

生物人工肝研究进展和应用前景

丁义涛, 江春平

丁义涛, 江春平, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科 南京大学肝胆研究所 江苏省肝胆疾病临床治疗中心 江苏省南京市 210008

丁义涛, 教授, 博士生导师, 主要从事肝胆外科, 专于人工肝与肝移植临床研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30371391

卫生部重点课题资助项目, No. WKJ2005-2-032

南京市重点课题资助项目, No. ZKX0410

作者贡献分布: 本文主要贡献者为丁义涛, 负责本文的构思、设计、论证及评论; 本文写作由丁义涛与江春平完成.

通讯作者: 丁义涛, 210008, 江苏省南京市中山路321号, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科, 南京大学肝胆研究所, 江苏省肝胆疾病临床治疗中心. yitaoding@hotmail.com

电话: 025-83304616 传真: 025-83317016

收稿日期: 2008-06-30 修回日期: 2008-08-01

接受日期: 2008-08-19 在线出版日期: 2008-09-18

Research progress and prospects of bioartificial liver system

Yi-Tao Ding, Chun-Ping Jiang

Yi-Tao Ding, Chun-Ping Jiang, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School; Hepatobiliary Institute of Nanjing University; Jiangsu Provincial Center of Hepatobiliary Diseases, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30371391; the Key Programs of Ministry of Health, No. WKJ2005-2-032; and the Key Project Foundation of Nanjing City, No. ZKX0410

Correspondence to: Yi-Tao Ding, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School; Hepatobiliary Institute of Nanjing University; Jiangsu Provincial Center of Hepatobiliary Diseases, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. yitaoding@hotmail.com

Received: 2008-06-30 Revised: 2008-08-01

Accepted: 2008-08-19 Published online: 2008-09-18

Abstract

Liver transplantation is the only established treatment for acute liver failure (ALF), one of the most challenging clinical syndromes; however, donor shortages remain problematic. Artificial livers as a bridge to liver transplantation are being considered worldwide. Non-bioartificial liver (NBAL) have limitations in improving the survival rates. Therefore, a biological artificial liver (BAL) that has metabolic, detoxic, and synthetic function of hepatocytes is anticipated. Biological artificial livers are classified by cell

source, types of culture system for hepatocytes, and types of bioreactor. This paper reviews the bioartificial liver devices that have been clinically tested to support ALF patients. Finally, we identify several improvements critical to bioartificial liver replacement therapy in the future.

Key Words: Acute liver failure; Bioartificial liver; Liver support

Ding YT, Jiang CP. Research progress and prospects of bioartificial liver system. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(26): 2907-2915

摘要

急性肝功能衰竭是最具挑战性的一种临床综合征, 肝移植是唯一可治愈急性肝功能衰竭的方法, 但供体匮乏是肝移植的主要问题, 人工肝可作为肝移植过渡支持手段. 非生物人工肝在提高急性肝功能衰竭患者存活率方面作用有限, 生物人工肝具有肝细胞的代谢、解毒和合成功能, 典型的生物人工肝包括细胞来源、细胞培养方式及生物反应器. 本文主要论述目前进入临床试验的生物人工肝, 并对生物人工肝替代治疗的将来作一展望.

关键词: 急性肝功能衰竭; 生物人工肝; 肝脏支持

丁义涛, 江春平. 生物人工肝研究进展和应用前景. *世界华人消化杂志* 2008; 16(26): 2907-2915

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2907.asp>

0 引言

人工肝支持系统(artificial liver support system, ALSS)简称人工肝, 是20世纪50年代逐渐发展起来的用来为肝衰竭患者提供体外肝脏功能支持的技术方法. 经过50余年的发展, 目前人工肝治疗技术已逐渐成熟, 基本形成3大类: (1)非生物型人工肝(non-bioartificial liver, NBAL): 指各种以清除毒素功能为主的装置, 如血液透析、血液滤过、全血/血浆灌流、血液置换、分子吸附循环系统等; (2)生物型人工肝(bioartificial

■背景资料

生物型人工肝作为肝移植过渡支持手段的效果是肯定的, 并且对严重肝衰竭患者的肝功能自然恢复也起到重要作用, 但至今仍存在许多理论和临床实践上迫切需要解决的问题, 如最佳细胞来源、体外细胞长期稳定性和活性的提高, 生物反应器重建肝脏的三维结构等, 活体肝脏结构和功能的复杂性远远超过了生物型人工肝, 要想在体外完全替代肝脏的功能, 还有很长的路要走. 只有将生物工程和临床研究紧密结合, 才有可能在不远的将来开发出更符合临床需要的BAL, 为人类健康做贡献. 本文主要就生物型人工肝上述问题的研究进展和应用前景作一述评.

■同行评议者

邱双健, 副教授, 复旦大学附属中山医院肝癌研究所、肝肿瘤外科

■研发前沿

BAL最佳的细胞来源还没有确定,许多科研小组想通过基因修饰改造的方法来扩增细胞数目,增强生物反应器中肝细胞的作用,如SV40和Cre/loxP介导的基因敲除诱导人类肝细胞永生化等。肝细胞和非实质细胞的共培养可以提高细胞与细胞之间的相互作用,未来的生物反应器可能需要重建这种微环境,需要发展一种称为三维立体的制造技术,来重建肝脏三维立体构象,并能精确定位细胞的位置,理想的BAL应该是由可完全吸收BAL植入性装置来实现永久的肝脏替代作用。

liver, BAL): 一般专指人工培养的肝细胞为基础构建的体外生物反应装置; (3)混合生物型人工肝(hybrid bioartificial liver support system, HBALSS): 由生物及非生物部分共同构成的人工肝支持系统^[1]。

