

永生化肝细胞微囊化移植治疗大鼠 肝豆状核变性

林海龙 陈洁 黄乐听 陈益平

(温州医学院附属第二医院育英儿童医院儿童感染科,浙江 温州 325000)

[摘 要] **目的** 观察微囊化 HepG2 细胞腹腔移植治疗肝豆状核变性(HLD)模型大鼠的疗效。**方法** 3 月龄 Wistar 雄性大鼠 120 只随机分为 HLD 模型组、裸 HepG2 细胞腹腔移植组和微囊化 HepG2 细胞移植组,采用铜负荷饮食法制作大鼠 HLD 模型。根据移植后标本采集时间分设 3 d、7 d、14 d、21 d、28 d 5 个时间点,每时间点 8 只大鼠;另取 8 只大鼠设为空白对照组。测定血清 ALT、AST、白蛋白水平及血清铜、肝铜含量。**结果** 模型组、裸 HepG2 细胞腹腔移植组、微囊化 HepG2 细胞移植组大鼠各时间点 ALT、AST、血清铜、肝铜水平均较空白对照组升高($P<0.05$),合成白蛋白水平明显下降(除微囊化 HepG2 细胞移植组 28 d 与空白组比较差异无统计学意义)。在大部分时间点裸 HepG2 细胞腹腔移植组、微囊化 HepG2 细胞移植组大鼠 ALT、AST、血清铜、肝铜值水平较模型组下降($P<0.05$),而白蛋白水平则较模型组增加($P<0.05$)。7~14 d 后微囊化 HepG2 细胞移植组大鼠 ALT、AST、血清铜、肝铜水平较裸 HepG2 细胞腹腔移植组明显下降($P<0.05$),而白蛋白则于 14 d 后高于裸 HepG2 细胞腹腔移植组。**结论** HepG2 细胞微囊化腹腔移植可明显减轻 HLD 大鼠的肝损害,减少肝铜沉积,加速血清铜的代谢,可成为一种细胞移植治疗 HLD 的新方法。

[中国当代儿科杂志,2010,12(12):959-962]

[关 键 词] 永生化肝细胞;移植;微囊化;肝豆状核变性;大鼠

[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2010)12-0959-04

Efficacy of microencapsulated HepG2 cells transplantation in rats with hepatolenticular degeneration

LIN Hai-Long, CHEN Jie, HUANG Le-Ting, CHEN Yi-Ping. Department of Pediatric Infection, Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou, Zhejiang 325000, China (Chen Y-P, Email: 58177423@qq.com)

Abstract: Objective To evaluate the efficacy of intraperitoneal transplantation of microencapsulated HepG2 cells in rats with hepatolenticular degeneration (HLD). **Methods** HLD was induced by copper-overloaded diet with forage containing 1 g/kg copper sulfate and water with 0.185% copper sulfate for 12 weeks in rats. One hundred and twenty three-month-old male Wistar rats were randomly intraperitoneal injected with normal saline (NS), microencapsulated HepG2 cells or non-microencapsulated HepG2 cells 9 weeks after copper-overloaded diet. Blood or liver samples were obtained at five time points: 3, 7, 14, 21 and 28 days after transplantation ($n=8$). The other 8 rats receiving normal diet were used as the control group. Serum levels of ALT, AST, albumin and Cu and liver Cu contents were measured. **Results** Serum ALT, AST and Cu levels and liver Cu contents in the NS-treated HLD, microencapsulated HepG2 cells and non-microencapsulated HepG2 cells transplantation groups increased significantly at all time points, in contrast, serum albumin levels decreased significantly in the NS-treated HLD and non-microencapsulated HepG2 cells transplantation groups compared with those in the control group at all time points ($P<0.05$), but serum albumin levels in the microencapsulated HepG2 cells transplantation restored to the level of the control group 28 days after transplantation. Serum ALT, AST and Cu levels and liver Cu contents in the microencapsulated HepG2 cells and non-microencapsulated HepG2 cells transplantation groups were significantly lower, in contrast, albumin levels were higher than those in the NS-treated HLD group on almost time points ($P<0.05$). Serum levels of ALT, AST and Cu and liver Cu contents in the microencapsulated HepG2 cells transplantation group decreased 7 or 14 days after transplantation, while serum albumin levels increased significantly 14 days after transplantation compared with those in the non-microencapsulated HepG2 cells transplantation group ($P<0.05$). **Conclusions** Intraperitoneal transplantation of microencapsulated HepG2 cells can relieve hepatic damage, reduce serum and liver Cu levels, and improve copper metabolism, therefore it is promising for the treatment of HLD.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (12):959-962]

