

细胞移植在肝脏疾病中的应用研究

孙超, 李定国, 陈源文

孙超, 李定国, 陈源文, 上海第二医科大学附属新华医院消化内科
上海市 200092

孙超, 女, 1976-11-29 生, 河南省郑州市人, 回族. 2000年毕业于河南医科大学临床医学系, 获医学学士学位. 2003年毕业于郑州大学医学院, 获内科学硕士学位. 现在上海第二医科大学攻读博士学位, 主要从事肝纤维化的防治研究.

通讯作者: 李定国, 200092, 上海市, 上海第二医科大学附属新华医院消化内科. dingguo_li@hotmail.com

电话: 021-65790000-3362

收稿日期: 2005-04-11 接受日期: 2005-04-21

摘要

近年, 随着对肝干细胞研究的深入, 肝细胞移植、干细胞移植等细胞移植在肝脏疾病中的应用研究日益增多, 为肝脏终末期疾病的治疗开辟了一条新的治疗途径. 本文对细胞移植的细胞来源、实验模型及临床应用等方面的研究现状予以阐述, 为各种肝脏疾病的治疗提供借鉴.

关键词: 细胞移植; 肝干细胞; 肝病

孙超, 李定国, 陈源文. 细胞移植在肝脏疾病中的应用研究. 世界华人消化杂志 2005;13(16):1941-1944

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1941.asp>

0 引言

众所周知, 对于各种肝脏疾病所致的肝脏功能衰竭, 目前有希望的治疗方式有原位肝移植、生物人工肝及基因治疗等. 然而, 这些治疗方式都面临肝源短缺、免疫毒性及高额的治疗费用等问题. 近年, 随着对肝干细胞研究的深入, 许多学者对肝细胞移植、干细胞移植等治疗进行了探索, 希望能找到合适的供体细胞, 以应用于各种难治性肝病的治疗.

1 细胞来源

生理上, 成体肝脏损伤后肝实质的维持和再生主要有三个细胞来源^[1-2]: 成熟的肝细胞、肝脏内的干细胞(如胆道和胆管周围的细胞)及肝外来源的干细胞(血液循环或骨髓来源的细胞). 以上这三种细胞处于一动态平衡中, 其互相转换取决于肝损伤的程度和类型^[2]. 在正常肝脏更新中, 成熟肝细胞占优势, 肝内干细胞或循环干细胞不参与或仅少量参与. 而当严重的肝损伤时, 肝内干细胞和循环干细胞则占优势.

1.1 成熟的肝细胞 成熟的肝细胞和胆管上皮细胞对肝脏的更新和损伤修复均起一定的作用. 在肝脏轻度受

损时, 残存的成熟肝细胞进入G₀期, 其明显的核分裂像、核深染等都说明其增生能力. 有研究表明, 成熟的肝细胞具有较强的增殖能力^[3].

1.2 肝脏内干细胞 当肝脏严重受损时, 肝脏内存在的干细胞, 如位于终末胆管或小叶内胆管的卵圆细胞能大量增殖并分化为肝细胞和胆管上皮细胞^[4-5]. 使用电镜可观察到卵圆细胞体积较小, 其胞质内含有张力微丝结构, 细胞间存在连接结构, 这二者被认为是卵圆细胞区别于其他细胞的典型特点, 且这种细胞可同时表达胆道上皮分化标记CK7和肝细胞分化标记白蛋白.

