

doi: 10.3969/j.issn.1006-5709.2013.05.033

## 关于生物人工肝细胞材料的研究新进展

庄康敏, 李爱民, 刘思德

南方医科大学南方医院消化内科, 广东 广州 510515

**【摘要】** 生物人工肝系统(bioartificial liver support system, BLSS 或 BAL) 细胞材料的研究近 20 年取得长足进步。目前, 国内外学者致力于对细胞材料来源和功能改善方面进行研究, 本文就 BAL 系统中细胞材料的相关基础研究的最新成果作一综述。

**【关键词】** 肝; 生物人工肝系统; 细胞材料

中图分类号: R318.14

文献标识码: A

文章编号: 1006-5709(2013)05-0495-03

收稿日期: 2012-08-15

### The new research progress on cell material of bioartificial liver

ZHUANG Kangmin, LI Aimin, LIU Side

Department of Gastroenterology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

**【Abstract】** The research of cell material of bioartificial liver support system (BLSS or BAL) has made great progress in recent 20 years. At present, the domestic and foreign scholars mainly concentrate the research on the source of cell material and functional improvement. In this article, we briefly review the latest achievement of the basic research of cell material in BAL.

**【Key words】** Liver; Bioartificial liver support system; Cell material

急性肝衰竭(ALF)是一种无肝病的患者出现肝功能突然丧失的一种临床综合征。急性肝衰竭病因多样, 病程多变, 死亡率极高<sup>[1]</sup>。目前认为肝移植是其唯一有效的治疗方案。由于供肝的缺乏, 多数患者未能够进行肝移植治疗, 或者在长期的等待中病情恶化而死亡。近 20 年来, 生物人工肝支持系统(bioartificial liver support system, BLSS 或 BAL) 得到了快速的发展和运用, 大量的动物实验和体外实验展示了这一新技术的光明前景, 使得其有望成为急性肝衰竭患者等待供肝过程中的一种替代治疗和终末期肝病的替代治疗<sup>[2]</sup>。BAL 系统主要是由肝细胞来源、细胞培养方式、生物反应器 3 要素组成, 其核心是相关的细胞材料。因此, 选用合适的细胞材料构建和完善理想的 BAL 系统成为了国内外学者研究的主要方向。本文就 BAL 系统中细胞材料的相关基础研究的最新成果作一综述。

#### 1 BAL 细胞来源

**1.1 同种肝细胞** 同种肝细胞具有正常肝细胞解毒、合成、代谢、生物转化等所需的一切功能, 其稳定性高, 生物功能相同, 是 BAL 系统最为理想细胞材料。但是同种肝细胞的实用价值却较低, 其来源有限, 通常来自于手术切除的肝碎片、不适合于成人肝移植的肝组织。同时, 由于成人肝细胞属于稳定性细胞, 一旦失去体外

微环境, 细胞在 1~2 周内便会死亡<sup>[3]</sup>, 故而体外的培养和增殖均较难, 难以获得足够数量的肝细胞进行 BAL 系统的应用。相比之下, 胚胎肝细胞具有较强的体外分化增殖能力, 然而涉及来源匮乏及伦理问题, 胚胎肝细胞的使用同样受到了限制。

**1.2 异种肝细胞** 异种肝细胞是 BAL 细胞的另一个重要来源, Donato 等<sup>[4]</sup> 将猪、鼠、犬、兔 4 种肝细胞的细胞色素 P450 同工酶、谷胱甘肽硫基转移酶、尿苷二磷酸葡萄糖醛基转移酶活性以及鞣酐代谢与人类肝细胞比较, 发现猪肝细胞代谢功能明显高于其他动物肝细胞, 与人肝细胞最为接近, 并且具有来源广泛、细胞分离简单、价格低廉、细胞活力较好等优点。因此, 猪肝细胞是 BAL 基础和临床研究中应用最多的细胞材料。Kleine 等<sup>[5]</sup> 通过研究猪肝细胞和成人肝细胞在 IL-6、TNF- $\alpha$  作用下细胞色素 P450 的表达抑制, 提示成人肝细胞能更强抑制 CYP1A1、2C8、3A4 的表达, 与猪肝细胞存在显著的物种表达差异, 使用猪肝细胞的 BAL 或临床异种移植会导致体液调节下功能的改变, 显示了其物种不相容性, 可能导致其临床应用的限制。迄今, 对于普遍关注的猪肝细胞存在的内源性逆转录病毒(PERV) 的安全性的研究, 2005 年, Di Nucuolo 等<sup>[6]</sup> 研究得出, 在追踪使用以猪肝细胞为材料的 AMC-BAL 治疗后的一期临床试验 14 例急性肝衰竭患者时, 发现他们血浆和外周血单核细胞中 PERV DNA 时在 2 周内即消失, 体外感染实验中未见 HEK293 感染, 证明猪肝细胞在 AMC-BAL 应用中的安全。2010 年, Di Nucuolo 等<sup>[7]</sup> 再次研究了以猪肝细胞为材料的 AMC-BAL 过渡治疗行肝移植的 8 例患者, 在长期使用

