

## 肝病细胞疗法的系统观

文剑, 赵伟, 蒋淑莲, 廖联明

文剑, 赵伟, 蒋淑莲, 东南大学医学院南京附属第二医院细胞生物学实验室 江苏省南京市 210003  
廖联明, 中国医学科学院组织细胞工程中心  
江苏省自然科学基金资助课题, No. BK2004012  
项目负责人: 文剑, 210003, 江苏省南京市, 东南大学医学院南京附属第二医院细胞生物学实验室, Wenjian2400@163.com  
电话: 025-83465372  
收稿日期: 2004-10-11 接受日期: 2004-10-20

### 摘要

由肝炎病毒引起的以肝功能衰竭为主要特征的重型肝炎治疗已由传统的保肝解毒向生物人工肝和肝脏细胞移植这两大细胞疗法方向发展。肝功能衰竭涉及到多器官衰竭及其对全身各系统的影响, 故应从系统论的观点来探讨肝功能衰竭中存在的主要矛盾及治疗策略、细胞疗法内存在问题及其解决时应采取的系统优化方案。

文剑, 赵伟, 蒋淑莲, 廖联明. 肝病细胞疗法的系统观. 世界华人消化杂志 2005;13(2):226-230  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/226.asp>

### 0 引言

我国是病毒性肝炎的高发区, 由肝炎病毒引起的以肝功能衰竭为主要特征的重型肝炎发病率很高。这类患者的大部分肝细胞发生了变性、坏死, 以致肝功能衰竭, 造成体内严重的代谢紊乱和毒物聚积, 而现有的病因疗法及传统的对症支持疗法多不能代偿肝功能, 故而重型肝炎的死亡率高达70%以上。因此, 肝功能衰竭的治疗由传统的保肝解毒向生物人工肝和肝脏细胞移植这两大细胞疗法方向发展。现从系统论的角度探讨一下肝病两种细胞疗法的现阶段进展、存在问题及发展方向。

### 1 肝功能衰竭研究中的系统观

生命是一个开放式系统, 外界环境对其的物质能量信息的输入和输出维持其处于一个动态平衡相对稳定的状态, 但却又是不断处于生老病死的过程中的, 具有一定的目的性和方向性。生命作为一个整体, 是适应外界环境变化的, 而其中的每个部分每个器官是不能脱离整体来单独研究的, 在系统变化的时空中, 其每个部分互相协调服务并支持整体的适应性安排的, 整体和外界、部分和整体之间具有反馈控制的特点。

肝功能衰竭主要存在肝细胞的大量坏死以及代谢紊乱和毒物聚积所导致的肝脏生存环境恶劣这两大矛盾, 更重要的是二者形成了一种恶性循环的正反馈形式, 肝细胞的坏死导致毒物聚积和生物活性因子减少, 肝功能甚至全身性器官功能恶化; 而肝脏生存环境的恶劣反过来加

速肝细胞的坏死, 所以, 对于死亡率极高的肝功能衰竭患者, 关键在于阻断这种恶性循环, 使其变为良性循环。如果仅仅是解决其中的一个环节, 比如人工肝治疗, 疗效是暂时的, 因为虽然人工肝可以清除体内大量的毒素, 改善肝脏生存环境, 有一定的促进肝细胞增生分化的作用, 但是肝脏的复原对细胞有着一定的数量效应, 在肝功能衰竭中, 其正常肝细胞往往低于原肝脏细胞数量的20%, 光靠改善生存环境是远远不够的, 必需加以外界的大量正常肝细胞移植。而肝脏正常功能细胞的不足, 势必意味着其仍不能有效清除毒素, 提供活性分子, 因此通过人工肝改善肝脏生存环境的效果是暂时的。可见, 肝衰竭中两个环节若不同时改善, 另一个环节的改善也只能是暂时的。反之, 如若同时改善两个环节, 则将进入良性循环, 势必大大加速肝脏的复原, 比之对单一环节的改善, 疗效显著的多。目前针对肝脏生存环境恶劣这一矛盾最有效的疗法是生物人工肝, 针对肝细胞不足最直接有效的疗法是细胞移植。两种疗法针对肝衰治疗时起着相辅相成, 相得益彰的作用。而且两种细胞疗法有着共同的核心问题即细胞来源的问题。故在此一起详述。

