

· 论 著 ·

人胚胎肝细胞移植治疗大鼠急性肝衰竭的效果分析*

刘凯歌, 尚红利, 赵 慧, 牛春燕, 汪 雯
(西安医学院附属医院消化科 710077)

摘要:目的 探讨人胚胎肝细胞移植治疗急性肝衰竭(ALF)的疗效及能否成为移植细胞源。方法 采用四甲基偶氮唑盐法检测人胚胎肝细胞增殖情况;免疫细胞化学检测其 ALB、细胞角蛋白-18(CK-18)的表达;D-氨基半乳糖(D-gal)药物诱导 ALF 的实验动物模型;人胚胎肝细胞移植治疗 ALF 的动物模型,包括移植组与对照组在肝功能指标[ALT、AST、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TBIL)]的差异性比较。免疫组织化学法检测植入脾脏中的人胚胎肝细胞 ALB 及 CK-18 的表达。结果 培养第 5 天左右细胞数量达到最高峰,每天完成 4~5 次分裂,胚胎肝细胞的生长曲线呈抛物线型。免疫细胞化学检测提示其具有表达 ALB、CK-18 的功能;D-gal 1.6 g/kg 腹腔注射 72 h 后大鼠 ALF 模型制备成功;移植第 3~5 天后,移植组与对照组比较,肝功能(ALT、AST、ALP、TBIL)指标差异有统计学意义($P < 0.01$)。植入脾内的肝细胞具有分泌并表达 CK-18、ALB 的功能。结论 人胚胎肝细胞脾内移植能有效治疗 ALF,并可能成为肝细胞移植的靶细胞源。

关键词:细胞移植;肝功能衰竭,急性;人胚胎肝细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.09.007

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)09-0848-03

Effective analysis on treatment of rat acute liver failure by human fetal hepatocyte transplantation*

Liu Kaige, Shang Hongli, Zhao Hui, Niu Chenyan, Wang Wen

(Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital, Xi'an Medical College, Xi'an, Shanxi 710077, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of treating rat acute liver failure and alternative sources of cells for transplantation by human fetal hepatocyte transplantation. **Methods** The proliferation, expression of albumin and cytokeratin-18 of human fetal hepatocyte were detected by MTT and immunocytochemistry. The animal models of rat acute liver failure were made by D-galactosamine. Hepatic functions, such as alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase and total bilirubin were measured between the treated and the control groups. The expression of albumin and cytokeratin-18 of human fetal hepatocyte transplanted in spleen were detected by immunohistochemistry. **Results** The cell population reached a peak, when human fetal hepatocyte were cultivated for 5 d. The cell division had 4-5 times per day, its growth curve present parabola. Immunocytochemistry revealed the positive expression of albumin and cytokeratin-18 of human fetal hepatocyte. The models of rat acute liver failure were made successfully in 72 h by D-galactosamine 1.6 g/kg intraperitoneal injection. Alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase and total bilirubin were measured and there were significant difference between the treated and the control groups ($P < 0.01$). Immunohistochemistry revealed the positive expression of albumin and cytokeratin-18 of human fetal hepatocyte transplanted in spleen. **Conclusion** These findings demonstrate the treating of rat acute liver failure by human fetal hepatocyte transplantation is effective and alternative sources of cells for transplantation.

Key words: cell transplantation; liver failure, acute; human fetal hepatocyte

肝疾病的发生率约占人口的 17.5%,肝细胞移植对于急性肝衰竭(ALF)和遗传性肝病等肝移植的患者来说是可供选择的方法之一,这种移植方法可用于部分患者的肝功能重建。本研究采用人胚胎肝细胞移植治疗药物诱导的 ALF 动物模型,以探讨人胚胎肝细胞移植治疗 ALF 的有效性及能否成为移植治疗的靶细胞源。

