

人骨髓干细胞在中空纤维滤器中诱导分化构建生物人工肝反应器的可行性研究

朱章华 仇毓东 施晓雷 谢婷 丁义涛

【摘要】 目的 探讨以人骨髓干细胞在中空纤维滤器中直接扩增并诱导分化为类肝细胞,从而直接构建成生物人工肝反应器的可行性。方法 取志愿者骨髓血,人骨髓间充质干细胞分离、扩增至 10^7 数量级后种植入中空纤维滤器,继续培养扩增 10 d 后,以含重组人肝细胞生长因子(rhHGF)、重组人碱性成纤维细胞生长因子 4(rhFGF-4)、重组人制瘤素 M(rhOSM)等细胞因子的培养液诱导分化,检测培养上清液中白蛋白、甲胎蛋白(AFP)水平;诱导 18 d 后检测氮代谢、安定代谢及尿素合成等功能。培养结束后以流式细胞仪检测消化滤器内细胞白蛋白表达率。培养全过程监测滤器内培养液葡萄糖浓度变化。结果 ①扩增培养期人骨髓间充质干细胞在中空纤维滤器内种植后的葡萄糖摄取量呈进行性升高,在诱导分化期保持相对平稳,诱导培养结束时细胞总数达 10^9 数量级。②进行诱导培养后 6 d,培养上清液中出现 AFP,12 d 达到峰值;9 d 出现白蛋白并持续进行性升高;诱导培养 18 d 时,滤器内细胞总体氨清除速率为 2.0~2.7 mmol/24 h,尿素产生速率为 1.8~2.2 mmol/24 h,安定清除速率为 3.2~3.8 mg/24 h。③21 d 滤器内细胞白蛋白表达率为 66.18%~76.91%。结论 人骨髓干细胞可在中空纤维滤器内扩增,并分化为肝细胞样细胞,成为具有一定功能的生物人工肝反应器。

【关键词】 间充质干细胞; 生物人工肝; 生物反应器

Construction of a novel bioreactor of bioartificial liver system with human bone marrow mesenchymal stem cells ZHU Zhang-hua*, QIU Yu-dong, SHI Xiao-lei, XIE Ting, DING Yi-tao. * Intensive Care Unit, the Affiliated Nanjing Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu, China

Corresponding author: DING Yi-tao, Email: diyitao@yahoo.com.cn

【Abstract】 **Objective** To design a novel bioreactor of bioartificial liver system by using expanded and differentiated human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMMSCs) as active cells. **Methods** hBMMSCs were isolated from bone marrow of volunteers and grown to 10^7 population, and then replanted into hollow fiber cartridge to expand continuously for 10 days. They were incubated in differentiation medium containing recombinant human hepatocyte growth factor (rhHGF), recombinant human fibroblast growth factor 4 (rhFGF-4), recombinant human oncostatin M (rhOSM), and the cells were induced to differentiate into hepatocyte-like cells for 21 days. The functions of the differentiated cells, such as synthesis of albumin (Alb), alpha fetoprotein (AFP) were determined. Eighteen days later, the functions of metabolism of ammonia and benzodiazepines, and synthesis of urea were monitored. The cellular synthesis rate of Alb was measured with flow cytometer. The glucose levels in the medium were measured during entire culture process. **Results** ①Glucose-uptake in the cartridge was increased during the culture period, and at the end of culture, the number of cells in the cartridge increased to 10^9 . ②After induction, AFP was detected on day 6, reaching the peak level on day 12. Alb was detected on day 9. Eighteen days after being induced, the clearance rate of ammonia and benzodiazepines in the cartridge was 2.0 - 2.7 mmol/24 hours and 3.2 - 3.8 mg/24 hours, respectively, and urea production rate was 1.8 - 2.2 mmol/24 hours. ③At the end of the culture, 66.18% - 76.91% of the cells showed positive Alb expression. **Conclusion** hBMMSCs can be multiply to construct a novel bioreactor of bioartificial liver system in a hollow fiber cartridge.

