developed to anterior definitive endoderm (ADE) with cell morphology underwent epithelial to mesenchymal transition (EMT) [38]. Cells displayed the mesenchymal-like morphology (Fig. 4d). At the third stage of differentiation, ADE cells became hepatic progenitors (Fig. 4e). The differentiated cell at this stage was confirmed with the expression of alpha-fetoprotein (AFP) (Fig. 4f), a characteristic of hepatoblast [31]. At maturation, hepatoblasts developed into functional hepatocyte-like cells (HLCs). HLCs shared both fetal and adult hepatocyte markers, e.g., albumin and minimal level of alpha-fetoprotein (Fig. 4g). The expression of HNF4- α , found only at the end of maturation, revealed that the cells fully developed into mature hepatocytes (Fig. 4h). After 4-week differentiation, human iPS cell developed into a near homogenous population with more than 95 % pure hepatocyte-like cell. HLCs exhibited typical hepatocyte morphology, e.g., a polygonal



shape, a dark cytoplasm with large nuclei containing nucleoli and bi-nucleated (Fig. 4i). Mature HLCs maintained in Williams' Media E exhibited homogeneous population (Fig. 4j), hepatic triad-like structure (Fig. 4k) and some populations produced bile pigment (Fig. 4l). HLCs exhibited polygonal morphology during passages (Fig. 4m). HLCs showed the capability to synthesize and store glycogen greater than did hMSCs as detected by Periodic acid Schiff staining (Fig. 4n and o). The HLCs were also positive for gene expressions of α -fetoprotein, albumin and HNF4- α using quantitative RT-PCR (Fig. 4p). For major metabolic functions in hepatocyte involving carbohydrate, lipid and amino acid metabolism, HLCs expressed both glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) and tyrosine aminotransferase (TAT). The expression levels of basic hepatocyte markers (i.e., ALB, AFP, HNF4- α , and TAT) were increased between 10–20 folds over those from undifferentiated iPS cells.

The elevated expression levels of most basal CYP450 isozymes in mature HLCs were inducible with prototypic inducers

To achieve fully functional hepatocyte, mature HLCs were maintained in 10 % FBS Williams' Media E for 3 d and the cells were screened for CYP expression. HLCs expressed a number of CYP isozymes as illustrated by immunostaining and quantitative real-time PCR. The basal mRNA levels of CYP2B6, CYP2D6, and CYP2C9 in HLCs were 22-, 25-, and 20-fold that of HepaRG cells respectively; while CYP3A4, CYP2C19, CYP1A2 were around 10 folds. CYP2E1 in HLCs was up-regulated to 40-fold that of the undifferentiated iPS cells (Fig. 5a). Other isozymes achieved comparable expression levels to those of HepaRG and the primary human hepatocytes. To evaluate the inducibility of these CYP isozymes, the HLCs were incubated with the cocktail of chemical inducers (20 μ M rifampicin, 50 μ M omeprazole, 1 mM phenobarbital and 88 μ M ethanol). The expressions of CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4 in HLCs were increased to 2, 2, 4, 3.5 folds respectively after the induction with the cocktail. In comparison, the expressions of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 in HepaRG were increased to 2, 2, 3.5 folds and comparable to those in HLCs (Fig. 5b). In particular, some CYP isozymes, e.g. CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 and CYP2E1 were more inducible in HLCs than in HepaRG cells. The expression levels of CYPs in primary human hepatocytes were dramatically decreased post-induction by 72 h. In addition to CYP expressions, HLCs contained high levels of organic anion transporting polypeptide 2 (OATP2). The elevated OATP2 expression could be extensively up regulated to 3 folds. For protein determination, more than 50 % of HLC populations were positive for intracellular CYP1A1, CYP3A4, CYP2B6 and CYP2E1 proteins (Fig. 5c–g). The immunofluorescent staining demonstrated the increasing expression of major CYP proteins (Fig. 5c–g), e.g., CYP3A4, CYP2B6, CYP1A1, CYP2C9 and CYP2E1. HLCs expressed multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) that represented the canalicular (apical) membrane of the hepatocyte as a biliary transport (Fig. 5h). The hMSC served as a control of non-hepatic cell (Fig. 5i). The increasing of CYP450 activities was investigated in hepatocytes (Fig. 5j). Mature HLCs population could proliferate, but still maintained hepatic morphology without losing basal levels of hepatic related gene expression.

HLCs expressed all major hepatitis C virus cell associated receptors

A potential application for HLCs is for the study of pathogen-host cell interactions. The HLCs derived from iPS cells were evaluated for the capability to host HCV replication. The expression of HCV receptors is essential

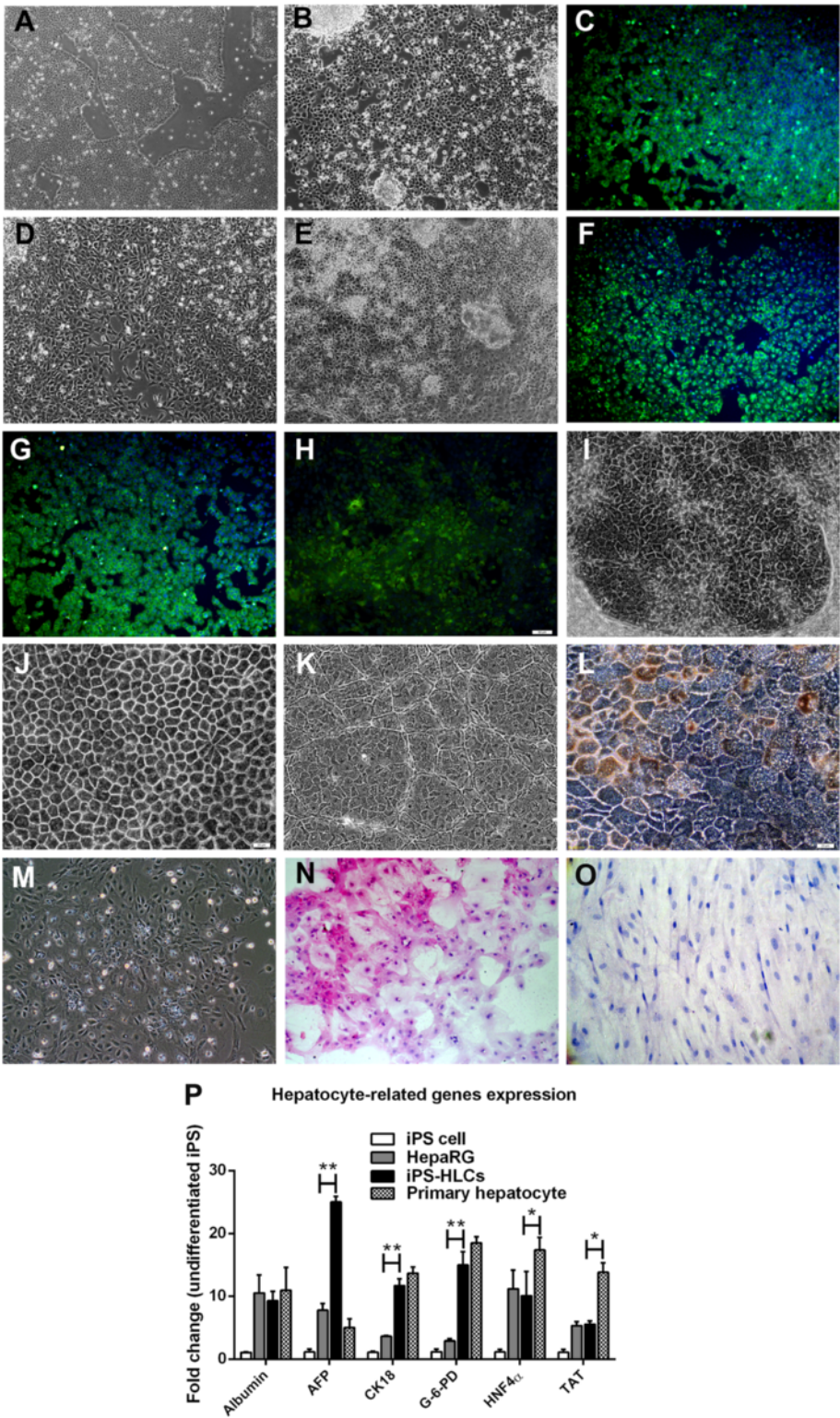


Fig. 4 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Fig. 4 The direct differentiation of iPS cell into fully the functional homogenous HLCs. The iPS cells in feeder-free condition at 60 % confluence (a) were differentiated into definitive endoderm with round-shaped morphology (b). During differentiation induction, cells were positive for Sox17 (c). During anterior definitive endoderm (ADE) development, the differentiated cells underwent epithelial to mesenchymal transition (EMT) (d). The ADE cells with oval-shape (e) served as hepatic progenitors. Differentiated cells were positive for α -fetoprotein (f), albumin (g) and HNF-4 α (h). The homogeneously mature HLCs exhibited polygonal morphology (i), cord-like structure with bile canaliculi (j) and hepatic sinusoidal-like structures (k). The HLCs were positive for bile pigment (l). The 2nd passage of HLCs still maintained the hepatic morphology (m). HLCs and hMSCs were examined for glycogen storage using PAS assay (n, o). HLCs, HepaRG and primary human hepatocyte were compared for the expressions of hepatocyte selective genes (p). Data were presented as a fold changes over the undifferentiated iPS cells. * and ** represented statistical different data with a *p* value <0.05 or <0.01 respectively

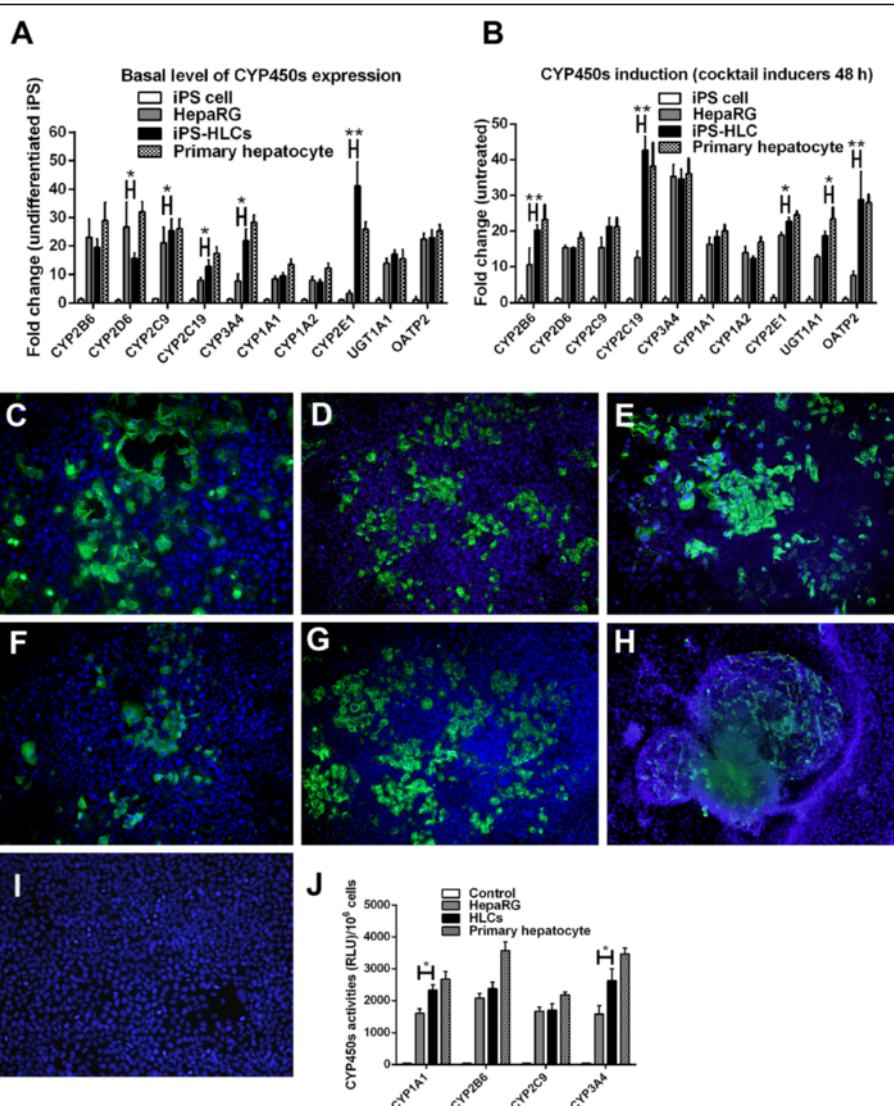


Fig. 5 The detection of function CYP450 isoenzymes in HLCs. Mature HLCs were investigated for CYP450 expression, protein levels and activities. HLC, HepaRG and primary hepatocyte were studied for the expression of CYP450 isoenzymes and presented as fold changes over the undifferentiated iPS cells (a). The CYP450 induction with the cocktail of inducers was evaluated and presented as fold changes over the corresponding untreated cells (b). * and ** represented statistical different data with a *p* value <0.05 or <0.01 respectively. The levels of CYP3A4 (c), CYP2B6 (d), CYP1A1 (e), CYP2C9 (f) and CYP2E1 (g) in untreated HLCs and inducer-treated HLCs were measured. Bile canaliculi marker (MRP2) was observed in HLCs (h), but not in human fibroblasts (i). The CYP450 activities (j) were assayed and presented as a relative light unit (RLU) over the corresponding untreated cells

for virus hepatitis C viral entry. Mature HLCs expressed all major receptors for HCV entry (Fig. 6a–c), e.g., specific tight junctions: claudin-1, occludin; cell surface receptor: TAPA-1 (CD81); scavenger receptor B1 (SR-BI), ApoB and ApoE. The expression of specific HCV receptors was increased together with the maturation stage of HLCs. On the cell surface of cultured HLCs, the protein products of these receptors were also detected (Fig. 6d–i), e.g., claudin-1, occludin, SR-BI, CD81, LDL-R and ApoE. Human fibroblast served as a negative control (Fig. 6j).