应该注意的是, 对于慢性肝功能衰竭, 机体各大器官对体内集聚的毒素产生了一定的适应性, 突然大量清除毒素, 有可能产生并发症。但是对于急性肝衰, 则需迅速清除体内集聚的毒素。由此可见, 对于肝功能衰竭的不同类型, 其两大主要矛盾虽然同样存在, 但治疗原则应有所不同, 应考虑到系统原则。

### 2 肝脏细胞移植研究中的系统观

2.1 肝脏细胞移植简介 肝细胞移植是将正常肝细胞、人体不同发育阶段的肝细胞、肝干细胞、基因修饰型肝细胞以及相关生长刺激因子, 通过不同途径移植到受体适当的靶位, 使之定居、增生, 以至重建肝组织结构, 并发挥主要正常肝功能的肝组织工程学手段。

肝细胞移植(HCT)与原位肝移植(OLT)相比, 具有明显的优点: (1) 技术简单, 易于操作; (2) OLT 供肝缺乏, 而来自一个肝脏的细胞可供多个受体, 至少可部分解决供肝短缺的问题; (3) 费用低廉, 手术风险小; (4) 不仅可以治疗肝功能衰竭, 而且可以治疗多种代谢性肝病。

用同系 Lewis 大鼠肝细胞移植治疗急性肝功能衰竭, 获得成功<sup>[1]</sup>。Makowka *et al* 于1980年代发现同系骨髓细胞腹腔内注入也能收到同样效果。后来, 许多学者都证明自体、同系、同种及异种肝细胞移植都能显著地

提高急性肝功能衰竭动物的存活率. 1982年O'Neill及Sutherland报告, 使用肝细胞培养液的上清治疗D-半乳糖胺诱发的急性肝功能衰竭大鼠, 肝功能很快恢复, 从而显著地提高了肝功能衰竭大鼠的存活率.

近年来HCT已进入临床研究阶段, 首例报道见于1994年, 患者患有家族性高胆固醇血症. 研究者将收集的患者肝细胞在体外转染低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)基因后通过门静脉重新移植入患者肝脏内, 结果证实该技术可行且有部分疗效. 此后有人将正常肝细胞植入1例I型Crigler-Najjar综合征患儿肝内, 有一定疗效. 除了代谢性肝病外, 美国学者开始采用脾内移植肝细胞的方法治疗进展性肝功能衰竭, 一些肝性脑病患者的肝功能在HCT后得到改善, 最终过渡到OLT阶段. Mito *et al*<sup>[2]</sup>通过切除部分肝脏分离获得肝细胞后, 注射入脾脏治疗肝功能衰竭患者, 10例中用同位素跟踪发现8例移植肝细胞存活1-11 mo, 临床症状改善. Habiballah *et al*把流产胎儿的肝细胞混合悬液移植患者腹腔治疗爆发性肝功能衰竭(FHF), 结果显示肝性脑病明显减轻、肝功能好转. 后来国外陆续有人源性肝细胞移植治疗急性肝衰竭的报道.

肝细胞移植的途径有脾内、腹腔内、皮下、肌肉等多种, 以前三种最常用, 脾内及静脉内效果较好, 腹腔内次之. 肝细胞植入受体后, 其分化、增生潜能既受自身特性及活性影响, 又受到受体肝内环境的影响<sup>[3]</sup>.

目前有关HCT治疗肝功能衰竭的临床研究还十分有限, 但至少能得到以下几点启示: (1)HCT可以延长患者生存时间, 使其过渡到OLT阶段; (2)HCT可诱导肝再生从而使部分患者避免OLT; (3)将肝细胞移植入人体是安全的.

HCT治疗肝功能衰竭还有不足: 一是正常成人肝细胞更新缓慢, 移植肝细胞本身缺乏增生活性; 二是移植肝细胞与受体肝细胞相比缺乏生长优势.

