论著

文章编号:1000-5404(2005)09-0856-04

建立人鼠嵌合肝动物模型的实验研究

蒋 黎,毛 青,王宇明,李俊刚,刘 俊 (第三军医大学西南医院全军感染病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 人胎肝细胞移植到具有正常免疫活性的大鼠体内是否不需要免疫抑制剂而能够存活。**方法** Wistar大鼠出生前宫内腹腔注射人胎肝细胞,诱导胎鼠对人胎肝细胞产生免疫耐受,出生后24 h内经脾移植人胎肝细胞。**结果** 采用免疫印迹法(Western blotting)、逆转录PCR(reverse transcription PCR, RT-PCR)及免疫组织化学等方法,于不同时相点检测实验大鼠血清人白蛋白、肝组织中人白蛋白mRNA及人肝细胞型细胞角蛋白CK18。结果于4、6、8周龄大鼠血清中测出人白蛋白;4、6、8、10周龄大鼠肝组织中测出人白蛋白mRNA;4、6、8、10、12周龄大鼠肝组织中有CK18的表达。**结论** 采用诱导胎鼠出生前对人胎肝细胞产生免疫耐受,出生后移植人胎肝细胞的方法,使移植到具有正常免疫活性大鼠体内的人胎肝细胞,不需免疫抑制剂而能够存活,并且保持人肝细胞的特性,产生人白蛋白,维持近12周。初步建立人鼠嵌合肝动物模型。

关键词: 嵌合;肝细胞移植;动物模型/鼠

中图法分类号: R-332; R617; R657.3 **文献标识码:** A

Establishment of an animal model of tolerant rats with chimeric human liver

JIANG Li, MAO Qing, WANG Yu-ming, LI Jun-gang, LIU Jun (Institute of Infectious Disease, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To determine whether genetically normal immunocompetent rodent hosts could be manipulated to accept human fetal hepatocyte transplants and survive without immunosuppression. **Methods** Tolerance to human hepatocytes was established by injection of human fetal hepatocytes into the peritoneal cavities of fetal Wistar rats. Corresponding cells were subsequently transplanted into newborn rats *via* intrasplenic injection within 24 h after birth to establish tolerant rats with chimeric human liver. **Results** Transplanted human fetal hepatocytes in rat livers were visualized at different time with different assays after birth. Human albumin protein was detected in rat serum by Western blotting from week 4 to 8. Human albumin mRNA was detected in rat livers by RT-PCR from week 4 to 10, and cell keratin from human hepatocyte of cytokeratin 18 was also detected in rat livers by immunohistochemical staining from week 4 to 12. **Conclusion** Human fetal hepatocytes could be introduced into an immunocompetent rats at the appropriate time during fetal development, which could be rendered tolerant and serve as suitable hosts to human hepatocyte transplants after birth without either genetic or pharmacological generalized immunosuppression, and the survival time of functional human hepatocytes was 12 weeks.

Key words: chimeric; hepatocyte transplantation; animal model; rat

近年来,利用模式动物进行异种肝细胞移植已成为肝脏疾病治疗研究的一个重要方向[1]。许多学者尝试将人肝细胞移植到动物体内形成"嵌合肝",作为嗜肝病毒感染的动物模型[2]。人鼠嵌合肝动物模型的建立,解决了肝炎病毒感染种族特异性的问题,可用于乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)的研究[2,3],有极其广阔的运用前景。因此本实验采用宫内注射人胎肝细胞,诱导具有正常免疫活性的胎鼠出生前对人胎肝细胞产生免疫耐受,出生后移植人胎肝细胞的方法,建立人鼠嵌合肝动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

生育期Wistar大鼠购自我校实验动物中心。交配后孕鼠单独关养于铁笼。选择Wistar大鼠孕龄14~18 d,体质量250~300 g者为实验对象。

1.2 动物模型及标本留取

1.2.1 人胎肝细胞 采用体外两步灌注法[4]分离人胎肝细

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30271173)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30271173)

作者简介: 蒋 黎(1974-),女,重庆市人,硕士研究生,主治医师,主要从事病毒肝炎发病机制以及肝炎病毒动物模型方面的研究。电话:(023)68754475-8007

通讯作者: 毛 青,电话:(023)68754142

收稿日期: 2004-05-17; **修回日期:** 2005-03-28

胞,并用液氮罐保存以备用。实验时取出冻存的人胎肝细胞,移入离心管,缓慢加入4 ℃培养液等倍稀释,30×g离心3 min,弃上清液,重复2次;重新混悬于培养液中。于倒置相差显微镜下用血细胞计数板计算肝细胞的数量,台盼蓝拒染法计算胎肝细胞的存活率,超过80%的用于实验(其中90%为胎肝实质细胞)。

