



培养人肝细胞用于生物人工肝 治疗肝衰竭的实验研究

An Experimental Study on Therapy in Hepatic Failure
with the Cultured Human Hepatic Cells

王英杰



高等教育出版社

HIGHER EDUCATION PRESS



培养人肝细胞用于生物人工肝 治疗肝衰竭的实验研究

An Experimental Study on Therapy in Hepatic Failure
with the Cultured Human Hepatic Cells

王英杰



高等教育出版社

HIGHER EDUCATION PRESS

图书在版编目(CIP)数据

培养人肝细胞用于生物人工肝治疗肝衰竭的实验研究/
王英杰. —北京:高等教育出版社, 2002. 6
ISBN 7-04-010428-8

I. 培... II. 王... III. 人工肝-应用-肝疾病:
功能性疾病-治疗-实验-研究 IV. R575.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2001)第 082567 号

培养人肝细胞用于生物人工肝治疗肝衰竭的实验研究
王英杰

出版发行	高等教育出版社	购书热线	010-64054588
社 址	北京市东城区沙滩后街 55 号	免费咨询	800-810-0598
邮政编码	100009	网 址	http://www.hep.edu.cn
传 真	010-64014048		http://www.hep.com.cn
经 销	新华书店北京发行所		
排 版	高等教育出版社照排中心		
印 刷	中国科学院印刷厂		
开 本	850×1168 1/32		
印 张	4.375	版 次	2002 年 6 月第 1 版
字 数	110 000	印 次	2002 年 6 月第 1 次印刷
插 页	2	定 价	7.90 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

作者简介



王英杰, 陕西延安市人, 第三军医大学西南医院全军感染病研究所副教授、副主任医师、硕士生导师。1985年毕业于延安大学医学系, 获学士学位; 1992年和1997年在第三军医大学分获传染病学硕士学位和博士学位; 1999年获首届全国百篇优秀博士学位论文奖。

主要从事重型肝炎肝衰竭发病机制和防治的研究, 主攻生物人工肝研究方向。1994年以来先后负责完成包括国家“九五”重点攻关项目在内的4项(省部级以上)生物人工肝方面的课题研究, 成功构建了具有完全自主知识产权、国内外尚无先例的新型“三合一”混合生物人工肝支持系统, 已获专利, 并顺利过渡应用于临床, 为重型肝炎肝衰竭的治疗提供了新的有效手段。

1994年至今在WGJ、中华医学杂志、中华传染病杂志、中华肝脏病杂志等发表论文80余篇, 参编专著9部。硕士和博士课题分获1998年和1999年军队科技进步二等奖, 两次荣立三等功, 2000年被评为军队“科技新星”。

目前承担着国家自然科学基金专项和面上项目、军队重大科技成果扩试等4项生物人工肝基础、临床及仪器研究课题。担任中华医学会重庆分会感染病专委会委员、重庆市生物医学工程学会委员兼生物材料与人工器官专委会副主任委员、《肝脏》杂志编委、《肝脏电子快讯》编委。

通讯地址: 重庆市沙坪坝区高滩岩30号(400038)

单位: 第三军医大学西南医院全军感染病研究所

电话: 023-68754141(O)

E-mail: Wangyj103@263.net

导师简介



李梦东, 1927年10月生于河南浚县。1948年考入河南大学医学院, 1953年毕业于第七军医大学医疗系本科。

1972—1980年任第七军医大学二院传染科主治医师、讲师。1981—1985年任第三军医大学二院传染科副教授、教研室主任。1986年晋升为教授、主任医师、硕士生导师。1990年任该校一院传染科主任、博士生导师。

1998年离休前曾任中华医学会四川省分会传染病与寄生虫病专委会副主任委员、中华医学会重庆分会常务理事、重庆市传染病与寄生虫病专委会主任委员, 并任“第三军医大学学报”常务编委、“重庆医学”副主编及“中华肝脏病杂志”、“临床肝胆病杂志”等编委。

在长期的临床医疗、教学、科研实践中, 对病毒性肝炎, 小儿传染病、感染与免疫造诣较深, 抢救了大量危重疑难病人。治学严谨, 诲人不倦, 先后培养硕士生30余名, 博士生6名, 发表论著百余篇。主编“实用传染病学”、“传染病学新进展”等5部专著, 参加“肝炎学大典”、“现代感染性疾病与传染病学”等10多部专著的编写。



