

# 倒千里光碱处理 SD 大鼠永生生化肝细胞同种脾内移植增殖实验研究

巴明臣<sup>1</sup> 袁晓东<sup>2</sup> 陈积圣<sup>1</sup> 袁丽<sup>1</sup> 中山大学孙逸仙纪念医院<sup>1</sup> 普外科袁林佰欣医学实验中心袁广东 广州 510120 袁

**摘要**目的 探讨倒千里光碱( retrorsine, Rts) 处理对 SD 大鼠永生生化肝细胞同种脾内移植增殖效率的影响遥 方法 SV40T 抗原转染法制备永生生化肝细胞遥 成熟 SD 大鼠 24 只随机分为 A、B、C 3 组遥 A 组为 Rts 处理 SD 大鼠永生生化肝细胞移植组遥 B 组为 Rts 处理 SD 大鼠正常肝细胞移植组遥 C 组为正常 SD 大鼠永生生化肝细胞移植组遥 A、B 两组 SD 大鼠分 2 次腹腔注射 Rts 遥 间隔 2 周遥 第 2 次注射 Rts 4 周后备用遥 0% 肝叶切除后袁 组 SD 大鼠分别行永生生化肝细胞移植或肝细胞移植遥 常规病理切片检查脾内移植永生生化肝细胞增殖效率遥 免疫组化检测脾脏内移植永生生化肝细胞白蛋白表达遥 透射电镜检测移植永生生化肝细胞形态遥 结果 病理检查显示袁 肝细胞移植后 3 周内袁 组 SD 大鼠脾脏内均可见移植肝细胞遥 免疫组化结果显示袁 组 SD 大鼠脾脏实质内均可见散在棕黄色白蛋白颗粒遥 袁 组大鼠脾脏内肝细胞面数密度与 B 组比较无显著差异遥 袁 但与 C 组有显著差异遥 透射电镜检测结果显示袁 脾内移植永生生化肝细胞具有正常肝细胞的超微结构遥 结论 脾内移植永生生化肝细胞具有正常肝细胞的形态结构及白蛋白表达功能遥 Rts 可促进永生生化肝细胞 SD 大鼠脾脏内移植的增殖效率遥

**关键词**永生生化肝细胞白蛋白表达 倒千里光碱 肝细胞移植

中图分类号 R322.47;R329.25 文献标识码 文章编号 000-2588(2003)06-0546-03

## Proliferation of retrorsine-treated SD rat immortalized hepatocytes after intrasplenic transplantation

BAMing-chen<sup>1</sup>, ZHOUXiao-dong<sup>2</sup>, CHENJi-sheng<sup>1</sup>, LIULi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of General Surgery, <sup>2</sup>Medical Centre of Linbaixin, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Science, Guangzhou 510120, China

**Abstract:** Objective To investigate the effect of retrorsine on the proliferation of SD rat immortalized hepatocytes after intrasplenic transplantation. Methods Immortalized hepatocytes from SD rats was prepared by transfecting the primary hepatocytes with a retroviral vector SSR69 expressing the gene encoding Simian virus 40 T large antigen. Twenty-four adult SD rats were randomly assigned to 3 equal groups designated respectively as A, B, and C groups. Intraperitoneal retrorsine injections at the dose of 26 mg/kg s.c. were performed twice in groups A and B at the interval of two weeks before hepatocyte transplantation. After 20% hepatic loberection were completed in all the groups, groups A and C received intrasplenic transplant with immortalized hepatocytes, while group B received normal hepatocyte transplant. Post-mortem examinations were performed on the spleen samples with HE staining. Albumin expression in the transplanted hepatocytes was examined by immunohistochemical staining, and the ultrastructure of the transplanted cells was observed under transmission electron microscope. Results Histological examination demonstrated that the rats spleen in all the 3 groups contained cluster of transplanted hepatocytes from 1 week to 3 weeks after the transplantation, and the proliferation of the transplanted cells were comparable between groups A and B, but both of which showed significant difference from group C. Albumin excretion by the immortalized hepatocyte was identified in all the groups, and the transplanted immortalized cells preserved normal cell ultrastructure. Conclusion Immortalized hepatocytes of SD rats have the normal cell ultrastructure and albumin-excretion function, and retrorsine can promote the proliferation of the transplanted hepatocytes.