1.2.2　诱导胎鼠免疫耐受　　对孕龄14~18 d的Wistar大鼠进行吸入乙醚麻醉。碘酒和乙醇消毒皮肤,铺巾,沿孕鼠腹白线逐层依次剪开,暴露子宫。用注射器将50 μl人胎肝细胞培养液(含1×10^7个细胞)缓慢经孕鼠子宫壁注射到胎鼠腹腔内,逐层缝合孕鼠腹腔。至孕鼠自然生产。

1.2.3　人胎肝细胞移植　　胎鼠出生后24 h内,把胎鼠置于碎冰上2~5 min冷冻麻醉,将100 μl人胎肝细胞培养液(含1×10^7个细胞)经皮肤注射入胎鼠脾脏。

1.2.4　标本收集　　胎鼠出生2周时,部分实验大鼠处死取心血、肝组织,而对同一母体来源的其它实验大鼠尾静脉采集外周血。4周龄始并每间隔1周取静脉血和肝组织1次,至14周。静脉血从尾静脉采取,肝组织在乙醚吸入麻醉下行肝部分切除术获得。将血离心,收集血清于-20 ℃保存。新鲜肝组织石蜡包埋切片做免疫组织化学染色,其余的装入冻存管液氮保存。

同时收集出生前经人胎肝细胞诱导免疫耐受但出生后未经移植人胎肝细胞的大鼠,以及正常生产的大鼠的标本作为对照。

1.3　检测指标及方法

1.3.1　Western blotting蛋白免疫印迹法检测血清人白蛋白

在丙烯酰胺终浓度为10%的SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳)中分离人白蛋白条带。每个加样孔加25 μl变性后的样品,接上电源,在10 mA恒流下电泳。当溴酚蓝前沿到达分离胶后,调整电流为15 mA,直至溴酚蓝到达凝胶的底部,切断电源,取出凝胶。

蛋白质印迹和化学发光显色:建立转移塔层,依次为海绵、滤纸、胶、硝酸纤维膜(NC膜)、滤纸、海绵;在转印槽中100 V低温电转1 h,卸下电泳装置。根据人白蛋白的位置,确定所测蛋白所在区域,切割NC膜。封闭液(含0.5%脱脂奶的TTBS)封闭NC膜上多余的结合位点;NC膜浸入用封闭液稀释(1∶2 500)的鼠抗人白蛋白单克隆抗体(Sigma, St. Louis公司)中,置室温过夜;TTBS洗涤NC膜4次,每次室温下15 min;NC膜浸入用封闭液稀释(1∶1 000)的辣根过氧化酶与兔抗鼠IgG的抗体偶联物(Sigma, St. Louis公司)中,置室温60 min;TTBS洗涤NC膜4次,每次室温下15 min。室温以PBS洗NC膜15 min,用Super-Signal® Western化学发光底物系统(HyClone-PIERCE公司)显迹。

1.3.2　免疫组织化学检测肝组织人肝细胞型角蛋白CK18

采用链酶菌亲生物素蛋白-过氧化酶法(S-P法)免疫组织化学染色(S-P试剂盒,Maixin公司)。获取新鲜鼠部分肝组织用10%多聚甲醛固定,石蜡包埋后切片,常规脱蜡,洗涤,过氧化氢阻断10 min,加鼠抗人细胞角蛋白18(cytokeratin 18, CK18)单克隆抗体(Maixin公司)4 ℃过夜,然后加第二抗体,底物用DAB。最后以苏木精复染,中性树胶封片,光镜下观察染色情况。

1.3.3　RT-PCR检测肝组织人白蛋白mRNA

检测移植了人胎肝细胞的免疫耐受鼠肝脏中,是否有人白蛋白mRNA表达。

按照Tripure RNA提取试剂(Roch公司)操作说明抽提大鼠肝组织总RNA,采用Promega一步法RT-PCR试剂盒(Promega公司)进行逆转录扩增。引物参照Ouyang等[5]的设计,由上海Sangon公司合成。人白蛋白mRNA引物,正向引物Hs:5′-CCTTGGTGTTGATTGCCTTGCTC-3′,逆向引物Ha:5′-CATCACATCAAC-CTCTGGTCTCACC-3′,扩增目的片断为315 bp;正常大鼠白蛋白mRNA引物,正向引物Rs:5′-CGGTTTAGGGACTTAGGAGAACAGC-3′,逆向引物Ra:5′-ATAGTGTCCCAGAAAGCTGGTAGGG-3′,扩增目的片断为388 bp。PCR扩增条件:48 ℃逆转录45 min,95 ℃变性2 min,而后95℃变性1 min;55 ℃退火1 min;72 ℃延伸1 min;共35个循环,最后72 ℃延伸7 min。采用未加入AMV反转录酶的扩增作为阴性对照以排除假阳性的可能。产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色后于凝胶成像仪上获取图像。