1.3 肝脏外来源的干细胞 对于成体肝脏, 这种循环多能干细胞主要来源于骨髓, 体外来源的循环干细胞多为胚胎干细胞、胎肝实质细胞等. 这些细胞多通过门静脉或其分支进入肝脏, 先定居于终末胆管, 转化为过渡细胞(卵圆细胞)或引起胆管反应, 而后定向分化为成熟的肝细胞和胆管上皮细胞^[6-7]. 某些研究推测此过程的可能机制, 人肝脏的终末胆管或前体细胞均表达c-kit, 提示可能存在c-kit/SCF(干细胞因子)系统参与这一过程, 且可能受肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)的调节^[8]. 先前对其他脏器研究发现, 某些因子如粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)等可能在动员骨髓干细胞进入血液循环中起重要作用^[9]. Hatch *et al*^[10]研究认为, SDF-1/CXCR4系统可能是造血干细胞归巢于骨髓的关键因子, 也许同样可促使循环的骨髓细胞种植在损伤的肝脏. 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases-2, MMP-2)表达的上调和MMP-9的重新产生可能也起一定的作用^[8]. 然而, 哪些因子在循环细胞种植到肝脏中起决定作用尚不清楚. 此外, 干细胞在肝脏的种植率问题也引起了许多学者的重视. 大多肝损伤模型都发现, 肝脏内仅有不足2%的供体来源的肝细胞. 但是, 后来研究发现, 肝损伤程度加深有利于向肝脏种植的骨髓干细胞的筛选, 尤其在遗传型酪氨酸血症模型I型^[11]及肝移植后胆汁郁积性肝炎^[6]等模型中. 这些细胞系是一复杂的体系, 低种植率说明了需要调整机体紊乱, 从而使细胞体系更适应肝脏损伤. 近期研究表明, 循环的骨髓细胞可通过细胞融合, 替代了已受损肝细胞的线粒体或核内遗传物质, 从而使受损的肝细胞恢复正常^[12-13]. 但另一些研究发

现, 循环的骨髓细胞进入肝脏转化为肝系细胞, 不伴有细胞融合^[14-15]. 然而, 无论转化还是细胞融合均显示了基因组表达的可塑性, 二者均可用于细胞移植治疗研究.

2 细胞移植研究的动物模型

2.1 延胡索酰乙酰乙酸水解酶(fuarylacetoacetate hydrolase, FAH)缺乏小鼠模型 在延胡索酰乙酰乙酸水解酶缺乏导致的遗传型酪氨酸血症I型(hereditary tyrosinaemia type I, HTI)模型中, 由于此酶的缺乏, 使酪氨酸分解代谢受阻, 无法生成延胡索酸、乙酰乙酸和琥珀酸盐, 引起酪氨酸在体内蓄积, 导致肝脏损害. Lagase *et al*^[11]报道, 在遗传型酪氨酸血症I型的小鼠模型治疗中, 仅50个纯化的骨髓造血干细胞移植就能在肝脏内不断增殖并纠正肝酶代谢的异常, 且超过30%的肝细胞由供体衍生的细胞所取代.

2.2 惹卓碱(retrorsine)或二乙酰氨基苄(2-acetylaminofluorene, 2-AAF)模型 多数学者认为, 抑制自体肝细胞的增生是提高外源细胞种植率的有效方法. 惹卓碱(一种吡咯双烷类生物碱)或2-AAF均可抑制内源性肝细胞的增生. Laconi *et al*^[16]发现惹卓碱可在肝细胞内代谢为活化状态, 使肝细胞DNA烷基化, 阻断细胞周期而干扰肝细胞的增殖. 将二肽基肽酶(dipeptidyl-peptidase IV, DPPIV)阳性的肝细胞移植给DPPIV阴性的惹卓碱处理的大鼠, 通过检测DPPIV的表达, 发现肝脏恢复原来的体积, 且几乎完全被供体来源的肝细胞所替代. 此外, 将骨髓干细胞移植给2-AAF/CCl₄处理过的大鼠, 可在受体肝脏也发现供体来源的肝细胞^[17].

2.3 尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase plasminogen activator, uPA)转基因小鼠模型 将肝细胞移植给Alb-uPA转基因小鼠中, 转基因小鼠的肝脏有供体来源的肝细胞, 而在MUP-uPA转基因小鼠模型中还可可见供体来源的多倍体或衰老的肝细胞, 这提示uPA引起自体肝细胞间蛋白水解, 促进外源细胞的种植^[18]. uPA(+/-)/Rag-2(-/-)杂交小鼠模型易于接受异种细胞的移植, 因Rag-2(-/-)小鼠呈现T、B细胞缺陷和免疫耐受. 人的肝细胞移植给此类小鼠可在其肝脏中种植并增生, 且这种小鼠更易感染人类的乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)^[19]. 然而, 更加免疫耐受的uPA(+/-)/NOD/scid小鼠同样可接受人肝细胞的移植, 且更易感染人类的丙肝病毒(hepatitis C virus, HCV). 这两种模型为研究HBV和HCV的抗病毒治疗提供了很好的模型^[20].