Hepatocyte-like cells support HCVcc virus production through JFH-1 system

To determine if HLCs could replace the Huh7 cells to host HCV, HLCs were transfected with JFH-1 RNA

using liposomal transfection [14]. Seven days after transfection, we found cytopathic effect with the aberration of cytoplasm in HLCs, but not with mock transfection (Fig. 7a and b). These cells had lower growth rate, aggregated and formed clusters of syncytial cells (Fig. 7c). These findings suggested that HCV might re-infect the HLCs in high titer. We could not observe the CPE nor the aberration of cytoplasm in mock transfection or JFH-1 transfected Huh7 cell on day 7 and day 14 (Fig. 7d–f). Conditioned medium from HLCs and Huh7 was harvested every 3 d and filtered through a 0.45 μ m syringe filter. The suitable multiplicity of infection (MOI) was optimized using 10-fold HCV dilution. Cell viability was determined with MTT assay (Fig. 7g and h). The HCV viral load was determined and compared between different cell lines (Fig. 7i). The kinetics of viral

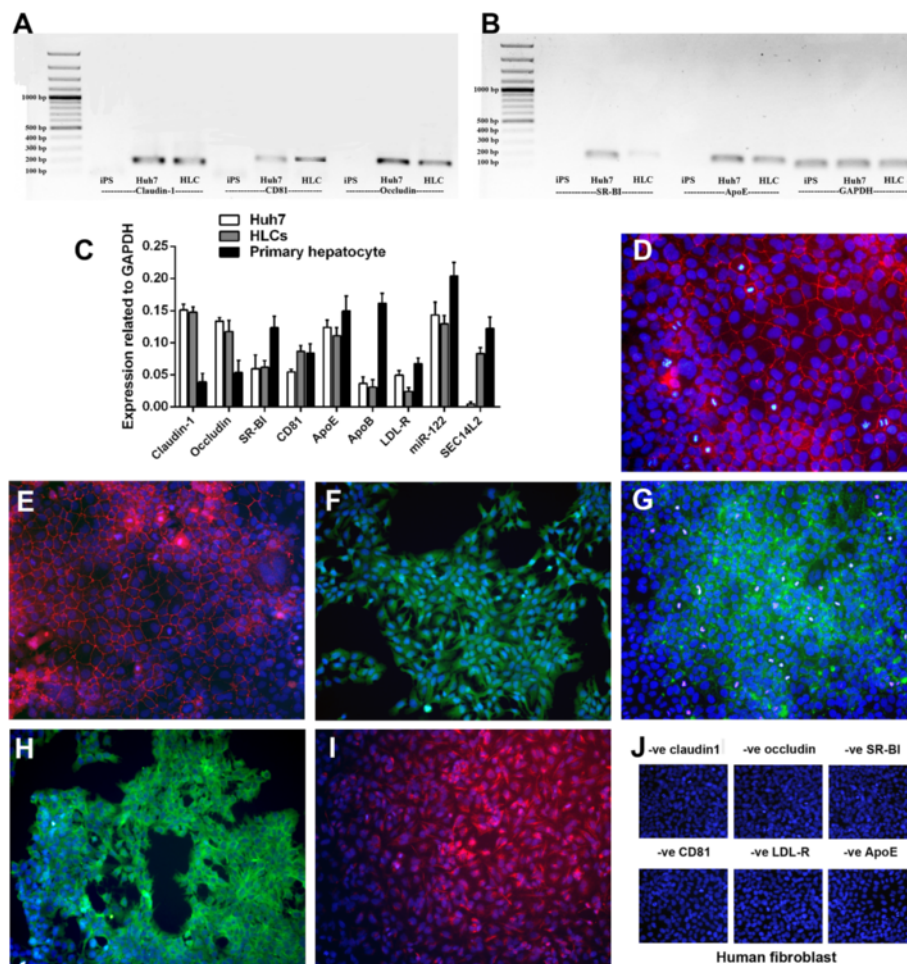


Fig. 6 Identifications of HCV cell-associated receptors and essential host factors on HLCs. Gel electrophoresis from RT-PCR products confirmed the expression of major HCV cell-associated receptors in iPS cell, Huh7 and HLCs (a, b). The expression levels of HCV cell-associated receptors and essential host factors (claudin-1, occludin, SR-BI, CD81, ApoE, ApoB, LDL-R, miR-122 and SEC14L2) in HLCs, HepaRG and primary hepatocyte were determined using real-time RT-PCR (c). * and ** represented statistical different data with a p value <0.05 or <0.01 respectively. Cellular localization of HCV cell-associated receptors was visualized using immunofluorescent staining. HLCs were visualized for claudin-1 (d), occludin (e), SR-BI (f), CD81 (g), LDL-R (h) and ApoE (i) in comparison to those observed in human fibroblasts (j)

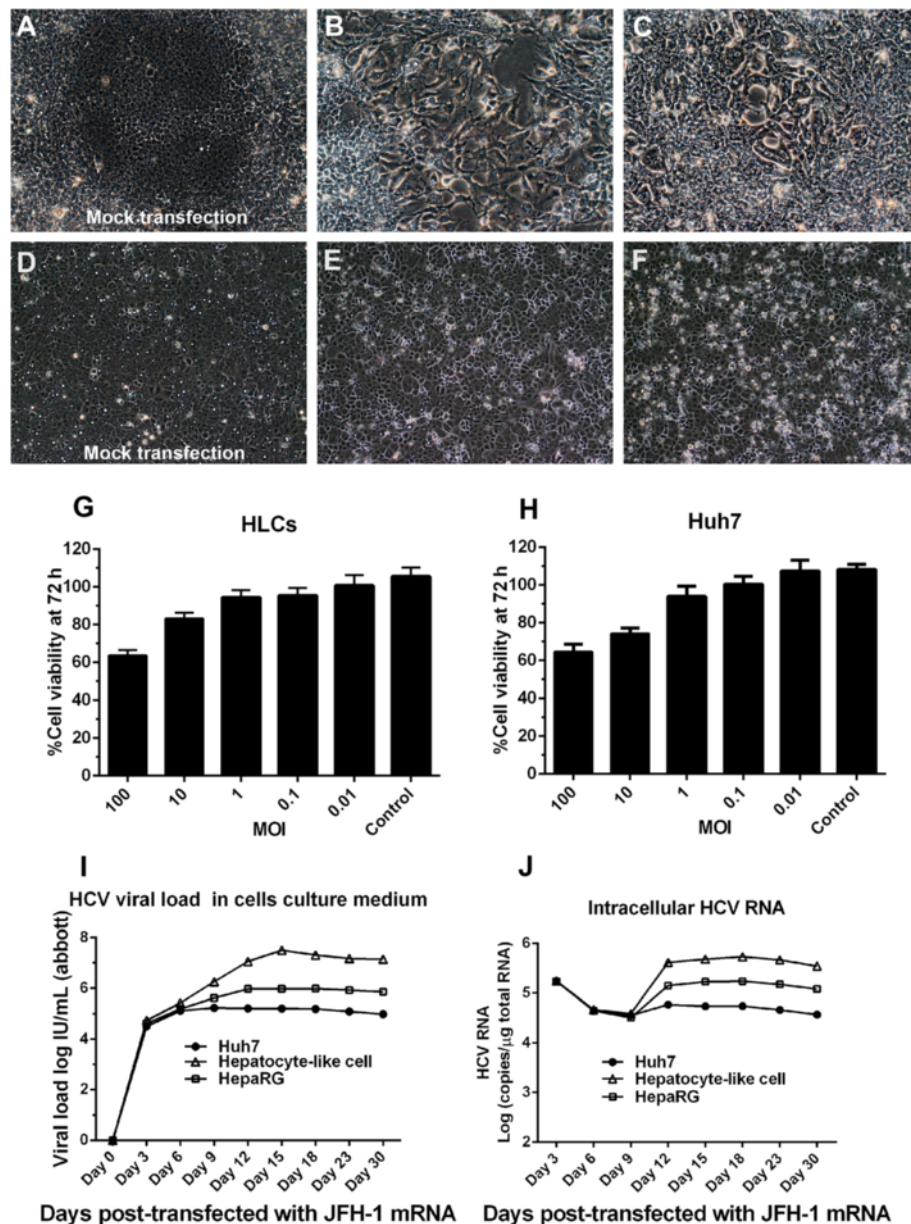


Fig. 7 Production of HCVcc (JFH-1) in HLCs and the viral propagation kinetics. HLCs were either mock transfected (a) or transfected with JFH-1 RNA to produce HCVcc had induced cytopathic effect, cell aberrations (CPE) on day 7 (b) and syncytial formation (c) on day 14. In comparison, Huh7 cells were either mock transfected (d) or transfected with JFH-1 RNA on day 7 (e) and 14 (f). Cell viability assay using MTT in HLCs (g) and Huh7 (h) corresponded to the MOI of HCVcc. The kinetics of HCV production in the culture medium were investigated using Abbott real-time HCV assay (i); while the kinetics of HCV replication were investigated using stand-specific real-time RT-PCR (j) in Huh7, HLCs and HepaRG cells

production varied depending on the hosting cells. The maximal HCV production was achieved between 12-15 d post-transfection. HCV viral load from Huh7 was about 10^5 IU/mL but HLCs could provide up to 10^7 IU/mL (Fig. 7i), comparable to those offered (10^8 IU/mL) by the transfected Huh7.5 [17]. The detection of HCV in HLCs supernatant was maintained beyond 1 month. In transfected Huh7 cells, HCV viral load was decreased to

10^4 IU/mL within 2 weeks and completely vanished in two months (Fig. 7i and j).

Completion of the wild-type HCV life cycle in HLC and the production of HCV progeny

The naïve HLCs and naïve Huh7 cells were infected with either HCVcc (JFH-1 genotype 2a) or with HCVser of various genotypes including 1a, 1b, 3a, 3b, 6f and 6n.

HCVcc could be obtained from the earlier transfection of HLCs or Huh7 with JFH-1 RNA. HCVser was collected from chronic hepatitis C patient. The cytopathic effect (CPE) in the infected cells was observed on both day 7 and 14 after infection (Fig. 8a–c). The cytoplasmic

localization of non-structural proteins: NS3A, NS5A, NS5B and structural protein: HCV core antigen was clearly detected. Therefore, HLCs allowed both HCV entry and the transcription of viral RNA (Fig 8d–h). To ensure that the HLCs support entire HCV life cycle, the

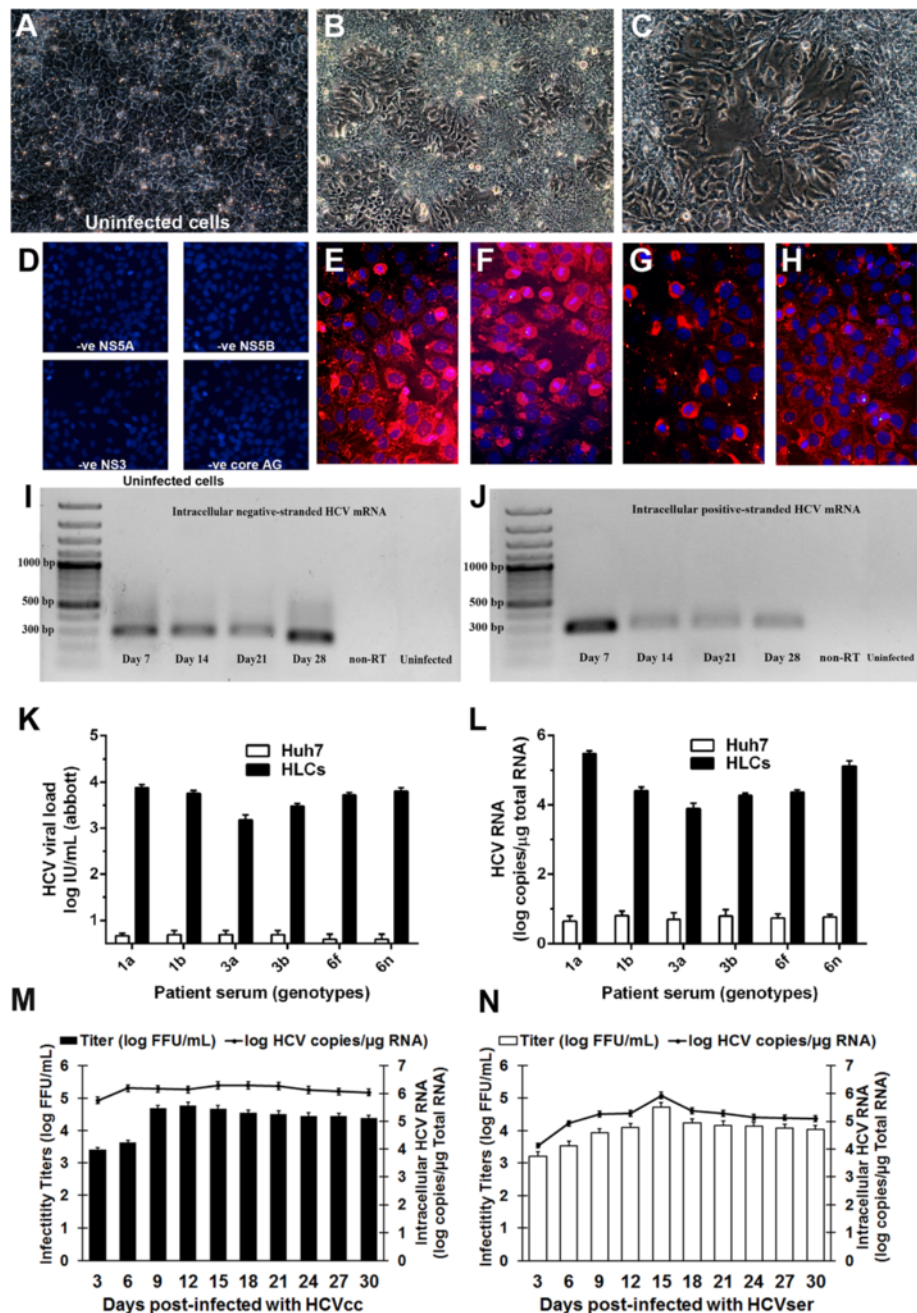


Fig. 8 HLCs supported entire HCVcc and HCVser life cycle. Uninfected HLC (a) or HLCs infected with HCVcc (JFH-1) or HCVser (genotype 1a) were observed for CPE and cytoplasmic aberrations (b, c). Uninfected HLCs (d), or HLCs after the infection for 14 d were investigated for HCV non-structural proteins, e.g., zinc-binding phosphoprotein (NS5A) (e), viral RNA polymerase (NS5B) (f), viral protease enzyme (NS3) (g) and the HCV structural protein (core antigen) (h). The intracellular negative-strand RNA represented the HCV replication (i). The intracellular positive-strand RNA level represented HCV entry and production (j). HCVser viral load (k) and intracellular RNA (l) in Huh7 and HLCs after natural HCV infection were monitored. The infectivity titers of HCVcc (m) and HCVser (n) were examine using fluorescent focus forming units (FFU/mL); while the intracellular HCV RNA was determined by quantitative real-time PCR (RNA log copies/μg of total RNA)

total RNA prepared from infected HLCs and Huh7 cell was investigated for the presence of HCV negative-strand RNA using specific RT-PCR primers. The viral RNA was maintained in infected cells up to 4 weeks in HLCs 2 weeks in Huh7 cells. The presence of positive-strand of viral RNA was measured in the supernatant from the infected cells using RT-PCR analysis (Fig. 8i and j). The HCVcc viral loads were 10^7 IU/mL and 10^4 IU/mL from the supernatants of HLCs and Huh7, respectively. The levels of intracellular HCV negative-strand RNA and positive-strand RNA were determined by reverse transcription PCR every week after transfection until 4 weeks. The negative-strand RNA was merely detectable on day 7 and increased on day 14 (Fig. 8i and j). For HCVser, HLCs allowed viral propagation as determined by the increasing HCV particles in culture medium (Fig. 8k) and the detection intracellular HCV RNA (Fig. 8l). Huh7 cell, in contrast, could barely hosted HCV derived from patient serum. The HCVser viral loads were 10^4 IU/mL from the supernatants of HLCs. The kinetics of viral replication post-infection with either HCVcc (JFH-1) or HCVser (genotype 1a) in HLCs were determined using HCV titer and intracellular HCV RNA. The kinetics of HCV production suggested that HLCs supported complete HCV replication of both HCVcc and HCVser (Fig. 8m and n). However, HLCs did allow HCVser replication beyond 4 weeks (Fig. 8n). The immunostaining and RT-PCR analysis confirmed that the entire replication cycle and formation of HCV progeny took place in HLC and the supernatants from the infected cultures could efficiently infect naïve HLCs and Huh7 cells.

