

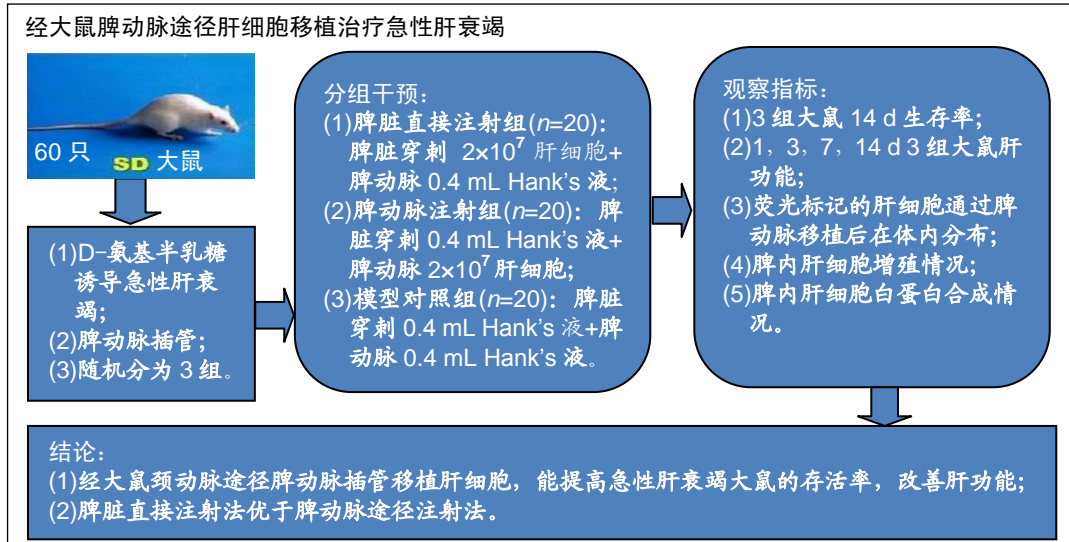
脾内两种途径肝细胞移植治疗急性肝衰竭大鼠的效果评价

冯渊¹, 李德卫², 杨均均¹(¹川北医学院第二临床学院, 南充市中心医院, 四川省南充市 637000; ²重庆医科大学附属第一医院肝胆外科, 重庆市 400016)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1624

ORCID: 0000-0002-2353-7893(冯渊)

文章快速阅读:



冯渊, 男, 1983年生, 四川省邻水县人, 汉族, 2012年重庆医科大学毕业, 硕士, 主要从事肝细胞移植方面的研究。

通讯作者: 李德卫, 博士, 教授, 重庆医科大学附属第一医院肝胆外科, 重庆市 400016

文献标识码: B

稿件接受: 2018-11-26



文题释义:

肝细胞移植: 目前肝细胞移植作为原位肝移植的替代治疗方法之一, 主要应用于终末期肝病以及肝脏代谢性疾病治疗, 能有效地提供近期或者远期肝功能支持, 取得了一定的成功。更有人认为未来肝细胞移植可能取代肝移植。

急性肝衰竭: 指各种原因引起肝细胞大面积坏死或严重肝功能损害。肝脏内的肝细胞呈一次性大面积坏死, 伴存活肝细胞严重变性, 肝窦网状支架塌陷或非完全性塌陷, 坏死组织释放各种酶及细胞内容物导致局部炎症反应, 同时正常肝细胞释放过量的细胞因子和炎症递质进一步破坏溶解肝细胞, 最终导致肝脏内环境紊乱。该病具有很高死亡率, 目前治疗方法有肝移植、人工肝、肝细胞移植等。

摘要

背景: 肝细胞移植在治疗代谢性疾病和急性肝衰竭的动物实验中取得了一定成功, 然而肝细胞移植的临床疗效却并没有动物实验理想。造成实验模型与临床疗效的差异可能与肝细胞移植途径有一定关系。

目的: 探讨经颈动脉途径脾动脉插管注射与脾脏直接注射两种方法行肝细胞移植治疗急性肝衰竭大鼠的疗效, 得出更加优化的移植方法。

方法: 在 Seglen 改良两步法的基础上稍加改进分离培养肝细胞。采用 D-氨基半乳糖诱导大鼠(重庆医科大学实验动物中心提供)急性肝衰竭 24 h 后, 65 只大鼠经颈动脉途径脾动脉插管, 60 只插管成功后随机分为 3 组: 脾脏直接注射组($n=20$)大鼠经脾脏直接注射约 2×10^7 个肝细胞、脾动脉注射 0.4 mL Hank's 液; 脾动脉注射组($n=20$)大鼠经脾脏直接注射 0.4 mL Hank's 液、脾动脉注射 2×10^7 个肝细胞; 模型对照组($n=20$)经脾脏直接注射 0.4 mL Hank's 液、脾动脉注射 0.4 mL Hank's 液。移植后 14 d 内观察各组大鼠的生存率及肝功能变化; 移植后 7 d, 荧光显微镜观察经脾动脉移植肝细胞的体内分布情况, 苏木精-伊红染色观察移植肝细胞在脾内的分布和增殖情况; 移植后 14 d, 免疫荧光染色观察白蛋白合成情况。