**2.2 肝脏细胞移植优化的系统观** 肝细胞移植后, 细胞的增生分化需要合适的系统结构以及微环境. 细胞作为一个开放式系统, 是在和外界环境不断进行物质能量信息的交换中才得以生存和发展的. 正常的肝脏在发育的时空过程中, 既给肝细胞的增生分化提供了合适的立体结构, 又提供了良好的微环境. 因此, 在肝脏骨架结构没有损害之前的细胞移植, 效果应好于终末期肝硬化导致的肝衰患者.

肝脏作为人体最大的代谢工厂, 需要功能多种多样的细胞, 彼此还需要协调配合, 以适应人体营养成分的需要以及代谢产物的清除. 考虑到这个系统时空过程的复杂性, 以及移植细胞的增生受限, 理论上可行有效的移植方法应是肝干细胞的移植, 而不是成熟肝细胞的移植. 干细胞的增生分化需要一定的细胞数量效应, 以及需要正常肝细胞和其他支持细胞的支持, 以提供合适的细胞环境, 加上干细胞在分化为成熟肝细胞之前还不能有效缓解肝功能, 因此, 针对肝衰患者的细胞移植, 在以肝干细胞移植为主的时候, 应该同时辅以正常肝细胞和其他支持细胞如DC细胞的移植.

目前增生能力较强的肝细胞来源: (1)永生化细胞株: 利用永生化基因SV40T转染肝细胞建立的永生化肝细胞株可大量增生, 已有研究显示这种永生化肝细胞可提高急性肝功能衰竭模型大鼠的存活率. 但是这种细胞的癌变倾向严重, 尚难以用于临床. (2)干细胞: 多种干细胞如肝卵圆细胞、胚胎干细胞及造血干细胞等移植后可分化为成熟肝细胞. 研究表明, 从人胎肝中分离的肝干细胞在培养时具有很强的增生活性, 移植到免疫缺陷小鼠体内可分化为成熟肝细胞, 而且胎肝干细胞还有易于大量分离培养与基因操作等优点.

采用某些措施可使移植的细胞具有增生优势, 如在某些刺激增生的信号存在时, 仅移植的细胞做出反应而受体肝细胞则不. 生物碱(具有致癌性)处理受体肝细胞可使之在存在刺激增生的信号时变得无应答. 人为地产生一些刺激增生的信号, 能使移植的细胞优势生长, 如在移植前对受体进行部分肝切除、再灌注损伤、诱导Fas介导的肝细胞调亡等(均属于造成肝细胞损伤)和给与肝细胞有丝分裂刺激物(生长因子、甲状腺激素等)<sup>[3]</sup>.

从外科手术、活检标本、器官移植等中获取正常肝细胞非常有限, 而维持机体正常肝功能至少需要30%的肝脏, 且肝细胞不易在体外培养生长, 普通条件下12-24 h即丧失其间隙连接结构, 3-5 d细胞成扁平状, 失去其特异组织功能, 1-2 wk全部死亡<sup>[4]</sup>. 而且在目前技术条件下, 肝细胞仍然只能原代培养, 尚不可能对其进行增生, 因此, 供体肝细胞不足问题仍然很突出.

肝脏干细胞则可以在体外长期扩增, 并且能避免增生限制的缺点, 必要时可以体外定向诱导成为成熟肝细胞, 从理论上讲, 利用肝脏干细胞、胎肝细胞等具有一定生长优势的肝脏细胞进行细胞移植治疗肝功能衰竭患者, 有望获得较好的疗效<sup>[5]</sup>.

总之, 肝脏干细胞移植(辅以其支持细胞移植)治疗肝功能衰竭, 目前才开始起步, 却代表了一项极具前景的治疗途径.

### 3 生物人工肝研究中的系统观

**3.1 人工肝发展简介** 体外人工肝支持系统(ALSS)是指用人工方法来替代严重肝病患者衰竭的肝功能, 为患者提供支持治疗的装置与方法. 生物型人工肝是利用生物方法(主要是体外培养的肝细胞)作为治疗的主要手段, 是新近发展起来的最为理想的体外肝功能支持方法, 已在动物实验及临床实践中取得较为满意的疗效.

