文章编号:1000-5404(2007)10-0899-04

论著

肝细胞移植联合肝再生增强因子治疗大鼠急性肝功能衰竭的研究

王志毅[1],张 艳[1],石小枫[1],刘 杞[2] (重庆医科大学:[1]附属第二医院感染科,[2]病毒性肝炎研究所,教育部感染性疾病分子生物学重点实验室,重庆 400010)

提 要:目的 探讨同种异体肝细胞腹腔移植联合肝再生增强因子(augmenter of liver regenration, ALR)对D-氨基半乳糖(D-gal)诱导的急性肝功能衰竭大鼠的治疗作用。**方法** 采用D-gal诱导大鼠急性肝功能衰竭,诱导后24 h,59只大鼠随机数字表法分成4组。Ⅰ组15只:腹腔注射生理盐水;Ⅱ组15只:经腹腔移植2×10^7肝细胞,以后腹腔注射生理盐水;Ⅲ组15只:经腹腔移植2×10^7肝细胞,同时腹腔注射ALR 50 $\mu g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$;Ⅳ组14只:腹腔注射ALR50 $\mu g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$。观察大鼠的存活率、肝脏功能、移植肝细胞存活情况、病理变化。**结果** Ⅱ组、Ⅲ组大鼠存活率(46.7%、66.7%)显著高于Ⅰ组(0.0%)($P=0.006$;$P=0.0002$),Ⅲ组(66.7%)与Ⅳ组(14.3%)有显著差异($P=0.008$),其他组间无明显差异($P>0.05$)。移植后第1、2天Ⅱ组腹水AST高于Ⅲ组($P=0.001$),Ⅱ组第1、2天腹水ALT高于Ⅳ组,Ⅱ组、Ⅲ组第1、2天腹水TBil高于Ⅰ组($P<0.05$)。Ⅲ组肝脏病理改变轻于其他组。Ⅲ组大鼠腹腔移植的肝细胞存活数多于Ⅱ组。**结论** 同种异体肝细胞经腹腔移植联合ALR可明显改善D-gal诱导的肝衰竭大鼠的存活率,促进移植肝细胞存活和增殖,促进肝组织及功能恢复。

关键词: 肝细胞移植;肝再生增强因子;急性肝功能衰竭
中图法分类号: R575.305;R657.3;R977.6 **文献标识码:** A

Combining hepatocyte transplantation intraperitoneally and augmenter of liver regeneration for acute hepatic failure in rats

WANG Zhi-yi[1], ZHANG Yan[1], SHI Xiao-feng[1], LIU Qi[2] ([1]Department of Infectious Diseases, The Second Affiliated Hospital, [2]Key Laboratory of Molecular Biology for Infectious Diseases, Ministry of Education, Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of allogeneic hepatocyte transplantation (HcT) plus augmenter of liver regenration (ALR) intraperitoneally on acute hepatic failure (AHF) induced by D-galactosamine (D-gal) in rats. **Methods** AHF was induced by D-gal in SD rats. HcT was received 24 h after intoxication, and the AHF rats were divided into four groups randomly. Group Ⅰ received normal saline (NS) intraperitoneally. Group Ⅱ received 2×10^7 hepatocytes intraperitoneally and daily NS. Group Ⅲ received 2×10^7 hepatocytes intraperitoneally and daily intraperitoneal injection of ALR ($50\ \mu g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$) simultaneously. Group Ⅳ received daily intraperitoneal injection of ALR ($50\ \mu g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$). The survival rate of rats, the survival rate of transplanted hepatocytes, liver function and liver histology of all rats were observed. **Results** Survival rate of Group Ⅱ, Group Ⅲ was higher than that of Group Ⅰ (46.7%, 66.7% *vs* 0.0%, $P=0.006$, $P=0.0002$), that of Group Ⅲ was higher than Group Ⅳ (66.7% *vs* 14.3%, $P=0.008$), without significant difference among other groups. Ascitic aspartate aminotransferase (AST) of Group Ⅱ was higher than that of Group Ⅲ on day 1, 2 after transplantation ($P=0.001$). Ascitic alanine aminotransferase (ALT) of Group Ⅱ was higher than that of Group Ⅳ on day 1, 2 after transplantation ($P<0.05$). Ascitic total