2.4 bcl-2 转导和 Fas 抗体模型 运用Fas抗体注射可引起内源性肝细胞的凋亡, 而将携带抗凋亡基因***bcl***

2的腺相关病毒转染移植的肝细胞可促进其增生^[21]. Guidotti *et al*^[22]将转染***bcl***-2的逆转录病毒的肝细胞移植给反复注射Fas抗体的小鼠, 发现其种植率高达85%.

2.5 其他模型 通常情况下, 多采用肝损伤模型与抑制内源性细胞增生模型相结合的方法进行实验动物造模. 一方面可刺激肝再生和肝细胞的分化, 另一方面提高外源细胞的种植率. 如部分肝切、CCl₄等可造成肝损伤模型刺激肝再生, 全身照射可抑制受体自身的骨髓, 从而提高外源细胞种植率^[23-24]. 此外, Wilson大鼠模型及mdr-2(-/-)小鼠模型等都成功用于肝细胞移植^[25-26]的研究.

3 细胞移植在肝脏疾病中的应用前景

上述三种细胞中, 肝细胞移植治疗的初步应用已替代了全肝移植, 并成为患者等待肝源、准备原位肝移植过渡的有效手段. 对于治疗肝脏固有的疾病或肝脏缺陷蛋白的产生或基因表达异常所引起的肝外表现, 这种方法可能也有效. 其中, 肝脏固有的疾病主要指遗传代谢性疾病, 如 α_1 -抗胰蛋白酶缺乏症、I型遗传性酪氨酸血症、Wilson氏病及卟啉病等, 肝外表现包括代谢缺陷(如Crigler-Najjar综合征、家族性高胆固醇血症、淀粉样多发性神经病及草酸盐沉积症)或凝血缺陷疾病(如血友病A型), 已开始了肝细胞移植在上述疾病的临床应用^[27-28]. 研究证明肝细胞移植具有创伤性小、并发症少及免疫排斥低等优势, 且其治疗的安全性也得到证实^[28]. 而对于获得性肝脏疾病, 特别是中毒或病毒引起的急性肝功衰竭, 肝细胞移植治疗的实验研究较少.

虽然成熟的肝细胞移植最接近于临床应用, 但也有一定的局限性, 即无法大量的增殖和急需时使用. 干细胞增殖能力强, 在体内外均有极强的向肝系细胞分化的能力, 从而干细胞移植倍受重视^[1-3]. 尤其Weissman^[29]研究发现, 改变端粒酶的活性可使人干细胞获取无限增殖的能力, 这将为获取用于治疗的稳定细胞群提供新的思路. 其他来源的治疗细胞如肝实质细胞和体外分化的胚胎干细胞都具有在体外易于扩增的特点. 其中, 已从动物和人胚胎分离的胎肝细胞具有大量扩增和双向分化的能力. 多项研究表明小鼠的胚胎干细胞在体外具有分化为肝系细胞的潜能, 尽管其培养条件和鉴定指标并不完全一致. 同时, 胚胎干细胞的体内回输研究也发现其在体内也可分化为成熟的肝细胞^[30-31]. 但是对于流产胚胎组织的来源及其涉及的伦理问题限制了其广泛应用.

无论细胞来源如何, 细胞移植治疗肝脏疾病已引起广泛的兴趣. 特别是发现肝干细胞不但可作为细胞

移植治疗的细胞来源, 还可用于人工肝、基因治疗等。目前, 人工肝需要大量的细胞来保证充分的代谢和功能支持。此装置在临床多用于急性肝功衰竭患者等待肝移植的过渡治疗, 而对于慢性肝病长期的人工肝维持治疗则需大量的细胞来补充, 体外培养扩增的大量的干细胞成为新的种子细胞, 其还能提供一些细胞因子, 促进肝内干细胞分化为肝细胞^[32]。此外, 还有猪肝细胞和C3A肝癌细胞株的应用研究, 但这些细胞来源的安全性, 如免疫排斥、人兽传染病及致癌性等尚需 II 期及 III 期临床研究。

