

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.18.010 [http://www.crter.org]

饶小惠, 简国登, 张志, 汪艳, 潘明新, 高毅. 中国人肝细胞系1 运用于生物人工肝的生物代谢功能[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(18):3295-3302.

中国人肝细胞系1运用于生物人工肝的生物代谢功能*★

饶小惠, 简国登, 张志, 汪艳, 潘明新, 高毅

南方医科大学珠江医院肝胆二科, 广东省广州市 510280

文章亮点:

- 1 以全接触灌流型生物反应器接种微载体微重力中国人肝细胞系1 细胞建立的人源细胞混合型生物人工肝对肝衰食蟹猴模型进行治疗。
- 2 动态监测实验组及对对照组肝衰食蟹猴模型的血清生化指标的变化, 间接反应中国人肝细胞系1 细胞的生物代谢功能。
- 3 实验创新之处是将中国人肝细胞系1 细胞运用于动物实验, 能够更加客观的探索其生物代谢功能, 但缺少对中国人肝细胞系1 细胞的药物代谢功能检测。

关键词:

器官移植; 移植与人工器官; 人肝细胞; 人工器官; 混合型生物人工肝; 肝; 肝特异性生物合成; 食蟹猴; 863 项目

摘要

背景: 前期研究发现, 中国人肝细胞系1 细胞分化程度高且生物代谢功能良好, 并且中国人肝细胞系1 细胞组织学上来源于正常肝组织, 较其他来源于肿瘤源性的肝细胞系更为安全。

目的: 探讨中国人肝细胞系1 细胞在混合型生物人工肝中的生物代谢功能。

方法: 15 只食蟹猴随机分成对照组($n=5$)和治疗组($n=10$), 均建立急性肝功能衰竭模型, 治疗组接受以全接触灌流型生物反应器接种微载体微重力中国人肝细胞系1 细胞建立的人源细胞混合型生物人工肝进行治疗。

结果与结论: 急性肝功能衰竭食蟹猴血清谷氨酸转氨酶、总胆红素、总胆汁酸、尿素氮、肌酐、血氨均明显上升, 而白蛋白、Fischer 指数则显著下降; 人源细胞混合型生物人工肝治疗后, 急性肝功能衰竭食蟹猴血清谷氨酸转氨酶、总胆红素、总胆汁酸、尿素氮、肌酐、血氨和白蛋白均恢复。提示中国人肝细胞系1 细胞在混合型生物人工肝中生物代谢功能良好, 表现出良好的肝特异性生物合成及生物代谢功能。

Biological metabolic function of the human liver cell line-1 used in bioartificial liver

Rao Xiao-hui, Jian Guo-deng, Zhang Zhi, Wang Yan, Pan Ming-xin, Gao Yi

Second Department of Hepatology, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China

Abstract

BACKGROUND: Our preliminary study found that Chinese human liver cell line-1 has high differentiation ability and good biological metabolic functions, and the human liver cell lines are separated from normal liver tissue on a cell histology which are safer than the tumor-derived liver cell line.

OBJECTIVE: To investigate the biological metabolic functions of Chinese human liver cell line-1 cells in a hybrid bioartificial liver.

METHODS: Fifteen cynomolgus monkeys were randomly divided into the control group ($n=5$) and the

饶小惠★, 男, 1987 年生, 广东省惠州市人, 汉族, 2013 年南方医科大学毕业, 硕士, 主要从事组织工程、生物人工肝方面的研究。
oulingjv@163.com

通讯作者: 潘明新, 博士, 博士生导师, 主任医师, 教授, 南方医科大学珠江医院肝胆二科, 广东省广州市 510280
pmxwxy@sohu.com

通讯作者: 高毅, 博士, 博士生导师, 主任医师, 教授, 南方医科大学珠江医院肝胆二科, 广东省广州市 510280
gaoyi6164@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2013)18-03295-08

收稿日期: 2013-02-12
修回日期: 2013-03-18
(201302164/YJ·C)

Rao Xiao-hui★, Master,
Second Department of
Hepatology, Zhujang Hospital of
Southern Medical University,
Guangzhou 510280,
Guangdong Province, China
oulingjv@163.com

Corresponding author: Pan
Ming-xin, Doctor, Doctoral
supervisor, Chief physician,
Professor, Second Department
of Hepatology, Zhujang Hospital
of Southern Medical University,
Guangzhou 510280,
Guangdong Province, China
pmaxxy@sohu.com

Corresponding author: Gao Yi,
Doctor, Doctoral supervisor,
Chief physician, Professor,
Second Department of
Hepatology, Zhujang Hospital of
Southern Medical University,
Guangzhou 510280,
Guangdong Province, China
gaoyi6164@163.com

Supported by: National High
Technology Development
Planning Project of China(863
Planning), No. 2006AA02A141*

Received: 2013-02-12
Accepted: 2013-03-18

treatment group ($n=10$), and all the monkeys were used to establish the acute liver failure models. The models in the treatment group were implanted with Chinese human liver cell line-1 established hybrid bioartificial liver through the contact perfusion bioreactor inoculation under micro carrier microgravity.

RESULTS AND CONCLUSION: The serum alanine aminotransferase, total bilirubin, total bile acid, urea nitrogen, creatinine and blood ammonia levels of the cynomolgus monkeys with acute liver failure were increased, while the albumin level and Fischer index were decreased; after treated with hybrid bioartificial liver, serum alanine aminotransferase, total bilirubin, total bile acid, urea nitrogen, creatinine and blood ammonia levels of the cynomolgus monkeys with acute liver failure were recovered to the normal levels. It suggests that Chinese human liver cell line-1 cells in hybrid bioartificial liver have good biological metabolic function with good liver-specific biosynthesis and biological metabolic functions.

