

培养猪肝细胞型生物人工肝的研究进展

张世昌, 王英杰

张世昌, 王英杰, 中国人民解放军第三军医大学西南医院感染病研究所
重庆市 400038
国家自然科学基金资助课题, No.30027001
项目负责人: 王英杰, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南
医院感染病研究所. wangyj103@263.net
电话: 023-68754475-8062
收稿日期: 2004-05-14 接受日期: 2004-06-10

摘要

生物人工肝研究的主要细胞材料是人肝细胞、肝肿瘤细胞株和猪肝细胞,但由于人肝细胞来源匮乏以及肿瘤细胞株潜在的不安全性,培养猪肝细胞型生物人工肝已经逐步成为人工肝研究和临床应用的主要对象.文章主要介绍了培养猪肝细胞型生物人工肝的动物实验、临床应用以及其生物安全性,同时探讨了该型生物人工肝存在的问题和应用前景.

张世昌, 王英杰. 培养猪肝细胞型生物人工肝的研究进展. 世界华人消化杂志
2004;12(9):2156-2158

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2156.asp>

0 引言

众所周知,原位肝移植治疗急性肝衰竭是公认的有效治疗手段,但由于供体的匮乏限制了原位肝移植的广泛开展,尤其是紧急肝移植的开展.因此,需要以肝细胞为核心材料的生物人工肝为患者提供可靠的过渡性支持治疗,使患者能够等到合适的供肝通过肝移植而恢复,或通过自身的肝再生恢复,从而避免肝移植.近年来,在大量实验研究的基础上,猪肝细胞型生物人工肝在动物实验、临床应用及生物安全性的研究已经取得较大的进展.现将这一领域的研究进展作一综述.

1 动物实验

猪肝细胞型生物人工肝的动物实验可为临床应用提供实验依据,是进入临床前必不可少的环节.研究者先后对多层平板式生物人工肝、平板膜式生物人工肝、透析型生物人工肝、中空纤维型生物人工肝等进行了大量的动物实验研究,结果证实各种生物人工肝均有代偿肝衰竭动物肝脏功能的作用.但随着生物反应器和支持系统的发展,以动物肝衰竭为模型的肝支持实验还在不断进行.

最近, Desille *et al*^[1]用内含藻酸盐包被猪肝细胞的生物人工肝治疗缺血性肝衰竭猪,结果显示该生物人工肝能有效地降低颅内压,减少肝性脑病的发生.日本九州大学研制的 PUF (polyurethane foam) 杂交型人工肝支持系统(PUF-HALSS),用 25 kg 的缺血性猪肝衰竭模型进行动物实验.包含 2×10^{10} 个猪肝细胞的 PUF-

HALSS 能完全抑制血氨、乳酸、总胆汁酸的升高,改善 Fisher 指数,维持血糖水平,降低血肌酐^[2].随后实验进一步证实 PUF-HALSS 能有效地促进肝再生^[3]. Shito *et al*^[4]设计的平板式生物人工肝的动物实验是用腹腔注射 D-氨基半乳糖的鼠作为肝衰竭模型,经细胞容量为 $(13.9 \pm 1.0) \times 10^6$ 的生物人工肝治疗后,治疗组存活率(83.3%)是对照组存活率(44.4%)的近两倍,生物人工肝能有效减少肝坏死,抑制血氨的上升和凝血酶原时间的下降.荷兰阿姆斯特丹大学医学中心研制的 AMC 型生物人工肝(AMC-BAL),利用全肝切除的猪肝衰竭模型进行猪肝细胞型生物人工肝的支持实验.15 只肝衰竭猪分成 3 组,两组为对照组(无猪肝细胞的 AMC-BAL 治疗和不治疗),另一组用有猪肝细胞的 AMC-BAL 治疗.结果显示治疗组存活时间(65 ± 15 h)较对照组(46 ± 6 h 和 43 ± 14 h)显著提高,血氨水平显著下降^[5].在对凝血系统的评价实验中,由于凝血因子的广泛消耗,AMC-BAL 的治疗并没有改善无肝猪的凝血状况,但未使其恶化,且使凝血酶抗凝血酶复合物和凝血酶片段 F1+2 增加,显示猪肝细胞有能力合成和激活凝血因子^[6].

