

L02细胞在倒千里光碱处理大鼠肝中的增殖

林沪, 毛青, 王宇明, 蒋业贵, 蒋黎

■背景资料

移植细胞在人鼠嵌合肝内的增殖是其存活及发挥功能的关键, 要建立稳定持久的人鼠嵌合肝动物模型, 必须提高移植细胞的增殖能力。本文课题组曾实验肝脏毒性药物2-乙酰氨基酚与部分肝切除术(2-AAF/PH)联合, 证实2-AAF/PH模型中, 2-AAF对移植L02细胞无明显增殖作用; L02细胞在2-AAF/PH处理人鼠嵌合肝动物模型中存活10 wk。

林沪, 毛青, 王宇明, 蒋业贵, 蒋黎, 中国人民解放军第三军医大学西南医院感染病研究所 重庆市 400038
林沪, 硕士, 主治医师, 主要从事肝炎发病机制和病毒性肝炎动物模型的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30271173

通讯作者: 毛青, 400038, 重庆市沙坪坝区高滩岩正街30号, 中国人民解放军第三军医大学西南医院感染病研究所。

qingmao@yahoo.com

电话: 023-65399064 传真: 023-68754475

收稿日期: 2006-11-20 接受日期: 2006-12-08

Repopulation of human L02 hepatocytes in tolerant rats treated with retrorsine

Hu Lin, Qing Mao, Yu-Ming Wang, Ye-Gui Jiang, Li Jiang

Hu Lin, Qing Mao, Yu-Ming Wang, Ye-Gui Jiang, Li Jiang, Institution of Infectious Diseases, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30271173

Correspondence to: Qing Mao, Institution of Infectious Diseases, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, 30 Gaotanyan Center Street, Shapingba District, Chongqing 400038, China. qingmao@yahoo.com

Received: 2006-11-20 Accepted: 2006-12-08

Abstract

AIM: To investigate whether human L02 hepatocytes can repopulate after transplantation into the normal and immunocompetent rats treated with retrorsine.

METHODS: Human L02 hepatocytes were injected into the peritoneal cavities of fetal Sprague Dawley rats to induce immune tolerance. The 3-week-old rats were injected with retrorsine or normal saline. After DiI (1, 1'-dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) staining, L02 hepatocytes were transplanted into the 7-week-old rats via the spleen. Immunofluorescent staining, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), S-P immunohistochemistry, and DiI staining were used to detect human albumin, human albumin mRNA and specific proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in rat livers. The distribution of human L02 hepatocytes was observed under fluores-

cent microscope. The number density and area density of PCNA were obtained with the help of computer-assisted image analyzer.

RESULTS: Dynamic distribution of human L02 hepatocytes in rat livers was observed from the 1st week to 6th month after transplantation, but it was from the 1st to 10th week in the controls. Human albumin and albumin mRNA (241 bp) were detected from the 2nd week to the 6th month after transplantation, but they could only be detected from the 1st to 8th week in the controls. The highest expression of human albumin and albumin mRNA appeared at the 4th week. Specific human PCNA was detected in rat livers from the 2nd week to the 6th month after transplantation, but it could only be examined from the 2nd to 6th week in the controls. The number of PCNA-positive cells reached the peak at the 4th week. The number density and area density of PCNA were significantly different between specific PCNA group and its control group ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Retrorsine is able to promote the repopulation of transplanted human L02 hepatocytes, and L02 hepatocytes can survive more than 6 months, and repopulate at the same time.

Key Words: Hepatocytes; Chimeric liver; Transplantation; Repopulation; Rats; Retrorsine

Lin H, Mao Q, Wang YM, Jiang YG, Jiang L. Repopulation of human L02 hepatocytes in tolerant rats treated with retrorsine. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(4):346-352

摘要

目的: 应用倒千里光碱(retrorsine, Rts), 研究正常人L02肝细胞移植到具有正常免疫活性的大鼠肝内的存活与增殖情况。

方法: SD大鼠出生前宫内ip人L02肝细胞, 诱导胎鼠对人L02肝细胞产生免疫耐受, 出生3 wk后分别ip Rts或生理盐水, 再经脾移植DiI (1, 1'-dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate)染色后的人L02

肝细胞,建立人鼠嵌合肝动物模型.采用免疫荧光、逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)、免疫组化、DiI荧光示踪等方法,在不同时相分别检测人白蛋白、人白蛋白mRNA、特异性人增殖细胞核抗原(PCNA)以及在荧光显微镜下观察人L02肝细胞在鼠肝内的分布,并采用计算机图像分析系统分析不同时相PCNA阳性细胞的数密度和面积密度.