基金项目: 国家自然科学基金(30170843),重庆市重点项目[渝科发计字[2001]38号]
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30170843) and the Key Research Project of Chongqing [2001]38]
作者简介: 王志毅(1963-),女,重庆市人,博士,副教授,主要从事病毒性肝炎方面的研究。电话:(023)63825854, E-mail:zhanginf@sohu.com
通讯作者: 刘 杞,电话:(023)63825854, E-mail: liuqiz@hotmail
收稿日期: 2006-11-21;**修回日期:** 2007-01-23

bilirubin of Group Ⅱ, Group Ⅲ was higher than that of Group Ⅰ ($P<0.05$). Hepatic histologic changes of Group Ⅲ was improved more than other groups. The function and histologic changes of transplanted hepatocytes were obviously improved in Group Ⅲ as compared with that of Group Ⅱ. **Conclusion** After HcT plus ALR intraperitoneally, the survival rate of AHF rats intoxicated with D-gal was increased, and their liver function and histologic changes were also improved. ALR improved the survival and proliferation of transplanted hepatocytes.

Key words: hepatocyte transplantation; augmenter of liver regenration; acute hepatic failure

目前,肝脏移植是治疗严重肝衰竭的最有效方法,但由于供体来源短缺、价格昂贵及手术创伤大等原因,使肝脏移植广泛开展受到限制。肝细胞移植(hepatocyte transplantation, HcT)具有简单易行、应用灵活、对受体影响小及价格相对低廉等特点,近年来得到较快发展,成为继原位肝移植后又一治疗各种肝功能衰竭的有效和有应用前景的方法[1-3]。本研究采用 D-氨基半乳糖(D-gal)诱导大鼠急性肝功能衰竭(acute hepatic failure, AHF),经腹腔移植同种异体肝细胞联合肝再生增强因子(augmenter of liver regenration, ALR)进行治疗,观察移植肝细胞存活情况、大鼠存活率、肝脏功能、病理变化,以期为临床开展肝细胞移植提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要试剂

雄性 SD 大鼠,65 只,体质量 170~230 g,由本校实验动物中心提供,实验室温度 20~25 ℃,实验前 12 h 禁食。Ⅳ型胶原酶购自 Gibco 公司,D-gal 购于重庆医科大学化学教研室,ALR、DMEM(H)由肝炎研究所供给,Hepes 购自 Amresco 公司。ALT、AST、TBil 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 建立急性肝功能衰竭模型 大鼠腹腔内注射不同剂量(1.0、1.2、1.4、1.4 g/kg)的 D-gal,根据动物死亡率、肝脏病理及肝功能损害选择大鼠急性肝功能衰竭的最适诱导剂量。

1.2.2 肝细胞的分离纯化 选用 170~230 g 雄性 SD 大鼠 6 只,采用改良二步胶原酶半原位循环灌注法。经门静脉插管,用 D-Hanks 液(含 Hepes10 mmol/L, 0.019% EDTA, 37 ℃, pH 7.4)灌注至肝脏成米黄色,游离肝脏至平皿,换为含 0.02% Ⅳ型胶原酶、2.5 mmol/L Hepes 的 Hanks 液(37 ℃, pH 7.4)持续循环灌注 10 min。移肝脏至 4 ℃ DMEM(H)液的平皿中,制成混合细胞悬液,分别以 100 目和 200 目网过滤,50 × g 离心 3 min,弃上清,4 ℃ DMEM(H)液重悬,清洗并反复离心 3 次,再以 4 ℃ DMEM(H)重悬,做细胞涂片 HE 染色判断肝实质细胞纯度,用 0.4% 台盼蓝(Trypan Blue)染色判断细胞活率,用血细胞计数板数细胞浓度并计算细胞产量。