2 临床应用

目前,无论细胞分离、培养,还是生物反应器研制与体外人工肝支持装置的构建,甚至于临床应用,猪肝细胞型生物人工肝已成为较成熟的生物人工肝.其中美国加州洛杉矶 Ceders-Sinai 医学中心研制的 HepatAssist 2000 型生物人工肝就是成功的范例,正在进行多中心、上百例的 III 期临床实验.最近该装置的临床应用是对 10 例急性肝衰竭进行 1-3 次治疗,直到肝移植,10 例患者神经症状改善(治疗前昏迷等级为 6.5 ± 3.7 ,治疗后昏迷等级为 9.6 ± 4.4 , $P < 0.02$),胆红素和转氨酶显著降低,10 例患者均成功过渡到肝移植^[7].作者认为 HepatAssist 2000 型生物人工肝可以改善大脑功能,帮助肝衰竭患者过渡到肝移植. Morsiani *et al*^[8]设计的辐射流式生物人工肝,可三维、高密度培养 230 g 猪肝细胞.对 7 例昏迷等级 III 或 IV 的急性肝衰竭患者进行 6-24 h 的治疗,其中 1 例因多器官功能衰竭死亡,另 6 例在接受治疗后肝移植,5 例移植后存活,神经症状和凝血酶原时间得到改善,血氨和转氨酶降低.上述患者均能耐受生物人工肝的治疗,未发现明显的不良反应.

AMC 型生物人工肝(AMC-BAL)是利用螺旋形、三维、非编织聚酯纤维、高密度猪肝细胞与氧合器结合构成的生物人工肝,可聚集培养猪肝细胞 10×10^9 个

以上^[9]. 在意大利开始的 I 期临床实验中, 对 7 例昏迷程度 III 或 IV 肝衰竭患者进行 8–35 h 的治疗, 其中 6 例患者成功的过渡到原位肝移植, 另 1 例接受两次治疗后肝功能恢复改善, 不需要肝移植, 未发现不良反应^[10]. 在另外 1 例急性乙肝病毒感染治疗过程中, 两次使用 AMC–BAL 治疗 35 h, 帮助患者成功过渡到肝移植, 出院 1 a 后检查无 PERV 感染^[11].

3 生物安全性

培养猪肝细胞型生物人工肝必须解决的问题就是生物安全性. 首先, 作为异种肝细胞要与患者血液接触, 非常容易引起免疫反应, 导致猪肝细胞的破坏; 其次, 存在传播动物病原的潜在危险.

3.1 猪肝细胞的免疫反应 由于人体内存在针对猪抗原的天然抗体, 特别是针对在猪肝细胞表面表达 Gal α –1, 3Gal 抗原决定簇(Gal α (1, 3) Gal epitopes)的抗体. 如果患者与猪肝细胞多次接触而没有保护, 猪肝细胞会短时间内被通过经典或旁路途径激活的补体级联反应破坏. Naruse *et al*^[12]用白细胞黏附柱、免疫球蛋白黏附柱结合猪肝治疗犬肝衰竭模型, 全血灌注猪肝 3 h, 犬全血经过免疫球蛋白黏附柱处理后, 再灌注猪肝能更有效地保护猪肝细胞的形态和功能. 目前在生物人工肝系统中采用 Cut–off 值在 100 ku 以下的半透膜对免疫球蛋白及补体进行阻隔, 既可以避免免疫反应引起广泛的猪肝细胞坏死, 以及因细胞坏死所致的炎症因子反流入人体, 同时也可以防止异种组织中的免疫物质进入患者血液. 国外有学者比较半透膜孔径为 10 nm 和 200 nm 两种猪肝细胞型生物人工肝与健康狗连接灌注后的免疫反应, 结果表明小孔径的半透膜能更有效减少异源性抗原抗体反应和细胞免疫反应的发生, 而补体介导的免疫反应不受半透膜孔径的影响^[13–14]. Schulte am Esch *et al*^[15]观察了猪肝细胞型生物人工肝治疗前后人抗体沉积、补体激活、DNA 碎片的变化, 治疗后猪肝细胞组化染色可见膜攻击复合物、C4、C3、B 因子、IgM、IgG 阳性, 猪肝细胞的 DNA 碎片在第一次治疗很少, 但随着治疗次数增加而增加.

