

微囊化猪肝细胞移植治疗大鼠急性肝衰的免疫隔离机制

刘菲, 刘雁冰, 钟岚, 熊伍军, 赵中辛

刘菲, 刘雁冰, 钟岚, 熊伍军, 同济大学附属东方医院消化内科
上海市 200120
赵中辛, 同济大学附属东方医院普外科 上海市 200120
刘菲, 女, 1962-04-13 生, 上海市人, 汉族, 1985 年上海医科大学学士, 主任
医师, 主要从事肝病的研究。
上海市浦东新区科委项目, No. PK2001-13
通讯作者: 刘菲, 200120, 上海市即墨路 150 号, 同济大学附属东方医院消
化内科. liufei2010@hotmail.com
电话: 021-38804518-7221
收稿日期: 2004-12-27 接受日期: 2005-01-26

Immunoisolation effects of microencapsulated porcine hepatocyte transplantation in treating acute hepatic failure in rats

Fei Liu, Yan-Bing Liu, Lan Zhong, Wu-Jun Xiong, Zhong-Xin Zhao

Fei Liu, Yan-Bing Liu, Lan Zhong, Wu-Jun Xiong, Department of
Gastroenterology, Dongfang Hospital, Tongji University, Shanghai
200120, China
Zhong-Xin Zhao, Department of General Surgery, Dongfang Hospital,
Tongji University, Shanghai 200120, China
Correspondence to: Fei Liu, Department of Gastroenterology, Dongfang
Hospital, Tongji University, Shanghai 200120,
China. liufei2010@hotmail.com
Received: 2004-12-27 Accepted: 2005-01-26

Abstract

AIM: To investigate the therapeutic effect of microencapsulated porcine hepatocyte transplantation intraperitoneally on toxic hepatic failure in rats.

METHODS: The isolated hepatocytes were encapsulated by the alginate method. The immunoisolation effects of sodium alginate-polyserine-sodium alginate (APA) microcapsules against NK cell-mediated cytotoxicity were evaluated. Microencapsulated porcine hepatocytes were transplanted into abdominal cavity of rats 48 hours after the induction of acute hepatic failure (AHF) with D-galactosamine. The survival rate and hepatic pathologic changes were determined. The expression of CD4, CD8, IgG and IgM in the greater omentum was examined.

RESULTS: Microcapsules effectively protected K562 cells against the killing by NK cells. Compared with the free hepatocyte transplantation group, the survival rate of the rats in microencapsulated porcine hepatocyte transplantation group was significantly higher, and the

expression of CD4, CD8 and IgG in the greater omentum was much weaker.

CONCLUSION: APA microencapsules can effectively prevent cellular and humoral immune responses. Microencapsulated xenogeneic hepatocyte transplantation is effective in the treatment of AHF.

Key Words: Microencapsulated porcine hepatocytes; Sodium alginate-polyserine-sodium alginate; Acute hepatic failure; Immunoisolation

Liu F, Liu YB, Zhong L, Xiong WJ, Zhao ZX. Immunoisolation effects of microencapsulated porcine hepatocyte transplantation in treating acute hepatic failure in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(6):748-751

摘要

目的: 探讨微囊化猪肝细胞腹腔内移植对药物性肝衰大鼠的治疗作用, 观察受体存活率、肝组织病理变化及大网膜的免疫隔离作用。

方法: 以海藻酸钠-多聚赖氨酸-海藻酸钠 (APA) 包裹乳猪肝细胞, 体外观察 APA 微囊对 NK 细胞介导的细胞毒作用的隔离效果。D-氨基半乳糖腹腔内注射诱导大鼠急性肝衰竭, 48 h 后将微囊化的猪肝细胞移植于大鼠腹腔内, 观察移植大鼠存活率, 免疫组化法检测大鼠大网膜内 CD4、CD8、IgG 和 IgM 的表达。

