

肝脏再生的动物模型^{*}

张 艳 黄淑桢^{**}

(上海市儿童医院上海医学遗传研究所 上海 200040)

摘要 肝细胞移植相对于全肝脏移植有其优越性,包括低致死率,低耗费,技术可行,有克服器官短缺的可能性,具有临床应用的潜能。目前关于移植肝细胞再生的研究大多数关注在选择最佳的移植位点、移植细胞数、移植细胞类型。然而,临床应用的最大障碍是移植细胞在受体扩增能力有限。移植细胞在多种动物实验模型中能大量替换肝实质细胞。通过对这些模型的探讨初步探索了移植细胞再生的相关条件。

关键词 肝细胞 移植 实验模型 再生

许多患者特别是肝功能衰竭患者需要肝脏移植。然而,可获得的供体器官数量有限。肝细胞移植(HTx)能够作为全肝移植的过渡,在肝功能衰竭过程支持代谢,或取代整个器官移植,使病人度过危险的肝功能衰竭难关而得以生存。细胞移植相对于整个器官移植有其潜在优势,包括低致死率,低耗费,有克服器官短缺的可能性。细胞移植治疗正赢得越来越多的关注,特别是近年来涌现出一系列的关于干细胞可塑性的研究,使细胞移植治疗的研究成为热点^[1,2]。然而,即使可塑性是细胞的本质,细胞生长、分化、迁移等模式也是固定的,细胞状态也是由体内高度的动态平衡机制调控,这种调控机制适用于任何移植入生物体内的细胞。移植细胞的行为将极大地依赖于受体组织的生存环境。移植细胞在许多动物模型能大量替换肝实质细胞,对这些动物模型的深入理解将有助于我们了解植入细胞体内再生的调控机制,提高细胞治疗的临床有效性。

1 肝脏再生的细胞移植模型

细胞治疗逐渐被认为是全肝脏移植的取代方式。然而,细胞治疗在临床的有效应用不仅仅需要植入细胞在受体肝脏中能存在,更需要供体细胞的大量增殖。移植细胞在受体肝脏扩增能力有限阻

碍了其临床应用。目前研究了几个实验动物模型,其肝脏能出现移植细胞的大量扩增。

1.1 肝脏遗传缺陷动物模型的细胞移植

Sangren 等^[3]发展的尿激酶血纤维蛋白溶酶原激活因子(uPA)基因转基因小鼠是第一个被发现与肝脏大量再生有关的模型。Sangren 等通过将尿激酶血纤维蛋白溶酶原激活因子 uPA 基因插入到白蛋白启动子下游,以引导其在肝脏中特异的表达来产生肝脏毒性。一般情况,大部分 uPA 分泌到血液,因而被认为是血栓溶解剂因子。在该模型,一些 uPA 仍保留在肝脏引起严重的炎症。肝脏经历持续的损伤导致大面积的坏死,大部分动物会死亡。然而有一些动物幸存,并有成簇的正常肝细胞存在,有的几乎替换了整个肝脏^[3]。研究发现这些动物有个别丢失转基因的肝脏细胞,在肝脏中产生选择性的增殖与再生。基于该发现,分离野生型标记的同源供体肝细胞,移植入 uPA 小鼠。检测受体肝脏的选择性再生能力,四到五周后,供体来源的肝脏细胞在受体肝脏比例大于 80%^[4]。证明 uPA 在转基因动物肝脏细胞的持续表达创造了有利于正常表型的移植细胞生长的选择性环境。

uPA 转基因被整合到免疫耐受 *mlnu* 小鼠,允许异种细胞(如大鼠肝脏细胞,甚至人类肝脏细胞)在该种小鼠肝脏中生长,可用作药物代谢以及肿瘤遗传学的研究^[5]。免疫缺陷 uPA/重组激活基因 2(RAG-2)转基因小鼠在移植人类肝脏细胞后,能够感染人类肝炎 B 病毒(正常动物不可能感染这种病毒),提供了治疗 HBV 感染的动物模型^[6]。