结果与结论: ①大鼠肝细胞分离存活率达 80%~90%; ②3 组大鼠生存率的比较差异有显著性意义, 脾脏直接注射组 14 d 存活率显著高于脾动脉注射组, 脾动脉注射组 14 d 存活率高于模型对照组; ③脾脏直接注射组、脾动脉注射组大鼠肝功能均明显改善, 尤其以脾脏直接注射组最为显著; ④CFDA-SE 荧光标记的肝细胞经脾动脉移植 7 d 后, 受体大鼠脾脏和肝脏可以看到散在绿色荧光分布; ⑤移植 14 d 后, 脾脏直接注射组、脾动脉注射组脾脏内有肝细胞白蛋白绿色荧光信号; ⑥移植 7 d 后, 脾脏直接注射组、脾动脉注射组肝细胞在脾脏红髓中簇集在一起并定植下来; ⑦结果表明, 经大鼠颈动脉途径脾动脉插管移植肝细胞能提高急性肝衰竭大鼠的存活率和改善其肝功能; 脾脏直接注射法优于脾动脉途径注射法。

关键词:

急性肝衰竭; 肝细胞移植; 脾动脉插管; 脾动脉注射; 脾内直接注射

主题词:

肝功能衰竭, 急性; 肝细胞; 脾; 脾动脉; 组织工程

中图分类号: R459.9; R394.2

Feng Yuan, Master,
Nanchong Central Hospital,
the Second Clinical School of
North Sichuan Medical
College, Nanchong 637000,
Sichuan Province, China

Corresponding author:
Li Dewei, MD, Professor,
Department of Hepatobiliary
Surgery, the First Affiliated
Hospital of Chongqing
Medical University,
Chongqing 400016, China

基金资助:

国家自然科学基金项目(81470898), 项目负责人: 李德卫

Therapeutic effects of hepatocyte transplantation via two different intrasplenic approaches in acute hepatic failure rats

Feng Yuan¹, Li Dewei², Yang Junjun¹ (¹Nanchong Central Hospital, the Second Clinical School of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan Province, China; ²Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract

BACKGROUND: Hepatocyte transplantation has achieved some success in animal experiments for the treatment of metabolic diseases and acute liver failure. However, the clinical efficacy of hepatocyte transplantation is unsatisfactory. The difference between the experimental results and the clinical efficacy may be related to the hepatocyte transplantation approach.

OBJECTIVE: To evaluate the therapeutic effects of hepatocyte transplantation by the intubation of the splenic artery and intrasplenic injection in rats with acute hepatic failure, providing more optimal transplantation approaches and methods.

METHODS: Hepatocytes were isolated and cultured by the modified Seglen's method (two-step). Acute hepatic failure was induced by D-gal in Sprague-Dawley rats (provided by the Experimental Animal Center of Chongqing Medical University in China). After 24 hours, an intubation tube was inserted into the splenic artery in 65 rats with acute hepatic failure, which was successful in 60 rats. Then these 60 rat models were randomly divided into three groups ($n=20$ per group). Intrasplenic injection group received about 2×10^7 hepatocytes through intrasplenic injection and 0.4 mL of Hank's solution through the splenic artery. Splenic artery group received 0.4 mL of Hank's solution through intrasplenic injection and 2×10^7 hepatocytes through the splenic artery. Model group received 0.4 mL of Hank's solution through intrasplenic injection and 0.4 mL of Hank's solution through the splenic artery. Survival rate and liver function of the rats was observed within 14 days after transplantation. The distribution of CFDA-SE-labeled hepatocytes transplanted via the splenic artery was observed under fluorescence microscope at 7 days after transplantation, and meanwhile, the distribution and proliferation of transplanted hepatocytes in the spleen were observed using hematoxylin-eosin staining. Synthesis of albumin in the spleen was observed by immunofluorescence staining.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) 80%–90% hepatocytes survived after isolation. (2) At 14 days after transplantation, the survival rates of rats in the three groups were significantly different: intrasplenic injection group > splenic artery group > model group. (3) The liver function of rats was significantly improved in the intrasplenic injection group and the splenic artery group, especially in the former group. (4) CFDA-SE-labeled hepatocytes (green fluorescence) were scattered in the rat spleen and liver at 7 days after transplantation via the splenic artery. (5) At 14 days after transplantation, immunofluorescent staining of albumin demonstrated some positive cells in the rat spleen in the intrasplenic injection group and splenic artery group. (6) At 7 days after transplantation, transplanted hepatocytes were concentrated and colonized in the red pulp of the spleen. In conclusion, hepatocyte transplantation through catheterization of the splenic artery via carotid route can improve the survival of rats with acute hepatic failure and ameliorate the hepatic function, but intrasplenic injection is significantly superior to the injection via the splenic artery.