Key Words: organ transplantation; transplantation and artificial organs; human hepatocytes; artificial organs; hybrid bioartificial liver; liver; liver-specific biosynthesis; cynomolgus monkeys; National 863 Project of China

Rao XH, Jian GD, Zhang Z, Wang Y, Pan MX, Gao Y. Biological metabolic function of the human liver cell line-1 used in bioartificial liver. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(18):3295-3302.

0 引言

肝脏作为人体最重要的器官之一,承担着合成、分泌、代谢、解毒等多种复杂的功能。一旦由于某种原因造成肝细胞大量坏死,将会出现肝衰竭,进而导致机体代谢紊乱和毒性物质堆积,而这反过来又造成肝细胞损伤加重,肝细胞再生受到影响,引起肝衰竭的恶性循环^[1]。人工肝治疗基于肝损伤的可逆性以及肝细胞的可再生性,通过体外辅助装置暂时替代衰竭的肝脏功能,从而为肝移植或再生赢得时间^[2]。混合型生物人工肝是目前国内外公认最接近自然肝脏、功能也最全面的人工肝脏支持系统^[3-6]。

肝细胞是混合型生物人工肝的核心原材料^[7-8]。虽然近20年来对各种来源的肝细胞进行了广泛而深入的研究,但生物人工肝细胞材料的来源问题至今未能得到满意解决。肝细胞可能来源有同种肝细胞包括成人肝细胞和胎肝细胞、异种动物肝细胞、肝细胞株、肝干细胞等^[9-10],但这些细胞都存在着不同的缺陷^[11],而理论上人肝细胞是混合型生物人工肝最为理想的来源,但成人供肝来源极其有限且主要用于肝移植,且成人肝细胞在体外培养中很快就失去分化代谢能力,故大量获取成人肝细胞是不可能的^[11-15]。胎肝的利用因涉及伦理问题,亦难以推广应用^[16-17]。猪肝细胞对人来说是异种细胞,存在免疫反应,且合成的蛋白质也有种属差异,同时猪体内普遍存在着内源性反转录病毒,而研究显示内源性反转录病毒质粒可通过人与猪细胞的体外混合培养而进行转导,并且有在新的宿主细胞内复制的可能性^[18-21]。目前对于肝干细胞的研究,只证实其存在和可能来源,同时发现其强大再生和分化功能,但尚未进入应用阶段^[22-26]。而人肝细胞系中C3A细胞系虽已进入了I-II期临床,其应用价值还有待进一步评价^[5, 27-28],其他还有一些新建的肝细胞系的临床效果也有待于进一步研究^[4, 29-30],

作者所在课题组前期研究发现中国人肝细胞系1细胞分化程度高且生物代谢功能良好,且中国人肝细胞系1细胞来源于正常肝组织,较其他来源于肿瘤源性的肝细胞系更为安全^[31],但是目前尚未在生物人工肝对中国人肝细胞系1细胞进行生物代谢功能的研究。

实验以全接触灌流型生物反应器接种微载体微重力中国人肝细胞系1细胞,通过食蟹猴急性肝功能衰竭模型进行救治,研究中国人肝细胞系1细胞在混合型生物人工肝中的生物代谢功能。

1 材料和方法

设计: 细随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2010年1月至8月在南方医科大学再生医学研究所完成。

材料:

动物: 清洁级雄性食蟹猴10只, 猴龄七八岁, 体重6.5-7.0 kg, 购自广东省昆虫研究所华南灵长类研究开发中心, 合格证号SCXK(粤)2009-2010。所有动物均分笼, 专用颗粒饲料喂养。实验已通过南方医科大学动物伦理委员会审核, 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准^[32]。

细胞: 中国人肝细胞系1细胞系由中国医学科学院上海细胞生物研究所提供。

生物人工肝生物代谢功能实验的主要试剂及仪器:

Main reagents and instruments:

试剂及仪器	来源
MTT, Hepes	美国 Sigma 公司
cytopore2 微载体	美国 GE 公司
DMEM 高糖培养基, 胎牛血清	美国 Gibco 公司
20%人血白蛋白	奥地利 Bsxtar AG 公司
D-氨基半乳糖盐酸盐	江苏省南京嘉源医药科技有限公司
0.9%氯化钠注射液	成都青山利康药业有限公司
羟乙基淀粉	北京费森尤斯卡比医药有限公司
肝素钠注射液	南京新百药业有限公司
乳酸钠林格注射液	浙江济民制药有限公司
盐酸氯胺酮注射液	福建古田药业有限公司
速眠新 II 注射液	解放军军需大学兽医研究所
硫酸阿托品注射液	河北天成药业有限公司
DX-10 型血液净化机	北京戴博瑞克技术发展有限公司

方法:

实验动物分组: 注射 D-氨基半乳糖 48 h 后, 全部食蟹猴随机分成对照组($n=5$)和治疗组($n=10$)。

食蟹猴急性肝功能衰竭模型的制作: 参考文献^[33], 实验猴术前禁食 12 h, 不禁水。采用速眠新 II (0.1 mL/kg) 和氯胺酮(0.1 mL/kg)肌肉注射联合麻醉, 平卧位并妥善固定, 用体积分数 2.5%-3.0%的碘酒, 体积分数 75%的乙醇消毒局部皮肤, 并铺好无菌小孔巾, 于颈外侧中段且与颈外静脉垂直处作 2.0-3.0 cm 的横切口, 切开皮肤皮下组织, 结扎出血点。用弯血管钳沿静脉方向分离皮肤组织, 将静脉游离 1.5-2.0 cm。从游离静脉深面穿过 2 根 1 号丝线, 暂时不结扎, 留作牵引用。吸取已

