

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG TÁI MÃ HÓA NGUYÊN BÀO SỢI NGƯỜI THÀNH TẾ BÀO GIỐNG TẾ BÀO GAN BẰNG CÁCH BIỂU HIỆN QUÁ MỨC GEN HNF4 α NHỜ HỆ THỐNG BIỂU HIỆN GEN TET-ON

Nguyễn Văn Hạnh^{1,2,✉}, Đỗ Trung Kiên², Trịnh Công Sự¹, Lê Thị Hải Minh³, Ngô Thị Thu Hương⁴, Trần Thị Hương Giang¹

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

⁴Đại học Y Hà Nội

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: nvhanh@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 02.10.2020

Ngày nhận đăng: 16.4.2021

TÓM TẮT

Nghiên cứu này khảo sát khả năng tái mã hóa thành tế bào nguyên bào sợi của người thành tế bào giống tế bào gan bằng biểu hiện quá mức HNF4 α . Tế bào nguyên bào sợi được phân lập và nhân nuôi từ mô da bao quy đầu của bệnh nhân khỏe mạnh hiến tặng. Gen HNF4 α được biểu hiện quá mức thông qua hoạt hóa bằng Doxycilin vector biểu hiện gen Tet.on-eGFP-HNF4 α . Tế bào sau quá trình xử lý tái mã hóa được đánh giá sự thay đổi hình thái, biểu hiện các protein đặc trưng tế bào gan như: albumin, α -fetoprotein (AFP) và HNF4 α sau khi nhuộm miễn dịch huỳnh quang và khả năng tích lũy glycogen trong tế bào bằng phương pháp nhuộm PAS. Nghiên cứu đã phân lập và nhân nuôi thành công tế bào nguyên bào sợi. Kết quả cho thấy sau chuyển gen, vector Tet.on-eGFP-HNF4 α biểu hiện trong hầu hết tế bào và không ảnh hưởng đến tốc độ tăng trưởng của tế bào. Tế bào sau hai tuần xử lý có hình thái tương tự tế bào gan, biểu hiện dương tính khi nhuộm albumin, AFP, HNF4 α và PAS. Nghiên cứu đã tạo được tế bào có một số đặc trưng của tế bào giống tế bào gan từ nguyên bào sợi, tuy nhiên cần các nghiên cứu khảo sát để đánh giá mức độ hoàn thiện của loại tế bào này.

Từ khóa: Tái mã hóa, biểu hiện quá mức, HNF4 α , nguyên bào sợi, hệ thống Tet-On, tế bào gan

MỞ ĐẦU

Tế bào gan phân lập từ mô gan người được đánh giá là tiêu chuẩn vàng cho các nghiên cứu y sinh và các thử nghiệm để phát triển các loại thuốc mới (Yamaguchi *et al.*, 2019). Tuy nhiên, nguồn hiến tặng gan để phân tách tế bào cho các định hướng trên vô cùng hạn chế. Do vậy việc nghiên cứu tạo ra nguồn tế bào có khả năng thay thế tế bào gan là nhu cầu thiết thực (Yamaguchi *et al.*, 2019). Đối với liệu pháp cấy ghép tế bào gốc để biệt hóa *in vivo*, Liu và cộng sự (2011) đã thông báo kết quả cho thấy ở những chuột cấy ghép 2×10^6 tế bào gốc cảm ứng người, tỷ lệ tế bào biểu hiện albumin (ALB) người trong mô gan chuột là 13% và tỉ lệ này đạt 35% khi ghép 7×10^6 tế bào. Tế bào gan cảm ứng (*induced hepatocytes- iHeps*) của người có nguồn gốc *in vitro* đã được xác định có khả năng tích hợp với mạch máu của vật chủ trong vòng 48 giờ sau khi cấy ghép và tiết ALB người tăng ở ngày thứ 10 sau

khí ghép là 50–3900 $\mu\text{g/mL}$ (Carpentier *et al.*, 2014). Những nghiên cứu cấy ghép tế bào iHeps và tế bào gan phân lập từ mô gan trên mô hình chuột đã cho thấy có sự tương đồng về hiệu quả trong cấy ghép của hai loại tế bào này (Yamaguchi *et al.*, 2019). Đối với định hướng mục tiêu dùng iHeps làm tế bào sàng lọc và thử nghiệm thuốc, Kim *et al.* (2019) đã chứng minh không có sự khác biệt về biểu hiện các gen chỉ thị trong thử nghiệm trên tế bào iHeps và tế bào gan.

