

肝脏干细胞研究及应用前景展望****★○

王楠^{1,2}, 邹伟², 刘鹏¹, 崔占峰³○, 刘晶¹

Prospect and advances in liver stem cells

Wang Nan^{1,2}, Zou Wei², Liu Peng¹, Cui Zhan-feng³○, Liu Jing¹

Abstract

BACKGROUND: The treatment of end-stage liver disease with liver stem cells transplantation has raised the concern in recent years. However, the clinical application is restricted by some technical problems, such as cell shortage, cell dispersion and loss and low differentiation rate after transplation, which will be solved effectively with rapid development of liver stem cells tissue engineering technology.

OBJECTIVE: To summarize the progress of liver stem cell tissue engineering and outlook the prospect application.

METHODS: We searched for the related articles in PubMed published from January 1999 and December 2010. The key words were "liver stem cell tissue engineering, three dimensional culture, biodegradable materials, bioreactor" in English. Totally 241 articles were selected primarily, and finally 43 articles met the inclusive requirement.

RESULTS AND CONCLUSION: Three-dimensional culture of cells is proved to be an effective means of cell proliferation *in vitro*, which will solve liver stem cells shortage in liver tissue engineering. There are big differences in proliferation efficiency and transplantation effect when the different scaffold materials and reactors are used. Therefore it is a crucial technical problem to establish the ideal proliferation conditions of liver stem cells, improve the biocompatibility of scaffold and promote the efficiency of transplantation. Further studies should be done to study the construction of scaffold materials and application of reactors for liver stem cells in the future.

Wang N, Zou W, Liu P, Cui ZF, Liu J. Prospect and advances in liver stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(6):1119-1124. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 近年肝脏干细胞移植治疗终末期肝病得到人们的广泛关注, 但临床应用中却面临来源有限, 细胞数量不足, 移植后干细胞往往弥散、流失, 且分化率低, 无法有效发挥其修复功能等技术问题制约。

目的: 总结肝脏干细胞组织工程的研究进展, 并展望其应用前景。

方法: 应用计算机检索 1999-01/2010-12 PubMed 数据库相关文献, 英文检索词 "liver stem cell tissue engineering" 分别与 "three dimensional culture, biodegradable materials, biological reactor" 组合, 并限定文献语言种类为 English。共检索到文献 241 篇, 最终纳入符合标准的文献 43 篇。

结果与结论: 肝脏干细胞来源有限, 而肝脏组织工程需要大量可靠的种子干细胞, 三维培养是目前发现行之有效的体外扩增手段。在三维培养条件下, 使用不同支架材料和反应器扩增效率及移植效果存在巨大差异, 如何确定具有肝脏干细胞特异性的理想扩增条件、改善支架生物相容性以提高移植效率是关键技术问题。未来的研究需要进一步探讨肝脏干细胞特异性扩增生物反应器及肝脏干细胞特异性支架构建等技术难点。

关键词: 肝脏干细胞; 组织工程; 三维培养; 生物可降解材料; 生物反应器; 综述文献

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.06.037

王楠, 邹伟, 刘鹏, 崔占峰, 刘晶. 肝脏干细胞研究及应用前景展望[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(6):1119-1124. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

目前终末期肝病的主要治疗手段是肝移植, 因为供体短缺、费用高昂等问题许多患者无法获得移植机会, 而接受肝脏移植的患者, 由于异体移植所存在的免疫排斥反应, 成功率较低, 需长期服用排斥药物^[1]。近年, 有关干细胞治疗肝功能衰竭的基础和临床研究, 显示出令人欣慰的治疗前景^[2-3]。干细胞移植不仅解决了供体不足, 免疫排斥等问题, 同时采用自体干细胞移植也避开了敏感的伦理学问题, 有望成为治疗肝功能衰竭最有前途的细胞替代性治疗策略^[4]。而肝脏干细胞属于内源性干细胞, 可

定向分化为肝细胞, 因此成为最理想的种子细胞。但临床应用中却面临来源有限, 细胞数量不足, 通过血管介入或局部注射等将干细胞移植入宿主体内后, 干细胞往往弥散、流失, 且分化率低, 无法有效发挥其修复功能等。近年国内外学者已尝试利用肝脏干细胞组织工程技术解决上述问题, 本文综述肝脏干细胞组织工程学领域的研究进展, 并对其应用前景进行乐观展望, 旨在为临床治疗提供理论与实验依据。

1 资料和方法

1.1 资料来源

检索人相关内容: 第一作者。

¹Centre for Regenerative Medicine, First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China; ²School of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029, Liaoning Province, China; ³Department of Engineering Science, University of Oxford, Oxford OX1 3PJ, U.K.

