

文章编号:1005-6947(2007)08-0803-03

· 文献综述 ·

肝细胞移植研究进展

郭峰¹, 卢永刚²综述 何建平¹审校

(1. 昆明医学院第一附属医院 肝胆外科, 云南 昆明 650031; 2. 昆明医学院第二附属医院 肝胆外科, 云南 昆明 650031)

摘要:肝细胞移植的实验研究是20世纪70年代开始的重要课题,近年来,国内外开展了大量肝细胞移植的临床和实验的研究,以期治疗各种肝病。笔者就肝细胞移植的研究进展作一综述,包括移植方法、移植细胞的选择、移植部位、排斥反应及存在的问题等。

[中国普通外科杂志,2007,16(8):803-805]

关键词:肝细胞移植; 实验研究; 综述文献

中图分类号:R 657.2; R 44

文献标识码:A

自1963年临床原位肝移植(OLT)第一次成功以来,世界各地相继开展了各种形式的肝脏移植手术。但肝移植因并发症发生率较高、可发生严重的免疫排斥反应,尤其是供肝来源缺乏等原因,临床应用受到很大的限制。肝细胞移植(HCT)技术,由于其自身的特点:一个供体可以给多个受体提供肝细胞,移植技术简单,即使移植失败对受体的影响也十分微小,因此受到越来越广泛的重视。20世纪70年代初国外开始进行HCT的基础研究,1993年美国和日本开始进行实验性临床应用,2004年10月29日我国解放军三〇二医院也成功地为一慢性重型肝炎中期合并肝性脑病、电解质紊乱、自发性腹膜炎的48岁男性患者实施了HCT手术。至今,国内外该技术已积累了丰富的经验,有望部分或全部代替肝移植而广泛应用于临床。

本文分别就肝细胞移植的方法、移植细胞的选择、肝细胞移植部位、免疫排斥反应及细胞因子的影响、临床应用、存在的问题等方面对HCT的进展情况予以综述。

收稿日期:2007-05-18;

修订日期:2007-07-30。

作者简介:郭峰,男,辽宁朝阳人,昆明医学院第一附属医院硕士研究生,主要从事肝脏疾病、肝移植方面的研究。

通讯作者:郭峰 E-mail: guofeng20013088@163.com

1 肝细胞移植方法

Mito等^[1]率先将HCT应用于治疗肝衰竭的患者,其方法是:切除三段肝左叶,分离肝细胞,即刻注射 $10^7 \sim 6 \times 10^8$ 个肝细胞于患者脾脏,随访患者症状的改善情况。目前Liu等^[2]则是将肝细胞和骨髓干细胞用胶囊共同包裹后进行移植,然后评价移植后其去除氨的能力及治疗小鼠高胆红素血症的效果,结果证明:与单独的HCT相比,用胶囊共同包裹后进行移植的方法,不仅在体外可增强去除氨的能力,而且还可降低体内总胆红素水平,移植成功的几率也大大增加。

2 移植细胞的选择

2.1 异种肝细胞移植

这种移植具有来源广泛的显著优点。目前最常用的异种肝细胞源是猪肝,它能提供与人肝结构相似、功能相近的肝细胞。Nishitai等^[3]在免疫缺陷鼠的脾脏内移植猪肝细胞,发现新鲜分离的猪肝细胞较之培养后、4℃保存或冻存后的猪肝细胞在移植后具有更好的活力和分泌功能。提示新鲜分离的猪肝细胞是首选的异种肝细胞源。

2.2 成熟的人肝细胞

这是最理想的细胞来源。Chen等^[4]用含肝细胞生长因子变异体的培养基培养人肝细胞作动物对照实验,

证实体外培养过程中该变异体能够维持人肝细胞的特异性功能。

2.3 胎肝细胞

胎肝细胞是由流产胎儿肝脏分离所得的肝细胞及其前体,具有分化增殖能力强、免疫原性弱及更能抵抗低温贮存损伤等优点。

2.4 永生化的肝细胞株

它是一种具有良好特征性的可移植肝细胞,可以解决增殖难题,具有成为取之不竭的潜力。国内有学者以重组质粒SV40LT/pcDNA3.1经脂质体转染来源于正常人肝细胞,成功构建永生化的肝细胞系HepLL,表明HepLL具有正常人肝细胞的形态特征和生物学功能^[5]。