Tế bào nguyên bào sợi có khả năng chuyển biệt hóa thành tế bào gan cả trong điều kiện *in vivo* (Song *et al.*, 2019) và *in vitro* (Huang *et al.*, 2019). Khi cấy ghép tế bào nguyên bào sợi vào chuột đã bị làm suy yếu chức năng gan tương tự bệnh xơ gan, Song *et al.* (2018) đã nhận thấy các tế bào này đã chuyển sang trạng thái tương tự tế bào gan. Các tế bào iHeps được tạo ra trong cơ thể sống này có biểu hiện tương tự với các tế bào gan nội sinh (eHeps) và cũng có các đặc điểm chức

năng tương tự, chẳng hạn như tiết albumin, tổng hợp urê, hoạt động của cytochrome và khả năng đáp ứng thuốc (Song *et al.*, 2019). Nakamori *et al.* (2017) đã thông báo về khả năng chuyên biệt hóa tế bào nguyên bào sợi của người sang tế bào gan cảm ứng iHeps bằng cách biểu quá mức một tập hợp các yếu tố phiên mã. Các iHeps thu được trong các báo cáo khác nhau cho thấy sự biểu hiện rộng rãi của các gen liên quan đến chức năng trao đổi chất của tế bào gan, phản ánh sự trưởng thành về chức năng khi hoạt hóa biểu hiện các gen hay nhóm gen khác nhau (Nakamori *et al.*, 2017). Một công bố gần đây cho thấy, gen *HNF4α* có vai trò và ưu thế trong việc tái biệt hóa tạo tế bào giống tế bào gan (Yamaguchi *et al.*, 2019).

Là một thành viên trong nhóm *HNF-4* nên *HNF-4α* cũng là một yếu tố phiên mã liên kết với DNA cần thiết cho quá trình phiên mã cho các gen đặc trưng. Gen này đóng một vai trò quan trọng trong sự phát triển của gan, thận, tuyến ruột. Gen *HNF-4α* đã được chứng minh có thể hoạt động như một gen điều phối trong các tác nhân phiên mã trong quá trình định hướng biệt hóa thành tế bào gan (Ishii *et al.*, 2008). Việc ứng dụng tác nhân *HNF-4α* để biệt hóa tế bào nguyên bào sợi thành tế bào gan, cho đến gần đây đã có một công bố tác động vào quá trình biểu hiện của gen này để tái lập trình tạo tế bào chức năng gan (Simeonov *et al.*, 2014; Nakamori *et al.*, 2017; Ballester *et al.*, 2019). Tuy nhiên, các nghiên cứu này sử dụng phương pháp chuyển nạp gen thông qua hệ thống lenti-virus. Trong khi đó, hệ thống Tet-On có một số lợi thế so với các hệ thống biểu hiện gen được điều hòa khác (Yamaguchi *et al.*, 2019). Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả bước đầu về khả năng sử dụng hệ thống Tet-On để biểu hiện quá mức gen *HNF4α* nhằm chuyển biệt hóa tế bào nguyên bào sợi thành tế bào có một số đặc trưng của gan.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Phương pháp phân lập tế bào

Tế bào nguyên bào sợi được phân lập từ mẫu da quy đầu. Mẫu da quy đầu được thu nhận tại Bệnh viện Sản Phụ từ những bệnh nhân khỏe mạnh hiến tặng. Mẫu xử lý và nhân nuôi trong môi trường DMEM/F12 bổ sung 10% FBS, 10 ng/mL FGF, 10 ng/mL EGF, 2 mM L-glutamine, 1x kháng sinh (từ dung dịch 100x bao gồm: 10.000 U/mL Penicillin, 10.000 µg/mL Streptomycin và 25 µg/mL Amphotericin B) (Sigma, Hoa Kỳ).