Wang Nan★, Studying for master's degree, Centre for Regenerative Medicine, First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China; School of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029, Liaoning Province, China
nan_nan4@126.com

Correspondence to: Liu Jing, Professor, Centre for Regenerative Medicine, First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China
dngs008@yahoo.com.cn

Supported by: the National Science and Technology Cooperation Project of Ministry of Science and Technology*; the National Natural Science Foundation, No.81071009*; the International cooperation Project of Dalian Science and Technology Bureau, No.2009F11GH179*; the Doctor start-up Foundation of Liaoning Science and Technology Bureau, No.20091020*

Received: 2011-06-15
Accepted: 2011-07-26

¹ 大连医科大学附属第一医院中英再生医学应用研究中心, 辽宁省大连市 116011;
² 辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁省大连市 116029;
³ Department of Engineering Science, University of Oxford, Oxford OX1 3PJ, U.K.

王楠★, 女, 1986年生, 吉林省德惠市人, 汉族, 在读硕士, 主要从事再生医学, 干细胞肝脏定向分化的研究。
 nan_nan4@126.com

通讯作者: 刘晶, 教授, 大连医科大学附属第一医院中英再生医学应用研究中心, 辽宁省大连市 116011
 dnsgs008@yahoo.com.cn

中图分类号: R318
 文献标识码: B
 文章编号: 1673-8225(2012)06-01119-06

收稿日期: 2011-06-15
 修回日期: 2011-07-26
 (20110615016/WL-W)

检索时间范围: 1989-01/2010-12。

检索词: 英文检索词 “liver stem cell tissue engineering”, 分别与 “three dimensional culture, biodegradable materials, biological reactor” 组合。

检索数据库: PubMed 数据库, 网址: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>。

检索文献量: 共检索到 241 篇文章。

1.2 入选标准

纳入标准: 与肝脏干细胞、肝脏组织工程及支架材料有关的文献。

排除标准: 与纳入标准无关及重复的文献。

1.3 资料提取 计算机初检得到 241 篇文章, 阅读标题和摘要进行初筛, 排除因研究目的与本文无关及内容重复的研究 198 篇, 共保留 43 篇进行归纳总结。

1.4 质量评估 符合纳入标准的 43 篇文章中, 文献[1-4]探讨了终末期肝病治疗现状, 文献[5-10]探讨了肝脏干细胞的研究现状, 文献[11-18]探讨了肝脏三维体外扩增的现状, 文献[19-33]重点探讨了生物支架可降解材料的研究现状, 文献[34-43]主要探讨了生物反应器及三维复合体的研究现状。

2 结果

组织工程学就是应用生命科学与工程学的原理与技术, 在正确认识哺乳动物正常及病理两种状态下组织结构与功能关系的基础上, 研究开发用于修复、维护、促进人体各种组织或器官损伤后功能和形态的生物替代物的一门新兴学科。肝脏干细胞组织工程学是组织工程领域中重要的学科之一, 即应用肝脏干细胞与工程学的原理与技术, 再生、再造有正常肝细胞代谢功能的“肝脏组织”, 进行体外支持或体内植入, 用以对病损组织进行形态、结构和功能的重建并达到永久性替代, 以治疗各种肝功能衰竭。目前肝脏干细胞组织工程学研究主要集中在 3 个要素即肝脏干细胞、可降解支架材料和生物反应器。

2.1 肝脏干细胞 肝脏干细胞的基本特征可以概括为两点: 一是具有双向分化能力, 属于前体细胞, 即可向肝细胞和胆管细胞分化; 二是与其他干细胞一样具有自我更新能力。肝脏干细胞主要分为胚胎肝脏干细胞和成体肝脏干细胞, 另外还有其他非肝源性干细胞具有一定向肝脏干细胞及肝细胞分化的能力, 也进入了肝

脏组织工程研究的范畴。

胚胎肝脏干细胞: 胚胎发育早期, 前肠末端的肝憩室演化为肝部和尾部两个部分, 其中肝部生长极为迅速, 至胚 5 周时已经充填于腹腔大部^[5]。这些向肝脏演化的胚胎样肝细胞被称之为成肝细胞, 它不但具有旺盛的增殖能力, 而且具有向肝细胞和胆管细胞分化的潜能^[6], 因此普遍认为成肝细胞就是胚胎肝脏干细胞。小鼠实验发现在胚胎发育第 10 天肝胚开始分化成肝细胞及肝内、外胆管细胞^[7]。但在成人肝脏肝胚中是否存在或消失尚不清楚。此外, 肝胚与卵圆细胞的关系、肝内许多上皮样肝细胞或卵圆细胞的起源, 以及肝脏中任何细胞的逆向分化过程等, 目前均不甚了解, 有待进一步研究证实。中国科学院近年来采用细胞共培养技术已将小鼠胚胎干细胞诱导为肝细胞, 该细胞能表达成熟肝细胞标志物。解放军第三军医大学全军肝病研究所建立了将干细胞分化为肝细胞的体外培养体系, 并开始了胚胎干细胞/肝干细胞及其生物工程化的研究。但目前为止国内外所报道的结果并不理想, 所有诱导出的干细胞仅能表达部分标志物和具备肝细胞部分功能, 离临床应用还相差甚远。

