DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.06.010
第25卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 6
484 2003年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)06-0484-03

用猪肝细胞型混合生物人工肝支持系统治疗肝衰竭的初步研究

王英杰,何念海,刘 俊,牛润章,李嘉佳,王宇明,李梦东 (第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 对培养猪肝细胞型混合生物人工肝支持系统治疗肝衰竭的可行性进行初步评价。方法 采用自行研制的以新生实验小型猪肝细胞为基础的混合生物人工肝支持系统,对5例慢性重型肝炎患者进行体外人工肝支持,综合评价其临床疗效和安全性。结果 5例患者经混合人工肝支持后,肝衰竭均得到不同程度的控制,表现为临床症状和肝衰竭相关指标好转,肝性脑病改善。最终2例好转出院,1例经肝移植存活,2例死亡,死亡原因与不良反应无关。结论 猪肝细胞型混合生物人工肝系统可用作重型肝炎肝衰竭的辅助支持和治疗。

关键词:生物人工肝;猪肝细胞;重型肝炎;慢性;肝支持
中图法分类号:R318.4;R575.305 文献标识码:A

A preliminary study of a hybrid bioartificial liver support system with porcine hepatocytes in the treatment of hepatic failure

WANG Ying-jie, HE Nian-hai, LIU Jun, NIU Run-zang, LI Jia-jia, WANG Yu-ming, LI Meng-dong (Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To evaluate the feasibility of a hybrid bioartificial liver support system with porcine hepatocytes in the treatment of chronic severe hepatitis. Methods A total of 5 patients with chronic severe hepatitis received the extracorporeal artificial liver support using a self-commanded hybrid bioartificial liver support system based on the hepatocytes of experimental suckling minipigs. Both curative effect and security of the system were estimated. Results Liver failure of the 5 patients was controlled by the hybrid bioartificial liver support system. Their clinical symptoms, hepatic encephalopathy and liver failure markedly improved after treatment. Two of the 5 patients recovered completely. One was bridged to liver transplantation and 2 died, but the death was not related to the harmful reaction of artificial liver support. Conclusion The hybrid bioartificial liver system with porcine hepatocytes can be used as an auxiliary supporting and treating method for chronic severe hepatitis.

Key words: bioartificial liver; pig hepatocytes; severe hepatitis; chronic; liver support

近年来,人工肝支持系统已成为急性肝衰竭和重型肝炎治疗研究的热门课题。其中,以培养肝细胞为材料的新型混合生物人工肝系统的应用前景引起广泛关注[1,2]。但由于受细胞材料来源的限制,有关的临床研究为数尚少。我们在成功建立体外混合生物人工肝支持系统之后,选择新生实验小型猪肝细胞为材料,对5例慢性重型肝炎进行了混合人工肝支持,初步评价了其临床疗效和安全性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

5例重型肝炎患者,男,年龄32~46岁,平均36.3岁。诊断完全符合文献[3]中的有关标准,其HBsAg均为阳性,皆为慢性重型肝炎。临床分期:中期3例,晚期2例。3例伴有Ⅱ~Ⅲ度肝性脑病,1例合并肝肾综合征,1例合并肝肺综合征,2例合并自发性腹膜炎,3例伴电解质紊乱。患者主要肝衰竭指标:血清总胆红素(TB)平均(568.9±149.2)μmol/L,凝血酶原时间(PT)平均(37.3±11.2)s(对照13~14 s,下同),凝血酶原活动度(PTa)平均(19.9±7.5)%。

1.2 混合生物人工肝系统的建立

首先采用体外两步法消化分离新生中国小型猪肝细胞[4],将总量约1×10^9~1×10^{10}的肝细胞预先培养成多细胞球形聚集体后接种于中空纤维型生物反应器(Spectrum产品),置反应器循环培养装置内培养12~48 h后备用。治疗时将生物反应器、血浆分离器(Fresenius产品)、血浆吸附器(宁波亚泰公司产品)以及血浆池等通过血泵、血路管优化组合连接成物理型、中间型和生物型"三合一"混合人工肝系统,并辅以保温、给氧、血液循环控制等装置。

1.3 人工肝支持方法

选择颈内静脉或股静脉穿刺放置大孔径双腔管建立血液

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30027001);全国优秀博士基金资助项目(199947)
作者简介:王英杰(1960-),男,陕西省延安市人,博士,教授,主要从事肝衰竭与生物人工肝方面的研究,发表论文90余篇。电话:(023)68754475-8062
收稿日期:2002-11-08;修回日期:2003-01-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