Phương pháp chuẩn bị vector

Vector mang gen *HNF-4α* là sản phẩm đề tài VAST.ĐL03/16-17, được chuẩn bị theo phương pháp

gắn vào vector Tet.On. Gen *HNF-4α* được tổng hợp sau đó chuyển vào vector pTRE-tight-BI (Clontech, Japan) nhờ xúc tác của enzyme T4 ligase (BioBasic, Canada). Tiếp theo, DNA plasmid có chứa gen *HNF-4α* được cắt bằng cặp enzyme *Bam*HI-*Nhe*I để tách đoạn gen *HNF4α*□□□□□-BI. Đoạn DNA này được chuyển sang vector Tet.On system (mang gen eGFP) để được vector cuối Tet.on-eGFP-HNF4α.

Phương pháp biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào

Vector biểu hiện Tet.On-eGFP-HNF4α được đưa vào tế bào nguyên bào sợi dựa vào bộ kit Lipofectamine® LTX DNA Transfection của hãng Invitrogen (Mỹ). Các bước thí nghiệm được làm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Kết thúc quá trình chuyển gen, tế bào được chuyển sang nuôi trong môi trường DMEM low glucose (1g/L), bổ sung 10% FBS (fetal bovine serum), 5 ng/mL EGF (epidermal growth factor), 50 IU Penicillin, 50 mg/mL Streptomycin, 10 µg/mL Ciprofloxacin. Thời gian nuôi cấy 3 ngày, ở 37°C và cấp khí CO₂ 5%. Để hoạt hóa biểu hiện của gen *HNF4α*, môi trường nuôi cấy sẽ được bổ sung Doxycyclin nồng độ 100 ng/mL trong 24 giờ nuôi cấy tiếp theo.

Đánh giá tế bào sau biệt hóa

Tế bào nguyên bào sợi sau khi hoạt hóa để tái biệt hóa tạo tế bào chức năng gan sẽ được theo dõi và đánh giá tế bào tại các thời điểm 1 tuần, 2 tuần và 3 tuần. Đánh giá tế bào tại các thời điểm này dựa vào thay đổi hình thái, nhuộm nhân và nhuộm PAS. Quá trình nhuộm được tiến hành theo hướng dẫn của bộ kit Schiff (Sigma-Aldrich).

Nhuộm miễn dịch huỳnh quang kiểm tra chỉ thị tế bào gan

Để nhuộm miễn dịch huỳnh quang, rửa nhẹ tế bào với môi trường rửa tế bào sau khi hút môi trường cũ ra. Tiếp theo, mẫu được cố định với 4% paraformaldehyde trong 10–20 phút ở nhiệt độ phòng, rửa lại 2–3 lần bằng môi trường rửa. Tiếp nữa, mở rộng màng tế bào để tăng tính thấm bằng cách nhuộm với 0,1% Triton X-100 có mặt PBS trong 15 phút rồi rửa lại với PBS, blocking với 3% BSA trong PBS với 0,1% Triton X-100. Sau đó các đĩa được ủ với kháng thể đơn dòng trong bộ kit của hãng *Santa Cruz Biotechnology, INC* bao gồm, *HNF4A(H-1): sc374229*, *AFP(C3) sc 8399*, *ALB(E11): sc-271601* (pha loãng 1: 300 trong PBS) trong 1 giờ. Bước sóng kích thích để kháng thể phát huỳnh quang là 488 nm. Phổ huỳnh quang phát ra được thu ở bước sóng 450–605 nm, sử dụng kính hiển vi Nikon Ti2.