结果: 微囊可有效保护囊内 K562 细胞不受 NK 细胞的杀伤。与裸肝细胞移植组相比, 微囊化乳猪肝细胞移植组大鼠存活率显著提高 (1wk 存活率 78.6% vs 66.7%, $P = 0.0046$; 2wk 存活率 42.9% vs 25.0%, $P = 0.0027$, $P < 0.01$)。大网膜 CD4、CD8、IgG 表达较弱 ($P = 0.0342$, $P = 0.0197$ 及 $P = 0.0445$, $P < 0.05$), 而 IgM 表达无明显差异 ($P > 0.05$)。

结论: APA 微囊可有效隔离抗体及淋巴细胞介导的体液和细胞免疫反应。微囊化异种肝细胞移植可治疗大鼠急性肝衰, 给予肝功能代谢支持, 提高移植治疗效果。

关键词: 微囊化猪肝细胞; 海藻酸钠-多聚赖氨酸-海藻酸钠; 急性肝衰竭; 免疫隔离

刘菲, 刘雁冰, 钟岚, 熊伍军, 赵中辛. 微囊化猪肝细胞移植治疗大鼠急性肝衰的免疫隔离机制. *世界华人消化杂志* 2005;13(6):748-751
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/748.asp>

0 引言

肝细胞移植与原位肝移植对于治疗急性、亚急性肝衰竭及肝脏基因缺陷所致代谢性疾病有同等的疗效。在人肝细胞来源困难的情况下可选用动物肝细胞作为供肝细胞的来源。近年来,异种肝细胞移植无论在理论上还是技术上都取得了重大进展,特别是微囊包裹、微载体技术的应用,为肝细胞移植开辟了新途径,在动物试验中已初步显示了有效的免疫隔离作用^[1-2]。我们采用D-氨基半乳糖诱导大鼠急性肝衰竭,经腹腔内移植微囊化的乳猪肝细胞,观察受体的存活率、肝功能及肝组织的病理学变化,并初步探讨微囊化猪肝细胞移植治疗大鼠急性肝衰的免疫隔离机制。

1 材料和方法

1.1 材料 成年雄性SD大鼠,质量200-250 g;出生后7 d的雄性乳猪,质量2-4 kg;均由上海第二医科大学实验动物中心提供。倒置显微镜(Olympus,日本),微囊发生装置(自制),二氧化碳培养箱(Sheil Lab,美国),全自动生化测定仪(DADE,美国)。D-氨基半乳糖,胶原酶(collagenase IV, Sigma公司),RPMI1640(Gibco公司),多聚赖氨酸(MW15000-30000, Sigma公司),(2-环己胺)-1-乙磺酸(CHES)缓冲液(上海生工生物公司),化学纯海藻酸钠(上海生化试剂厂),台盼蓝(Sigma公司)。小鼠抗大鼠IgM mAb和兔抗大鼠IgG多抗(Sigma公司),小鼠抗大鼠CD4和CD8 mAb(Pharmingen公司)。鼠ABC和兔ABC试剂盒(Santa Cruz公司)。D-氨基半乳糖(D-gal),以生理盐水配成100 g/L溶液,0.1 mol/L NaOH调PH 7.2,以1.4 g/kg一次性ip,诱导大鼠急性肝衰竭。猪肝细胞的分离制备采用文献报道的二步法(D-Hanks液灌注和胶原酶灌注)分离肝脏,获得肝细胞,此法肝细胞产量约为 3×10^{10} ,肝细胞纯度为93%,台盼蓝染色判断肝细胞存活率超过90%。所得沉淀细胞悬于DMEM培养液中,置CO₂孵箱内培养,细胞存活率>90%方予使用。将肝细胞悬液和15 g/L海藻酸钠充分混合,加入微囊发生装置,通过调节垂直方向气流大小和水平方向气流大小,使最终得到直径0.4-0.8 mm的微滴,滴入15 g/L氯化钙液中,于1 g/L多聚赖氨酸、1.5 g/L海藻酸钠中静置强化,于15 g/L柠檬酸三钠中去除Ca²⁺核心,获得微囊包裹肝细胞,每mL微囊含肝细胞约 2×10^7 个。