成体肝脏干细胞: 因为肝脏本身再生能力很强, 正常肝脏是否存在于干细胞一直存有争议。大多数研究者认为成体肝脏干细胞定位于终末小胆管(Herring 管)内^[8], 是肝小叶边缘, 连接胆小管和小叶间胆管的一个比较特殊的解剖位置。在肝脏严重受损或成熟肝细胞增殖受阻的情况下, 一些肝脏细胞可以异常激活、增殖, 大量出现在肝小叶外周区域, 组织学上表现为肝小叶周围体积较小、增殖活跃的细胞群体。这些细胞核质比较大, 胞核圆形或卵圆形, 被称之为肝卵圆形细胞(hepatic oval cell, HOC)。大量增殖的卵圆形细胞沿肝实质向肝小叶中央区迁移, 分化为成熟的肝细胞, 修复和营建肝脏。与此同时, 卵圆细胞也可以向胆管上皮细胞分化, 参与肝内胆管的形成。目前人们普遍认为, 肝卵圆形细胞就是成体肝组织内的肝脏干细胞。Crosby 等^[9]实验表明, 应用卵圆细胞表面较特异标志物 OV-6、CK19 等在原发性胆汁性肝硬化, 原发性硬化性胆管炎及肝癌癌旁组织中发现大量 OV-6、CK19 阳性细胞, 而这些细胞与大鼠模型中发现的卵圆细胞类似, 说明卵圆细胞可能参与肝脏发生发展及肝脏病变的形成过程, 这为肝卵圆形细胞是肝脏干细胞的理论提供了实验依据。

非肝源性干细胞: 其他非肝源性干细胞主要指具有一定定向肝脏干细胞及肝细胞分化能力的干细胞, 主要包括胚胎干细胞, 成体干细胞等。

胚胎干细胞的来源主要是选择性流产的人类胚胎组织、不孕症治疗后剩余的胚胎组织、人工授精创造的胚胎, 胚胎干细胞是全能型干细胞, 极易分化, 缺点是定向分化条件不好控制, 且存在伦理学上的争议。而成体干细胞, 其分化潜能相对局限, 更容易诱导向定向的组织细胞分化, 也可直接用于体内组织的原位修复。同时解决了胚胎干细胞伦理道德的制约。因此, 成体干细胞是移植最佳的种子细胞。目前主要集中在骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)和脂肪基质干细胞(adipose derived stem cells, ADSCs)。

BMSCs 具有强大的增殖能力和多向分化潜能, 且取材方便、安全性高, 便于外源基因转染和表达调控, 已成为研究热点。骨髓由造血系统和基质系统组成, 后者包括成纤维细胞、内皮细胞、上皮细胞、巨噬细胞、网状细胞、脂肪细胞、脂肪前体细胞、平滑肌细胞、毯子样细胞和 BMSCs 等细胞群。研究表明来源于中胚层的 BMSCs 可跨越胚层界限, 向来源于内胚层及外胚层的组织和细胞分化。ADSCs 存在于脂肪组织的血管碎片基质中, 除具有与 BMSCs 相似的表型和功能外, 还具有以下特点: ①有多向分化潜能, 可以诱导分化成脂肪、骨、软骨和肌肉细胞等。②容易获得, 可通过脂肪抽吸术获取, 对患者伤害小。③不存在伦理学争议。④具有更低的致病概率。⑤异基因移植中的免疫排斥问题小。⑥培养时较易黏附和扩增。此外, 课题组前期工作还发现除取材方便, 含量丰富, 与 BMSCs 相比, ADSCs 在增殖速度、定向分化效率等方面都明显优于 BMSCs, 有可能成为一种新的理想组织工程种子细胞^[10]。但其向肝脏分化效率尚需要进一步确定, 分化诱导方法也不十分成熟, 还需要大量实验资料验证。

2.2 肝脏干细胞体外扩增的有效手段: 三维培养 肝脏干细胞来源有限, 而肝脏组织工程需要大量可靠的干细胞, 三维培养是目前发现行之有效的体外扩增手段。

细胞外基质主要由胶原蛋白、弹性蛋白、结构性糖蛋白、蛋白多糖 4 种分子组成。哺乳动物细胞分泌的细胞外基质可以形成复杂的支架结构, 细胞聚集在这些支架上, 形成三维矩阵。这种独特的组织结构有利于水溶性信号分子、营养物质、代谢废物的运输和抵抗机械压力张力的作用^[11]。有研究表明, 肝脏细胞外基质对肝脏维持动态平衡起到重要作用^[12]。由于传统的单层平面培养时细胞受重力作用而自然沉降在支架材料上, 使细胞贴壁而无极性, 细胞形态由球形转为扁平状, 由此影响细胞的分泌功能及部分关键基因的正常表达, 且二维平板培养无法反映细胞与细胞之间、细胞与基质微环境之间等多