收稿日期: 2003-09-10 修回日期: 2003-10-29

^{*} 国家 863 计划资助项目(2002AA216091)

^{**} 通讯作者, 电子信箱: ytzeng@stn.sh.cn

与 uPA 小鼠移植模型相似的另一模型是富马酰乙酰乙酸盐水解酶 (FAH⁻) 基因敲除小鼠。该模型由 Grompe 等^[7] 发展作为人类遗传性酪氨酸血症 I 型 (HT1) 的动物模型。该模型小鼠缺乏 FAH, 酪氨酸分解代谢的最后一步受到阻碍, 导致富马酰乙酰乙酸盐 (FAA) 和前体 (MAA) 底物的聚集, FAA 与 MAA 对肝脏有毒性。HT1 病者与 FAH⁻ 小鼠模型常出现进展型肝脏衰竭、早期肝小细胞癌。曾报道 HT1 病人有正常肝细胞聚集并通过自我诱导来修正遗传缺陷, 这些细胞克隆发育成结节, 并有比周围 FAH⁻ 细胞选择性增殖的优势^[8]。Overturf 等^[9] 在 uPA 转基因小鼠观察到类似的现象, 移植野生型肝细胞到 FAH⁻ 小鼠导致大量的肝脏再生, 肝脏恢复正常结构与功能。从正常同种小鼠分离肝细胞移植到该小鼠, 能够替换 80% 受体肝实质细胞。然而, 如果给对照受体服用 2-硝基-4-3-氟-甲基苯 (NTBC), 以阻止酪氨酸代谢途径产生毒性代谢物 FAA 和 MAA 在受体肝脏的聚集, 则没有发现供体来源的肝细胞选择生长。该模型对移植细胞产生了强大的正向选择压力。

1.2 移植遗传修饰的肝脏细胞

与肝脏再生有关的另一途径是移植遗传修饰的肝脏细胞。直接注射重组腺相关病毒 AAV (rAAV) 到小鼠肝脏一般仅能转导 2% 肝细胞, 但移植整合了 Bcl-2 基因(在程序性细胞凋亡中起十分重要的抑制作用)的肝细胞到小鼠后, 小鼠服用抗 Fas 抗体, Fas 优先诱导受体肝细胞凋亡, 而使移植肝细胞的比例增加到 20%^[10]。如果骨髓来源的肝细胞通过基因工程过量表达 Bcl-2, 它们同样能在 Fas 抗体的选择压力下在动物体扩增^[11]。应用 AAV-Bcl-2 转导的移植肝细胞和 Fas 抗体治疗小鼠模型, 证明了 Fas 介导的内源细胞凋亡可形成移植细胞的选择优势, 通过这个办法可选择性再生那些遗传修饰的肝脏细胞。

1.3 倒千里光碱预先处理的动物模型移植肝细胞

倒千里光碱 (RS) 结合肝切除预先处理的动物模型为最近发展的移植肝脏细胞再生动物模型。吡咯啉生物碱 RS 能与细胞 DNA 结合成生物活性物质烷基化 DNA, 破坏细胞周期进程, 导致肝细胞长期的有丝分裂抑制, 肝细胞增殖抑制数月。所以内源细胞不能增殖而移植细胞不受影响。Laconi 等^[12] 将倒千里光碱/PH 与细胞移植模型结合, 用倒千里光碱/部分肝切除 (PH) 处理胆微管酶

二肽酶 IV 缺陷 DPPIV⁻ 大鼠 (Thompson 和 Hixson 等^[13]) 后, 移植 DPPIV⁺ 遗传标记的大鼠肝脏细胞。由酶组化分析移植细胞, 移植肝细胞完全整合到肝实质, 与内源肝细胞形成杂合胆小管, 肝脏替换迅速, 特别是在雄性大鼠, 移植两周后植入肝细胞占肝细胞团比例的 10% ~ 15%, 1 个月 40% ~ 50%, 2 个月 90% ~ 95%, 4 个月 98%, 9 个月 99%, 肝脏变成原来大小, 移植细胞的生化和生理功能完全激活。在无白蛋白血症 (nagase analbuminemic) 的遗传缺陷大鼠, 亦用倒千里光碱/PH 得到证明^[14]。