国外人工肝的研究开始于1950年代, 人工肝的发展大致经历了三个阶段.

早在上一世纪50年代, 人们就试图用人工肝脏来替代严重肝病患者衰竭的肝功能, 但受技术条件及方法的限制, 加上肝脏功能十分复杂, 早期解毒为主的人工肝装置及方法难以有效地代偿肝功能、提高成活率. 以后经过数十年不懈的努力, 特别是随着以培养肝细胞为材料的新型生物人工肝的日臻成熟, 人工肝支持系统(ALSS)终于

有望成为肝衰竭理想的辅助支持治疗手段<sup>[6]</sup>, 为患者等待肝移植或通过肝再生而自然恢复争取时间、创造条件, 同时也有可能为重型肝炎救治这一临床难题的解决开辟新的途径.

早期以解毒功能为主的ALSS大多属物理型, 如血液灌流、血液透析/滤过等. 用树脂、活性炭等材料进行血液灌流, 可有效吸附肝衰竭患者血液中的毒性物质, 是早期人工肝支持的常用方法. 但由于这些吸附材料与血液生物相容性较差, 临床应用副反应大. 晚近采用活性炭微囊化技术、改用血浆灌流等, 避免了活性炭与血细胞直接接触, 从而减少了不良反应. 但由于吸附材料本身选择性较差, 在去除患者体内毒性物质的同时, 也吸附了一些机体有用的物质, 故虽可显著改善重型肝炎等肝衰竭患者的肝性脑病, 但死亡率并未明显下降<sup>[7]</sup>. 目前主要利用其解毒尤其是吸附胆红素的作用与其他人工肝联合使用或用于治疗病情较轻的重型肝炎.

中间型人工肝是介于物理型与生物型人工肝之间的一类中间型装置, 包括血浆置换、交换输血及整体洗涤等, 其中以血浆置换最为常用. 该疗法可去除与血浆蛋白结合的大分子物质(如内毒素)及中、小分子物质, 并补充蛋白、调理素及凝血因子等多种生物活性物质. 1990年代初 Sugihara *et al* 曾报道, 血浆置换法治疗15例急性肝衰竭9例成活, 成活率达60%. 但以后日本学者报道血浆置换治疗百余例重症肝炎的成活率仅有21-24%, 提示单独应用疗效并不十分理想. 随后国外又有人将血浆置换疗法与新型膜材料透析滤过相结合, 使10例重症肝炎全部存活. 表明血浆置换与物理型人工肝方法的优化组合可显示出更好的效果.

血浆置换是较为成熟的肝脏替代疗法, 但需消耗大量新鲜冷冻血浆, 易发生人类免疫缺陷病毒(HIV)和肝炎病毒的经血传播, 少数患者可出现过敏反应, 置换过程中同时去除了患者机体内有益的物质.

生物型人工肝(BLSS)是1980年代后期出现的新型ALSS, 是将肝细胞悬液、培养肝细胞等与生物合成材料相结合组装成某种形式的ALSS, 他不仅具有肝特异性的解毒功能, 而且具有更高的效能, 如参与三大物质代谢、具有生物转化功能、可清除毒性物质、能分泌具有促进肝细胞生长活性的物质等<sup>[8]</sup>.

该系统是将培养肝细胞置于体外循环装置, 即生物反应器中, 患者血液/血浆流过生物反应器时, 通过半透膜或直接接触与培养肝细胞间进行物质交换, 从而起到理想的人工肝支持作用<sup>[9]</sup>.

**3.2 生物人工肝存在问题** 肝细胞是生物型人工肝的核心部分, 目前国外使用最多的是猪肝细胞<sup>[10]</sup>, 动物实验及个别临床研究均未见明显的副反应, 其原因可能系暴发性肝衰竭患者免疫功能低下, 不易引起明显的免疫反应. 由于存在着种属差异, 加上有时暴发性肝衰竭患者血清对培养肝细胞的毒性作用可使其很快失去活性, 使用动物肝细胞的支持作用并不令人十分满意, 因此建议在临床

研究及应用中最好使用同种肝细胞. 成人肝在国外仅用作肝移植的供体, 由手术过程获得的人类肝细胞虽经分离培养证实可以用于生物型人工肝, 但其数量及质量显然有限.