Key words: HepG2 cell; Transplantation; Microencapsulation; Hepatolenticular degeneration; Rats

[收稿日期]2010-04-19;[修回日期]2010-06-09
[作者简介]林海龙,男,硕士,住院医师。
[通信作者]陈益平,主任医师。

肝豆状核变性 (hepatolenticular degeneration, HLD)是以铜代谢障碍为特征的多脏器受累的遗传病,于青少年期开始起病,肝脏往往首先受累^[1]。肝细胞移植目前已成为 HLD 的首选治疗方案之一,其目的在于向受体内输入正常的游离肝细胞,使移植的肝细胞在受体内存活并发挥正常肝细胞的功能,为受体提供一定的肝功能支持。肝细胞微囊化技术是一种利用高分子聚合物膜材料将肝细胞包裹于其所形成的微囊内,从而使其达到了避免免疫排斥的目的,使异体细胞移植成为可能,可有效延长肝细胞的寿命^[2]。本研究试通过微囊化 HepG2 细胞腹腔移植来研究其对 HLD 大鼠治疗作用。

1 材料和方法

1.1 HepG2 细胞的培养

HepG2 细胞株(购自上海细胞研究所)由含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素的 DMEM 完全培养基培养,3~5 d 后以 0.25% 胰蛋白酶消化传代或备用 于微囊化。

1.2 细胞微囊的制备

采用海藻酸钠-氯化钡一步微囊成形法^[3]制备微囊。离心收集肝细胞,加 1.5% 的纯化海藻酸钠溶液,混匀,转入自制的气流法微囊发生器,气体流速为 4 L/min,海藻酸钠溶液滴速为 50 mL/h,滴入 25 mmol/L BaCl₂溶液中。海藻酸钠与 Ba²⁺ 交联成囊,并静置 15 min。D-Hanks 液洗涤 3 次,以去除多余的 BaCl₂,加入 DMEM 完全培养基后进行培养。

1.3 HLD 模型的建立及实验分组

采用铜负荷法^[4]制作大鼠 HLD 模型。取 3 月龄 Wistar 雄性大鼠 120 只(由温州医学院动物实验中心提供),随机分为模型组、裸 HepG2 细胞移植组和微囊化 HepG2 细胞移植组,分设 3 d、7 d、14 d、21 d、28 d 等 5 个时间点(以铜负荷第 9 周起始为 0 d),每组每时间点 8 只大鼠,另取 8 只大鼠设为空白对照组。所有大鼠均按标准饲养 12 周,模型组、裸 HepG2 细胞移植组和微囊化 HepG2 细胞组均同时喂饲含硫酸铜 1 g/kg 的饲料和 0.185% 硫酸铜的水,共 12 周。于饲养第 9 周开始,取大鼠正中腹腔 5 mm 切口,以 12 号针头按实验要求分别注入 0.9% 生理盐水 2 mL、裸 HepG2 细胞、HepG2 细胞微囊。裸 HepG2 细胞移植组和微囊化 HepG2 细胞移植组每只大鼠腹腔注入约 1×10⁷ 个细胞。术后严格消毒创口。