配制好的 D-氨基半乳糖溶液, 接上头皮针, 并将液体灌满管腔内。左手提起静脉远心端的 1 号丝线, 右手准确地把头皮针插进颈外静脉, 回抽注射器见回血后收紧近心端的丝线, 将头皮针与颈外静脉结扎在一起。在 10 min 内把 D-氨基半乳糖溶液经颈外静脉一次性输入实验猴体内, 完成后拔出头皮针, 结扎颈外静脉。

人肝细胞的制备: 中国人肝细胞系 1 细胞经方形培养瓶扩增后, 消化, 锥虫蓝染色细胞活力大于 95%; 取 2×10^6 个细胞, 接种至 100 mg 微载体, 接种体积 25 mL。接种后于 37 °C 恒温, 体积分数 5%CO₂ 静置 12 h 后补齐剩余的 25 mL 培养基(DMEM 高糖培养基 + 体积分数 10%胎牛血清+30 mmol/L HEPES), 并开始旋转微重力培养。每 24 h 更换培养上清液体 25 mL, 接种后第 5 天结束培养。肝细胞用于人工肝前用乳酸钠林格液清洗细胞 15 次, 清除细胞培养基中的胎牛血清成分, 同时锥虫蓝染色检测肝细胞活力。

人源细胞混合型生物人工肝治疗: 普通肝素抗凝, 首剂为 180 U/kg, 维持量为 30 U/(kg·h)。治疗参数设定: 血流量为 15 mL/min, 血液经过膜型血浆分离器后, 血浆以 5 mL/min 的流速进入血液灌流器。生物部分以 5 mL/min 的速度维持进出量, 温度设定为 36.5 °C。

治疗组食蟹猴先给予血浆灌流治疗, 把双腔血液透析导管的动、静脉端口连接于血液净化机管路的动、静脉端口以建立循环通路。普通肝素抗凝, 首剂为 180 U/kg, 维持量为 30 U/(kg·h)。引血速度为 15-20 mL/min, 血液经过膜型血浆分离器后, 血浆以 5 mL/min 的流速进入血液灌流器进行树脂灌流治疗。

将通过 Cytopore 培养的 2.0×10^9 中国人肝细胞系 1 细胞置于全接触灌流型生物反应器中, 连接膜式氧合器、膜型血浆分浆器, 然后利用三通阀与血液净化机管路连接起来。当血浆灌流治疗 2 h 后, 打开三通阀, 以 5 mL/min 的流速把血液净化机管路中的血浆引入全接触灌流型生物反应器中, 使其与中国人肝细胞系 1 细胞进行物质交换, 联合治疗时间为 4 h。对照组食蟹猴不予治疗。

动态检测食蟹猴血清生化指标变化: 动态抽取食蟹猴给药前、给药后 48 h 及治疗后 6 h 周围静脉血送实验室, 迅速分离出血清, -86 °C 冻存, 用于检测天冬氨酸转氨酶、白蛋白、总胆红素、总胆汁酸、尿素氮、肌酐、血氨及计算 Fischer 指数。上述血清生化指标由南方医科大学附属南方医院临床检验中心按常规方法检测。

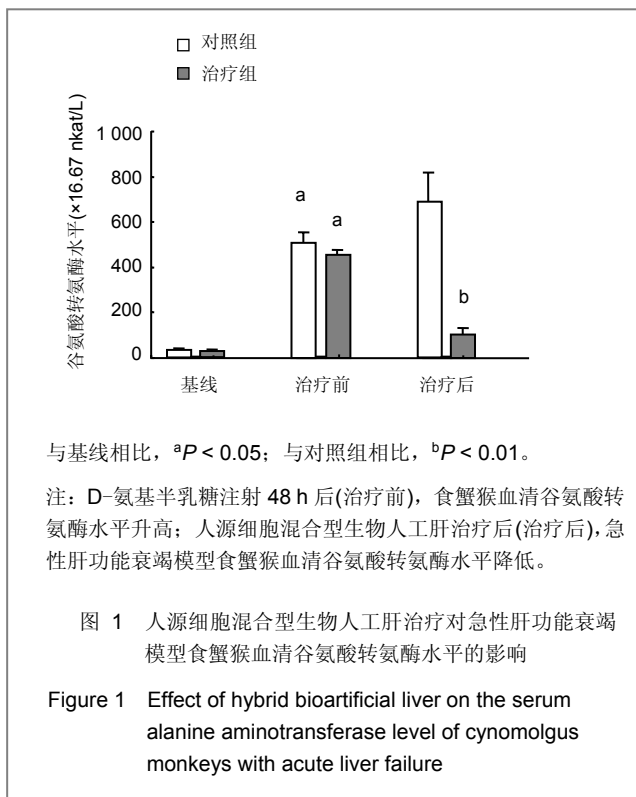
主要观察指标: 对照组及治疗组之间给药前、给药后 48 h 及治疗后 6 h, 天冬氨酸转氨酶、白蛋白、总胆红素、总胆汁酸、尿素氮、肌酐、血氨及计算 Fischer 指数的变化。

统计学分析: 采用 SPSS 13.0 统计学软件分析实验数据, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间计量资料比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