循环通道, 肝素抗凝下将患者血液引入血浆分离器, 先行 1 500 ml 的血浆置换, 再将分离出的血浆汇集于贮存池内, 约达 300 ml 时引入活性炭血浆吸附器循环灌流 30 min, 随后再将贮存池内血浆引入生物反应器并反复循环。贮存池内反复循环的血浆由血浆泵按血浆分离速度输回体内, 以维持血液/血浆循环的平衡, 支持与治疗时间 5~8 h。治疗过程中严格监测患者生命征变化和不良反应, 抽血查血常规、肾功、肝功、PT 等, 以综合评价临床疗效和安全性。

2　结果

病例 1　患者因劳累发病, 1 周内黄疸迅速加深, 并出现明确的Ⅱ度肝性脑病, 病情恶化。首次人工肝支持治疗后, 患者肝性脑病消失, TB 下降 327.4 μmol/L, PT 缩短 4.1 s, PTa 由 30.9%提高至 43.8%, ALT、AST 同时下降, 患者快速进展的肝衰竭和肝性脑病得以控制。治疗中患者突然出现寒战、高热, 按输液反应处理后缓解。3 d 后行第 2 次治疗, 效果基本同前, 无不良反应, 血常规、肾功基本正常。9 d 后患者出现呼吸道真菌感染和一侧肢体瘫痪, 并最终因呼吸衰竭于第 13 天死亡。

病例 2　患者原发病为明确的肝硬化, 转入本院时高度腹胀, 大量腹水, 伴高度乏力和高黄疸, TB 578.1 μmol/L, PT 52 s, PTa 11.8%。首次人工肝支持治疗后, 患者乏力、腹胀减轻, 腹水减少, 食欲增加, PT、TB 下降, 但治疗后 4 d 临床症状又倒退到治疗前情况。间用非生物人工肝支持治疗(血浆置换, 或血浆置换+灌流)4 次, 临床疗效和病情反复基本同前。住院 1 个月后再次进行混合生物人工肝支持, 病情才得以控制, 治疗后肝衰竭指标反复不明显, 最终人工肝治疗结束时 TB 140.2 μmol/L, PT 22 s, PTa 41.2%。4 个月后出院, 至今 2 年无异常情况。

病例 3　人工肝治疗前肝浊音界显著缩小, 肝性脑病Ⅱ~Ⅲ度, 伴脑水肿、明显的出血倾向和尿量减少、BUN 和肌酐升高。人工肝治疗后, 患者意识有所转清, TB 由 592.0 μmol/L 降为 351.6 μmol/L, PT 由 39 s 缩短为 30 s, PTa 由 17.5%回升至 24.9%。患者尿量未增加, BUN 和肌酐继续升高, 治疗中同病例 1 一样出现寒战、高热, 按输液反应处理后缓解。此后患者家属放弃治疗, 终因肝衰竭、肝肾综合征死亡。

病例 4　人工肝支持治疗前, 患者精神极差, 扑翼样震颤阳性, TB 345.8 μmol/L, PT 31 s, PTa 23.8%。治疗后患者肝性脑病消失, 扑翼样震颤阴性, 精神及食欲好转, 但仍高度乏力, 肝衰竭指标 TB、PT 及 PTa 好转, 血小板稍降低。5 d 后进行第 2 次治疗, 患者症状进一步好转, TB 127.2 μmol/L, PT 21.5 s, PTa 42.6%。治疗中患者血压突然降至 0, 自感头昏、恶心, 立即予升压处理, 约 10 min 后, 血压回升至正常水平, 不适症状消失, 治疗继续进行。以后患者病情逐渐好转, 出院至今 2 年, 身体健康, 病情无反复。

病例 5　人工肝治疗时肝衰竭已进入晚期, 肝性脑病Ⅲ度, 伴脑水肿, TB 765.3 μmol/L, PT 42 s, PTa 15.7%, 人工肝治疗后病情稳定, 肝性脑病有所改善(Ⅱ~Ⅲ度), 脑水肿减轻, TB 465.9 μmol/L、PT 31 s、PTa 23.7%, 血常规、肾功无明显变化, 2 d 后成功接受肝移植。

3　讨论

近年来的研究显示, 以培养猪肝细胞为生物材料的生物人工肝系统可为急性肝衰竭患者提供可靠的过渡支持, 进一步将生物人工肝与早期以去毒为主的物理型人工肝组合而成的新一代体外混合生物人工肝支持系统, 兼有代偿肝脏生物合成与解毒代谢两大功能, 为肝衰竭提供理想的辅助肝支持作用, 进而为患者通过肝移植或肝再生而恢复创造条件并争取时间[5]。由于国外并无慢性重型肝炎这一病例分型, 新型生物人工肝系统是否能够成为此类患者安全有效的治疗方法尚缺乏临床研究资料。