1963年Nose教授等在成功通过血液透析系统治疗肾功能衰竭50年后,首次报道一种替代肝脏合成和代谢功能的装置,该装置含200 g猪肝细胞,滤过膜采用肾透析所用的50 kDa凝胶纤维素膜,这是生物人工肝早期雏型。1986年Demettrion教授首先提出BAL的概念,即由肝细胞和人工解毒装置共同组成的循环系统,能发挥肝细胞的作用^[2]。构建BAL三要素为细胞来源、细胞培养方式及生物反应器,这些一直是人们研究的重点,虽取得一些进展,但至今仍存在许多理论和临床实践上迫切需要解决的问题,如最佳细胞来源、体外细胞长期稳定性、活性的提高和生物反应器重建肝脏的三维结构等,但生物型人工肝作为肝移植过渡支持手段的效果是肯定的,并且对严重肝衰竭患者肝功能自然恢复也起到重要作用,同时在肝移植供体匮乏的当今时代,生物性人工肝有可能成为替代肝脏的一种方法^[3-4]。本文主要就上述BAL三要素研究进展和应用前景作一述评。

1 BAL的细胞来源

肝组织主要由两种类型细胞组成: 实质细胞和非实质细胞。肝实质细胞是肝脏主要功能细胞,具有非常复杂的代谢功能,包括代谢、凝血、蛋白合成和解毒。非实质细胞如星状细胞、Kupffer细胞、内皮细胞、胆管内皮细胞等对维护肝脏的结构和功能极其重要。

目前,所有临床实验的BAL都尝试着去模仿肝细胞的功能,从而来实现对患者的治疗作用。这些肝细胞获取方法大多是采用肝细胞外基质释放的胶原蛋白经肝脏脉管系统灌注^[5]。

但是,人体肝细胞是表皮细胞源性的,需要细胞与细胞之间的接触以及与非实质细胞的接触才能发挥其生理功能^[6]。现有BAL装置大多缺乏这一要求即微环境,因此BAL中肝脏细胞多表现为功能降低,关键酶活性丧失以及最后导致繁殖能力丧失^[7]。另外,这些BAL系统大多采用常规一层膜培养细胞技术,其模拟代谢转化梯度和矢量与体内相比较差。因此,理想的BAL细胞来源是当前迫切需要解决的问题之一。目前, BAL的细胞来源主要有以下几种。

1.1 人类原代肝细胞 较理想BAL细胞来源是自体肝细胞。自体肝细胞从分化起源上来讲,有着相同的免疫原性,不会发生免疫排斥反应。但临床上终末期肝病患者其肝细胞的数量和质量均不能满足BAL肝细胞的要求,这些病态的肝细胞一旦离开体内微环境会失去他们全部功能。所以人类自体细胞虽然有免疫方面的优势,但不能作为一种满意的细胞来源。

同种异体肝细胞是另一个比较好的细胞来源,但异体肝细胞有三方面的因素限制了其使用。一是来源有限,在临床上很难立刻获得足量健康肝细胞;二是同种异体存有免疫排斥;三是从人类组织中提取,可能会传播一些疾病。

为了克服上述不足,有作者研究人类肝细胞永生化技术,即建立人类永生化肝细胞株,其原理是通过在细胞中导入含肿瘤基因的病毒/质粒,从而使细胞逃避M1衰老期,再通过诱导端粒酶保持端粒的长度,从而使细胞逃避M2危机期,最终达到永生化。目前主要使用SV40T和hTRET这两种肿瘤基因。这类细胞来源广,免疫并发症少,但肝功能保留不全,还存在致癌及病毒感染的风险。近年来,有学者研究了一种可恢复性肝细胞株,他是在将肿瘤基因导入原代细胞获得永生化后,再以特异性位点重组技术切除该基因,使细胞恢复到永生化前的状态,从而避免了其致癌性及病毒感染,但该技术仍处于基础研究阶段,有望使同种异体肝细胞作为BAL的最好的细胞来源^[8]。

1.2 肝细胞株 在体外,具有无限生长潜能的肝细胞株被证实是BAL一个有希望的细胞来源。这些细胞大多是从人类肝脏肿瘤细胞分化而来,而且在体外培养时显示出了很好的耐受性。

最常用于BAL研究的细胞株是HepG2-C3A细胞株。选择这一细胞株的原因是他具有正常细胞的大多数功能,包括白蛋白的合成, P450活性和尿素的代谢,由于他是肿瘤源性的,可产生AFP,作为HepG2功能的一个标志。由于这些细胞是从恶性肿瘤分离而得到的,有可能转移到免疫妥协的患者身上^[9]。因此,采用这些细胞作为细胞来源的BAL,常需要一个滤过系统来阻止细胞离开生物反应器。

肿瘤源性肝细胞包括C3A、HepG2等细胞株,来源充足,增殖能力强,且具有良好的合成功能^[10],但目前只有C3A有应用于临床的报道,这可能是由于其代谢解毒功能较弱,并存在潜在的致癌性所致。目前一个研究方向就是对这类细胞

株进行改良, 增加其代谢功能, 如Enosawa *et al*用谷氨酰胺合成酶基因转染HepG2细胞, 转染后的细胞(GS-HepG2)具有良好的氨清除能力. 但是这些系统在临床上广泛使用之前需要更多的临床试验.

1.3 异种肝细胞 由于人肝细胞的短缺, 很多异种动物肝细胞成为BAL的细胞来源, 包括猪、犬、兔、鼠等哺乳动物. 异种肝细胞是从其他物种肝脏分离出来的. 使用这些细胞的优势在于他们有足够多的数量, 而且他们的生产可以被严密的控制.

其中, 猪肝细胞非常有吸引力, 因为他们显示出了诸如尿素合成, 白蛋白合成以及P450活性等功能与人类肝细胞相似. 这些细胞可以耐受大部分的操作步骤来变得容易获得和储存几个月以备使用. 故目前应用较多, 很多进入临床的BAL应用的就是猪肝细胞. 异种细胞的使用需要关注的是动物源性传染病传播, 特别是猪内源性逆转录病毒. 在20世纪90年代中期, 来自英国的两篇报道提出了关于动物传染性疾病在体外传播, 结果导致了欧洲异种肝细胞的临床使用完全被禁止. 而在美国, 异种细胞的使用法律法规要求进行预筛选, 没有动物性传染病的优先使用, 而且需长期监视异种细胞植入后的患者.