Subject headings: Liver Failure, Acute; Hepatocytes; Spleen; Splenic Artery; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81470898 (to LDW)

0 引言 Introduction

急性肝衰竭是指各种原因引起肝细胞大面积坏死或严重肝功能损害, 该病具有很高死亡率, 目前临床上最为有效的治疗方法为肝移植^[1]。然而肝移植面临供者紧缺、长期使用免疫药物、手术创伤大、高昂费用等缺点, 限制其在临床上广泛运用^[2-3]。目前短暂替代治疗急性肝衰竭的方法有人工肝和肝细胞移植, 人工肝主要是通过血液透析的方法改善肝功能, 而无法完成肝脏代谢功能^[4-5]。肝细胞移植作为一种桥梁作用, 帮助肝功能衰竭患者渡过肝衰竭期^[6-7]。肝细胞移植与原位肝移植相比有以下优势: ①一肝多用, 很大程度上缓解了供肝的紧缺; ②手术创伤小; ③肝细胞可以低温保存(-140 °C), 可以随时为肝衰竭患者提供治疗; ④排斥反应小。与原位肝移植比较, 肝细胞移植免疫原性较小, 不需要大量服用免疫性药物; ⑤费用低, 有利于肝细胞移植广泛运用等; ⑥基因修饰, 可以将基因修饰的肝细胞移植到基因缺陷体内, 达到治疗的目的^[8]。

Zern^[9]认为未来肝细胞移植可能取代肝移植。

肝细胞移植在治疗代谢性疾病和急性肝衰竭的动物实验中取得了一定成功^[10], 然而肝细胞移植的临床疗效却并

没有动物实验理想^[11-12]。肝细胞移植部位较多, 包括肝脏、脾脏、腹膜后、肠系膜等, 其中脾脏是肝细胞移植运用较多、最为成熟的部位之一^[13-14]。目前脾脏内移植途径主要包括脾动脉注射法和直接脾内注射法两种^[13]。大多数动物模型选择脾脏直接注射法移植治疗急性肝衰竭, 而临床治疗则选择脾动脉途径进行移植^[11-12]。造成实验模型与临床疗效的差异可能与肝细胞移植途径有一定关系^[12]。为此, 该实验通过比较经颈动脉途径脾动脉插管注射与脾脏直接注射肝细胞治疗急性肝衰竭大鼠的疗效, 为临床提供一种更为优化的移植途径和方法。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 动物实验观察。

1.2 时间及地点 于2011年6月至2014年7月在重庆医科大学附属第一医院神经内科重点实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 供体: SD大鼠20只, 6–8周龄, 雌雄各半, 体质量(200±25) g; 受体: SD大鼠65只, 6–8周龄, 雌雄各半, 体质量(200±25) g, 均由重庆医科大学动物实

验中心提供, 实验动物许可证号: SCXK(渝)2007-0001, 饲养条件: 20-25 °C, 充足的水和食物, 12 h昼夜交换。

1.3.2 实验试剂 D-氨基半乳糖(重庆医科大学化学教研室); 兔抗大鼠白蛋白单克隆抗体(美国Abcam公司); CFDA-SE荧光染料(上海碧云天生物公司); 多聚赖氨酸(武汉博士德生物工程公司); 多聚甲醛、水合氯醛(重庆川东化工集团公司); 硬膜外导管(重庆医科大学附属第一医院麻醉科); 甘油(美国Sigma公司); 枸橼酸盐缓冲液(上海碧云天生物公司); PBS(美国Sigma公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 肝细胞分离 20只SD大鼠作为肝细胞移植的供体。肝细胞的分离是在Seglen改良两步法的基础上稍加改进^[15-16]: ①通过门静脉插管灌注D-Hank's液; ②换用含0.05%胶原酶IV的Hank's液灌注。将分离出的肝细胞制成肝细胞悬液, 通过锥虫蓝染色, 观察肝细胞的活性。

1.4.2 肝细胞荧光标记 使用荧光标记物CFDA-SE对肝细胞进行绿色荧光标记。在10 mL肝细胞悬液($1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$)中加入荧光示踪剂CFDA-SE溶液10 μL , 充分摇匀, 10 min后4 °C离心3 min(300 $\times g$), 去除上清液, 避光, 反复2次。通过荧光显微镜观察肝细胞标记情况。

1.4.3 动物造模及实验分组 65只SD大鼠一次性腹腔注射D-氨基半乳糖(剂量为0.8 g/kg)诱导急性肝衰竭24 h后, 进行颈动脉途径脾动脉插管, 具体操作方法参照文献^[17]: ①分离左侧颈动脉; ②分离腹腔干; ③插管。插管成功60只, 失败5只。将插管成功的60只大鼠随机分为3组: 脾脏直接注射组、脾动脉注射组、模型对照组, 每组20只。