维的相互作用, 使单层平板培养的细胞生物学特征与体内细胞真实的生理病理状况经常相差甚远。

三维培养技术克服了上述单层平板培养的不足, 较好地模拟出细胞在组织体内接近真实的生存状况, 对体外细胞的扩增以及细胞生物学功能的深入解析产生有力的推动。

细胞三维培养就是利用各种材料及方法, 使细胞呈空间立体方式生长, 更接近于体内生长模式, 形成类似的体内组织结构, 发挥其功能, 用以对病损组织进行形态、结构和功能的重建并达到永久性替代。徐大勇等^[13]利用旋转式细胞培养系统, 采用模拟微重力方法, 将人肝癌细胞(HepG2)接种于生物可降解支架聚羧基乙酸培养, 结果表明, 细胞在此模型中生长良好, 细胞呈多面体, 含有丰富的微绒毛、线粒体以及胞间有紧密连接形成。Bokhari 等^[14]利用一种塑料支架, 模拟人体条件的独特干细胞及其他组织生长技术, 使细胞在一种更接近体内细胞生长环境的三维环境中生长, 结果显示细胞结构与性能和体内的细胞最为相似。课题组也利用生物反应器在体外成功扩增出间充质干细胞, 如利用搅拌式生物反应器培养人胎盘来源的间充质干细胞, 与用培养皿扩增的对照组细胞相比较, 培养 144 h 后搅拌式生物反应器扩增的细胞数量是培养皿的 1.73 倍, 并且 MSCs 的表型特征不变^[15]。通过气升式环流中空纤维膜生物反应器对兔 BMSCs 进行三维动态培养, 7 d 后可扩增 16 倍, 扩增后大部分细胞呈 CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, 保持 MSCs 的表型, 并具有较强成骨、成软骨和成脂的多向分化能力^[16]。如课题组及 Chen 等^[17]研究中, 均发现大规模扩增后的 MSCs 可分化为成骨细胞、成软骨细胞、成脂肪细胞等, 能够维持其多向分化潜能。研究还发现, 利用这个系统能够更有效地进行药物研发, 并减少一些不必要的动物实验。因此, 三维培养技术不仅在体外模拟细胞间相互作用及细胞与基质微环境间相互作用、模拟细胞生长微环境及其生理病理变化以及促进细胞在体外扩增等方面显示出明显的优势, 而且为进一步应用组织工程方法构建人类组织器官提供有效的手段。

目前虽已能够从技术上实现肝脏干细胞的体外扩增, 但在大规模、系统地应用于临床治疗前, 急需解决的问题就是细胞扩增后的功能有效性与移植安全性, 即在体外大规模扩增后, 是否具有与原始干细胞相同的自我更新和多向分化潜能、表达相同的标记蛋白, 以及是否具有致癌性和移植带来的不良反应, 这是衡量与决定扩增干细胞移植能否应用到临床治疗的一个重要指标。因此必须在移植之前, 对扩增后的干细胞进行“身份”鉴定和安全检查^[18]。

2.2.1 支架材料 肝脏组织工程的另一个要素是能模仿肝脏组织特征及力学特点的支架。

目前研究主要集中在发展生物材料, 以模仿细胞外

基质独特的自然特征。理想的生物材料可以承受强大的生理负荷, 体内可降解、非致癌和非诱变。生物相容性是生物材料另一个重要特点, 取决于材料的物质组成, 表面润湿性, 表面粗糙度, 电荷, 大小和形状。生物材料表面的疏水性和亲水性决定了在吸附表面的蛋白质相互作用^[19]。目前组织工程中使用的生物材料大致可分为生物降解材料与非生物降解材料。非生物降解材料包括金属, 陶瓷和复合材料, 常被用作骨和牙齿的部分替换^[20-21]。而生物降解材料分为天然降解材料、合成降解材料和复合材料。无论天然或合成的可降解生物材料所形成的组织工程人工支架与原有的组织要非常相似。肝脏组织工程支架所使用天然或合成的聚合物, 是根据机械物理化学特性, 反映活性和降解性等特殊需要选择的, 从而构成一个多层次、多样化的生物材料有机体。

