

人鼠嵌合肝研究进展

林 沪, 毛 青, 王宇明

林沪, 毛青, 王宇明, 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

林沪, 男, 1970-01-08, 重庆市人, 汉族, 1993 大学本科毕业, 中级职称, 主要从事肝病方面研究。

通讯作者: 林沪, 400038, 重庆市沙坪坝区高滩岩正街 30 号, 中国人民解放军第三军医大学西南医院感染病研究所. linhu7018@yahoo.com.cn

电话: 023-65399064 传真: 023-68754475

收稿日期: 2005-04-15 接受日期: 2005-04-27

摘要

人鼠嵌合肝动物模型的建立可为进一步研究病毒性、代谢性肝病的发病机制、治疗药物及疫苗开发提供新的技术手段, 具有良好的前景与发展意义。本文综述了人鼠嵌合肝相关内容, 包括该模型建立原理、移植细胞来源、建立途径与方法, 介绍了近期研究进展, 探讨了如何进一步提高移植细胞的增殖能力以延长生存时间这一重要课题。

关键词: 人鼠嵌合肝

林沪, 毛青, 王宇明. 人鼠嵌合肝研究进展. 世界华人消化杂志 2005;13(12): 1373-1376

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1373.asp>

0 引言

人鼠嵌合肝是利用人肝细胞异种移植到受体鼠肝内建立的新型动物模型。其受体可分为免疫缺陷小鼠^[1]或诱导免疫耐受大鼠^[2], 二者均能初步建立乙型肝炎病毒感染的人鼠嵌合肝动物模型。本文重点介绍人鼠嵌合肝在提高移植细胞增殖能力、延长生存时间上所做的改进。

1 人鼠嵌合肝建立原理

异种肝细胞移植到有免疫活性的动物体内会因宿主免疫系统的T淋巴细胞激活和迟发性超敏反应而排斥供体细胞, 为此可选用免疫缺陷小鼠, 或在正常免疫系统中诱导针对移植物特异耐受的大鼠。

1.1 免疫缺陷转基因小鼠 (1) uPA-RAG/2 杂交小鼠: 既有 Alb-uPA 基因的异常表达又不能正常表达 RAG-2 基因, 前者导致小鼠肝细胞进行性死亡, 后者导致小鼠体内不能形成成熟的 T 细胞及 B 细胞, 因而处于免疫缺陷状态。Dandri *et al*^[3]报道将成人肝细胞植入 uPA/RAG-2 转基因小鼠脾脏内, 植入的成人肝细胞经血液循环进入肝脏生长, 其数量占小鼠肝细胞的 15%, 形成人鼠嵌合肝。小鼠血清中检测到人白蛋白, 这是高度

分化的正常成人肝细胞成功植入异种动物肝内的首次报道。(2) SCID-Alb-uPA 小鼠: Mercer *et al*^[1]在肾包膜下建立的人鼠嵌合肝动物模型。Alb-uPA 转基因鼠和严重联合免疫缺陷小鼠杂交后, 把人肝细胞移植到纯合子 Alb-uPA 的杂交鼠中所建立的嵌合肝, 人肝细胞数量在小鼠肝内重构可达 50% 以上。该嵌合体作为第一个适合于研究丙型肝炎病毒 (HCV) 体内感染的小鼠模型, 可反映 HCV 自然感染的全过程。但免疫缺陷小鼠杂交的紊乱及新生 SCID 小鼠较高的死亡率, 使其操作较困难^[4]。因免疫系统在肝炎病毒的发病机制中占重要地位, 故免疫缺陷鼠不能用于免疫机制的研究, 从而无法研究有效疫苗^[5]。