但他也存在着缺点, 比如猪逆转录病毒(PERV)的感染问题, 虽然目前临床应用的人工肝还没有发现1例感染该病毒, 这可能与入血浆中的补体通过经典途径灭活PERV以及异源性抗Gal-a-1, 3Gal抗体可以在体外阻止PERV感染人等有关^[11-12]. 但动物试验证实培养液中还是能检测到该病毒的存在, 2003年SARS的流行引起人们对人兽共患疾病更加关注. 另外异种肝细胞还能出现免疫排斥反应, 而且其生物合成功能也不能完全代替人肝细胞, 上述因素大大限制了猪肝细胞在BAL中的应用. 因此, 随着其他组细胞来源关键性技术的突破可能会逐步淘汰异种细胞来源的使用.

1.4 干细胞 干细胞是另一类很有希望的BAL细胞来源, 在去分化状态下无限增值, 而且具有良好的分化能力, 多种起源的干细胞在组织动员方面显示有一定的前景, 特别是在BAL, 包括胚胎干细胞、祖细胞、造血干细胞、骨髓干细胞以及转分化干细胞. 但是, 这些细胞还没有正式用于BAL. 而且应用于BAL的干细胞还处于未成熟阶段. 其存在的问题是还没有一种完全有效的纯化和鉴别干细胞的方法, 而且目前尚无法使干细

胞在体外扩增至 10^7 数量级, 这是其临床应用最大的“瓶颈”^[13].

2 BAL的细胞培养

BAL所需肝细胞数量应相当于受体肝质量的1/10-1/5, 即 $1-2 \times 10^{10}$, 如此大规模的体外细胞培养是BAL应用的一个挑战. 为了尽可能的保持细胞的活性及功能, 人们不断改进细胞的培养方法, 包括细胞悬液培养、单层贴壁培养、微载体培养、微囊化培养、反应器培养及共培养等多种模式, 下面对其中主要的几种进行介绍.

2.1 微载体培养 微载体是指直径在60-250 μm 的由天然葡聚糖或其他聚合物组成的微球, 目前最常用的是Cytodex-3. 该方法是将肝细胞黏附于微载体表面生长, 由于微载体具有较大的表面积与体积比, 可以在有限的培养空间培养更多的细胞, 而细胞聚集后相互间紧密的接触, 也可以增强肝细胞的功能表达^[14].

2.2 微囊化培养 微囊实质上是一种半透膜, 其分子截留量一般为75-100 kDa, 用这种半透膜做成的微囊包被肝细胞, 既具有良好的通透性, 又能起到免疫隔离屏障的作用. 目前常用的海藻酸钠-聚赖氨酸-海藻酸钠(APA)微囊已被证实具有良好的生物相容性和通透性, 从而得到广泛的应用^[15].

2.3 球形聚集培养 该方法是通过被覆培养瓶、旋转培养箱、液喷流槽等多种方法, 限制肝细胞的贴壁生长, 从而使新分离的肝细胞聚集成球. 研究表明, 该聚集体为肝细胞提供了一个类似于体内的三维生长环境, 其内可见细胞间胆小管、细胞连接等结构, 可促进肝细胞的生长和代谢功能. 但由于聚集体中心的细胞处于不良的营养和缺氧环境, 容易衰老死亡, 所以必须控制形成的球形聚集体的直径($<15 \mu\text{m}$).

2.4 生物反应器培养 将肝细胞培养于各种生物反应器中, 通过培养液在反应器中不断循环, 供给细胞生长所需营养, 培养液按一定速度更换, 另外还有氧气供应装置、pH检测及温度调节装置, 以尽可能模拟肝细胞在体内的微环境, 提高其活性和功能. 目前该方法已广泛应用于BAL支持系统的研究, 如何改进生物反应器, 以更好的改善细胞的生存环境, 是目前BAL的一个研究热点.

2.5 共培养 共培养是指将肝细胞和肝非实质细胞或其他非肝细胞在一起培养, 这些细胞主要有肝星状细胞、骨髓干细胞、窦状隙内皮细

■应用要点

未来的生物反应器需要建立正常肝脏氧气和营养物质的浓度梯度微环境, 这个梯度是随肝细胞与门静脉的距离而改变的, 正是由于存在这一梯度, 肝细胞显示了不同的功能. 未来的生物反应器还应该最大化转化营养物质和氧气, 这就需要发展一种称为三维立体的制造技术, 来重建肝脏三维立体构象, 并能精确定位细胞的位置. 最终理想的BAL应该是由可完全吸收BAL植入性装置来实现永久的肝脏替代作用.

■名词解释

1 非生物型人工肝(NBAL):指各种以清除毒素功能为主的装置,如血液透析、血液滤过、全血/血浆灌流、血液置换、分子吸附循环系统等。

2 生物型人工肝(BAL):一般专指人工培养的肝细胞为基础构建的体外生物反应装置。

3 混合生物型人工肝(HBALSS):由生物及非生物部分共同构成的人工肝支持系统。

细胞、胰岛细胞等。肝细胞与以上不同类型的细胞相互作用,可以形成有利的细胞微环境,保持细胞间直接的相互接触,抑制肝细胞的凋亡。已有研究证明,共培养可以延长肝细胞生存时间,促进肝细胞的合成分泌代谢功能,因此,共培养将是今后BAL的一个发展趋势^[16]。

此外,为了最大程度的模拟体内环境,保持细胞活性,人们对培养液的成分不断地进行改进,目前培养液中加入的成分主要有以下几种:(1)激素:胰岛素、胰高血糖素、氢化可的松、转铁蛋白等;(2)胞外基质:Matrigel、胶原凝胶等;(3)细胞生长因子:包括EGF、HGF、NGF等;(4)氨基酸及营养物质;(5)诱导剂:如戊巴比妥;(6)抗生素。