1.2.3 肝细胞移植 59 只大鼠在 D-gal 诱导肝衰竭后 24 h,随机数字表法分为 4 组,Ⅳ组 14 只,其他组各 15 只。Ⅰ组:腹腔注射生理盐水,第 1 天 2 ml,以后每天 0.5 ml,连续 6 d;Ⅱ组:经腹腔移植 2×10^7 肝细胞,以后 5 d 腹腔注射生理盐水 0.5 ml/d;Ⅲ组:经腹腔移植 2×10^7 肝细胞,同时腹腔注射 ALR 50 $\mu g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ 共 6 d,后 5 d ALR 用 NS 稀释成 0.5 ml;Ⅳ组:腹腔注射 ALR50 $\mu g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ 共 6 d,第 1 天用 NS 稀释成 2 ml,后 5 d 用 NS 稀释成 0.5 ml。每组大鼠全用于观察 2 周存活率及组织学检查。大鼠死亡时立即腹腔用 NS 2 ml 冲洗,留取冲洗液,2 000 r/min离心 10 min,沉淀做细胞涂片,上清液(腹水)做生化检查。

1.2.4 肝脏功能测定 大鼠死亡时立即心腔穿刺取血,或 2 周处死大鼠时摘眼球取血,用赖氏法测丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST),溴甲酚绿法测总胆红素(TBil)。取 6 只正常大鼠作正常对照。腹水也测 ALT、AST、TBil。

1.2.5 组织学检查 取大鼠肝脏标本,用 10% 中性甲醛固定,常规方法作 HE 染色。腹腔冲洗液沉淀细胞涂片做 HE 及糖原染色(PAS)。取网膜包裹团块、游离黄豆大小团块用 Carnoy 液固定,做 PAS 染色。

1.3 统计学分析

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用方差分析或非参数检验。计数资料采用 Fisher 确切概率计算。用 SPSS 12.0.1 软件作统计学分析。

2 结果

2.1 药物诱导剂量的确定及肝细胞得率

根据大鼠死亡率、肝脏病理及肝功能损害指标选择 1.0 g/kg 的 D-gal 为大鼠急性肝功能衰竭的最适诱导剂量。本实验肝细胞得率为$(0.8\sim2.4)\times10^8$细胞/鼠;细胞活率为 90%~95%;肝实质细胞纯度 >95%。

2.2 大鼠存活率

所有大鼠于药物诱导 24 h 后,活动减少,嗜睡、食欲减退。36 h 后逐步进入昏迷状态,部分伴尿失禁、尿色深黄,口腔、泌尿生殖道出血,死亡时间大多在 48~96 h 之间。Ⅰ组大鼠药物诱导 96 h 内全部死亡。Ⅱ组、Ⅲ组、Ⅳ组 2 周存活率分别为 46.7%(7/15)、66.7%(10/15)、14.3%(2/14)(表 1)。各组间 2 周存活率的两两比较,按 Bonferroni 法调整检验水准 α 为 0.008 3。Ⅱ组、Ⅲ组大鼠存活率显著高于Ⅰ组($P=0.006$, $P<0.008\ 3$; $P=0.0002$, $P<0.008\ 3$),Ⅲ组与Ⅳ组有显著差异($P=0.008$, $P<0.008\ 3$),余组间无差异($P>0.008\ 3$)。

表 1　肝细胞移植后 2 周内大鼠存活情况（只）

分组	n	存活时间（移植后）					2 周存活率%
		1 d	2 d	3 d	7 d	14 d	
Ⅰ组	15	8	1	0	0	0	0
Ⅱ组	15	13	9	7	7	7	46.7[a]
Ⅲ组	15	15	11	10	10	10	66.7[b]
Ⅳ组	14	9	5	2	2	2	14.3[c]