1.2 方法

1.2.1 微囊化肝细胞体外培养后上清液白蛋白、转氨酶及尿素氮的水平 将微囊肝细胞与游离肝细胞以 2×10^6 细胞/瓶静态培养,于培养1-5 d细胞换液前分别收集培养上清放-20℃保存,用全自动生化分析仪检测培养上清中白蛋白、转氨酶及尿素氮水平。

1.2.2 观察微囊免疫隔离抗排斥的效果 按常规NK细胞活性测定方法,取新鲜血液,制备人外周血NK细胞(效应细胞)悬液。将含裸露或微囊化K562细胞(靶细胞)的悬液加入96孔板中(1×10^4 细胞/孔),按不同比例分别加入效应细胞悬液。37℃孵育18 h后,裸露靶细胞组以台盼蓝染色法计数每孔K562细胞死亡率,微囊化靶细胞组用培养液洗去淋巴细胞,吸取少量微囊置于载玻片上,滴加台盼蓝染液并加盖盖玻片,轻压盖片使囊内细胞散出,计数K562细胞死亡率。结果按下式计算:自然杀伤率(%) = 实验组细胞死亡率(%) / 对照组细胞死亡率(%)。

1.2.3 肝细胞移植 SD大鼠67只在D-氨基半乳糖诱导肝衰竭后48 h,随机分为3组。对照组:ip生理盐水2 mL,共21只大鼠,其中11只用于观察死亡率,10只用于抽血及组织学检查。裸肝细胞组:肝细胞悬液配成 2×10^{10} /L,每只大鼠腹腔内移植 4×10^7 个肝细胞(4×10^{10} /L, $\times 2$ mL),共22只,其中12只用于观察死亡率,10只用于抽血及组织学检查。微囊肝细胞组:腹腔内移植2 mL微囊,每只大鼠注射 4×10^7 个肝细胞,共24只,其中14只用于观察死亡率,10只用于抽血及组织学检查。于移植后4d分别取三组大鼠腹腔网膜标本,用100 g/L多聚甲醛固定,石蜡包埋,按常规方法作HE染色。于移植后4 d取3组大鼠大网膜标本,利用免疫组化Envision二步法测定CD4, CD8, IgG, IgM水平。以Axioplan 2多功能全自动荧光显微镜及KS400图像分析系统对图像进行分析。如果细胞膜上有棕黄色环形物质,为阳性。

统计学处理 所有数据以均数±标准差表示。死亡率比较采用Log Rank确切概率计算。各项检测结果比较采用团体t检验,用SPSS软件作统计分析。

2 结果

台盼蓝染色显示微囊包裹对肝细胞活率无明显影响,包裹后细胞活率约为88%。微囊包裹肝细胞与裸肝细胞白蛋白、转氨酶及尿素氮分泌水平无显著差异(表1)。表明微囊包裹对肝细胞分泌功能无明显影响。微囊包裹对K562细胞活性无明显影响,随着靶细胞浓度增加,NK细胞对裸露靶细胞的自然杀伤率明显升高。但将K562靶细胞用APA微囊包裹后,NK细胞对微囊内细胞无明显杀伤作用,表明APA微囊可有效保护囊内细胞不受囊外细胞毒细胞的杀伤作用(表2)。

2.1 各组肝衰大鼠存活率比较 D-氨基半乳糖ip后,对照组大鼠存活率1 d内为73.6%(8/11),3 d内为36.4%(4/11),1 wk内为18.2%(2/11),2 wk内全部死亡。而腹腔内裸肝细胞移植组及微囊包裹肝细胞组大鼠3 d内全部存活,但微囊包裹组1 wk存活率