由于肝组织是代谢性软组织, 其对材料的力学性能要求与骨组织相比要低得多, 而对细胞外基质蛋白的生物活性及微环境仿生要求更高。研究肝脏支架时, 作为天然细胞基质衍生物的生物材料, 在体内已确认解决可能产生具有功能性完全成熟的肝细胞的关键因素, 如细胞基质, 细胞信号。从这个意义上来讲, 诸如海藻酸钠、壳聚糖、胶原、纤维连接蛋白、层连蛋白、透明质酸等天然基质材料更适用于肝组织工程。胶原蛋白是一种天然的细胞基质, 它在骨骼、皮肤、韧带和结缔组织中广泛存在。可以被基质细胞识别、附着, 同时促进细胞的增殖分化。Imamura 等^[22]将胚胎干细胞胚培养的聚丙烯管插入到胶原支架中进行三维培养, 并对系统补充外援的生长因子和激素, 结果显示有肝脏基因和白蛋白的产生。透明质酸是另一种细胞外基质成分, 在胚胎和胎儿组织中存在, 它参与细胞复制与扩散, 在细胞形态和细胞信号中发挥重要作用。人肝母细胞和肝脏干细胞表达(CD44 的)透明质酸受体。透明质酸的糖胺聚糖, 可以形成高活性生物材料^[23], 细胞聚集形成的肝母细胞和肝干细胞的透明质酸凝胶, 可以保持细胞活力和表型 4 周, 其主要缺点是天然细胞外基质的化学成分, 物理性质是一个变量, 同时存在着伦理和安全性问题。因此与其相关的生物材料衍生出来。植物、动物、昆虫来源的天然生物材料已部分研发出来, 如丝绸, 壳聚糖, 海藻酸钠和基底膜基质。丝素蛋白是从丝绸和蚕蛹中提取获得的, 美国 FDA 批准用于手术和药物。丝素蛋白微流器在肝 HepG2 细胞培养中起支持和扩散的特定功能^[24]。壳聚糖是由一种天然生物高分子氨基葡萄糖与 N-乙酰甲壳素脱乙酰化得到的。壳聚糖白蛋白矩阵已被证实可以支持创建类似器官的猪胎肝组织。

此外, 还有一部分合成聚合物用于制作三维支架。合成生物聚合物具有天然聚合物的优势如广泛的材料来源, GMP 可扩展性, 生物相容性及可生物降解。合成聚合物形成的支架随着时间的推移, 聚合物减少降

解。目前最常见的生物可降解聚合物包括聚乳酸(PLA), 聚-L-乳酸(PLLA), 聚羧基酸(PGA), 聚酸酐, Polyfumarates (PF), polyorthoesters, polycaprolactones (PCL)和聚碳酸酯^[25-26]。

PLA 是经 FDA 批准的极少数可用于人体的可降解聚合材料之一。PLA 在人体内代谢的最终产物是 CO₂ 和 H₂O, 中间产物乳酸也是体内正常糖代谢的产物, 不会在重要器官聚集, 因此具有优异的生物降解性和可吸收性。但是 PLA 细胞亲和性差, 疏水性较强, 降解速度很慢, 在体内长期存在容易引发炎症和肿胀等并发症。因此, PLA 通常不单独作为组织工程支架材料而是利用与其他单体的共聚、与其他共聚物共混, 或者用天然高分子或天然无机物与 PLA 共混或杂化的技术, 通过控制材料的组分、组成比、分子质量、分子质量分布等手段, 达到调节和控制材料性能的目的。

聚 α-羧基酸由 PGA 和 PLLA 组成共聚物聚乳酸乙醇酸(poly latic-co-glycolic acid, PLGA), 并通过重组形成 L-, D-或 DL-型具有旋光性的 PLDLA, 可被用于外科手术缝合线和移植设备^[27]。用聚乳酸支架体外培养小鼠胎肝细胞, 可产生具有白蛋白的小鼠肝细胞^[28]。另一个引起关注的聚合物就是聚氨酯, 被广泛用于植入式生物聚合物设备的开发, 如人工心脏、心脏起搏器和结构组织的代替品^[29]。成年大鼠肝细胞在毛孔聚氨酯支架中细胞聚集成球^[30-31]。

Gelain 等^[32]利用微小的蛋白质片段设计出一种新型三维“脚手架”, 干细胞能够在这种“脚手架”上生长、繁殖并分化成脑细胞, 这种“脚手架”相容性及可塑性更接近生物活体本身。Bokhari 等^[33]研制出三维多孔聚苯乙烯支架, 用其做支架培养的肝脏细胞结构和特征与人体中自然生长的肝脏细胞最为相似。利用日本高研公司研制的 Atelocollagen 支架种植培养的心肌细胞, 形成了可跳动的心肌组织, 其中包含的纤维细胞能形成胶原纤维, 内皮细胞可形成少量的毛细血管, 基本具备了心肌组织的特点。

2.2.2 生物反应器 具备大量可靠的种子细胞和符合要求的生物支架材料, 只完成了第一步。任何细胞团体积大于 1 mm³时, 如无血管的供养, 并将代谢废物排出, 则细胞就会死亡。因此, 必须开发出可以培养在三维系统下的细胞团的方法。三维培养环境模拟的探索一直是肝脏干细胞组织研究领域的热点问题。国内外已相继开展这方面研究工作, 取得了一些进展。目前较为成功的方法是通过生物反应器实现肝脏组织工程构建^[18]。

生物反应器是一个封闭系统, 由接种肝细胞后的多聚材料形成包囊, 管接循环介质, 培养液贮存器, 捕捉气泡的除泡器, 以及可以氧化培养液的增氧器组成^[34]。一方面新鲜培养基不断泵入, 另一方面含有代谢废物(乳酸、氨等)的反应液不断流出, 支架和反滤器壁保持