1.4.4 肝细胞移植 插管成功后, 临时阻断腹腔干的肝总动脉、胃左动脉分支, 保持腹腔干与脾动脉形成唯一通路^[11]。脾脏直接注射组($n=20$)大鼠脾尾直接注射肝细胞悬液0.4 mL(含 2×10^7 个肝细胞)、通过导管注射0.4 mL Hank's液; 脾动脉注射组($n=20$)大鼠脾尾直接注射0.4 mL Hank's液、通过导管注射肝细胞悬液0.4 mL(含 2×10^7 个肝细胞); 模型对照组($n=20$)脾尾直接注射0.4 mL Hank's液、通过导管注射0.4 mL Hank's液。注射完毕后退导管, 结扎左侧颈动脉, 2 min后解除各血管梗阻(恢复肝总动脉、胃左动脉畅通), 缝合皮肤。

1.5 主要观察指标

1.5.1 肝细胞存活和荧光标记情况 使用锥虫蓝染色观察肝细胞存活情况, 荧光显微镜观察CFDA-SE标记的肝细胞染色情况。

1.5.2 大鼠存活情况 观察14 d内3组急性肝衰竭大鼠存活情况。

1.5.3 肝功能 各组大鼠分别在移植后0, 1, 3, 7, 14 d经尾静脉采血。用赖氏法检测谷丙转氨酶活性, 溴甲酚绿法检测总胆红素水平。

1.5.4 荧光标记检测肝细胞在体内分布 在移植后7 d, 取下脾动脉注射组2只荧光标记受体大鼠的脾脏、肝脏、肺送

快速冰冻, 6 μm 厚度连续切片, 60%甘油封固, 通过荧光显微镜观察经脾动脉途径移植的肝细胞在体内分布情况。

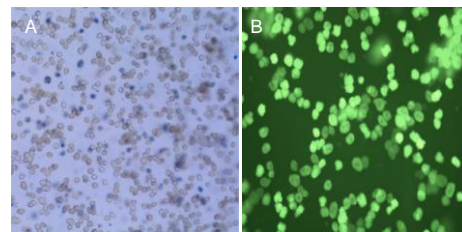
1.5.5 苏木精-伊红染色观察脾脏组织形态 移植后7 d, 取各组1只大鼠脾脏, 经40 g/L多聚甲醛固定24 h后, 石蜡包埋、切片, 苏木精-伊红染色观察移植肝细胞在脾内的分布和增殖情况。

1.5.6 免疫荧光检测白蛋白表达 移植后14 d, 取各组2只大鼠脾脏组织送快速冰冻, 6 μm 厚度连续切片, 40 g/L多聚甲醛室温固定15-30 min, PBS水化组织2次, 每次10 min, 3%BSA室温封闭30 min, 加入兔抗大鼠白蛋白单克隆抗体避光孵育2 h, PBS水化组织2次, 每次10 min, 60%甘油封固, 共聚焦荧光显微镜观察荧光信号。

1.6 统计学分析 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 3组14 d生存率比较采用 χ^2 检验, 3组之间两两比较时用 $\alpha' = \frac{\alpha}{k(k-1)/2}$ 校正检验水准; 谷丙转氨酶和总胆红素水平差异采用单因素方差分析且用SNK检验进行两两对比。所有数据均采用SPSS 22.0统计软件分析。

2 结果 Results

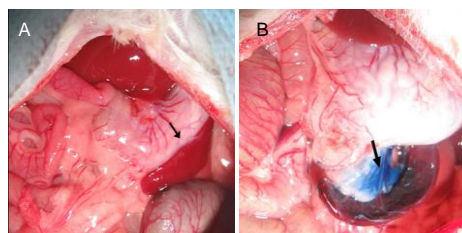
2.1 肝细胞存活和荧光标记情况 肝细胞成功分离为单个细胞, 锥虫蓝染色活力为80%-90%, 存活肝细胞透亮不被锥虫蓝着色, 而细胞壁破坏的肝细胞则染成蓝色, 见图1A。肝细胞使用荧光示踪剂CFDA-SE标记后显绿色荧光, 见图1B。



图注: 图中A为肝细胞锥虫蓝染色, 细胞活力为80%-90%($\times 100$); B为CFDA-SE标记的肝细胞, 显示绿色荧光($\times 200$)。

图1 SD大鼠肝细胞存活和荧光标记情况
Figure 1 Survival and labeling of hepatocytes from Sprague-Dawley rats

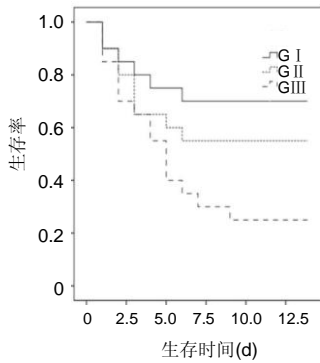
2.2 脾动脉插管情况 经颈动脉途径脾动脉插管成功后, 通过导管注射亚甲基蓝溶液, 脾脏显蓝色, 肝脏和胃未显色, 见图2。



