

# 世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

**Shijie Huaren Xiaohua Zazhi**

**2005 年 7 月 28 日 第 13 卷 第 14 期 (Volume 13 Number 14)**



**14/2005**

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊,  
2003年百种中国杰出学术期刊,

《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.

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.

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2005 年 7 月 28 日 第 13 卷 第 14 期 (总第142期)

述 评	1645 进一步加强慢性肝炎、肝纤维化治疗研究 姚希贤, 崔东来 1650 胃肠道生理功能的再认识与肠衰竭 丁连安, 黎介寿
胃 癌	1652 AGS细胞系中12-LOX的表达及其抑制剂对细胞增殖的影响 黄彩云, 陈丰霖, 李建英, 陈治新, 王小众
肝 癌	1658 Maxizyme对肝癌突变抑癌基因p53的抑制作用 李岩, 林菊生, 孔心涓 1663 肝癌组织中TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 1R II和NF- $\kappa$ B的表达 缪林, 张锁林, 季国忠, 范志宁, 刘政, 张平, 杨春 1667 肝细胞癌组织和外周血中肿瘤/睾丸抗原SSX-2和SSX-5的表达 吴力群, 王新建, 张斌, 卢云, 杨金镛 1673 肝细胞肝癌患者肿瘤/睾丸抗原SSX-1及NY-ESO-1mRNA的表达意义 吴力群, 王新建, 卢云, 张斌, 杨金镛 1679 重组人内皮抑素真核表达载体pCD-sEndo的构建和表达 邵俊伟, 刘然义, 易继林, 卢绮萍, 黄文林 1684 蛋白质芯片飞行质谱技术检测体外培养的肝癌细胞株与转染HBV的肝癌细胞株蛋白质的差异表达 丁守怡, 钱冬萌, 闫志勇, 宋旭霞, 牟文凤, 王斌
病毒性肝炎	1688 酵母双杂交技术筛选白细胞cDNA文库中新基因NS2TP蛋白结合蛋白基因 张黎颖, 成军, 邓红, 郭江, 郭风劲, 王巧侠 1692 抗HBV多聚酶TP区VH抗体体外可抑制HBV复制 于俊岩, 兰林, 王宇明, 丁世涛 1696 黑龙江地区乙型肝炎病毒耐药变异与基因型 李迪, 张淑云, 谷鸿喜, 程险峰, 王晓燕 1700 丙型肝炎病毒非结构蛋白2反式调节基因NS2TP的克隆化 张黎颖, 成军, 邓红, 刘妍, 王琳
基础研究	1705 苷脱氨酶基因对小鼠大剂量化疗的保护作用 路平, 王永来, 金锋, 陈波, 姚凡, 王舒宝, 陈峻青, 徐惠绵, 赵实诚 1713 三氧化二砷注射液对胰腺癌细胞系PC-3的体外作用 刘静冰, 秦叔逵, 李进 1717 消炎痛和阿斯匹林对C57BL/6和Balb/c小鼠胃酸分泌的效应 王昌成 1721 $^{103}\text{Pd}$ 诱导犬胆管增殖平滑肌细胞凋亡及对相关基因的影响 何贵金, 吴荣, 高沁怡, 许书河, 高红, 姜维国, 蒋涛, 戴显伟, 马凯
文献综述	1725 热休克蛋白家族与肝癌的关系 吴顺华, 成军, 郑玉建 1731 HCV的基因型及其变异与肝细胞癌的关系 韩苏夏, 刘正稳, 马瑾璐 1734 移植肝细胞基因调控研究 林勇, 曾欣 1737 三氧化二砷治疗肝癌的分子机制 吴顺华, 成军, 郑玉建 1744 丁酸钠抗肿瘤作用的新进展 崔路佳, 高善玲, 裴风华 1747 聚乙二醇 $\alpha$ -干扰素治疗慢性乙型肝炎的研究进展 周平, 谢仁江 1750 人类免疫缺陷病毒与黏膜免疫 杨贵波, 邵一鸣
研究快报	1760 胰腺外分泌功能研究大鼠模型的建立 陈小燕, 李兆申, 屠振兴, 曹晓鹏 1762 乳杆菌细胞壁表面黏附相关蛋白的提取和鉴定 王斌, 魏泓 1766 幽门螺杆菌和促胃液素在胃癌前病变中的作用 郑宗茂, 吴灵飞, 冯家琳, 李国平, 王炳周 1768 表皮生长因子及其受体mRNA在胃溃疡发生与愈合过程中的表达 谭永港, 舒晴, 邱猛进, 张永锋 1770 巢式PCR-RFLP法对湖南省乙型肝炎病毒Bj和Ba基因亚型的初步鉴定 温志立, 谭德明, 杨铁一, 徐铿 1773 阿霉素对胃癌细胞内游离 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的影响 邢承忠, 路平, 郭晓临, 刘瑾, 徐惠绵, 袁媛 1776 BALB/C小鼠炎症性肠病动物模型建立方法探讨 刘敬军, 郑长青, 潘丽丽, 闻英, 胡刚正