结果:实验组于移植后1 wk-6 mo,在荧光显微镜下观察到人L02肝细胞在鼠肝内的动态分布,而对照组为移植后1-10 wk;实验组移植后2 wk-6 mo,大鼠检测出人白蛋白、人白蛋白mRNA及特异性人增殖细胞核抗原PCNA,而对照组分别于移植后2-8 wk检测出人白蛋白及人白蛋白mRNA,移植后2 wk-6 mo检测出特异性人PCNA.以上各组阳性细胞的出现均以移植4 wk最多. PCNA阳性细胞的数密度和面积密度均显示,特异性人PCNA组与其对照组比较有统计学差异($P<0.05$).

结论:Rts对移植L02细胞有明显的增殖作用, L02细胞在人鼠嵌合肝动物模型中存活并增殖6 mo以上.

关键词:肝细胞;嵌合肝;移植;大鼠;增殖;倒千里光碱

林沪,毛青,王宇明,蒋业贵,蒋黎. L02细胞在倒千里光碱处理大鼠中的增殖. 世界华人消化杂志 2007;15(4):346-352
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/346.asp>

0 引言

直接给予受体鼠移植人肝细胞,移植细胞的存活数量与时间很有限,移植细胞在受体肝内的增殖是其存活及发挥功能的关键,要建立稳定持久的人鼠嵌合肝动物模型,必须提高移植细胞的增殖能力^[1].研究认为,移植细胞要大量增殖,必须满足两个条件:移植肝细胞有更强的生长优势;受体细胞的更新必须超过正常肝细胞更新水平,二者相辅相成的^[2].前者常用肝脏毒性药物:倒千里光碱(retrorsine, Rts)、2-AAF等^[3-6],阻断受体肝细胞进入再生周期;后者常采用四氯化碳、2/3肝切除等^[7-9]再生刺激作用,二者共同促进移植肝细胞增殖.倒千里光碱与部分肝切除术(retrorsine/partial hepatectomy, Rts/PH)联合应用,是移植肝细胞增殖常用模式^[10].部分肝切除术给予嵌合肝再生刺激,提高受体细胞的更新水平,倒千里光碱强烈而持续阻断

宿主肝细胞增殖的细胞周期,而移植肝细胞增殖的细胞周期却不受影响,使移植肝细胞有更强的生长优势,其具体机制尚不清楚.二者共同促进移植肝细胞增殖.我们将诱导免疫耐受的大鼠ip Rts, 2 wk后行2/3肝切除术,同时经脾移植DiI (1, 1'-dioctadecyl-3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate)染色后的L02细胞,建立Rts/PH肝细胞增殖模型;采用免疫荧光、RT-PCR、免疫组化、DiI荧光示踪以及计算机图像分析系统等方法,检测嵌合于具有正常免疫活性大鼠肝内人L02细胞的存活、增殖情况.

1 材料和方法

1.1 材料 生育期SD大鼠6只,购自第三军医大学实验动物中心.选择大鼠孕龄15-17 d,体质量250-300 g者为实验对象. L02细胞属于人正常肝细胞,购自中国科学院上海细胞生物研究所.加入胰酶酶解后,重新混悬.血细胞计数板计算肝细胞的数量,台盼蓝拒染法计算存活率,超过80%的用于实验.

1.2 方法

1.2.1 模型的制备与分组 孕龄15-17 d的SD大鼠乙醚吸入麻醉,孕鼠腹白线逐层剪开,暴露子宫. 1 mL注射器将50 μ L人L02细胞培养液(含 1×10^8 个细胞)缓慢经孕鼠子宫壁注射到胎鼠腹腔,逐层缝合.至孕鼠自然生产.药物配制的方法见参考文献[11].孕鼠随机分2组,产胎鼠各约30只:免疫耐受胎鼠出生3 wk和5 wk腹腔内各注射Rts 30 mg/(kg·只);对照组:免疫耐受鼠出生3 wk和5 wk腹腔内各注射生理盐水,其余与药物组同.出生7 wk,两组大鼠乙醚麻醉下行2/3肝切除并经脾移植已标记DiI的L02肝细胞培养液100 μ L(浓度为 10^{12} /L以上). 2/3肝切除术:大鼠在乙醚吸入麻醉下,腹白线暴露肝脏,用细丝线分别结扎左前叶、右前叶、右后叶及尾叶后切除,保留肝中叶,腹腔青霉素抗炎. DiI荧光染色:具体方法见参考文献[12],标记细胞经4 g/L台盼蓝染色计数后,用PBS液调整细胞浓度为 1.0×10^{12} /L;于荧光显微镜(日本Olympus公司)诺丹明滤片下进行荧光观察并照相. L02细胞移植:出生7 wk实验组胎鼠,乙醚吸入麻醉,孕鼠腹白线逐层剪开,暴露脾,自脾系膜缘进针,向脾体和脾尾方向,将100 μ L经DiI染色的L02细胞培养液缓慢注入,轻压注射点,防止出血和渗液.标本收集: L02细胞移植后wk 1取标本, wk 2开始每2 wk取一次,至wk 8后按移植后4 mo, 6 mo取材.

■ 研发前沿

倒千里光碱与部分肝切除术(Rts/PH)联合应用,是移植肝细胞增殖常用模式. PH给予嵌合肝再生刺激,而Rts使移植肝细胞有选择性生长优势,其具体机制尚不清楚.