1.2 诱导免疫耐受大鼠 动物在胚胎发育时期接触到外来抗原, 会逐渐对这些抗原产生耐受。因此, 先用人胎肝细胞诱导胎鼠对人肝细胞产生免疫耐受, 再把人肝细胞移植到正常大鼠肝内, 从而建立针对移植物耐受的动物模型^[6]。Ouyang *et al*^[7]采用大鼠宫内胚胎腹腔注射人胎肝细胞, 出生 24 h 内经脾移植人胎肝细胞, 首次建立了人鼠嵌合肝模型。在移植后的 16 wk 发现人白蛋白基因, 人白蛋白阳性持续 6 wk。国内蒋黎 *et al*^[8]采用类似的方法也成功建立人鼠嵌合肝, 人胎肝细胞在鼠肝内最长存活至 12 wk。构建在正常免疫系统基础上的动物模型, 能够模拟病毒感染的全过程, 为研究发病机制、抗病毒治疗和开发疫苗提供了新的方法。

2 移植细胞来源

2.1 胚胎肝细胞 通过肝细胞移植模型发现, 成年肝细胞可呈克隆样生长, 显示为功能性干细胞, 成年肝细胞自身的复制通常发生在肝脏受到中度损伤时, 但只能进行一到两个周期的复制。与成年肝细胞相比, 胚胎肝细胞具有较高的增殖能力、低的免疫原性和更能抵抗低温贮存导致的损伤等优点, 对胰岛素、胰高血糖素以及表皮生长因子诱导的增殖反应更敏感^[9], 故目前建立人鼠嵌合肝动物模型多采用胚胎肝细胞移植。

2.2 干细胞 根据来源不同, 干细胞分为肝组织来源和非肝组织来源两种。前者如卵圆细胞, 可分化为肝细胞和胆管上皮细胞; 后者如胚胎干细胞和骨髓干细胞 (包括造血干细胞和基质干细胞) 等, 在特定条件

下均可转化成肝细胞. 在宿主持续性损伤或内源性肝细胞增殖受到干扰条件下, 肝细胞和干细胞均能增殖, 而只有干细胞能在正常肝脏内增殖^[10]. 干细胞既有很强的增生性, 又可分化成肝细胞, 是肝细胞移植的最理想细胞^[11]. 外源性基因导入干细胞较成年肝细胞容易, 经基因工程改造的肝细胞可用于纠正某些肝代谢缺陷疾病. 干细胞为移植肝细胞的增殖提供了新的思路, 其定向分化过程中的基因表达已成为近期相关研究的热点^[12].

2.3 永生化肝细胞 胚胎期干细胞及生理、病理状态下的某些体细胞(来自成体的干细胞)及肿瘤细胞, 由于具有强大的增殖或分化能力, 广义上都属于永生化细胞的范畴. 近2 a研究表明, 基因修饰所获得的永生化肝细胞可有效解决肝细胞增殖的问题, 但由于具备癌基因的表达, 其作用机制为肿瘤细胞逃避免疫监视、抗凋亡及摆脱正常的细胞周期, 以达无限增殖, 因此安全性受到置疑^[13].

3 建立的途径与方法

3.1 脾内移植 脾内肝细胞移植为效果比较确切的方法. 来自门脉血的丰富的营养物质, 尤其是脾红髓的网状组织结构, 有利于细胞间的相互作用, 同时具有诱导免疫耐受的作用. 肝细胞脾内植入后, 可表达出白蛋白、胆汁的代谢和酶的功能. Gupta *et al*^[14]运用¹¹¹In标记法来检测移植于脾内的肝细胞在体内的分布, 结果发现 $55 \pm 7\%$ 的移植肝细胞于移植后 48 h 内转运到宿主肝脏, 仍保证正常功能和长期存活, 脾内只剩下约 $15 \pm 3\%$ 的肝细胞, 肺约有 3%, 胰 1%.

3.2 门静脉移植 肝内微循环和门脉血中的营养成分, 对移植的肝细胞有益, 但植入的肝细胞可能阻碍受体肝的血液供应, 引起肝梗塞和坏死, 限制了移植的肝细胞数量. 对此有人提出重复门脉内移植, 既增加植入细胞数量, 又可降低并发症, 实验表明多次输注优于单次. 但与脾内移植相比, 操作较复杂.

3.3 腹腔移植 技术简单, 营养和代谢产物交换面积大, 但植入的异种肝细胞炎症反应和细菌感染的可能性大, 易引起腹膜炎和腹腔粘连.