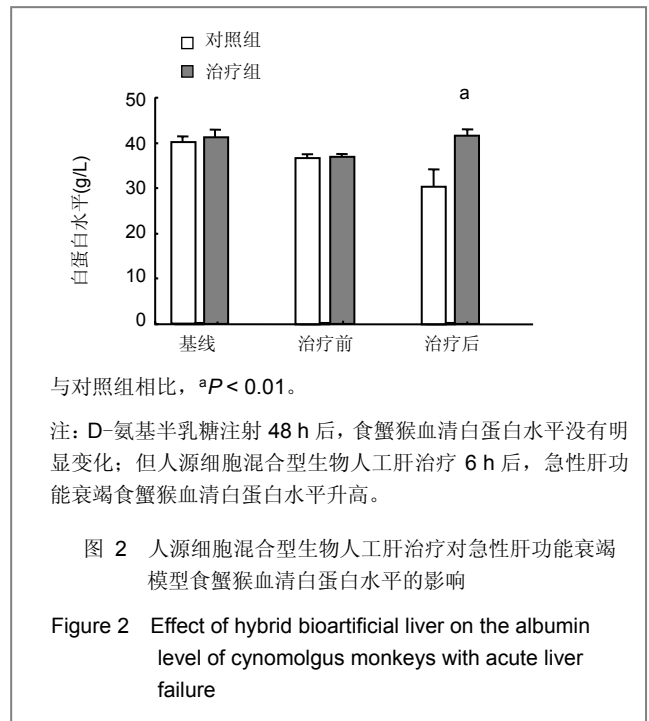
2 结果

2.1 实验动物数量分析 10 只进行救治的急性肝衰竭食蟹猴在治疗过程中无死亡, 均进入结果分析。

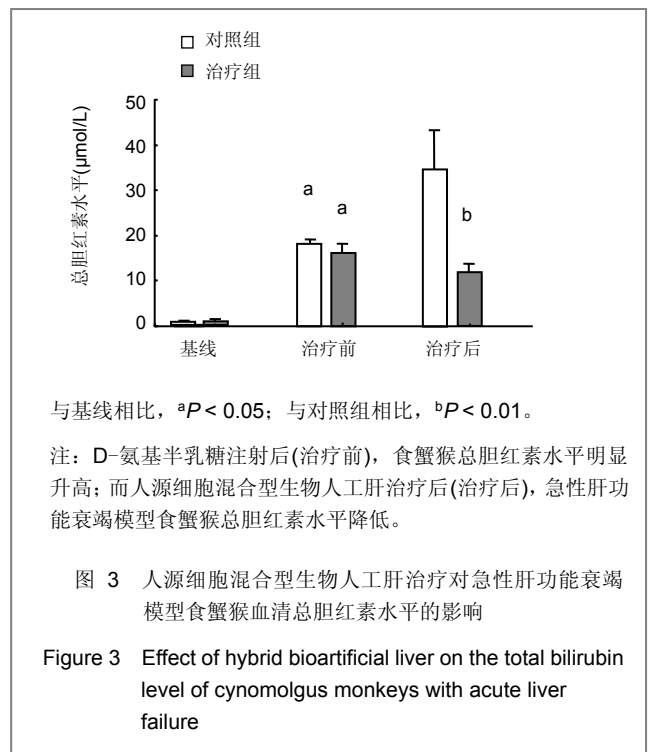
2.2 人源细胞混合型生物人工肝治疗降低急性肝功能衰竭模型食蟹猴血清谷氨酸转氨酶水平 D-氨基半乳糖注射 48 h 后, 食蟹猴血清谷氨酸转氨酶水平较基线明显升高 ($P < 0.05$); 而人源细胞混合型生物人工肝治疗 6 h 后, 急性肝功能衰竭模型食蟹猴血清谷氨酸转氨酶水平显著降低 ($P < 0.01$), 见图 1。



2.3 人源细胞混合型生物人工肝治疗提高急性肝功能衰竭模型食蟹猴血清白蛋白水平 D-氨基半乳糖注射 48 h 后, 食蟹猴血清白蛋白水平较基线没有明显变化; 但人源细胞混合型生物人工肝治疗 6 h 后, 急性肝功能衰竭食蟹猴血清白蛋白水平显著增加, 见图 2。

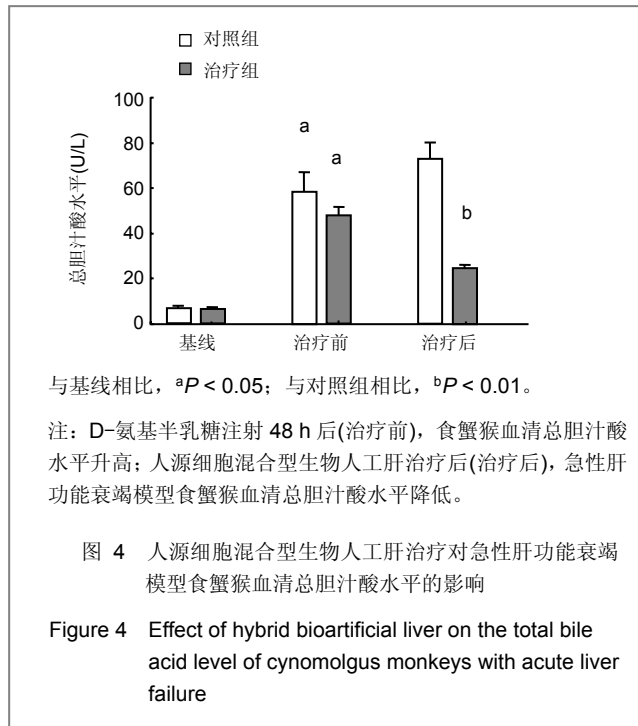


2.4 人源细胞混合型生物人工肝治疗降低急性肝功能衰竭模型食蟹猴血清总胆红素水平 D-氨基半乳糖注射 48 h 后, 食蟹猴血清总胆红素水平较基线明显升高 ($P < 0.05$)。人源细胞混合型生物人工肝治疗 6 h 后, 急性肝功能衰竭模型食蟹猴血清总胆红素水平降低 ($P < 0.01$), 见图 3。