■创新盘点

在具有正常免疫活性的人鼠嵌合肝模型基础上,应用倒千里光碱提高移植细胞增殖能力;采用多样化检测手段:DiI动态示踪、免疫荧光、免疫组化及RT-PCR,证实移植细胞在嵌合肝中的生物学功能及增殖能力;计算机细胞图像定量分析PCNA数密度和面积密度,反映了移植细胞的增殖情况。

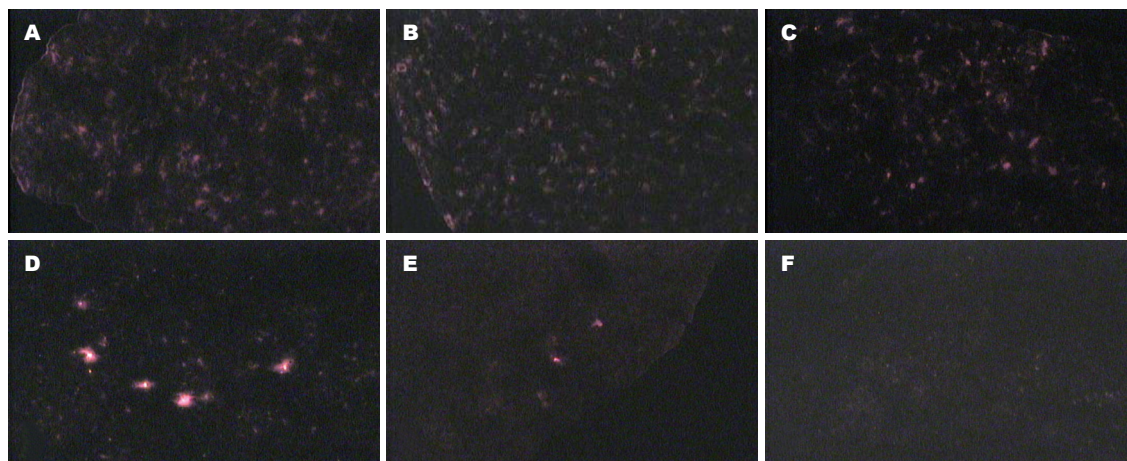


图1 DiI染色L02细胞荧光图像(×200). A, B, C: 实验组移植4 wk, 8 wk, 6 mo; D, E, F: 对照组移植4 wk, 8 wk, 6 mo.

每次每组取4只大鼠. 大鼠在乙醚吸入麻醉下行肝部分切除术, 新鲜肝组织送冰冻切片, 在荧光显微镜诺丹明滤片下观察; 部分组织用40 g/L中性甲醛固定, 送石蜡包埋切片.

1.2.2 DiI荧光示踪法 用DiI染色L02肝细胞后, 移植前于荧光显微镜诺丹明滤片下观察; L02细胞移植后, 大鼠取新鲜肝组织送冰冻切片, 在荧光显微镜下观察.

1.2.3 免疫荧光检测肝组织人白蛋白 新鲜肝组织用冰冻切片4-8 μm , 室温放置30 min后, 入4℃丙酮固定10 min, 37℃下100 mL/L封闭血清孵育20 min, 滴加鼠抗人白蛋白mAb(Sigma公司, 滴度1:400) 4℃过夜, 加荧光标记二抗, 异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC)标记山羊抗大鼠IgG(滴度1:100), 37℃暗室下孵育45 min. 用900 mL/L缓冲甘油封片, 激光共聚焦显微镜(瑞士Zeiss公司)下观察. PBS替代一抗作阴性对照.

1.2.4 免疫组化检测肝组织特异人增殖细胞核抗原(PCNA) 采用链霉菌亲生物素蛋白-过氧化酶法(SP法)染色. 新鲜肝组织用40 g/L中性甲醛固定, 石蜡包埋切片, 60℃烤箱中烤1-2 h, 脱蜡至水, 加入含0.5 g/L的Triton×100的PBS室温下孵育5 min, 37℃下30 mL/L过氧化氢孵育20 min, 特异性人增殖细胞核抗原mAb (Chemicon公司, 滴度1:200)或非特异性增殖细胞核抗原mAb (滴度1:200, 检测所有脊椎动物)4℃过夜, 加聚合物辅助剂和辣根酶标记羊抗鼠IgG多聚体. 二氨基联苯胺(DAB)显色, 苏木素复染, 中性树胶封片, 光镜下观察. PBS替代一抗作阴性对照. 采用LeicaQWin计算机图像分析系统(德国Leica公司), 在100倍PCNA免疫组化切片下, 每个切片

随机选取5个测量区域, 计算在不同时相PCNA阳性细胞的数密度(个/ μm^2)和面积密度($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$).