3 BAL的生物反应器

生物反应器是整个BAL的核心部分。目前研究及应用的生物反应器主要有以下几种。

3.1 中空纤维型生物反应器 是目前应用最多的一类反应器。中空纤维管分为内腔和外腔,目前一般将肝细胞黏附生长于外腔,内腔用来通血浆或氧气。可根据不同来源的细胞选择合适分子截留量的生物膜。该反应器最大的优点是巨大的表面积与体积比,便于代谢物的转运,且保持最小的死腔。但由于肝细胞在反应器中分布不均,也易造成细胞活力的下降。

3.2 平板单层生物反应器 该反应器是将肝细胞直接种植于平板上,他的优点是细胞分布均匀,微环境一致,但表面积与体积之比下降。Shito *et al*^[17]设计了一种带有内膜氧合器的平板单层生物反应器,研究结果表明:带有氧合器的反应器中肝细胞活性更稳定,功能更强。

3.3 灌注床/支架生物反应器 该生物反应器是将肝细胞种植在灌注床或支架上,该反应器使血浆与细胞直接接触,增加了物质的转运,三维支架也促进了肝细胞三维结构的形成,同时也容易扩大细胞容量,其缺点是灌注不均一,易堵塞。

3.4 包被悬浮生物反应器 该生物反应器是将肝细胞用一种半透膜材料包裹,制成多孔微囊,然后进行灌注培养。其优点是所有细胞有相同的微环境,有大量细胞培养的空间,减少免疫反应的发生。缺点是细胞稳定性差,物质交换能力受限^[18-19]。

4 BAL的临床应用

4.1 HepatAssist 2000肝脏支持系统 是一个体外

利用猪肝细胞作为基础的BAL系统,由Cedars-Sinai医疗中心发明,Arbios Inc.waltham, MA制造。这一装置含有4部分组成:含有 7×10^7 猪肝细胞的纤维空心反应器,2个木炭过滤网,1个膜冲氧器和1个泵。生物反应器中生物反应膜能阻止整个肝细胞通过,但可以让水溶性和蛋白结合的毒物以及大分子质量的蛋白质自由通过。这些物质在肝细胞之间通过内部毛细管相互交换,而血浆则是在空心管的内部流动。一开始,患者的血液在血浆置换装置中被分成血浆和细胞成分,两个活性炭过滤装置可以清除血液中的有毒物质,其原理如同血液透析系统。在解毒作用后,血浆通过含有肝细胞的空心纤维管,进一步去除血氨、乳酸盐、胆汁酸,生成分泌白蛋白和葡萄糖,而净化血浆。净化血浆与细胞部分混合,重新回输给患者。氧气发生器和加热器,位于活性炭过滤和肝细胞反应器之间,保持血浆和肝细胞处于体温状态下。HepatAssist 2000肝脏支持系统是体外细胞基础肝脏支持系统中研究最多的一个。这一系统在体内和体外经过一系列严格临床评估,在改善患者神经系统方面是肯定的^[20]。

1997年,该系统通过I、II期试验并被证实了他的安全性,是终末期肝病患者通向肝移植手术的桥梁。随后,该系统进行了为期4年的随机对照试验,通过来自美国和欧洲的20个临床医疗中心的171例患者的使用,证实其能够提高爆发性肝衰竭患者的生存率。但是,该系统尚在进行III期临床试验,其临床应用前景尚不容乐观^[20-21]。

4.2 ELAD体外肝脏支持系统 体外肝辅助装置(extracorporeal liver assist device, ELAD)是由Baylar设计, Vital治疗公司(San Diego, CA, USA)研制开发。其在概念上与辅助肝脏相似,但ELAD运用HepC3A肝细胞,而不是猪肝细胞,包括四个中空纤维透析生物反应器。使用之前,在每个反应器里放入少量的肝细胞,经过3 wk的成熟期,细胞复制,每个反应器含有大约200 g的肝细胞,通过静脉-静脉血滤机形成超过滤(400-900 mL/h)。这个过滤设计有一个显著的优点,就是他可以连续工作10 d而不间断。超过滤只允许直径1 μ m的物质通过,从而保证没有HepG2细胞再回输到患者体内。

两个临床试验中心24例患者通过该系统进行治疗,通过监测平均动脉压,心脏指数等来评价其安全性。结果24例患者神经系统症状与对

照组相比明显改善. 在其 I、II 期临床试验中, 12 个医疗中心的 44 位患者的治疗, 证实了 ELAD 系统的安全性. 临床数据显示与对照组相比, ELAD 治疗组患者生存率明显提高, 大多患者能安全过度至肝移植. 近来, Enosawa *et al* 通过谷氨酰胺合成酶转染方法明显提高 HepG2-C3A 细胞株的氨清除能力. 唯一缺陷是 ELAD 系统易发生阻塞, 因此需要使用大量肝素, 导致凝血时间从 200 s 延长到 250 s^[22].

ELAD 的临床试验已于去年在我国正式启动, 这是 ELAD 重要临床试验准备阶段的最后一个步骤, Vital 治疗公司计划借助临床试验确定 ELAD 的安全性和功效, 并以此为基础获得我国有关部门的批准, 从而在我国市场正式推出此产品. 如获批准, ELAD 将成为全球首个基于人类细胞的体外人工肝辅助装置.

4.3 BLSS 肝脏支持系统 BLSS 是由匹兹堡大学与 Mc Gowan 研究所设计的, 采用猪肝细胞的一种中空纤维反应器. 反应器包含了 70-100 g 的猪肝细胞^[23]. 血液通过热交换器和充氧器, 然后通过中空纤维管反应器, 纤维膜阻止患者的血液直接接触猪肝细胞, 但是却允许毒素的弥散. 在通过 BLSS 后的净化血液再次泵回患者体内. BLSS 的治疗时间大约 36 h, 其中包括 12 h 的监测阶段, 12 h 的灌注时间以及 12 h 的灌注后监测阶段.