本研究在采用培养新生中国小型实验猪肝细胞-中空纤维生物反应器及活性炭吸附器的基础上, 进一步联合应用血浆置换技术, 构成物理型、中间型和生物型"三合一"混合生物人工肝系统, 初步对 5 例中晚期慢性重型肝炎患者进行的人工肝辅助支持, 取得较好的效果。患者黄疸降低, 中毒症状减轻, PT 缩短, PTa 升高, 肝性脑病改善。其中, 2 例病情逐渐好转出院, 1 例成功等到肝移植。该结果的取得, 得益于混合生物人工肝系统补充生物活性物质与机械去毒能力更为完善, 更有利于培养肝细胞生物合成功能与特异性解毒、转化代谢功能的发挥。表明以培养猪肝细胞为主的体外混合生物人工肝系统对慢性重型肝炎患者肝功能衰竭有不同程度的控制作用, 可成为此类患者的辅助支持与治疗手段。

目前在国内, 血液灌流与血浆置换这两种典型的非生物人工肝已应用于重型肝炎的治疗, 因其可清除患者体内内毒素等毒性物质、血氨等致肝性脑病物质以及其它因肝功能衰竭而堆积的大量代谢产物, 同时补充白蛋白、凝血因子、调理素等活性物质, 故疗效较为肯定, 临床应用的安全性也较前有明显的提高。因此, "三合一"混合生物人工肝系统治疗慢性重型肝炎的安全性问题主要与细胞材料有关。

猪肝细胞用于生物人工肝首先需要考虑的问题是免疫反应。已知大约 7%的正常人存在抗猪肝细胞的免疫球蛋白 M(IgM)[6], 在异种器官移植时可引起急性排异反应。因此, 在生物人工肝系统中常规采用半透膜进行免疫阻隔, 既可避免免疫反应引起广泛的猪肝细胞坏死, 以及因细胞坏死所致的炎性化学物质反流入人体内, 同时也可防止异种组织中的免疫物质进入病人血液。本组 5 例患者中均未发生异性免疫反应, 其原因可能系患者相对免疫耐受, 不足以引起明显的免疫反应。表明培养猪肝细胞型混合生物人工肝可以

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

较安全地用于慢性重型肝炎的治疗。但治疗中出现输液反应2例次,这与混合生物人工肝支持系统较为复杂、准备环节较多等因素有关,应严格杜绝热源污染,以保障混合生物人工肝顺利、有效的支持与治疗。

此外值得一提的是,业已发现猪体内普遍存在着一种内源性逆转录病毒(PERV),由于在生物人工肝治疗过程中一些细胞会从支持系统中进入病人血液中,故有PERV交叉传染于人的可能性。尽管到目前为止,无论是接受猪肝组织移植的病人,还是生物人工肝治疗的肝衰竭患者均未发现明显的PERV感染证据[7],但研究显示PERV质粒可以通过人与猪细胞的体外混合培养而进行转导[8],并且有在新的宿主细胞内复制的可能性。故猪肝细胞型混合生物人工肝临床应用的长期安全性仍需进一步观察与研究。

参考文献:

[1] Maddrey W E. Bioartificial liver in the treatment of hepatic failure[J]. Liver Transplant, 2000, 6(4 suppl 1): S27-30.

[2] Bismuth H, Figueiro J, Samuel D. What should we expect from a bioartificial liver in fulminant hepatic failure[J]? Artif Organs, 1998, 22(1): 26-31.

[3] 中华医学会传染病分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 肝脏, 2000, 5(4): 257-263.

[4] 郭海涛, 王英杰, 刘 俊, 等. 体外灌流装置分离肝细胞的初步探索[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(6): 549-550.

[5] Watanabe F D, Mullon C J P, Hewitt W R, *et al*. Clinical experience with a bioartificial liver in the treatment of severe liver failure. A phase I clinical trial[J]. Ann Surg, 1997, 225(5): 484-494.

[6] Takahashi M, Ishikura H, Takahashi C, *et al*. Immunologic considerations in the use of cultured porcine hepatocytes as a hybrid artificial liver. Anti-porcine hepatocyte human serum[J]. ASAIO J, 1993, 39(3): M242-246.