紧密衔接, 避免培养液从支架四周流过。通过调节灌注速率, 可以使营养物质和代谢产物与细胞之间的质量传递、细胞/支架结构体的截留以及流体产生的剪切力之间达到平衡, 使细胞在相对稳定的生长环境中增殖分化, 有利于组织形成。课题组研制的三维灌注微生物反应器, 见图 1, 该系统是一个标准的 96 孔板细胞培养模式, 每个孔培养基都通过单独的硅管进行灌注。该反应器用聚二甲硅氧烷透光材料制作, 可在显微镜下观察细胞并进行分析。并且它还有气体传递功能, 排出 CO_2 , 注入氧气, 可用于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 的细胞培养箱中。研究证明形成包囊的多聚材料可以促进细胞贴附, 并且其多孔性有利于细胞接触以及营养交换, 能为细胞贴附生长提供更广阔的空间。培养液循环系统可以增加细胞团中心细胞摄入营养和氧气, 帮助其排除代谢废物和 CO_2 , 明显降低细胞团中心细胞的死亡率, 为下一步肝脏干细胞组织工程研究奠定了基础^[35]。

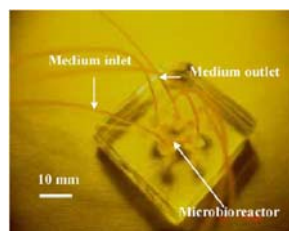


图 1 生物反应器的实物照片图(摘自 Biomed Microdevices 2006;8:331-340)

基于以上优点, 肝细胞可以在生物反应器中长期存活, 并保持细胞色素 p-450 和肝脏产物如白蛋白分泌的功能。更重要的是通过在生物反应器的培养, 对组织工程肝脏未来应用所需的体内外特殊参数检测提供了前景^[34, 36-37]。

2.3 肝脏干细胞移植体内定植的理想方式: 肝脏干细胞可降解支架在生物反应器内形成的复合体 获得理想的干细胞后, 就面临着细胞移植的问题。与肝移植相比, 细胞移植简单易行, 可通过微创手术或介入置管完成。目前临床试验主要采用门脉肝内移植及脾内移植途径。但偶会出现门脉高压及肺栓塞的风险, 同时细胞会随着血液的流动而转移, 不能很好的定植到病灶处, 发挥其最大的功效。因此, 肝脏干细胞移植入体内, 面临的一个最大问题是如何实现有效定植。

之前介绍了大量体外扩增干细胞的方法就是三维培养, 细胞在空间立体支架间生长, 形成一个细胞-支架复合体。将这个复合体整体回植, 已在皮肤、骨组织工程中取得显著效应^[38-39]。肝细胞团大于 1 mm^3 , 如无血管长入, 则会死亡, 只有在体外构建了管道系统——血管网, 通过营养液在血管内的循环, 为细胞提供营养和氧气, 或者将人工制造的肝组织于宿主血液循环连接起来, 得到宿主血液的供应, 才能使细胞成活。因此提

出“肝组织工程的血管化”这一名词。Mooney 等^[40]将小鼠肝细胞种植在厚 1 mm 的多孔 PLGA 海绵支架上, 植入腹腔, 1 周后发现有大量的毛细血管长入, 孔隙率越大, 长入血管和存活的肝细胞越多。Aoki 等^[41]通过中空纤维管的有序排列构建类似肝小叶的结构, 将肝细胞种植于外腔, 治疗由局部缺血造成的肝功能衰竭小鼠。小鼠血氨升高水平得到抑制, 4 周后血液组成恢复到正常水平, 肝脏体质量也恢复到正常水平。Ajioka 等^[42]将转染了血管内皮生长因子的原代肝细胞与支架材料 Cytodex 3 一同植入大鼠腹腔, 2 周后取材。实验组移植植物较对照组颜色更红、体积更大。免疫组织化学研究证实, 实验组含有更多的新生血管, 促进移植肝细胞的增殖。此后, 该研究小组又将包有表达血管内皮生长因子的原代肝细胞和细胞外基质的尼龙网袋移植入大鼠腹腔, 使其一端与肝脏相接触。3 周后发现, 有自肝脏发出并长入尼龙网袋的血管形成, 与支架内新生的血管网相连接。Kedem 等^[43]将能够持续释放血管内皮生长因子的海藻酸盐支架植入肝叶, 发现生成的血管密度和直径都明显大于对照组。植入肝细胞后, 能明显促进肝细胞的定植和增生。

3 展望

近年来干细胞技术发展突飞猛进, 肝脏干细胞组织工程的发展更是给终末期肝病的治疗带来了希望。肝脏干细胞在体外通过三维培养的方式繁殖扩增, 解决了肝脏干细胞来源及数量上的制约; 同时细胞在三维条件下生长, 具有一定的空间结构, 这就可以通过手术缝合的方式将肝脏干细胞及其支架附属结构定植到病灶处, 支架材料随着时间不断地降解, 同时细胞在体内病灶处进行修复, 从而解决了肝脏干细胞的定植问题。