临床经验	1779 社会因素对老年人群幽门螺杆菌感染的影响 张玫, 汤哲, 汤欣, 蔡玲, 牛小羽, 孙书春 1781 口服药物致食管溃疡22例 王孟春, 张丽瑶, 钟琳琳 1782 经内镜乳头括约肌预切开术在困难ERCP中的应用 王庆, 秦明放, 勾承月, 李宁, 王震宇, 邹富胜 1785 肠镜检查肠道准备无效率的影响因素 蔡文智, 智发朝, 李凤伶, 陈秀云, 姜泊 1787 中国人与非洲黑人 <i>H. pylori</i> 相关胃十二指肠疾病发生情况比较及分析 廖常奎, Geojanna GA 1790 大肠癌术后时辰化疗联合中医时间医学治疗的临床研究 张思奋, 罗湛滨, 吴文江, 何晶, 范小华 1792 幽默疗法辅助治疗慢性萎缩性胃炎53例 阮鹏, 阮浩然 1794 肝炎肝硬化患者血清IL-10、IL-18水平及意义 谭永港, 刘俊, 丁世华, 刘新民 1797 暴发性胰腺炎时腹腔室隔综合征的联合治疗40例 孙早喜, 孙诚谊
致 谢	1800 致谢世界华人消化杂志编委
封面故事	1652 AGS细胞系中12-LOX的表达及其抑制剂对细胞增殖的影响 黄彩云, 陈丰霖, 李建英, 陈治新, 王小众 世界华人消化杂志 2005;13(14):1652-1657 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v13/i14/1652.htm">http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v13/i14/1652.htm</a>
国际会议	13th United European Gastroenterology Week, UEGW October 15-20, 2005  American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting October 28-November 2, 2005  ISGCON 2005 November 11-15, 2005 <a href="mailto:isgcon2005@yahoo.co.in">isgcon2005@yahoo.co.in</a> <a href="http://www.isgcon2005.com">isgcon2005.com</a>  Advanced Capsule Endoscopy Users Course November 18-19, 2005 <a href="http://www.asge.org/education">www.asge.org/education</a>  II Latvian Gastroenterology Congress November 29, 2005 <a href="mailto:gec@stradini.lv">gec@stradini.lv</a> <a href="http://www.gastroenterologs.lv">www.gastroenterologs.lv</a>  2005 CCFA National Research and Clinical Conference - 4th Annual Advances in the Inflammatory Bowel Diseases December 1-3, 2005 <a href="mailto:c.chase@imedex.com">c.chase@imedex.com</a> <a href="http://www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm">www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm</a>  10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus February 22-25, 2006 <a href="mailto:isde@sapmea.asn.au">isde@sapmea.asn.au</a> <a href="http://www.isde.net">www.isde.net</a>