此外, 肾包膜下、皮下、肌肉、胰腺、肺等均可代谢支持, 但不如脾内移植优越.

4 提高移植细胞比例及存活时间

如何进一步提高移植细胞在嵌合肝中的比例, 延长生存时间, 是目前人鼠嵌合肝应用于肝病研究要解决的重要课题.

4.1 提高移植细胞冻存复苏后的数量和活性 使用冻存复苏的肝细胞, 要求降低对移植肝细胞的影响和破

坏, 提高人胎肝细胞冻存复苏后的数量和活性.

冻存复苏的原则是缓慢冻存、快速复温. 为降低冻存和复苏过程对移植肝细胞的影响和破坏, 冻存细胞时应用合适的浓度, 一般认为 $(2-4) \times 10^9$ 个细胞/L 是比较适中; 在冻存前后, 在具有丰富的基质和生长因子的培养基中修复细胞膜, 以提高复苏后细胞的活率; 且最好采用电脑程控程序性降温进行肝细胞冻存. 此外, 冻存前将肝细胞黏附于微载体以避免贴壁, 或采用三维凝胶包绕肝细胞和球体细胞培养技术等均可提高人胎肝细胞冻存复苏后的数量和活性^[15]. 将肝细胞与其他类型如骨髓细胞、胰岛或肝非实质细胞等共同培养也可提高其存活力, 但存在再次分离肝细胞的问题.

4.2 增加接种的次數和浓度 脾内移植的肝细胞数量因动物的不同而异, 一般认为, 小鼠为 10^6 级, 大鼠为 10^7 级, 大的哺乳动物如狗为 10^9 级^[16]. 移植肝细胞植入过多可引起肝功能损害、器官的栓塞和移植细胞的存活率降低, 所以肝细胞移植量问题一直在探索中. Wu *et al*^[17]用 200 μ L 含 2×10^6 个细胞的人胎肝细胞培养液经脾内注射免疫耐受大鼠, 在大鼠肝内存活 16 wk, 人白蛋白持续 6 wk 左右. 国内相同方法存活只有 12 wk, 提示移植的肝细胞存活时间较短, 数量也不多.

目前认为, 移植肝细胞较大量沉积在鼠肝窦内是安全的, 大量肝细胞进入肝窦只导致暂时性门静脉高压. Rajvanshi *et al*^[18]一次经脾移植 1×10^6 个细胞, 约占受体肝细胞总量的 10-15%, 没有对受体产生不良影响, 经过比较发现, 在受体肝脏中存活的移植肝细胞随移植量的增加而增加; 在此基础上, 分 3 次将总量达 1.75×10^8 个肝细胞移植入大鼠脾内, 移植细胞量达宿主肝细胞量的 15% 以上, 结果显示并没有影响移植肝细胞的功能和与宿主肝实质的结合, 这样既增加了移植肝细胞量, 又减少了因一次大量移植而产生并发症的可能性.

4.3 诱导移植细胞增殖 移植细胞在受体肝内的增殖是其发挥功能的关键. 肝细胞增殖发生于整个成熟的细胞群, 包括肝细胞、胆管上皮细胞等实质细胞, 也包括肝非实质细胞的支持. 移植肝细胞通过质膜结构重建与宿主肝实质发生整合, 其间和之后的增殖过程包含了基因表达在内的复杂的生物学机制. 在大鼠肝的微环境中, 缺乏肝移植细胞生长的各种激素和生长因子以及提供肝细胞增殖的人肝非实质细胞的细胞构架, 宿主肝细胞的增殖将优先于移植肝细胞, 使移植的肝细胞很难具备强大的增殖能力.