**Key words:** immortalized hepatocytes; albumin expression; retrorsine; hepatocyte transplantation

### 肝细胞移植因存在供体来源缺乏 移植肝细胞增

殖缓慢等问题袁 临床应用受到限制遥 永生生化肝细胞移植是解决供体肝细胞来源缺乏及不能冷冻保存供临床随时应用的重要方法遥 倒千里光碱( retrorsine, Rts) 抑制宿主肝细胞增殖袁 是解决移植肝细胞增长缓慢的重要手段遥 本实验旨在对 Rts 处理 SD 大鼠永生生化肝细胞同种脾内移植增殖效率作一探讨遥

收稿日期 2003-03-01

基金项目 国家自然科学基金 000096060 袁 广东省重大科技攻关项目 2KM05402S 袁 广东省自然科学基金 001358 袁

Supported by National Natural Science Foundation of China (700096060), Key Sci-tech Research Project of Guangdong Province (2KM05402S) and Natural Science Foundation of Guangdong Province (001358)

作者简介 巴明臣 1969 年男 河南周口人 袁 2002 年毕业于中山大学袁 博士袁 副主任医师袁 电话 3650990351

### 1 材料和方法

#### 1.1 永生生化肝细胞的制备

改良 Selgen 法分离肝细胞<sup>[1]</sup>含 SV40T 抗原转染法制备永生生化肝细胞<sup>[2]</sup>含 SV40T 抗原的 SSR69 质粒<sup>[3]</sup>美国麻省理工大学 Karen Westerman 博士惠赠<sup>[4]</sup>热冲击法转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌<sup>[5]</sup>质粒纯化试剂盒<sup>[6]</sup>美国 Promega 公司<sup>[7]</sup>转染脂质体转染试剂盒<sup>[8]</sup>美国 CLONtech 公司<sup>[9]</sup>转染 PA317 包装细胞<sup>[10]</sup>制备 SSR69 缺陷逆转录病毒<sup>[11]</sup>转染分离肝细胞<sup>[12]</sup>潮霉素<sup>[13]</sup>美国 Sigma 公司<sup>[14]</sup>筛选阳性克隆<sup>[15]</sup>扩增后冷冻保存备用<sup>[16]</sup>

### 1.2 实验分组

成熟 SD 大鼠<sup>[17]</sup>中山大学动物实验中心提供<sup>[18]</sup>4 只<sup>[19]</sup>随机分为 A 组<sup>[20]</sup>3 组<sup>[21]</sup>每组 8 只<sup>[22]</sup>组为 Rts 处理 SD 大鼠永生生化肝细胞移植组<sup>[23]</sup>组为 Rts 处理 SD 大鼠正常肝细胞移植组<sup>[24]</sup>组为正常 SD 大鼠永生生化肝细胞移植组<sup>[25]</sup>A 组<sup>[26]</sup>两组 SD 大鼠分 2 次腹腔注射 Rts<sup>[27]</sup>6 mg/kg<sup>[28]</sup>b.w.<sup>[29]</sup>间隔 2 周<sup>[30]</sup>第 2 次注射 Rts<sup>[31]</sup>美国 Sigma 公司<sup>[32]</sup>周后备用<sup>[33]</sup>遥 C 组 SD 大鼠不作处理<sup>[34]</sup>

### 1.3 肝细胞移植

暂时阻断脾蒂血液回流<sup>[35]</sup>组 SD 大鼠 5 号小儿头皮静脉针脾内注射永生生化肝细胞或肝细胞悬液<sup>[36]</sup>

只 SD 大鼠细胞总数<sup>[37]</sup>2伊<sup>[38]</sup>0<sup>[39]</sup>袁压迫注射部位阻止移植肝细胞溢漏<sup>[40]</sup>遥分别于移植后 1<sup>[41]</sup>尧尧尧<sup>[42]</sup>周处死动物<sup>[43]</sup>尧尧尧<sup>[44]</sup>次 2 只<sup>[45]</sup>尧尧尧<sup>[46]</sup>切除脾脏保存<sup>[47]</sup>尧尧尧<sup>[48]</sup>检遥