<div>世界华人消化杂志</div> <div>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</div> <div>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (半月刊)  创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2005-07-28 原刊名 新消化病学杂志</div> <div>名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生 编辑部主任 张海宁 中文编辑 潘伯荣 张海宁 英文编辑 张海宁 排版校对 张敏 张勇 李琪</div>	<div>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 出版 世界胃肠病学杂志社 100023, 北京市2345信箱 E-mail: <a href="mailto:wjgd@wjgnet.com">wjgd@wjgnet.com</a> <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a> 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893 印刷 北京科信印刷厂 发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱) 订购 全国各地邮电局 邮购 世界胃肠病学杂志社发行部 (100023, 北京市2345信箱) 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893</div>	<div>世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 2003年百种中国杰出学术期刊, 《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. 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.</div> <div>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</div> <div>2005年版权归世界胃肠病学杂志社所有</div>
--	---	---

ISSN 1009-3079	邮发代号	国外代号	国内定价	广告经营许可证
CN 14-1260/R	82-262	M 4481	每期24.00元 全年576.00元	1401004000050

[www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com)

# 移植肝细胞基因调控研究

林勇, 曾欣

林勇, 曾欣, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院消化内科  
上海市 200003  
国家自然科学基金资助项目, No. 30200122, No. 30400205  
上海市自然科学基金资助项目, No. 04ZR14004  
上海高校优秀青年教师后备人选基金资助项目, No. 03YQHB112  
通讯作者: 林勇, 200003, 上海市凤阳路 415 号, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院消化内科, linyongmd@yahoo.com.cn  
电话: 021-63610109-73255 传真: 021-63520020  
收稿日期: 2005-05-17 接受日期: 2005-05-30

## 摘要

随着基因工程和基因治疗方法的不断更新, 肝细胞移植技术在基础研究和临床应用中已取得很大进展, 特别是利用基因调控手段提高移植肝细胞增殖能力、改善移植肝细胞分化水平以及调控移植肝细胞特异性功能基因表达, 为肝细胞移植的进一步应用展示了广阔的前景. 通过对移植肝细胞某些特定靶基因表达的调控, 将有可能培养出抗排斥能力强、存活时间长、功能作用全的“超级肝细胞”(super hepatocyte), 上述研究的开展对于急慢性肝病、肝纤维化、肝脏功能基因缺陷性疾病等的治疗具有重要意义, 并将成为肝病细胞移植治疗研究的重要领域.

林勇, 曾欣. 移植肝细胞基因调控研究. 世界华人消化杂志 2005;13(14): 1734-1736  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1734.asp>

## 0 引言

近 20 a 来, 一系列基础与临床研究证实: 利用肝细胞移植 (hepatocyte transplantation, HCT) 技术将各种类型移植肝细胞, 包括正常成熟肝细胞、不同发育阶段肝细胞、肝潜能细胞、修饰型肝细胞移植于急慢性肝功能衰竭及肝脏功能基因缺陷性疾病受体体内, 可以使之定居、增殖, 并能重建肝组织结构及维持主要肝功能. 相对于原位肝移植的供体缺乏、治疗代价高等不足, HCT 具有很好的临床应用前景. 但目前乃至今后 HCT 面临的最大挑战就是如何提高供体肝细胞在体、内外的增殖能力和分化水平, 特别是维持其在受体内的增殖能力和生物学活性, 以改善 HCT 的治疗效果. 目前, 人类基因组计划 (human genome project) 的完成和后基因组学的研究为 HCT 的进一步发展创造了条件, 许多学者在基因水平开展了移植肝细胞的调控研究, 通过调控移植肝细胞某些功能基因的表达, 培养出抗排斥能力强、存活时间长、功能作用全的“超级肝细胞”(super hepatocyte)<sup>[1-2]</sup>. 我们先后在数项国家级和上海市基金的资助下, 系统开展了移植肝细胞增殖、分化以及生物学功能活性的基因调控研究. 一系列的结果证实, 通过调控移植肝细胞某些重

要基因的表达可有效改善移植肝细胞各种生物学活性, 是 HCT 研究的重要领域之一.

