论著

文章编号:1000-5404(2009)18-1724-04

HepaRG细胞移植治疗鼠特异性Fas抗体诱导的小鼠急性肝衰竭

蒋 黎,兰 林,李俊刚,王宇明,刘国栋 (第三军医大学西南医院全军感染病研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨HepaRG细胞移植对鼠特异性Fas抗体诱导的急性肝衰竭小鼠的治疗作用和人肝细胞异种移植的策略。**方法** 利用特异性鼠抗Fas抗体(Jo2 mAb)腹腔注射,剂量为0.3 mg/kg,诱导20只SCID小鼠制备急性肝衰竭模型,24 h内按照实验动物随机数字表分组方法,经脾移植2×10^6 HepaRG细胞的小鼠为实验组(10只),未经HepaRG细胞移植的小鼠为对照组(10只)。观察小鼠的存活率、肝脏功能、肝组织变化情况。实验组移植4周免疫组化检测肝组织人白蛋白、人CK18、人Hep Par 1的表达,免疫荧光检测人白蛋白的表达。**结果** 实验组小鼠有9只存活超过4周,而对照组小鼠3 d内先后死亡9只,实验组血清ALT和AST趋于正常,显著低于对照组($P<0.01$),且存活时间显著高于对照组($P<0.01$)。实验组经HepaRG细胞移植能避免Jo2 mAb所致肝组织出血、坏死,移植后4周免疫组化可见人白蛋白、CK18、Hep Par 1阳性表达细胞,肝组织免疫荧光可见人白蛋白阳性细胞的表达。**结论** 移植HepaRG细胞可治疗Jo2 mAb腹腔注射小鼠诱导的急性肝衰竭,HepaRG细胞不仅在小鼠肝内存活,且得以增殖。

关键词: 肝细胞移植;Fas抗体/Jo2 mAb;急性肝衰竭;动物模型/鼠
中图法分类号: R-332;R575.3;R617 **文献标识码:** A

HepaRG cells engraftment treats acute liver failure in severe combined immunodeficient mice after mouse-specific anti-Fas antibody inducement

JIANG Li, LAN Lin, LI Jun-gang, WANG Yu-ming, LIU Guo-dong (Institution of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of engrafting human liver cancer cell line HepaRG on mouse-specific anti-Fas monoclonal antibody (Jo2 mAb) induced acute liver failure(ALF) in the severe combined immunodeficient (SCID) mice and investigate the heteroplastic strategy of human hepatocyte. **Methods** ALF was induced by injecting Jo2 mAb (0.3 mg/kg) intraperitoneally in SCID mice. Mice from experimental group ($n=10$) received 2×10^6 HepaRG cells engraftment in the spleen within 24 h after Jo2 mAb administration, and another 10 ALF mice served as control. The survival rate of mice, liver function and liver morphology of all mice were observed. At 4 weeks post-engraftment, HepaRG cells was characterized by S-P immunohistochemical staining for human albumin, human cytokeratin 18 and human Hep Par 1, meanwhile, immunofluorescence staining for human albumin. **Results** Nine transplanted mice were survival in 4 weeks after treatment and 9 non-transplanted mice were dead successively within 3 d. Compared to control group, survival time was prolonged significantly and serum liver enzyme levels was reduced significantly either of experimental group ($P<0.01$). HepaRG cells engraftment protected mice from Jo2 mAb mediated liver hemorrhage and hepatocyte apoptosis in contrast to matched nonengrafted mice. In 4 weeks post-engraftment, human albumin, CK18 and specific human Hep Par 1 were found by immunohistochemistry staining, so was human albumin by immunofluorescence staining. **Conclusion** HepaRG cells transplantation prolongs the survival time and attenuates histological changes of Jo2 mAb-induced ALF mice. The transplanted HepaRG cells may well survive and regenerate for some period.