表1 裸肝细胞组与包裹组分泌白蛋白、ALT和BUN功能变化

组别		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
白蛋白(g/L)	裸肝细胞	3.23 ± 0.68	3.73 ± 0.50	5.13 ± 0.55	4.43 ± 0.68	3.50 ± 0.60
	包裹肝细胞	3.00 ± 0.36	3.23 ± 0.37	4.66 ± 0.75	4.73 ± 0.47	3.07 ± 0.65
ALT(U/L)	裸肝细胞	20.4 ± 1.14	24.4 ± 1.52	18.2 ± 1.78	17.6 ± 1.34	17.0 ± 1.58
	包裹肝细胞	19.6 ± 1.14	21.8 ± 1.12	18.2 ± 1.64	16.6 ± 1.52	14.8 ± 1.48
BUN(mmol/L)	裸肝细胞	1.82 ± 0.15	1.62 ± 0.11	2.08 ± 0.15	2.24 ± 0.24	2.28 ± 0.25
	包裹肝细胞	1.56 ± 0.11	1.88 ± 0.18	1.98 ± 0.19	1.96 ± 0.11	2.06 ± 0.18

两组比较 $P > 0.05$.

表2 NK细胞对裸露和微囊化K562细胞的杀伤作用(mean±SD, %)

效靶比	无靶细胞	10 : 1	20 : 1
裸细胞	4.6 ± 1.5	13.3 ± 3.5	21.7 ± 4.7
微囊包裹	5.0 ± 3.6	6.3 ± 1.5 ^a	6.7 ± 2.1 ^a

^a $P < 0.05$ vs 裸细胞.

(78.6% vs 66.7%)及2 wk存活率(42.9% vs 25.0%)均显著提高($P = 0.0046$ 及 $P = 0.0027$, $P < 0.01$). (图1).

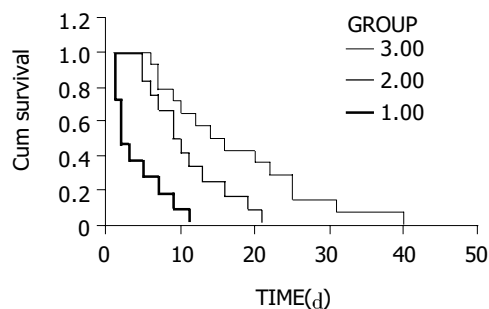


图1 三组大鼠存活率比较.

2.2 组织学检查 正常大网膜为纤维、血管及脂肪组织. 移植后第3 d打开腹腔, II组大鼠腹腔内可见散在分布的微囊, 有的聚集成团, 一部分附着于大网膜, HE染色见团块内细胞形态较好, 有的呈索状排列, 并可见血管形成, 个别见软骨样组织, 少数微囊周围可见纤维组织出现.

2.3 大网膜CD4, CD8, IgG, IgM免疫组化结果 裸肝细胞组和微囊包裹组大鼠3 d于大网膜内均检测

表3 移植大鼠大网膜CD4, CD8, IgG及IgM表达水平

	CD4		CD8		IgG		IgM	
	阳性率	强阳性率	阳性率	强阳性率	阳性率	强阳性率	阳性率	强阳性率
裸肝细胞	19.8 ± 2.6	12.8 ± 3.5	20.1 ± 7.5	12.5 ± 5.00	18.3 ± 1.4	12.0 ± 1.9	17.3 ± 6.0	12.1 ± 5.0
包裹肝细胞	12.3 ± 3.7 ^b	7.5 ± 2.8 ^d	13.0 ± 5.4 ^b	7.6 ± 4.3 ^d	10.9 ± 4.0 ^b	7.1 ± 3.7	17.8 ± 5.5	11.7 ± 4.1

^b $P < 0.01$ vs 裸肝细胞组; ^d $P < 0.01$ vs 裸肝细胞组.

到CD4, CD8, IgG和IgM的表达(图2). 与裸肝细胞组相比, 微囊包裹组大网膜CD4, CD8, IgG表达较弱, 二者相比显著差异($P = 0.0342$, $P = 0.0197$ 及 $P = 0.0445$, $P < 0.05$), 而IgM表达差异不明显($P > 0.05$, 表3).