无论是动物还是人类肝细胞培养时均存在生长条件要求严格、存活时间及产量有限、难以传代等缺点, 而一些肝肿瘤细胞株恰可弥补上述不足, 且来源广泛, 培养后能迅速达到人工肝支持所需的数量标准, 并且具有正常肝细胞的某些功能. 如HepG2细胞株不仅可替代肝细胞的代谢解毒功能, 而且可在患者血浆中存活并生长的特性, 被认为是较理想的肝细胞替代物. C3A细胞株具有良好的肝细胞特异功能, 如分泌白蛋白, 参与尿素、糖原合成等. 将其用于4例伴III-IV度肝性脑病的暴发性肝衰竭患者的人工肝支持, 结果患者脑病症状得到改善, 其中1例存活<sup>[11]</sup>. 但由于肿瘤来源肝细胞株的特异性功能常与肝组织不同, 有的肝细胞株系病毒感染转化而成, 有的则可使实验动物发生癌变. 故一般不主张将肝细胞瘤细胞株用于生物人工肝, 据悉美国已限制使用C3A细胞株.

生物人工肝的缺点: 一是使用体外培养的异种/异源肝细胞以及肿瘤细胞可能引起的异体排斥反应, 并可能有潜在的人畜共患疾病及致癌的危险. 二是体外培养细胞替代自然肝脏的能力有限, 而且受肝细胞培养技术、大规模生产、保存和运输的生物材料限制, 使生物人工肝的临床推广受到一定限制. 三是肝衰竭患者体内积累的大量代谢产物及毒性物质难以在有限的交换中由培养肝细胞解毒, 反过来还可能对培养肝细胞的存活及生物学功能产生不利影响.

### 3.3 生物人工肝的优化

**3.3.1 混合型生物人工肝** 人工肝的发展史说明了不管是物理型、中间型人工肝, 还是生物人工肝, 都有着各自的优势和缺陷, 应该去劣存优.

将早期偏重于解毒作用的人工肝支持方法与生物型人工肝相结合, 组成混合型(或杂交型)生物人工肝, 可使人工肝的生物合成转化功能及解毒作用更加完善<sup>[12]</sup>. 迄今, 已有将血液透析滤过、血浆交换、活性炭吸附等方法与生物型人工肝相结合的研究报道. 其中, 由血浆分离器、活性炭、肝细胞生物反应器等组成的混合型BLSS, 设计较为合理, 效果也更为理想.

Demetriou *et al*<sup>[13]</sup>用混合型生物人工肝对10例严重肝衰竭患者进行人工肝支持治疗, 结果7例患者顺利等到了肝移植, 1例完全恢复, 并于6 mo后实施了选择性肝移植, 存活率达到80%. 另2例患者虽因并发败血症、多器官衰竭和可卡因试验阳性未能实行肝移植手术而死亡, 但其存活时间也分别延长了3和4 wk. Watanabe *et al*<sup>[14]</sup>对三组肝衰竭患者进行人工肝支持, 结果显示: I组等待紧急肝移植的暴发性肝衰竭患者18例, 16例经支持治疗神经系统症状均好转, 中心静脉压降低, 脑灌注压增高, 血氨下降, 肝移植成功, 另有1例自然恢复; II组等待再次肝移植的暴发性肝衰竭患者3例取得类似的成功; III组10例慢性肝功能衰竭患者经支持症状改善, 但8例因并发多器官衰竭和败血症, 未能进行肝移植而死亡, 另

2例恢复并择期实施了肝移植. 如上所述, 人工肝的研究已经取得了重大进展, 新一代混合型BLSS已成为人工肝的发展方向, 其作为肝移植可靠的过渡支持手段也被愈来愈多的临床资料所证明. 从理论上讲, 只要能进一步解决肝细胞的来源数量、培养细胞的活性保存以及生物反应器强化设计等问题, BLSS就有可能为肝衰竭患者的肝再生提供最大的希望.