Key words: hepatocytes transplantation; anti-Fas antibody/Jo2 mAb; acute liver failure; animal model/mouse

基金项目: 国家自然科学基金(30470882)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470882)

作者简介: 蒋 黎,女,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事肝炎发病机制和病毒性肝炎动物模型方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68754475-8007,E-mail:jl618cq@yahoo.com.cn
通信作者: 王宇明,电话:(023)68754475-8000,E-mail:wym417@163.com

收稿日期: 2009-05-18;**修回日期:** 2009-06-03

近年来,利用小鼠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]。临床所见的暴发性肝衰竭约 70% 由病毒性肝炎所致,然而其机制并非病毒的直接损伤,而主要为感染的肝细胞通过细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)引起肝组织的凋亡和坏死[2]。细胞凋亡涉及 Fas、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)等细胞因子的参与,而特异性鼠抗 Fas 抗体(Jo2 mAb)腹腔注射小鼠不会导致肝外组织器官明显损伤,却可造成小鼠肝细胞大面积的凋亡,可作为模拟人暴发性肝衰竭的有效的动物模型[3]。本研究将人肝癌细胞株 HepaRG 细胞移植到 Jo2 mAb 诱导的急性肝衰竭的小鼠脾脏内,观察 HepaRG 细胞移植对小鼠肝衰竭的治疗作用,以及 HepaRG 细胞在小鼠肝内的生长和增殖。

1　材料与方法

1.1　实验动物

BALB/c 品系的 SCID 小鼠 20 只,4 ~ 6 周龄,体质量 15 ~ 20 g,购自北京实验动物中心,本校实验动物中心 SPF 级动物房分笼饲养,自由饮水。

1.2　主要试剂与仪器

HepaRG 细胞株购自 Biopredic 公司(雷恩,法国),DMEM、Trypsin EDTA 购自 Gibco 公司,胎牛血清购自 HyClone 公司,一次性培养瓶及培养板购自 Gibco 公司,TUNEL 试剂盒(Roche 公司),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(中杉公司),鼠抗人肝细胞(Hep Par 1)单克隆抗体、鼠抗人细胞角蛋白 18(CK18)抗体(DAKO 公司),羊抗人白蛋白(ALB)抗体(Bethyl 公司),异硫氰酸荧光素(FITC)标记的兔抗羊 IgG 抗体(Invitrogen 公司),特异性鼠抗 Fas 抗体(Jo2 mAb,BD Pharmingen 公司)。倒置相差显微镜、荧光显微镜及显微摄影装置(Olympus 公司),激光共聚焦显微镜(Zeiss 公司),全自动生化分析仪(Hitachi 公司)。

1.3　实验方法

1.3.1　HepaRG 细胞复苏　　取出冻存的 HepaRG 细胞,37 ℃迅速解冻,移入离心管,200 × *g* 离心 3 min,弃上清。缓慢加入 4 ℃培养液等倍稀释,200 × *g* 离心 3 min,弃上清液,重复 2 次;重新混悬于培养液中,终浓度为 2×10^4/μl。

1.3.2　小鼠急性肝损伤模型的制备与细胞移植　　20 只小鼠腹腔给予 Jo2 mAb 注射,剂量为 0.3 mg/kg,制备小鼠急性肝损伤模型。24 h 内按照实验动物随机数字表分组方法分为 2 组:①实验组:10 只,乙醚吸入麻醉,小鼠腹白线逐层剪开,暴露脾,自脾系膜缘进针,向脾体和脾尾方向,将 100 μl HepaRG 培养液(含 2×10^6 细胞)缓慢注入,明胶海绵轻压注射点,逐层缝合。②对照组:10 只,未行肝细胞移植。

1.4　检测指标

1.4.1　肝脏功能的检测　　对照组和实验组小鼠处死时取心血,于全自动化生化仪检测丙氨酸转移酶(ALT)和门冬氨酸转移酶(AST)水平。

1.4.2　肝组织 HE 染色和原位末端标记方法检测细胞凋亡　　4% 多聚甲醛固定肝组织,经石蜡包埋、切片,苏木精和伊红染色(HE 染色),光镜下常规病理检查。按照 TUNEL 试剂盒说明书操作,最后常规 DAB 显色,苏木精复染,中性树胶封固,可在显微镜下观察细胞核中棕黄着色的凋亡细胞。