The α -tocopherol-pretreated HLCs improved HCV viral load

The effect of α -tocopherol to HCVser infection was investigated using HLCs and Huh7 cell line. After the pretreatment with 1 μ M or 5 μ M α -tocopherol for 24 h and infection with either HCVcc (JFH-1) or HCVser genotype 1a, the infected HLCs and Huh7 cells were further maintained for 14 days. The HCVser viral load was raised to 10^6 IU/mL in HLCs but the HCVcc viral load was not affected by α -tocopherol. In Huh7 cell, α -tocopherol did not improve the HCV viral load in HCVser infection and HCVcc (JFH-1) infection (Fig. 9a and b).

The efficacy study of anti-HCV drugs in infected HLCs

To screen for the sensitivity of infected HLCs to anti-HCV agents, naïve HLCs were infected with 10^6 IU/mL of either HCVcc (from conditioned medium of HLCs) or HCVser. Different anti-HCV agents or their combinations, e.g., ribavirin (20 μ M), IFN- α (10 IU/mL), and sofosbuvir (PSI-7977, 200 nM) were incubated with the 24-h infected cells for 7 d. The HCV RNA expression in

HCVcc and HCVser served as drug response. The intracellular HCV RNA was determined by real-time qPCR at 4, 8, 12, and 24 d after the infection initiation. Ribavirin, IFN- α and sofosbuvir were not cytotoxic up to 100 μ M, 10 IU/mL and 100 μ M respectively. Either ribavirin or IFN- α decreased HCV RNA to 50 % in Huh7 and HLCs. The combination of IFN- α and ribavirin decreased viral RNA to 20 %. Sofosbuvir decreased viral RNA below 20 %. (Fig. 9c and d). The IC_{50} of IFN- α toward HCV RNA level in HLCs and Huh7 cells were 5.3 and 2.4 IU/mL respectively ($p < 0.01$). The IC_{50} of ribavirin in HLCs and Huh7 were 6.9 and 3.2 μ g/mL respectively ($p < 0.01$). The IC_{50} of sofosbuvir in HLCs and Huh7 were 96 and 92 nM respectively ($p < 0.01$) (data not shown).

Host inflammatory response and the maintenance of long-term HCVcc propagation in HLCs

Relative real-time qPCR on days 3 and 14 revealed that the expression of inflammatory markers, e.g. TNF- α , IL-28B and IL-29 were inducible during the infection. Particularly, IL-28B expression in response to HCV infection was observed earlier only in primary human hepatocyte, but also in our HLCs model (Fig. 9e). Long-term HCVcc production was evaluated by infecting naïve HLCs with viral load 10^7 IU/mL for 72 h. The cell culture medium that had been replaced every week still carried HCV particles up to 6 months. The kinetics of HCV represented the new viral particles releasing from infected cell to the medium (Fig. 9f). At 4-week post-infection, the HCVcc viral load varied from 10^4 to 10^5 IU/mL and increased at 2-3 months later to 10^5 IU/mL. The HCV viral production was still maintained at 10^4 - 10^5 IU/mL up to 5 months. Until 6 months, most of the HLCs died in accordance with the viral CPE.

Discussion

Our study demonstrated that HLCs could host HCV for at least 6 months while retaining the capability to allow a complete viral life cycle. In these regards, HLCs are superior to the classical HCV host, the Huh7 cells. Despite HLCs had been studied in association with HCV, only a brief infection with JFH-1 had been addressed. These earlier studies employed immature and heterogeneous HLCs derived from iPS/ES cells as host cells for HCVcc infection [27, 28, 30]. These cells did not express all of major functional CYP450s and were functionally immature that constrained the study of HCV-host interactions [39–42]. We expanded this observation by elucidating the mature HLCs not only as a viral target, but as a producer of new viral particles to complete a viral life cycle.

We modified the previous hepatic differentiation protocol [31, 43, 44] to achieve homogenous population of fully functional HLCs by extending the maturation

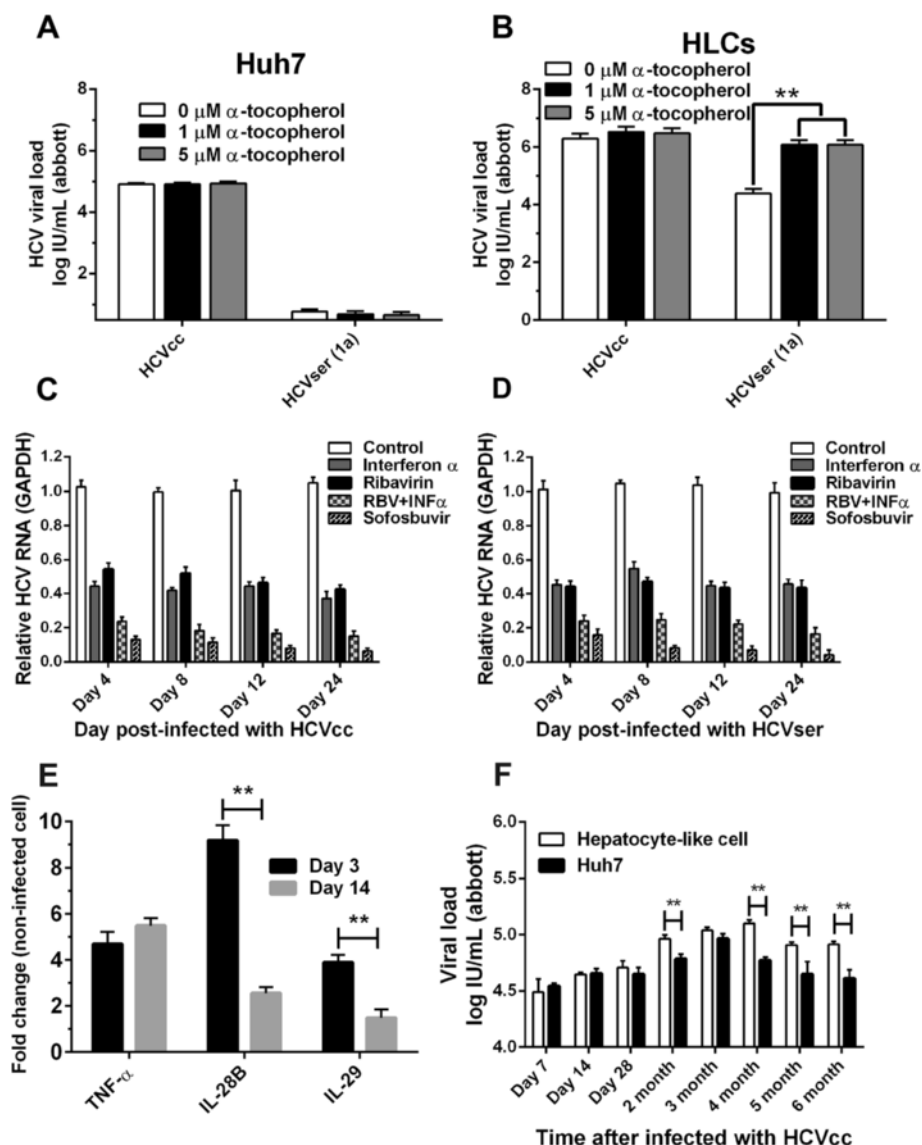


Fig. 9 The enhancing effect of α -tocopherol and the inhibitory effects of anti-HCV drugs on HCV replication. Huh7 (a) and HLCs (b) were treated with 0, 1, 5 μ M α -tocopherol 24 h prior to infection with HCVser and assayed for HCV viral load. For anti-viral treatment, HLCs were either infected with HCVcc or HCVser ($n = 3$) for 24 h prior to the treatment with ribavirin, Interferon- α or sofosbuvir for 7 d. Copies of HCV RNA in lysates were quantified by real-time PCR (c, d). Infected HLCs were assayed for inflammatory markers (e). For long-term maintenance of HCVcc in HLCs, the supernatants of the infected HLCs were measured for viral load up to 6 months (f)

step. The differentiated cells were challenged with a cocktail of CYP inducers. During hepatic differentiation, the differentiated cells expressed hepatic lineage markers (Sox17, AFP and albumin). In final step, we observed the homogeneous of hepatocyte-like cell with bile canaliculi, hepatic triad-like structure and bile pigments. HLCs were positive for hepatocyte selective markers, e.g., HNF-4 α and tyrosine aminotransferase (TAT). The expression level of hepatic markers was higher than those of HepaRG cell, but were comparable to those of primary hepatocyte.

The xenobiotic biotransformation is a crucial and specialized function of hepatocyte. Previous studies could drive the differentiation of human iPS cells to only immature hepatocytes [45, 46]. Our study demonstrated that HLCs express phase I (CYP2B6, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2 and CYP2E1), phase II drug-metabolizing enzyme (OATP2) and phase III drug transporters (MRP2) at levels comparable to those of primary human hepatocytes, but higher than HepaRG, the hepatocellular carcinoma cell line frequently used in pharmaceutical industry. The expression of all major

CYP450s was inducible with the standard cocktail of inducers [33].

Cellular polarity is crucial for maintaining hepatic phenotype and the susceptibility to HCV [47]. At the end of hepatic induction, four types of HCV receptors on the basolateral membrane were detected, i.e., claudin-1, occludin, SR-BI and CD81. HCV particles triggered the increase in CD81 and claudin-1 endocytosis via clathrin [48]. Clathrin-dependent endocytosis and LDL metabolism involved in the processes of HCV entry [49–51]. ApoB and ApoE were involved in the production of HCVcc in Huh7 cells [52]. Both apolipoproteins and LDL-receptors on apical membrane correlated with HCV entry and emission from host cells [53]. The production of infectious particles depended on VLDL secretion pathway in hepatocytes [54]. We observed the increasing expressions of ApoE, ApoB and LDL receptors after maturation.

Since the discovery of JFH-1 replication in Huh7 cells [11], subclones of Huh7 (Huh7.5 and Huh7.5.1) had been developed as a replacement for primary hepatocytes. HCV has been classified into seven major genotypes and numerous of subtypes [55–57]. Nonetheless, JFH-1 is a single unusual HCV strain of genotype 2a. Other genotypes could not be maintained in Huh7 cells due to cell tropism and the restrict host range. The robust propagation systems of full-length HCV clones of the TN strain (1a) [58], H77 strain (genotype 1a) [59], JFH-2 (2a) and s310 strain (3a) [60] were developed but the construction of other HCV genotypes has not been success. HepG2, Hep3B and HEK293T cells allowed HCVcc replication [61–63]. However, these cells require exogenous host factors (e.g., miR-122, claudin-1 and ApoE) for complete propagation of HCVcc [63]. Novel culture models that can host various HCV genotypes are required. Our study showed that HCV production was sustained for six months in HLCs that had been either transfected with full-length JFH-1 RNA or infected with HCV genotype 1a, 1b, 3a, 3b, 6f and 6n. No requirement for exogenous expression of cellular host factors was required for the production of HCVcc. HCVcc and HCVser produced from HLCs could infect naïve hepatocytes.

The essential HCV host factors, miR-122 and SEC14L2, facilitated the propagation of HCV in cultured hepatocyte. SEC14-like protein 2 (SEC14L2) promoted HCVser infection by upregulating vitamin E-mediated protection against lipid peroxidation. SEC14L2 together with α -tocopherol transfer protein and cellular retinol-binding protein involved in cholesterol biosynthetic pathway [64]. Both miR-122 and SEC14L2 were highly expressed in HLCs and primary human hepatocytes, but not Huh7 cells, correlated with the capability to host HCVser propagation.

After transfection with HCV RNA or infection with patient serum, we found the CPE in both transfected

and infected HLCs within 7-d post-transfection. HCV viral load in culture was 10^4 IU/mL on day 3 and 10^8 IU/mL on day 15; while the intracellular HCV RNA was detectable starting on day 3. Taken together, HLCs supported complete HCV life cycle from JFH-1 system and from patient serum.

Host cell immune response play a major role in antiviral activity which is naturally occurred in animal models but defective in current cell culture model of HCV [65]. HLCs were investigated for cellular immune responses by infecting with HCVcc for 14 d and inflammatory cytokines were detected on day 3 and day 14. The cellular response to HCV infection was clearly observed in HLCs. In HLCs, the expressions of inflammatory cytokines, e.g., TNF- α , IL-28B and IL-29 were up-regulated during the infection that mimicked the natural infection in the primary hepatocytes. IL-28B is associated with the sensitivity of IFN treatment of chronic hepatitis C patients [66, 67]. These results are typical of an ongoing inflammatory response in cells that could serve as indicators for subsequent antiviral strategies.

Our study implicated that our HLCs could substitute the primary hepatocytes to serve as a generalized host for HCV. A complete life cycle of the wild-type HCV could be driven in our culture system. With this encouraging observation, an array of applications of HLCs for the study of hepatocyte-pathogen interactions would be the next direction. The list of potential pathogens included hepatitis B and dengue viruses that have been conventionally limited to human biopsies, surgical resection, organ donation and hepatocellular carcinoma cells from clinical specimens. The obtained host-pathogen interactions would provide a platform for the screening of efficacious antiviral regimens in accordance with personalized medicine.

Conclusions

Here, we have developed the functional homogenous HLCs starting from hMSCs through iPS cell reprogramming. These HLCs were confirmed for eliciting major hepatic functions including CYP450 activities. They exhibited the capability for hosting long-term HCVser infection in cell culture condition, bypassing the earlier limitation to the genotype 2a. Together with the expression of SEC14L2 and the addition of α -tocopherol, the HCVser infection in HLCs were further intensified. We demonstrated that the production of HCV genotype 1a, 1b, 3a, 3b, 6f and 6n were sustained for at least six months in these HLCs. The HCV-infection was controlled by the upregulation of TNF- α , IL-28B and IL-29. Taken together, this novel HCV culture could serve as a model for HCV biology, host immune response, and antiviral strategy.

Ethics approval and consent to participate

Human mesenchymal stem cells (hMSC) were isolated from aspirated bone marrow of consenting healthy donors ($n = 3$). This procedure received an approval from the Ethics Committee on Research Involving Human Subjects at Ramathibodi Hospital, Mahidol University (2554/404). All subjects are adults and provided written informed consent.