目前, 人血浆与猪肝细胞直接接触发生异源性免疫反应尚不能完全避免, 应采取积极的预防措施. Yamashita *et al*^[16]利用蛋白酶抑制剂 Nafamostat Mesilate (NM)可以减少补体 C3 在猪肝细胞上的黏附率, 在生物反应器内加入 NM 使猪肝细胞的氨代谢能力由 24 h 延长到 48 h, 明显抑制了 ALT 和 AST 的快速升高并可以较好地保护猪肝细胞的形态. 提示和证明了 NM 可以减少猪肝细胞与肝衰竭患者血清接触的异源性免疫反应, 有利于猪肝细胞型生物人工肝的应用和肝支持作用, 但 NM 的应用只能减少或延缓异源性免疫反应. 由于补体反应主要由 Gal α –1, 3Gal 抗原决定簇引起的抗原抗体反应激活, 国外用基因敲除技术已经产生了无 α –1, 3 半乳糖基转移酶(Gal α –1, 3Gal 抗原决定簇合成

的关键酶)的转基因猪^[17–18], 将这种转基因猪的肝细胞于生物人工肝也许可以避免或减少补体反应对猪肝细胞的损伤.

3.2 猪肝细胞的病毒感染 采用严格的健康筛选方法一般可以保证排除猪体内的绝大多数致病因子, 但猪体内普遍存在着一种内源性逆转录病毒(porcine endogenous retroviral, PERV)–是位于猪基因组中的一种前病毒, 由于在生物人工肝治疗过程中一些细胞可能会从支持系统中进入患者血液中, 故 PERV 交叉感染的可能性引起研究者的高度重视. Irgang *et al*^[19]收集 7 例接受过猪肝细胞型生物人工肝治疗的肝衰竭患者血清进行 PERV 感染的调查, 采用 ELISA 检测 PERV 特异性抗原, 无 1 例阳性. Kuddus *et al*^[20]为了评价猪肝细胞型生物人工肝的安全性, 在实验室收集外腔培养液(猪肝细胞位于内腔), 在临床上收集 5 例接受生物人工肝治疗后的患者血液, 采用 RT–PCR、SS–PCR 检测收集的标本, PERV 均为阴性, 进一步把培养液上清与 HEK–293 细胞一起培养, 未发现 PERV 感染. Xu *et al*^[21]分析接受过猪肝细胞型生物人工肝治疗的患者 3–4 a 的血清也无 PERV 抗原存在.

虽然迄今为止, 接受生物人工肝治疗的患者均未发现 PERV 感染的证据, 这可能和人血浆中的补体通过经典途径灭活 PERV^[22]以及异源性抗 Gal– α –1, 3Gal 抗体可以在体外阻止 PERV 感染^[23]等有关. 但最近 SARS 的流行引起人们对人兽共患疾病更加关注. PERV 已在体外成功了感染人周围血单核细胞、原代内皮细胞、原代大动脉平滑肌细胞、淋巴细胞及内皮细胞株等^[24], 并且有研究认为重组后 PERV 感染人细胞可能会具有更强的复制能力^[25]. 但 Argaw *et al*^[26]发现 PERV 能感染豚鼠后, 病毒 DNA 拷贝数量并不随时间的推移而增加. 最近, 研究显示感染人细胞的 PERV 即人回归性(human–tropic)PERV 是 PERV 亚群 A 和 C 的重组子–PERV–A/C, 这种具有复制能力的重组子在动物 DNA 中并不存在^[27], 对动物本身来说也是一种外源性病毒, 认为这些外源性病毒是人回归性病毒的主要来源, 并且还发现在猪周围血单核细胞中的重组子 PERV–A/C 传染能力与 PERV–C 的表达相关, 这说明 PERV–C 是影响人回归性 PERV 产生的重要因子, 这为进一步筛选更健康的动物提供理论依据^[28]. 由于人体内也有人内源性逆转录病毒(human endogenous retroviral, HERV), 如果 PERV 感染人, 就有可能与 HERV 重组产生新的病毒. Suling *et al*用表达 HERV–K、W、E、R 的人 293 细胞研究认为这种潜在重组成新病毒的危险性很小. PERV 感染的潜在危险性是猪肝细胞应用必须解决的棘手问题, 解决这些问题可以考虑运用基因敲除技术研究无 PERV 的转基因猪或研究针对 PERV 保守序列的疫苗.