1.4.3　免疫组织化学检测小鼠肝组织人 ALB、CK18、Hep Par1 的表达　　采用链酶菌亲生物素蛋白-过氧化酶法免疫组织化学染色(S-P),获取新鲜鼠肝组织用 4% 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。分别加羊抗人白蛋白抗体(滴度 1∶200)、抗 CK18(滴度 1∶100)、抗 Hep Par1(滴度 1∶100)抗体工作液为一抗,4 ℃过夜。PBS 替代一抗作为阴性对照。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。

1.4.4　免疫荧光检测鼠肝组织人 ALB 表达　　新鲜肝组织用冰冻切片 4 ~ 8 μm,室温放置 30 min 后,加入 4 ℃丙酮固定 10 min,37 ℃下封闭血清孵育 20 min,滴加羊抗人白蛋白抗体(滴度 1∶400) 4 ℃过夜,加荧光标记二抗,FITC 标记的兔抗羊 IgG(滴度 1∶200),37 ℃暗室下孵育 45 min。缓冲甘油封片,激光共聚焦显微镜下观察。PBS 替代一抗作阴性对照。

1.5　统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行 Wilcoxon 秩和检验。

2　结果

2.1　小鼠存活状况

小鼠经 Jo2 mAb 0.3 mg/kg 腹腔注射后,出现不同程度的懒动、倦怠、厌食,实验组于 24 h 内 HepaRG 细胞移植后,除 1 只因手术时出血较多,于手术后 2 h 死亡外,余 9 只在移植后第 2 天食欲、活动逐渐恢复,存活直到移植后 4 周,其 4 周存活率为 90%,存活时间为(25.30 ± 8.53)d。而对照组小鼠在 3 d 内有 9 只小鼠先后死亡,有 1 只小鼠存活到 4 周,其 4 周存活率为 10%,存活时间为(4.50 ± 8.29)d。2 组存活时间差异有统计学意义($P < 0.01$,图 1)。

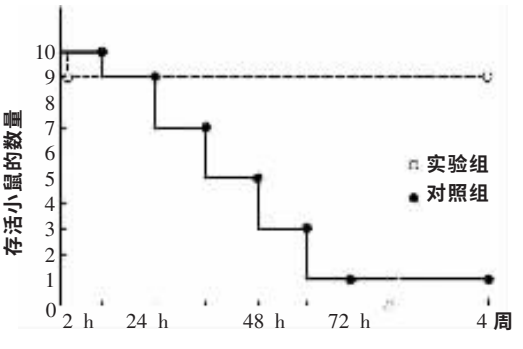
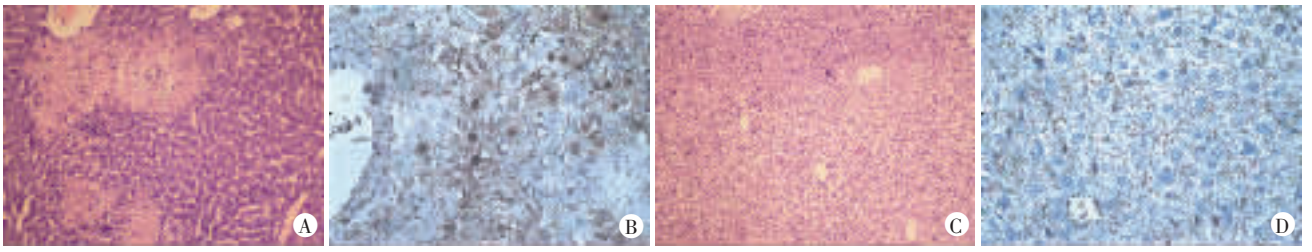