如果给予外源性生长刺激, 可诱导肝细胞增殖^[19]: (1) 手术, 如 2/3 肝切除、门腔静脉分流或再灌注损伤; (2) 联合细胞移植, 如肝细胞、胰岛细胞联合

移植,胰岛的局部向肝因素对肝细胞直接刺激,促进肝细胞生长;(3)应用外源性激素、生长因子,如胰岛素、甲状腺素作为有丝分裂原可促进肝细胞有丝信号的活化,肝细胞生长因子(HGF)、上皮生长因子(EGF)等均能促进肝细胞增殖;(4)转基因肝细胞移植:重复注射Fas抗体诱导宿主肝细胞凋亡,同时移植包含抗凋亡基因bc12的肝细胞;(5)化学性肝损伤:四氯化碳、烯丙醇等的肝毒性作用。

再生刺激可使移植细胞加速增殖,但对宿主细胞同样有作用。若首先抑制受体细胞增殖,随后给予上述刺激信号,则能显著提高移植细胞的增殖能力。目前较多采用倒千里光碱、野百合碱等生物碱、2-乙酰氨基苄(2-AAF)、丝裂霉素和放射线等^[12, 20],以倒千里光碱与2/3肝切除术联合应用为最多,在采取此措施后1-2 mo,移植肝细胞及后代细胞在受体肝内可多达90%。研究表明,经脾注射大量移植肝细胞(1×10^8 以上)、肝细胞的多次移植或者移植前诱导肝毒性等方法,与注射倒千里光碱相比肝细胞增殖均显得轻微。倒千里光碱强烈而持续阻断宿主肝细胞增殖的细胞周期,促进了移植肝细胞的选择性生长,其具体机制尚不清楚^[21]。

为了解移植肝细胞整合与相互作用机制,Koenig *et al*^[22]注射倒千里光碱与30%肝切除术联合进行,成年肝细胞通过门静脉注入,发现移植2 mo后移植肝细胞占宿主肝的37%以上,移植细胞在穿过内皮层时失去其细胞膜缝隙连接(连接蛋白32),移植细胞成功整合需要5 d以上,意味着缝隙连接的重构,连接蛋白32的表达可作为移植肝细胞有效整合的一个指标。

Laconi *et al*^[23]发现在外源性生长刺激如部分肝切除缺乏下,仅给予倒千里光碱处理,将倒千里光碱处理与移植肝细胞之间间隔由原来的4 wk缩短为2 wk,结果移植肝细胞增殖提高,2 mo时增殖细胞约占40%,1 a占95%以上,说明倒千里光碱处理与移植肝细胞的间隔时间是影响该模型增殖范围的关键因素;倒千里光碱的毒性包括肝细胞坏死,并未对肝细胞增殖造成影响,为倒千里光碱在移植肝细胞的有效增殖和临床应用提供了依据。

4.4 肝干细胞移植 研究认为,移植细胞要大量增殖,必须满足2个条件:宿主细胞增殖受到抑制;移植细胞有更强的生长优势。因此,目前永生化细胞株和肝干细胞成为关注的热点^[24]。胚胎干细胞已成功分离和移植,增殖后可达正常肝的10%以上,但难以分离纯化^[25]。

Shafritz *et al*^[10]报道大鼠行2/3部分肝切除后移植成年肝细胞,只在移植后2-4 wk产生轻微增殖,没有形成胆管结构;相同条件下移植胚胎干细胞,移植后2-6 mo持续增殖,可达10%以上,大

多数增殖细胞群中包含肝细胞和胆管。该实验显示了干细胞的3个主要特性:多系分化潜能、扩展期的增殖和长期的组织再生能力。在此基础上,给予倒千里光碱预处理,胚胎干细胞6 mo后可形成大量多小叶结构,广泛增殖达60-80%^[26],说明干细胞的增殖也需要选择性生长刺激。

成人骨髓包含能向干细胞分化的亚群,但骨髓细胞替代肝细胞是一个缓慢的过程,如果不给予选择性生长刺激,产生的肝细胞极少^[27]。Di Campli *et al*^[28]在无辐射条件下,用烯丙醇诱导NOD/SCID小鼠肝损伤,腹膜内直接灌注脐带血干细胞,结果干细胞能转化为肝细胞,提高肝增殖可达30%以上,证明腹膜内直接灌注干细胞能保证快速的肝细胞移植。