a：$P=0.006$，与Ⅰ组比较；b：$P=0.0002$，与Ⅰ组比较；c：$P=0.006$，与Ⅲ组比较

2.3　肝脏功能变化

移植后第 1、2 天各组血清 ALT、AST、TBil 均明显升高，但组间无显著性差异（$P>0.05$），第 14 天存活大鼠血清、腹水 ALT、AST、TBil 与正常大鼠血清的无显著性差异（$P>0.05$）。肝细胞移植后第 1、2 天各组腹水 AST 总体上有差异（$F=7.358$，$P=0.0134$，$P<0.05$，见表 2），Ⅰ组、Ⅱ组与Ⅲ组间有显著差异（Tukey 法，$P=0.0178$，$P<0.05$；$P=0.0048$，$P<0.05$），Ⅱ组与Ⅳ组有显著差异（$P=0.014$，$P<0.05$），余组间无差异（$P>0.05$）。第 1、2 天腹水 ALT 各组总体上有差异（$\chi^2=10.712$，$P=0.0134$，$P<0.05$），Ⅱ组与Ⅳ组有显著差异（Dunnett C，$P=0.045$，$P<0.05$），余组间无差异（$P>0.05$）。肝细胞移植后第 1、2 天腹水 TBil 各组总体上有差异（$F=5.44$，$P=0.007$，$P<0.05$），Ⅱ组、Ⅲ组分别与Ⅰ组比较有显著性差异（Tukey 法，$P=0.013$，$P<0.05$；$P=0.011$，$P<0.05$），余组间无显著性差异（$P>0.05$）。

表 2　肝衰竭大鼠细胞移植后与正常大鼠肝脏生化指标比较（$x\pm s$）

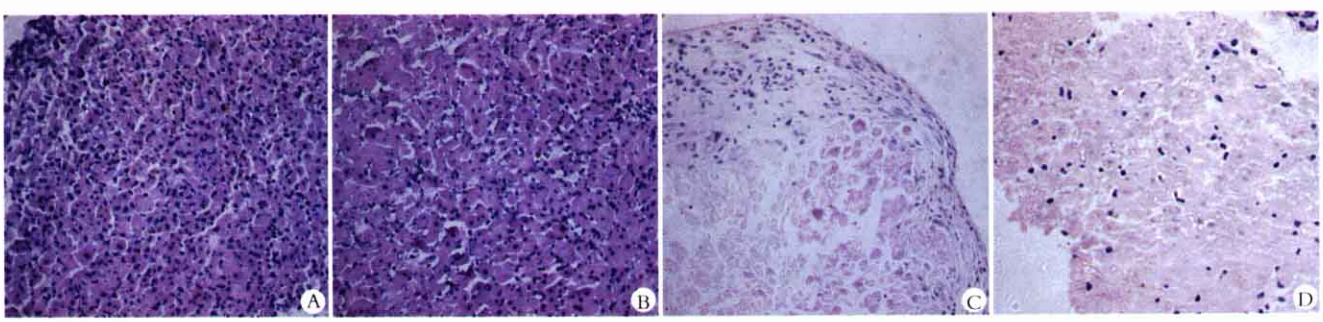
标本	血清 d2			腹水 d2			血清 d14			腹水 d14		
	ALT	AST	Tbil	ALT	AST	Tbil	ALT	AST	Tbil	ALT	AST	Tbil
正常大鼠血清	10.8±6.8	48.1±9.9	8.3±1.2	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Ⅰ组	1551.4±912.4	1003.0±730.2	100.6±151.9	108.6±103.5	526.2±227.1	3.4±1.6	–	–	–	–	–	–
Ⅱ组	2320.0±1741.6	1291.4±667.5	57.7±18.0	309.2±280.7	591.7±179.9	17.3±9.9[a]	9.7±5.0	37.7±5.7	11.6±5.1	5.6±1.9	24.4±8.2	3.5±1.0
Ⅲ组	1200.0±415.7	663.3±315.6	50.9±12.8	138.7±42.2	132.0±53.6[ab]	16.6±5.0[a]	7.8±2.6	26.8±9.4	8.2±2.9	7.0±5.3	26.0±9.5	5.0±0.2
Ⅳ组	1713.3±1116.6	968.9±308.6	52.6±20.9	53.8±25.1[b]	216.7±307.7[b]	10.6±4.8	–	–	–	–	–	–