1.4 指标测定

1.4.1 血清 ALT、AST、白蛋白 (ALB) 测定 分别取各时间点的大鼠血清标本,全自动生化分析仪测定 ALT、AST、ALB 值。

1.4.2 血清铜、肝铜含量测定 血清铜检测以待测血清用去离子水 1:10 稀释后混匀,采用原子吸收分光光度法测量。肝铜测定采用肝组织 500 mg,先用 0.9% 生理盐水反复洗净,再用干净滤纸吸干,用浓硝酸(分析纯)10 mL 低温加热进行消化,等组织完全溶解至黄色澄清透明后,用原子吸收法测铜含量。

1.5 统计学分析

数据处理及统计学分析采用 SPSS 16.0 统计软件包,所有计量资料均用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,样本比较采用单因素方差分析以及 SNK 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 ALT、AST 及 ALB 变化

模型组、裸 HepG2 细胞移植组和微囊化 HepG2 细胞移植组大鼠各时间点 ALT、AST 均较空白对照组大鼠明显升高($P < 0.05$),合成 ALB 水平明显下降($P < 0.05$)(除外微囊化 HepG2 细胞移植组 28 d)。模型组大鼠 ALT、AST 水平随时间推移逐渐升高,而 ALB 水平则逐渐下降。裸 HepG2 细胞移植组大鼠 ALT、AST、ALB 水平与相应时间点模型组大鼠相比差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。裸 HepG2 细胞移植组大鼠 ALT 在 7 d 时达最低点 120 ± 19 U/L(与同组其他时间点相比, $P < 0.05$),而 ALB 水平亦在 7 d 时达最高峰 33.8 ± 1.5 g/L。微囊化 HepG2 细胞移植组大鼠于 3 d 时与裸 HepG2 细胞移植组相比,ALT 差异无统计学意义($P > 0.05$),AST 水平高于裸 HepG2 细胞移植组($P < 0.05$),ALB 水平则低于裸 HepG2 细胞移植组($P < 0.05$)。7 d 时微囊化 HepG2 细胞移植组大鼠 ALT、AST 水平较裸 HepG2 细胞移植组明显下降($P < 0.05$),并随时间的延长进行性下降,而 ALB 水平合成水平则呈现逐渐上升趋势,于 28 d 时达到 41.2 ± 1.5 g/L,与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 血清铜、肝铜含量测定的变化

模型组、裸 HepG2 细胞移植组和微囊化 HepG2 细胞移植组大鼠各时间点血清铜、肝铜水平均较空白对照组大鼠明显升高($P < 0.05$)。模型组大鼠血清铜、肝铜含量随时间点逐渐升高。裸 HepG2 细胞移植组大鼠血清铜值与模型组相应时间点相比均