王宇明,1951年11月生于江苏海安。第三军医大学西南医院全军感染病研究所主任,教授,主任医师,博士生导师。

1976年贵阳医学院医疗系毕业;1985年第三军医大学硕士毕业;1990—1991年获笹川医学奖学金赴日本岐阜大学研修;1995—1998年NIH资助,在美国约翰斯·霍普金斯大学医学院研修。

从事医、教、研工作25年,具有扎实的理论基础,丰富的临床经验,为本学科领军人。主要从事重症肝炎/肝功能衰竭、肝炎病毒核酸变异、动物模型、肝再生及感染病学学科发展等研究。1985年以来发表论文60余篇、英文论著10篇,主编专著3部。培养硕士生10名、博士生6名,博士后1名。

现任中华感染病学会全国委员、中华病毒学会全国委员兼理事,重庆市感染病专委会主任委员,全军感染病专委会副主任委员。为2家中华系列杂志副主编,8家杂志编委及J Clin Microbiol Infect审稿人。获军队科技进步二等奖4项、国家自然科学基金4项、国家科委重点课题1项,享受政府特殊津贴。

内 容 提 要

本书为作者 1997 年博士研究生毕业时的学位论文全文,由正文(研究论文)与附录(相关文献综述)两部分组成。为符合出版要求,做了适当的调整,并略加修改。

本书的研究为国家自然科学基金和国家“九五”重点攻关项目,对分离培养人肝细胞用于生物人工肝及其治疗肝衰竭进行了系列实验研究。主要包括:建立了简易体外两步灌流酶消化分离人肝细胞法,对培养人肝细胞及其分泌上清进行了生物学活性的研究;采用综合限制贴壁技术、微载体、中空纤维管进行了人肝细胞-肝非实质细胞混合培养研究,建立了用于生物人工肝的高密度培养系统;以混合球形体人肝细胞及其培养上清为材料,中空纤维管为生物反应器,与辅助循环装置共同构成体外生物人工肝支持系统,并对其性能进行了系列评价。实验研究为生物人工肝的进一步深入研究及应用提供了可靠的实验依据,奠定了一定的基础。

本书研究内容曾获军队科技进步二等奖。

郑 重 声 明

高等教育出版社依法对本书享有专有出版权。任何未经许可的复制、销售行为均违反《中华人民共和国著作权法》。行为人将承担相应的民事责任和行政责任,构成犯罪的,将被依法追究刑事责任。社会各界人士如发现上述侵权行为,希望及时举报,本社将奖励举报有功人员。

现公布举报电话及通讯地址:

电 话:(010) 84043279 13801081108

传 真:(010) 64033424

E-mail:dd@hep.com.cn

地 址:北京市东城区沙滩后街 55 号

邮 编:100009

责任编辑	罗艳红
封面设计	张楠
责任绘图	朱静
版式设计	史新薇
责任校对	李辉
责任印制	宋克学

目 录

1. 前言	1
1.1 肝功能衰竭及其治疗现状	1
1.2 人工肝与肝支持	2
1.3 生物人工肝	3
1.4 有关研究存在的不足	4
1.5 本研究的目的及意义	5
1.6 参考文献	5
2. 人肝细胞的分离、常规培养及其分泌上清生物活性的观察 ...	9
2.1 材料与方法	10
2.1.1 材料及主要试剂	10
2.1.2 人胎肝细胞的分离	10
2.1.3 胎肝细胞的培养	11
2.1.4 培养胎肝细胞的形态与功能观察	13
2.1.5 大鼠肝细胞的分离、培养及 HCS 作用的 形态观察	13
2.1.6 大鼠肝细胞 DNA 合成率的测定	14
2.1.7 小鼠 FHF 模型的复制及实验分组	14
2.1.8 HCS 对 FHF 小鼠作用的观察	15
2.1.9 统计分析	16