Phương pháp nhuộm Periodic Acid-Schiff

Glycogen tích lũy trong tế bào được phân tích bằng phương pháp nhuộm bằng Periodic Acid-Schiff (PAS). Đĩa nuôi có chứa các tế bào được cố định trong 4% paraformaldehyde và thấm màng bằng với 0,1% Triton X-100 trong 10 phút. Các mẫu tế bào này sau đó được tiến hành oxy hóa trong 1% axit periodic trong 10 phút, rửa lại 3 lần trong nước khử ion (dH₂O), nhuộm bằng thuốc nhuộm Schiff trong 20 phút ở nhiệt độ phòng và rửa trong dH₂O cho 5-10 phút. Nhân tế bào được nhuộm màu với Hematoxylin Mayer trong 1 phút, rửa lại bằng dH₂O và đánh giá dưới kính hiển vi quang học.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

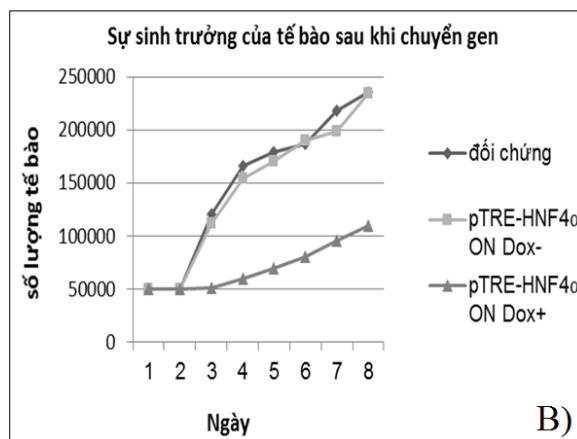
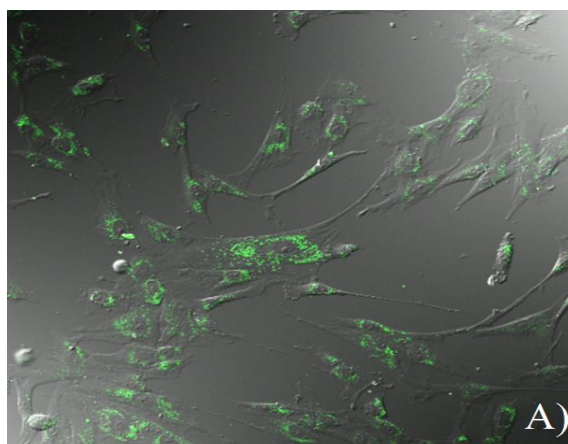
Phân lập nhân nuôi tế bào nguyên bào sợi

Sau 2 tuần nuôi cấy, từ mẫu da quy đầu các tế bào nguyên bào sợi bắt đầu mọc ra từ rìa, bám vào mặt đĩa nuôi. Các tế bào ban đầu thường không đồng nhất và có chứa một số tế bào tế bào hình tròn xen lẫn hầu hết các tế bào dạng thoi, thuôn dài. Đến tuần thứ ba của quá trình nuôi cấy, có thể quan sát thấy nhiều tế bào biểu hiện hình thái hình thoi với sự sắp xếp ngày càng sát nhau và nhân của chúng có hình bầu dục đều đặn, lớn và rõ ràng. Sau ba lần cấy chuyển, tế bào có dạng thoi, thuôn dài, các tế bào đồng nhất và bám dính vào bề mặt

đĩa nuôi. Tiến trình xuất hiện, tăng sinh và hình thái của tế bào thu nhận được đều có sự tương đồng với kết quả nhân nuôi tế bào nguyên bào sợi từ da người theo công bố của Keira *et al.* (2004). Phương pháp phân lập tế bào nguyên bào sợi từ mô da người bằng mảnh mô được đánh giá là phương pháp hiệu quả nhất (Huschtscha *et al.*, 2012). Điều này sẽ giúp mở rộng tính hữu dụng của các nguyên bào sợi bình thường của người đối với các nghiên cứu về sinh học tế bào và hoạt động điều khiển bộ gen chức năng liên quan đến các nghiên cứu thao tác di truyền (Huschtscha *et al.*, 2012).