图注: 图中A为正常肝脏; B为肝动脉插管成功。箭头所示为亚甲基蓝染色。

图2 SD大鼠脾动脉插管情况
Figure 2 Splenic artery intubation in the Sprague-Dawley rats

2.3 各组大鼠存活情况 移植后14 d内3组大鼠未见偏瘫、脾脏和胃黏膜坏死等并发症发生。3组大鼠生存率的比较差异有显著性意义，脾脏直接注射组14 d存活率显著高于脾动脉注射组，脾动脉注射组14 d存活率高于模型对照组；生存分析log-rank检验，差异有显著性意义($\chi^2=7.220$, $P=0.027 < 0.05$)，见图3。

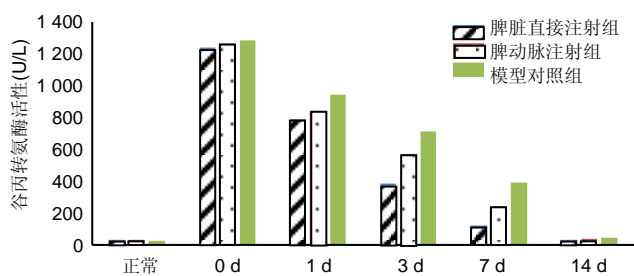


图注:脾脏直接注射组(G I)14 d存活率显著高于脾动脉注射组(G II),脾动脉注射组14 d存活率高于模型对照组(G III)。

图3 各组大鼠14 d生存曲线

Figure 3 Survival curves of acute hepatic failure rats at 14 days after transplantation

2.4 各组大鼠肝功能比较 移植前谷丙转氨酶、总胆红素水平最高，移植后1 d谷丙转氨酶、总胆红素水平两两比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。移植后3, 7 d, 脾脏直接注射组大鼠谷丙转氨酶、总胆红素水平与脾动脉注射组、模型对照组比较，差异均有显著性意义($P < 0.05$)。移植后14 d, 3组存活大鼠肝功能基本恢复正常，见图4, 5。

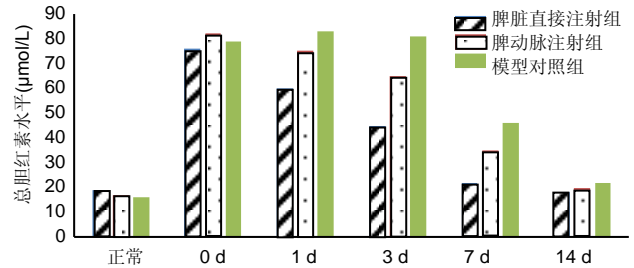


图注:移植后1 d谷丙转氨酶活性两两比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。移植后3, 7 d, 脾脏直接注射组大鼠谷丙转氨酶活性低于脾动脉注射组、模型对照组，差异均有显著性意义($P < 0.05$)。移植后14 d, 3组存活大鼠谷丙转氨酶活性基本恢复正常。

图4 各组大鼠谷丙转氨酶活性变化

Figure 4 Changes in the serum alanine aminotransferase level in acute hepatic failure rats after transplantation

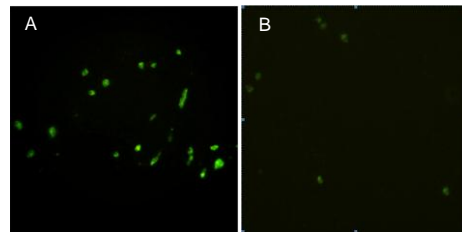
2.5 肝细胞在体内分布情况 脾动脉注射组大鼠移植后7 d, 将脾脏、肝脏、肺快速冰冻切片，通过荧光显微镜观察发现脾脏、肝脏内有散在绿色荧光标记的肝细胞，肺部未发现绿色荧光信号，见图6。



图注:移植后1 d总胆红素水平两两比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。移植后3, 7 d, 脾脏直接注射组大鼠总胆红素水平低于脾动脉注射组、模型对照组，差异均有显著性意义($P < 0.05$)。移植后14 d, 3组存活大鼠总胆红素水平恢复正常。

图5 各组大鼠总胆红素水平变化

Figure 5 Changes of the serum bilirubin level in acute hepatic failure rats after transplantation

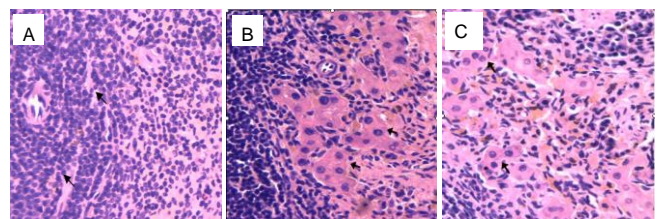


图注:图中A为脾脏内有散在绿色荧光标记的肝细胞;B为肝脏内有散在绿色荧光标记的肝细胞。

图6 移植肝细胞在脾动脉注射组大鼠体内分布情况(x200)