基金项目: 广东省教育部产学研结合项目(2011B090400018); 广东省科技计划项目(2009B060300020); 广东省高等学校人才引进专项资金项目(粤财教字[2011]431号)

通讯作者: 刘思德, 医学博士, 教授, 主任医师, 主要从事生物人工肝研究

免疫抑制剂后,检测其外周血单核细胞未见 PERV 感染。施晓雷等<sup>[8]</sup>研究以半乳糖基化壳聚糖纳米膜支架的多层幅向流动反应器为构成的新型生物人工肝系统安全性时,发现 PERV 的穿透性可能与半透膜孔径、组成材料以及 PERV 的暴露时间有关。但异种细胞的安全性尚需进一步的临床观察和随访研究来证实。

**1.3 肿瘤性肝细胞株** 肿瘤性肝细胞株与原代成人肝细胞比较的优点是:具有正常肝细胞功能,无限增殖能力,体外易于培养,易于达到 BAL 所需细胞材料数量要求,故而也成为了 BAL 细胞材料的一个重要来源。常用的肿瘤性肝细胞株有 HepG2、C3A 细胞株<sup>[9]</sup>,HepG2 明显缺点是较低的代谢解毒能力,且缺乏细胞色素 P450 活性,这也限制了其应用。Nibourg 等<sup>[10]</sup>利用人妊娠 X 受体基因在 HepG2 细胞的稳定表达形成 cBAL119 细胞株,显著提高了 HepG2 的应用。Tang 等<sup>[11]</sup>试用真核双基因表达载体 pBudCE4.1 构建了 HepG2(hArg I + hOTC) 细胞,明显提高了其耐氨能力和氨解毒,使其分别达到了原先 HepG2 细胞株的 3、3.1 倍。C3A 细胞是由 HepG2 衍生而来的一种细胞克隆,其分化程度高于 HepG2,最大的进步是 P450 的活性较 HepG2 明显提高,与此同时,它也是目前唯一应用于动物实验和临床生物人工肝体外肝脏支持系统体外肝辅助装置的肿瘤来源细胞<sup>[12]</sup>。吴青松等<sup>[13]</sup>研究对比了 C3A 与 CL1、HepG2、HepFMMU 细胞株的生物学特性和功能得出 C3A 具有较强的白蛋白合成能力和安定等药物的代谢能力,但尿素合成能力及白蛋白分泌能力较差,需进一步改进。此外,Laurent 等<sup>[14]</sup>利用重组基底膜凝胶(EHS-gel)培养基创造一种三维细胞形态的培养环境,构建了一种新型的肝肿瘤细胞株 FLC-4,其肝细胞核因子(HNF-4 $\alpha$ )等其他肝特异性基因的表达明显高于 HepG2 细胞株,为 BAL 细胞材料提供了新的选择。

**1.4 永生化肝细胞株** 永生化细胞株的获得可以通过基因工程技术使细胞停留在分化的某个阶段,不能进行终末分化,获得具有无限增殖和良好功能的子细胞。同时,也可以经选择性传代培养建立细胞株。前者常用的方法是病毒基因转染,如猴肾病毒 40(SV40) T 抗原、腺病毒的 E1A 和 E1B 基因等,SV40T 广泛用于各种人肝细胞类型的永生化建构。目前,利用其作为转染基因构建的永生化细胞株有 OUMS-29、G418、胎肝细胞系等。其中,OUMS-29 是一株人胎肝细胞转染 PSV3neo 质粒获得的含有永生化基因 SV40Tag 肿瘤抗原的肝细胞株,可表达许多特殊肝功能标记物,并具有合成白蛋白、人凝血因子 X、谷氨酰胺合成酶、尿素合成等功能<sup>[15]</sup>。此外,亦有研究者利用端粒酶逆转录酶 hTERT 导入构建永生化细胞株,Deurholt 等利用 hTERT 导入人胚胎肝细胞构建了永生

化细胞株 cBAL111,其能表达多种特殊肝功能标记物,如谷胱甘肽硫转移酶、细胞角蛋白 19(CK-19)、CD146。将其移植入免疫缺陷的大鼠中,可分化为肝细胞,并且在 34 d 内未见肿瘤,提示其安全性。cBAL111 细胞株有肝细胞所有特殊功能,在 AMC-BAL 系统中氨代谢和尿素合成能力分别是原代肝细胞的 49%、90%,但白蛋白生成功能和利多卡因转化率较低,提示需进一步刺激其分化<sup>[16]</sup>。