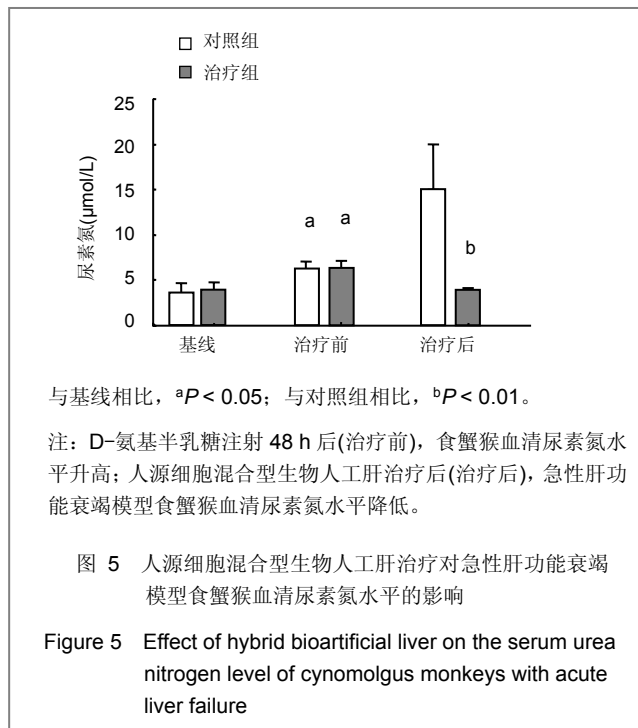


2.5 人源细胞混合型生物人工肝治疗降低急性肝功能衰竭模型食蟹猴血清总胆汁酸水平 D-氨基半乳糖注

射48 h后, 食蟹猴血清总胆汁酸水平较基线明显升高 ($P < 0.05$); 而人源细胞混合型生物人工肝治疗6 h后, 急性肝功能衰竭食蟹猴血清总胆汁酸水平降低 ($P < 0.01$), 见图4。



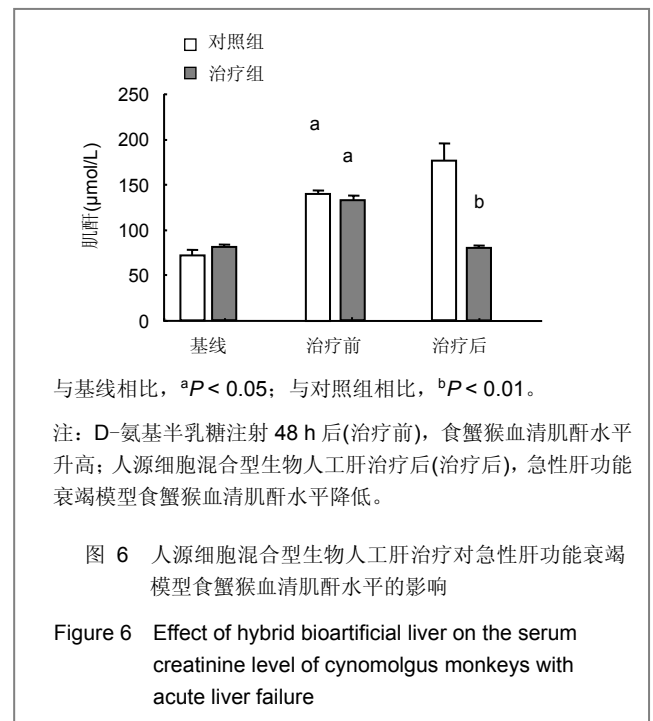
2.6 人源细胞混合型生物人工肝治疗降低急性肝功能衰竭模型食蟹猴血清尿素氮水平 见图5。



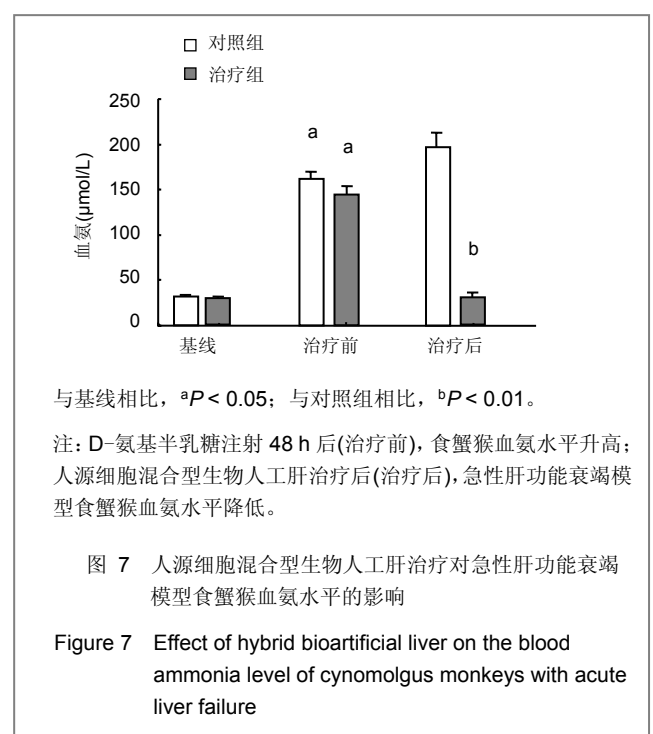
D-氨基半乳糖注射48 h后, 食蟹猴血清尿素氮水平较基线升高 ($P < 0.05$); 而人源细胞混合型生物人工肝治疗6 h后, 急性肝功能衰竭食蟹猴尿素氮水平显著降