图 1　实验组和对照组小鼠 Jo2 mAb 腹腔注射后存活数量比较

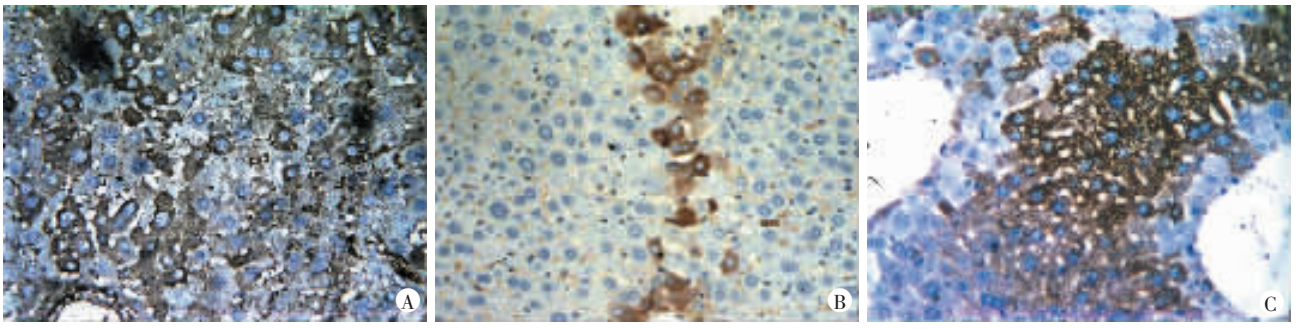
2.2　小鼠急性肝衰竭模型的评价

对照组死亡时取血和肝组织,实验组小鼠经 Jo2 mAb 腹腔注射后,1 只在手术时死亡,另 9 只均在移植 4 周取血和肝组织进行检测。对照组 3 d 内死亡的 9 只小鼠血清 ALT 和 AST 均明显升高[分别为(1 399.22 ± 574.26)、(1 338.77 ± 582.28)IU/L],而实验组除外手术后死亡小鼠,4 周处死时 ALT 和 AST 基本正常[分别为(42.25 ± 12.32)、(45.37 ± 9.59)IU/L],2 组转氨酶水



A:对照组(HE×100);B:对照组(TUNEL×200);C:实验组(HE×100);D:实验组(TUNEL×200)

图2 实验组和对照组小鼠肝组织的病理观察



A:抗人 ALB 表达;B:抗人 CK18 表达;C:抗人 Hep Par1 表达

图3 免疫组化观察实验组小鼠 HepaRG 细胞移植后4周肝组织人 ALB、CK18、Hep Par1 的表达 (S-P×200)

平差异有统计学意义($P<0.01$)。对照组肝组织 HE 染色显示肝细胞大面积点、片状坏死,中央小静脉、肝窦和叶间静脉扩张、出血,肝细胞结构模糊,弥漫性炎细胞浸润,大量 TUNEL 染色阳性棕黄色凋亡信号分布于细胞核。实验组4周 HE 染色显示肝组织结构完整,无明显坏死灶,管腔无明显扩张,只见少量充血,TUNEL 染色阴性(图2)。

2.3 实验组小鼠肝组织免疫组织化学检测人 ALB、CK18、Hep Par1 的表达

移植后4周实验组的9只小鼠,鼠肝组织免疫组化均能检测到人 ALB、CK18 以及人 Hep Par1 的阳性表达,主要位于肝细胞的细胞质中,呈棕黄色(图3)。

2.4 实验组小鼠肝组织免疫荧光检测人 ALB 的表达

实验组小鼠4周处死后,经 FITC 标记荧光二抗,人 ALB 阳性细胞质在激光共聚焦显微镜的蓝色滤光片下显示为绿色荧光,与周围小鼠肝细胞界限清楚,细胞核未着色(图4)。