Biến nạp vector vào tế bào và ảnh hưởng lên tốc độ tăng sinh của tế bào

Sau 24 giờ biến nạp vector mang gen *HNF4 α* , tế bào được hoạt hóa bằng Doxycycline để hoạt hóa quá trình tổng hợp các protein. Kết quả cho thấy hầu hết tế bào có biểu hiện của gen eGFP (Hình 1A). Kết quả trong hình 1B cho thấy, không có sự khác biệt giữa lô đối chứng và lô chuyển gen nhưng không hoạt hóa bằng Doxycyclin. Trong khi đó, tốc độ tăng sinh tế bào giảm rõ rệt trong lô được hoạt hóa bằng Doxycyclin. Theo Vương *et al.* (2015), *HNF-4 α* là một trong những gen hoạt động ức chế tăng sinh tế bào. Kết quả cho thấy, từ kết quả biểu hiện gen eGFP và tốc độ tăng sinh của tế bào cho thấy vector Tet.on-eGFP-HNF4 α đã hoạt hóa tổng hợp các protein tương ứng.



Hình 1. Tế bào biểu hiện protein eGFP (A) (độ phóng đại ảnh 200x) và tốc độ sinh trưởng của tế bào sau khi hoạt hóa bằng Doxycyclin (B).

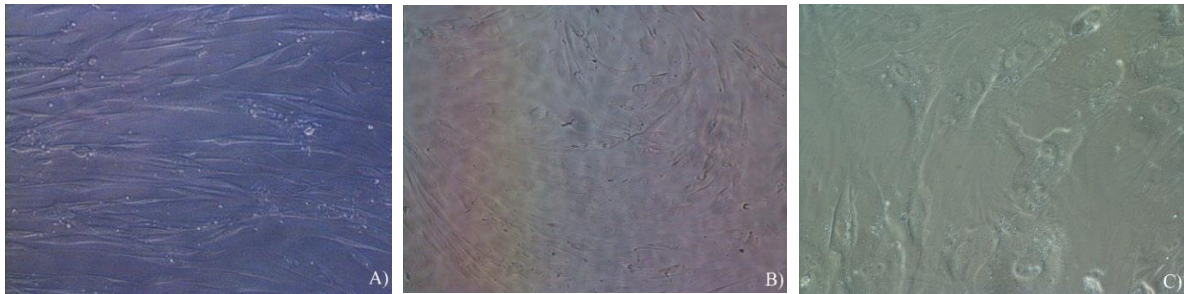
Biểu hiện hình thái tế bào sau chuyển gen

Sau khi chuyển vector mang gen *HNF4 α* , sử dụng kính hiển vi quan sát hình thái và ghi nhận sự thay đổi hình thái tế bào mỗi ngày. Kết quả cho thấy hình thái đặc trưng của tế bào nguyên bào sợi (Hình 2A) có sự chuyển biến theo xu hướng co ngắn lại sau một tuần

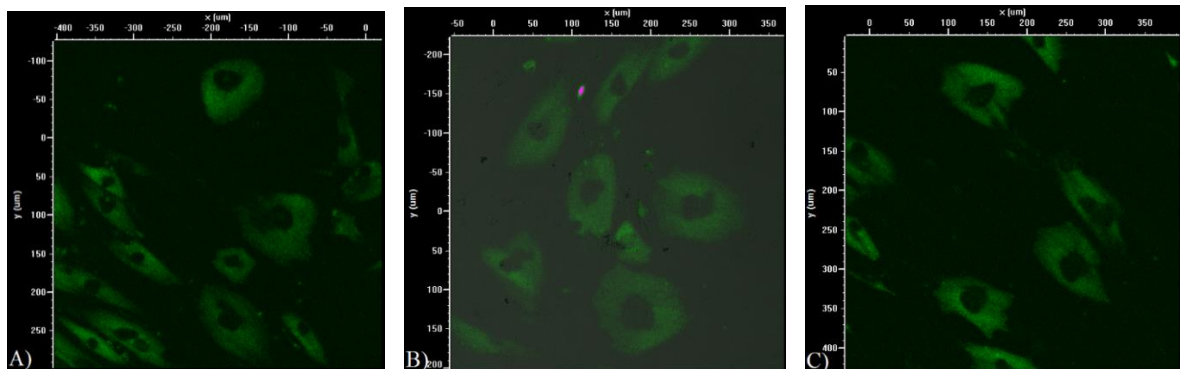
(Hình 2B). Ở tuần thứ 2, tế bào có dạng đa giác với tỷ lệ giữa thể tích nhân tế bào và tế bào chất tăng lên, hình thái này tương tự với tế bào nhu mô gan (Hình 2C). Xu thế chuyển đổi hình thái tế bào trong quá trình tái mã hóa cũng đã được đề cập trong nhiều nghiên cứu (Ballester *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2019). Tuy nhiên, trong các nghiên cứu này thời gian đánh giá tế