1.2.5 RT-PCR检测鼠肝组织人白蛋白mRNA 按TRIzol提取RNA试剂说明进行, 采用BioDev公司RT-PCR试剂盒的两步法逆转录和扩增反应, 引物由大连TaKaRa公司设计合成. 人白蛋白mRNA引物, 正向引物Hs: 5'-TCGACAACGGCTCCGGCAT-3', 逆向引物Ha: 5'-AAGGTGTGGTGCCAGATTTTC-3', 扩增目的片段为241 bp; 正常大鼠白蛋白mRNA引物, 正向引物Rs: 5'-CGGTTTAGGGACTTAGGAGAACAGC-3', 逆向引物Ra: 5'-ATAGTGTCCCAGAAAGCTGGTAGG-3', 扩增目的片段为388 bp. 扩增条件: 94℃预变性5 min, 94℃变性50 s; 55℃退火50 s; 72℃延伸1 min; 共32个循环, 最后72℃延伸8 min. 采用未加入AMV反转录酶的扩增作为阴性对照以排除假阳性的可能. 产物经15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色后于凝胶成像仪上获取图像.

统计学处理 数据均以mean±SD表示, 采用SPSS10.0统计分析软件, 两均数的比较采用配对t检验.

2 结果

2.1 DiI荧光示踪 DiI染色的阳性细胞在绿色滤光片下显示红色荧光, 细胞均匀着色呈圆形或椭圆形, 不能区分胞核与胞质. 实验组于移植后1 wk-6 mo, 观察到L02肝细胞在鼠肝内的动态分布. L02细胞自第1周起一直呈亮度不大的散在均匀分布, 该状态维持4 mo, 至第6月荧光细胞数目开始减少, 亮度有所减弱, 显示为片状均匀分布. 对照组早期时相可见L02细胞分布在受体

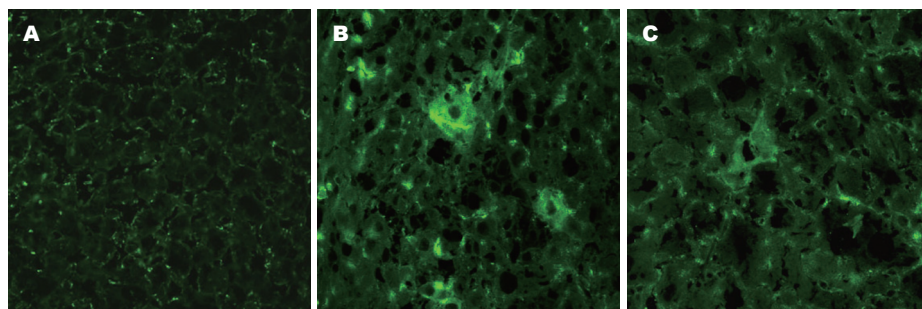


图 2 正常鼠肝组织和移植4 wk嵌合鼠肝组织中胞质呈绿色荧光的L02细胞($\times 400$). A: 正常鼠肝组织; B: 实验组; C: 对照组.

■应用要点

通过应用倒千里光碱, 提高L02细胞在人鼠嵌合肝中的增殖能力, 延长存活时间, 可获得稳定持续性的动物模型; 该模型构建在正常免疫系统基础上, 为进一步研究病毒感染发病机制、病毒原学诊断和治疗等提供良好的平台.