BLSS 和 HapatAssist 都是采用猪肝细胞作为细胞来源, 他们的区别是 BLSS 能够允许全血直接灌注入有网眼的中空纤维反应器. 与 ELDA 相似, BLSS 不使用活性炭吸附系统来解毒而是优先注入反应器.

第 1 个采用 BLSS 治疗是 1 例 41 岁的女性患者, 该患者患有爆发性肝衰竭. 治疗后患者血氨、乳酸盐浓度、总胆红素明显降低, 凝血功能改善, 全部临床症状改善, 最终可以撤除人工肝的治疗^[24].

2001 年 Mazaregios 评估 4 位急性肝衰竭患者 BLSS 治疗安全性. 4 位患者都能耐受治疗而且治疗效果良好, 该方法安全性可靠, 但是在血液透析过程可发生低血压, 血小板减少, 凝血障碍和低血糖症^[25].

2002 年, Kuddus *et al* 就 PERV 感染问题评价了 BLSS 治疗的安全性. 对 5 位经过 BLSS 治疗患者的生物反应器流出物一系列检查, 证实半透膜孔径只允许 100 kDa 以内物质透过, 能防止 PERV 感染. Kuddus *et al* 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^[26].

4.4 AMC-BAL (AMC-bioartificial liver) AMC-BAL 是由荷兰阿姆斯特丹大学研究人员 Chamuleau *et al* 开发, 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^[26]. 采用高密度的肝细胞形成更符合生理大小的聚合物. AMC-BAL 与其他生物反应器在结构上的最大不同在于没有中空纤维生物半透膜, 而是一种氧发生器和肝细胞培养聚酯罐合二为一的一体化生物反应器, 从而避免了生物半透膜微孔因污物阻塞, 而不能发挥物质交换的作用的缺点. AMC-BAL 生物反应器完全模拟正常肝脏的结构, 每个肝细胞都能获得良好的灌注, 保证了最佳的物质交换效率. van de Kerkhove *et al* 报道, 这一装置在 20 世纪 90 年代后期经过了许多动物实验, 完成了 I 期试验. 在意大利开始的 I 期临床实验中, 对 7 例昏迷程度 III 或 IV 期的肝衰竭患者进行 8-35 h 的治疗, 所有患者的神经系统功能改善, 而且胆红素和血氨的浓度有所改善. 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, 不需要肝移植, 未发现不良反应^[27]. 2004 年, van de Kerkhove *et al*^[18] 再次报道 1 例通过采用 AMC-BLA 治疗, 顺利过渡到肝移植的病例.

4.5 混合型 LSS-MELS 系统 (hybrid liver support system, LSS & modular extracorporeal liver support system, MELS) 由德国柏林 Charité virchow 教授研发, 其生物反应器设计独特, 由交织的中空纤维膜组成, 产生三维架构, 肝细胞团分布其上, 可改善细胞的供氧和物质交换. 生物反应器内有 3 组中空纤维管, 2 组由亲水的纤维管构成, 血浆流经此中空纤维管, 与管腔外的肝细胞接触; 另一组由疏水的纤维管构成, 是用来产生氧气和去除二氧化碳的, 用于生物反应器内的气体交换. 生物反应器可装填 500-600 g 的肝细胞. 三个中空纤维管形成了一个三维毛细管网, 具有高效率的营养物质和酶作用底物的交换^[28].

2002 年, Mundt *et al* 报道该系统采用猪肝细胞与非实质细胞共培养而进行实验的, 生物反应器存放 180-550 g 新鲜分离共同孵化的猪肝细

■同行评价

本文内容丰富, 能紧跟研究前沿, 具有一定的理论依据及临床基础, 学术价值较好.

细胞,直到用于临床。7例患者全部过渡到移植手术,在随后的两年随访中生存率达到100%。通过计算血氨的摄取和尿素的释放显示5/7个反应器中血氨是净摄入,6/7个反应器中尿素是持续释放,提示了肝功能的正常化。

随后的I期临床试验中证明了其安全性,没有一个患者有不良反应,3-4年的随访中,没有发现PERV的感染病例^[29-30]。

LSS和MELS还是唯一利用废弃人体供肝分离人肝细胞的系统。2003年Gerlach *et al*报道从废弃的人类肝脏移植中分离肝细胞和非实质细胞作为MELS的细胞来源。细胞在培养基中孵化数周,通过监测培养基的代谢活性,尿素合成,氨的解毒,半乳糖和葡萄糖摄取的数量来显示其稳定的表现。这一研究表明从废弃人体供肝分离的人肝细胞可以从损伤中恢复过来,若保存于反应器中共同孵化,可使这些细胞发展成为临床可用的BAL细胞来源^[31]。但该系统还没有通过III期临床试验,来进一步证明他的有效性。

4.6 RFB反应器(radial flow bioreactor) 日本东京大学的研究组和意大利Ferrara大学都各自开发出了RFB^[32]。两个系统很相似,区别主要是日本系统采用人肝细胞作为细胞来源,而意大利系统采用的是新鲜分离的猪肝细胞。意大利系统在试验上更进一步,简要介绍如下:生物反应器是1个灌注床构型,采用6 mm厚的聚酯纤维膜,反应器中可加入200-230 g新鲜分离的肝细胞,加温氧合的血浆从纤维管的外周向中间通过,汇聚到收集腔中,离开生物反应器之后与血液重组回输给患者。

2002年, Morisani *et al*报道采用意大利RFB治疗7个多种病因引起的急性肝衰竭患者I期临床试验。其中6例患者度过危险期,顺利进入肝移植阶段。一个患者因多器官功能衰竭死亡。患者在治疗期间是被屏蔽的,以免传播PERV,随访180天没有发现传染的迹象^[33]。虽然该系统在I期试验中表现不错,但是欧洲系统的将来还是不确定。因为需要更进一步的临床试验和取消当前禁止使用猪肝细胞禁令。