1 材料与方 法

1.1 材料 人胚胎肝由本院产科提供,胎龄分别为 16、20、23 周,胎肝的使用经本院医学伦理委员会批准,并征得家属同意签订《胎儿捐献用于科学研究同意书》。成年雄性 SD 大鼠由西安交通大学医学院动物实验中心提供。MTT、Hepatozyme-SFM 无血清培养基、Williams'E 培养基及胎牛血清均自美国 Amresco 公司,鼠抗人 ALB 单克隆抗体、鼠抗人细胞角蛋白-18(CK-18)单克隆抗体均自美国 Sigm 公司。

1.2 方 法

1.2.1 胚胎肝细胞的分离、培养 采用改良的 Seglen 二步灌注法^[1-2]分离细胞后,将胎肝细胞以终浓度 2×10^5 /mL 接种于一次性培养瓶内,分别选择 DMEM 及 Hepatozyme-SFM 无血清培养基培养。其中 DMEM 培养基内含 15% 胎牛血清、地塞米松 10^{-9} mol/L、胰岛素 10^{-9} mol/L、表皮生长因子(EGF) $5 \mu\text{g/L}$ 、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 $\mu\text{g/mL}$, 37°C 、5% CO_2 孵箱内培养。

1.2.2 MTT 法检测人胚胎肝细胞的增殖情况 取对数生长长期的人胚胎肝细胞制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 5×10^4 /mL,以每孔 200 μL 接种于 96 孔培养板, 37°C 、5% CO_2 孵箱内培养,每天取 12 孔,每孔加入 MTT 溶液 20 μL ,继续孵育 4 h 后终止培养,吸去每孔上清液,分别加入 150 μL 二甲亚砜,振荡 10 min,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度(A)值,连

* 基金项目:西安医学院附属医院科研资助项目(XYFY2006-8)。

续测定 8 d, 实验重复 3 次, 取各孔平均 A 值。以时间为横坐标, A 值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.2.3 免疫细胞化学 用 Hepatozyme-SFM 无血清培养基对人胚胎肝细胞进行培养, 6 孔培养板爬片培养 7 d 时, 用免疫细胞化学测定其中 ALB 及 CK-18 的表达, 操作按试剂盒说明书要求进行, 人 ALB 及 CK-18 抗体均以 1:100 稀释。

1.2.4 制备大鼠 ALF 模型 选用 D-氨基半乳糖(D-gal), 剂量为 1.6 g/kg, 腹腔注射后 72 h 制备大鼠 ALF 模型。注射 D-gal 第 1、3、5、7 天, 各组随机选取 2 只大鼠处死, 取肝脏进行 HE 染色, 显微镜下观察其病理改变。

1.2.5 人胚胎肝细胞移植治疗大鼠 ALF 采用肝脏功能检测、脾脏病理组织观察、免疫组化检测移植后人胚胎肝细胞的 ALB 及 CK-18 表达。44 只大鼠在用 D-gal 诱导 ALF 后随机分为两组。移植组 24 只, 脾脏实质内注射浓度为 2×10^7 /mL 的人胚胎肝细胞悬液 1 mL。其中 12 只用于观察 2 周存活率及组织学检查, 12 只用于抽血及组织学检查。对照组 20 只, 脾内注射生理盐水 1 mL, 10 只用于观察 2 周存活率及组织学检查, 10 只用于抽血及组织学检查。各组实验大鼠每天按 10 mg/kg 剂量肌肉注射环孢霉素 A(CsA)。分别在人胚胎肝细胞移植后第 1、3、5、7 天, 各组随机选取 3 只大鼠经腹主动脉抽血, 用全自动生化分析仪检测 ALT、AST、总胆红素(TBIL)及碱性磷酸酶(ALP)。取 4 只大鼠作正常对照。同时各组随机选取 3 只大鼠处死, 取脾脏组织 HE 染色, 显微镜下观察。

1.3 统计学处理 实验数据采用 SPSS12.0 统计软件进行分析, 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人胚胎肝细胞增殖情况 胚胎肝细胞的生长曲线呈抛物线型(图 1), 胚胎肝细胞培养 24 h, 贴壁率达 80% 左右, 贴壁后细胞伸展, 形态由圆形变为多边形, 细胞核及核仁明显可辨, 通常多个细胞成簇状分布; 培养第 4~6 天时, 细胞数量达到最高峰, 平均完成 4~5 次分裂, 细胞相互连接呈片状铺满瓶底, 此种形态及密度可维持 2 周左右, 至第 3 周以后细胞逐渐停止生长, 数量明显下降。