3 讨论

肝细胞移植(HCT)已成为继原位肝移植后又一治疗肝衰竭和肝先天性代谢障碍疾病的一种有效治疗措施. 免疫排斥是肝细胞移植(HCT)面临的主要问题之一. HCT所致的免疫排斥反应, 其强弱程度依赖于供受体组织相容性匹配程度. 自从1988年微囊化技术首次应用以来, 使异体或异种肝细胞移植翻开新的一页. 微囊肝细胞, 即将肝细胞包裹在藻酸盐-多聚赖氨酸-藻酸盐(APA)的微囊膜内, 该膜允许营养物质及小分子细胞合成产物通过, 而不让大分子如抗体通过, 能使植入肝细胞被屏障起来, 从技术上解决免疫排斥问题^[3]. 通过微囊化技术, 不同种属间的细胞移植在一定程度上可不用使用免疫抑制剂.

在我们的试验中, 通过将猪肝细胞移植入急性肝衰大鼠腹腔内, 明显降低了肝衰大鼠的死亡率, 延长了大鼠的存活时间, 肝功能也明显改善. 而与裸肝细胞移植组相比, 微囊化肝细胞移植组大鼠表现出更为显著的治疗效应, 不仅死亡率更低、存活时间更长. 进一步通过免疫组化法, 发现裸肝细胞组和微囊包裹组大鼠在大网膜内均检测到CD4、CD8、IgG和IgM的表达. 提示药物性肝衰大鼠腹腔内移植异种肝细胞后, 受体在产生细胞免疫的同时, 也有体液免疫的参