肝脏干细胞组织工程学是一个多学科交叉领域, 它是生物学、材料科学、信息科学、制造科学和临床医学等一系列相关学科的发展和技术的创新与集成, 因此, 它的发展将对生命科学和工程科学的自身发展作出重要贡献。随着肝脏干细胞组织工程取得每一个新的进展, 就向获得可植入的人造肝脏前进了一步。这对所有涉及其中的人们尤其是那些将要受益的患者而言, 不啻于是一个福音。

4 参考文献

- [1] Raia S, Nery JR, Mies S. Liver transplantation from live donors. *Lancet*. 1989 Aug 26;2(8661):497.
- [2] Seaman DS. Adult living donor liver transplantation: current status. *J Clin Gastroenterol*. 2001;33(2):97-106.
- [3] Ramadori G, Moriconi F, Malik I, et al. Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair. *J Physiol Pharmacol*. 2008;59 Suppl 1:107-117.
- [4] Starzl TE, Lakkis FG. The unfinished legacy of liver transplantation: emphasis on immunology. *Hepatology*. 2006;43(2 Suppl 1):S151-S163.

- [5] Zaret KS. Liver specification and early morphogenesis. *Mech Dev.* 2000;92(1):83-88.
- [6] Strick-Marchand H, Weiss MC. Embryonic liver cells and permanent lines as models for hepatocyte and bile duct cell differentiation. *Mech Dev.* 2003;120(1):89-98.
- [7] Dabeva MD, Petkov PM, Sandhu J, et al. Proliferation and differentiation of fetal liver epithelial progenitor cells after transplantation into adult rat liver. *Am J Pathol.* 2000;156(6):2017-2031.
- [8] Dan YY, Yeoh GC. Liver stem cells: a scientific and clinical perspective. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23(5):687-698.
- [9] Crosby HA, Hubscher S, Fabris L, et al. Immunolocalization of putative human liver progenitor cells in livers from patients with end-stage primary biliary cirrhosis and sclerosing cholangitis using the monoclonal antibody OV-6. *Am J Pathol.* 1998;152(3):771-779.
- [10] 诸葛栋, 梁战华, 宋琳, 等. 不同来源干细胞神经向分化能力的研究现状[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(23):6031-6035.
- [11] Burdick JA, Vunjak-Novakovic G. Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(2):205-219.
- [12] McClelland R, Wauthier E, Uronis J, et al. Gradients in the liver's extracellular matrix chemistry from periportal to pericentral zones: influence on human hepatic progenitors. *Tissue Eng Part A.* 2008;14(1):59-70.
- [13] 徐大勇, 汪蕴, 丰美福. HepG2细胞在模拟微重力条件下的生长研究—体外细胞三维生长模型构建[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34(2):146-153.
- [14] Bokhari M, Carnachan RJ, Cameron NR, et al. Culture of HepG2 liver cells on three dimensional polystyrene scaffolds enhances cell structure and function during toxicological challenge. *J Anat.* 2007;211(4):567-576.
- [15] Yu Y, Li K, Bao C, et al. Ex vitro expansion of human placenta-derived mesenchymal stem cells in stirred bioreactor. *Appl Biochem Biotechnol.* 2009;159(1):110-118.
- [16] 李香琴, 刘天庆, 朱琳, 等. 气升式环流中空纤维膜生物反应器内骨髓间充质干细胞的培养与扩增[J]. *高校化学工程学报*, 2008, 22(6):985-991
- [17] Chen X, Xu H, Wan C, et al. Bioreactor expansion of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006;24(9):2052-2059.
- [18] 刘晶, 宋琳, 邹伟, 等. 体外扩增间充质干细胞功能有效性及移植安全性评价研究进展[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(12):1629-1635.
- [19] Roach P, Eglin D, Rohde K, et al. Modern biomaterials: a review - bulk properties and implications of surface modifications. *J Mater Sci Mater Med.* 2007;18(7):1263-1277.
- [20] Dawson E, Mapili G, Erickson K, et al. Biomaterials for stem cell differentiation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(2):215-228.
- [21] Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, et al. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2006;27(18):3413-3431.
- [22] Imamura T, Cui L, Teng R, et al. Embryonic stem cell-derived embryoid bodies in three-dimensional culture system form hepatocyte-like cells in vitro and in vivo. *Tissue Eng.* 2004;10(11-12):1716-1724.
- [23] Turner WS, Schmelzer E, McClelland R, et al. Human hepatoblast phenotype maintained by hyaluronan hydrogels. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007;82(1):156-168.
- [24] Bettinger CJ, Cyr KM, Matsumoto A, et al. Silk Fibroin Microfluidic Devices. *Adv Mater.* 2007;19(5):2847-2850.
- [25] Cheung HY, Lau KT, Lu TP, et al. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. *Composites Part B.* 2007;38(3):291-300.
- [26] Liu C, Xia Z, Czernuszka JT. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Chem Eng Res Design.* 2007;85(7):1051-1064.
- [27] Chan G, Mooney DJ. New materials for tissue engineering: towards greater control over the biological response. *Trend Biotechnology.* 2008;26(7):382-392.
- [28] Jiang J, Kojima N, Guo L, et al. Efficacy of engineered liver tissue based on poly-L-lactic acid scaffolds and fetal mouse liver cells cultured with oncostatin M, nicotinamide, and dimethyl sulfoxide. *Tissue Eng.* 2004;10(9-10):1577-1586.
- [29] Zdrahala RJ, Zdrahala IJ. Biomedical applications of polyurethanes: a review of past promises, present realities, and a vibrant future. *J Biomater Appl.* 1999;14(1):67-90.
- [30] Ijima H, Matsushita T, Nakazawa K, et al. Hepatocyte spheroids in polyurethane foams: functional analysis and application for a hybrid artificial liver. *Tissue Eng.* 1998;4(2):213-226.
- [31] Ijima H, Nakazawa K, Mizumoto H, et al. Formation of a spherical multicellular aggregate (spheroid) of animal cells in the pores of polyurethane foam as a cell culture substratum and its application to a hybrid artificial liver. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1998;9(7):765-778.
- [32] Gelain F, Bottai D, Vescovi A, et al. Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for adult mouse neural stem cell 3-dimensional cultures. *PLoS One.* 2006;1:e119.
- [33] Bokhari M, Carnachan RJ, Cameron NR, et al. Novel cell culture device enabling three-dimensional cell growth and improved cell function. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;354(4):1095-100.
- [34] Kim SS, Sundback CA, Kaihara S, et al. Dynamic seeding and in vitro culture of hepatocytes in a flow perfusion system. *Tissue Eng.* 2000;6(1):39-44.
- [35] Cui ZF, Xu X, Trainor N, et al. Application of multiple parallel perfused microbioreactors and three-dimensional stem cell culture for toxicity testing. *Toxicol In Vitro.* 2007;21(7):1318-1324.
- [36] Powers MJ, Janigian DM, Wack KE, et al. Functional behavior of primary rat liver cells in a three-dimensional perfused microarray bioreactor. *Tissue Eng.* 2002;8(3):499-513.
- [37] Powers MJ, Domansky K, Kaazempur-Mofrad MR, et al. A microfabricated array bioreactor for perfused 3D liver culture. *Biotechnol Bioeng.* 2002;78(3):257-269.
- [38] Markowicz M, Koellensperger E, Neuss S, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells seeded on modified collagen improved dermal regeneration in vivo. *Cell Transplant.* 2006;15(8-9):723-732.
- [39] Dong J, Uemura T, Shirasaki Y, et al. Promotion of bone formation using highly pure porous beta-TCP combined with bone marrow-derived osteoprogenitor cells. *Biomaterials.* 2002;23(23):4493-4502.
- [40] Mooney DJ, Kaufmann PM, Sano K, et al. Transplantation of hepatocytes using porous, biodegradable sponges. *Transplant Proc.* 1994;26(6):3425-3426.
- [41] Aoki K, Mizumoto H, Nakazawa K, et al. Evaluation of a hybrid artificial liver module with liver lobule-like structure in rats with liver failure. *Int J Artif Organs.* 2008;31(1):55-61.
- [42] Ajioka I, Akaike T, Watanabe Y. Expression of vascular endothelial growth factor promotes colonization, vascularization, and growth of transplanted hepatic tissues in the mouse. *Hepatology.* 1999;29(2):396-402.
- [43] Kedem A, Perets A, Gamlieli-Bonshtein I, et al. Vascular endothelial growth factor-releasing scaffolds enhance vascularization and engraftment of hepatocytes transplanted on liver lobes. *Tissue Eng.* 2005;11(5-6):715-722.