由于 SV40T 长期存在于永生化肝细胞中,可能诱导肝细胞去分化和核型不稳定,并有诱导人体肿瘤发生的潜在危险。故而可逆性永生化细胞株的构建也成为了研究的热点之一。所谓可逆性永生化,即将永生化基因导入细胞后成功建立永生化细胞株,并在体外繁殖到一定数量后,再利用 Cre-LoxP 特异位点重组技术,切除永生化基因使细胞恢复到永生化前的状态。基于此原理,Kobayashi 等<sup>[17-18]</sup>成功构建了 NKNT-3 细胞株。最近,Meng 等<sup>[19]</sup>转导 SV40Tag 基因入猪肝细胞,构建了一株可逆性永生化细胞株。并利用改良的四步胶原酶逆行灌注技术培养、分离,能获得细胞活性高达 97% 约  $1.05 \times 10^9$  细胞,为细胞转导效率低这一问题的解决及分离技术的提高提供了新的方法。

**1.5 干细胞** 近年来,干细胞因其具有的多向分化,自我复制的优势而越来越受到重视。肝脏的干细胞分为肝源性和非肝源性两类。前者包括肝内卵圆细胞和小肝细胞等,后者包括胚胎干细胞、骨髓干细胞、间充质干细胞、造血干细胞和胰腺上皮祖细胞等。Wurm 等<sup>[20]</sup>介绍了利用小肝细胞(small human hepatocytes)作为细胞材料的一种新型生物型人工肝,在研究中表示小肝细胞具有肝细胞多种特殊功能,如减少乙醇和苯二氮卓、尿素合成、乳酸形成、LDH 释放等,且其生物转化能力高于猪肝细胞。此外,胚胎干细胞(embryonic stem cells,ESCs)和间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs),二者均具有较强的分化复制能力,可形成大量终末分化细胞,是当前研究的热点。最近,Bukong 等<sup>[21]</sup>采取了一种新型的逐步诱导方式,先后利用 TGF 超家族和 FGF 等相关细胞因子体外诱导胚胎干细胞分化为肝细胞,诱导分化成的肝细胞具有肝细胞特异性表型 CD81、CK8、LDL 受体等,并能生成白蛋白、谷丙转氨酶、乙醇脱氢酶、CYP450 等,提示能够通过调控分化过程中的相关因素达到人为目的。Za-goura 等<sup>[22]</sup>在妊娠中期的羊水中提取出 MSCs(AF-MSCs),体外利用肝细胞生长因子(HGF)、表皮生长因子(EGF)、纤维母细胞生长因子(bFGF)诱导分化成肝祖细胞样细胞(HPL)和肝细胞样细胞(HL),植入由 CCl<sub>4</sub> 诱导的急性肝衰竭小鼠,能够明显改善其肝功能。SUN 等将脂肪间充质干细胞静脉注入肝脏缺血-再灌注损伤的小鼠体内,显示其能够显著保存肝细胞

的完整性,并能抑制炎症反应、氧化应激和细胞凋亡等不良反应。由于胚胎干细胞涉及伦理问题,间充质干细胞在人体来源不足,体外培养寿命不长等缺点。Li-ang 等<sup>[23]</sup>通过转染 hTERT 基因到人脐带血中的间充质细胞(hUCMSCs),新转染的 MSCs 细胞生存时间延长,能够表达肝细胞特异性因子,如 AFP、CK-18、白蛋白等,且植入裸鼠体内未发现其转化为肿瘤,提示其安全性。Groth 等<sup>[24]</sup>在体外培养基 HHMM-P 中,利用 HGF、EGF 成功诱导分化猪 MSCs 为肝细胞样细胞,为开拓肝细胞来源提供了新的途径。

## 2 结语

随着各种细胞材料的研究不断深入,作为 BAL 系统的核心元素—细胞支持技术在近些年来取得了长足的进步和发展,但仍有许多亟待解决的难题。今后,应继续致力于发掘完善新的细胞来源,进一步模拟肝细胞体内微环境,解决管理及技术支持方面的问题,为早日创建成熟的能够投入临床应用的 BAL 系统而努力。

## 参考文献

[1] Yu LC, Wang YM, He CL. Acute liver failure: update [J]. Chinese Hepatology, 2008, 13(5): 404-410.  
于乐成,王宇明,何长伦. 急性肝衰竭最新认识[J]. 肝脏, 2008, 13(5): 404-410.

[2] Strain AJ, Neuberger JM. A bioartificial liver—state of the art [J]. Science, 2002, 295(5557): 1005-1009.

[3] Elaut G, Henkens T, PaDeleu P, et al. Molecular mechanisms underlying the dedifferentiation process of isolated hepatocytes and their cultures [J]. Curr Drug Metab, 2006, 7(6): 629-660.