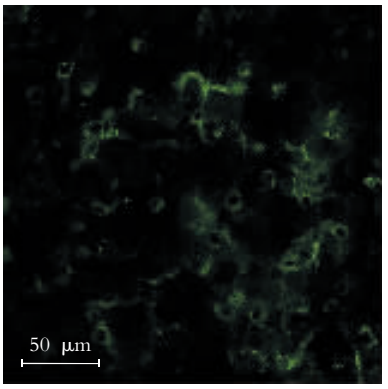


图4 实验组小鼠 HepaRG 细胞移植后4周肝组织免疫荧光染色观察

3 讨论

Fas 是一种细胞表面信号分子,属于肿瘤坏死因子受体超家族成员[4]。当与 Fas 配体或特异性抗体(如 Jo2 mAb)结合后,Fas 启动细胞凋亡[5],在肝细胞凋亡或损伤中发挥着极其重要的作用。Jo2 mAb 是从仓鼠体内衍生而制的针对鼠特异性致凋亡的抗体[6],且具有明显的嗜肝性。Jo2 mAb 诱导的肝衰竭模型能够较好地模拟人感染肝炎病毒所致的急性肝衰竭,目前在肝病研究中颇受重视[7,8]。本研究采用 Jo2 mAb 腹腔注射小鼠,对照组大部分小鼠3 d 内先后死亡,血清转氨酶急剧升高,肝组织 HE 染色显示肝脏结构模糊,肝细胞大面积点、片状坏死,中央小静脉、肝窦和叶间静脉扩张、出血,弥漫性炎细胞浸润,大量 TUNEL 染色阳性棕黄色凋亡信号分布于细胞核,说明该方法可复制类似人类急性肝衰竭的小鼠模型,相对 2/3 肝脏切除以及四氯化碳所致的急性肝衰竭小鼠模型效果相当,且操作方便,简单易行,与文献[9]报道一致。同时,实验组经 HepaRG 细胞移植后,小鼠存活时间延长,移植后4周转氨酶水平趋于正常,HE 染色肝组织结构完整,无明显坏死灶,管腔只轻微扩张,少量出血,说明 HepaRG 细胞移植能够治疗鼠特异性 Fas 抗体诱导的小鼠急性肝衰竭,提高小鼠生存率,改善肝脏病理组织和功能,为急性肝衰竭的研究和治疗提供了理想

的实验动物模型。

在活性细胞移植治疗肝脏疾病的研究领域中,获得理想的供体细胞,使其在受体体内增殖、分化,替代部分受损肝细胞的功能一直是该领域研究的重点[10-12]。目前颇受关注的将人肝细胞移植到小鼠体内建立人鼠嵌合肝动物模型,也须解决如何使人肝细胞在鼠体内长时间存活并保持功能,才是作为理想动物模型的首要条件。在探索人肝细胞异种移植的道路上,我们曾采用人胎肝细胞移植到经免疫耐受的正常大鼠体内[13],并试图感染乙肝病毒[14],观察生化学变化。但人胎肝细胞具有一定的伦理学限制,且在异种动物体内增殖有限,使该模型受到限制。HepaRG 细胞是从慢性丙型肝炎感染的肝癌患者体内分离的细胞株,与正常的肝细胞相比具有相似的形态学和生理学功能,其极低的致瘤性,较弱的免疫源性,以及较强的增殖能力可作为研究细胞移植再生体外模型的良好供体[15]。我们用 HepaRG 细胞移植到 Fas 介导的肝衰竭动物模型中,不仅改善了肝衰竭小鼠的存活率,同时实验组 4 周可在鼠肝组织中发现人白蛋白、CK18 以及特异性人肝细胞表达的阳性细胞,说明 HepaRG 细胞移植后在小鼠体内存活、增殖,具有正常肝细胞一样的合成功能,参与受体小鼠的肝组织的重建,因为检测白蛋白可代表肝脏的合成和储备功能,而 CK18 是构成肝细胞中间丝细胞骨架的细胞角蛋白,且 Hep Par1 是人肝细胞特异性抗原之一[16]。这种人肝细胞异种移植建立人鼠嵌合肝的策略,国内鲜有报道。我们的后续研究也证实,HepaRG 细胞不但可治疗 Jo2 mAb 所致的小鼠急性肝衰竭,还能在小鼠体内生长、增殖,并且通过优化移植条件,人源性肝细胞在鼠肝脏内的嵌合率可进一步提高,并可持续相当长的一段时间。