bào có dạng tế bào gan có khác nhau. Trong nghiên cứu của Ballester *et al.* (2019), nhóm tác giả không đề cập tới thời gian đánh giá trạng thái tế bào. Trong khi đó, công bố của Xie *et al.* (2019) hình dạng tế bào được đánh giá sau 15 và 30 ngày. Kết quả từ ngày 15, tế bào bắt đầu có hình dạng của tế bào nhu mô gan và ngày thứ 30 toàn bộ tế bào tương tự với hình thái tế bào gan phân lập từ mô gan (Xie *et al.*, 2019).

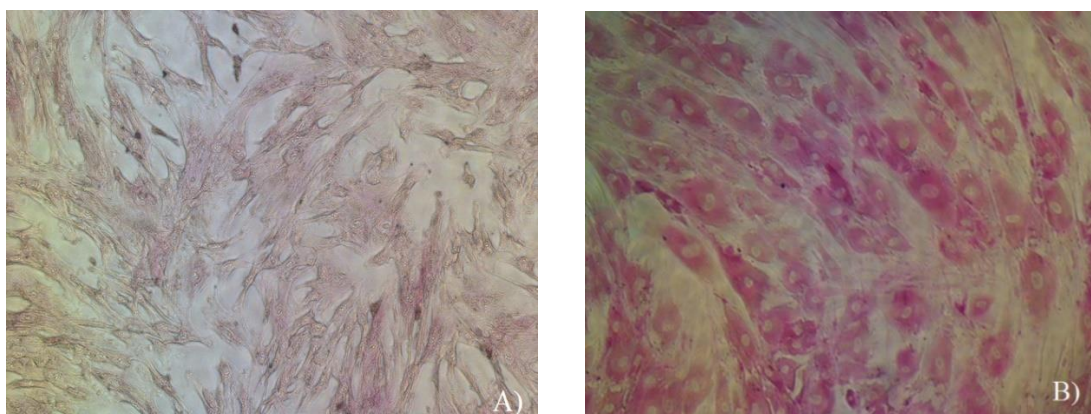
Kết quả nhuộm miễn dịch tế bào sau 2 tuần xử lý được thể hiện ở hình 3. Kết quả cho thấy, các tế bào đều có biểu hiện dương tính với các chỉ thị đặc trưng của tế bào gan như AFP, ALB và HNF4 α . Kết quả nhuộm miễn dịch huỳnh quang các chỉ thị AFP, ALB và HNF4 α để đánh giá đặc trưng tế bào gan sau tái mã hóa cho thấy có sự tương đồng với các công bố trước đây (Simeonov *et al.*, 2014; Ballester *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 20).



Hình 2. Hình thái tế bào thay đổi trong quá trình tái mã hóa. A) Tế bào dạng hình thoi (độ phóng đại 200x), B) Hình thái tế bào sau 1 tuần xử lý (độ phóng đại 200x) và C) Hình thái tế bào sau 2 tuần xử lý (độ phóng đại 200x).



Hình 3. Hình ảnh tế bào nhuộm miễn dịch huỳnh quang. A) tế bào nhuộm với AFP, B) tế bào nhuộm với ALB và C) tế bào nhuộm với HNF4 α (Độ phóng đại 400x).