4.7 混合型人工肝支持系统(hybrid artificial liver support system, HALSS) HALSS由中国的研究队伍研发,这一系统与HepatAssist 2000有很多相似之处,包括1个空心纤维管反应器,1个充氧器/加热器,1个活性炭吸附操作杆。唯一区别是前者使用肝细胞悬浮液和生长因子,细胞悬浮液和营养液从中空纤维管反应器的外侧灌注,与

管腔内的经过活性炭吸附治疗后血浆形成对流。每个生物反应器最大治疗时间达5-6 h,而血浆置换则需要2-3 L,还有报道3.5-4 L的。

2001年, Xue *et al*^[34]采用TACE-HALSS治疗了6例急性或慢性肝功能衰竭的患者,结果很令人振奋。没有发生呼吸急促,低血压或心跳过速等事件。而且所有患者的神经系统功能都有所改善。另外,总胆红素、直接胆红素和血氨都趋向于正常,而凝血酶原时间也有所改善。该作者还报道了两个典型例子,患者因肝性脑病而接受HALSS治疗,效果非常好,以至于在患者8 d内就出院。

2003年,笔者应用两步胶原酶法分离猪肝细胞,构建聚砜膜中空纤维管生物反应器(bioliv A3A reactor),细胞数量 1×10^{10} 个,与非生物人工肝同期或非同期使用,对12例患者治疗14例次,每次支持时间为6 h,治疗前后观察患者一般状况,并检测血氨、凝血酶原时间和部分肝功能指标。结果:应用生物人工肝治疗后血氨、凝血酶原时间和总胆红素均明显改善,治疗2 d后血氨为 $106 \pm 131 \mu\text{mol/L}$,与治疗前相比较 $172 \pm 187 \mu\text{mol/L}$ 差异有显著意义($P < 0.05$);治疗1 mo后,同期生物人工肝治疗组死亡1例,非同期生物人工肝治疗组死亡2例,患者总存活率75%(9/12)。提示我们构建的新型生物人工肝可支持急性肝功能衰竭患者的肝功能,同期生物人工肝治疗可能优于非同期生物人工肝^[35-36]。

与其他系统一样, HALSS系统仍需要经过进一步非常严格的随机临床试验,来评价其安全性和疗效。

4.8 其他生物人工肝 目前新型的尚未应用于临床的BAL有很多种,如: (1)LIVER \times 2000系统:该系统是将肝细胞悬浮于胶原凝胶内,并注入分子截留量为100 kDa的中空纤维管的内腔中,24 h后,凝胶收缩,在内腔中产生一个新的空间,用作灌流循环的培养基,而纤维管的外腔是血液灌流。(2)LIVERaid系统:他是在HepatAssist系统的基础上建立起来的。该系统在中空纤维管的外周又套了一个大的纤维管,里面的纤维管内腔循环流动活性炭,两个管道之间的间隙灌流血浆,外面的纤维管表面生长肝细胞。这个构型将活性炭的解毒功能和肝细胞的治疗功能整合到了一起。(3)Oxy-HFB系统:该系统采用的中空纤维管是热交换纤维,肝细胞接种于纤维管表面,氧气和营养由纤维管内腔供应,温度也可以通过纤维管调节。患者血浆在管道外直接和

肝细胞接触^[37]. (4)LLS系统: 由很多中空纤维管组成, 他们有规律的紧密排列, 其内灌流血浆或营养液, 其作用类似于肝脏毛细血管. 肝细胞通过离心力高密度的接种于纤维管表面, 如莲藕般形成一个类器官结构, 并表达很多肝脏特异的功能. (5)UCLA-BAL系统: 肝细胞置于生物相容性的藻酸盐-多聚赖氨酸-藻酸盐(APA)半透膜中, 再将微囊化的肝细胞置于体外空腔, 并将患者血液直接灌注. 细胞可在微囊中相互接触, 又可以和血浆的成分免疫隔离开来. 微囊有很大的表面积, 很大的肝细胞载量及很高的膜半透性, 这些保证了血浆和肝细胞间充分有效的物质交换. (6)PUF-BAL系统: 该系统将肝细胞接种在一个圆筒状的聚氨酯(PUF)泡沫支架上, 在聚氨酯泡沫内三角形排列着很多毛细纤维管, 用作灌流血浆或营养液. 每个毛细管的直径是1.5 mm, 每个管之间间距3 mm. 接种于支架上的肝细胞在24 h内形成一个100-150 μm 直径的球聚体^[38]. (7)FMB-BAL系统: 是一种平板单层型生物反应器, 由大量的可堆积的平板模型组成, 每个平板都有一个供氧的表面区域. 该反应器先在透氧膜的表面包被I型胶原, 肝细胞种植依附后, 再在细胞层表面覆盖第2层胶原, 这被称为三明治培养技术, 是最稳定的肝细胞培养技术, 平板最上层的空间留做血浆或营养液灌流.

5 结论

BAL的临床应用前景是令人鼓舞的, 但其广泛应用仍需努力攻克许多难题, 如最佳细胞来源, 体外细胞长期稳定性和活性的提高, 生物反应器重建肝脏的三维结构等. 今后研究方向主要集中在以下几点.

BAL最佳的细胞来源还没有确定, 最优化的细胞扩增, 保存和共培养的问题仍然没有完全解决. 近来, 许多科研小组想通过基因修饰改造的方法来扩增细胞数目, 增强生物反应器中肝细胞的作用, 比如通过谷氨酰合成酶基因修饰, 使HepG2细胞改善氨的代谢; 基因转染猪肝细胞膜上IL-1R拮抗剂来稀释解毒IL-1对急性肝功能衰竭的毒副作用^[39]; SV40和Cre/loxP-介导的基因敲除诱导人类肝细胞永生化等.