目前, 有关移植肝细胞基因调控研究主要关注以下三个方面: (1) 提高移植肝细胞增殖能力; (2) 改善移植肝细胞分化水平; (3) 调控特异性功能基因表达.

## 1 提高移植肝细胞增殖能力

维持移植肝细胞在体内、外的增殖能力, 对提高其功能活性和 HCT 治疗效果有极其重要的意义. 一些研究通过调控细胞周期基因表达或外源导入增殖基因和抗凋亡基因以改善移植肝细胞的增殖能力. p27<sup>Kip1</sup> 基因表达产物可下调细胞周期素 E 及细胞周期素依赖性激酶 CDK 2 的活性, 使细胞停滞在 G1 期, 增殖受到抑制. Karnezis *et al*<sup>[3]</sup> 发现 p27<sup>Kip1</sup> 基因敲除的小鼠肝细胞 DNA 合成能力较野生型提高 5 倍; 通过脾脏注射将此类肝细胞移植于肝纤维化小鼠, 移植肝细胞增殖数量明显增加, 小鼠平均生存期由野生型肝细胞移植组的 35 d 提高至 57.5 d, 2 mo 的生存率提高近 5 倍. SV40T 抗原基因是用于调控移植肝细胞增殖的重要外源目的基因之一, 其诱导细胞增殖的作用可能与抑制抑癌基因 p53 和 Rb 的表达有关<sup>[4]</sup>. Cai *et al*<sup>[5-6]</sup> 将 SV40T 抗原基因片段整合入移植肝细胞基因组内, 同时在 SV40T 抗原基因片段侧翼设计了 LoxP 重组位点, 使该片段可被外源表达的 Cre 重组酶去除. SV40T 抗原修饰后的移植肝细胞增殖能力明显增强, 每隔 48 h 细胞数目增加 1 倍, 且细胞形态和功能均具有成熟分化肝细胞的特点; 由于移植肝细胞基因组中的 SV40T 抗原片段随时可被外源 Cre 重组酶切除, 移植肝细胞的生长可被人为控制, 并且能回复到永生代前的状态, 避免了 HCT 治疗过程中肝细胞永生代趋势和成瘤危险. Kobayashi *et al*<sup>[4]</sup> 将上述基因修饰过的移植肝细胞经脾内注射治疗肝切除致急性肝功能衰竭大鼠, 发现大鼠生存率提高 60%, 生存时间由对照组的不足 5 d 延长至 30 d; 肝功能明显好转; 病理解剖和免疫组化显示肝残余尾状叶增大, 肝细胞再生明显. 利用逆转录病毒将 SV40T 抗原基因与单纯疱疹病毒胸苷激酶基因片段同时整合入细胞构建回复性永生代肝细胞株, 如肝细胞株 OUMS-29/tk, 能人为调控肝细胞增殖能力和永生代表现<sup>[7]</sup>. Werner *et al*<sup>[8]</sup> 通过脂质体介导转染白蛋白启动子调控的反义序列来抑制细胞周期负性调节蛋白 Rb 和 P53, 同时共转染表达细胞转录因子 E2F 和细胞周期蛋白 D1 基因的质粒, 建立增殖能力很强的人肝细胞株 HepZ. 端粒和端粒酶与细胞的增殖关系密切, 上调

肝细胞端粒酶催化亚单位-端粒酶逆转录酶(hTERT)表达能促进细胞生长, 抑制细胞凋亡. Wege *et al*<sup>[9]</sup>利用逆转录病毒载体将hTERT基因导入人胎肝细胞构建HF-hTERT肝细胞株, 用于HCT治疗, 体内、外研究证实能明显提高移植肝细胞增殖水平、功能活性以及HCT治疗效果.