### 1.4 实验结果检测

免疫组化检测受体脾脏内肝细胞白蛋白表达<sup>[49]</sup>尧尧尧<sup>[50]</sup>像分析系统检测移植后阳性细胞面数密度<sup>[51]</sup>遥

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS 8.0 统计学软件<sup>[52]</sup>包行方差分析<sup>[53]</sup>袁两两比较用 SNK 法<sup>[54]</sup>遥

## 2 结果

### 2.1 HE 染色结果

肝细胞及永生生化肝细胞移植后 1~3 周<sup>[55]</sup>袁组受体脾脏内均可见移植的供体肝细胞<sup>[56]</sup>袁分散在脾脏红髓中<sup>[57]</sup>尧尧尧<sup>[58]</sup>数个细胞成簇状<sup>[59]</sup>尧尧尧<sup>[60]</sup>索状或假小叶状分布<sup>[61]</sup>尧尧尧<sup>[62]</sup>成熟肝细胞较脾脏内其他细胞体积大<sup>[63]</sup>袁细胞之间边界不清<sup>[64]</sup>袁形态不一<sup>[65]</sup>尧尧尧<sup>[66]</sup>核质比例高<sup>[67]</sup>尧尧尧<sup>[68]</sup>胞核较大呈圆形或椭圆形<sup>[69]</sup>尧尧尧<sup>[70]</sup>染色较淡<sup>[71]</sup>尧尧尧<sup>[72]</sup>胞质丰富<sup>[73]</sup>尧尧尧<sup>[74]</sup>胞核清楚<sup>[75]</sup>尧尧尧<sup>[76]</sup>染色较淡<sup>[77]</sup>尧尧尧<sup>[78]</sup>偏向一侧<sup>[79]</sup>尧尧尧<sup>[80]</sup>1 尧尧尧<sup>[81]</sup>移植 4 周后<sup>[82]</sup>袁组大鼠脾脏内肝细胞偶尔可见<sup>[83]</sup>遥

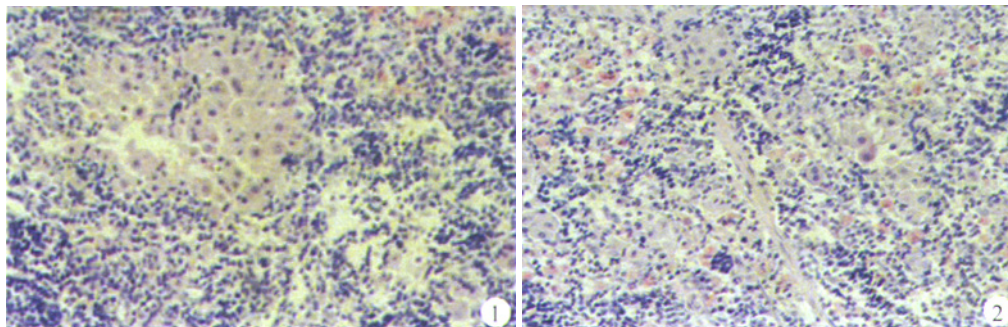


图 1 Rts 处理的 SD 大鼠永生生化肝细胞脾脏内移植 1 周后的增殖状态<sup>[84]</sup>尧尧尧<sup>[85]</sup>HE 染色<sup>[86]</sup>尧尧尧<sup>[87]</sup>原放大倍数<sup>[88]</sup>100 尧尧尧<sup>[89]</sup>尧尧尧<sup>[90]</sup>  
Fig.1 Proliferation ability of immortalized hepatocytes 1 week after transplantation in retrorsine-treated SD rat spleen (HE staining, original magnification: 100)

Pseudolobular structure can be seen

图 2 Rts 处理的 SD 大鼠肝细胞脾脏内移植 1 周后的增殖状态<sup>[91]</sup>尧尧尧<sup>[92]</sup>HE 染色<sup>[93]</sup>尧尧尧<sup>[94]</sup>原放大倍数<sup>[95]</sup>100 尧尧尧<sup>[96]</sup>尧尧尧<sup>[97]</sup>  
Fig.2 Proliferation ability of normal hepatocytes 1 week after transplantation in retrorsine-treated SD rat spleen (HE staining, original magnification: 100)