基金声明: 科技部国家科技合作专项“俄罗斯器官特异性干细胞定植支架及定向生长分化的关键技术引进与联合研发”; 国家自然科学基金“复层灌注微生物反应器结合hBMSCs/黑质 DA 能神经元 3D 共培养构建功能性多巴胺能神经网络的研究”(81071009); 大连市科技局国际合作项目“中英干细胞临床应用与技术平台”(2009F11GH179); 辽宁科技厅博士启动“三维灌注培养下 BMSC 成神经分化优化方案筛选及神经网络模型构建”(20091020)。

作者贡献: 第一作者和通讯作者构思并设计本综述, 分析并解析数据, 所有作者共同起草, 经通讯作者审校, 第一作者对本文负责。

利益冲突: 课题未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。

伦理批准: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

此问题的已知信息: 干细胞移植治疗终末期肝病, 依据不同来源干细胞肝脏向分化能力而选择, 肝脏干细胞作为内源性干细胞具有定向分化的明显优势。

本综述增加的新信息: 肝脏干细胞三维培养是行之有效的体外扩增手段, 而伴随的生物可降解材料支架构建和肝脏干细胞特异性生物反应器的研发仍是技术关键。

临床应用的意义: 已证明肝脏干细胞是移植治疗终末期肝病的理想种子细胞, 总结近年来肝脏干细胞组织工程相关文献, 为肝脏干细胞组织工程研究指明方向, 有望为临床肝脏干细胞移植治疗终末期肝病提供理论依据。