低 ($P < 0.01$)。

2.7 人源细胞混合型生物人工肝治疗降低急性肝功能衰竭模型食蟹猴血清肌酐水平 D-氨基半乳糖注射后, 食蟹猴血清肌酐水平较基线明显升高 ($P < 0.05$); 生物人工肝治疗6 h后, 食蟹猴血清肌酐水平显著降低 ($P < 0.01$), 见图6。

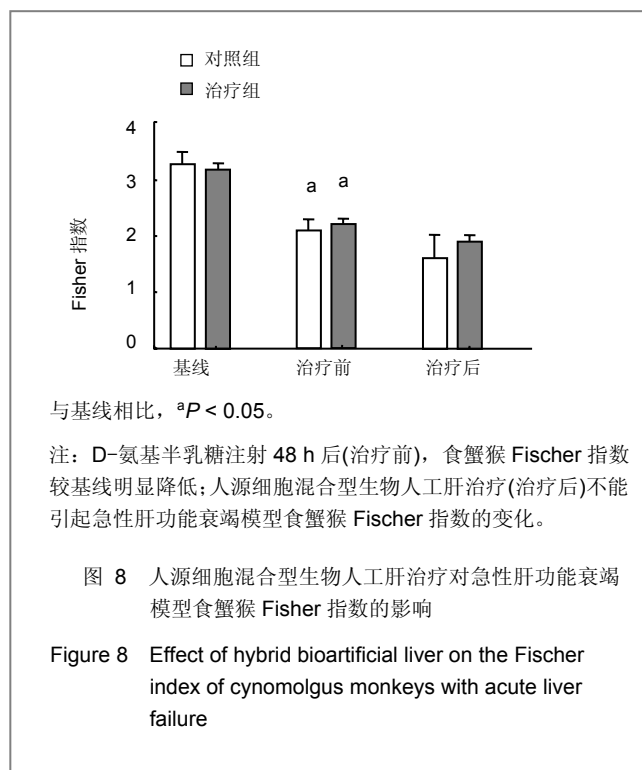


2.8 人源细胞混合型生物人工肝治疗降低急性肝功能衰竭模型食蟹猴血氨水平 见图7。



D-氨基半乳糖注射48 h后, 食蟹猴血氨水平较基线明显升高($P < 0.05$); 而人源细胞混合型生物人工肝治疗6 h后, 急性肝功能衰竭食蟹猴血氨水平显著降低($P < 0.01$)。

2.9 人源细胞混合型生物人工肝治疗对Fischer指数的影响 D-氨基半乳糖注射48 h后, 食蟹猴Fischer指数较基线明显降低($P < 0.05$); 而人源细胞混合型生物人工肝治疗6 h后, 急性肝功能衰竭食蟹猴Fischer指数与未治疗食蟹猴差异无显著性意义($P > 0.05$), 见图8。



3 讨论

急性肝功能衰竭是临床急危重症之一, 其患者病情危重, 进展迅速, 预后凶险, 尽管近年来内科综合治疗措施取得了较大进展, 患者病死率依然高达80%, 是临床亟待解决的难题^[34-37]。目前, 惟一有效的治疗是原位肝移植^[38-44], 然而, 供体的日益短缺、围手术期成本高和手术复杂, 使得绝大多数患者得不到最有效的治疗^[45-46]。基于此种前提下, 生物人工肝能暂时替代衰竭肝脏的部分功能, 为肝脏再生创造条件, 作为通向肝移植的桥梁, 从而降低患者死亡率。

肝细胞作为人源细胞混合型生物人工肝的其核心

原材料, 对肝功能衰竭患者的肝支持作用几乎完全依赖于所用肝细胞的生物学功能。

实验以中国人肝细胞系1为混合型生物人工肝的种子细胞, 对食蟹猴肝衰模型进行救治。结果显示, 经过人源细胞混合型生物人工肝治疗后可以降低急性肝功能衰竭动物肝脏酶学中谷氨酸转氨酶、总胆红素、总胆汁酸水平, 提示生物反应器中的中国人肝细胞系1细胞发挥了积极的解毒作用。同样地, 混合型生物人工肝治疗可以降低急性肝功能衰竭动物血氨及芳香族氨基酸水平, 提高Fischer指数。研究表明, 血氨与芳香族氨基酸的蓄积与肝性脑病密切相关^[47-49], 血氨水平及Fischer指数作为两个关键指标已被广泛应用于混合型生物人工肝的评价。迅速降低的血氨提示生物反应器中的中国人肝细胞系1细胞具有良好的氨清除和调节氨基酸平衡的作用。结果显示白蛋白水平显著回升, 提示经过混合型生物人工肝的治疗, 动物肝脏的白蛋白合成功能有所改善, 同时生物反应器中的中国人肝细胞系1细胞也有一定的白蛋白分泌, 而且实验前使用人血白蛋白预充生物反应器及其管路, 也是白蛋白水平提升的一重要因素。