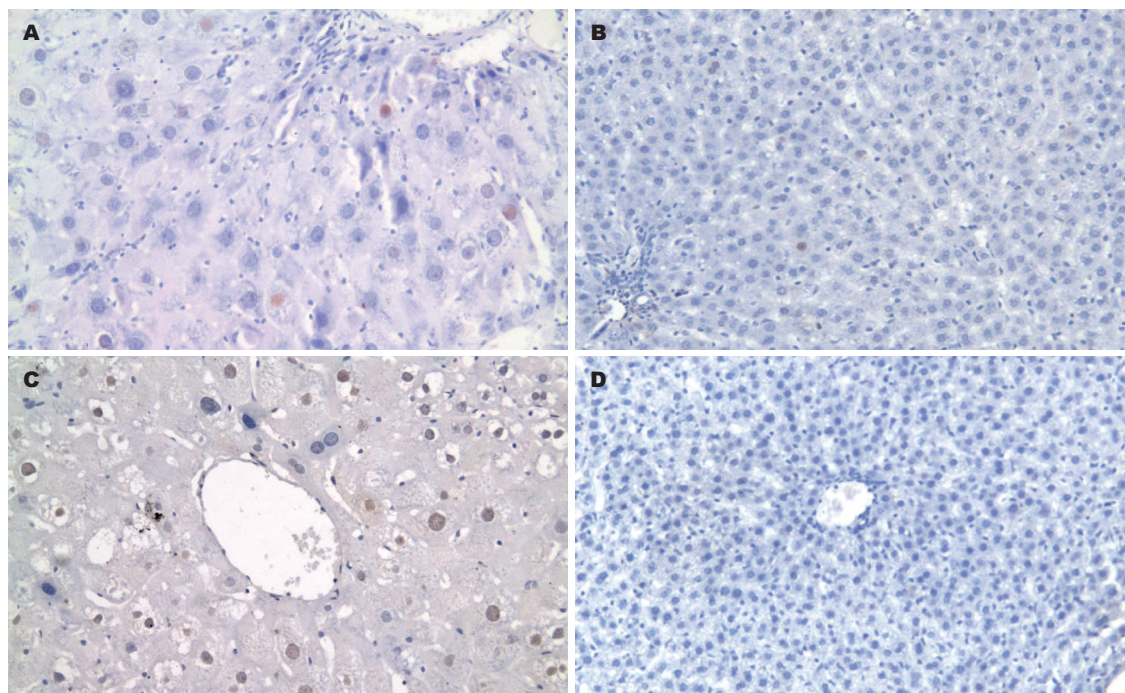


图 3 正常鼠肝组织和移植4 wk嵌合鼠肝组织中胞核呈棕色的L02细胞($\times 200$). A: 实验组1; B: 对照组; C: 实验组2; D: 正常鼠肝组织.

鼠肝内的门静脉区域, 聚集成团, 以后扩散到肝实质区域, 荧光细胞数目减少较快, 亮度逐渐减弱, 维持10 wk左右. 相应时相荧光细胞数目较实验组明显稀少(图1).

2.2 鼠肝组织中人白蛋白的表达 FITC标记荧光二抗, 阳性细胞的胞质在激光共聚焦显微镜的蓝色滤光片下显示为绿色荧光, 与周围大鼠肝细胞界限清楚, 胞核未着色. 实验组移植后2 wk-6 mo大鼠均检测出人白蛋白; 对照组移植后2-8 wk大鼠可检测出人白蛋白. 两组均以4 wk发现绿色荧光细胞最多, 实验组比相应时相对对照组阳性细胞数目多. 实验组肝实质显示了轻度到中度肝索结构的破坏、门脉区炎性细胞浸润和分散的巨大肝细胞, 这些巨大肝细胞都有大的细胞核; 对照组未见明显上述现象. 实验组和对照组均未见肝纤维化、肝坏死等(图2).

2.3 特异人PCNA的表达 特异性人和非特异性PCNA阳性细胞核DAB显色后均为棕色(图3). 实验组和对照组各取两份切片, 分为实验组1: 一抗为特异性人增殖细胞核抗原mAb, 其实验组移植后2 wk-6 mo检测出特异性人PCNA, 4 wk最多, 以后逐渐减少, 6 mo后仍有少量; 对照组移植后2-6 wk, 检测出特异性人PCNA, 仍以4 wk最多. 对照组相应时相阳性细胞数量略少于实验组; 实验组2: 一抗为非特异性增殖细胞核抗原mAb, 其实验组与对照组差别不大, 均移植后1 wk-6 mo, 检测出大量非特异性人PCNA, 阳性细胞核数量未见减少. PCNA阳性细胞的数密度和面积密度均显示, 实验组1与其对照组比较有统计学差异($P < 0.05$); 实验组2与其对照组比较无统计学差异($P > 0.05$)(表1).

2.4 人白蛋白mRNA的表达 实验组移植后2 wk-

■名词解释

倒千里光碱与部分肝切除术联合肝细胞增殖模型(Rts/PH): 是移植肝细胞增殖常用模式。部分肝切除术给予嵌合肝再生刺激, 提高受体细胞的更新水平; 倒千里光碱强烈而持续抑制宿主肝细胞的增殖, 而不影响移植肝细胞增殖, 使移植肝细胞有选择性生长优势, 二者共同促进移植肝细胞增殖, 其具体机制尚不清楚。

表 1 大鼠不同时相PCNA的数密度和面积密度(mean \pm SD, $n = 4$)

指标	分组	1 wk	2 wk	4 wk	6 wk	4 mo
数密度 ($10^{-4} \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$)	实验组1		0.47 \pm 0.08 ^a	1.33 \pm 0.34 ^a	0.56 \pm 0.38 ^a	0.08 \pm 0.03
	对照组1		0.10 \pm 0.07	0.46 \pm 0.04	0.14 \pm 0.04	
	实验组2	5.53 \pm 1.12	5.68 \pm 0.89	6.02 \pm 0.87	6.78 \pm 1.03	5.77 \pm 0.68
	对照组2	6.20 \pm 0.85	5.77 \pm 1.18	6.16 \pm 1.02	5.46 \pm 1.03	6.73 \pm 0.58
面积密度 ($10^{-4} \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$)	实验组1		2.14 \pm 0.22 ^a	7.85 \pm 1.46 ^a	3.54 \pm 1.63 ^a	0.58 \pm 0.72
	对照组1		1.47 \pm 0.04	2.94 \pm 0.64	2.37 \pm 0.48	
	实验组2	74.8 \pm 1.06	69.3 \pm 2.84	45.3 \pm 3.38	77.3 \pm 4.84	84.7 \pm 2.67
	对照组2	84.2 \pm 6.84	67.5 \pm 2.73	66.3 \pm 4.48	74.2 \pm 5.73	83.3 \pm 4.83

^a $P < 0.05$ vs 对照组1.