2.2 结果	16
2.2.1 胎肝细胞的分离与常规培养	16
2.2.2 培养胎肝细胞的形态观察	16
2.2.3 培养胎肝细胞蛋白合成的检测	18
2.2.4 HCS 刺激大鼠肝细胞增殖的形态观察	18
2.2.5 HCS 对大鼠肝细胞 DNA 合成的影响	20
2.2.6 HCS 对小鼠存活率的影响	21
2.2.7 HCS 对小鼠血清 ALT 水平的影响	22
2.2.8 实验小鼠肝脏病理改变	22
2.3 讨论	23
2.3.1 人胎肝细胞的分离与培养	23
2.3.2 胎肝细胞在肝衰竭治疗中的作用及意义	24
2.3.3 早期胎肝治疗重型肝炎的机制与 HCS 的作用	25
2.4 参考文献	26
3. 高密度悬浮培养人肝细胞系统的建立	30
3.1 材料与方法	31
3.1.1 主要试剂及器材	31
3.1.2 肝细胞-肝非实质细胞的分离	32
3.1.3 肝细胞-肝非实质细胞的激载体粘附培养	33
3.1.4 肝细胞-肝非实质细胞的球形聚集培养	33
3.1.5 聚集肝细胞的中空纤维管培养	33
3.1.6 培养肝细胞的功能与形态观察	34
3.2 结果	35
3.2.1 肝细胞-肝非实质细胞的混合激载体培养	35
3.2.2 肝细胞-肝非实质细胞的混合球体培养	38
3.2.3 中空纤维管对肝细胞球形体的培养	43
3.3 讨论	45
3.3.1 肝细胞的激载体培养	45
3.3.2 肝细胞球形聚集体培养	46

3.3.3 肝细胞-肝非实质细胞的混合培养	47
3.3.4 中空纤维管培养球形聚集肝细胞	48
3.4 参考文献	50
4. 生物人工肝支持系统的构建及其功能评价	53
4.1 材料与方法	54
4.1.1 主要试剂与器材	54
4.1.2 肝细胞的分离与培养	54
4.1.3 EBLSS 的组成	55
4.1.4 EBLSS 生物合成功能的评价	55
4.1.5 EBLSS 药物转化实验	56
4.1.6 EBLSS 循环重型肝炎病人血清实验	56
4.1.7 EBLSS 肝细胞的活力观察	56
4.2 结果	57
4.2.1 EBLSS 的建立	57
4.2.2 EBLSS 循环液中蛋白、尿素含量变化	58
4.2.3 EBLSS 循环液对培养大鼠肝细胞 DNA 合成的 影响	58
4.2.4 EBLSS 对安定的转化代谢	59
4.2.5 EBLSS 对利多卡因的转化代谢	59
4.2.6 循环重型肝炎患者血清胆红素的变化	61
4.2.7 循环重型肝炎患者血清白蛋白含量分析	61
4.2.8 循环重型肝炎患者血清 AFP 含量分析	63
4.2.9 循环重型肝炎血清氨基酸变化	63
4.2.10 EBLSS 功能评价实验对肝细胞的影响	64
4.3 讨论	66
4.3.1 体外生物人工肝系统的构建	66
4.3.2 EBLSS 的生物合成功能	67
4.3.3 EBLSS 的生物转化功能	68
4.3.4 EBLSS 支持治疗重型肝炎的可能性	69

4.4	参考文献	70
5.	生物人工肝支持系统对肝衰竭动物的支持作用	74
5.1	材料与方法	75
5.1.1	主要试剂与材料	75
5.1.2	人肝细胞的制备	75
5.1.3	实验动物	75
5.1.4	兔 FHF 模型的制备	75
5.1.5	FHF 兔的人工肝支持	75
5.1.6	犬急性肝缺血模型的制备	77
5.1.7	FHF 犬的人工肝支持方法与观察指标	77
5.1.8	EBLSS 循环后肝细胞活力观察	78
5.2	结果	79
5.2.1	FHF 兔存活时间	79
5.2.2	FHF 兔主要生化指标的变化	79
5.2.3	FHF 兔肝组织病理改变	79
5.2.4	人工肝支持犬的存活时间	82
5.2.5	实验犬的生命征变化	82
5.2.6	实验犬血氨浓度的动态观察	83
5.2.7	实验犬血乳酸浓度的动态观察	83
5.2.8	EBLSS 循环过程肝细胞活力变化	85
5.3	讨论	85
5.3.1	EBLSS 对化学药物诱导 FHF 兔的支持作用	85
5.3.2	EBLSS 对急性肝缺血模型犬肝功能的 代偿作用	86
5.3.3	EBLSS 的完善及其用于肝衰竭治疗的前景	87
5.4	参考文献	89
6.	小结	93
7.	综述一:肝细胞的分离、培养与应用研究	96
7.1	肝细胞的分离技术	97