Hepatic cluster structure can be seen

### 2.2 免疫组化检测结果

3 组受体脾脏内均可见散在细胞内棕黄色白蛋白染色颗粒<sup>[98]</sup>遥

### 2.3 图像分析供体肝细胞脾内移植后增殖的面数密度结果<sup>[99]</sup>表 1 尧尧尧

肝细胞移植后 1 尧尧尧<sup>[100]</sup>尧尧尧<sup>[101]</sup>周<sup>[102]</sup>袁组与 B 组 SD 大鼠脾脏内肝细胞面数密度无明显差异<sup>[103]</sup>尧尧尧<sup>[104]</sup>尧尧尧<sup>[105]</sup>移植后 1 尧尧尧<sup>[106]</sup>尧尧尧<sup>[107]</sup>周<sup>[108]</sup>袁组与 C 组 SD 大鼠脾脏内肝细胞面数密度有显著差异<sup>[109]</sup>尧尧尧<sup>[110]</sup>尧尧尧<sup>[111]</sup>肝细胞移植 4 周后<sup>[112]</sup>袁组 SD 大鼠脾脏内肝细胞面数密度比较<sup>[113]</sup>尧尧尧<sup>[114]</sup>无明显差异<sup>[115]</sup>尧尧尧<sup>[116]</sup>尧尧尧<sup>[117]</sup>

表 1 各组大鼠移植后不同时间的增殖状态比较<sup>[118]</sup>尧尧尧<sup>[119]</sup>面数密度<sup>[120]</sup>尧尧尧

Tab.1 Comparison of the proliferation ability of the hepatocytes at different time periods after transplantation in different groups (Na)

Group	Time after transplantation			
	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
A	675.36*	577.29*	533.83*	37.21
B	685.27*	539.46*	497.57*	48.56
C	427.26	389.43	244.25	27.56

\* P<0.05 vs group C

### 2.4 透射电镜观察结果

脾脏移植的永生化肝细胞具有正常肝细胞的超微结构

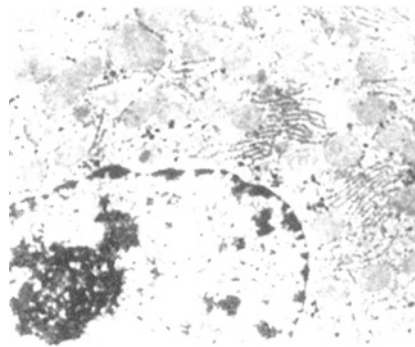


图 3 脾脏内移植永生化肝细胞的超微结构

Fig.3 Ultrastructure of transplanted immortalized hepatocyte (Original magnification: 伊 2000)

Chondriosome, endoplasmic reticulum and nucleolus can be seen



图 4 脾脏内移植肝细胞的超微结构

Fig.4 Ultrastructure of transplanted normal hepatocyte (Original magnification: 伊 2000)

Chondriosome, endoplasmic reticulum and nucleolus can be seen

### 3 讨论

国外学者对肝细胞移植治疗急慢性肝功能衰竭、肝脏先天性代谢性疾病等终末性肝脏疾病进行了系统研究，展示了其临床应用前景。但肝细胞移植存在供体缺乏、肝细胞不能冷冻保存、移植肝细胞增殖缓慢等问题，限制了其临床应用。

表达不耐热的 SV40T 抗原变异基因逆转录病毒载体 SSR69 转染至大鼠肝细胞内，在 33 益条件下培养分化增殖。但在 37~39 益情况下，变异 T 抗原基因失活，基因修饰肝细胞停止扩增，表现为成熟肝细胞。成年机体肝脏大小基本固定，宿主肝细胞优先占据了肝脏再生增殖空间，移植肝细胞失去了原来赖以生存的微环境及与其他肝实质细胞相互作用，缺乏应有的增殖环境，导致移植肝细胞增殖缓慢及增殖能力受限。为解决移植肝细胞增殖缓慢问题，国内外学者进行了卓有成效的探索，并取得了可喜成就。

增强肝细胞增殖能力，通过肝叶切除提供移植肝细胞再生或增殖空间。应用药物如 Rts、丝裂霉素等，抑制宿主肝细胞分裂增殖，改善移植肝细胞生存微环境。如应用外源性肝细胞生长因子刺激肝细胞 DNA 复制，促进肝细胞分裂增殖及其功能基因表达。应用外源性表皮样细胞生长因子作用于肝内血管内皮细胞，促进血管再生和新生血管形成，从而促进肝细胞分裂增殖。