Additional file

Additional file 1: Primer sets and conditions used in quantitative real-time PCR (qPCR). (DOCX 15 kb)

Abbreviations

HCV: Hepatitis C virus; JFH1: Japanese Fulminant Hepatitis 1; HCVcc: Hepatitis C Virus derived from cell culture; HCVser: Hepatitis C Virus derived from patient serum; HLCs: Hepatocyte-Like Cells; hMSC: Human Mesenchymal Stem Cell; iPSC: Induced Pluripotent Stem Cell; PCR: Polymerase Chain Reaction; CYP450: Cytochrome P450; INF: Interferon; RLU: Relative Light Unit.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

KS and PP performed most of the experiments, designed the protocol, performed the statistical analysis and drafted the manuscript. AW, SB, and SH designed the protocol. NK participated in the teratoma assay in nude mice. PP prepared the lentiviral vectors and iPSC cell reprogramming. WC collected HCV from patient serum and provided HCV viral load detection using Abbott RealTime HCV assay. AW and SH coordinated the study. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors would like to thank Prof. Takaji Wakita (National Institute of Infectious Diseases, Japan) for his generous gift of the full-length JFH1 HCV plasmid.

Funding

This study was funded by the research grants of Mahidol University and the Thailand Research Fund (TRF) separately awarded to A. Wongkajornsilp and K. Sa-ngiamsuntorn. K. Sa-ngiamsuntorn is a recipient of Mahidol Postdoctoral Fellowship. A. Wongkajornsilp is a recipient of Chalermprakiat grant of the Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University.

Author details

¹Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, 10400, Thailand. ²Department of Pharmacology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, 2 Wanglang Road, Bangkoknoi, Bangkok 10700, Thailand. ³Stem Cell Research Group, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Nakhon Pathom 73170, Thailand.

⁴Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand. ⁵Department of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.

⁶Department of Pediatrics, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, 270 Rama VI Road, Ratchatewi, Bangkok 10400, Thailand.

Received: 31 December 2015 Accepted: 29 March 2016

Published online: 05 April 2016

References

- Pawlotsky JM, Chevaliez S, McHutchison JG. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology*. 2007;132:1979–98.
- Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspe G, Kuiken C, Maertens G, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2005;42:962–73.
- Chisari FV. Unscrambling hepatitis C virus-host interactions. *Nature*. 2005;436:930–2.
- Yu Y, Fisher JE, Lillegard JB, Rodysill B, Amiot B, Nyberg SL. Cell therapies for liver diseases. *Liver Transpl*. 2012;18:9–21.
- Joshi D, Pinzani M, Carey I, Agarwal K. Recurrent HCV after liver transplantation: mechanisms, assessment and therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11:710–21.
- Xiao F, Fofana I, Heydmann L, Barth H, Soulier E, Habersetzer F, Doffoel M, Bukh J, Patel AH, Zeisel MB, Baumert TF. Hepatitis C virus cell-cell transmission and resistance to direct-acting antiviral agents. *PLoS Pathog*. 2014;10:e1004128.
- Soltys KA, Soto-Gutierrez A, Nagaya M, Baskin KM, Deutsch M, Ito R, Schneider BL, Squires R, Vockley J, Guha C. Barriers to the successful treatment of liver disease by hepatocyte transplantation. *J Hepatol*. 2010;53:769–74.
- Jazwinski AB, Muir AJ. Direct-acting antiviral medications for chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2011;7:154–62.
- Halfon P, Locarnini S. Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. *J Hepatol*. 2011;55:192–206.
- Vinaixa C, Rubin A, Aguilera V, Berenguer M. Recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Ann Gastroenterol*. 2013;26:304–13.
- Wakita T, Kato T. Development of an Infectious HCV Cell Culture System. In *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*. Edited by Tan SL. Norfolk (UK): Horizon Bioscience; 2006.
- Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*. 2005;11:791–6.
- Catanese MT, Dorner M. Advances in experimental systems to study hepatitis C virus in vitro and in vivo. *Virology*. 2015;479–480:221–33.
- Bartenschlager R, Pietschmann T. Efficient hepatitis C virus cell culture system: what a difference the host cell makes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:9739–40.
- Blight KJ, McKeating JA, Marcotrigiano J, Rice CM. Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J Virol*. 2003;77:3181–90.
- Sa-ngiamsuntorn K, Wongkajornsilp A, Kasetsinsombat K, Duangsard S, Nuntakarn L, Borwornpinoy S, Akaraserenont P, Limrichamrern S, Hongeng S. Upregulation of CYP 450 s expression of immortalized hepatocyte-like cells derived from mesenchymal stem cells by enzyme inducers. *BMC Biotechnol*. 2011;11:89.
- Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:9294–9.
- Blight KJ, McKeating JA, Rice CM. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*. 2002;76:13001–14.
- Breiman A, Grandvaux N, Lin R, Ottone C, Akira S, Yoneyama M, Fujita T, Hiscott J, Meurs EF. Inhibition of RIG-I-dependent signaling to the interferon pathway during hepatitis C virus expression and restoration of signaling by IKKepsilon. *J Virol*. 2005;79:3969–78.
- Helle F, Brochet E, Fournier C, Descamps V, Izquierdo L, Hoffmann TW, Morel V, Herpe YE, Bengrine A, Belouard S, et al. Permissivity of primary human hepatocytes and different hepatoma cell lines to cell culture adapted hepatitis C virus. *PLoS One*. 2013;8:e70809.
- Podevin P, Carpentier A, Pene V, Aoudjehane L, Carriere M, Zaidi S, Hernandez C, Calle V, Merit JF, Scatton O, et al. Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology*. 2010;139:1355–64.
- Gondeau C, Briolotti P, Razafy F, Duret C, Rubbo PA, Helle F, Reme T, Ripault MP, Ducos J, Fabre JM, et al. In vitro infection of primary human hepatocytes by HCV-positive sera: insights on a highly relevant model. *Gut*. 2014;63:1490–500.
- Yu Y, Wang X, Nyberg SL. Potential and Challenges of Induced Pluripotent Stem Cells in Liver Diseases Treatment. *J Clin Med*. 2014;3:997–1017.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126:663–76.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131:861–72.
- Chun YS, Byun K, Lee B. Induced pluripotent stem cells and personalized medicine: current progress and future perspectives. *Anat Cell Biol*. 2011;44:245–55.


27. Schwartz RE, Trehan K, Andrus L, Sheahan TP, Ploss A, Duncan SA, Rice CM, Bhatia SN. Modeling hepatitis C virus infection using human induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:2544–8.
28. Roelandt P, Obeid S, Paeshuyse J, Vanhove J, Van Lommel A, Nahmias Y, Nevens F, Neyts J, Verfaillie CM. Human pluripotent stem cell-derived hepatocytes support complete replication of hepatitis C virus. *J Hepatol*. 2012;57:246–51.
29. Si-Tayeb K, Duclos-Vallee JC, Petit MA. Hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells (iHLCs) are permissive to hepatitis C virus (HCV) infection: HCV study gets personal. *J Hepatol*. 2012;57:689–91.
30. Wu X, Robotham JM, Lee E, Dalton S, Kneteman NM, Gilbert DM, Tang H. Productive hepatitis C virus infection of stem cell-derived hepatocytes reveals a critical transition to viral permissiveness during differentiation. *PLoS Pathog*. 2012;8:e1002617.
31. Hannan NR, Segeritz CP, Touboul T, Vallier L. Production of hepatocyte-like cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. 2013;8:430–7.
32. Warlich E, Kuehle J, Cantz T, Brugman MH, Maetzig T, Galla M, Filipczyk AA, Halle S, Klump H, Scholer HR, et al. Lentiviral vector design and imaging approaches to visualize the early stages of cellular reprogramming. *Mol Ther*. 2011;19:782–9.
33. Ulvestad M, Nordell P, Asplund A, Rehnstrom M, Jacobsson S, Holmgren G, Davidson L, Brolen G, Edsbacke J, Bjorquist P, et al. Drug metabolizing enzyme and transporter protein profiles of hepatocytes derived from human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Biochem Pharmacol*. 2013;86:691–702.
34. Vieyres G, Pietschmann T. Entry and replication of recombinant hepatitis C viruses in cell culture. *Methods*. 2013;59:233–48.
35. Yu X, Uprichard SL. Cell-based hepatitis C virus infection fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay for antiviral compound screening. *Curr Protoc Microbiol* 2010, Chapter 17:Unit 17 15.
36. Raymond VA, Selliah S, Ethier C, Houle R, Jouan L, Maniere T, Lamarre D, Willems B, Bilodeau M. Primary cultures of human hepatocytes isolated from hepatitis C virus-infected cirrhotic livers as a model to study hepatitis C infection. *Liver Int*. 2009;29:942–9.
37. Zorn AM. Liver development. In *StemBook*. Cambridge (MA): The Stem Cell Research Community; 2008.
38. Hu A, Shang C, Li Q, Sun N, Wu L, Ma Y, Jiao X, Min J, Zeng G, He X. Epithelial-mesenchymal transition delayed by E-cad to promote tissue formation in hepatic differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Stem Cells Dev*. 2014;23:877–87.
39. Touboul T, Hannan NR, Corbiveau S, Martinez A, Martinet C, Branchereau S, Mainot S, Strick-Marchand H, Pedersen R, Di Santo J, et al. Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development. *Hepatology*. 2010;51:1754–65.
40. Song Z, Cai J, Liu Y, Zhao D, Yong J, Duo S, Song X, Guo Y, Zhao Y, Qin H, et al. Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Cell Res*. 2009;19:1233–42.
41. Chen YF, Tseng CY, Wang HW, Kuo HC, Yang VW, Lee OK. Rapid generation of mature hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells by an efficient three-step protocol. *Hepatology*. 2012;55:1193–203.
42. Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, Li J, Battle MA, Duris C, North PE, Dalton S, Duncan SA. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology*. 2010;51:297–305.
43. Wongkajornsilp A, Sa-Ngiamsuntorn K, Hongeng S. Development of immortalized hepatocyte-like cells from hMSCs. *Methods Mol Biol*. 2012;826:73–87.
44. Zhao D, Chen S, Duo S, Xiang C, Jia J, Guo M, Lai W, Lu S, Deng H. Promotion of the efficient metabolic maturation of human pluripotent stem cell-derived hepatocytes by correcting specification defects. *Cell Res*. 2013;23:157–61.
45. Chistiakov DA, Chistiakov PA. Strategies to produce hepatocytes and hepatocyte-like cells from pluripotent stem cells. *Hepatol Res*. 2012;42:111–9.
46. Du Y, Wang J, Jia J, Song N, Xiang C, Xu J, Hou Z, Su X, Liu B, Jiang T, et al. Human hepatocytes with drug metabolic function induced from fibroblasts by lineage reprogramming. *Cell Stem Cell*. 2014;14:394–403.
47. Sainz Jr B, TenCate V, Uprichard SL. Three-dimensional Huh7 cell culture system for the study of Hepatitis C virus infection. *Virology*. 2009;416:103.
48. Farquhar MJ, Hu K, Harris HJ, Davis C, Brimacombe CL, Fletcher SJ, Baumert TF, Rappoport JZ, Balfe P, McKeating JA. Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis. *J Virol*. 2012;86:4305–16.
49. Meertens L, Bertaux C, Dragic T. Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J Virol*. 2006;80:11571–8.
50. Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, Rouille Y. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*. 2006;80:6964–72.
51. Collier KE, Berger KL, Heaton NS, Cooper JD, Yoon R, Randall G. RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis. *PLoS Pathog*. 2009;5:e1000702.
52. Shiokawa M, Fukuhara T, Ono C, Yamamoto S, Okamoto T, Watanabe N, Wakita T, Matsuura Y. Novel permissive cell lines for complete propagation of hepatitis C virus. *J Virol*. 2014;88:5578–94.
53. Owen DM, Huang H, Ye J, Gale Jr M. Apolipoprotein E on hepatitis C virus facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor. *Virology*. 2009;394:99–108.
54. Gastaminza P, Cheng G, Wieland S, Zhong J, Liao W, Chisari FV. Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol*. 2008;82:2120–9.
55. Gottwein JM, Scheel TK, Jensen TB, Lademann JB, Prentoe JC, Knudsen ML, Hoegh AM, Bukh J. Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1–7 cell culture systems: role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral drugs. *Hepatology*. 2009;49:364–77.
56. Scheel TK, Gottwein JM, Mikkelsen LS, Jensen TB, Bukh J. Recombinant HCV variants with NS5A from genotypes 1–7 have different sensitivities to an NS5A inhibitor but not interferon-alpha. *Gastroenterology*. 2011;140:1032–42.
57. Tariq H, Manzoor S, Parvaiz F, Javed F, Fatima K, Qadri I. An overview: in vitro models of HCV replication in different cell cultures. *Infect Genet Evol*. 2012;12:13–20.
58. Li YP, Ramirez S, Jensen SB, Purcell RH, Gottwein JM, Bukh J. Highly efficient full-length hepatitis C virus genotype 1 (strain TN) infectious culture system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:19757–62.
59. Yi M, Villanueva RA, Thomas DL, Wakita T, Lemon SM. Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:2310–5.
60. Saeed M, Gondeau C, Hmwe S, Yokokawa H, Date T, Suzuki T, Kato T, Maurel P, Wakita T. Replication of hepatitis C virus genotype 3a in cultured cells. *Gastroenterology*. 2013;144:56–8. e57.
61. Narbus CM, Israelow B, Sourisseau M, Michta ML, Hopcraft SE, Zeiner GM, Evans MJ. HepG2 cells expressing microRNA miR-122 support the entire hepatitis C virus life cycle. *J Virol*. 2011;85:12087–92.
62. Kambara H, Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Ohara Y, Kamitani W, Matsuura Y. Establishment of a novel permissive cell line for the propagation of hepatitis C virus by expression of microRNA miR122. *J Virol*. 2012;86:1382–93.
63. Da Costa D, Turek M, Felmlee DJ, Girardi E, Pfeffer S, Long G, Bartschlag R, Zeisel MB, Baumert TF. Reconstitution of the entire hepatitis C virus life cycle in nonhepatic cells. *J Virol*. 2012;86:11919–25.
64. Saeed M, Andreo U, Chung HY, Espiritu C, Branch AD, Silva JM, Rice CM. SEC14L2 enables pan-genotype HCV replication in cell culture. *Nature*. 2015;524:471–5.
65. Schoggins JW, Rice CM. Innate immune responses to hepatitis C virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;369:219–42.
66. Fukuhara T, Taketomi A, Motomura T, Okano S, Ninomiya A, Abe T, Uchiyama H, Soejima Y, Shirabe K, Matsuura Y, Maehara Y. Variants in IL28B in liver recipients and donors correlate with response to peg-interferon and ribavirin therapy for recurrent hepatitis C. *Gastroenterology*. 2010;139:1577–85. 1585 e1571–1573.
67. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, Bassendine M, Spengler U, Dore GJ, Powell E, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet*. 2009;41:1100–4.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Effects of the Ayurved Siriraj Wattana recipe on functional and phenotypic characterization of cytokine-induced killer cells and dendritic cells in vitro

Adisak Wongkajornsilp¹, Nuntarak Numchaisersuk¹, Khanit Sa-ngiamsuntorn⁴, Pravitt Akarasereenont^{1,2}, Valla Wamanuttajinda¹, Kanda Kasetsinsombat¹, Sunisa Duangsa-ard¹, Tawee Laohapan² and Kittipong Maneechotesuwan^{3*} 

Abstract

Background: Ayurved Siriraj Wattana recipe (AVS073), has been prescribed as tonic, to increase appetite, and for pain relief. It also exhibits antioxidant, anti-inflammatory, immunomodulating and anti-cancer activities. However, the immunomodulatory effects on antigen-presenting cells and effector T cells remained elusive. We thus aimed to study the effects of AVS073 on differentiation, maturation, functions and proportions of CIK cells and monocyte-derived DCs.