2　结果

2.1　不同时期嵌合鼠的存活及各项指标的检测

因第2周龄鼠太小,无法活体获取肝组织或足够血进行检验,只有处死后才能留取标本。对同一母体来源在2周龄处死的大鼠中必须检测到人白蛋白,剩余大鼠才会继续喂养,并纳入实验组观察样本中,否则处死该组其它的大鼠直到出现检测阳性为止。14周龄实验大鼠检测各项指标均为阴性,故统计时段为4~12周龄大鼠。

4~12周龄实验大鼠血清人白蛋白、肝组织CK18及人白蛋白mRNA指标检测中,任意两种或以上指标为阳性即能证明人肝细胞不同程度的在大鼠肝组织嵌合。从6只孕鼠所生的53只实验大鼠中,有37只表明嵌合成功,嵌合成功率为69%。在同一时相点3项检测指标均为阳性的嵌合鼠4周龄时有17只,6周龄时新出现11只,而8周龄时有9只,均不是新出现的鼠。故37只嵌合鼠中有28只在不同时相点能够同时用不同检验方法发现人肝细胞的存在,同时说明6周龄时嵌合鼠中人肝细胞的数量较高,功能活性较好。37只嵌合成功的实验大鼠血清人白蛋白、肝组织CK18及人白蛋白mRNA 3种检测指标在不同时相点的检出例数及检出率,结果见表1。

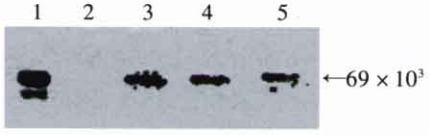
表1　嵌合鼠各检测指标的阳性例数和检出率

Tab 1　Detection of transplanted human fetal hepatocytes in rat liver with different assays

Time after birth of rat (week)	Western blotting for human albumin in rat serum		Immunohistochemical staining for human CK18 in rat liver		RT-PCR for human mRNA in rat liver	
	Positive number	Positive rate (%)	Positive number	Positive rate (%)	Positive number	Positive rate (%)
4	21	56.8	23	62.2	19	51.4
6	26	70.3	32	86.5	28	75.7
8	11	29.7	25	67.6	19	51.4
10	0	0	14	37.8	4	10.8
12	0	0	1	2.7	0	0

2.2 Western blotting 蛋白免疫印迹法检测血清人白蛋白

2周龄时实验大鼠血清中即可检测到人白蛋白(69 kb),10周龄时则未再检出。而对1只实验大鼠观察,4、6、8周龄血清中可连续检测到人白蛋白,而正常大鼠血清中未能检测到人白蛋白(图1)。嵌合鼠4、6、8周龄血清人白蛋白的检出率分别是56.8%、70.3%、29.7%。



1: Standard human albumin; 2: Normal rat; 3: 4 week chemeric rat; 4: 6 week chemeric rat; 5: 8 week chemeric rat

图1 Western blotting 检测鼠血清人白蛋白结果

Fig 1 Detection of human albumin protein in rat serum by Western blotting

2.3 免疫组织化学方法检测肝组织 CK18

2周龄处死的实验大鼠肝组织中即能检测到 CK18 的表达。同1只实验大鼠4、6、8、10、12周龄可连续出现肝组织 CK18 表达(图2)。嵌合鼠4、6、8、10、12周龄 CK18 的检出率分别是62.2%、86.5%、67.6%、37.8%、2.7%。对照组病理切片同时进行检测。肝组织 CK18 阳性细胞在嵌合鼠肝组织中发现,而正常大鼠及经免疫耐受但出生后未经人肝细胞移植的大鼠肝组织未能发现。嵌合鼠 CK18 阳性物质主要位于肝细胞的胞质中,有的呈颗粒状聚集在细胞两极或散在于细胞质中,有的呈细丝状贯穿于细胞或包绕着细胞核。