移植肝细胞的凋亡是影响供体肝细胞增殖与存活的重要因素之一, 通过基因调控促进移植肝细胞抗凋亡基因的表达是增强HCT治疗效果的重要方法. Song *et al*<sup>[10]</sup>将*bcl-2*基因外源导入移植肝细胞, 发现基因调控后移植肝细胞抗凋亡能力明显增强, caspase-3活性同时受到抑制. 肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是肝细胞的强效促分裂剂, 对维持肝细胞的增殖有重要作用. Lee *et al*<sup>[11]</sup>将HGF基因导入大鼠移植肝细胞, 24 h HGF的分泌可达5-10 ng/10<sup>6</sup>细胞; 将HGF修饰的供体肝细胞移植于大鼠脾脏, 肝细胞数量及功能均得到明显改善.

随着基因工程技术的日臻成熟, 进一步调控移植肝细胞增殖相关基因的表达, 可改善其功能活性, 使基因修饰后的肝细胞存活时间延长、生物学特性更接近体内正常细胞, 能更广泛的应用于HCT基础和临床研究.

## 2 改善移植肝细胞分化水平

目前, 基因修饰移植肝细胞大多以增殖旺盛的胎肝细胞或肝细胞株作为研究对象, 许多研究表明, 细胞增殖能力与分化水平相互制约, 增殖能力强的移植肝细胞往往分化能力差, 其蛋白和糖原合成、药物代谢以及解毒功能均受到限制, 此外, 低分化的永生化肝细胞还存在潜在致癌性<sup>[5]</sup>. 如果仅上调肝细胞增殖基因的表达, 特别是对尚缺乏成熟分化表型的胎肝细胞进行上述基因调控, 将有可能抑制移植肝细胞分化能力和生物学功能. 因此调控某些分化基因的表达可促进移植肝细胞向成熟表型转化并增强其功能. 晚近, Kunieda *et al*<sup>[12]</sup>研究表明将调控分化水平的p21基因导入SV40T抗原基因修饰的永生化肝细胞NKNT-3, 肝细胞的分化表型及功能均明显改善.

研究表明, 肝细胞在分化转录水平上的调控是维持其功能的重要途径之一. 许多与分化相关的转录因子如HNF3 $\beta$ 、C/EBP $\alpha$ 及HNF4 $\alpha$ 是调控肝细胞分化和维护肝细胞生物学功能的重要转录蛋白. 缺乏HNF3 $\beta$ 转录活性的肝细胞株的功能基因如白蛋白、甲状腺转运蛋白、转铁蛋白及醛缩酶B等表达显著下降, 表明HNF3 $\beta$ 在肝细胞特异性基因表达的转录调控中起重要作用. C/EBP $\alpha$ 属于C/EBP家族, 仅在高度分化且不分裂的细胞中高水平表达, 肿瘤细胞中C/EBP $\alpha$ 表达明显下降. 将C/EBP $\alpha$ 基因转染至永生化肝细胞或肝癌细胞株后, 细胞增殖受到抑制, 提示C/EBP $\alpha$ 对细胞增殖起负性调控作用. 而对敲除C/EBP $\alpha$ 基因的肝细胞株进行体外培养后发现, 细胞增殖明显增强, 并且表现出去分化的某些特征, 如增殖时间缩短、核异型性及成瘤性, 提示C/EBP $\alpha$ 对促进肝细胞分化起重要作用. HNF4 $\alpha$ 是一种核激素受体家族的转录因子, 在分化成