Methods: CIK cells and monocyte-derived DCs were treated with AVS073, followed by the assessment of T-helper (Th) phenotypes using real-time RT-PCR and flow cytometry.

Results: AVS073 promoted Th1 phenotype in CD3⁺CD56⁺ subset of CIK cells through increasing STAT4, T-bet, and interferon- γ . AVS073 inhibited Th2 phenotype through decreasing STAT6. AVS073 inhibited Treg phenotype through decreasing STAT5A, STAT5B and IDO. AVS073 promoted Th17 phenotype through increasing STAT3, RORC and IL-17. AVS073 treatment of mDCs resulted in increasing Th1-prone cytokine (IL-12) and Th17-prone cytokines (IL-6 and IL-23).

Conclusions: AVS073 upregulated Th1 and Th17, but downregulated Th2 and Treg phenotypes within CD3⁺CD56⁺ cells. The treatment of mDCs drove Th1 and Th17-polarizations.

Keywords: CIK cells, Dendritic cells, Lymphocytes, Traditional medicine Asia, Immunomodulation, Cytotoxicity

Background

Ayurved Siriraj Wattana recipe (AVS073) [1] has been used in Thai traditional medicine for decades. The recipe was prescribed for health promotion, strength supplement, appetite induction and attenuation of degeneration (anti-aging). It has recently been tested for immunomodulatory activity (NK cells activity), osteoarthritis and gastric emptying rate [2–4]. It conveyed protection against UVA-induced melanogenesis through an antioxidant/redox mechanism [1]. The 18 medicinal

plant components of the recipe are *Aegle marmelos* (L.) Corrêa., *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf., *Caesalpinia sappan* L., *Carthamus tinctorius* L., *Cinnamomum siamense* Craib, *Citrus sinensis* L.Osbeck, *Cladogynos orientalis* Zipp. ex Span., *Cryptolepis buchanani* Roem. & Schult., *Cyperus rotundus* L., *Derris scandens* (Roxb.) Benth., *Drypetes roxburghii* Wall., *Ferula assa-foetida* L., *Ligusticum sinense* Oliv., *Mallotus repandus* (Willd.) Müll.Arg., *Piper nigrum* L., *Saussurea lappa* (Decne.) Sch.Bip., *Terminalia chebula* Retz., *Tinospora crispa* (L.) Hook. f. & Thomson.

Aegle marmelos (L.) Corrêa has been used in the treatment of chronic diarrhea, peptic ulcers and dysentery, as a laxative and to recuperate from respiratory affections

* Correspondence: kittipong.man@mahidol.ac.th

³Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, 2 Wanglang Road, Bangkoknoi, Bangkok 10700, Thailand
Full list of author information is available at the end of the article

in various traditional medicines [5, 6]. *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf has been commonly used in Southeast Asia as a food ingredient. Traditional healers throughout Thailand have been using this plant against inflammation, aphthous ulcer, dry mouth, stomach discomfort, dysentery, oral disease and cancers [7–9]. The heartwood of *Caesalpinia sappan* L. has been used as a hemostatic, analgesic and anti-inflammatory for traumatic disease and blood flow promoting agent [10–13]. *Carthamus tinctorius* L. has various pharmacological effects, e.g., anticoagulant and antithrombotic activities, anti-fibrotic effect, immunomodulatory activity [14–16]. The stem of *Cryptolepis buchanani* Roem. & Schult. has been used for the treatment of inflammation, including muscle and joint pain [17–19]. *Cyperus rotundus* L. has antidepressant [20] and anti-melanogenesis activities [21]. *Tinospora crispa* (L.) Hook. f. & Thomson has immunostimulatory effect [22, 23]. The other plant components in AVS073 also have anti-inflammatory effect and analgesic activity [24–30]. Some components of AVS073 showed direct anti-cancer properties through inhibiting cell growth or inducing cellular apoptosis, and indirect pathway via the immunological action of immune cells [31, 32]. Several in vitro and in vivo studies demonstrated that the extracts of AVS073's components carried antioxidant, anti-inflammatory, immunomodulating and anti-cancer actions [33–40].

Differentiation of Th1 cells are driven by STAT1 and STAT4 while STAT6 and GATA3 induces Th2 cells, forkhead transcription factor (Foxp3) induces regulatory T (Treg) cells, and retinoic acid-related orphan receptor (Rorc) induces Th17 cells [41]. Differentiation of Th1 cell and regulatory T (Treg) cells may be actually linked to the differentiation of Th2 and Th17, respectively, depending on the overall cytokine milieu. The differentiation of both Treg and Th17 cells requires TGF- β . The differentiation of Th17 cells requires low concentrations of TGF- β in combination with the pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-23 [42], while in the absence of pro-inflammatory cytokines, high concentrations of TGF- β is optimal for Foxp3 expression and thus tips the balance towards Treg cell differentiation [43, 44]. In addition to cytokine environment, Treg cell development could be enhanced by kynurenine [45], a breakdown product of indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) in dendritic cells (DCs).

DCs are professional antigen presenting cells that present antigens to naïve T cells, inducing their differentiation towards either Th1 or Th2 phenotype. DCs that generate Th1 responses would handle infections or malignant disorders via the induction of Th1-polarizing cytokine interleukin-12 (IL-12) and interferon-gamma (IFN- γ) [31]. In addition, Th17 cells also play a role in anti-tumor immunity [46]. In contrast, induction of Th2

responses by DCs may provide clinical benefits when Th1 responses are excessive, e.g., transplantation, contract allergy, or autoimmune disorders, by producing Th2 cytokines in particular IL-4, to induce B cells to secrete protective antibodies [47]. Immature DCs can be differentiated from monocytes and bone marrow progenitor cells by treatment with granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and IL-4. Immature DCs are stimulated with maturation signals, such as tumor necrosis factor α (TNF- α), to express a strong immune response against foreign antigens. The exposure of cytokine-induced killer (CIK) cells to mature DCs led to the enhancement of anti-tumor cytolytic activity of the former [48–50].

A number of studies showed the possible immunological action of AVS073's components in DCs. *Carthamus tinctorius* L. extract has been reported to stimulate the production of IFN- γ and IL-10 in mouse splenic T lymphocytes and promote the expression of maturation markers in mouse bone-marrow-derived DCs. Furthermore, *Carthamus tinctorius* L. treated DCs maintained the high profile of maturation markers in tumor antigen pulsed-DCs [31]. In contrast, *Piper nigrum* L. significantly inhibited the phenotypic maturation, cytokine production (TNF- α and IL-12), phosphorylation of ERK and JNK, but enhanced the endocytosis activity of LPS-induced bone-marrow-derived DCs [32]. DCs, which can subsequently interact with CIK cells [49, 51], might be potential targets of this recipe.

CIK cells have been used as non-major histocompatibility complex (MHC)-restricted effector cells with high cytotoxicity against a variety of tumor targets [52]. CIK could be driven toward Th1 phenotype away from Th2 phenotype, but no data for Treg and Th17 polarization [49]. However, there was no data available for the effect of AVS073 components on CIK cells. We investigated the alteration to Th-polarizing cytokine profiles in DCs and Th polarization in CIK cells after AVS073 treatment.

Methods

Preparation of Ayurved Siriraj Watana Recipe powder

The Ayurved Siriraj Watana Recipe was manufactured as powder under GMP Guidelines by the Center of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University. The sources of all herbal components came from the wild stretching from the Central and the Northeastern parts of Thailand. They were authenticated by experts, including certified pharmacognosists of the Center of applied Thai traditional medicine. Herbal raw materials were washed and dried in a hot air oven in accordance with the Ayurved Siriraj Watana Recipe Master Formula. It was validated with chemical fingerprint using ultra-performance liquid chromatography as previously described [1]. The crude

powder was preserved at 25 °C in a desiccator. To prepare the extract, the crude powder was dissolved in 80% ethanol at a final concentration 100 mg/mL. The extract was filtered with cotton wool and subsequently centrifuged at 10,000 × g for 10 min. The supernatant was evaporated and lyophilized to dry powder.

Generation of CIK cells and DCs from peripheral blood mononuclear cells

CIK cells and DCs were generated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy donors and characterized as described previously [49–51]. All healthy donor volunteers understood and signed the informed consent document before the participation. The protocol was approved by the Institutional Review Board of the Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University. PBMCs were isolated from whole blood by Ficoll gradient centrifugation (IsoPrep®, Robbins Scientific, CA). The cell suspension was allowed to adhere over the container at a density of 5×10^6 cells/mL for 1 h at 37 °C in RPMI 1640, 10% FBS, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. The non-adherent cells (PBLs) were processed into CIK cells. The adherent cells were processed into mature DCs (mDCs) (Additional file 1).

To generate CIK cells, PBLs were maintained in RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA), 10% FBS (Biochrom, Berlin, Germany), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. IFN-γ (1000 U/mL, Amoytop Biotech, Xiamen, China) was added and incubated at 37 °C, 5% CO₂ for 24 h. After 24-h incubation, 50 ng/mL monoclonal antibody against CD3 (eBioscience, CA), and 300 IU/mL IL-2 (Amoytop Biotech, Xiamen, China) were added. Recombinant IL-2 and fresh growth medium were added every 3 d. After 14 d, AVS073 were added to the culture for 7 d or left with medium alone.

The adherent PBMCs was maintained in growth medium without cytokine to be remain as monocytes. To generate immature DCs (iDCs), the adherent cells were cultured in RPMI 1640, 10% FBS, 400 U/mL GM-CSF and 500 U/mL IL-4 for 14 d. The differentiation into mDCs could be achieved by adding 1000 U/mL TNF-α (Amoytop Biotech, Xiamen, China) for 48 h. The mDCs were incubated with AVS073 for 7 d either before or after maturation induction with TNF-α to generate pre-treated mDCs or treated mDCs respectively.

Preparation of CD3⁺CD56⁺ subset of

An aliquot of 10^8 cells of day 14 CIK cells were harvested. CD3⁺CD56⁺ cells were isolated from CIK cells using CD3 microbead followed by CD56 Multisort Kit (Miltenyi Biotec, Germany) according to the manufacturer's instruction. The CD3⁺CD56⁺ cell pellet was washed by adequate volume of the buffer, counted, and determined for viability by trypan blue exclusion. CD3⁺CD56⁺ cells were resuspended

in appropriated volume of growth medium (RPMI-1640, 10% FBS, and 300 IU/mL IL-2) to achieve a density of less than 1×10^6 cells/mL.

Determination of cell proliferation

(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl) tetrazolium bromide was dissolved in the culture medium (200 µg/mL). The solution was added to each well. The plates were incubated at 37 °C in 5% CO₂ for 1 h. After which time, the medium was discarded and 100 µL of dimethyl sulfoxide was added. The plates were left at room temperature for 10 min with occasionally gently shaking. The absorbance in each well was measured at 595 nm and calculated as the percentage of the control as follows:

$$\% \text{proliferation} = \frac{\text{OD}(\text{sample}) - \text{OD}(\text{background})}{\text{OD}(\text{control}) - \text{OD}(\text{background})} \times 100$$

OD (sample) represents the OD of the well containing the treated cells. OD (control) represents the OD of the well containing untreated cells. OD (background) represents the OD of the blank well.

Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis

PBLs were analyzed with fluorochrome-conjugated antibodies against CD3, CD8-, CD11a-, CD16-, CD28, CD56, CD69, CD152, CD154, CD278 (ICOS), CD279 (PD-1) (eBioscience, CA) and antibodies against regulatory T (Treg) cells (Biolegend). CIK phenotypes were analyzed with fluorochrome-conjugated antibodies against CD3, CD8, CD28, and CD56. DC phenotypes were analyzed with the following monoclonal markers: CD1a, CD11c, CD14, CD40, CD80, CD83, CD86 and HLA-DR (eBioscience). Cells were incubated with the corresponding fluorochrome-conjugated primary monoclonal antibodies at 4 °C for 30 min in the dark in 5 mL polystyrene round-bottom tube. The cells were washed by adding 2 mL of FACS buffer and pelleted by centrifugation at 400 × g at 4 °C for 5 min. The cells were resuspended in 200 µL FACS buffer. Regulatory T (Treg) cells were detected in PBLs and CIK cells by Human Treg Flow™ kit included Foxp3 Alexa Fluor® 488 and CD4 PE-Cy5/CD25 PE cocktail, according to the manufacturer's protocol. Flow cytometry analysis on 30,000 cells was performed using a FACSCalibur (Becton Dickinson, CA). Data were analyzed using FlowJo version 10.0.7.

RNA preparation and quantitative real-time PCR analysis

After AVS073 treatment, DCs or CD3⁺CD56⁺ cells were separately extracted for total mRNA by RNeasy mini RNA isolation kit (GE Healthcare, UK) according to the manufacturer's instruction. Total mRNA was converted to cDNA using Improm-II™ reverse transcription system (Promega, Madison, WI). The cDNA samples were tested

for quality and quantity by NanoVue™ Spectrophotometer (GE Healthcare, UK). The specific primers for DCs and CD3⁺CD56⁺ cells (Table 1) were designed by Vector NTI version 10 and Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, CA) and purchased from 1st BASE (Singapore). The specific genes were amplified with Brilliant® II SYBR® Green QPCR master mix (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) in a StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems). Quantitative real-time PCR was performed using 300 ng of cDNA in a 7.5 µL of SYBR master mix containing 20 µM primers and constituted to 15 µL

with water and amplified for 40 cycles of 95 °C for 15 s, 56–60 °C for 40 s, and 72 °C for 40 s. The obtained Ct's were subtracted with the Ct of GAPDH of the same condition to obtain Δ Ct. The Δ Ct's of the treated cells were subtracted with Δ Ct's of the untreated cells of the same period to obtain $\Delta\Delta$ Ct's. The fold-changes could be obtained from the expression of $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

Statistical analysis

The results are shown as mean \pm standard error of the mean (SEM). Data were plotted and analyzed using GraphPad

Table 1 Primer pair and their information for quantitative real-time PCR

Genes	Oligonucleotides (5' → 3')	Size (bp)	Annealing (°C)
GAPDH	Forward: GAAATCCCATCACCATCTTC Reverse: AAATGAGCCCCAGCCTTCTC	124	60
IDO	Forward: AGTCCGTGAGTTTGTCCTTCAA Reverse: TTTACACAGGCGTCATAAGCT	68	60
IFN γ	Forward: GTGTGGAGACCATCAAGGAAGAC Reverse: CAGCTTTTCGAAGTCATCTCGTTT	80	60
IL-4	Forward: AACAGCCTCACAGAGCAGAAGAC Reverse: GCCCTGCAGAAGGTTTCCTT	101	60
IL-6	Forward: GCTGCAGGCACAGAACCA Reverse: ACTCCTTAAAGCTGCGCAGAA	68	60
IL-10	Forward: CTGGGTGCGCAAGCCTTGT Reverse: AGTTCACATGCGCCTTGATG	100	60
IL-12	Forward: GCAAAACCCTGACCATCCAA Reverse: TGAAGCAGCAGGAGCGAAT	100	60
IL-17	Forward: ACCTGTGTACCCCGATTGT Reverse: GGGTCGGCTCTCCATAGTCTAA	90	58
GATA3	Forward: ACTACGGAACTCGGTGAGG Reverse: CAGGGTAGGGATCCATGAAG	100	60
STAT1	Forward: GTGGCGGAACCCAGGAAT Reverse: TGACAGAAGAACTGCCAACTCA	97	60
STAT3	Forward: ACCAAGCGAGGACTGAGCAT Reverse: TGTGATCTGACACCCTGAATAATTC	90	58
STAT4	Forward: TTCCTTCTGTTTTATCCCCATCT Reverse: TGTTGTGGGACTCAGGTTTTCTC	128	60
STAT5A	Forward: CACGCAGGACACAGAGAATGA Reverse: TCAGGCTCTCCTGGTACTGGAT	80	58
STAT5B	Forward: GGTACGCAGGACACAGAGAA Reverse: CCAGCGGGCCAAACTG	110	58
STAT6	Forward: CTTTGGCAGTGGTTTGATGGT Reverse: TGTTTGCTGATGAAGCCAATG	96	60
T-bet	Forward: AGGATTCCGGGAGAACTTTGA Reverse: TACTGGTTGGTAGGAGAGGAGAGTA	123	60
RORC	Forward: CCACAGAGACATCACCGAGCC Reverse: GTGGATCCCAGATGACTTGTC	114	60

Prism Software version 5.03. Student's *t*-test was used for flow cytometry and real-time PCR analysis. One-way ANOVA with Dunnett's test was used to determine the significance of difference between the controls and treatments. Two-way ANOVA with Bonferoni test was used to analyze statistical significance of the difference between means of cytotoxic experiments. A *p*-value < 0.05 was considered significant.