本实验应用 SV40T 抗原转染法制备的永生化肝细胞具有分裂增殖能力，冷冻保存复苏后存活率达 80% 以上，增殖后可随时供实验应用。Rts 能与肝细胞核内的 DNA 结合，抑制宿主肝细胞分裂增殖。在应激、外界刺激等状态下不能代偿性增生，且 Rts 与 DNA 结合后解离缓慢，短时间内肝细胞的增殖能力不能恢复。应用 Rts 抑制宿主肝细胞分裂增殖能力，在 SD 大鼠肝细胞增殖能力完全被 Rts 抑制、Rts 完全排出后切除 SD 大鼠部分肝叶，为移植肝细胞提供适宜的增殖空间，刺激移植肝细胞增殖。本研究结果表明，Rts 可促进永生化肝细胞 SD 大鼠脾脏内移植后的增殖效果。病理结果显示，与正常肝细胞一样，永生化肝细胞能够在大鼠脾脏内分裂增殖，存活 1 月左右，逐渐凋亡。其增殖效果与正常肝细胞相同。免疫组化结果显示，永生化肝细胞 Rts 处理 SD 大鼠脾内移植后与正常肝细胞同样可在宿主脾脏内表达白蛋白。电镜检测结果显示，在 SD 大鼠脾脏内，永生化肝细胞具有与正常肝细胞一样的超微结构。表明脾内移植永生化肝细胞具有正常肝细胞的功能，能够为急慢性肝功能衰竭、肝脏先天性代谢性疾病等终末性肝脏疾病提供代谢支持。

自肝细胞移植基础研究开始，移植部位的选择就是首先考虑的问题之一。本实验选择脾脏作为肝细胞移植的部位，只是便于对移植肝细胞分化、增殖、存活状况进行观察。肝细胞与其他非肝实质细胞、胆管上皮细胞间的信号传导是维持正常肝细胞功能的基础。胆汁排泄通路也是脾脏内肝细胞移植不可回避的问题。本实验脾内移植肝细胞只能存在 4 周左右，除生存微环境改变致移植肝细胞凋亡外，缺少胆汁排泄通路也是主要原因之一。因此，脾内肝细胞移植并不是肝细胞移植最合适的部位。

基因治疗均存在致癌、致畸、致突变问题。SV40T 抗原基因制备永生化肝细胞同样存在这一问题。由于人体内存在 3 万个以上的基因组，各基因及其产物之间的信号传导相互影响，相互作用错综复杂。自从应用 SV40T 抗原基因制备永生化细胞开始，国内外学者一直对其临床应用的安全性进行不断的探索。

白蛋白占菌体总蛋白的 5%。各菌株间尿素酶基因相对保守,同源性在 95% 以上。应用噬菌体文库筛选发现 *UreB* 为 Hp 重要的保护性抗原,具有被动保护作用的抗 Hp 单克隆抗体也证实就是针对 Hp/Hf 的尿素酶。因此尿素酶是最被看好的疫苗候选抗原。尿素酶由 A 和 B 两种单位组成,完整的具有活性的尿素酶作为疫苗对机体具有一定的毒副作用,而其亚单位不具有尿素酶活性,但同样具有免疫活性。尤其是 *UreB* 具有更好的保护作用。本研究利用基因工程技术在大肠杆菌中获得了 *UreB* 的高效表达,发展 Hp *UreB* 疫苗奠定了一定的基础。

### 3.2 rUreB 的理化性质

本研究结果显示 *UreB* 的相对分子质量约为 62 000,氨基酸组成成分与理论预测值一致。*UreB* 的 N 端 15 个氨基酸序列与预测值完全一致。*UreB* 与 GenBank 公布的 5 株 Hp 中 *UreB* 的氨基酸序列相似度非常高,达 99.5%。通过这些可以推测 r*UreB* 可能具有与天然 Hp *UreB* 相同的生物学性质。