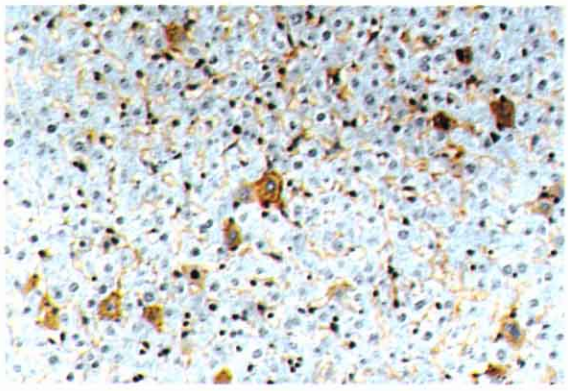
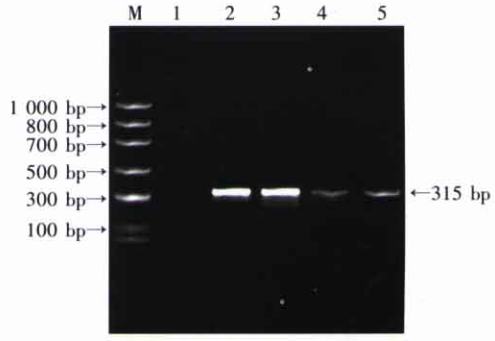


图2 免疫组化检测出生前经免疫耐受,且出生后进行肝细胞移植的6周龄大鼠肝组织 CK18 的表达。图中棕黄色为 CK18 阳性细胞 (S-P×200)

Fig 2 Immunohistochemical staining for human cytokeratin 18 in rat that was tolerant and transplanted with human fetal hepatocytes, sacrificed on 6 week after-birth (S-P×200)

2.4 RT-PCR 检测肝组织人白蛋白 mRNA

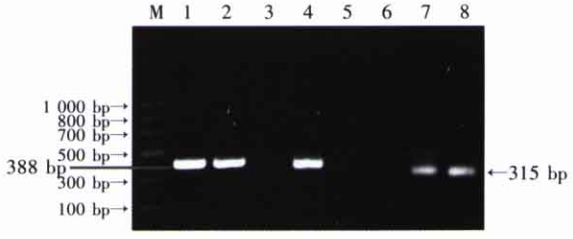
2周龄处死的实验大鼠肝组织中即可检测到人白蛋白 mRNA,12周龄时则无。同1只实验大鼠4、6、8、10周龄可连续出现肝组织人白蛋白 mRNA 条带(315 bp,图3)。分别采用人和大鼠白蛋白 mRNA 引物作 RT-PCR 时,可在实验大鼠肝组织中检测到相应的人白蛋白 mRNA 条带(315 bp)及大鼠白蛋白 mRNA 条带(388 bp,图4)。



M: 1 kb markers; 1: Rats of intrauterine injection, but non-transplantation of human fetal hepatocytes after birth; 2: 4 week chemeric rat; 3: 6 week chemeric rat; 4: 8 week chemeric rat; 5: 10 week chemeric rat

图3 各时相点 RT-PCR 检测大鼠肝组织人白蛋白 mRNA

Fig 3 Human albumin mRNA expression in the rat livers by RT-PCR



M: 1 kb marker; 1 – 4: Ampified with rat albumin primer; 5 – 6: Ampified with human albumin primer; 1 and 5: Nomal rat; 2 and 6: Rat of intrauterine injection, but non-transplantion of human fetal hepatocytes after birth; 3 and 7: Nomal human; 4 and 8: Chimeric rat

图4 RT-PCR 检测肝组织人白蛋白和鼠白蛋白 mRNA

Fig 4 RT-PCR for human and rat albumin mRNA products in live tissues

3 讨论

把人肝细胞移植到鼠肝体内建立人鼠嵌合肝既往曾有报道,但主要是移植到基因敲除小鼠或是免疫缺陷小鼠、抑或是两者的杂交品系体内。这些利用免疫缺陷小鼠建立的人鼠嵌合肝模型,人肝细胞重构于小鼠肝内,能够在体内人肝细胞的微环境研究肝炎病毒,这有别于病毒感染黑猩猩及其它动物模型,使动物模型的发展有了新的突破。但因免疫系统在肝炎病毒的发病过程中占有重要地位,故使其应用研究受到限制;且免疫缺陷小鼠杂交的紊乱以及近35%的新生 SCID

小鼠死亡率使得此类模型的操作较为艰难。国外近期报道人肝细胞异种移植不再需要宿主的免疫缺陷或是实施免疫抑制,经过出生前胚胎免疫耐受的宿主可避免免疫排斥的发生[5]。到目前为止,国内尚无类似的报道。