**3.3.2 生物人工肝中的细胞来源** 如前所述, 细胞作为开放系统, 对其环境具有一定的适应性和依赖性, 因此, 针对患者血清条件培养的细胞应选用适应人类血清条件的人类肝脏干细胞, 而不是异种肝细胞. 另外, 干细胞是处于整个细胞系统发展时空中的早期阶段, 相对后期已分化的成熟肝细胞, 还有着较强的增生复制潜能和适应能力.

细胞的培养需要一定的细胞数量效应、合适的立体架构和微环境. 细胞的数量效应体现在细胞作为开放系统是互相连接和交换各种物质能量信息的, 低于一定的培养密度, 不管培养条件如何的好, 细胞缺乏彼此的支持和联结, 仍会相继凋亡. 同时, 在培养肝细胞时, 给予适当的支持细胞是可以增加其存活时间的. 对于肝细胞而言, 提供其立体空间架构和巨大的吸附面, 能减少细胞彼此对资源的竞争, 增加彼此的协调, 提高培养效率. 微环境和肝细胞之间时刻存在着各种输入和输出, 比如各种生物活性分子(细胞因子、激素等)、血液中各种代谢产物、机体吸收的营养成分等等, 另外, 细胞所处环境能提供其各种信息, 细胞为求适应其环境, 从而可按照人们设想的目标去分化. 体外人工培养肝细胞时, 难以实现体内的真实环境, 但是针对以上原则的任何改进, 都将大大改善生物人工肝细胞来源的问题.

### 3.4 优化策略

**3.4.1 合适的空间立体结构改善生物人工肝中细胞的培养条件** 新分离的肝细胞在悬液中由于缺乏立体支架而难以维持其活性及功能, 临床试用仅能短时间改变肝功能不全患者的肝脏功能. 单层培养肝细胞在细胞的生物活性、增生能力方面均明显优于肝细胞悬液, 直接培养于肝衰竭患者的血浆中, 可使患者血浆中的氨基酸紊乱得到纠正. 但缺点是单位面积细胞数较少, 且不便随意取出. 采用微载体培养肝细胞, 不仅能明显增加培养肝细胞的数量, 而且能通过提供立体支撑作用维持肝细胞良好的形态特征, 保持蛋白合成和胆红素代谢功能1 mo以上<sup>[15]</sup>. 在肝细胞分离后采用抑制肝细胞单层贴壁方法, 可促进其相互聚集成多细胞球形, 该培养系统中肝细胞立体排列, 能较好地维持形态并产生相互作用. 球形聚集肝细胞与微载体肝细胞均有很高的组织化程度, 有明显的分化增生能力, 能长期(50 d)维持正常的生物学功能, 尤其具有取用方便的优点, 因此是生物人工肝系统理想的细胞培养方法<sup>[16]</sup>.

除此之外, 近年来空心纤维培养技术也被应用于肝细胞培养系统, 即在数百根中空纤维的外侧空间播种肝细胞, 中空纤维内灌流培养液, 通过多孔质的中空纤维补充营养及氧分, 以维持肝细胞生存. 该方法同样实现了肝细

胞高密度、长期高活性培养, 且实用性更强<sup>[17]</sup>. 尽管经过近十年的努力, 肝细胞分离、高密度培养以及生物反应器等BLSS的关键技术已得到初步的解决, 临床应用救治数例暴发性肝衰竭患者取得了成功, 但迄今尚无单独应用治疗重型肝炎的研究报道.

**3.4.2 微环境和细胞间支持对细胞的增生和诱导作用** 最近的研究揭示骨髓细胞通过移植能发育成为肝细胞. 然而, 骨髓细胞分化成为肝细胞的机制尚不清楚. 一种合适的培养骨髓细胞分化成为肝细胞的培养方法对理解这种分化机制和体外有效扩增骨髓中的肝前体细胞起着重要作用. 最近发现HGF受体(c-Met)和AFP表达的细胞存在于成年大鼠骨髓中. 也发现这些细胞能表达造血干细胞的分子标志如CD34, Thy-1和c-Kit. 用HGM培养基结合HGF和EGF, 已成功的从成年大鼠骨髓中增生诱导了肝细胞样细胞, 通过免疫细胞化学方法在这些细胞中检测到了白蛋白的表达, 通过RT-PCR方法检测到了TO(tryptophan-2, 3-dioxygenase)和TAT(tyrosine aminotransferase)的表达, 后二者是肝细胞终端分化的标志. 因此, 这种培养基可以成为肝细胞移植疗法中一种有用的培养基.