7.2	肝细胞的原代培养	99
7.3	肝细胞的传代培养	102
7.4	培养肝细胞的应用研究	105
7.4.1	肝炎病毒的感染与培养	105
7.4.2	生物型人工肝支持系统	105
7.4.3	肝细胞移植	106
7.4.4	基因治疗	106
7.5	结语	107
7.6	参考文献	107
8.	综述二:生物人工肝及其治疗急性肝衰竭的研究进展	111
8.1	生物人工肝的历史回顾	112
8.1.1	早期人工肝支持系统	112
8.1.2	生物(混合)人工肝系统	113
8.2	生物人工肝的肝细胞选择	114
8.3	生物人工肝的肝细胞培养	116
8.4	生物人工肝的体外循环装置	117
8.5	混合型生物人工肝的现状	119
8.6	生物人工肝对肝衰竭动物的支持作用	121
8.7	生物人工肝的临床应用及意义	122
8.8	参考文献	124
	英文缩写与简写词	129

第1章 前言

早在 50 年前,人们就开始了人工肝(artificial liver)的研究,希望利用某种人工肝装置或方法,作为肝衰竭(hepatic failure)患者肝功能的替代手段。然而因技术与方法学的限制以及对肝衰竭发病机制认识的局限,早期的各种人工肝装置及方法的疗效均不尽人意。

近 10 年来,随着肝细胞分离与培养技术的日趋成熟,将与正常肝脏结构与功能完全一致的培养肝细胞用于人工肝脏的研究,产生了新一代生物人工肝支持系统(bioartificial liver support system),从而使该领域的研究步入了一个新的发展阶段。

1.1 肝功能衰竭及其治疗现状

肝脏是机体重要的器官之一,有“化学工厂”之称,担负着机体生物合成、转化代谢和解毒排泄等重要的生理功能。因各种原因造成肝脏细胞的大量坏死,将导致肝衰竭,引起严重的代谢异常和毒性物质的聚集,进而对机体产生一系列严重的不利影响,甚至导致多器官功能衰竭。故肝衰竭是多种严重肝病的终末期表现形

式,常见的病毒性肝炎、酒精性肝炎、中毒性肝损害及代谢性疾病等均可引起。

在我国,以重型病毒性肝炎引起暴发性或亚暴发性肝衰竭最为多见,其病情凶险、预后极差。十余年来,虽已在其病因、发病机制及临床诊断等方面取得显著成绩,但由于此类患者的大部分肝细胞发生变性、坏死、功能衰竭,依靠现有的病因疗法、一般对症支持疗法、动物源性促肝细胞生长因子等多不能代偿肝细胞功能,病死率仍高达60%~80%以上。

目前公认,急性肝衰竭(acute hepatic failure, AFL)、暴发性肝衰竭(fulminant hepatic failure, FHF)和终末期慢性肝病的最有效的疗法是肝移植^[1,2],经改进手术方法及使用免疫抑制剂对抗排斥反应,已使肝移植患者的总存活率达75%。但由于肝移植供体来源严重匮乏,难以满足急性和暴发性肝衰竭的紧急肝移植需要,而且存在手术复杂、围手术期要求严格、需终生使用免疫抑制剂、费用较高等局限性,故国外学者在积极开展肝移植的同时,长期致力于人工肝脏的研究,以期作为等待肝移植的过渡支持手段和替代疗法^[3-6]。

1.2 人工肝与肝支持

人工肝是具有肝脏功能的人工器官。迄今为止,各种人工肝都是具有一定正常肝脏功能的体外装置,像人工肾一样,通过体外血液循环和某种特殊的器材实现对原有肝脏在功能上的支持,即人工肝支持(artificial liver support)。人工肝研究的出发点主要基于肝功能衰竭时必然要造成严重的代谢紊乱和毒性物质积聚,二者反过来又进一步影响肝细胞功能、加剧肝细胞坏死、影响残存肝细胞再生,从而加重肝功能衰竭,形成恶性循环,最终导致患者死亡。