[4] Donato MT, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. Characterization of drug metabolizing activities in pig hepatocytes for use in bioartificial liver devices: comparison with other hepatic cellular models [J]. J Hepatol, 1999, 31(3): 542-549.

[5] Kleine M, Schrem H, Borlak J, et al. Clinical versatility of porcine hepatocytes in the light of interspecies differences in cytochrome P450 regulation and expression [J]. Xenotransplantation, 2008, 15(4): 208-217.

[6] Di Nicuolo G, van de Kerkhove MP, Hoekstra R, et al. No evidence of in vitro and in vivo porcine endogenous retrovirus infection after plasmapheresis through the AMC-bioartificial liver [J]. Xenotransplantation, 2005, 12(4): 286-292.

[7] 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 [J]. Xenotransplantation, 2010, 17(6): 431-439.

[8] Shi XL, Han B, Zhang Y. New evidence of porcine endogenous retrovirus transmission with new bio-artificial liver system: a experimental study [J]. Chin J Hepatol, 2012, 20(1): 45-49.  
施晓雷,韩冰,张悦,等. 新型生物人工肝系统安全性的实验研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2012, 20(1): 45-49.

[9] Kinasiewicz A, Gautier A, Lewinska D, et al. Culture of C3A cells in alginate beads for fluidized bed bioartificial liver [J]. Transplant Proc,

2007, 39(9): 2911-2913.

[10] Nibourg GA, Huisman MT, vander Hoeven TV, et al. Stable overexpression of Pregnane X receptor in hepG2 cells increases its potential for bioartificial liver application [J]. Liver Transpl, 2010, 16(9): 1075-1085.

[11] Tang N, Wang Y, Wang X, et al. Stable overexpression of arginase I and ornithine transcarbamylase in HepG2 cells improves its ammonia detoxification [J]. J Cell Biochem, 2012, 113(2): 518-527.

[12] Pless G, Sauer IM. Bioartificial liver: current status [J]. Transplant Proc, 2005, 37(9): 3893-3895.

[13] Wu QS, Li ZG, Liu GB, et al. Comparison of biological features and functions of human hepatocyte lines CL-1, HepFMMU, HepG2, and C3A [J]. The Journal of Practical Medicine, 2012, 28(4): 540-543.  
吴青松,李治国,刘广波,等. 人源肝细胞系 CL-1、HepFMMU、HepG2、C3A 生物学特性与功能的比较[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(4): 540-543.

[14] Laurent T, Murase D, Tsukioka S, et al. A novel human hepatoma cell line, FLC-4, exhibits highly enhanced liver differentiation functions through the three-dimensional cell shape [J]. J Cell Physiol, 2012, 227(7): 2898-2906.

[15] Kobayashi N, Miyazaki M, Fukaya K, et al. Transplantation of highly differentiated immortalized human hepatocytes to treat acute liver failure [J]. Transplantation, 2000, 69(2): 202-207.

[16] Deurholt T, van Til NP, Chhatta AA, et al. Novel immortalized human fetal liver cell line, cBAL111, has the potential to differentiate into functional hepatocytes [J]. BMC Biotechnol, 2009, 9: 89.

[17] Kobayashi N, Nqguchi H, Watanabe T, et al. A new approach to develop a biohybrid artificial liver using a tightly regulated human hepatocyte cell line [J]. Hum Cell, 2000, 13(4): 229-235.

[18] Kobayashi N, Fujiwara T, Westerman KA, et al. Prevention of acute liver failure in rats with reversible immortalized human hepatocytes [J]. Science, 2000, 287(5456): 1258-1262.

[19] Meng FY, Chen ZS, Han M, et al. Porcine hepatocyte isolation and reversible immortalization mediated by retroviral transfer and site-specific recombination [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(13): 1660-1664.

[20] Wurm M, Woess C, Libiseller K, et al. Challenging small human hepatocytes with opiates: further characterization of a novel prototype bioartificial liver [J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16(3): 807-813.

[21] Bukong TN, Lo T, Szabo G, et al. Novel developmental biology-based protocol of embryonic stem cell differentiation to morphologically sound and functional yet immature hepatocytes [J]. Liver Int, 2012, 32(5): 732-741.

[22] Zagoura DS, Roubelakis MG, Bitsika V, et al. Therapeutic potential of a distinct population of human amniotic fluid mesenchymal stem cells and their secreted molecules in mice with acute hepatic failure [J]. Gut, 2012, 61(6): 894-906.

[23] Liang XJ, Chen XJ, Yang DH, et al. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells by hTERT gene transfection in vitro [J]. Cell Biol Int, 2012, 36(2): 215-221.

[24] Groth A, Ottinger S, Kleist C, et al. Evaluation of porcine mesenchymal stem cells for therapeutic use in human liver cancer [J]. Int J Oncol, 2012, 40(2): 391-401.