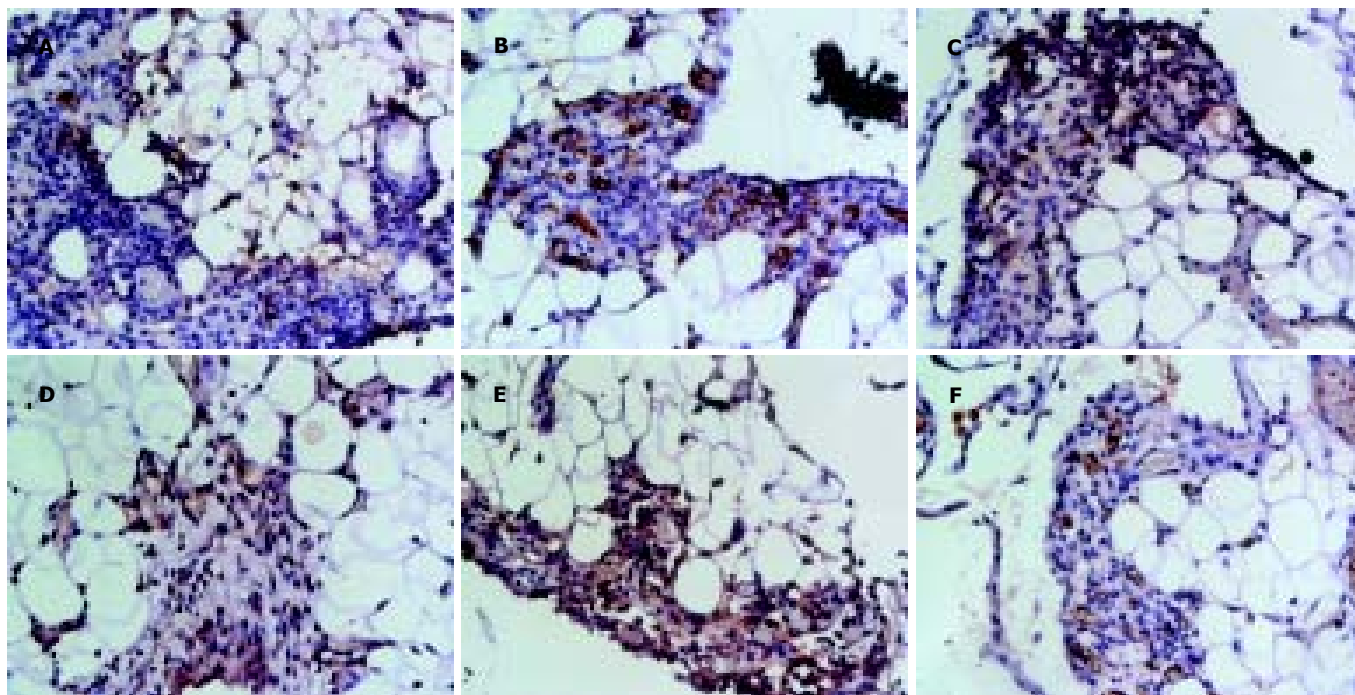


图2 裸肝组、微囊包裹组大鼠CD4, CD8及IgG表达×40. A: 裸肝组CD4; B: 微囊包裹组CD4; C: 裸肝组CD8; D: 微囊包裹组CD8; E: 裸肝组IgG; F: 微囊包裹组IgG.

与. 研究还发现, 与裸肝细胞组相比, 微囊包裹组大网膜CD4、CD8、IgG表达较弱, 二者相比显著差异($P < 0.05$), 证实了肝细胞经微囊包裹后, 有效抵御了淋巴细胞介导的细胞免疫反应和抗体介导的体液免疫反应. Bumgardner *et al*^[4]通过试验证实HCT的排斥反应主要是由T细胞介导的, 并通过CD4, CD8单克隆抗体封闭T细胞介导的不同免疫途径, 证实了肝细胞具有较强的免疫原性, 能引起宿主体内强烈的CD4⁺, CD8⁺T细胞介导的免疫反应, 其中迟发型超敏反应起重要作用. 体液免疫反应的程度一般比较轻微, 有试验证明同种大鼠HCT时有补体(主要是c3)及少量的抗体(主要是IgM)参与免疫排斥反应. 本组结果与其相似.

微囊化肝细胞移植显著的治疗作用, 考虑与下列机制有关: (1) 移植入腹腔的肝细胞发挥替代功能. 本试验证明微囊包裹肝细胞与裸肝细胞白蛋白、转氨酶及尿素氮分泌水平无显著差异, 表明微囊包裹对肝细胞分泌功能无明显影响. (2) 微囊化技术效降低了免疫排斥反应. 与裸肝细胞组相比, 微囊包裹组大网膜CD4、CD8、IgG表达较弱, 提示生物膜半透膜的阻隔作

用降低了免疫反应的强度^[5]. (3) 可能还与移植细胞促进受损肝脏的修复有关. 其中有复杂的体液分子机制参与, 包括促肝细胞生长因子、胰岛素、上皮生长因子、转化生长因子等, 促进宿主残余肝细胞增值和肝功能的恢复. 其中肝细胞生长因子是一种很强的DNA合成促进剂, 主要由肝的非实质细胞表达, 是一种热稳定肽酶, 对肝有特异性, 可成为HCT中有效的促分裂原, 在肝损伤后对肝的再生起作用. 其具体机制有待阐明.

4 参考文献

- 1 郭水龙, 薛毅琬, 李新建, 罗芸, 田磊, 李雁凌, 张佐云. APA微囊移植免疫隔离效果的研究. 中国免疫学杂志 2003;19:682-685
- 2 Selden C, Casbard A, Themis M, Hodgson HJ. Characterization of long-term survival of syngeneic hepatocytes in rat peritoneum. *Cell Transplant* 2003;12:569-578
- 3 赵中辛, 丁友成. 异种肝细胞移植排斥机制的探讨. 中华器官移植杂志 2001;22:280-281
- 4 Bumgardner GL, Li J, Heininger M, Ferguson RM, Orosz CG. In vivo immunogenicity of purified allogeneic hepatocytes in a murine hepatocyte transplant model. *Transplantation* 1998; 65:47-52
- 5 何震宇, 高蓓, 朱泰来, 陈永田, 杨春, 张萍. 药物性肝衰大鼠脾内移植异种肝细胞治疗前后CD4、CD8的变化及意义. 中国普通外科杂志 2004;13:224-227