现有的生物反应器设计只能体现肝细胞实质细胞和细胞外基质的相互作用, 而忽视了非实质细胞的重要性. 共培养策略可能是一个比较有前途的开拓领域^[8], 特别是肝细胞和非实质细胞的共培养可以提高细胞与细胞之间的相

互作用. 肝脏中的肝细胞面临着氧气和营养物质的浓度梯度, 而这个梯度是随着他们与门静脉的距离改变而改变的, 正是由于存在这一梯度, 肝细胞显示了不同的功能, 为了肝细胞可以继续发挥在正常肝脏中所有的功能, 未来的生物反应器可能需要重建这种微环境. 所有上述BAL系统, 都需要肝细胞与合成表面的接触, 他们最终的功能可能会由更多的拟生态的酶作用底物例如胶原来提高.

随着生物工程技术的不断创新, 未来的生物反应器应该最大化转化营养物质和氧气, 这就需要发展一种称为三维立体的制造技术, 来重建肝脏三维立体构象, 并能精确定位细胞的位置^[40]. 最终, 理想的BAL应该是由可完全吸收BAL植入性装置来实现永久的肝脏替代作用^[41].

总之, BAL无论是在细胞来源, 细胞培养方式, 还是在生物反应器的设计上, 都取得了很大的进展. 然而, 活体肝脏结构和功能的复杂性远远超过了BAL, 要想在体外完全替代肝脏的功能, 还有很长的路要走. 只有将生物工程和临床研究紧密结合, 才有可能在不远的将来开发出更符合临床需要的BAL, 为人类健康做贡献.

6 参考文献

- Onodera K, Sakata H, Yonekawa M, Kawamura A. Artificial liver support at present and in the future. *J Artif Organs* 2006; 9: 17-28
- Demetriou AA, Whiting J, Levenson SM, Chowdhury NR, Schechner R, Michalski S, Feldman D, Chowdhury JR. New method of hepatocyte transplantation and extracorporeal liver support. *Ann Surg* 1986; 204: 259-271
- Chamuleau RA, Poyck PP, van de Kerkhove MP. Bioartificial liver: its pros and cons. *Ther Apher Dial* 2006; 10: 168-174
- Pryor HI 2nd, Vacanti JP. The promise of artificial liver replacement. *Front Biosci* 2008; 13: 2140-2159
- Kulig KM, Vacanti JP. Hepatic tissue engineering. *Transpl Immunol* 2004; 12: 303-310
- Demetriou AA, Brown RS Jr, Busuttil RW, Fair J, McGuire BM, Rosenthal P, Am Esch JS 2nd, Lerut J, Nyberg SL, Salizzoni M, Fagan EA, de Hemptinne B, Broelsch CE, Muraca M, Salmeron JM, Rabkin JM, Metselaar HJ, Pratt D, De La Mata M, McChesney LP, Everson GT, Lavin PT, Stevens AC, Pitkin Z, Solomon BA. Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. *Ann Surg* 2004; 239: 660-667; discussion 667-670
- Grant MH, Morgan C, Henderson C, Malsch G, Seifert B, Albrecht W, Groth T. The viability and function of primary rat hepatocytes cultured on polymeric membranes developed for hybrid artificial liver devices. *J Biomed Mater Res A* 2005; 73: 367-375
- Chamuleau RA, Deurholt T, Hoekstra R. Which are the right cells to be used in a bioartificial liver?