熟的肝细胞中高表达, 是调控肝细胞分化和维护肝细胞生物学功能的重要转录蛋白. HNF4不仅可以影响肝细胞的分化表型, 同时还调控肝细胞中参与脂肪代谢、白蛋白合成以及药物解毒等重要功能基因表达<sup>[13-14]</sup>. 研究发现: 原代培养肝细胞HNF4等分化基因的表达下调, 利用二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)或制瘤素M诱导HNF4基因表达或上调HNF4基因的转录活性可以促进肝细胞分化, 增强其功能<sup>[15-16]</sup>. HNF4 $\alpha$ 过表达可逆转肝癌细胞的去分化状态. 有研究表明将HNF4 $\alpha$ 基因转染至无内源性HNF4 $\alpha$ 表达的肝癌细胞株H5后, 发现H5部分肝细胞功能被激活, 包括表达 $\alpha$ -抗胰蛋白酶、 $\beta$ -纤维蛋白原及甲状腺转运蛋白. 用地塞米松诱导HNF4 $\alpha$ 基因转染后的细胞株, 细胞HNF4 $\alpha$ 和糖皮质激素的表达提高10倍. 将表达HNF4 $\alpha$ 的H5细胞用去甲基化药物5-氮胞苷处理, 再用含有地塞米松的无糖培养基筛选阳性细胞株, 发现这些肝细胞许多功能基因表达上调, 其中一些细胞克隆已经完全恢复了正常肝细胞功能, 表明HNF4 $\alpha$ 基因表达可充分维持正常肝细胞分化与功能<sup>[16]</sup>.

## 3 调控特异性功能基因表达

基因调控移植肝细胞, 不仅可以控制肝细胞自身的生物学特性, 同时还可利用移植肝细胞作为载体将外源特异性功能基因导入体内, 以增强HCT治疗作用. 同种异体肝细胞移植后, 受体对移植肝细胞的免疫排斥强度依赖于二者之间的组织相容性匹配程度, 也是决定移植效果的关键因素之一. 移植肝细胞自身的免疫原性诱导宿主体内CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞介导细胞免疫反应, 还可通过FasL表达与移植肝细胞表面的Fas受体结合, 诱发肝细胞凋亡<sup>[17]</sup>. 通过对移植肝细胞进行基因修饰, 以降低宿主免疫排斥反应, 可有效提高HCT治疗效果. Hayashi *et al*<sup>[18]</sup>为缓解宿主体内对移植肝细胞的补体依赖性细胞毒作用, 将表达CD59抗原的逆转录病毒整合至大鼠供体肝细胞, 并置于一定浓度的人血清内培养, 细胞抗排斥能力明显提高, 生存活力比对照组提高20%. Okada *et al*<sup>[19]</sup>将由巨细胞病毒(CMV)启动子驱动表达IL-10的腺病毒体外修饰供体肝细胞, 并移植于受体脾脏, 外源表达的IL-10可以明显缓解受体体内T细胞介导的免疫排斥反应, 供体肝细胞的存活期明显延长, 接近自体肝细胞移植的效果. Reddy *et al*<sup>[20]</sup>构建表达CTLA4免疫球蛋白的重组腺病毒体外修饰供体肝细胞, 移植后表达的CTLA4球蛋白可阻断CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞分泌细胞因子和T细胞活化, 有效抑制受体细胞免疫应答, 移植肝细胞存活时间明显延长.

将能治疗和控制慢性肝病、肝纤维化发展的功能基因导入移植肝细胞内并用于HCT体内研究, 这些外源基因的表达可控制慢性肝病的病程, 阻止肝纤维化的发生和发展. 将IL-18基因修饰的供体肝细胞移植入肝纤维化大鼠, 受体肝脏和外周血中均有IL-18高效表达, 可以调控肝纤维化形成过程中Th细胞分泌细胞因子的比例, 降低

肝脏自身免疫反应,逆转肝纤维化进程.进一步的研究利用可表达 $\gamma$ -IFN的重组腺病毒修饰小鼠移植肝细胞,脾脏移植治疗血吸虫性肝纤维化小鼠,外源表达的 $\gamma$ -IFN可抑制肝星状细胞活性,治疗4 wk后肝纤维化小鼠肝脏中I型和III型胶原表达明显下降;TGF- $\beta$ 1和其受体表达明显减少,肝纤维化发展得到有效控制<sup>[21-22]</sup>.为减轻慢性肝病和肝纤维化造成的肝细胞坏死和功能减退,Mignon *et al*<sup>[23]</sup>将bcl-2修饰后的供体肝细胞移植于大鼠脾脏,发现受体肝脏抵抗Fas介导的细胞凋亡的能力明显增强,其肝细胞再生数量可增加16%,缓解了慢性肝病引起的肝细胞功能衰减和肝纤维化的发展.