### 3.3 rUreB 的免疫学性质

r*UreB* 注射免疫 BalB/c 小鼠,ELISA 证实其能刺激机体产生抗原特异的抗体,表现出良好的免疫原性。同时产生的抗体能与不同的 Hp 菌发生抗原抗体反应,表明此 r*UreB* 具有与天然 Hp *UreB* 相同的免疫学性质。这就为 r*UreB* 作为 Hp 疫苗成分奠定了免疫学基础。同时 r*UreB* 还可用作包被抗原建立检测 Hp *UreB* 特异性抗体的酶联免疫方法。

## 参考文献

### 连接 548 页

一种方法是把编码 T 抗原的基因片段插入到 *LoxP* 基因位点之间,以便发生恶性转化时用 Cre 重组酶切割,使 T 抗原基因失活。另一种方法是把自杀基因整合到永生生化肝细胞内,一旦发生恶性转化,用前体药物将其杀灭。本实验所用 SSR69 质粒内 T 抗原的基因片段插入在 *LoxP* 基因位点之间,且其内整合有自杀基因 TK,为防止其恶性转化提供了有效的预防措施。

总之,本研究能抑制宿主肝细胞分裂,在肝叶切除时为移植永生生化肝细胞提供适宜的增殖空间,促进脾内移植永生生化肝细胞增殖,为肝细胞移植供体缺乏、移植肝细胞增殖缓慢问题的解决提供了有效方法。但 Rts 毒副作用较大,临床应用尚有一段距离。

## 参考文献

1. Roger AF, James PE, Jeremy MH, et al. Epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Br Med Bull*, 1998, 54(1): 39-54.
2. 范学工, 夏华向. 幽门螺杆菌感染重要基础与临床. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1997. 20-5.
3. 胡伏莲, 周殿元, 贾博琦. 幽门螺杆菌感染的基础与临床. 北京: 科学出版社, 2002. 382-90.
4. Czinn SJ, Cai A, Nedrud JG, et al. Oral immunization against *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*, 1991, 59(7): 2359-63.
5. Cortes TI, Porta N, Glauser M, et al. Oral immunization with *Helicobacter pylori* urease B subunit as treatment against *Helicobacter* infection in mice. *Gastroenterology*, 1995, 109(1): 115-21.
6. 丁磊, 萨姆布鲁克, 瓦里奇, 瓦尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992. 34-55.
7. 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999. 136-8.
8. 瓦奥斯拉, 瓦布伦特, 瓦金斯敦, 颜子颖, 王海林. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1997. 358-60.
9. 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998. 16-8.
10. Raghavan S, Hjulstrom M, Holmgren J, et al. Protection against experimental *Helicobacter pylori* infection after immunization with inactivated *H. pylori* whole-cell vaccines. *Infect Immun*, 2002, 70(11): 6383-8.
11. Gomez-Duarte OG, Bumann D, Meyer TF. The attenuated *Salmonella* vaccine approach for the control of *Helicobacter pylori*-related diseases. *Vaccine*, 1999, 17(13-14): 1667-73.
12. Roth KA, Kapadia SB, Martin SM, et al. Cellular immune responses are essential for the development of *Helicobacter felis*-associated gastric pathology. *Immunol*, 1999, 163(3): 1490-7.
13. Mohammadi M, Czinn S, Redline R, et al. *Helicobacter*-specific cell-mediated immune responses display a predominant Th1 phenotype and promote a delayed-type hypersensitivity response in the stomachs of mice. *Immunol*, 1996, 156(12): 4729-38.
14. Kobayashi N, Miyazaki M, Fukaya K, et al. Transplantation of highly differentiated immortalized human hepatocytes to treat acute liver failure. *Transplantation*, 2000, 69(2): 202-7.
15. Kobayashi N, Fujiwara T, Westerman KA, et al. Prevention of acute liver failure in rats with reversibly of immortalized human hepatocytes. *Science*, 2000, 287(5456): 1258-62.
16. Laconi S, Curreli F, Diana S, et al. Liver regeneration in response to partial hepatectomy in rat treated with retrorsine: a kinetic study. *Hepatology*, 1999, 31(6): 1069-74.
17. Strom SC, Fisher RA, Thompson MT, et al. Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation*, 1997, 63(4): 559-69.
18. Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, et al. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med*, 1998, 338(20): 1422-6.
19. Muraca M, Gerunda G, Neri D, et al. Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type Ia. *Lancet*, 2002, 359(9303): 317-8.