2 肝脏再生的条件

移植细胞相对于整个器官移植有部分潜在优势, 包括低致死率, 低耗费, 至少部分克服器官短缺的可能性。研究移植细胞再生的条件是很有必要的。移植细胞再生障碍是移植细胞在受体的低水平扩增。其主要的原因可能为移植细胞没有生长优势。另一方面, 正常肝细胞在充分的刺激作用下有巨大的增殖优势, 这意味着 HTx 可能有临床应用潜力。早在上世纪 90 年代中期, 首先在两个遗传修饰的小鼠模型 (uPA 和 FAH⁻ 小鼠) 观察到的一些结果, 引起我们对于体细胞再生能力的思考。在该模型, 受体细胞有内在遗传缺陷, 增殖能力降低, 允许正常表型的移植细胞的出现。移植细胞在受体肝脏体内再生往往需要两个条件的结合: 肝脏持久的大面积损伤和移植细胞有生长优势。

另一具有吸引力的途径是通过遗传修饰的移植细胞, 让移植细胞获得在正常背景下进行选择生长 (如 AAV-Bcl-2 转导细胞移植和 Fas 抗体治疗结合的途径), 以达到由有遗传修饰的细胞治疗的目的。

上述的 HTx 通过在宿主与移植细胞间创造遗传差异, 给予后者选择优势。Laconi 等^[12] 发展了另一种有效再生肝脏途径: 预先用倒千里光碱处理受体肝脏通过长期破坏宿主细胞的增殖力, 让供体肝细胞获得选择性生长优势。放射线是另一个阻断内源肝细胞增殖的办法。在倒千里光碱与放射线模型, DNA 损伤的内源细胞凋亡可能在长期肝脏增殖扮演了重要的角色。在该种模型, 两类细胞没有遗传差异出现, 供体受体在移植前均有正常的背景, 通过外加处理受体导致差异。生物碱导致受体长期内源肝细胞周期的阻断, 受体在移植正常细胞后, 在合适的刺激 (肝切除) 作用下, 移植细胞进行选择增殖。

3 未来的研究方向

上述细胞移植成功的例子是通过药物作用, 或基因操作联合药物作用造成受体与移植细胞增殖能力的差异, 使移植细胞获得选择性再生能力。然而, 目前尚存在一些问题造成临床应用的障碍。如 α PA 和 FAH⁻ 小鼠为出生前致死, 这种情况在人类很少见。移植修饰的遗传肝脏细胞存在细胞长期生存与持续稳定表达的问题。RS/PH 模型可能涉及 RS 的细胞毒性及 PH 的损伤。尚需寻找一更接近人类肝病表型的动物病理模型。Braun 等^[15] 2000 年报道了白蛋白增强子/启动子介导的 HSV-tk 肝脏特异表达的转基因小鼠模型作为肝细胞移植模型, 肝脏损伤的时间与严重程度可以通过服用 GCV 得以控制, 代表了毒性诱导的人类肝病模型。