2.5 肝干细胞

由Petersen于1999年最先提出,分为肝源性和非肝源性两大类。目前较为明确的是前者,主要包括肝卵圆细胞;后者包括成体肝细胞和胚胎干细胞两大类。关于成体干细胞的研究主要聚焦于骨髓干细胞向肝细胞的分化研究^[6]。国内也开展很多关于骨髓源性肝干细胞方面的研究,蔡云峰等^[7]建立动物模型应用免疫磁珠法分离骨髓干细胞,在体外培养诱导分化,免疫组化技术检测,证明 β_2m -细胞在体外具有向肝细胞分化的能力。

3 肝细胞移植部位

理论上,肝脏本身的微环境及门

静脉血中的营养成分均对植入的肝细胞有益;门静脉内或肝实质内应是供体肝细胞理想的植入场所。国外有些实验发现:门静脉内移植会导致严重的肝损伤和广泛的肝坏死,移植早期实验动物的病死率明显增加。这可能是由于植入的肝细胞直接阻碍受体肝脏的血液供应,引起肝脏的梗塞和坏死。这就严重限制了肝细胞的植入数量,直接降低了其对受体的代谢支持功能。腹腔内 HCT,由于其技术简单及可反复多次进行等优点故首先被选用于 HCT。先期腹腔内移植显示出令人鼓舞的短期疗效。但腹膜腔无法为肝细胞的长期附着和生存提供足够支持,移入的肝细胞寿命短暂。改进后采用的联合移植肝细胞与非实质细胞或自体基质,或以胶原包裹或藻酸盐微囊化肝细胞均可延长肝细胞在腹膜腔内的生存时间^[8]。近来,Rahman 等^[9]用联合包裹 HepG₂ 细胞和支持细胞的方法延长了移植细胞在鼠腹膜腔的生存时间。微囊化方法与局部免疫抑制的结合可能是一种有价值的 HCT 策略。

脾实质内 HCT。脾脏已被认为是 HCT 的最佳部位。植入脾内的肝细胞可长期存活、增殖,并保持肝细胞的形态和功能^[10]。虽然肝细胞移植入体内其他部位如胰腺、肺脏、肾脂肪囊、皮下组织、肌肉等处也有一定的代谢支持功能,但均不如脾内移植优越。因此脾实质的移植可能是未来最有前途的移植选择。

4 HCT 的免疫排斥反应及细胞因子的影响

免疫学问题仍是 HCT 面临的主要问题之一。由于肝细胞表面只有少量的 MHC-I 类分子,无 MHC-II 类分子表达,故理论上肝细胞无免疫原性。但并非所有研究均支持这种观点。在不使用免疫抑制剂的情况下,同种 HCT 移植的肝细胞只能在受体内存活不到 7d。HCT 所致的免疫排斥反应的强弱程度依赖于供、受体组织相容性匹配程度。Bumgardner 等^[11]将同种异体肝细胞分别经脾移植入 B 细胞、CD4 细胞或 CD8 细胞缺失的受体中,移植肝细胞存活均不超过 10d,

移植入 T 细胞缺失的受体中,存活超过 16 周。因此推测 HCT 的排斥反应主要由 T 细胞介导。亦有实验证明,同种大鼠 HCT 时可发生有补体(主要为 C₃)及少量的抗体[主要为免疫球蛋白 M(IgM)]参与的免疫排斥反应。Attavar 等^[12]将同种异体的大鼠肝细胞悬液植入脾脏的同时植入胸腺,诱发大鼠的免疫耐受而长期生存,这可能是诱发了中枢免疫耐受的结果。当前,用环孢素 A(CsA)作同种异体移植的免疫抑制剂取得了较好的效果。在应用 CsA 治疗异种 HCT 的排斥反应试验研究中,受体组织学检查表明,异种移植后 24h 出现肝细胞变性,72h 移植周围出现炎性细胞浸润,移植后应用 CsA 24h 细胞核仍有损害,但却不明显,7d 后很少见移植物痕迹。CsA 能抑制 HCT 的排斥反应,也有可能是阻断了 Fas 系统介导的凋亡,因为 CsA 能抑制 T 细胞表达 Fas 配体。异种 HCT 时,细胞本身及由其合成的蛋白质都可导致受体的免疫排斥反应,移植肝细胞微囊包被及环孢素可延长细胞存活和发挥功能的时间。移植肝细胞的纯化亦是降低移植排斥反应和维持其长期存活的关键因素之一^[13]。另外,深低温可使膜蛋白中螺旋增加,并导致移植肝细胞的免疫反应原性降低。