Owen 最早观察到天然免疫耐受现象,其后在 1953 年人们成功地复制了胚胎期免疫耐受的动物模型。实验证明[6]于子宫内对胚胎腹膜腔注射供体细胞,出生后即产生如前所述的针对供体细胞特异免疫耐受。胚胎时期通过宫内接触到外来抗原而对其产生特异性免疫耐受的机制可能归因于"T 淋巴细胞克隆消除"[7]。关于对胚胎注射供体细胞的时机,既往有异位皮肤移植研究认为鼠胚胎发育 14 ~ 16 d 时较为满意,其既能产生针对异种供体细胞的特异耐受,又能够让外源性的移植皮肤长期存活。Ouyang 等[5]表明在鼠胚胎 15 ~ 17 d 时注射原代人肝细胞,出生后移植人原代肝细胞,可建立针对人肝细胞的免疫耐受。而我们的实验显示 14 ~ 18 d 的胚胎鼠都可建立针对人胎肝细胞的免疫耐受。

肝脏是人体白蛋白惟一的合成器官,血浆白蛋白可代表肝脏的合成和储备功能。蛋白质合成是判断肝细胞功能非常敏感的指标,因为蛋白质的合成是个复杂的耗能过程,包括氨基酸的跨膜转运、多肽链的合成等。采用 Western bloting 从 4、6、8 周龄实验大鼠血清中测出人白蛋白及 RT-PCR 从 4、6、8、10 周龄实验大鼠肝组织中测出人白蛋白基因 mRNA,能够直观说明人肝细胞在大鼠肝组织中不仅存活,而且具有正常人肝细胞一定的生物学功能。

正常成人肝脏中,肝细胞的中间丝细胞骨架仅有 CK8 和 CK18 构成;而胆管上皮除含有上述两种 CK 外,还表达 CK7 和 CK19。这两组细胞类型的 CK 组型过去被认为能在各种生理、病理状态下保持恒定不变,因此 CK8 和 CK18 被称为"肝细胞型"CK,CK7 和 CK19 被认为"胆管型"。本研究中 CK18 阳性细胞仅出现在人肝组织和 4、6、8、10、12 周龄实验大鼠肝组织中,而对照组大鼠肝组织中无表达。证明嵌合鼠中人肝细胞的存在。同时嵌合鼠和人肝组织可检测到人白蛋白 mRNA,充分表明人白蛋白的分泌来源于移植于大鼠肝组织中的人胎肝细胞。

我们的实验采用 Wistar 大鼠出生前宫内注射人胎肝细胞的方法,诱导胎鼠对人胎肝细胞产生免疫耐受,出生后经脾移植人胎肝细胞,通过对人肝细胞固有成分以及肝细胞代谢产物的检测,实验大鼠嵌合成功率为 69%(37/53),37 只嵌合鼠中有 28 只在不同时相点能够同时用不同检验方法发现人肝细胞的存在。证实胎鼠出生前接触到人胎肝细胞,出生后可对人胎肝细胞产生免疫耐受,并且允许人胎肝细胞移植到体内,不需要免疫抑制剂而能够存活。同时移植的人胎肝细胞具有人肝细胞一定的生物学功能。由于嵌合于鼠肝细胞中的是正常人肝细胞,对肝炎致病因子易感,可感染 HBV[8],并有望利用人鼠嵌合肝模型进行其他已知和未知肝炎致病因子的研究。

参考文献:

[1] Dandri M, Burda M R, Torok E, *et al*. Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and *in vivo* infection with hepatitis B virus[J]. Hepatology, 2001, 33(4): 981 - 988.

[2] Mercer D F, Schiller D E, Elliott J F, *et al*. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers[J]. Nat Med, 2001, 7(8): 927 - 933.

[3] Dandri M, Burda M R, Gocht A, *et al*. Woodchuck hepatocytes remain permissive for hepadnavirus infection and mouse liver repopulation after cryopreservation[J]. Hepatology, 2001, 34(4 Pt 1): 824 - 833.

[4] 王宇明, 陈国政, 董家鸿, 等. 分离肝细胞的一种体外灌流法[J]. 中华消化杂志, 1994, 14(3): 175.

[5] Ouyang E C, Wu C H, Walton C, *et al*. Transplantation of human hepatocytes into tolerized genetically immunocompetent rats[J]. World J Gastroenterol, 2001, 7(3): 324 - 330.

[6] Wu C H, Ouyang E C, Walton C, *et al*. Liver cell transplantation-novel animal model for human hepatic viral infections[J]. Croat Med J, 2001, 42(4): 446 - 450.

[7] Kim H B, Shaaban A F, Milner R, *et al*. In utero bone marrow transplantation induces donor-specific tolerance by a combination of clonal deletion and clonal anergy[J]. J Pediatr Surg, 1999, 34(5): 726 - 729.

[8] 蒋　黎, 毛　青, 王宇明, 等. HBV 感染的人鼠嵌合肝动物模型的建立[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(5): 封 2.

(编辑　王　红)