a：$P<0.05$，与Ⅰ组比较；b：$P<0.05$ 与Ⅱ组比较

2.4　组织学改变

各组在 D-gal 诱导后第 2、3 天，肝脏小叶结构破坏，肝索紊乱，肝细胞大块变性坏死，以坏死为主，变性为细胞质疏松，可见空泡，核固缩或碎裂。由汇管区开始淋巴细胞、中性粒细胞等炎性细胞浸润，坏死区亦见炎性细胞浸润。肝窦扩张，可呈网眼状，见淤血、出血肝细胞移植后第 3 天，Ⅲ组肝脏组织病变轻于其他组，部分标本亦可见肝细胞坏死明显轻于其他组，表现为肝小叶结构尚清楚，肝细胞变性为主，坏死灶小，炎性细胞浸润少，充血出血轻。第 14 天各存活大鼠肝脏结构恢复正常。

Ⅱ组、Ⅲ组在移植后第 1～3 天，腹腔内有游离的黄豆大小的黄白色团块及网膜包裹团块，团块经 PAS 染色见肝细胞，细胞成簇排列，周围可见枯否细胞、淋巴细胞等炎性细胞浸润（图 1A－D），Ⅲ组存活的肝细胞数明显多于Ⅱ组，且炎性细胞浸润轻于Ⅱ组。腹腔冲洗液沉淀涂片 HE 染色Ⅱ组、Ⅲ组均见存活的肝细胞，Ⅰ组、Ⅳ组涂片仅见炎性细胞，无肝细胞。第 14 天打开腹腔不见游离团块，可见到网膜裹聚团块，PAS 染色发现团块内肝细胞变性坏死，难见完整肝细胞，坏死肝细胞被纤维组织包裹，仅Ⅲ组部分可见少量形态正常的肝细胞。第 14 天腹腔冲洗液沉淀涂片 HE 染色Ⅲ组仍可见形态正常的肝细胞，而Ⅱ组未见肝细胞。



A：Ⅱ组移植后第 2 天；B：Ⅲ组移植后第 2 天；C：Ⅱ组移植后第 14 天；D：Ⅲ组移植后第 14 天

图 1　不同时间腹腔内植入的肝细胞观察（PAS×400）

3 讨论

肝细胞移植用于治疗各种原因引起的AHF，对肝功能衰竭起着代偿和支持作用；又可以纠正由于肝代谢酶缺陷引起的遗传性代谢疾病[3-5]。本实验采用的是改良二步胶原酶半原位灌注法，获得肝细胞纯度高，活性好，节约胶原酶用量，减少消化对肝细胞的损伤。目前肝细胞移植最有效的途径是脾实质内移植[5]。但AHF经脾移植操作复杂，移植细胞数量少，且并发症严重，使脾脏移植不能在临床应用。我们采用腹腔移植，其移植细胞数量较大，操作简便，并发症少，大鼠腹腔内无明显的粘连，不影响以后肝脏移植。本实验显示肝细胞腹腔移植联合ALR能提高AHF大鼠存活率，提示临床开展此途径移植肝细胞有一定的可行性和较高的安全性。

ALR是新近发现的一种促肝再生因子，文献[6]报道ALR重组质粒能降低CCl_4所致AHF大鼠的死亡率，促进肝再生，减少ALT、AST。本实验Ⅱ组、Ⅲ组大鼠存活率显著高于Ⅰ组，虽然Ⅱ组、Ⅲ组间大鼠存活率无差异，但Ⅲ组存活率明显高于Ⅳ组，而Ⅱ组、Ⅳ组间无差异，说明肝细胞联合ALR更有效地促进AHF大鼠的恢复，提高存活率。