综上所述,采用 Jo2 mAb 腹腔注射小鼠诱导建立急性肝衰竭的模型能较好的模拟人急性肝衰竭的病理状况。将人 HepaRG 细胞移植到 Jo2 mAb 诱导的急性肝衰竭的小鼠脾脏,这种异体移植方式较接近于临床移植中供、受体实际情况,为临床开展肝细胞移植研究提供了新的方法。观测 HepaRG 细胞移植对小鼠肝衰竭的治疗作用,以及 HepaRG 细胞在小鼠肝内的生长和增殖,为异种动物体内移植人肝细胞探索出一种新的策略,为进一步深入研究人肝细胞在异种动物肝内增殖、分化特性打下基础。

参考文献:

[1] Lee S W, Wang X, Chowdhury N R, *et al*. Hepatocyte transplantation: state of the art and strategies for overcoming existing hurdles[J]. Ann Hepatol, 2004, 3(2): 48-53.

[2] Chavez-Galan L, Arenas-Del-Angel M C, Zenteno E, *et al*. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes[J]. Cell Mol Immunol, 2009, 6(1): 15-25.

[3] Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, *et al*. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice[J]. Nature, 1993, 364(6440): 806-809.

[4] Song J H, Bellail A, Tse M C, *et al*. Human astrocytes are resistant to Fas ligand and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis[J]. J Neurosci, 2006, 26(12): 3299-3308.

[5] Nagata S, Golstein P. The Fas death factor[J]. Science, 1995, 267(5203): 1449-1456.

[6] Wilson J H, Paturzo F X, Johnson L K, *et al*. Rat hepatocyte engraftment in severe combined immunodeficient x beige mice using mouse-specific anti-fas antibody[J]. Xenotransplantation, 2006, 13(1): 53-62.

[7] Miyasou T, Kwon A H, Tsuji K, *et al*. Edaravone prevents Fas-induced fulminant hepatic failure in mice by regulating mitochondrial Bcl-xl and Bax[J]. Shock, 2008, 30(2): 212-216.

[8] Siebler J, Schuchmann M, Strand S, *et al*. Enhanced Sensitivity to CD95-Induced Apoptosis in ob/ob Mice[J]. Dig Dis Sci, 2007, 52(9): 2396-2402.

[9] Gandillet A, Vidal I, Alexandre E, *et al*. Experimental models of acute and chronic liver failure in nude mice to hepatocyte transplantation[J]. Cell Transplant, 2005, 14(5): 277-290.

[10] Ohashi K, Park F, Kay M A. Hepatocyte transplantation: clinical and experimental application[J]. J Mol Med, 2001, 79(11): 617-630.

[11] Vidal I, Blanchard N, Alexandre E, *et al*. Improved xenogenic hepatocyte implantation into nude mouse liver parenchyma with acute liver failure when followed by repeated anti-Fas antibody (Jo2) treatment[J]. Cell Transplant, 2008,17(5): 507-524.

[12] 谢　青, 桂红莲. 急性肝功能衰竭的研究进展[J]. 实用临床医药杂志, 2007, 11(3): 4-9, 12.

[13] 蒋　黎, 毛　青, 王宇明, 等. 建立人鼠嵌合肝动物模型的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(9): 856-859.

[14] 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.

[15] Kanebratt K P, Andersson T B. Evaluation of HepaRG cells as an *in vitro* model for human drug metabolism studies[J]. Drug Metab Dispos, 2008, 36(7): 1444-1452.

[16] Sharma A D, Cantz T, Richter R, *et al*. Human cord blood stem cells generate human cytokeratin 18-negative hepatocyte-like cells in injured mouse liver[J]. Am J Pathol, 2005, 167(2): 555-564.

(编辑　王　红)