已知,肝组织本身具有极强的再生能力,动物实验显示肝大部

分切除术后,可在较短的时间内得到再生与修复。临床上各种原因所致肝功能衰竭难以救治的原因,关键在于患者肝细胞发生大块或亚大块坏死,其坏死程度和速度远大于残存肝细胞的再生能力,加上内毒素血症等综合因素作用,使坏死肝组织来不及再生修复而致患者死亡。人们寄希望采用人工解毒、代偿肝脏代谢及合成功能的方法,打破上述恶性循环,稳定肝衰竭患者的内环境,为患者的救治创造条件。为此研究者已先后尝试了血液透析、血液/血浆灌流、血浆置换及交换输血等多种形式的人工肝支持方法^[7-12],这些早期的人工肝方法属Ⅰ型(非生物型)和Ⅱ型(中间型)人工肝,大多以解毒为主,实际上是血液净化技术移植并应用于肝病领域。

实践证明,这些人工肝支持方法具有显著改善肝性脑病的效果,但患者存活率并无明显提高^[13]。因此,在长达40年的时间里,早期人工肝及其肝支持方法并未实现提高肝功能衰竭治疗水平的目的。

1.3 生物人工肝

生物人工肝由生物成分和合成材料组成,系将同种或异种供体的全肝、肝组织片、肝细胞悬液、培养肝细胞、肝细胞微粒及特定的肝细胞酶等与生物合成材料相结合装配成某种形式的人工肝装置。目前,早期的生物人工肝装置如交叉循环、肝灌流等,由于疗效不肯定、副反应大、操作复杂等原因,已被逐渐放弃。相比之下,以培养肝细胞为基础的现代生物人工肝——新型体外生物人工肝支持系统(extracorporeal bioartificial liver support system, EBLSS),不仅具有肝特异性的解毒功能,而且具有生物合成、转化代谢等更为复杂的功能,因此是人工肝历史上最先进的支持系统。

已知,在正常肝组织中,细胞间紧密接触,在细胞表面调节因子(cell surface modulator, CSM)的作用下,不产生细胞增殖功能,

称为接触抑制;相反,在体外肝细胞培养中,细胞间排列松散,肝细胞从调节因子抑制下释入,发生细胞增殖,产生活跃的生物学功能^[14]。藉此建立的生物人工肝最能模拟正常肝脏功能,从而起到比较理想的肝支持与替代作用。”

EBLSS的基本工作原理是将培养肝细胞放置或继续培养于体外生物反应器中,患者血液流过反应器时,通过半透膜或直接接触的方式与培养肝细胞间进行物质交换。肝细胞可发挥解毒作用,又具合成功能,故能起到理想人工肝支持治疗作用^[15,16]。该系统是目前研究的重点,并且不断取得进展^[17,18],虽然国外大多研究仍处在动物实验的最后阶段,但成功的临床个例报道已日见增多。

1.4 有关研究存在的不足

尽管近年来生物人工肝支持系统的研究取得较大的进展,一些关键的技术正在逐渐得到解决,但有关研究尚存在以下不足:

① 迄今报道的生物人工肝的研究均采用动物肝细胞和肿瘤来源的肝细胞株^[19~21],虽取得一定效果,但由于种属差异,肝细胞无法提供人白蛋白等特异性物质,支持作用并不十分理想,长期使用有可能引起异性蛋白反应,而肿瘤细胞株的远期不良反应亦不能完全排除。

② EBLSS需要大量有活性的肝细胞才能起到人工肝支持作用,高密度、高活性培养肝细胞是生物人工肝的关键技术之一。迄今,微载体技术、胶原凝胶技术已在EBLSS中应用^[22,23],初步满足了EBLSS对肝细胞培养的要求,但二者本身难度较大,并存在一定的局限性。

③ 目前,EBLSS仅使用了单一的肝细胞培养系统,肝细胞培养过程中产生的、具有生物学功能的分泌成分和能产生肝细胞再生因子(hepatocyte growth factor, FGF),并在维持肝细胞特性和