降低($P < 0.05$),而肝铜含量则在 7 d、14 d、28 d 时低于模型组($P < 0.05$)。裸 HepG2 细胞移植组血清铜值在 7 d 后逐渐升高,而肝铜值亦在 7 d 后逐渐呈上升趋势。微囊化 HepG2 细胞移植组大鼠血清铜于 3 d 时高于裸 HepG2 细胞移植组($P < 0.05$),但 7 d 后均低于裸 HepG2 细胞移植组($P < 0.05$),28 d 最低至 $2.18 \pm 0.18 \mu\text{g/mL}$,已接近空白对照组水平。微囊化 HepG2 细胞移植组大鼠肝铜含量则在 3 d 时高于裸 HepG2 细胞移植组($P < 0.05$),而 7 d 时与裸 HepG2 细胞移植组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),但在 14 d 后则明显下降($P < 0.05$),最低 28 d 至 $21.34 \pm 3.25 \mu\text{g/g}$,仍显著高于空白对照组水平($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 各组不同时间点 ALT、AST、ALB 值变化
($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组 别	时间	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALB (g/L)
对照		34 ± 11	49 ± 12	42.8 ± 2.7
模型	3 d	145 ± 19 ^a	330 ± 75 ^a	29.5 ± 1.2 ^a
	7 d	154 ± 14 ^a	376 ± 47 ^a	29.3 ± 1.3 ^a
	14 d	152 ± 12 ^a	533 ± 66 ^a	27.9 ± 1.1 ^a
	21 d	163 ± 15 ^a	556 ± 72 ^a	27.1 ± 1.7 ^a
	28 d	179 ± 19 ^a	643 ± 57 ^a	24.6 ± 1.2 ^a
裸 HepG2 移植	3 d	117 ± 14 ^{a,b}	213 ± 20 ^{a,b}	33.5 ± 1.2 ^{a,b}
	7 d	120 ± 19 ^{a,b}	277 ± 22 ^{a,b}	33.8 ± 1.5 ^{a,b}
	14 d	133 ± 10 ^{a,b}	283 ± 37 ^{a,b}	30.5 ± 1.5 ^{a,b}
	21 d	135 ± 9 ^{a,b}	348 ± 32 ^{a,b}	28.5 ± 1.0 ^{a,b}
	28 d	149 ± 15 ^{a,b}	388 ± 31 ^{a,b}	28.3 ± 1.5 ^{a,b}
微囊化 HepG2 移植	3 d	138 ± 13 ^{a,c}	275 ± 26 ^{a,b,c}	29.3 ± 0.9 ^{a,c}
	7 d	110 ± 10 ^{a,b,c}	184 ± 23 ^{a,b,c}	33.3 ± 1.4 ^{a,b}
	14 d	97 ± 9 ^{a,b,c}	102 ± 11 ^{a,b,c}	36.4 ± 1.7 ^{a,b,c}
	21 d	85 ± 7 ^{a,b,c}	87 ± 13 ^{a,b,c}	38.4 ± 1.5 ^{a,b,c}
	28 d	65 ± 6 ^{a,b,c}	77 ± 11 ^{a,b,c}	41.2 ± 1.5 ^{b,c}

a:与对照组比较, $P < 0.05$; b:与同时间点模型组比较, $P < 0.05$; c:与同时间点裸 HepG2 移植组比较, $P < 0.05$

表 2 各组不同时间点血清铜、肝铜值变化 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组 别	时间	血清铜 ($\mu\text{g/mL}$)	肝铜 ($\mu\text{g/g}$)
对照		1.93 ± 0.13	6.07 ± 0.81
模型	3 d	3.58 ± 0.31^a	41.60 ± 5.02^a
	7 d	3.89 ± 0.21^a	41.95 ± 3.28^a
	14 d	3.77 ± 0.36^a	45.08 ± 4.27^a
	21 d	4.09 ± 0.21^a	46.80 ± 6.56^a
	28 d	4.03 ± 0.36^a	52.83 ± 6.68^a
裸 HepG2 移植	3 d	$3.04 \pm 0.43^{a,b}$	36.70 ± 4.05^a
	7 d	$2.89 \pm 0.29^{a,b}$	$34.38 \pm 4.40^{a,b}$
	14 d	$3.12 \pm 0.46^{a,b}$	$37.76 \pm 5.42^{a,b}$
	21 d	$3.16 \pm 0.21^{a,b}$	43.70 ± 5.23^a
	28 d	$3.50 \pm 0.39^{a,b}$	$45.21 \pm 5.08^{a,b}$
微囊化 HepG2 移植	3 d	$3.85 \pm 0.43^{a,c}$	$42.62 \pm 4.88^{a,c}$
	7 d	$3.44 \pm 0.37^{a,b,c}$	$35.55 \pm 3.49^{a,b}$
	14 d	$2.60 \pm 0.37^{a,b,c}$	$28.70 \pm 4.54^{a,b,c}$
	21 d	$2.27 \pm 0.21^{a,b,c}$	$25.16 \pm 4.07^{a,b,c}$
	28 d	$2.18 \pm 0.18^{a,b,c}$	$21.34 \pm 3.25^{a,b,c}$