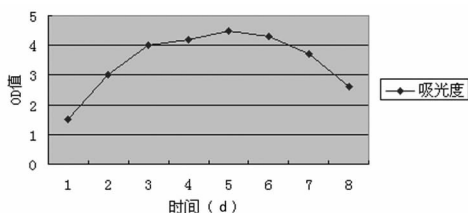
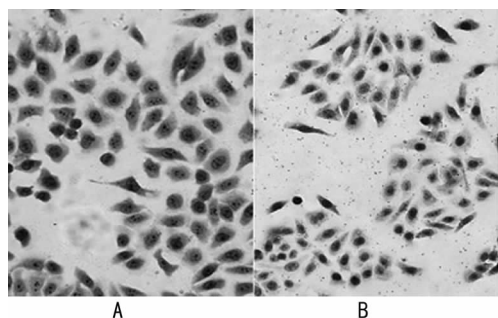


图 1 人胚胎肝细胞生长曲线图



A: ALB 阳性表达; B: CK-18 阳性表达。

图 2 人胚胎肝细胞中的 ALB 及 CK-18 的表达 (×200)

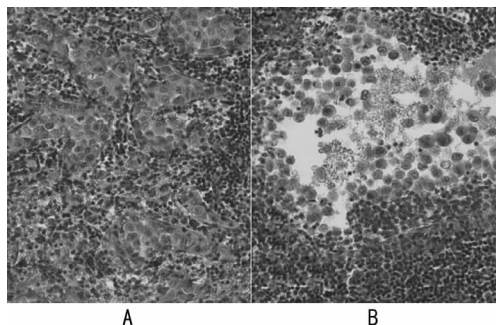
2.2 免疫细胞化学测定人胚胎肝细胞中 ALB 及 CK-18 的表

达 人胚胎肝细胞 6 孔培养板爬片培养 5 d 时, 免疫细胞化学测定 ALB(图 2A)及 CK-18(图 2B)在人胚胎肝细胞的细胞质中均有表达, 提示人胚胎肝细胞具备移植靶细胞的基本功能。

2.3 ALF 大鼠细胞移植后肝脏生化功能观察 肝细胞移植后第 1 天, 移植组与对照组各项肝功能指标(ALT、AST、ALP、TBIL)差异无统计学意义($P > 0.05$)。移植第 3~5 天后, 移植组与对照组比较, 各项肝功能指标差异均有统计学意义($P < 0.01$)。至第 7 天, 移植组大鼠各项肝功能指标已趋于正常, 对照组大鼠全部死亡。提示细胞移植可以明显改善 ALF 大鼠的肝脏功能。

2.4 细胞移植后大鼠存活率比较 移植组、对照组在细胞移植后第 1 天, 存活率差异无统计学意义($P > 0.05$); 移植 3 d 后移植组与对照组比较大鼠存活率出现差异($P < 0.05$), 在 7 d 内存活率有明显差异($P < 0.01$)。说明人胚胎肝细胞经脾脏移植可显著提高 ALF 大鼠的存活率。

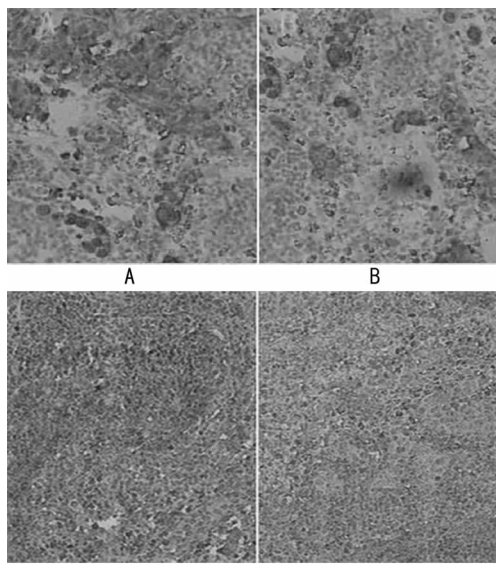
2.5 细胞移植后组织学观察 移植后第 3 天, 脾内可见大量游离肝细胞, 部分聚集成团, 分布于脾实质内, 白髓中较为多见(图 3A); 第 5 天肝细胞数量明显减少, 部分坏死, 可见炎性细胞浸润(图 3B); 至第 7 天肝细胞已被大量纤维化条索替代。