[7] Pitkin Z, Mullon C. Evidence of absence of porcine endogenous retrovirus (PERV) infection in patients treated with a bioartificial liver support system [J]. Artif Organs, 1999, 23(9): 829-833.

[8] Paradis K, Langford G, Long Z, *et al*. Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue [J]. Science, 1999, 285(5431): 1236-1241.

(编辑 刘鸿娥)

(上接483页)

薄壁型的壁内只有少量胶原纤维和成纤维细胞,血管腔隙很大。

3.2 不同病理类型与影像学表现

由于HHE主要是肝动脉供血,瘤体由含血液的血管组成。在注射造影剂后,CT表现为瘤体内不同程度的强化现象,主要取决于瘤体的组织学类型。厚壁型海绵状血管瘤由于架隔组织较多,腔隙很小,造影剂进入不畅,CT增强表现为无明显强化,临床上易误诊为肝癌,应注意鉴别。本组2例为厚壁型海绵状血管瘤在增强扫描时未见强化而误诊为肝癌。因此,笔者认为在三期增强扫描时应延迟扫描时间以提高HHE诊断的准确性。薄壁型海绵状血管瘤,腔隙扩张显著,造影剂进入较多,由于腔壁内一般并无肌性组织,进入腔内造影剂停滞较久,且可逐渐弥散,在CT延迟扫描时,最终可表现为等密度。本组有38例(95%)有此表现,符合薄壁型海绵状血管瘤诊断。本组40例中,29例(72.5%)动脉期出现结节样或环状强化,22例(55%)强化结节密度与腹主动脉或肝动脉相近。有学者认为动脉期病灶边缘强化结节密度与腹主动脉相近可作为HHE诊断的可靠依据[1,2],本组结果支持这一观点。门静脉期上述强化部分进行性向病灶中心扩展,密度缓慢降低。其中3例强化结节最先从病灶近肝门侧开始逐渐向远侧推进,我们认为此现象可能与病灶接受来自肝门的血供,造影剂最先充填肝门侧血窦,逐渐向远侧推进有关。且造影剂充填病灶是由其病理基础决定的[3],本组38例(95%)平衡期见病灶充填成稍高密度或等密度,其中5例病灶中心无强化,有学者认为此种现象与血管瘤内坏死,广泛纤维化,使瘤体内有的血管被团状纤维组织取代,形成纤维瘤样结构,造影剂不易充盈所致[4]。事实上瘤体内可有厚壁与薄壁两种类型同时存在,而CT表现出部分增强和部分无明显强化的混合性病灶。由于螺旋CT对HHE进行三期增强扫描,减少了病人呼吸运动及部分容积效应所造成的病灶遗漏,提高了病变诊断的敏感性,文献报道其对HHE的敏感性为92%,与本组3例误诊,敏感性达92.5%,结果相近。因此,螺旋CT对HHE的定性诊断有着重要的作用。

我们认为螺旋CT三期增强扫描时,动脉期与腹主动脉密度接近的结节样强化,且延迟扫描时出现病灶充填直至与肝实质密度相等,为典型肝血管瘤的特征性CT表现,具有定性诊断价值。但是,对于不典型血管瘤,如果检查技术不熟悉或检查粗糙,则很难与小肝癌鉴别。两者的区别在于其峰值持续时间的长短以及延迟扫描病灶时缩小或出现等密度充填,且无占位效应及水肿。如果仍无法区别,则可行CT引导下穿刺活检或MRI检查。

关键词:肝肿瘤;血管瘤;断层摄影术;X线计算机
中图法分类号:R735.7;R814.42 文献标识码:B

参考文献:

[1] Quinn S F, Benjamin G G. Hepatic cavernous hemangiomas: simple diagnostic sign with dynamic bolus CT[J]. Radiology, 1992, 182(2): 545-548.

[2] Hoe L V, Bert A L. Gryspeedrdts, *et al*. Dualphase helical CT of the liver: Value of an early phase acquisition in the differential diagnosis of non-cystic focal lesions[J]. AJR, 1997, 168(5): 1185-1186.

[3] Freey P C, Cardner J C, Voningers I C, *et al*. Hepatic helical CT: effect of reduction of iodine dose of intravenous contrast material on hepatic contrast enhancement [J]. Radiology, 1995, 197(6): 89-91.

[4] 杨海山, 王大伟, 赵永生, 等. 肝动脉插管双氧水声学造影诊断肝内占位病变[J]. 中华医学杂志, 1992, 72(9): 538-540.

(编辑 王 红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net