a:与对照组比较, $P < 0.05$; b:与同时间点模型组比较, $P < 0.05$; c:与同时间点裸 HepG2 移植组比较, $P < 0.05$

3 讨论

HLD 也称 Wilson 病,是一种遗传性铜代谢障碍所致的肝硬化和以基底节为主的脑部变性的常染色体隐性遗传性疾病。儿童期主要表现为肝脏的损害,是儿童时期肝硬化的主要原因。外科手术治疗特别是肝移植的开展,使 HLD 成为可以治愈的代谢性疾病之一。但是,活体肝移植由于受到由于供体肝来源的限制及手术难度大,并不能广泛开展。肝细胞移植是原位肝移植(orthotopic liver transplantation, OLT)的一种过渡替代疗法,由于细胞来源广(如永生化肝细胞),且移植径路可行性高,同样可以重建体内铜代谢平衡,逆转 HLD 进程^[5]。但不论是活体肝还是肝细胞移植,免疫排斥问题以及异体细胞存活时间仍是影响移植技术发展的两大重要因素。近几年发展起来的微囊化肝细胞具有有效的免疫隔离屏障,在细胞移植中的研究正受到越来越多的关注。微囊化肝细胞是将肝细胞用具有选择性的半透膜包裹或隔离,细胞生存所需要的营养物质、氧气、代谢产物及其分泌的生物活性物质能通过半透膜出入,而宿主免疫细胞、免疫球蛋白、补体等则不能通过半透膜,故囊内肝细胞可不受宿主的免疫排斥而长期存活,发挥其生物学功能,达到治疗目的^[6]。同时,由于永生化肝癌细胞株(如 HepG2 细胞)具有无限增殖及存活能力强的特点,已经在很大程度上替代了原代肝细胞在微囊化研究中的应用^[7]。肝细胞脾脏移植由于能使外源性肝细胞整合入肝组织的优点,成为了目前 HLD 细胞移植治疗的首选路径^[8]。但由于 HepG2 细胞涉及癌基因的表达,同时肝细胞微囊化后受限于微囊的大小(300 μm 左右),脾脏移植显然不具操作性,因此本次研究选择采用腹腔移植的方式进行。

铜负荷模型是目前最常见的 HLD 动物模型,可以较好地反映类似 HLD 肝脏铜损伤的情况^[9]。在本研究中,大鼠在给予长达 12 周的高浓度铜喂养后,血清 ALT、AST 及 ALB 水平出现了类似肝炎甚至肝功能不全的表现,这符合 HLD 铜沉积后的肝脏损害表现^[10]。肝铜及血清铜水平是肝脏铜沉积并导致肝脏不同损害程度的直接体现,同时,监测肝铜及血清铜水平有利于了解肝细胞移植治疗的疗效。本研究中,治疗组(裸 HepG2 细胞移植组和微囊化 HepG2 细胞移植组)大鼠的肝酶水平在移植后均比铜负荷大鼠模型组有下降,肝铜及血清铜水平亦呈下降趋势,且肝脏合成 ALB 水平也有提升。但是,

裸 HepG2 细胞移植组大鼠不论是肝酶、肝铜及血清铜的下降水平还是 ALB 合成的回升程度,以及疗效巩固时间,与微囊化 HepG2 细胞移植组相比存在显著性差异,这可能是由于裸 HepG2 细胞不能耐受宿主的免疫排斥反应。在本研究中,裸 HepG2 细胞移植组肝酶水平、铜水平的下降程度均在 7 d 左右最低,而 14 d 时即已明显加重,提示移植肝细胞的功能难以持续超过 1 周。而微囊化 HepG2 细胞移植组大鼠的肝酶、血清铜、肝铜水平则明显低于裸 HepG2 细胞移植组,呈持续下降趋势,同时 ALB 合成水平显著提高,同时延长了疗效的维持时间。综合本研究结果,微囊化 HepG2 细胞移植可改善 HLD 大鼠的铜代谢水平,减轻肝铜沉积,加速血清铜的代谢,改善肝功能,提示其在肝细胞移植治疗 HLD 中具有一定的研究前景。但由于 HLD 属慢性疾病,如何进一步提高移植肝细胞功能的维持时间将是接下去研究工作的重点。

[参 考 文 献]

[1] Schilsky ML. Wilson disease; current status and the future. *Biochimie*[J], 2009, 91(10): 1278-1281.