6 mo, 检测出人白蛋白mRNA, 对照组移植后2-8 wk, 检测出人白蛋白mRNA. 分别采用人和大鼠白蛋白mRNA引物作RT-PCR时, 可在实验大鼠肝组织中检测到相应的人白蛋白mRNA条带(241 bp)及大鼠白蛋白mRNA条带(388 bp)(图4).

3 讨论

动物在胚胎发育时期免疫系统尚未成熟, 接触到外来抗原时, 可能由于“T淋巴细胞克隆消除”的原因^[13], 会逐渐对这些抗原产生耐受, 因此, 先用人胎肝细胞诱导胎鼠对人肝细胞产生免疫耐受, 再把人肝细胞移植到正常大鼠肝内, 从而建立针对移植物耐受的动物模型^[14]. 由于我们的人鼠嵌合肝模型建立在正常免疫系統上, 嵌合于鼠肝细胞中的是正常人肝细胞, 对多种肝炎致病因子易感, 因此可利用人鼠嵌合肝模型进行已知和未知肝炎致病因子的研究. 应用标记技术, 在荧光显微镜或流式细胞仪下, 移植肝细胞与受体肝细胞很容易区别开来, 且能直观的监测移植肝细胞的功能与转归、分布与存活. 我们采用亲脂性碳花青荧光染料DiI标记整个细胞, 荧光衰减非常慢, 有报道^[15]用DiI标记的神经元在体外保持活性4 wk以上, 体内保持9 mo以上, 仍没有明显衰减和向周围的神经元细胞转移. 本实验DiI荧光及免疫组化均显示, 移植的L02细胞首先到达远端门静脉区域和肝窦, 聚集成团, 逐渐扩散到肝实质区域, 并散在分布, 在Rts的作用下, 散在分布的L02细胞开始成簇增殖. 实验组L02细胞一直呈亮度不大的散在均匀分布, 提示移植细胞扩散到肝实质区域后很快分裂增殖, 导致荧光细胞亮度减弱; 而对照组相应时相荧光细胞亮度虽大, 但数目较实验组明显稀少, 提示其分裂增殖相对较少, 说明Rts对移

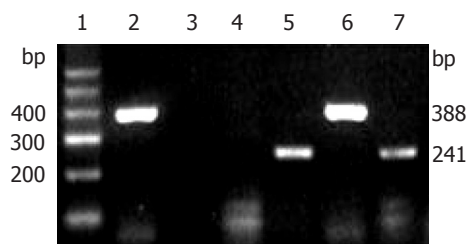


图 4 RT-PCR检测肝组织人白蛋白和鼠白蛋白mRNA. 1: 标准分子量DNA Marker; 2, 3: 正常大鼠肝组织; 4, 5: 人肝组织; 6, 7: 嵌合鼠肝组织; 2, 4, 6: 大鼠白蛋白mRNA引物; 3, 5, 7: 人白蛋白mRNA引物.

植细胞有明显增殖作用. 实验组荧光细胞维持6 mo以上, 而对照组维持8 wk, 证实DiI荧光染料衰减很慢, 对照组荧光最后的消失不是因为衰减, 而是移植细胞有限的增殖能力和细胞活性下降所致.

我们采用免疫荧光技术和RT-PCR, 从移植后2 wk-6 mo嵌合肝大鼠肝组织中检测出人白蛋白及人白蛋白mRNA; 对照组于移植后2-8 wk检出. 两组均证实人L02细胞在嵌合肝中的存在, 并具有生物学功能, 但实验组比对照组阳性持续时间明显延长, 均未见肝纤维化、肝坏死现象, 说明Rts不仅提高了L02细胞在大鼠肝组织中的增殖, 而且其肝细胞毒性不影响移植细胞生物学功能. 另外发现, 实验组肝实质出现肝索结构的破坏、大量炎性细胞浸润和巨大核肝细胞, 而对照组不明显, 体现了移植肝细胞与受体细胞的整合过程, 并逐渐发生移植细胞的增殖、替代. Laconi *et al*^[21]发现, 由于肝脏总重量和DNA含量在移植细胞增殖过程, 均未超过正常水平值, 说明移植细胞并不是简单的与受体细胞共存, 而是移植细胞的缓慢替代, 而除了Rts,