然而, 只有阐明移植细胞选择性扩增机制才能从根本上解决移植细胞的扩增问题。移植细胞能整合到受体肝脏并进行广泛的增殖, 这要求受体器官提供一个不可少的空间。由此, 肝脏再生经常发生在内源细胞损伤的遗传缺陷(如 α PA 和 FAH⁻) 小鼠。另一个例子是有类似于人类 Wilson's 疾病表型(铜代谢损伤导致肝脏细胞损伤)的 Long Evans Cinnamon(LEC) 大鼠, 早期 HTx 能够在 70% 实验 LEC 大鼠中再生(20 个月后)并且恢复铜代谢平衡, 逆转肝脏疾病^[16, 17]。移植细胞的选择性增殖常常由受体肝细胞的慢性毒性和细胞死亡支持, 所以可能为一种互补性生长机制。但许多肝脏遗传疾病的表型没有明显的肝细胞毒性。按照上述原则, HTx 不可能有效。实际上, 经 2/3 部分肝切除的残余肝细胞大部分有广泛增殖能力。RS 模型是将小鼠在细胞移植前作 RS 处理, 因而移植细胞在合适的刺激(PH)作用下能选择性生长。原因可能是 RS 处理后, 内源细胞凋亡速率加快了供体来源细胞的生长。另外, 正常移植细胞的出现也可能加快 RS 损伤的受体选择性凋亡。近来有报道移植细胞在缺乏外界刺激因子下(PH)也能产生肝脏的大量再生^[18]。可能除了互补性生长机制外还有别的供体细胞选择性再生的机制。目前对 RS 特别是其长期阻碍肝脏细胞周期的机制了解不多。已知 RS 能与 DNA 结合, 而别的 DNA 结合物质不能维持大鼠肝脏再生。这说明了生物碱的效应是特殊的, 提出了鉴定有治疗潜力的新的分子靶点。总之, 更好理解移植细胞在受体生长的相关机制将有助于我们更

有效的设计细胞治疗的途径。

参考文献

- [1] Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*, 2000, 287: 1442~ 1446
- [2] Oh IH, Kim DW. Three dimensional approach to stem cell therapy. *J Korean Med Sci*, 2002, 17(2): 151~ 160
- [3] Sangren EP, Palmiter RD, Heckel JL, et al. Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin plasminogen activator transgene. *Cell*, 1991, 66: 245~ 256
- [4] Rhim JA, Sangren EP, Degen JL, et al. Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science*, 1994, 263: 1149~ 1152
- [5] Rhim JA, Sangren EP, Palmiter RD, et al. Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci*, 1995, 92: 4942~ 4946
- [6] Dandri M, Burda MR, Torok E, et al. Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and *in vivo* infection with hepatitis B virus. *Hepatology*, 2001, 33: 981~ 988
- [7] Grunpe M, al Dhalimy M, Finegold M, et al. Loss of fumarylacetoacetate hydrolase is responsible for the neonatal hepatic dysfunction phenotype of lethal albino mice. *Genes Dev*, 1993, 7(12A): 2298~ 2307
- [8] Kvittingen EA, Rootwelt H, Berger R, et al. Self induced correction of the genetic defect in tyrosinemia type I. *J Clin Invest*, 1994, 94: 1657~ 1661
- [9] Overturf K, al Dhalimy M, Ou CN, et al. Serial transplantation reveals the stem cell like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol*. 1997, 151: 1273~ 1280
- [10] Mignon A, Guidotti JE, Mitchell C, et al. Selective repopulation of normal mouse liver by Fas/CD95 resistant hepatocytes. *Nat Med*. 1998, 4(10): 1185~ 1188
- [11] Mallet VO, Mitchell C, Mezzy E, et al. Bone marrow transplantation in mice leads to a minor population of hepatocytes that can be selectively amplified *in vivo*. *Hepatology*, 2002, 35(4): 799~ 804
- [12] Laconi E, Oren R, Mukhopadhyay D, et al. Long term, near total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes. *Am J Pathol*, 1998, 153: 319~ 329
- [13] Thompson NL, Hixson DC, Callanan H, et al. A Fisher rat substrain deficient in dipeptidyl peptidase IV activity makes normal steady-state RNA levels and an altered protein Use as a liver cell transplantation model. *Biochem J*, 1991, 273: 497~ 502
- [14] Oren R, Dabeva M, Petkov P, et al. Restoration of normal serum albumin levels in Nagase and albuminemic rats using a newly described strategy for hepatocytes transplantation. *Hepatology*, 1999, 29: 75~ 81
- [15] Braun KM, Degen JL, Sangren EP. Hepatocyte transplantation in a model of toxin induced liver disease: variable therapeutic effect during replacement of damaged parenchyma by donor cells. *Nat Med*, 2000, 6(3): 320~ 326