[2] Mei J, Sgroi A, Mai G, Baertschiger R, Gonelle-Gispert C, Serre-Beinier V, et al. Improved survival of fulminant liver failure by transplantation of microencapsulated cryopreserved porcine hepatocytes in mice[J]. *Cell Transplant*, 2009, 18(1): 101-110.

[3] Kang IK, Moon JS, Jeon HM, Meng W, Kim YI, Hwang YJ, et al. Morphology and metabolism of Ba-alginate encapsulated hepatocytes with galactosylated poly(allyl amine) and poly(vinyl alcohol) as extracellular matrices[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2005, 16(6): 533-539.

[4] Pulverer BJ, Kyriakis JM, Avruch J, Nikolakaki E, Woodgett JR. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases[J]. *Nature*, 1991, 353(6345): 670-674.

[5] Malhi H, Irani AN, Vollenberg I, Schilsky ML, Gupta S. Early cell transplantation in LEC rats modeling Wilson's disease eliminates hepatic copper with reversal of liver disease[J]. *Gastroenterology*, 2002, 122(2): 438-447.

[6] Orive G, Hernández RM, Rodríguez Gascón A, Calafiore R, Chang TM, de Vos P, et al. History, challenges and perspectives of cell microencapsulation[J]. *Trends Biotechnol*, 2004, 22(2): 87-92.

[7] Ahmad TA, Fujioka H, Eguchi S, Yanaga K, Kamohara Y, Furui J, et al. Long-term effect of hepatocyte transplantation on fulminant hepatic failure in rats[J]. *Hepatogastroenterology*, 2003, 50(50): 467-471.

[8] Carruba G. Aromatase in nontumoral and malignant human liver tissues and cells[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1155:187-193.

[9] Suzuki KT, Kanno S, Misawa S, Aoki Y. Copper metabolism leading to and following acute hepatitis in LEC rats[J]. *Toxicology*, 1995, 97(1-3): 81-92.

[10] Friendman LS, Yarze JC. Zinc in the Treatment of Wilson's disease: how it works[J]. *Gastroenterology*, 1993, 104(5): 1566-1568.

(本文编辑:王 霞)

· 消息 ·

《儿科药理学杂志》2011 年征订启事

《儿科药理学杂志》是目前我国儿科药理学领域唯一的专业性学术刊物。国际标准连续出版物号:ISSN 1672 - 108X, 国内统一连续出版物号:CN 50 - 1156/R。《儿科药理学杂志》是“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”、儿科学类核心期刊,“中国核心期刊(遴选)数据库”、“中国学术期刊综合评价数据库”来源期刊,“中国学术期刊(光盘版)”和“中国期刊网”、“万方数据—数字化期刊群”、“中文科技期刊数据库”、“中文生物医学文摘文献库(CMCC)”等全文刊载,被美国化学文摘(CA)收录。

本刊报道的主要内容有:儿科临床药理的基础与临床研究、儿科中西药制剂、儿科中西医临床用药、儿科药物制剂与分析、儿科临床药理学、药事管理、新药评价、儿科安全用药与不良反应、儿科药理学基础知识与理论、最新研究成果、先进技术介绍等。辟有专家论坛、论著(基础研究、儿科药物治疗学、儿科临床药理学、儿科药物制剂与质量控制)、药事管理与法规、综述、经验交流等栏目。

本刊为双月刊,大 16 开 64 页,铜版纸精美印刷,双月 10 日出版,每册定价 9.00 元,全年 54.00 元。全国各地邮局均可订阅,邮发代号:78 - 133。未及时订阅者,可直接向编辑部订购。编辑部地址:重庆市渝中区中山二路 136 号重庆医科大学儿童医院内《儿科药理学杂志》编辑部,邮编:400014,电话:(023)63633143;传真:023 - 63626877。

Email: ymjd2003@163. com。投稿网址: http://www. ekyxzz. com。

《儿科药理学杂志》编辑部