5 HCT 的初步临床应用

HCT 现主要用于治疗以下疾病:(1)各种原因引起的急、慢性肝衰竭,如肝肿瘤、终末期肝硬化;(2)肝代谢疾病^[14],如 α -1 抗胰蛋白酶缺乏;(3)肝脏疾病的基因治疗,如家族性高胆固醇血症。大量的临床、实验研究表明,对于患有致命性肝脏疾病的治疗,HCT 较 OLT 具有以下优点^[8]:(1)HCT 的创伤对受体的打击相对较小,易操作,安全性好。(2)OLT 供体缺乏,HCT 可部分解决供体短缺的问题。(3)HCT 排异反应低于 OLT。(4)植入的肝细胞能较快地发挥合成、解毒和促进胆红素排泄等作用;(5)HCT 还可通过复杂的体液分子机制,促进宿主残余肝细胞增殖和肝功能的恢复;(6)肝脏随着肝细胞的再生而发挥其正常功能;(7)具有基因修饰的可能性。

6 问题与展望

HCT 历经 30 余年的不断研究,已从动物模型阶段开始进入初步临床试验。虽然 HCT 是当前热点之一,但在其常规用于治疗人类疾病之前还有许多有待解决的问题:(1)移植肝细胞所需数量大,如何才能从切取的肝脏上最大限度地获得分离的肝细胞,如何大量培养和保存肝细胞,怎样从有病变的肝脏中分离和纯化肝细胞;(2)肝细胞低温冻存复苏后存活率不高,功能受到不同程度影响;(3)如何建立细胞耐受和抑制排斥反应的新策略;(4)体外培养并大量扩增原代人肝细胞的技术能力有限;(5)HCT 适宜的移植部位、数量和方式,在病理机体情况下,哪些器官或部位最适合移植肝细胞;(6)HCT 的指征和不同程度应用的剂量以及临床效用的监测;(7)HCT 基因治疗适宜载体的构建。

由于移植肝细胞在体内的存活和增殖仍然比较困难,使得 HCT 目前尚处于动物实验阶段及少量试验性临床应用,进入真正临床应用还有很长一段路要走。动物实验资料和近期临床应用的成功事例展示了 HCT 这一技术的长远、广阔的前景。

参考文献:

- [1] Mito M, Susano M, Sawa M. Hepatocyte transplantation for hepatic failure [J]. *Transplant Rev*, 1993, 7(1): 35-43.
- [2] Liu ZC, Chang TM. Coencapsulation of hepatocytes and bone marrow stem-cells: in vitro conversion of ammonia and in vivo lowering of bilirubin in hyperbilirubemia Gunn rats [J]. *Int J Artif Organs*, 2003, 26(6): 491-497.
- [3] Nishitai R, Kochca, Ogata K, et al. Toward the survival and function of xenogeneic hepatocyte grafts [J]. *Liver Transpl*, 2005, 11(1): 39-50.
- [4] Chen Y, Kobayashi N, Suzuki S, et al. Transplantation of human hepatocytes cultured with deleted variant of hepatocyte growth factor prolongs the survival of mice with acute liver failure [J]. *Transplantation*, 2005, 79(10): 1378-1385.