Hình 4. Kết quả nhuộm PAS, A) tế bào không bổ sung Doxycyclin âm tính khi nhuộm PAS, B) Tế bào chuyển gen, hoạt hóa bằng Doxycyclin dương tính khi nhuộm PAS. (độ phóng đại ảnh 100x).

Kết quả tế bào sau 2 tuần xử lý nhuộm với PAS được thể hiện trong hình 4. Kết quả cho thấy, ở tế bào không hoạt hóa biểu hiện *HNF4α* tế bào không bắt màu khi nhuộm PAS (Hình 4A) và tế bào bắt màu với PAS ở lô hoạt hóa bằng Doxycyclin để biểu hiện *HNF4α* (Hình 4B). Khả năng tích lũy Glicogen của tế bào được thể hiện trong phản ứng nhuộm PAS. Kết quả thu được tương tự với thông báo của Ballester *et al.* (2019).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chứng minh rằng các tế bào giống tế bào gan có thể được tạo ra một cách chi chuyen nạp một gen duy nhất *HNF4α* vào nguyên bào sợi của người. Đây được đánh giá là gen đóng vai trò quan trọng nhất, dựa trên phát hiện rằng nó có tác dụng thúc đẩy chuyển đổi mạnh nhất (Nakamori *et al.*, 2017). Kết quả cho thấy có sự tương đồng các báo cáo trước đây đã sử dụng gen *HNF4α* để tái lập trình gan trực tiếp ở người (Huang *et al.*, 2014; Nakamori *et al.*, 2017). Từ những kết quả này, một lần nữa khẳng định gen *HNF4α* đóng một vai trò quan trọng trong việc tái lập trình trực tiếp gan và biểu hiện quá mức gen này sẽ thúc đẩy quá trình tái mã hóa tế bào nguyên bào sợi thành tế bào gan. Chức năng của tế bào gan cảm ứng (iHeps) có thể được tăng cường bằng cách điều chỉnh khoảng thời gian biểu hiện và lượng *HNF4α* (Nakamori *et al.*, 2017; Xie *et al.*, 2019).

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập và nhân nuôi thành công tế bào nguyên bào sợi người. Chuyển nạp vector Tet.on-eGFP-*HNF4α* vào tế bào nguyên bào sợi không ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của tế bào. Biểu hiện quá mức gen *HNF4α* đã tái lập trình tế bào nguyên bào sợi thành tế bào có một số đặc điểm đặc trưng của tế bào gan.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được thực hiện bởi kinh phí đề tài “Nghiên cứu biểu hiện quá mức gen *HNF4α* bằng vector tet.on để chuyển biệt hóa nguyên bào sợi người thành tế bào chức năng gan”, Mã số đề tài: CS.CNSH.03/20.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Carpentier A, Tesfaye A, Chu V, Nimgaonkar I, Zhang F, Lee SB, Thorgerirsson SS, Feinstone SM, Liang TJ (2014) Engrafted human stem cell derived hepatocytes establish an infectious HCV murine model. *J Clin Invest* 124(11): 4953–2964.

Huang P, Sun L, Zhang L, Hui L (2019) Conversion of Fibroblasts to Hepatocytes In Vitro. *Methods Mol Biol* 1905: 93–101.

Huang P, Zhang L, Gao Y, He Z, Yao D, Wu Z, Cen J, Chen X, Liu C, Hu Y, Lai D, Hu Z, Chen L, Zhang Y, Cheng X, Ma X, Pan G, Wang X, Hui L (2014) Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable hepatocytes. *Cell stem cell* 14: 370–384.

Huschtscha LI, Napier CE, Noble JR, Bower K, Au AY, Campbell HG, Braithwaite AW, Reddel RR (2012) Enhanced isolation of fibroblasts from human skin explants. *BioTechniques* 53: 239-244.

Ishii K, Yoshida Y, Akechi Y, Sakabe T, Nishio R, Ikeda R, Terabayashi K, Matsumi Y, Gonda K, Okamoto H, Takubo K, Tajima F, Tsuchiya H, Hoshikawa Y, Kurimasa A, Umezawa A, Shiota G (2008) Hepatic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by tetracycline-regulated hepatocyte nuclear factor 3beta. *Hepatology* 48(2): 597–606.