虽然实验组食蟹猴肝衰模型经治疗后, 相关肝功能指标都得到一定改善, 但是不能恢复到正常基线水平, 说明中国人肝细胞系1细胞与正常肝细胞功能上仍存在一定差距。特别是肝细胞的药物代谢功能, 药物进入体内后的代谢是一个复杂的过程, 包括吸收, 分布, 代谢及排泄^[50], 而这样一个过程主要是通过肝细胞来完成, 肝细胞含有各种药物代谢酶^[51], 主要是P450酶, 也是中国人肝细胞系1细胞代谢功能的一项重要指标。因为在肝衰竭的患者中, 不可避免需要药物的维持治疗。因此, 中国人肝细胞系1细胞的药物代谢功能, 还有待进一步研究。

综上所述, 中国人肝细胞系1细胞在混合型生物反应器中的生物功能得到证实, 因此, 中国人肝细胞系1细胞有成为混合型人工肝种子细胞的潜质, 可进一步探讨其有效性, 有望用于各种动物实验研究及各期临床实验研究。

基金资助: 国家高技术发展计划(863 计划)(2006AA02A141), 课题名称: 人源细胞混合型生物人工肝的研制与开发。

作者贡献: 饶小惠、简国登、张志进行实验设计, 实验实施为饶小惠、简国登、张志, 实验评估为汪艳, 资料收集为饶小惠、简国登, 饶小惠成文, 潘明新、高毅审校, 潘明新、高毅对文章负责。潘明新与高毅对文章贡献相同, 故并列为通讯作者。

利益冲突: 课题不涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验已通过南方医科大学动物伦理委员会审核, 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, et al. Acute liver failure. *Lancet*. 2010;376(9736):190-201.
- [2] Bismuth H, Figueiro J, Samuel D. What should we expect from a bioartificial liver in fulminant hepatic failure? *Artif Organs*. 1998;22(1):26-31.
- [3] Xue YL, Zhao SF, Zhang ZY, et al. Effects of a bioartificial liver support system on acetaminophen induced acute liver failure canines. *World J Gastroenterol*. 1999;5(4):308-311.
- [4] Rong YH, Liu HL, You SL, et al. Construction and experimental study on off-line hybrid bioartificial liver supporting system with human liver cell line. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 2010;24(3):193-195.
- [5] Shi XL, Zhang Y, Chu XH, et al. Evaluation of a novel hybrid bioartificial liver based on a multi-layer flat-plate bioreactor. *World J Gastroenterol*. 2012;18(28):3752-3760.
- [6] Pless G. Bioartificial liver support systems. *Methods Mol Biol*. 2010;640:511-523.
- [7] Miyoshi H, Ehashi T, Kawai H, et al. Three-dimensional perfusion cultures of mouse and pig fetal liver cells in a packed-bed reactor: effect of medium flow rate on cell numbers and hepatic functions. *J Biotechnol*. 2010;148(4):226-232.
- [8] Dan YY, Yeoh GC. Liver stem cells: a scientific and clinical perspective. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23(5):687-698.
- [9] Schroeder IS, Wiese C, Truong TT, et al. Differentiation analysis of pluripotent mouse embryonic stem (ES) cells in vitro. *Methods Mol Biol*. 2009;530:219-250.
- [10] Fonsato V, Herrera MB, Buttiglieri S, et al. Use of a rotary bioartificial liver in the differentiation of human liver stem cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010;16(1):123-132.
- [11] Tsiaoussis J, Newsome PN, Nelson LJ, et al. Which hepatocyte will it be? Hepatocyte choice for bioartificial liver support systems. *Liver Transpl*. 2001;7(1):2-10.
- [12] Nyberg SL, Rimmel RP, Mann HJ, et al. Primary hepatocytes outperform Hep G2 cells as the source of biotransformation functions in a bioartificial liver. *Ann Surg*. 1994;220(1):59-67.
- [13] Nagaki M, Miki K, Kim YI, et al. Development and characterization of a hybrid bioartificial liver using primary hepatocytes entrapped in a basement membrane matrix. *Dig Dis Sci*. 2001;46(5):1046-1056.
- [14] Dixit V. Development of a bioartificial liver using isolated hepatocytes. *Artif Organs*. 1994;18(5):371-384.
- [15] Rozga J, Morsiani E, Lepage E, et al. Isolated hepatocytes in a bioartificial liver: A single group view and experience. *Biotechnol Bioeng*. 1994;43(7):645-653.
- [16] Poyck PP, van Wijk AC, van der Hoeven TV, et al. Evaluation of a new immortalized human fetal liver cell line (cBAL111) for application in bioartificial liver. *J Hepatol*. 2008; 48(2):266-275.
- [17] Sivertsson L, Synnergren J, Jensen J, et al. Hepatic differentiation and maturation of human embryonic stem cells cultured in a perfused three-dimensional bioreactor. *Stem Cells Dev*. 2013;22(4):581-594.
- [18] Nyberg SL, Yagi T, Matsushita T, et al. Membrane barrier of a porcine hepatocyte bioartificial liver. *Liver Transpl*. 2003;9(3):298-305.
- [19] Frühauf JH, Mertsching H, Giri S, et al. Porcine endogenous retrovirus released by a bioartificial liver infects primary human cells. *Liver Int*. 2009;29(10):1553-1561.
- [20] Di Nicuolo G, D'Alessandro A, Andria B, et al. Long-term absence of porcine endogenous retrovirus infection in chronically immunosuppressed patients after treatment with the porcine cell-based Academic Medical Center bioartificial liver. *Xenotransplantation*. 2010;17(6):431-439.
- [21] Yang Q, Liu F, Pan XP, et al. Fluidized-bed bioartificial liver assist devices (BLADs) based on microencapsulated primary porcine hepatocytes have risk of porcine endogenous retroviruses transmission. *Hepatol Int*. 2010;4 (4):757-761.
- [22] Kobayashi N. Life support of artificial liver: development of a bioartificial liver to treat liver failure. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2009;16(2):113-117.
- [23] Sharma R, Greenhough S, Medine CN, et al. Three-dimensional culture of human embryonic stem cell derived hepatic endoderm and its role in bioartificial liver construction. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:236147.
- [24] Mizumoto H, Hayashi S, Matsumoto K, et al. Evaluation of a hybrid artificial liver module based on a spheroid culture system of embryonic stem cell-derived hepatic cells. *Cell Transplant*. 2012;21(2-3):421-428.
- [25] Greenhough S, Medine CN, Hay DC. Pluripotent stem cell derived hepatocyte like cells and their potential in toxicity screening. *Toxicology*. 2010;278(3):250-255.
- [26] Schmelzer E, Triolo F, Turner ME, et al. Three-dimensional perfusion bioreactor culture supports differentiation of human fetal liver cells. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(6):2007-2016.
- [27] Filippi C, Keatch SA, Rangar D, et al. Improvement of C3A cell metabolism for usage in bioartificial liver support systems. *J Hepatol*. 2004;41(4):599-605.
- [28] Harm S, Stroble K, Hartmann J, et al. Alginate-encapsulated human hepatoma C3A cells for use in a bioartificial liver device - the hybrid-MDS. *Int J Artif Organs*. 2009;32(11):769-778.
- [29] Harimoto N, Taketomi A, Kitagawa D, et al. The newly established human hepatocyte cell line: application for the bioartificial liver. *J Hepatol*. 2005;42(4):557-564.