Figure 6 Distribution of transplanted hepatocytes in the splenic artery group (x200)

2.6 脾组织病理形态 正常脾脏进行苏木精-伊红染色，脾细胞多为单核，无明显胞浆，细胞核较小，见图7A；移植后7 d, 脾脏直接注射组大鼠脾脏红髓中发现许多胞浆较红的肝细胞，胞浆丰富，圆形或椭圆形核位于中央，还可见双核，核膜清楚，核仁一两个，与脾细胞相比，肝细胞核仁更大。肝细胞簇集在一起形成细胞群，排列整齐，在脾脏红髓内定植下来，见图7B；脾动脉注射组大鼠脾脏有散在均匀肝细胞分布，肝细胞排列紊乱，见图7C。

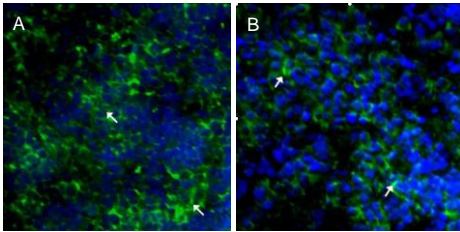


图注:图中A为正常脾脏，脾细胞多为单核，无明显胞浆，细胞核较小；B为脾脏直接注射组，肝细胞簇集在一起形成细胞群，排列整齐，在脾脏红髓内定植下来；C为脾动脉注射组，脾脏内有散在均匀肝细胞分布，肝细胞排列紊乱。箭头表示脾细胞。

图7 移植后7 d各组大鼠脾脏组织病理形态(苏木精-伊红染色, x400)

Figure 7 Pathological morphology of the rat spleen tissues in each group at 7 days after transplantation (hematoxylin-eosin staining, x400)

2.7 免疫荧光检测白蛋白表达 移植后14 d, 免疫荧光发现脾脏直接注射组、脾动脉注射组大鼠脾脏内有大量的绿色荧光信号, 表明肝细胞在脾脏内具有合成白蛋白的功能, 其中脾脏直接注射组绿色荧光信号明显强于脾动脉注射组, 见图8。



图注: 图中 A 为脾脏直接注射组; B 为脾动脉注射组。脾脏直接注射组绿色荧光信号明显强于脾动脉注射组。箭头所示白蛋白绿色荧光表达。

图 8 免疫荧光检测各组大鼠脾脏中白蛋白表达(x400)
Figure 8 Immunofluorescence detection of albumin expression in the spleen of rats in each group (x400)

3 讨论 Discussion

肝脏具有独特的组织结构和非实质细胞的相互作用, 从生理环境和细胞环境来说, 目前认为肝脏是肝细胞移植最理想的植入部位之一^[18-19]。临床上可以通过经皮门静脉直接穿刺、颈静脉插管、脐静脉、脾静脉、股静脉等途径进入门静脉移植肝细胞, 易于操作, 创伤小, 可重复操作^[18-19]。婴儿可能通过脐静脉插管途径移植肝细胞, 成人可能通过腹腔镜下门静脉直接注射移植肝细胞^[20]。在治疗代谢性肝病方面, 门静脉途径是肝细胞移植的首选途径之一^[21-22]。在治疗肝硬化和急性肝衰竭方面, 门静脉途径不作为首选移植途径^[23]。肝硬化病理结构提示肝脏纤维化和假小叶形成, 会影响移植的肝细胞进入肝窦, 从而影响肝细胞的增殖^[24]; 肝硬化常见的临床表现为门静脉高压, 如通过门静脉注射移植肝细胞, 可能加重门静脉高压, 甚至出现门静脉栓塞^[25]。急性肝衰竭的肝脏病理微环境会影响植入的肝细胞, 从而影响移植肝细胞在肝内增殖和发挥其功能, 经门静脉植入大量肝细胞还容易造成门静脉高压、血栓栓塞、加重肝性脑病或者进入体循环引起肺栓塞等并发症^[26], 因此门静脉途径不做为肝细胞移植治疗急性肝衰竭的首选途径^[27]。

Wang等^[28]通过脾动脉途径移植肝细胞治疗急、慢性肝衰竭患者, 发现肝细胞能在脾脏髓质定植、增殖, 能降低患者的死亡率和改善其肝功能, 并在脾脏肝细胞聚集地方观察到胆管网状结构。脾脏是肝移植运用较多部位之一。肝细胞移植包括脾内直接注射和脾动脉注射两种方法, 在动物模型中运用较多的是脾脏直接注射法, 而临床上运用较多的是脾动脉移植注射法^[11-12]。Nagata等^[12]研究猪脾动脉和脾内注射两种移植途径对比发现, 脾动脉移植容易造成脾脏和胃黏膜坏死, 影响移植效果, 脾内直接注射优于脾动脉途径。