由p19(ARF)裸鼠分离的原代永生化肝细胞,即MIM细胞,就是利用缺失p19基因以降低p53抑制生长功能和避免细胞衰老的机制达到永生化。Mikula *et al*^[13]将MIM细胞经脾移植入Fas介导肝损伤的SCID小鼠体内,显示其能抵抗Fas介导的凋亡,表现为局限的小群落,分化为胆管细胞和表达有胚胎肝细胞与卵圆细胞标记的细胞,证明长期培养的p19(ARF)裸鼠肝细胞在肝恢复期能分化为肝祖细胞,表现出重构肝的活性。各种基因修饰方法可用于构建永生化肝细胞,但由于几乎无法控制可靠的肝基因表达程序及避免恶性化,使其应用受限。

总之,不断完善人鼠嵌合肝,提高移植细胞的增殖能力,延长生存时间,从理论和实践中都能够证明人鼠嵌合肝动物模型的应用前景。人鼠嵌合肝的成功建立,对肝脏细胞生物学理论的发展具有重大的推动作用,为异种肝细胞移植用于治疗重型肝炎肝衰竭患者提供了理论基础,为进一步研究各类肝病的发病机制、指导临床治疗提供了新的方法和途径。

5 参考文献

- 1 Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A, Addison WR, Fischer KP, Churchill TA, Lakey JR, Tyrrell DL, Kneteman NM. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 2001;7:927-933
- 2 Wu CH, Ouyang EC, Walton CM, Wu GY. Human hepatocytes transplanted into genetically immunocompetent rats are susceptible to infection by hepatitis B virus in situ. *J Viral Hepat* 2001;8:111-119
- 3 Dandri M, Burda MR, Torok E, Pollok JM, Iwanska A, Sommer G, Rogiers X, Rogler CE, Gupta S, Will H, Greten H, Petersen J. Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and In vivo infection with hepatitis B virus. *Hepatology* 2001;33:981-988
- 4 Brass V, Blum HE, Moradpour D. Of mice and men: a small animal model of hepatitis C virus replication. *Hepatology* 2002;35:722-724
- 5 Zhu Y, Yamamoto T, Cullen J, Saputelli J, Aldrich CE, Miller DS, Litwin S, Furman PA, Jilbert AR, Mason WS. Kinetics of Hepadnavirus loss from the liver during inhibition of viral DNA synthesis. *J Virol* 2001;75:311-322