目前,我们课题组在多项科研基金的资助下,先后开展了移植肝细胞的增殖基因(如人端粒酶重要组分hTR和hTERT基因)调控、分化基因(如HNF4基因)调控以及功能基因(如uPA、MMP-1、HGF、NO合酶基因)调控研究.初步结果显示,选择多个合适的外源基因并调控其在移植肝细胞内表达,可达到既提高肝细胞增殖能力,又促进肝细胞正常分化并维持其重要生物学功能的目的,也是利用基因工程技术在增殖与分化两方面双向调控移植肝细胞生物学功能、提高HCT治疗水平的有益探索.

总之,近年来HCT在基础研究和临床应用中已取得很大进展,利用基因工程技术提高移植肝细胞增殖能力、改善移植肝细胞分化水平并调控移植肝细胞特异性功能基因表达,为HCT的进一步应用展示了广阔的前景.随着基因工程、基因治疗技术等研究的不断深入,培养功能完备的“超级肝细胞”并在临床治疗中广泛应用将成为可能.

#### 4 参考文献

- Lee LA. Advances in hepatocyte transplantation: a myth becomes reality. *J Clin Invest* 2001;108:367-369
- Guha C, Roy-Chowdhury N, Jauregui H, Roy-Chowdhury J. Hepatocyte-based gene therapy. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001;8:51-57
- Karnezis AN, Dorokhov M, Grompe M, Zhu L. Loss of p27<sup>Kip1</sup> enhances the transplantation efficiency of hepatocytes transferred into diseased livers. *J Clin Invest* 2001;108:383-390
- Kobayashi N, Fujiwara T, Westerman KA, Inoue Y, Sakaguchi M, Noguchi H, Miyazaki M, Cai J, Tanaka N, Fox JJ, Leboulch P. Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes. *Science* 2000;287:1258-1262
- Cai J, Ito M, Westerman KA, Kobayashi N, Leboulch P, Fox JJ. Construction of a non-tumorigenic rat hepatocyte cell line for transplantation: reversal of hepatocyte immortalization by site-specific excision of the SV40 T antigen. *J Hepatol* 2000;33:701-708
- Kobayashi N, Noguchi H, Westerman KA, Watanabe T, Matsumura T, Totsugawa T, Fujiwara T, Leboulch P, Tanaka N. Cre/loxP-based reversible immortalization of human hepatocytes. *Cell Transplant* 2001;10:383-386
- Kobayashi N, Noguchi H, Totsugawa T, Watanabe T, Matsumura T, Fujiwara T, Miyazaki M, Fukaya K, Namba M, Tanaka N. Insertion of a suicide gene into an immortalized human hepatocyte cell line. *Cell Transplant* 2001;10:373-376
- Werner A, Duvar S, Muthing J, Bunttemeyer H, Kahmann U, Lunsdorf H, Lehmann J. Cultivation and characterization of a new immortalized human hepatocyte cell line, HepZ, for use in an artificial liver support system. *Ann N Y Acad Sci* 1999;875:364-368
- Wege H, Le HT, Chui MS, Liu L, Wu J, Giri R, Malhi H, Sappal BS, Kumaran V, Gupta S, Zern MA. Telomerase reconstitution immortalizes human fetal hepatocytes without disrupting their differentiation potential. *Gastroenterology* 2003;124:432-444
- Song E, Chen J, Antus B, Su F, Wang M, Exton MS. Adenovirus-mediated Bcl-2 gene transfer inhibits apoptosis and promotes survival of allogeneic transplanted hepatocytes. *Surgery* 2001;130:502-511
- Lee JH, Kim WH, Park H, Yun C, Kim BH, Kwak SJ, Cho H, Kim MW. Production and characterization of immortalized rat hepatocytes secreting hepatocyte growth factor/scatter factor. *Hepatogastroenterology* 2000;47:978-983