D-gal诱导后2、3 d各组大鼠肝生化指标ALT、AST、TBil升至最高，移植后14天完全恢复正常，与临床AHF相似。虽然Ⅱ组、Ⅲ组的移植后1、2 d血清肝生化指标无改善，但腹水ALT Ⅱ组高于Ⅳ组；腹水ASTⅢ组明显低于Ⅰ组、Ⅱ组；Ⅱ组、Ⅲ组腹水TBil均高于Ⅰ组，说明腹腔植入肝细胞坏死释放转氨酶及胆红素，引起腹腔局部肝生化指标升高，ALR能减少植入肝细胞的破坏，维持其功能，促进增殖。

从组织学改变来看，移植后第3天Ⅲ组较其他组的肝脏病理改变更轻，且腹腔内肝细胞结节中存活的肝细胞数更多，肝细胞周围炎性细胞浸润较少；移植后14 d腹腔冲洗液沉淀涂片仍可见形态正常的肝细胞；网膜包裹肝细胞结节内有部分存活的肝细胞。而Ⅱ组于2周腹腔内未能发现完整肝细胞。提示肝细胞移植联合ALR能促进ALF大鼠肝脏组织和功能恢复，ALR刺激肝细胞增殖。体外实验显示ALR以剂量依赖方式刺激QGY、HepG2肝癌细胞株增殖，但对原代大鼠肝细胞无刺激增殖作用[7]。本实验显示体内ALR可刺激肝细胞增殖，其机制可能为：我们用的ALR剂量更大，肝细胞植入体内后受到多种因子和炎性细胞的作用，使植入肝细胞表达ALR受体。文献[8,9]报道ALR能抑制NK细胞活性，促进枯否细胞产生IL-6和TNF-α，减轻植入肝细胞的排斥反应，促进其存活和增殖。

综上所述，肝细胞腹腔移植联合ALR可有效地治疗大鼠急性肝衰竭，提高存活率，促进肝再生，改善肝脏组织和功能，ALR刺激移植肝细胞增殖。药物性大鼠肝衰竭模型能较好地模拟人体病情，所采用的同种异体移植方式较接近于临床移植中供体、受体实际情况[10]，为临床开展肝细胞移植研究提供了新的方法。有关ALR的免疫调节作用有待于进一步研究。

参考文献：

[1] Strom S, Fisher R. Hepatocyte transplantation: new possibilities for therapy[J]. Gastroenterology, 2003, 124(2): 568-571.

[2] Allen K J, Soriano H E. Liver cell transplantation: the road to clinical application [J]. J Lab Clin, 2001, 138(5): 298-312.

[3] Nagata H, Ito M, Cai J, *et al*. Treatment of cirrhosis and liver failure in rats by hepatocyte xenotransplantation [J]. Gastroenterology, 2003, 124(2): 422-431.

[4] Hughes R D, Mitry R R, Dhawan A. Hepatocyte transplantation for metabolic liver disease: UK experience[J]. J R Soc Med, 2005, 98(8): 341-345.

[5] Fisher R A, Strom S C. Human hepatocyte transplantation: worldwide results[J]. Transplantation, 2006, 82(4): 441-449.

[6] Zhang L M, Liu D W, Liu J B, *et al*. Effect of naked eukaryotic expression plasmid encoding rat augmenter of liver regeneration on acute hepatic injury and hepatic failure in rats[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(24): 3680-3685.

[7] Liu Q, Yu H F, Sun H, *et al*. Expression of human augmenter of liver regeneration in pichia pastoris yeast and its bioactivity *in vitro*[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(21): 3188-3190.

[8] Tanigawa K, Sakaida I, Masuhara M, *et al*. Augmenter of liver regeneration (ALR) may promote liver regeneration by reducing natural killer (NK) cell activity in human liver diseases[J]. J Gastroenterol, 2000, 35(2): 112-119.

[9] Wang C P, Zhou L, Su S H, *et al*. Augmenter of liver regeneration promotes hepatocyte proliferation induced by Kupffer cells[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(30): 4859-4865.

[10] 张 莹，别 平，石承先，等. “二袖套法”制备大鼠原位肝移植模型的方法改进[J]. 消化外科, 2005, 4(6): 444-446.

（编辑 郭建秀）