- Metab Brain Dis* 2005; 20: 327-335
- 9 Ichai P, Samuel D. Treatment of patients with hepatic failure: the difficult place of liver support systems. *J Hepatol* 2004; 41: 694-695
- 10 Kinasiewicz A, Gautier A, Lewinski D, Bukowski J, Legallais C, Weryński A. Culture of C3A cells in alginate beads for fluidized bed bioartificial liver. *Transplant Proc* 2007; 39: 2911-2913
- 11 Wang HH, Wang YJ, Liu HL, Liu J, Huang YP, Guo HT, Wang YM. Detection of PERV by polymerase chain reaction and its safety in bioartificial liver support system. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1287-1291
- 12 Nishitai R, Ikai I, Shiotani T, Katsura N, Matsushita T, Yamanokuchi S, Matsuo K, Sugimoto S, Yamaoka Y. Absence of PERV infection in baboons after transgenic porcine liver perfusion. *J Surg Res* 2005; 124: 45-51
- 13 Burra P, Tomat S, Villa E, Gasbarrini A, Costa AN, Conconi MT, Forbes SJ, Farinati F, Cozzi E, Alison MR, Russo FP; Italian Association for the Study of the Liver (AISF). Experimental hepatology applied to stem cells. *Dig Liver Dis* 2008; 40: 54-61
- 14 辛绍杰, 邹正升, 王敏, 王福生, 游绍莉, 李保森, 王永康, 刘敬超, 张冰, 邢汉前. 中国小型猪肝细胞cytodex TM 3微载体培养及其功能. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 1376-1380
- 15 Gao Y, Jiang HC, Xu J, Pan SH, Li YD. Microencapsulating hepatocytes. *Transplant Proc* 2005; 37: 4589-4593
- 16 黄艳欣, 杜雅菊, 李宝杰. 肝细胞与骨髓间质干细胞共同培养时的肝细胞功能. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1129-1131
- 17 Shito M, Kim NH, Baskaran H, Tilles AW, Tompkins RG, Yarmush ML, Toner M. In vitro and in vivo evaluation of albumin synthesis rate of porcine hepatocytes in a flat-plate bioreactor. *Artif Organs* 2001; 25: 571-578
- 18 van de Kerkhove MP, Hoekstra R, Chamuleau RA, van Gulik TM. Clinical application of bioartificial liver support systems. *Ann Surg* 2004; 240: 216-230
- 19 Park JK, Lee DH. Bioartificial liver systems: current status and future perspective. *J Biosci Bioeng* 2005; 99: 311-319
- 20 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
- 21 Custer L, Mullen CJ. Oxygen delivery to and use by primary porcine hepatocytes in the HepatAssist 2000 system for extracorporeal treatment of patients in end-stage liver failure. *Adv Exp Med Biol* 1998; 454: 261-271
- 22 Pless G, Sauer IM. Bioartificial liver: current status. *Transplant Proc* 2005; 37: 3893-3895
- 23 Mazariegos GV, Patzer JF 2nd, Lopez RC, Giraldo M, Devera ME, Grogan TA, Zhu Y, Fulmer ML, Amiot BP, Kramer DJ. First clinical use of a novel bioartificial liver support system (BLSS). *Am J Transplant* 2002; 2: 260-266
- 24 Patzer II JF, Lopez RC, Zhu Y, Wang ZF, Mazariegos GV, Fung JJ. Bioartificial liver assist devices in support of patients with liver failure. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002; 1: 18-25
- 25 Mazariegos GV, Kramer DJ, Lopez RC, Shakil AO, Rosenbloom AJ, DeVera M, Giraldo M, Grogan TA, Zhu Y, Fulmer ML, Amiot BP, Patzer JF. Safety observations in phase I clinical evaluation of the Excorp Medical Bioartificial Liver Support System after the first four patients. *ASAIO J* 2001; 47: 471-475
- 26 Poyck PP, Pless G, Hoekstra R, Roth S, Van Wijk AC, Schwartländer R, Van Gulik TM, Sauer IM, Chamuleau RA. In vitro comparison of two bioartificial liver support systems: MELS CellModule and AMC-BAL. *Int J Artif Organs* 2007; 30: 183-191
- 27 van de Kerkhove MP, Poyck PP, Deurholt T, Hoekstra R, Chamuleau RA, van Gulik TM. Liver support therapy: an overview of the AMC-bioartificial liver research. *Dig Surg* 2005; 22: 254-264
- 28 Gerlach JC. Bioreactors for extracorporeal liver support. *Cell Transplant* 2006; 15 Suppl 1: S91-S103
- 29 Mundt A, Puhl G, Müller A, Sauer I, Müller C, Richard R, Fotopoulou C, Doll R, Gäbelein G, Höhn W, Hofbauer R, Neuhaus P, Gerlach J. A method to assess biochemical activity of liver cells during clinical application of extracorporeal hybrid liver support. *Int J Artif Organs* 2002; 25: 542-548
- 30 Sauer IM, Kardassis D, Zeillinger K, Pascher A, Gruenwald A, Pless G, Irgang M, Kraemer M, Puhl G, Frank J, Müller AR, Steinmüller T, Denner J, Neuhaus P, Gerlach JC. Clinical extracorporeal hybrid liver support--phase I study with primary porcine liver cells. *Xenotransplantation* 2003; 10: 460-469
- 31 Gerlach JC, Mutig K, Sauer IM, Schrader P, Efimova E, Mieder T, Naumann G, Grunwald A, Pless G, Mas A, Bachmann S, Neuhaus P, Zeilinger K. Use of primary human liver cells originating from discarded grafts in a bioreactor for liver support therapy and the prospects of culturing adult liver stem cells in bioreactors: a morphologic study. *Transplantation* 2003; 76: 781-786
- 32 Kanai H, Marushima H, Kimura N, Iwaki T, Saito M, Maehashi H, Shimizu K, Muto M, Masaki T, Ohkawa K, Yokoyama K, Nakayama M, Harada T, Hano H, Hataba Y, Fukuda T, Nakamura M, Totsuka N, Ishikawa S, Unemura Y, Ishii Y, Yanaga K, Matsuura T. Extracorporeal bioartificial liver using the radial-flow bioreactor in treatment of fatal experimental hepatic encephalopathy. *Artif Organs* 2007; 31: 148-151
- 33 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
- 34 Xue YL, Zhao SF, Luo Y, Li XJ, Duan ZP, Chen XP, Li WG, Huang XQ, Li YL, Cui X, Zhong DG, Zhang ZY, Huang ZQ. TECA hybrid artificial liver support system in treatment of acute liver failure. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 826-829
- 35 Ding YT, Qiu YD, Chen Z, Xu QX, Zhang HY, Tang Q, Yu DC. The development of a new bioartificial liver and its application in 12 acute liver failure patients. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 829-832
- 36 Xu Q, Sun X, Qiu Y, Zhang H, Ding Y. The optimal hepatocyte density for a hollow-fiber bioartificial liver. *Ann Clin Lab Sci* 2004; 34: 87-93
- 37 Jasmund I, Langsch A, Simmoteit R, Bader A.

- Cultivation of primary porcine hepatocytes in an OXY-HFB for use as a bioartificial liver device. *Biotechnol Prog* 2002; 18: 839-846
- 38 Shimada M, Yamashita Y, Tanaka S, Shirabe K, Nakazawa K, Ijima H, Sakiyama R, Fukuda J, Funatsu K, Sugimachi K. Characteristic gene expression induced by polyurethane foam/spheroid culture of hepatoma cell line, Hep G2 as a promising cell source for bioartificial liver. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 814-820
- 39 Shinoda M, Tilles AW, Wakabayashi G, Takayanagi A, Harada H, Obara H, Suganuma K, Berthiaume F, Shimazu M, Shimizu N, Kitajima M, Tompkins RG, Toner M, Yarmush ML. Treatment of fulminant hepatic failure in rats using a bioartificial liver device containing porcine hepatocytes producing interleukin-1 receptor antagonist. *Tissue Eng* 2006; 12: 1313-1323
- 40 Liu Tsang V, Chen AA, Cho LM, Jadin KD, Sah RL, DeLong S, West JL, Bhatia SN. Fabrication of 3D hepatic tissues by additive photopatterning of cellular hydrogels. *FASEB J* 2007; 21: 790-801
- 41 Fidkowski C, Kaazempur-Mofrad MR, Borenstein J, Vacanti JP, Langer R, Wang Y. Endothelialized microvasculature based on a biodegradable elastomer. *Tissue Eng* 2005; 11: 302-309

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志英文摘要要求

本刊讯 本刊英文摘要包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致. 具体格式要求如下: (1)题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致; (2)作者 署名一般不超过8人. 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”; (3)单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China; (4)基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801; (5)通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wjcd@wjgnet.com; (6)收稿及修回日期 格式如: Received: Revised: . (常务副总编辑: 张海宁 2008-09-18)