- Kunieda T, Kobayashi N, Sakaguchi M, Okitsu T, Totsugawa T, Watanabe T, Matsumura T, Maruyama M, Noguchi H, Takesue M, Shibata N, Ohmoto K, Fujiwara T, Yamamoto S, Tanaka N. Transduction of immortalized human hepatocytes with p21 to enhance differentiated phenotypes. *Cell Transplant* 2002;11:421-428
- Watt AJ, Garrison WD, Duncan SA. HNF4: a central regulator of hepatocyte differentiation and function. *Hepatology* 2003;37:1249-1253
- Parviz F, Matullo C, Garrison WD, Savatski L, Adamson JW, Ning G, Kaestner KH, Rossi JM, Zaret KS, Duncan SA. Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat Genet* 2003;34:292-296
- Lazaro CA, Croager EJ, Mitchell C, Campbell JS, Yu C, Foraker J, Rhim JA, Yeoh GC, Fausto N. Establishment, characterization, and long-term maintenance of cultures of human fetal hepatocytes. *Hepatology* 2003;38:1095-1106
- Naiki T, Nagaki M, Shidoji Y, Kojima H, Moriwaki H. Functional activity of human hepatoma cells transfected with adenovirus-mediated hepatocyte nuclear factor (HNF)-4 gene. *Cell Transplant* 2004;13:393-403
- Kawahara T, Yagita H, Kasai S, Sawa M, Kato K, Okumura K, Futagawa S, Mito M. Allogeneic hepatocyte transplantation: Contribution of Fas-Fas ligand interaction to allogeneic hepatocyte rejection. *J Gas Hep* 1998;13(Suppl):S119-S123
- Hayashi S, Isobe K, Emi N, Okada H, Yokoyama I, Takagi H. Protection of xeno-hepatocytes from complement-mediated cytolysis by transduction with homologous restriction factor 20 gene using retroviral vector. *Eur Surg Res* 1998;30:161-167
- Okada Y, Saito S, Fujisawa K, Fujiwara T, Tanaka N. Adenovirus-mediated viral IL-10 gene transfer prolongs survival of xenogeneic spheroidal aggregate-cultured hepatocytes. *Transpl Int* 2000;13(Suppl 1):S485-S493
- Reddy B, Gupta S, Chuzhin Y, Kalergis AM, Budhai L, Zhang M, Droguett G, Horwitz MS, Chowdhury JR, Nathenson SG, Davidson A. The effect of CD28/B7 blockade on alloreactive T and B cells after liver cell transplantation. *Transplantation* 2001;71:801-811
- Zhang LH, Pan JP, Yao HP, Sun WJ, Xia DJ, Wang QQ, He L, Wang J, Cao X. Intrasplenic transplantation of IL-18 gene-modified hepatocytes: an effective approach to reverse hepatic fibrosis in schistosomiasis through induction of dominant Th1 response. *Gene Ther* 2001;8:1333-1342
- Zhang L, Mi J, Yu Y, Yao H, Chen H, Li M, Cao X. IFN-gamma gene therapy by intrasplenic hepatocyte transplantation: a novel strategy for reversing hepatic fibrosis in Schistosoma japonicum-infected mice. *Parasite Immunol* 2001;23:11-17
- Mignon A, Guidotti JE, Mitchell C, Fabre M, Wernet A, De La Coste A, Soubrane O, Gilgenkrantz H, Kahn A. Selective repopulation of normal mouse liver by Fas/CD95-resistant hepatocytes. *Nat Med* 1998;4:1185-1188