总之, 大量的实验研究和临床实验均证明猪肝细胞型生物人工肝可以作为较好体外人工肝支持系统,

使生物人工肝的应用日趋成熟,但猪肝细胞毕竟是异种肝细胞,仍然存在着免疫反应和传播病毒的潜在危险.虽然应用已经产生无 α -1,3半乳糖基转移酶的转基因猪可能可以减少补体介导的免疫反应,但由于人血浆中异源性抗Gal- α -1,3Gal抗体通过抗原抗体反应激活补体反应,从而灭活PERV,可以在体外阻止PERV感染人^[23-24],因此,无 α -1,3半乳糖基转移酶的转基因猪肝细胞的应用可能促进PERV的释放,增加传播病毒的危险性.在无 α -1,3半乳糖基转移酶的转基因猪的基础上进一步研究无PERV的转基因猪,也许可以解决这一问题.这些问题的解决将进一步提高猪肝细胞型生物人工肝的支持治疗时间和生物安全性.

4 参考文献

- Desille M, Mahler S, Seguin P, Malledant Y, Fremond B, Sebillé V, Bouix A, Desjardins JF, Joly A, Desbois J, Lebreton Y, Campion JP, Clement B. Reduced encephalopathy in pigs with ischemia-induced acute hepatic failure treated with a bioartificial liver containing alginate-entrapped hepatocytes. *Crit Care Med* 2002;30:658-663
- Yamashita Y, Shimada M, Tsujita E, Shirabe K, Ijima H, Nakazawa K, Sakiyama R, Fukuda J, Funatsu K, Sugimachi K. Efficacy of a larger version of the hybrid artificial liver support system using a polyurethane foam/spheroid packed-bed module in a warm ischemic liver failure pig model for preclinical experiments. *Cell Transplant* 2003;12:101-107
- Mizumoto H, Funatsu K. Liver regeneration using a hybrid artificial liver support system. *Artif Organs* 2004;28:53-57
- Shito M, Tilles AW, Tompkins RG, Yarmush ML, Toner M. Efficacy of an extracorporeal flat-plate bioartificial liver in treating fulminant hepatic failure. *J Surg Res* 2003;111:53-62
- Sosef MN, Abrahamse LS, van de Kerkhove MP, Hartman R, Chamuleau RA, van Gulik TM. Assessment of the AMC-bioartificial liver in the anhepatic pig. *Transplantation* 2002;73:204-209
- Sosef MN, Van De Kerkhove MP, Abrahamse SL, Levi MM, Chamuleau RA, Van Gulik TM. Blood coagulation in anhepatic pigs: effects of treatment with the AMC-bioartificial liver. *J Thromb Haemost* 2003;1:511-515
- Samuel D, Ichai P, Feray C, Saliba F, Azoulay D, Arulnaden JL, Debat P, Gigou M, Adam R, Bismuth A, Castaing D, Bismuth H. Neurological improvement during bioartificial liver sessions in patients with acute liver failure awaiting transplantation. *Transplantation* 2002;73:257-264
- Morsiani E, Pazzi P, Puviani AC, Brogli M, Valieri L, Gorini P, Scoletta P, Marangoni E, Ragazzi R, Azzena G, Frazzoli E, Di Luca D, Cassai E, Lombardi G, Cavallari A, Faenza S, Pasetto A, Girardis M, Jovine E, Pinna AD. Early experiences with a porcine hepatocyte-based bioartificial liver in acute hepatic failure patients. *Int J Artif Organs* 2002;25:192-202
- Calise F, Mancini A, Amoroso P, Belli A, Bracco A, Ceriello A, Di Florio E, Di Nicuolo G, Di Martino A, Maida P, Scala D, Zeuli L, Chamuleau RA. Functional evaluation of the AMC-BAL to be employed in a multicentric clinical trial for acute liver failure. *Transplant Proc* 2001;33:647-649
- Van de Kerkhove MP, Di Florio E, Scuderi V, Mancini A, Belli A, Bracco A, Dauri M, Tisone G, Di Nicuolo G, Amoroso P, Spadari A, Lombardi G, Hoekstra R, Calise F, Chamuleau RA. Phase I clinical trial with the AMC-bioartificial liver. *Int J Artif Organs* 2002;25:950-959
- Van de Kerkhove MP, Di Florio E, Scuderi V, Mancini A, Belli A, Bracco A, Scala D, Scala S, Zeuli L, Di Nicuolo G, Amoroso P, Calise F, Chamuleau RA. Bridging a patient with acute liver failure to liver transplantation by the AMC-bioartificial liver. *Cell Transplant* 2003;12:563-568
- Naruse K, Sakai Y, Natori T, Guo L, Shindoh J, Iida Y, Michishita K, Karasawa Y, Kojima K, Makuuchi M. Xenogeneic direct hemoperfusion using whole swine liver for liver failure in dogs. *J Surg Res* 2003;111:229-235
- Matsumita T, Amiot B, Hardin J, Platt JL, Nyberg SL. Membrane pore size impacts performance of a xenogeneic bioartificial liver. *Transplantation* 2003;76:1299-1305