移植细胞也可能加速了受体细胞的消亡过程。研究表明,经脾注射大量移植肝细胞(1×10^8 以上)、肝细胞的多次移植或者移植前诱导肝毒性等增殖方法,与注射Rts相比,肝细胞增殖均显得很轻微^[16]。Rts的毒性包括肝细胞坏死,并未对肝细胞增殖造成影响,为Rts在移植肝细胞的有效增殖和临床应用提供了依据^[17]。Rts是千里光属植物种中所含吡咯烷类生物碱,可强烈而持续阻断宿主肝细胞增殖的细胞周期,而移植肝细胞增殖的细胞周期却不受影响,从而促进了移植肝细胞的选择性生长,虽半衰期很短,但对肝细胞增殖的抑制作用可持续数周至数月^[18]。Rts主要阻断肝细胞周期S晚期和G2期,即阻断了随后的细胞有丝分裂;也能阻断肝细胞进入S期,与DNA结合阻断其合成^[19],但其他结合DNA的试剂如二乙基亚硝胺却不能维持移植肝细胞的增殖过程,提示了生物碱的特殊性^[2]。Laconi *et al*^[20]发现,在外源性生长刺激如部分肝切除缺乏下,仅给予Rts处理,其结果同Rts/PH联合相似,提示除了维持移植肝细胞选择性生长优势以外, Rts的作用可能还有其他机制存在。我们也试验了单独给予Rts,无pH作用下, Rts同样能提高L02细胞的增殖能力,延长其生存时间,只是移植细胞的增殖似乎较慢。Gordon *et al*^[21]研究Rts所致不可逆损伤的巨大肝细胞清除机制,发现Rts除了阻断肝细胞的有丝分裂,导致S晚期和G2期细胞增加外,也可因凋亡前体蛋白Bax和抗凋亡蛋白Bcl-xl的相对水平高低和所处位置,诱导凋亡,导致细胞损伤。

目前,计算机图像分析系统应用广泛,对免疫组化切片分析和计算移植肝细胞的数量、数密度、面积、面积密度、细胞最大直径及形态因子等参数,可以反映移植肝细胞的增殖情况,我们采用计算机图像分析以及统计学分析,检测不同时相PCNA细胞的数密度和面积密度。实验发现,特异性人PCNA作一抗时,实验组与对照组相应时相的数密度和面积密度有明显差异且有统计学意义,前者比后者持续时间明显延长,说明倒Rts既能抑制受体肝细胞增殖,促进卵圆细胞活化,也能促进移植肝细胞的增殖。Zheng *et al*^[22]推测,应用Rts后,肝严重损伤后的再生可能首先是移植的成年肝细胞的增殖分化,其次是单能或双能前体细胞的增殖与分化的过程。实验组与对照组增殖期L02细胞高峰均出现在第4周,只是前者数量明显多于后者,以后检测均逐渐减少,移植4 mo后,阳性细胞仅有

少量,6 mo与4 mo水平相当,说明L02肝细胞在鼠肝脏内保持高度分化增殖持续到移植后4 mo左右,增殖能力持续时间长,且最后仍维持在低水平复制状态。Zheng *et al*^[22]应用Rts和部分肝切除处理的二肽酶(dipeptidyl peptidase, DPP)IV⁻大鼠,移植的DPPIV⁺肝细胞在第1月复制和分裂次数最多,以后很快减少,第3月到达细胞增殖的相对平台,但复制一直维持在低水平而不停止,我们的结论与之基本相符。非特异性PCNA作一抗时,经计算机图像和统计学分析,实验组与对照组在时间和数量上无明显差异,非特异性PCNA在1 wk-6 mo一直持续存在且数量很多,说明鼠肝细胞在行部分肝切除术后迅速表现出强烈而持续的增殖趋势,实验组由于Rts虽允许受体肝细胞的DNA合成作用,但主要阻断肝细胞wk期S晚期和G2期,即阻断了随后的细胞有丝分裂,使受体肝细胞增殖受阻。该机制也解释了应用Rts后出现的巨大核肝细胞,是由于部分受体肝细胞能够在核内复制合成DNA,但不能有丝分裂的结果^[20]。70%肝切除是常见的大鼠肝再生模型,由于移植肝细胞数量在嵌合肝中比例很小,部分肝切除术促进L02细胞增殖的数量很少,所以,非特异性PCNA在wk 1出现,而特异性人PCNA在wk 1未能发现,并且即使Rts能提高移植细胞的增殖能力,但在相应时相特异性人PCNA与非特异性PCNA比较,数量明显稀少。

通过应用药物Rts后,提高L02细胞在人鼠嵌合肝中的增殖能力,延长存活时间,可获得稳定持续性的动物模型。从理论和实践中都能够证明人鼠嵌合肝动物模型的应用前景,构建在正常免疫系统基础上的动物模型,为进一步研究病毒感染免疫应答、致病机制、抗病毒治疗和开发强效疫苗开辟了道路。

4 参考文献

- 1 Mizuguchi T, Mitaka T, Katsuramaki T, Hirata K. Hepatocyte transplantation for total liver repopulation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005; 12: 378-385
- 2 Laconi E, Laconi S. Principles of hepatocyte repopulation. *Semin Cell Dev Biol* 2002; 13: 433-438
- 3 Witek RP, Fisher SH, Petersen BE. Monocrotaline, an alternative to retrorsine-based hepatocyte transplantation in rodents. *Cell Transplant* 2005; 14: 41-47
- 4 Menthena A, Deb N, Oertel M, Grozdanov PN, Sandhu J, Shah S, Guha C, Shafritz DA, Dabeva MD. Bone marrow progenitors are not the source of expanding oval cells in injured liver. *Stem Cells* 2004; 22: 1049-1061
- 5 Fandrich F, Ruhnke M. Stem cells and liver