Results

The effects of AVS073 on the viability and proliferation of monocytes, PBLs and CIK cells

AVS073 (1 ng/mL–3,000 µg/mL) were incubated with PBLs and CIK cells for 3d and determined for cell viability by trypan blue exclusion assay. The relatively low doses of AVS073 (1 ng/mL–30 µg/mL) did not

harm the cultured cells. At higher doses (100–3,000 µg/mL), AVS073 compromised the viability of these cells (Fig. 1a). A range of 1–100 µg/mL AVS073 was brought to proliferation assay using MTT. The proliferation of these cells was highly improved after being cultured with 30–100 µg/mL of AVS073 (Fig. 1b). The viability of cultured cells after 3d was not compromised until the concentration reached 100 µg/mL. AVS073 at 30 µg/mL was selected for subsequent phenotypic and functional assays after being incubated with the selected immune cells for 7 d. The selected concentration did not compromise the mDCs' viability (>90% viability) nor induce any alteration to cellular morphology and markers throughout the study (data not shown).

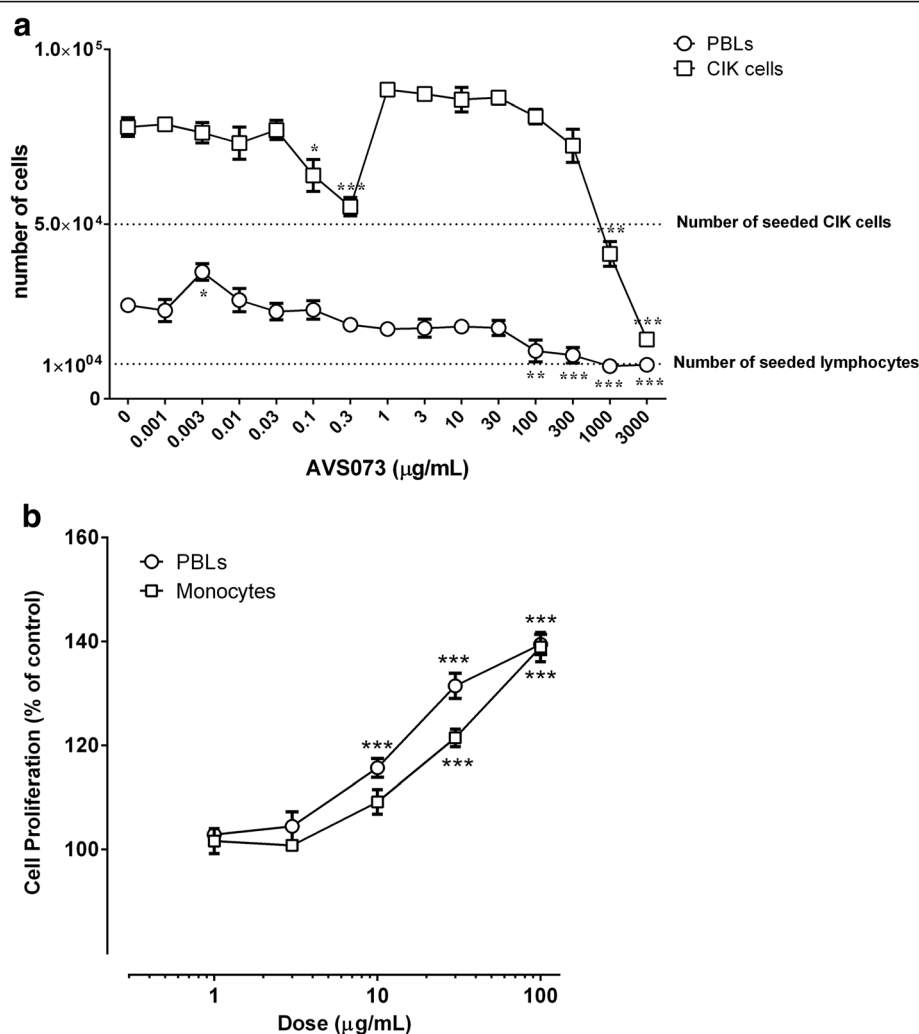


Fig. 1 The concentration-toxicity relationship of AVS073 toward immune cells was evaluated using trypan blue assay and MTT assay to obtain suitable studying concentrations. The viability of PBLs (○) and CIK cells (□) after being exposed to AVS073 for 3 d was determined by trypan blue exclusion assay (a). Data are represented as mean ± SEM (*n* = 6). The MTT assay (b) demonstrated the proliferative effects of AVS073 on PBLs (○) and monocytes (□) after 7 d-culture. Data are represented as mean ± SEM (*n* = 8). *, ** and *** represent data with statistically significant difference from those of the untreated cells with *p* < 0.05, *p* < 0.01 and <0.001 respectively

The phenotypic characterization and the proportions of CD3⁺CD56⁺ and Treg subsets in PBLs and in CIK cells

There were no significantly alteration in the activation and differentiation markers (Fig. 2): including lymphocyte early activation marker (CD69), adhesion molecule (CD11a), costimulatory molecules (CD8, CD28, CD154 and CD278), co-inhibitory molecule (CD152; CTLA-4) and negative regulatory molecule (CD279; PD-1), NK cell markers (CD16, CD56) and T cell markers (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3) in PBLs after being treated with AVS073. Regarding the subset proportions, either PBLs (Fig. 3a) or CIK cells (Fig. 3b) were exposed to AVS073 for 7 d. There was no significant alteration in the proportions of CD3⁺CD56⁺, CD3⁺CD56⁻, CD3⁻CD56⁺, nor Treg subsets within both PBLs and CIK cells after AVS073 treatment.

The analysis for the polarization of CD3⁺CD56⁺ cells after the exposure to AVS073

The isolated CD3⁺CD56⁺ subset incubated with 30 µg/mL of AVS073 for 7 d were extracted for total mRNA and analyzed for the polarization markers. For Th1 markers, the expression of STAT4, T-bet, and IFN-γ, but not STAT1, were significantly increased (Fig. 4a). For Th2 markers, STAT6 expression was significantly decreased, but neither was GATA3 nor IL-4 (Fig. 4b). For Treg markers, STAT5A, STAT5B and IDO were significantly decreased, but neither was IL-10 (Fig. 4c). For Th17 markers, STAT3, RORC and IL-17 were increased (Fig. 4d).

The phenotypic characterization of DCs after AVS073 treatment

The expression of CD40, CD80, CD83 and CD86 were not altered in mDCs treated with AVS073 regardless of the treatment timing (Fig. 5). The expression of HLA-DR was not significantly altered in DCs regardless of the timing of AVS073 treatment. The expression of CD14, a monocyte marker, was suppressed in mDCs treated with AVS073.

The alteration to the cytokines in mDCs after the exposure to AVS073

The level of IL-12, a Th1-prone cytokine, was rising in AVS073-treated mDCs (Fig. 6). AVS073 significantly increased the level of Th17-prone cytokines, IL-6 and IL-23 in AVS073-treated mDCs. The level of IL-10, an immunosuppressive cytokine that promote Treg development, was not altered.

Discussion

The phenotypic changes to PBLs

AVS073 did not alter the phenotypic characterization of PBLs: T-cell markers (CD3, CD4 and CD8), NK-cell markers (CD16 and CD56), activation markers (CD25, CD69), co-stimulatory molecules (CD28, CD40L, and ICOS), co-inhibitory molecule (CD152 or CTLA-4) or negative regulatory molecule (CD279 or PD-1). Moreover, AVS073 did not alter the proportion of Treg cells subset.

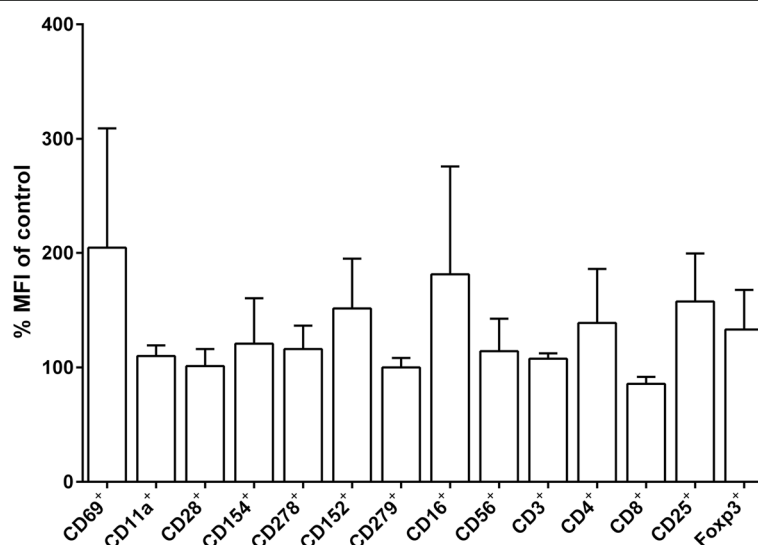


Fig. 2 AVS073 was investigated for its potential action toward lymphocyte activation and differentiation in PBLs. The corresponding cellular markers were investigated using FACS. The mean fluorescence intensity (MFI) of lymphocyte markers was taken from FACS analysis of PBLs after the exposure to 30 µg/mL AVS073 for 7 d. Data are represented as mean ± SEM (*n* = 3) of % of untreated control. The unpaired *t*-test was used to analyze the statistically significant by compared with 100% control at *p* < 0.05

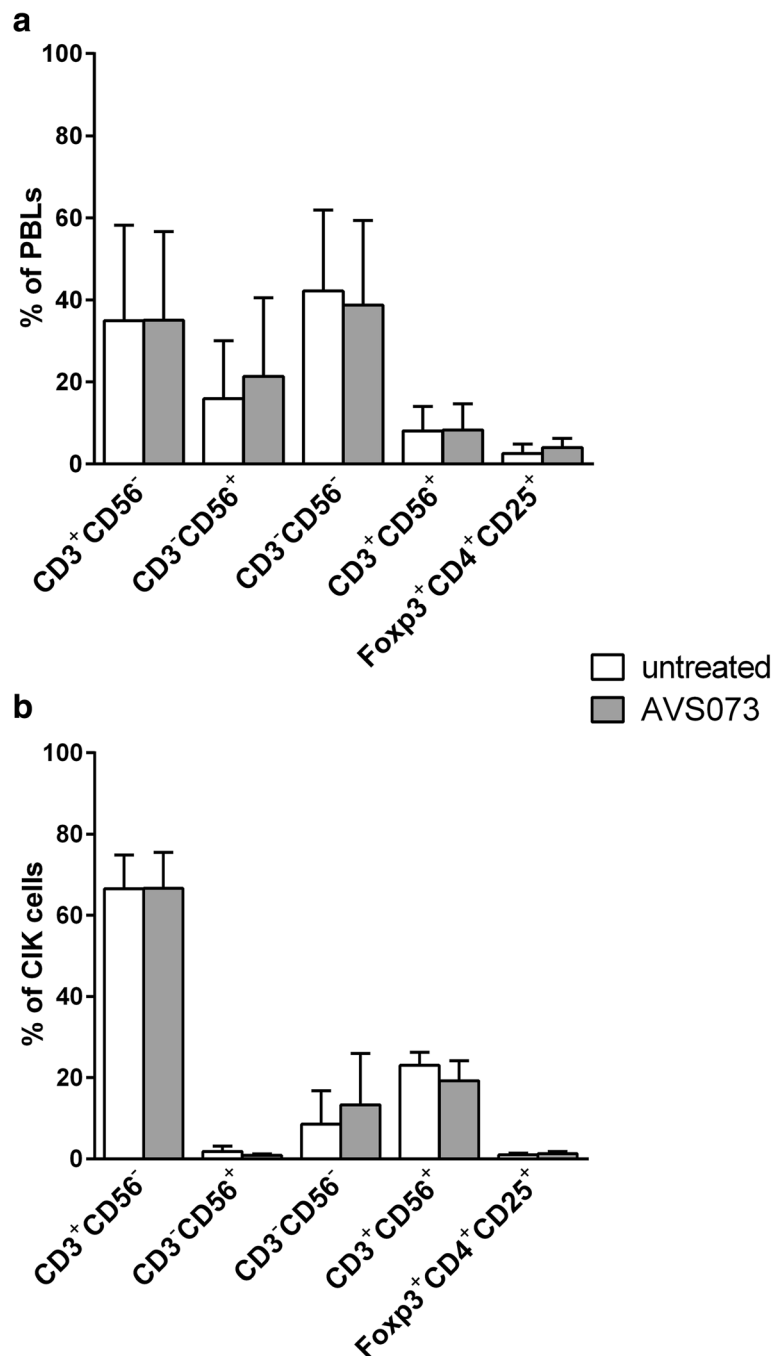


Fig. 3 AVS073 was investigated for its potential action on the proportion of subsets in PBLs and CIK cells. The alteration in the proportions of CD3⁺CD56⁻, CD3⁻CD56⁺, CD3⁺CD56⁺ and Treg subsets was evaluated in PBLs (a) and CIK cells (b) after AVS073 exposure. Cells were cultured in presence or absence of 30 µg/mL AVS073 for 7 d. Data are presented as mean ± SEM (n = 3). The paired *t*-test was used to analyze the statistically significant at *p* < 0.05