- [5] Li J, Li LJ, Cao HC, *et al.* Establishment of highly differentiated immortalized hepatocyte line with simian virus 40 large tumor antigen for liver based cell therapy [J]. *Asaio J*, 2005, 51(3):262-268.
- [6] 陈积圣, 商昌珍. 应用肝干细胞治疗难治性肝病的进展 [J]. *中国普通外科杂志*. 2007, 16(3):269-271.
- [7] 蔡云峰, 闵军, 何劲松, 等. 骨髓源性肝干细胞的确认及定向分化的实验研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 12(4):287-290.
- [8] Ambrosino G, Varotto S, Basso SM, *et al.* Hepatocyte transplantation in the treatment of acute liver failure: microencapsulated hepatocytes versus hepatocytes attached to an autologous biomatrix [J]. *Cell Transplant*, 2003, 12(1):43-49.
- [9] Rahman TM, Diakanov I, Selden C, *et al.* Cotransplantation of encapsulated HepG2 and rat Sertoli cells improves outcome in a thioacetamide induced rat model of acute hepatic failure [J]. *Transpl Int*, 2005, 18(8):1001-1009.
- [10] Ahmad TA, Fujidka H, Eguchi S, *et al.* Long-term effect of hepatocyte transplantation on fulminant hepatic failure in rats [J]. *Hepa-to-gastroenterology*, 2003, 50(50):467-471.
- [11] Bumgardner GL, Li J, Heininger M, *et al.* In vivo immunogenicity of purified allogeneic hepatocytes in a murine hepatocyte transplant model [J]. *Transplantation*, 1998, 65(1):47-52.
- [12] Attavar P, Budhai L, Kim BH, *et al.* Mechanism of intrathymic tolerance induction to isolated rat hepatocyte allograft [J]. *Hepatology*, 1997, 26(1):1287-1295.
- [13] 张水兴, 张雪林. 肝细胞移植实验及临床应用研究 [J]. *Chinese Hepatology*, 2003, 8(1):52-54.
- [14] 蔡宏波, Stephen Strom, 吕新生. 临床肝细胞移植的现状和前景 [J]. *中国普通外科杂志*. 2003, 12(9):704-706.

欢迎订阅《中国急救医学》

《中国急救医学》创刊于1981年,由卫生部主管。是中国医师协会系列期刊之一。是中国科技论文统计源期刊、中文核心期刊、中国生物医学核心期刊。报道范围包括各有关学科(急诊、院前急救、内、外、妇、儿、神经、麻醉等)的急危重症的临床救治、基础研究、教学科研等内容。主要栏目有论著、综述、专题研究、临床研究、院前急救、学科建设、急诊教学、经验交流、个案报道、述评等。《中国急救医学》是做好急危重症抢救工作的良师益友,订阅《中国急救医学》是您明智的选择! 欢迎订阅2008年的《中国急救医学》杂志并真诚欢迎各科医务人员踊跃来稿!

刊号:ISSN1002-1949/CN23-1201/R 国内定价:8.00元/本 国内外发行 国内:各地邮局 代号:14-75

国外:中国图书贸易总公司 代号:M6365 月刊大16开本96页 每月10日出版

编辑部地址:哈尔滨市南岗区银行街74号

邮编:150001 电话:0451-53643877

Email:zgjjyx@163.com; zgjjyx@periodicals.net.cn

中国急救医学杂志编辑部

《中国感染控制杂志》征订征稿启事

《中国感染控制杂志》(ISSN 1671-9638, CN 43-1390/R, 邮发42-203)是国家教育部主管,中南大学(湘雅医院)主办的国内外公开发行的国家级感染性疾病专业学术期刊。本刊为中国科技论文统计源与核心期刊,并被美国化学文摘(CA)、俄罗斯文摘杂志(AJ)、中国期刊全文数据库(CNKI)、中文科技期刊数据库、中文生物医学期刊文献数据库(CMCC)、万方数据-数字化期刊群等重要检索机构收录。本刊涉及感染病学基础(微生物、病理生理、流行病学等)与临床(各科感染性疾病)及医院感染控制等内容,栏目丰富(专家论坛、论著、临床研究、实验研究、经验交流、病例报告、医学教育、综述、国内外学术动态、译文等),可读性与实用性强,欢迎各相关专业医务人员及疾病预防与控制人员订阅(双月刊,10元/期,全年60元)、赐稿(稿件审理费40元)。为满足作者及读者需求,尽早刊登高质量研究论文,本刊承诺,投至本刊的国家级基金项目论文如审稿通过,在收稿4个月内刊登,省级基金项目论文审稿通过,在收稿6个月内刊登。

联系人:任旭芝、任南、吴安华。

编辑部地址:湖南省长沙市湘雅路87号 中国感染控制杂志社; 邮编:410008。

电话:0731-4327658; 传真:0731-4327237; E-mail:zggrkz2002@yahoo.com.cn。

中国感染控制杂志编辑部