- 6 Wu CH, Ouyang EC, Walton C, Wu GY. Liver cell transplantation-novel animal model for human hepatic viral infections. *Croat Med J* 2001;42:446-450
- 7 Ouyang EC, Wu CH, Walton C, Promrat K, Wu GY. Transplantation of human hepatocytes into tolerized genetically immunocompetent rats. *World J Gastroenterol* 2001;7:324-330
- 8 蒋黎, 毛青, 王宇明, 李俊刚, 刘俊. HBV 感染的人鼠嵌合肝动物模型的建立. 第三军医大学学报 2003;25:38
- 9 周晓东, 余丽君. 肝细胞移植的细胞来源与适应证. 中华肝病杂志 2003;11:368
- 10 Shafritz DA, Dabeva MD. Liver stem cells and model systems for liver repopulation. *J Hepatol* 2002;36:552-564
- 11 Di Campli C, Nestola M, Piscaglia AC, Santoliquido A, Gasbarrini G, Pola P, Gasbarrini A. Cell-based therapy for liver diseases. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2003;7:41-44
- 12 Fandrich F, Ruhnke M. Stem cells and liver replacement. *Med Klin (Munich)* 2003;98(Suppl 2):18-22
- 13 Mikula M, Fuchs E, Huber H, Beug H, Schulte-Hermann R, Mikulits W. Immortalized p19ARF null hepatocytes restore liver injury and generate hepatic progenitors after transplantation. *Hepatology* 2004;39:628-634
- 14 Gupta S, Lee CD, Vemuru RP, Bhargava KK. ¹¹¹Indium labeling of hepatocytes for analysis of short-term biodistribution of transplanted cells. *Hepatology* 1994;19:750-757
- 15 Selden C, Hodgson H. Cellular therapies for liver replacement. *Transpl Immunol* 2004;12:273-288
- 16 姜涛, 张雪林. 经脾肝细胞移植的研究进展. 肝脏 2003;8:56-59
- 17 Wu CH, Ouyang EC, Walton C, Promrat K, Forouhar F, Wu GY. Hepatitis B virus infection of transplanted human hepatocytes causes a biochemical and histological hepatitis in immunocompetent rats. *World J Gastroenterol* 2003;9:978-983
- 18 Rajvanshi P, Kerr A, Bhargava KK, Burk RD, Gupta S. Efficacy and safety of repeated hepatocyte transplantation for significant liver repopulation in rodents. *Gastroenterology* 1999;111:1092-1102
- 19 Guha C, Deb NJ, Sappal BS, Ghosh SS, Roy-Chowdhury N, Roy-Chowdhury J. Amplification of engrafted hepatocytes by preparative manipulation of the host liver. *Artif Organs* 2001;25:522-528
- 20 Witek RP, Fisher SH, Petersen BE. Monocrotaline, an alternative to retrorsine-based hepatocyte transplantation in rodents. *Cell Transplant* 2005;14:41-47
- 21 Laconi E, Laconi S. Principles of hepatocyte repopulation. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:433-438
- 22 Koenig S, Stoesser C, Krause P, Becker H, Markus PM. Liver repopulation after hepatocellular transplantation: integration and interaction of transplanted hepatocytes in the host. *Cell Transplant* 2005;14:31-40
- 23 Laconi S, Pillai S, Porcu PP, Shafritz DA, Pani P, Laconi E. Massive liver replacement by transplanted hepatocytes in the absence of exogenous growth stimuli in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol* 2001;158:771-777
- 24 Oertel M, Rosencrantz R, Chen YQ, Thota PN, Sandhu JS, Dabeva MD, Pacchia AL, Adelson ME, Dougherty JP, Shafritz DA. Repopulation of rat liver by fetal hepatoblasts and adult hepatocytes transduced ex vivo with lentiviral vectors. *Hepatology* 2003;37:994-1005
- 25 Dabeva MD, Shafritz DA. Hepatic stem cells and liver repopulation. *Semin Liver Dis* 2003;23:349-362
- 26 Sandhu JS, Petkov PM, Dabeva MD, Shafritz DA. Stem cell properties and repopulation of the rat liver by fetal liver epithelial progenitor cells. *Am J Pathol* 2001;159:1323-1334
- 27 Wang X, Montini E, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M. Kinetics of liver repopulation after bone marrow transplantation. *Am J Pathol* 2002;161:565-574
- 28 Di Campli C, Piscaglia AC, Pierelli L, Rutella S, Bonanno G, Alison MR, Mariotti A, Vecchio FM, Nestola M, Monego G, Michetti F, Mancuso S, Pola P, Leone G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. A human umbilical cord stem cell rescue therapy in a murine model of toxic liver injury. *Dig Liver Dis* 2004;36:603-613

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志 2005 年由月刊改为半月刊

本刊讯 中国科技期刊引证报告(2003 年版): 2002 年度世界华人消化杂志总被引频次 4151, 影响因子 1.926, 即年指标 0.424, 他引总引比 0.45, 引用刊数 173, 扩散因子 4.2, 被引半衰期 2.99, 地区分布数 26, 机构数 138, 国际论文比 0.03, 基金论文比 0.27. 2002 年度各学科影响因子较高的 3 种期刊排名: 世界华人消化杂志影响因子 1.926, 临床医学排名第 2 位. 2002 年度总被引频次较高的 20 种期刊排名: 世界华人消化杂志总被引频次 4151, 排名第 1 位. 世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004 年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊, 2001 年度第一届中国百种杰出学术期刊, 2003 年度中国百种杰出学术期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录. 为适应我国消化病学专业基础与临床研究的快速发展, 从 2005 年开始, 世界华人消化杂志将由月刊改为半月刊, 大 16 开, 160 页, 每月 15, 28 日出版, 24 元/期, 全年 24 期, 邮发代号 82-262, 北京报刊发行局发行. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)