The alteration to the CIK cell subsets

The absolute number of CD3⁺CD56⁺ subset at 21-d CIK cell increased up to 10 folds over that in the initial PBLs. AVS073 had not altered the proportion of CD3⁺CD56⁺ nor other subsets in both PBLs and CIK cells. The CD3⁺CD56⁺ subset was isolated from the CIK cells to

monitor the alteration in Th1/Th2/Th17/Treg phenotypes after AVS073 treatment. The AVS073-treated CD3⁺CD56⁺ subset expressed more STAT4, that indicated the polarization toward Th1 phenotype. The Th2 and Treg phenotypes in AVS073-treated CD3⁺CD56⁺ subset was suppressed as evidenced by the decrease in STAT6

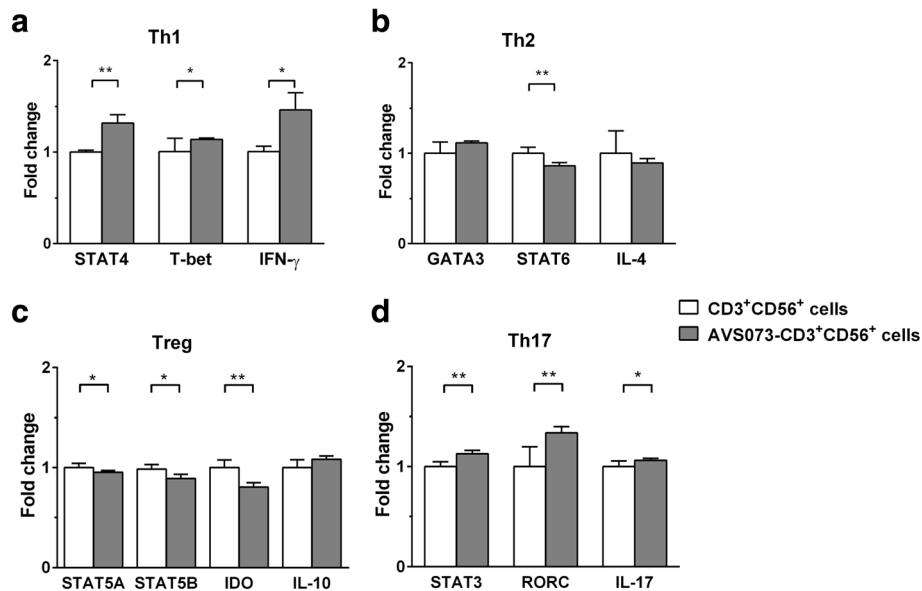


Fig. 4 AVS073 was investigated for its potential actions toward the expression of polarization markers in CD3⁺CD56⁺ cells. The expression data of cytokines and transcription factors in CD3⁺CD56⁺ subset after the exposure to 30 μ g/mL AVS073 for 7 d were evaluated using quantitative real-time PCR analysis. Data are represented as mean \pm SEM ($n = 4$). * and ** represent data with statistically significant difference from those of the untreated cells with $p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively

and STAT5A expressions, respectively. The Th17 phenotype was enhanced after AVS073 treatment as evidenced by increasing STAT3, RORC and IL-17 expression. Therefore, AVS073 tended to promote the Th1 and Th17 phenotypes in the CD3⁺CD56⁺ subset at the expense of Th2 and Treg phenotypes. The promotion of Th1 and Th17 phenotypes by the AVS073-treated CD3⁺CD56⁺ subset would make this preparation a candidate for anti-cancer treatment. Th17 cells exhibited pivotal roles in anti-tumor activity depending on the cytokines,

costimulatory molecules and cell-cell interactions in the tumor microenvironment. The presence of IFN- γ together with IL-17 would promote tumor regression [53].

Phenotype and maturation of DCs

The phenotypic changes induced by AVS073 might be attributed by its components. The *Carthamus tinctorius* L., one of AVS073's components, was reported to promote the expression of maturation markers (CD80, MHC class I and II) in mouse bone-marrow-derived

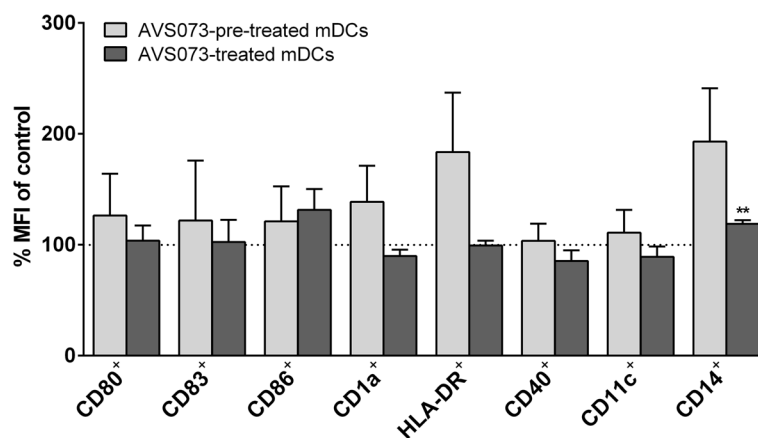
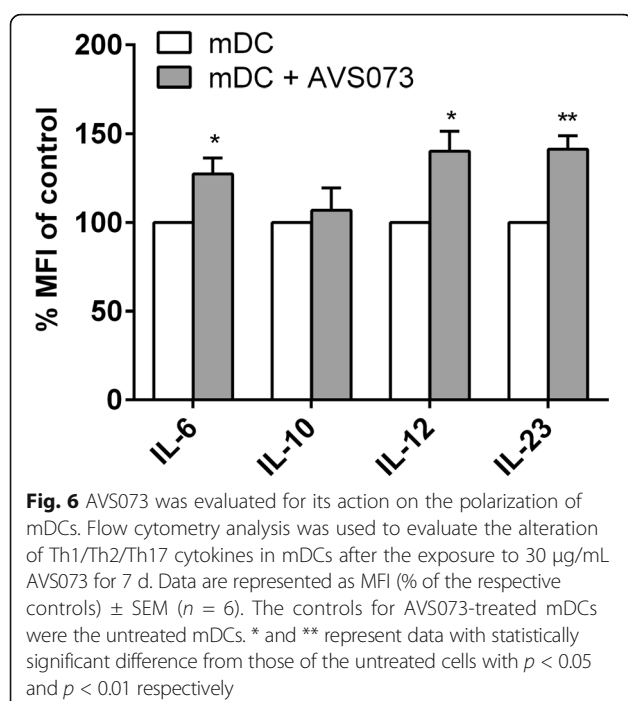


Fig. 5 AVS073 was investigated for its potential action on the differentiation of mDCs. The MFI of differentiation markers on DCs after the exposure to 30 μ g/mL AVS073 for 7 d were determined using FACS analysis. Data are represented as mean fluorescence intensity (% of the respective controls) \pm SEM ($n = 3$). AVS073-pre-treated mDCs refers to DCs that exposed to AVS073 prior to TNF- α induced maturation. AVS073-treated mDCs refers to mDCs exposed to AVS073 after TNF- α induced maturation. The controls for AVS073-pre-treated-mDCs and AVS073-treated-mDCs were the untreated mDCs. * represents data with statistically significant difference from 100% control with $p < 0.05$



DCs and maintained the high profile of maturation markers (CD80, CD86, MHC class I and II) in tumor antigen pulsed-DCs [31]. In contrast, *Piper nigrum* Linn. extract, piperine, significantly inhibited the maturation (MHC class II, CD40 and CD86), cytokine production (TNF- α and IL-12), phosphorylation of ERK and JNK, but enhanced the endocytosis activity of LPS-induced bone-marrow-derived DCs [32]. However, we did not observe significant alteration in the maturation markers of both conditions of treated mDCs.

Alteration to Th-polarizing profiles in DCs

The AVS073-treated mDCs carried more IL-12, the Th1-prone cytokine. AVS073 did not alter the IL-10 level, and therefore did not shift mDCs toward Treg-promoting activity. The cytokine levels of both IL-6 and IL-23 in AVS073-treated mDCs were increased, and therefore induced the Th17 polarization. IL-6 and TGF- β are necessary for the initial induction of Th17 differentiation whereas IL-23 is essential for the later stage of Th17 polarization [54]. IL-6 activates, while together with IL-21 further sustains STAT3 signaling required for ROR- α expression, and restrain Foxp3 mediated repression of ROR- α . TGF- β induces ROR- α expression through SMAD phosphorylation and provokes IL-23 receptor expression in naïve T cells, rendering them receptive to IL-23. IL-23 cements Th17 lineage commitment such that Th17 cells induced with TGF- β 1 and IL-6 are insufficiently committed to the lineage and therefore plays a vital role in promoting Th17-mediated tissue inflammation [55].

The alteration to Th profiles would affect, in particular, immunocompromised patients. The Th1 and Th17 enhancing effects of AVS073 may boost protective adaptive immunity against infection and cancer while Th2-suppressing activity may also provide clinical benefit in allergic diseases including asthma. However, all mentioned have to be optimized with its effect on Treg suppression to prevent overt immune reaction. The pathogenesis of tumor immune evasion relies on immunosuppressive cells (e.g., Tregs) to establish an immunosuppressive tumor microenvironment. If this is the case, AVS073 can inhibit Tregs, and therefore attenuate tumor immune evasion and dampen cancer progression. Similarly, the pathogenesis of Th2-associated asthma is perpetuated by Th2 cytokine microenvironment that may be suppressed by AVS073 through downregulation of Th2 cells. However, we further need to study how to direct AVS073-treated CIK cells towards decisive immune boosting for reversing each disease condition as mentioned.

Conclusions

The present study has demonstrated the effect of AVS073 on CIK and mDCs directing immune axis towards prominent Th1 and Th17 response while suppressing Th2 and Treg polarization. This molecular mechanism may provide clinical implication not only in boosting host protective immunity against infection and tumor immune evasion, but also reversing immune deviation in allergic diseases.

Additional file

Additional file 1: The identity of mDCs was demonstrated using flow cytometry analysis for DC markers. The studied markers included CD80, CD83, CD86, CD40 and HLA-DR. (TIF 1013.76 kb)

Abbreviations

AVS073: Ayurved Siriraj Wattana recipe; CIK: Cytokine-induced killer; DCs: Dendritic cells; FACS: Fluorescence-activated cell sorting; mDCs: Mature DCs; PBLs: Peripheral blood lymphocytes; PBMCs: Peripheral blood mononuclear cells; Treg: Regulatory T cell

Acknowledgements

AW, PA, TL and KM are recipients of Chalemrphrakiat Grant of the Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University.

Funding

The work was supported by the Grant for Goal-oriented Research Project of Mahidol University and the Thailand Research Fund (TRF) awarded to AW.

Availability of data and materials

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article.

Authors' contributions

AW served as the principal investigator. AW and NN contributed to the study design. NN, VW, KK and SD carried out the experiments, collected and statistically analyzed data. AW, NN and KM interpreted data, drafted manuscript. AW, KM, KS, PA and TL revised manuscript. All authors read and approved the final version of manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests. The funders had no involvement in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

The protocol was approved by the Institutional Review Board of the Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand with the protocol number 258/2556(EC1).

Author details

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand. ²Center of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand. ³Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, 2 Wanglang Road, Bangkoknoi, Bangkok 10700, Thailand. ⁴Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.