实验结果显示, 脾动脉注射组与模型对照组14 d存活率差异有显著性意义, 表明经脾动脉插管移植肝细胞能提高急性肝衰竭大鼠存活率。移植后3, 7 d, 脾动脉注射组大鼠谷丙转氨酶和总胆红素水平与模型对照组比较差异有显著性意义, 表明经脾动脉移植肝细胞能明显改善急性肝衰竭大鼠的肝功能。脾脏直接注射组大鼠14 d存活率较脾动脉注射组明显提高; 移植后3, 7 d, 脾脏直接注射组大鼠的谷丙转氨酶和总胆红素水平与脾动脉注射组、模型对照组比较差异也有显著性意义; 移植后7 d, 苏木精-伊红染色发现脾脏直接注射组、脾动脉注射组肝细胞在脾脏内定植下来; 移植后14 d脾脏直接注射组、脾动脉注射组大鼠脾脏内有大量的绿色荧光信号, 表明肝细胞在脾脏内具有合成白蛋白的功能, 其中脾脏直接注射组绿色荧光信号明显强于脾动脉注射组。以上结果均能证实脾脏直接注射法肝细胞移植能改善急性肝衰竭大鼠肝功能和提高存活率, 并在治疗急性肝衰竭方面更优于脾动脉途径。

实验发现脾脏直接注射法在改变大鼠生存率和改善肝功能方面明显优于脾动脉途径, 造成这种原因可能有: ① Nordlinger等^[29]研究经猪脾动脉途径移植肝细胞发现, 脾脏直接注射法效果明显优于脾动脉插管肝细胞移植, 可能原因是由于动脉途径的肝细胞更易于经血液进入肝脏、肺部, 甚至全身各部位。肝细胞在分离过程中, 肝脏组织的血管结构破坏, 肝细胞周围的间质细胞和细胞因子丧失, 使进入肺部或其他部位的肝细胞失去其存活增殖的微环境, 仅有少部分肝细胞定植在脾脏和肝脏发挥作用^[30]; ② 脾动脉途径移植的肝细胞更有利于肝细胞定植于脾脏髓质, 有利于肝细胞的增殖和发挥其功能^[30-31]。脾动脉移植的肝细胞在血流冲击下, 与脾脏直接注射相比, 使更多的肝细胞经脾静脉进入肝脏内, 在肝脏内发现CFDA-SE标记的肝细胞得到证实。然而D-氨基半乳糖诱导大鼠急性肝衰竭后, 肝脏内的肝细胞呈一次性大面积坏死, 伴存活肝细胞严重变性, 肝窦网状支架塌陷或非完全性塌陷^[32]; 坏死组织释放各种酶及细胞内容物导致局部炎症反应; 同时正常肝细胞释放过量的细胞因子和炎症递质进一步破坏溶解肝细胞, 最终导致肝脏内环境紊乱^[33]。此时通过脾动脉移植肝细胞治疗急性肝衰竭大鼠时, 移植后的肝细胞在肝脏内受到病理微环境的影响, 只有少量的肝细胞能存活下来, 发挥功能作用, 所以影响肝细胞移植的效果^[34]。

结论: 经大鼠颈动脉途径脾动脉插管肝细胞移植能提高急性肝衰竭大鼠的存活率和改善其肝功能, 脾脏直接注射法更优于脾动脉途径。最近20年的肝细胞移植研究发现, 肝细胞移植具有短暂的有效性和安全性; 未来的挑战是如何提高移植肝细胞的有效性, 寻求新的肝细胞供体, 减少移植后肝细胞免疫损伤, 提高肝细胞的增殖能力, 这也是未来的研究方向。