■同行评价

文章提供了有意义的信息,具有新颖性,符合伦理学要求,能较好的反映我国胃肠病学基础研究的先进水平。

- replacement. *Med Klin (Munich)* 2003; 98 Suppl 2: 18-22
- 6 Shafritz DA, Dabeva MD. Liver stem cells and model systems for liver repopulation. *J Hepatol* 2002; 36: 552-564
- 7 Dahlke MH, Popp FC, Bahlmann FH, Aselmann H, Jager MD, Neipp M, Piso P, Klempnauer J, Schlitt HJ. Liver regeneration in a retrorsine/CCl₄-induced acute liver failure model: do bone marrow-derived cells contribute? *J Hepatol* 2003; 39: 365-373
- 8 Guha C, Deb NJ, Sappal BS, Ghosh SS, Roy-Chowdhury N, Roy-Chowdhury J. Amplification of engrafted hepatocytes by preparative manipulation of the host liver. *Artif Organs* 2001; 25: 522-528
- 9 Okumoto K, Saito T, Haga H, Hattori E, Ishii R, Karasawa T, Suzuki A, Misawa K, Sanjo M, Ito JI, Sugahara K, Saito K, Togashi H, Kawata S. Characteristics of rat bone marrow cells differentiated into a liver cell lineage and dynamics of the transplanted cells in the injured liver. *J Gastroenterol* 2006; 41: 62-69
- 10 Gordon GJ, Coleman WB, Hixson DC, Grisham JW. Liver regeneration in rats with retrorsine-induced hepatocellular injury proceeds through a novel cellular response. *Am J Pathol* 2000; 156: 607-619
- 11 Avril A, Pichard V, Bralet MP, Ferry N. Mature hepatocytes are the source of small hepatocyte-like progenitor cells in the retrorsine model of liver injury. *J Hepatol* 2004; 41: 737-743
- 12 韩明子, 邹亚男, 赵宪琪, 李福德, 韩桂萍, 赵瑞波, 温洁. DiI荧光示踪剂在小鼠骨髓细胞肝内移植中的研究. *中华器官移植杂志* 2003; 24: 251
- 13 Kim HB, Shaaban AF, Milner R, Fichter C, Flake AW. In utero bone marrow transplantation induces donor-specific tolerance by a combination of clonal deletion and clonal anergy. *J Pediatr Surg* 1999; 34: 726-729; discussion 729-730
- 14 Wu GY, Konishi M, Walton CM, Olive D, Hayashi K, Wu CH. A novel immunocompetent rat model of HCV infection and hepatitis. *Gastroenterology* 2005; 128: 1416-1423
- 15 Vidal-Sanz M, Villegas-Perez MP, Bray GM, Aguayo AJ. Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye diI. *Exp Neurol* 1988; 102: 92-101
- 16 Laconi E, Oren R, Mukhopadhyay DK, Hurston E, Laconi S, Pani P, Dabeva MD, Shafritz DA. Long-term, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol* 1998; 153: 319-329
- 17 Koenig S, Stoesser C, Krause P, Becker H, Markus PM. Liver repopulation after hepatocellular transplantation: integration and interaction of transplanted hepatocytes in the host. *Cell Transplant* 2005; 14: 31-40
- 18 Guo D, Fu T, Nelson JA, Superina RA, Soriano HE. Liver repopulation after cell transplantation in mice treated with retrorsine and carbon tetrachloride. *Transplantation* 2002; 73: 1818-1824
- 19 Laconi S, Curreli F, Diana S, Pasciu D, De Filippo G, Sarma DS, Pani P, Laconi E. Liver regeneration in response to partial hepatectomy in rats treated with retrorsine: a kinetic study. *J Hepatol* 1999; 31: 1069-1074
- 20 Laconi S, Pillai S, Porcu PP, Shafritz DA, Pani P, Laconi E. Massive liver replacement by transplanted hepatocytes in the absence of exogenous growth stimuli in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol* 2001; 158: 771-777
- 21 Gordon GJ, Coleman WB, Grisham JW. Bax-mediated apoptosis in the livers of rats after partial hepatectomy in the retrorsine model of hepatocellular injury. *Hepatology* 2000; 32: 312-320
- 22 Zheng YW, Ohkohchi N, Taniguchi H. Quantitative evaluation of long-term liver repopulation and the reconstitution of bile ductules after hepatocellular transplantation. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6176-6181

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志在线办公系统

本刊讯 自2005-12-15起, 世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流. 凡在在线办公系统注册的用户, 将可获得世界华人消化杂志最新出版消息.