[16] Wu J,Forbes JR, Chen HS, et al. The LEC rat has a deletion in the copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson disease gene. Nat Genet , 1994, 7: 541~ 545

[17] Malhi H, Irani AN, Vollenberg I, et al. Early cell transplantation in LEC rats modeling Wilson’s disease eliminates hepatic copper with reversal of liver disease. Gastroenterology, 2002, 122(2) : 438~ 447

[18] Laconi S, Pillai S, Porcu PP, et al. Massive liver replacement by transplanted hepatocytes in the absence of exogenous growth stimuli in rats treated with retrorsine. . Am J Pathol, 2001, 158(2) : 771~ 777

Models of Hepatocyte Repopulation

Zhang Yan Huang Shuzheng

(Shanghai Institute of Medical Genetics Shanghai Children’s Hospital Shanghai 200040)

Abstract Tranplantation of hepatocytes (HTx) has a number of potential advantage over whole organ transplant including a lower morbidity, a lower cost, a technical feasibility and the possibity to overcome, at lest in part, the problem of organs shortage. So it has the potential to be become clinically beneficial. Current research focus on optimatzing parameters including site of transplantation, cell number and the preferred cell type to te transplanted. However the major impediment towards its clinical effectiveness is the limited expansion of transplanted cells in the recipient liver. Some experimental models permit the near-total replacement of the liver parenchyma by donor cells. Related conditions for the repopulation of transplanted cells are presented and discussed.

Key words Hepatocyte Transplantation Experimental models Repopulation

耐高温消毒 pH 电极和 DO(溶解氧) 电极

耐高温消毒 GKFpH 电极和 DO(溶解氧) 电极是我所科技项目成果产品, pH 电极曾获得“ 七五” 攻关重大科技成果奖、中国科学院科技进步二等奖, 广泛应用于制药、生化制品、味精、食品发酵、石油、血制品、化工等行业的在线检测, 能适时掌握生产过程中 pH、DO 参数的变化, 是提高产品质量、产量的重要手段。

pH 电极和二次仪表经上海技术监督局和化工部化工专用仪器仪表质量监督检验中心随机检测, 结果表明, 该产品性能指标和产品质量优良。通过几代申东人的奋斗, 目前产品质量更尽善尽美。主要技术指标:

1. pH 电极
- 测量范围: pH1~ 12
- 灭菌温度: 105~ 150℃
- 测量范围: 10~ 95℃
- 插入深度: 125, 150, 180, 200, 250mm(可根据客户要求特制)
- 安装方式: 通过护套与发酵罐连接或通过法兰与反应釜连接配套工业 pH 计, 测量范围: pH0~ 14
- 分辨率: pH0.01
- 输出信号: 0~ 10mA 或 4~ 20mA 标准电流
- 开口尺寸: 138mm× 138mm(表盘) 在非机械损伤条件下, 玻璃电极寿命长于 20 批罐(灭菌条件 130℃, 30min)
2. DO 电极
- 检测系统: 原电池
- 测量范围: 0% ~ 100%
- 响应时间: 90% 响应小于 760s
- 灭菌条件: 120~ 130℃, 0.17MPa
- 二次表输出信号: 0~ 10mA 或 4~ 20mA

我厂生产的 pH 电极和 DO 电极品种齐全, 能与各种规格发酵罐和反应釜配合使用, 能应用于各种场合各种介质, 几何尺寸采用国际统一规格, 能与进口产品替换, 也可根据用户要求特制。

制造计量器具许可证编号: 沪制 02240122

上海申东生化传感器厂
联系地址: 上海市定西路 1295 号中科院上海硅酸盐研究所 邮编: 200050
联系人: 任国鑫 丁晓聪
电 话: (021) 62208693 手机: 13901821285 传真: (021) 62200141