A: 移植后第 3 天; B: 移植后第 5 天。

图 3 脾内肝细胞移植 HE 染色 (×200)

2.6 移植细胞 ALB 及 CK-18 的表达 肝细胞移植入脾内 24、72 h, 取脾脏组织行免疫组化染色, 可见移植的肝细胞胞质及脾脏组织内含棕色颗粒, 证实移植脾内的肝细胞具有分泌 ALB(图 4A、C)及 CK-18(图 4B、D)的功能。



A: 移植 24 h ALB 的表达; B: 移植 24 h CK-18 的表达; C: 移植 72 h ALB 的表达; D: 移植 72 h CK-18 的表达。

图 4 植入脾脏组织的免疫组化染色 (×200)

3 讨 论

肝疾病的发生率约占人口的 17.5%^[2], ALF 是肝脏疾病死亡的主要原因, 原位肝移植是其最为有效的治疗方法, 但由于其临床大量开展受到诸多因素的限制, 故肝细胞移植治疗成为可供选择的方法之一。肝细胞移植是将游离的、有生物学活性的肝细胞移植到受体内, 在受体内生长、增殖并发挥正常肝细胞的作用, 以替代部分肝脏功能, 这种移植方法已经用于一小部分患者的肝功能重建^[3-4]。寻找可供移植的肝细胞源是非常必要的, 包括胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC, 起源于胚泡内层细胞团)、成体干细胞(adult stem cell, ASC)、肝细胞, 甚至肝癌细胞 HepG2, 已经应用于探索肝功能和人工肝的模型中^[5], 这些都是潜在的移植细胞源。已有证据显示能够将不同胚胎干细胞和非肝细胞诱导成为具有某些肝细胞特征的细胞^[6-7]。Cho 等^[8]将 ESC 在体外诱导为肝细胞样类肝细胞, 这些细胞不但和正常成熟肝细胞有同样的基因表达模式, 而且和正常成熟肝细胞有相同的形态结构及功能特点。并通过生物人工肝装置用于治疗暴发性肝衰竭, 其结果可以提高动物生存率, 证实这种来源于胚胎干细胞分化的肝细胞样类肝细胞可应用于 ALF 的治疗。Agarwal 等^[9]的研究也得到类似的结果。Schwartz 等^[10]发现骨髓多能成体祖细胞移植到肝脏中, 它们可以分化为肝细胞。其机制可能是基础成纤维细胞生长因子能够诱导骨髓细胞转化为肝细胞^[11]。但无论 ESC 或 ASC 来源的肝细胞样类肝细胞, 能否成为肝细胞移植的较好细胞源, 目前还不明确^[12]。另外, HepG2 不能模拟体内环境, 它不表达尿素循环酶和完成生酮作用^[13], 由于完全不同于人肝细胞的生物学行为, 因此 HepG2 也不是理想的细胞源。在肝脏的发育过程中, 胚胎肝细胞的分裂、增殖、分化最为活跃, 胚胎肝细胞在不断增殖的同时, 也不断分化为具有肝细胞功能的成熟肝细胞。且 16~24 周的胚胎肝脏已具有合成 ALB、甲胎蛋白、细胞角蛋白等功能, 因此, 本实验选择人胚胎肝细胞作为移植靶细胞。实验证实, 人胚胎肝细胞脾内移植可明显改善 ALF 大鼠的肝脏功能, 各项肝功能指标(ALT、AST、ALP、TBIL)在细胞移植后第 1 天未见明显改善, 1 周内肝功能显著好转, 与对照组差异显著。组织学观察发现, 植入体内的肝细胞早期形成团块, 并可以表达 ALB 及 CK-18, 发挥其功能, 由于免疫排斥的原因, 1 周后难以发现肝细胞。与此同时, ALF 大鼠的存活率也明显提高, 1 周内治疗组存活率达 50%, 而对照组无一存活, 治疗效果是肯定的。本实验证实了脾内人胚胎肝细胞移植治疗 ALF 的有效性, 人胚胎肝细胞成为 ALF 细胞移植治疗的可能理想候选细胞。但本实验所获得的移植细胞除人胚胎肝细胞外, 还有少许 ESC 和 ASC 分化为肝细胞^[14], 体外 ESC 向肝细胞转化的过程中, 发现在培养液中体外 ESC 能转化为可分泌甲胎蛋白、ALB 的肝细胞^[15], 并发现了它们的分化、增殖、归巢, 即具有可分化成为组织或器官的特定细胞类型, 对组织的完整性及受损修复功能。研究它们对胚胎肝细胞、本身分化、增殖、归巢等在肝衰竭细胞移植治疗中的影响和相互作用更加具有意义, 是进一步需研究的课题。