作者贡献: 实验设计为冯渊, 实验实施为冯渊、杨均均, 实验评

估为李德卫,资料收集为杨均均。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金项目(81470898)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经重庆医科大学动物实验伦理委员会批准,批准号为 2017-182。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过南充市中心医院生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Newland CD. Acute Liver Failure. *Pediatr Ann*. 2016;45(12):e433-e438.
- [2] Sarin SK, Choudhury A. Acute-on-chronic Liver Failure. *Curr Gastroenterol Rep*. 2016;18(12):61.
- [3] Dhawan A. Clinical human hepatocyte transplantation: Current status and challenges. *Liver Transpl*. 2015;21 Suppl 1:S39-44.
- [4] Patel P, Okoronkwo N, Pysopoulos NT. Future Approaches and Therapeutic Modalities for Acute Liver Failure. *Clin Liver Dis*. 2018;22(2):419-427.
- [5] Thawley V. Acute Liver Injury and Failure. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2017;47(3):617-630.
- [6] Soltys KA, Setoyama K, Tafaleng EN, et al. Host conditioning and rejection monitoring in hepatocyte transplantation in humans. *J Hepatol*. 2017;66(5):987-1000.
- [7] Iansante V, Mitry RR, Filippi C, et al. Human hepatocyte transplantation for liver disease: current status and future perspectives. *Pediatr Res*. 2018;83(1-2):232-240.
- [8] Khan Z, Strom SC. Hepatocyte Transplantation in Special Populations: Clinical Use in Children. *Methods Mol Biol*. 2017;1506:3-16.
- [9] Zern MA. Cell transplantation to replace whole liver transplantation. *Gastroenterology*. 2009;136(3):767-769.
- [10] Kobayashi E, Enosawa S, Nagashima H. Experimental Hepatocyte Transplantation in Pigs. *Methods Mol Biol*. 2017;1506:149-160.
- [11] Pietrosi G, Vizzini GB, Gruttadauria S, et al. Clinical applications of hepatocyte transplantation. *World J Gastroenterol*. 2009;15(17):2074-2077.
- [12] Nagata H, Ito M, Shirota C, et al. Route of hepatocyte delivery affects hepatocyte engraftment in the spleen. *Transplantation*. 2003;76(4):732-734.
- [13] Iwase H, Liu H, Schmelzer E, et al. Transplantation of hepatocytes from genetically engineered pigs into baboons. *Xenotransplantation*. 2017;24(2): 1-22.
- [14] Soltys KA, Setoyama K, Tafaleng EN, et al. Host conditioning and rejection monitoring in hepatocyte transplantation in humans. *J Hepatol*. 2017;66(5):987-1000.
- [15] Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol*. 1976;13:29-83.
- [16] 冯渊,李德卫,杨晓波,等.原发肝细胞的分离和移植[J].中国组织工程研究,2012,16(18):3314-3317.
- [17] 冯渊,李德卫,杨均均,等.经大鼠脾动脉行肝细胞移植建立动物模型[J].复旦学报(医学版),2012,39(6):653-657.
- [18] Puppi J, Strom SC, Hughes RD, et al. Improving the techniques for human hepatocyte transplantation: report from a consensus meeting in London. *Cell Transplant*. 2012;21(1):1-10.
- [19] Hansel MC, Gramignoli R, Skvorak KJ, et al. The history and use of human hepatocytes for the treatment of liver diseases: the first 100 patients. *Curr Protoc Toxicol*. 2014;62: 14.12.1-14.12.23.
- [20] Kluge M, Reutzel-Selke A, Napierala H, et al. Human Hepatocyte Isolation: Does Portal Vein Embolization Affect the Outcome. *Tissue Eng Part C Methods*. 2016;22(1):38-48.
- [21] Moris D, Vernadakis S, Papalampros A, et al. Mechanistic insights of rapid liver regeneration after associating liver partition and portal vein ligation for stage hepatectomy. *World J Gastroenterol*. 2016;22(33):7613-7624.
- [22] Dagher I, Boudechiche L, Branger J, et al. Efficient hepatocyte engraftment in a nonhuman primate model after partial portal vein embolization. *Transplantation*. 2006;82(8):1067-1073.
- [23] Timm F, Vollmar B. Heterogeneity of the intrahepatic portal venous blood flow: impact on hepatocyte transplantation. *Microvasc Res*. 2013;86:34-41.
- [24] Strom SC, Chowdhury JR, Fox IJ. Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease. *Semin Liver Dis*. 1999;19(1): 39-48.
- [25] Dhawan A, Puppi J, Hughes RD, et al. Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;7(5):288-298.
- [26] Ho CM, Chen YH, Chien CS, et al. Transplantation speed offers early hepatocyte engraftment in acute liver injured rats: A translational study with clinical implications. *Liver Transpl*. 2015; 21(5):652-661.
- [27] Bilir BM, Guinette D, Karrer F, et al. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl*. 2000;6(1):32-40.
- [28] Wang F, Zhou L, Ma X, et al. Monitoring of intrasplenic hepatocyte transplantation for acute-on-chronic liver failure: a prospective five-year follow-up study. *Transplant Proc*. 2014;46(1):192-198.
- [29] Nordlinger B, Bouma ME, Wang SR, et al. High-yield preparation of porcine hepatocytes for long survival after transplantation in the spleen. *Eur Surg Res*. 1985;17(6):377-382.
- [30] Fox IJ, Roy-Chowdhury J. Hepatocyte transplantation. *J Hepatol*. 2004;40(6):878-886.
- [31] Gäbelein G, Nüssler AK, Morgott F, et al. Intrasplenic or subperitoneal hepatocyte transplantation to increase survival after surgically induced hepatic failure. *Eur Surg Res*. 2008;41(3): 253-259.
- [32] Koblíhová E, Lukšan O, Mrázová I, et al. Hepatocyte transplantation attenuates the course of acute liver failure induced by thioacetamide in Lewis rats. *Physiol Res*. 2015;64(5):689-700.
- [33] 李宏涛,陈国民. D-氨基半乳糖研究的回顾和展望[J].肝脏, 2004, 9(3):209-210.
- [34] 冯渊,李德卫,杨晓波,等.经颈动脉途径肝动脉插管及脾内注射肝细胞移植治疗急性肝衰大鼠的疗效比较[J].重庆医科大学学报, 2012, 37(1):84-88.