Masahiro Miyazaki *et al*<sup>[18]</sup>建立了一种诱导培养骨髓细胞分化成为肝细胞的方法, 研究了肝细胞生长因子HGF等细胞因子对骨髓细胞诱导分化的作用. HGF开始是作为一种肝细胞的有丝分裂因子发现和克隆的, 后来发现他在肝脏的发育和再生中起着关键的作用, 具有促进分化和细胞成形的作用, 除了对肝细胞外, 对许多其他类型的表达HGF受体(c-Met)的细胞都如此. 在以前的研究中, Miyazaki发现成年大鼠的骨髓中含有c-Met表达的细胞, 对他们进行体外HGF诱导能产生白蛋白, 且这些细胞能表达CK8和CK18等正常成年肝细胞所特异表达的分子. 最近, Miyazaki *et al*改善了培养条件, 能有效的增生骨髓来源的肝脏前体细胞, 并且诱导其分化成为成熟肝细胞, 表达TO和TAT等肝细胞终端分化的分子标志.

通过改善培养基成分促进干细胞增生和分化成为特殊细胞型是目前研究很热的一个课题. 最近, 国外有人改善了培养条件, 能有效将骨髓细胞分化成为肝细胞, 也能有效繁殖成年肝细胞. DF培养基(DMEM和F12培养基的混合)含有诸多营养成分的平衡, 被广泛应用在不同类型的细胞. 含有HGF的DF培养基能很好的支持骨髓细胞生长和分化成为肝细胞样细胞<sup>[19]</sup>. HGM培养基最开始是为了克隆成年大鼠的原代肝细胞而设计的. 这个培养基能使细胞在其中活跃的繁殖, 在HGF、EGF、TGF- $\alpha$ 和苯巴比妥等存在的条件下能将原代肝细胞重新分化. HGM培养基含有烟碱, 他能有效支撑细胞繁殖, 也能促进成年大鼠的肝细胞在其中繁殖. HGM培养基中也含有地塞米松, 他有很强的刺激原代肝细胞DNA合成的作用. 其他成分如ITS(Insulin胰岛素、transferrin转铁蛋白、selenium硒)、脯氨酸和微量元素Zn, Mn和Cu, 他们在原代肝细胞生存繁殖和骨髓细胞增殖分化中起作用.

用HGM作为基础培养基,已成功诱导骨髓细胞分化形成肝细胞样的细胞克隆,并且能表达终端分化标志如T0和TAT,而这在DF培养基中从来没有检测到过.而且,这些克隆的数量和大小也远大于在DF培养基中的克隆.这些说明HGM更适合诱导骨髓细胞分化为肝细胞.

最近的研究表明不同细胞间的相互作用调节着细胞生长、迁移和分化.在正在发育的肝脏和成人肝脏中,细胞的相互作用在器官功能协调中起着关键作用.因此,通过恰当的组合搭配生长因子、细胞因子以及通过一定的细胞间作用,以便进一步改善体外大量培养肝细胞的条件,是非常重要的.

总之,肝脏细胞移植和生物型人工肝在肝功能衰竭治疗中的基础研究和临床应用发展较快,但下列一些问题亟待解决:体外分离培养人源性肝脏干细胞并建立其定向诱导分化为成熟肝细胞的技术,为肝病的细胞移植和生物人工肝治疗提供合适的细胞来源.完善肝脏细胞的体外高密度培养技术.探索肝脏细胞的定向移植方法,提高移植细胞在受体肝脏中的存活数量和增生能力.解决肝细胞在体外培养系统中的长期存活问题.