- [30] Hoekstra R, Nibourg GA, van der Hoeven TV, et al. The HepaRG cell line is suitable for bioartificial liver application. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011;43(10):1483-1489.
- [31] Jian GD, Zhang Z, Wang Y, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(12): 2129-2132. 简国登, 张志, 汪艳, 等. 新型人源细胞混合型生物人工肝的安全性 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(12):2129-2132.
- [32] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [33] Xu YZ, Xue K, Gao Y, et al. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi.* 2010;18(19):1985-1989. 徐玉振, 薛琨, 高毅, 等. 非人灵长类动物急性肝功能衰竭模型的建立 [J]. *世界华人消化杂志*, 2010, 18(19):1985-1989.
- [34] Shakil AO, Kramer D, Mazariegos GV, et al. Acute liver failure: clinical features, outcome analysis, and applicability of prognostic criteria. *Liver Transpl.* 2000;6(2):163-169.
- [35] Sass DA, Shakil AO. Fulminant hepatic failure. *Liver Transpl.* 2005;11(6):594-605.
- [36] Castaldo ET, Chari RS. Liver transplantation for acute hepatic failure. *HPB (Oxford).* 2006;8(1):29-34.
- [37] Chamuleau RA, Deurholt T, Hoekstra R. Which are the right cells to be used in a bioartificial liver? *Metab Brain Dis.* 2005; 20(4):327-335.
- [38] Ostapowicz G, Lee WM. Acute hepatic failure: a Western perspective. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000;15(5):480-488.
- [39] Pereira SP, McCarthy M, Ellis AJ, et al. Auxiliary partial orthotopic liver transplantation for acute liver failure. *J Hepatol.* 1997;26(5):1010-1017.
- [40] Goss JA, Shackleton CR, Maggard M, et al. Liver transplantation for fulminant hepatic failure in the pediatric patient. *Arch Surg.* 1998;133(8):839-846.
- [41] Esquivel CO, Keeffe EB, Garcia G, et al. Resection versus transplantation for hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 1999;14 Suppl:S37-41.
- [42] Lee KK, Kim DG, Moon IS, et al. Liver transplantation versus liver resection for the treatment of hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol.* 2010;101(1):47-53.
- [43] Chan SC. Liver transplantation for fulminant hepatic failure: as early as necessary and as late as possible. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26(1):3-4.
- [44] Gómez Cabeza de Vaca V, Bernal Bellido C, Alamo Martínez JN, et al. Liver transplantation due to fulminant hepatic failure. *Transplant Proc.* 2012;44(7):2076-2077.
- [45] Lee WM. Acute liver failure. *Semin Respir Crit Care Med.* 2012;33(1):36-45.
- [46] Lucidi V, Buggenhout A, Boon N, et al. Liver transplantation for acute liver failure in adults. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2008;54(1):49-55.
- [47] Ndraha S, Hasan I, Simadibrata M. The effect of L-ornithine L-aspartate and branch chain amino acids on encephalopathy and nutritional status in liver cirrhosis with malnutrition. *Acta Med Indones.* 2011;43(1):18-22.
- [48] Bajaj JS. Management options for minimal hepatic encephalopathy. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2008; 2(6):785-790.
- [49] Ortiz M, Jacas C, Córdoba J. Minimal hepatic encephalopathy: diagnosis, clinical significance and recommendations. *J Hepatol.* 2005;42 Suppl(1):S45-53.
- [50] Kola I, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(8):711-715.
- [51] Gómez-Lechón MJ, Lahoz A, Castell JV, et al. Evaluation of cytochrome P450 activities in human hepatocytes in vitro. *Methods Mol Biol.* 2012;806:87-97.