Keira SM, Ferreira LM, Gragnani A, Duarte IS, Santos IAN (2004) Experimental model for fibroblast culture. *Acta Cir Bras* 19: 11–19.

Kim Y, Kang K, Lee SB, Seo D, Yoon S, Kim SJ, Jang K, Jung YK, Lee KG, Factor VM, Jeong J, Choi D (2019) Small molecule-mediated reprogramming of human hepatocytes into bipotent progenitor cells. *J Hepatol* 70(1): 97–107.

Liu H, Kim Y, Sharkis S, Marchionni L, Jang YY (2011) In vivo liver regeneration potential of human induced pluripotent stem cells from diverse origins. *Sci Transl Med* 3(82): 82–39.

Nakamori D, Akamine H, Takayama K, Sakurai F, Mizuguchi H (2017) Direct conversion of human fibroblasts into hepatocyte-like cells by ATF5, PROX1, FOXA2, FOXA3, and HNF4A transduction. *Sci Rep* 7: 16675.

Simeonov KP, Uppal H (2014) Direct Reprogramming of Human Fibroblasts to Hepatocyte-Like Cells by Synthetic Modified mRNAs. *PLoS ONE* 9(6): e100134.

Song G, Yuan Q, Dai Z, Tsay HC, Shen X, Ott M, Sharma AD (2019) Conversion of Fibroblasts to Hepatocyte-Like Cells In Vivo. In: Tanimizu N. (eds) Hepatic Stem Cells. Methods in Molecular Biology, vol 1905. Humana Press, New York, NY.

Xie B, Sun D, Du YY, Jia J, Sun SC, Xu J, Liu YF, Xiang CG, Chen ST, Xie HF, Wang Q, Li G, Lyu X, Shen H, Li S, Wu M, Zhang X, Pu Y, Xiang K, Lai W, Du P, Yuan Z, Li C, Shi Y, Lu S, Deng H (2019) A two-step lineage reprogramming strategy to generate functionally competent human hepatocytes from fibroblasts. *Cell Res* 29: 696–710.

Yamaguchi T, Matsuzaki J, Katsuda T, Saito Y, Saito H, Ochiya T (2019) Generation of functional human hepatocytes in vitro: current status and future prospects. *Inflamm Regen* 39: 13.

ASSESSMENT OF REPROGRAMMING CAPABILITY OF HUMAN FIBROBLAST INTO HEPATOCYTE-LIKE CELL BY OVEREXPRESSION HNF4 α GENE IN TET-ON SYSTEM

Nguyen Van Hanh^{1,2}, Do Trung Kien², Tinh Cong Su¹, Le Thi Hai Minh³, Ngo Thi Thu Huong⁴, Tran Thi Huong Giang¹

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

³*University of Sciences, Hue University*

⁴*Hanoi Medical University*

SUMMARY

This study investigated the ability to reprogramming human fibroblast cells into hepatocyte-like cells by overexpressing *HNF4 α* gene. The fibroblast cells isolated and primary cultured from foreskin donated by healthy patients. The *HNF4 α* gene overexpressed through Doxycilin activated the vectors *Tet-on-eGFP-HNF4 α* . The cells after the reprogramming process were evaluated by observing morphological changes, immunofluorescence staining to assess the expression of proteins specific to hepatocytes such as albumin, α -fetoprotein (AFP), HNF4 α , and PAS staining to evaluate the ability to glycogen store in cells. The research has isolated and successfully primary cultured fibroblasts. The results showed that after gene transfer, the vector *Tet-on-eGFP-HNF4 α* expressed in all cells and it did not affect the growth rate of the cell. After two weeks, the cells acquired hepatocytes morphology, and they were positive for albumin, AFP, HNF4 α and PAS staining. The research has created the cells with some characteristics of liver cells from fibroblasts, however, further studies are needed to comprehensively evaluate them.

Keywords: Reprogramming, Overexpression, HNF4 α , Fibroblasts, Tet-On system, Hepatocytes