- Nyberg SL, Yagi T, Matsumita T, Hardin J, Grande JP, Gibson LE, Platt JL. Membrane barrier of a porcine hepatocyte bioartificial liver. *Liver Transpl* 2003;9:298-305
- Schulte arn Esch J, Hamann D, Soltau M, Zante B, Jungbluth M, Sputeck A, Nierhaus A, Hillert C, Broering DC, Rogiers X. Human antibody deposition, complement activation, and DNA fragmentation are observed for porcine hepatocytes in a clinically applied bioartificial liver assist system. *Transplant Proc* 2002;34:2321
- Yamashita Y, Shimada M, Tsujita E, Rikimaru T, Ijima H, Nakazawa K, Sakiyama R, Fukuda J, Funatsu K, Sugimachi K. The efficacy of Nafamostat Mesilate on the performance of a hybrid-artificial liver using a polyurethane foam/porcine hepatocyte spheroid culture system in human plasma. *Int J Artif Organs* 2001;24:34-40
- Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, Chen SH, Ball S, Specht SM, Polejaeva IA, Monahan JA, Jobst PM, Sharma SB, Lamborn AE, Garst AS, Moore M, Demetris AJ, Rudert WA, Bottino R, Bertera S, Trucco M, Starzl TE, Dai Y, Ayares DL. Production of α 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 2003;299: 411-414
- Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. Production of α -1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 2002;295:1089-1092
- Irgang M, Sauer IM, Karlas A, Zeilinger K, Gerlach JC, Kurth R, Neuhaus P, Denner J. Porcine endogenous retroviruses: no infection in patients treated with a bioreactor based on porcine liver cells. *J Clin Virol* 2003;28:141-154
- Kuddus R, Patzer JF 2nd, Lopez R, Mazariegos GV, Meighen B, Kramer DJ, Rao AS. Clinical and laboratory evaluation of the safety of a bioartificial liver assist device for potential transmission of porcine endogenous retrovirus. *Transplantation* 2002;73:420-429
- Xu H, Sharma A, Okabe J, Cui C, Huang L, Wei YY, Wan H, Lei Y, Logan JS, Levy MF, Byrne GW. Serologic analysis of anti-porcine endogenous retroviruses immune responses in humans after ex vivo transgenic pig liver perfusion. *ASAIO J* 2003;49:407-416
- Fujita F, Yamashita-Futsuki I, Eguchi S, Kamohara Y, Fujioka H, Yanaga K, Furui J, Moriuchi R, Kanematsu T, Katamine S. Inactivation of porcine endogenous retrovirus by human serum as a function of complement activated through the classical pathway. *Hepatol Res* 2003;26:106-113
- McKane BW, Ramachandran S, Yang J, Xu XC, Mohanakumar T. Xenoreactive anti-Galalpha(1, 3)Gal antibodies prevent porcine endogenous retrovirus infection of human in vivo. *Hum Immunol* 2003;64:708-717
- Specke V, Rubant S, Denner J. Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses. *Virology* 2001;285:177-180
- Denner J, Specke V, Thiesen A, Karlas A, Kurth R. Genetic alterations of the long terminal repeat of an ecotropic porcine endogenous retrovirus during passage in human cells. *Virology* 2003;314:125-133
- Argaw T, Colon-Moran W, Wilson CA. Limited infection without evidence of replication by porcine endogenous retrovirus in guinea pigs. *J Gen Virol* 2004;85(Pt 1):15-19
- Scobie L, Taylor S, Wood JC, Suling KM, Quinn G, Meikle S, Patience C, Schuurman HJ, Onions DE. Absence of replication-competent human-tropic porcine endogenous retroviruses in the germ line DNA of inbred miniature Swine. *J Virol* 2004;78:2502-2509
- Wood JC, Quinn G, Suling KM, Oldmixon BA, Van Tine BA, Cina R, Arn S, Huang CA, Scobie L, Onions DE, Sachs DH, Schuurman HJ, Fishman JA, Patience C. Identification of exogenous forms of human-tropic porcine endogenous retrovirus in miniature swine. *J Virol* 2004;78:2494-2501