Received: 14 July 2016 Accepted: 10 November 2016

Published online: 29 November 2016

References

- Panich U, Pluemsamran T, Tangsupa-a-nan V, Wattanarangsarn J, Phadungrakwittaya R, Akaraseenont P, et al. Protective effect of AVS073, a polyherbal formula, against UVA-induced melanogenesis through a redox mechanism involving glutathione-related antioxidant defense. *BMC Complement Altern Med*. 2013;13:159.
- Bunnan K, Chaikomin R, Lohsiriwat S, Chomchai S, Akaraseenont P. Effect of Ayurved Siriraj herbal recipe "Wattana" on gastric emptying rate. *Siriraj Med J*. 2012;64:89–93.
- Duangsa-ard S, Wongkajornsilp A, Akaraseenont P, Huabprasert S, Chongputtharaksa T, Laohapand T. The effects of Ayurved Siriraj Wattana recipe on splenocytes in Wistar rat. *Siriraj Med J*. 2013;65:73–6.
- Pengkhum T, Chatsiricharoenkul S, Akaraseenont P, Charoencholvanich K. Phase II clinical trial of Ayurved Siriraj Wattana Recipe for symptomatic relief in patients with osteoarthritis of the knee. *J Med Assoc Thai*. 2012;95(3):452–60.
- Baliga MS, Bhat HP, Joseph N, Fazal F. Phytochemistry and medicinal uses of the bael fruit (*Aegle marmelos* Correa): A concise review. *Food Res Int*. 2011;44(7):1768–75.
- Sharma CK, Sharma M, Sharma V. Therapeutic Potential of the Medicinal Plant *Aegle Marmelos* (Linn.) Correa: Insight. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2016;35(1):1–10.
- Morikawa T, Funakoshi K, Ninomiya K, Yasuda D, Miyagawa K, Matsuda H, et al. Medicinal foodstuffs. XXXIV. Structures of new prenylchalcones and prenylflavanones with TNF- α and aminopeptidase N inhibitory activities from *Boesenbergia rotunda*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2008;56(7):956–62.
- Ng KB, Bustamam A, Sukari MA, Abdelwahab SI, Mohan S, Buckle MJ, et al. Induction of selective cytotoxicity and apoptosis in human T4-lymphoblastoid cell line (CEMss) by boesenbergin A isolated from *boesenbergia rotunda* rhizomes involves mitochondrial pathway, activation of caspase 3 and G2/M phase cell cycle arrest. *BMC Complement Altern Med*. 2013;13:41.
- Isa NM, Abdelwahab SI, Mohan S, Abdul AB, Sukari MA, Taha MM, et al. In vitro anti-inflammatory, cytotoxic and antioxidant activities of boesenbergin A, a chalcone isolated from *Boesenbergia rotunda* (L.) (fingerroot). *Braz J Med Biol Res*. 2012;45(6):524–30.
- Wang YZ, Sun SQ, Zhou YB. Extract of the dried heartwood of *Caesalpinia sappan* L. attenuates collagen-induced arthritis. *J Ethnopharmacol*. 2011;136(1):271–8.
- Nirmal NP, Rajput MS, Prasad RG, Ahmad M. Brazilin from *Caesalpinia sappan* heartwood and its pharmacological activities: A review. *Asian Pac J Trop Med*. 2015;8(6):421–30.
- Mueller M, Weinmann D, Toegel S, Holzer W, Unger FM, Viernstein H. Compounds from *Caesalpinia sappan* with anti-inflammatory properties in macrophages and chondrocytes. *Food Funct*. 2016;7(3):1671–9.
- Tewtrakul S, Tungcharoen P, Sudsai T, Karalai C, Ponglimanont C, Yodsaoeue O. Antiinflammatory and Wound Healing Effects of *Caesalpinia sappan* L. *Phytother Res*. 2015;29(6):850–6.
- Zhou X, Tang L, Xu Y, Zhou G, Wang Z. Towards a better understanding of medicinal uses of *Carthamus tinctorius* L. in traditional Chinese medicine: a phytochemical and pharmacological review. *J Ethnopharmacol*. 2014;151(1):27–43.
- Kuehnl S, Schroecksadel S, Temml V, Gostner JM, Schennach H, Schuster D, et al. Lignans from *Carthamus tinctorius* suppress tryptophan breakdown via indoleamine 2,3-dioxygenase. *Phytomedicine*. 2013;20(13):1190–5.
- Yao D, Wang Z, Miao L, Wang L. Effects of extracts and isolated compounds from safflower on some index of promoting blood circulation and regulating menstruation. *J Ethnopharmacol*. 2016;191:264–72.
- Laupattarakasem P, Wangsrimongkol T, Surarit R, Hahnvanjanawong C. In vitro and in vivo anti-inflammatory potential of *Cryptolepis buchanani*. *J Ethnopharmacol*. 2006;108(3):349–54.
- Laupattarakasem P, Houghton PJ, Hoult JR, Itharat A. An evaluation of the activity related to inflammation of four plants used in Thailand to treat arthritis. *J Ethnopharmacol*. 2003;85(2–3):207–15.
- Hanprasertpong N, Teekachunhatean S, Chaiwongsa R, Ongchai S, Kunanusorn P, Sangdee C, et al. Analgesic, anti-inflammatory, and chondroprotective activities of *Cryptolepis buchanani* extract: in vitro and in vivo studies. *Biomed Res Int*. 2014;2014:978582.
- Zhou ZL, Yin WQ, Yang YM, He CH, Li XN, Zhou CP, et al. New Iridoid Glycosides with Antidepressant Activity Isolated from *Cyperus rotundus*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2016;64(1):73–7.
- Nam JH, Nam DY, Lee DU. Valencene from the Rhizomes of *Cyperus rotundus* Inhibits Skin Photoaging-Related Ion Channels and UV-Induced Melanogenesis in B16F10 Melanoma Cells. *J Nat Prod*. 2016;79(4):1091–6.
- Ahmad W, Jantan I, Kumolosasi E, Bukhari SN. Immunostimulatory effects of the standardized extract of *Tinospora crispa* on innate immune responses in Wistar Kyoto rats. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:2961–73.
- Aboud WN, Fahmi I, Abdulla MA, Ismail S. Immunomodulatory effect of an isolated fraction from *Tinospora crispa* on intracellular expression of INF- γ , IL-6 and IL-8. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14:205.
- Znati M, Ben Jannet H, Cazaux S, Souchard JP, Harzallah Skhiri F, Bouajila J. Antioxidant, 5-lipoxygenase inhibitory and cytotoxic activities of compounds isolated from the *Ferula lutea* flowers. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2014;19(10):16959–75.
- Hasan MM, Uddin N, Hasan MR, Islam AF, Hossain MM, Rahman AB, et al. Analgesic and anti-inflammatory activities of leaf extract of *Mallotus repandus* (Willd.) Muell. *Arg Biomed Res Int*. 2014;2014:539807.
- Kumar CU, Pokuri VK, Pingali U. Evaluation of the Analgesic Activity of Standardized Aqueous Extract of *Terminalia chebula* in Healthy Human Participants Using Hot Air Pain Model. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(5):FC01–4.
- Puttarak P, Sawangjit R, Chaiyakunapruk N. Efficacy and safety of *Derris scandens* (Roxb.) Benth. for musculoskeletal pain treatment: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Ethnopharmacol*. 2016;194:316–323.
- Bagheri SM, Hedesh ST, Mirjalili A, Dashti RM. Evaluation of Anti-inflammatory and Some Possible Mechanisms of Antinociceptive Effect of *Ferula assa foetida* Oleo Gum Resin. *J Evid Based Complementary Altern Med*. 2016;21(4):271–6.
- Eshwarappa RS, Ramachandra YL, Subaramaihha SR, Subbaiah SG, Austin RS, Dhananjaya BL. Anti-Lipoxygenase Activity of Leaf Gall Extracts of *Terminalia chebula* (Gaertn.) Retz. (Combretaceae). *Pharmacognosy Res*. 2016;8(1):78–82.
- Kalaiselvan S, Rasool MK. The anti-inflammatory effect of triphala in arthritic-induced rats. *Pharm Biol*. 2015;53(1):51–60.
- Chang JM, Hung LM, Chyan YJ, Cheng CM, Wu RY. *Carthamus tinctorius* Enhances the Antitumor Activity of Dendritic Cell Vaccines via Polarization toward Th1 Cytokines and Increase of Cytotoxic T Lymphocytes. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011;2011:274858.
- Bae GS, Kim JJ, Park KC, Koo BS, Jo IJ, Choi SB, et al. Piperine inhibits lipopolysaccharide-induced maturation of bone-marrow-derived dendritic cells through inhibition of ERK and JNK activation. *Phytother Res*. 2012;26(12):1893–7.
- Choi YK, Cho SG, Woo SM, Yun YJ, Jo J, Kim W, et al. Saussurea lappa Clarke-Derived Costunolide Prevents TNF α -Induced Breast Cancer Cell Migration and Invasion by Inhibiting NF- κ B Activity. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:936257.



ISSCR 2016

ANNUAL MEETING

SAN FRANCISCO

22-25 JUNE

CALIFORNIA • USA

THE GLOBAL
STEM CELL EVENT

**POSTER
ABSTRACT
BOOK**



INTERNATIONAL SOCIETY
FOR STEM CELL RESEARCH

co-sponsored by:

CIRM

isscr2016.org



W1103

HBV-INFECTED HUMAN HEPATOCYTE-LIKE CELLS DERIVED FROM INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS ALLOWED LONG-TERM VIRAL PROPAGATION AND WAS SPECIFICALLY TARGETED BY CYTOKINE-INDUCED KILLER CELLS

Sa-ngiamsuntorn, Khanit, Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, Thailand, Wongkajornsilp, Adisak, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkoknoi, Thailand, Kongsomboonchoke, Pattida, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakhon Pathom, Thailand, Thongsri, Piyanoot, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, Thailand and Hongeng, Suradej, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Hepatitis B virus (HBV) infection induces chronic liver inflammation which could eventually develop into hepatocellular carcinoma. The study of HBV biology and virus-host cell interaction have been hindered by the limitation of the available host cells. The long-term cultured functional hepatocyte that supports a complete HBV life cycle for a long term is essential for this task. In this study, hepatocyte-like cells (HLC) derived from human iPSCs were examined for HBV associated receptors, infectivity with HBV isolated from patient serum. The HBV receptors for example; HSPG, NTCP and clathrin were highly expressed in mature HLC as evaluated by immunofluorescent and real-time qPCR. HLCs sustained viral covalently closed circular DNA (cccDNA) replication and produced HBV particles after challenging with HBV from patient serum. The generation of HBV virions from HLCs outperformed those from HepaRG cell. Infection of HLCs with HBV from patient serum resulted in the expression of HBcAg, HBeAg and HBV cccDNA that was consistent with higher HBV protein synthesis and replication. The conditioned medium from infected HLCs was able to infect naïve HLCs and HepaRG cells. The HLCs upregulated the expression of IFN- α , TNF- α and IL-6 after the HBV infection. The co-culture of HBV-infected HLCs with cytokine-induced killer (CIK) cell exhibited 90% infected cell lysis whereas the non-infected HLCs exhibited 0% lysis. In summary, HLC could serve as an effective host for the study of HBV life cycle, virus-host interaction with a potential to develop hepatocellular carcinoma.

Funding Source: This study was funded by the research grants of Mahidol University and the Thailand Research Fund (TRF).

W1105

HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS SURVIVED AND INITIATED HEPATOCYTE DIFFERENTIATION IN WILLIAM'S E MEDIUM FOLLOWED BY HEPATOCYTE DIFFERENTIATION INDUCER MEDIUM

Tomizawa, Minoru, National Hospital Organization Shimoshizu Hospital, Yotsukaide City, Japan

If hepatocytes are produced from iPS cells of patients with liver insufficiency, these hepatocytes can be transplanted into those patients as a curative treatment. Glucose and arginine are essential for cell survival. Hepatocytes produce glucose from galactose and arginine from ornithine through gluconeogenesis and the urea cycle, respectively. Hepatocytes can survive in a medium without glucose or arginine and with added galactose and ornithine. Hepatocyte differentiation inducer medium (HDI) does not contain glucose or arginine but contains galactose, ornithine, and oncostatin M. HDI initiates the differentiation of iPS cells into hepatocytes, as demonstrated by increased alpha-feto protein (AFP) expression. A major problem concerning HDI is that most cells cultured in HDI die within three days and no cells survive beyond 7 days. To increase the number of the cells obtained, iPS cells were cultured in conventional media after being cultured for 48 h in HDI. To determine the most appropriate media for use following HDI incubation, iPS cells were cultured in 13 different conventional media for 7 days, and AFP expression levels in these media were analyzed. The highest AFP expression in iPS cells was observed in William's E medium (WE) and Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F-12 Ham (DF12). The AFP expression levels were evaluated in iPS cells cultured in HDI for 48 h and then cultured in WE or DF12 for 5 days. The number of cells decreased to 5.4% of that on day 0 after 48-h culture in HDI and recovered to 60% of that on day 0 after 48-h culture in HDI followed by 5-day culture in WE. The AFP expression was higher in iPS cells cultured in HDI for 48 h and WE for 5 days than in iPS cells cultured in HDI only. These results suggested that culture in HDI for 48 h followed by culture in WE for 5 days was suitable to promote the differentiation of iPS cells into a hepatocyte lineage. To determine the culture period, iPS cells were cultured in HDI for 0, 3, 6, 12, 24, or 48 h and were then cultured in WE for 7 days, following which their AFP and albumin expression levels were analyzed. The AFP and albumin expression levels were highest in iPS cells cultured in HDI for 48 h followed by culture in WE for 5 days. Taken together, culture in HDI for 48 h followed by culture in WE for 7 days was suitable for the differentiation of iPS cells into a hepatocyte lineage.

THE
GLOBAL
STEM CELL
EVENT

POSTER ABSTRACT BOOK

ISSCR 2017
ANNUAL MEETING
BOSTON | USA
14-17 JUNE
ISSCR2017.ORG

inspiring

SCIENCE
STEM CELL
insightfully
DELIVERED

co-sponsored by:
HSCI Harvard
Stem Cell Institute

ISSCR

INTERNATIONAL SOCIETY
FOR STEM CELL RESEARCH



T-2026

HYDROGEN PEROXIDE UPREGULATED ANTIOXIDANT ENZYMES AND MAINTAINED THE PLURIPOTENT STAGE IN HUMAN IPS CELL THROUGH ENHANCING NRF2 EXPRESSION

Sa-Ngiamsumtorn, Khanit¹, Wongkajornsilp, Adisak², Kongsomboonchoke, Pattida³, Thongsri, Piyanoot⁴ and Hongeng, Suradej⁵

¹Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, Thailand, ²Pharmacology, Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand, ³Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand, ⁴Biochemistry, Mahidol University, Bangkok, Thailand, ⁵Pediatric, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Tilting the balance between the reactive oxygen species (ROS) and the cellular antioxidant defense would result in oxidative stress. ROS accumulation is a key contributor to disease and cell death. Nuclear factor, erythroid 2-like 2 (Nrf2) is a major transcription factor for antioxidant defense against both endogenous and exogenous stress by increasing the expression of various antioxidant enzymes and detoxification genes. Inhibition of Nrf2 impairs both self-renewal capability of pluripotent stem cell (PSC) and antioxidant defense mechanism. ROS accumulation could be physiologically induced by hydrogen peroxide (H₂O₂) produced from cellular metabolism. The presence of low dose H₂O₂ could activate Nrf2 expression and maintain pluripotent genes in iPSC. In this study, human iPSCs generated from hMSC were investigated for the effects of H₂O₂-induced oxidative stress on the pluripotency, antioxidant genes expression and differentiation. The iPSCs at 80% confluence were treated with H₂O₂ ranging from 16 - 150 μ M for 24 and 48 h. The treated cells were observed for cell morphology, viability, apoptosis and senescence. The H₂O₂ was not cytotoxic up to 150 μ M. Glutathione producing enzymes such as glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC), glutamate-cysteine ligase regulatory subunit (GCLM) and H₂O₂ catalyzing enzyme (catalase, CAT) were highly expressed in H₂O₂-treated iPSC at 48 h. The glutathione S-transferase P (GSTP1) and glutathione peroxidase (GPx) were upregulate in iPSC treated with 16-64 μ M H₂O₂, but decreased when exposed to 128-150 μ M H₂O₂. Nrf2 and pluripotent markers (Oct4, Sox2, Klf4 and Nanog) were increased after being treated with 16-128 μ M H₂O₂ for 24 h. The presence of 64 μ M H₂O₂ in iPSCs during spontaneous differentiation processes inhibited the development of three germ layers through Nrf2 activation. The addition of n-acetyl cysteine (NAC) or vitamin C reversed the expression of pluripotent genes as well as other effects of ROS. In summary, the exposure to ROS not only

drove the expressions of GCLC, GCLM GSTP1 and GPx in the iPSC cells to keep the balance of cellular redox stage, but also regulate self-renewal and differentiation in pluripotent stem cells through targeting Nrf2.

Funding Source: This research project is supported by Thailand research fund (TRF) TRG5880087 and the Faculty of Pharmacy Mahidol University to (K. Sa-ngiamsumtorn).

T-2028

EVALUATION OF NAÏVE HUMAN PLURIPOTENT STEM CELL CULTURE PROTOCOLS UNDER NORMOXIA

Mallon, Barbara¹, Shi, YiJun², Killian, J.², Chen, Kevin², Park, Kyeyoon² and Robey, Pamela²

¹NIH Stem Cell Unit, Bethesda, MD, USA, ²National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

Although mouse embryonic and epiblast stem cells, the original 'naïve' and 'primed' pluripotent stem cells (PSCs), are generally derived and maintained at normoxia (O₂ > 19%), many of the current protocols for the derivation or reversion of human pluripotent cells to a naïve state are performed under hypoxic conditions (< 5% O₂). We wished to determine if human PSCs, cultured under normoxic conditions in naïve medium, could be considered truly naïve. In so doing, we also questioned what criteria could confidently be used to evaluate the naïve state and if simple assays could be determined for confirmation. We initially evaluated 4 culture protocols using 2 human embryonic stem cell lines of which only 2 protocols demonstrated compact and domed colonies, appropriate for the naïve condition, after serial passage with the best cell line and culture condition selected for further analysis. We chose to evaluate differences in the naïve versus primed conditions that have been proposed in the literature such as pluripotency marker expression, X chromosome inactivation status, TFE3 (Transcription Factor Binding to IGHM Enhancer 3) localization, cadherin expression, metabolism and methylation differences. However, in some cases, the data were indeterminate or showed no difference between 'naïve' and 'primed', whereas in others, the results were in fact opposite to those reported. It was unclear if these differences with the published data were due to the cell line used, the normoxic conditions or simple lab-to-lab variation. Subsequently, three cell lines were cultured using the naïve medium giving the best colony morphology in normoxia. Differences were observed between the cell lines in morphological and culture characteristics as well as in gene expression profiles. However, certain gene expression markers appeared to exhibit robust and dramatic changes in all three lines which should allow them to serve as bona fide naïve culture markers if the methylation profile confirms the naïve, globally hypomethylated state in these normoxic cultures. We