代谢缺陷性肝病可望用基因修饰细胞移植治疗。将目的基因与肝特异性启动子如白蛋白连接, 导入肝脏可表达所缺陷的酶。利用干细胞作为基因转染细胞, 因其具有自我更新的能力, 故可产生稳定而持久的基因表达。将肝细胞或骨髓干细胞移植给FAH基因敲除的小鼠模型证实了这种设想的有效性^[11]。然而, 该模型与临床人类疾病还不尽相同, 尚需进一步的临床应用研究。此外, 有研究表明, 骨髓细胞移植治疗FAH基因敲除的小鼠主要通过与肝细胞融合而转化, 这并不否决其治疗能力, 且提示其可作为基因转染的后选细胞^[33]。

当急性肝衰时, 细胞移植或人工肝均为患者等待肝移植的过渡治疗, 以提供充分的代谢来维持生命, 而其中促使机体挽回生命的信号传导机制尚不清楚, 也许是一些细胞因子或化学因子起关键作用^[9-10]。相对与代谢性疾病或急性肝衰而言, 慢性肝脏疾病的治疗更为复杂。他并非单纯由于肝细胞损失导致威胁生命, 而同时伴有血流动力学障碍引起血栓形成, 肝实质硬化和再生, 导致肝功衰竭。有关慢性肝病的研究刚刚开始, Fang *et al*^[24]报道利用FLK1⁺骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)防治大鼠CCl₄肝硬化, 在造模的同时给予干细胞治疗时, FLK1⁺MSC能整合入肝脏, 诱导肝再生并减轻胶原沉积。但这项研究的临床应用价值尚不清楚, 因此, 有关细胞移植疗法在慢性肝脏疾病的应用有待进一步的探讨和研究。

总之, 随着对肝脏疾病发病机制的了解, 我们可创造出新的治疗模型来研究细胞移植的临床应用治疗, 并且伴随着对肝干细胞研究的深入, 细胞移植有望成为肝脏疾病的有效治疗措施。

4 参考文献

- 1 Sell S. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology* 2001;33:738-750
- 2 Theise ND, Krause DS. Bone marrow to liver: the blood of Prometheus. *Semin Cell Dev Biol* 2002;33:411-417
- 3 Grompe M. Mouse liver goes human: a new tool in experimental hepatology. *Hepatology* 2001;33:1005-1006

- 4 Shafritz DA, Dabeva MD. Liver stem cells and model systems for liver repopulation. *J Hepatol* 2002;36:552-564
- 5 Yin L, Sun M, Ilic Z, Leffert HL, Sell S. Derivation, characterization, and phenotypic variation of hepatic progenitor cell lines isolated from adult rats. *Hepatology* 2002;35:315-324
- 6 Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei P, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000;32:11-16
- 7 Wulf GG, Luo KL, Jackson KA, Brenner MK, Goodell MA. Cells of the hepatic side population contribute to liver regeneration and can be replenished with bone marrow stem cells. *Haematologica* 2003;88:368-378
- 8 Kollet O, Shvitiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S, Goichberg P, Kalinkovich A, Arenzana-Seisdedos F, Nagler A, Hardan I, Revel M, Shafritz DA, Lapidot T. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34⁺ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 2003;112:160-169
- 9 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10344-10349
- 10 Hatch HM, Zheng D, Jorgensen ML, Petersen BE. SDF-1 α /CXCR4: a mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats. *Cloning Stem Cells* 2002;4:339-351
- 11 Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000;6:1229-1234
- 12 Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003;422:897-901
- 13 Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003;422:901-904
- 14 Newsome PN, Johannessen I, Boyle S, Dalakas E, McAulay KA, Samuel K, Rae F, Forrester L, Turner ML, Hayes PC, Harrison DJ, Bickmore WA, Plevris JN. Human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion. *Gastroenterology* 2003;124:1891-1900
- 15 Ishikawa F, Drake CJ, Yang S, Fleming P, Minamiguchi H, Visconti RP, Crosby CV, Argraves WS, Harada M, Key LL Jr, Livingston AG, Wingard JR, Ogawa M. Transplanted human cord blood cells give rise to hepatocytes in engrafted mice. *Ann N Y Acad Sci* 2003;996:174-185
- 16 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
- 17 Hong H, Chen JZ, Zhou F, Xue L, Zhao GQ. Influence of serum from liver-damaged rats on differentiation tendency of bone marrow-derived stem cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:2250-2253
- 18 Alison MR, Poulsom R, Forbes SJ. Update on hepatic stem cells. *Liver* 2001;21:367-373
- 19 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
- 20 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
- 21 Chen SJ, Tazelaar J, Wilson JM. Selective repopulation of normal mouse liver by hepatocytes transduced in vivo with re-

- combinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther* 2001;12: 45-50
- 22 Guidotti JE, Mallet VO, Mitchell C, Fabre M, Schoevaert D, Opolon P, Parlier D, Lambert M, Kahn A, Gilgenkrantz H. Selection of in vivo retrovirally transduced hepatocytes leads to efficient and predictable mouse liver repopulation. *Fed Am Soc Exp Biol J* 2001;15:1849-1851
- 23 Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000;31:235-240
- 24 Fang B, Shi M, Liao L, Yang S, Liu Y, Zhao RC. Systemic infusion of FLK1 (+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation* 2004;78:83-88
- 25 Irani AN, Malhi H, Sleghria S, Gorla GR, Volenberg I, Schilsky ML, Gupta S. Correction of liver disease following transplantation of normal rat hepatocytes into Long-Evans Cinnamon rats modeling Wilson's disease. *Mol Ther* 2001;3: 302-309
- 26 De Vree JM, Ottenhoff R, Bosma PJ, Smith AJ, Aten J, Oude Elferink RP. Correction of liver disease by hepatocyte transplantation in a mouse model of progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 2000;119:1720-1730
- 27 Laconi E, Laconi S. Principles of hepatocyte repopulation. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:433-438
- 28 Gupta S, Chowdhury JR. Therapeutic potential of hepatocyte transplantation. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:439-446
- 29 Weissman IL. Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000;100:157-168
- 30 Yamada T, Yoshikawa M, Kanda S, Kato Y, Nakajima Y, Ishizaka S, Tsunoda Y. In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. *Stem Cells* 2002;20:146-154
- 31 Choi D, Oh HJ, Chang UJ, Koo SK, Jiang JX, Hwang SY, Lee JD, Yeoh GC, Shin HS, Lee JS, Oh B. In vivo differentiation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes. *Cell Transplant* 2002;11:359-368
- 32 Strain AJ, Neuberger JM. A bioartificial liver-state of the art. *Science* 2002;295:1005-1009
- 33 Scott EW. Stem cell plasticity or fusion: two approaches to targeted cell therapy. *Blood Cells Mol Dis* 2004;32:65-67

编辑 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 •

2006 年世界华人消化杂志由半月刊改为旬刊出版发行

本刊讯 世界华人消化杂志主要报道食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合等胃肠病学和肝病学的最新进展及原创性等基础或临床研究的文章。

据中国科技期刊引证报告（潘云涛，马峰著，北京：科学技术文献出版社，2004：1-289）统计，世界华人消化杂志 2003 年发表文章 594 篇，地区分布 25 个，机构分布 191 个，基金论文比 31%，总被引频次 5249 次，影响因子 2.924，即年指标 0.529，引用期刊数 260 种，被引半衰期 3.06。中国科学技术信息研究所每年出版的《中国科技期刊引证报告》定期公布收录的中国科技论文统计源期刊的 10 个科学计量指标，并根据此指标评选出中国百种杰出学术期刊。世界华人消化杂志获得 2001 年和 2003 年中国百种杰出学术期刊。

据《中文核心期刊要目总览 2004 年版》（戴龙基，蔡蓉华主编，北京：北京大学出版社，2004：1-678），采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录等 7 个评价指标，选作评价指标统计源的数据库有 51 种，统计到的文献数量共计 9435301 篇次，涉及期刊 39893 种次。参加核心期刊评审的学科专家达 1873 位。经过定量筛选和专家定性评审，从中国正在出版的近 1 万 2 千种中文期刊中评选出 1800 种核心期刊。世界华人消化杂志被评为中文核心期刊要目总览。

世界华人消化杂志发表的英文摘要被美国《化学文摘（Chemical Abstracts）》，荷兰《医学文摘库/医学文摘（EMBASE/Excerpta Medica）》，俄罗斯《文摘杂志（Abstracts Journals）》收录。

世界华人消化杂志 2006 年由北京报刊发行局发行，国内统一刊号 CN 14 1260/R，邮发代号 82-262，出版日期 8, 18, 28 日，页码 160，月价 72.00。（世界胃肠病学杂志社 2005-06-29）