运用系统的观点,利用生物技术,抓住肝功能衰竭两大主要矛盾联合使用两种细胞疗法以促使病情向良性循环发展,在肝细胞移植疗法中采用干细胞移植辅以支持细胞的混合移植方法,在混合型生物人工肝中优化人类肝细胞的存活条件和规模数量,必将在不久的将来为广大肝衰患者带来福音.

#### 4 参考文献

- Makowka L, Rotstein LE, Falk RE, Falk JA, Langer B, Nossal NA, Blendis LM, Phillips MJ. Reversal of toxic and anoxic induced hepatic failure by syngeneic, allogeneic and xenogeneic hepatocyte transplantation. *Surgery* 1980;88:244-253
- Mito M, Ebata H, Kusano M, Onishi T, Saito T, Sakamoto S. Morphology and function of isolated hepatocytes transplanted into rat spleen. *Transplantation* 1979;28:499-505
- 周晓东, 余丽君. 肝细胞移植的细胞来源与适应证. *中华肝脏病杂志* 2003;11:368
- Mizuguchi T, Hui T, Palm K, Sugiyama N, Mitaka T, Demetriou AA, Rozga J. Enhanced proliferation and differentiation of rat hepatocytes cultured with bone marrow stromal cells. *J Cell Physiol* 2001;189:106-119
- 王宇明, 陈耀凯. 肝细胞移植的进展与挑战. *中华肝脏病杂志* 2003;11:326-327
- Bismuth H, Figueiro J, Samuel D. What should we expect from a bioartificial liver in fulminant hepatic failure? *Artif Organs* 1998;22:26-31
- Nyberg SL, Peshwa MV, Payne WD, Hu WS, Cerra FB. Evolution of the bioartificial liver: the need for randomized clinical trials. *Am J Surg* 1993;166:512-521
- Cao S, Esquivel CO, Keeffe EB. New approaches to supporting the failing liver. *Annu Rev Med* 1998;49:85-94
- Dixit V, Gitnick G. Artificial liver support: state of the art. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1996;220:101-114
- Corno V, Donini A, Vianello V, Gonano C, Bonfreschi V, Pasqualotto A, Risaliti A, Belvedere O, Degrassi A, Bresadola F. Bioartificial liver based on porcine hepatocyte: in vitro functional assessment. *Transplant Proc* 1998;30:2469-2470
- Kelly JH, Sussman NL. The Hepatic extracorporeal liver assist device in the treatment of fulminant hepatic failure. *ASAIO J* 1994;40:83-85
- Gerlach J. Hybrid liver support. *Int J Artif Organs* 1996;19:1-2
- Demetriou AA, Rozga J, Podesta L, Lepage E, Morsiani E, Moscioni AD, Hoffman A, McGrath M, Kong L, Rosen H. Early clinical experience with a hybrid bioartificial liver. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1995;208:111-117
- Watanabe FD, Mullon CJ, Hewitt WR, Arkadopoulos N, Kahaku E, Eguchi S, Khalili T, Arnaout W, Shackleton CR, Rozga J, Solomon B, Demetriou AA. Clinical experience with a bioartificial liver in the treatment of severe liver failure. A phase I clinical trial. *Ann Surg* 1997;225:484-491
- Kino Y, Sawa M, Kasai S, Mito M. Multiporous cellulose microcarrier for the development of a hybrid artificial liver - using isolated hepatocytes. *J Surg Res* 1998;79:71-76
- Ijima H, Nakazawa K, Mizumoto H, Matsushita T, Funatsu K. Formation of a spherical multicellular aggregate (spheroid) of animal cells in the pores of polyurethane foam as a cell culture substratum and its application to a hybrid artificial liver. *J Biomater Sci Polym Ed* 1998;9:765-778
- Gerlach JC. Long-term liver cell cultures in bioreactors and possible application for liver support. *Cell Biol Toxicol* 1997;13:349-355
- Miyazaki M, Akiyama I, Sakaguchi M, Nakashima E, Okada M, Kataoka K, Huh NH. Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298:24-30
- Ferry N, Hadchouel M. Liver regeneration: with a little help from marrow. *J Hepatol* 2002;36:695-697

编辑 张海宁