参考文献:

[1] Galvao FH, de Andrade Junior DR, de Andrade DR, et al.

- Hepatocyte Transplantation: state of the art[J]. *Hepatol Res*, 2006, 36(4): 237-247.
- [2] Bellentani S, Tiribelli C. The spectrum of liver disease in the general population; Lessons from the Dionysos study [J]. *J Hepatol*, 2001, 35(4): 531-537.
- [3] Fox IJ, Roy-Chowdhury J. Hepatocyte transplantation [J]. *J Hepatol*, 2004, 40(6): 878-886.
- [4] Selden C, Hodgson H. Cellular therapies for liver replacement[J]. *Transplant Immunol*, 2004, 12(3/4): 273-288.
- [5] Sussman NL, Gislason GT, Conlin CA, et al. The hepatic extracorporeal liver assist device-initial clinical experience [J]. *Artificial Organs*, 1994, 18(4): 390-396.
- [6] Theise ND, Saxena R, Portmann BC, et al. The canals of hering and hepatic stem cells in humans [J]. *Hepatology*, 1999, 30(6): 1425-1437.
- [7] Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells [J]. *Science*, 1999, 284(5417): 1168-1170.
- [8] Cho CH, Parashurama N, Park EYH, et al. Homogeneous differentiation of hepatocyte-like cells from embryonic stem cells: applications for the treatment of liver failure [J]. *FASEB*, 2008, 22(3): 898-909.
- [9] Agarwal S, Holton KL, Lanza R, et al. Efficient differentiation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(5): 1117-1127.
- [10] Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(10): 1291-1302.
- [11] Saji Y, Tamura S, Yoshida Y, et al. Basic fibroblast growth factor promotes the trans-differentiation of mouse bone marrow cells into hepatic lineage cells via multiple liver-enriched transcription factors [J]. *Hepatol*, 2004, 41(4): 545-550.
- [12] Banas A, Yamamoto Y, Teratani T, et al. Stem Cell plasticity: learning from hepatogenic differentiation strategies developmental dynamics [J]. *Stem Cells*, 2007, 236(12): 3228-3241.
- [13] Agius L. Human in vitro techniques for metabolic studies [J]. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 1987, 1(4): 999-1021.
- [14] Yin YJ, Lim YK, S-Tellez M, et al. AFP⁺ ESC-derived cells engraft and differentiate into hepatocytes in vivo [J]. *Stem Cells*, 2002, 20(4): 338-346.
- [15] Hu A, Cai I, Zheng Q, et al. Hepatic differentiation from embryonic stem cells in vitro [J]. *Chin Med J*, 2003, 116(3): 1893-1897.

(收稿日期: 2010-08-10 修回日期: 2010-09-17)