【Key words】 Mesenchymal stem cell; Bioartificial liver system; Bioreactor

以干细胞为细胞源构建人工肝生物反应器的可

行性已被许多专家肯定^[1-2]。但涉及实际的方案仍存在许多问题,包括干细胞的扩增及大规模培养、诱导分化及反应器的构建等。本实验中使用特殊的中空纤维滤器作为细胞培养载体,将干细胞经适当扩增后直接种植于中空纤维滤器内再次进行扩增和诱导后,检测其中的细胞功能状态,以评价其作为生物人工肝反应器的可行性。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.12.006

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371391);江苏省自然科学基金资助项目(BK2003008)

作者单位:210008 江苏,南京大学医学院附属鼓楼医院 ICU(朱章华),肝胆外科(仇毓东、施晓雷、谢婷、丁义涛)

通信作者:丁义涛,Email:diyitao@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 主要实验材料:①骨髓来源于年龄 18~22 岁的健康志愿者。②主要试剂:DMEM-LG 培养液、胎牛血清(FCS)、0.25%胰酶为美国 Hyclone 公司产品;MCDB-201 培养液、纤维连接蛋白为美国 Sigma 公司产品;重组人血小板衍生生长因子-BB(rhPDGF-BB)、重组小鼠表皮生长因子(rmEGF)、重组人肝细胞生长因子(rhHGF)、重组人碱性成纤维细胞生长因子 4(rhFGF-4)、重组人制瘤素 M(rhOSM)均为美国 RD 公司产品。③主要仪器:CO₂ 培养箱、冷冻离心机、流式细胞仪、相差显微镜、逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)仪、分光光度计、凝胶成像系统、Cascadeflo EC-40 滤器。

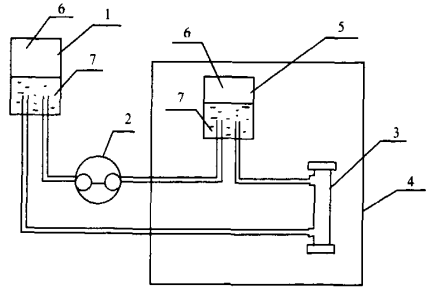
1.2 细胞培养液配置:①扩增培养液配置:54% DMEM-LG, 36% MCDB-201, 10%FCS, 10 ng/ml rhPDGF-BB, 10 ng/ml rmEGF。②诱导培养液配置:54% DMEM-LG, 36% MCDB-201, 10% FCS, 20 ng/ml rhHGF, 20 ng/ml rhFGF-4, 20 ng/ml rhOSM。

1.3 人骨髓间充质干细胞分离、纯化及体外扩增:从志愿者髂前上棘穿刺抽取 5 ml 骨髓血, 肝素抗凝, 密度梯度离心(900×g, 30 min), 制备成单个核细胞, 经磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次后计数, 用扩增培养液稀释后, 按 2.5×10⁵/cm² 的密度接种于培养瓶中, 于 CO₂ 培养箱培养。每 72 h 换液 1 次, 待细胞融合达 70%~80% 时用稀释成 0.05% 的胰酶消化、计数, 继续以 2.5×10⁵/cm² 的密度接种传代。经 2 次传代后, 细胞数可扩增至 10⁷ 数量级, 上述方法将细胞消化后以扩增培养液约 150 ml 重悬、计数后, 加入纤维连接蛋白 72.5 μg。

1.4 细胞接种及培养:以 500 ml PBS 和 500 ml MCDB-201 培养液先后预冲滤器后抽空 MCDB-201 培养液。向滤器内腔缓慢注入上述细胞重悬液, 然后以扩增培养液加至完全充满滤器。置入 37 °C CO₂ 培养箱静止培养 24 h 后, 按图 1 连接培养液循环管路, 培养液以 20 ml/h 的速度在循环管路内持续循环, 定时检测培养液中氧分压(PO₂)、二氧化碳分压(PCO₂)、糖含量、pH 值、乳酸含量等指标, 以指导培养液更换。以扩增培养液持续循环 10 d, 11 d 时更换为诱导培养液持续循环。根据检测结果计算滤器内细胞的葡萄糖摄取率。

1.5 生物反应器合成功能及代谢实验:诱导后每 3 d 取 1 ml 培养液, 用酶联免疫吸附法(ELISA)测定白蛋白(Alb)及甲胎蛋白(AFP)含量, 并计算每

日产生量。诱导开始后 18 d 加入氯化铵和安定, 使其初始浓度分别达到 5 mmol/L 和 10 mg/L, 与培养液快速循环均匀后抽取培养液, 并在 24 h 后抽取培养液, 测定氨、尿素及安定浓度。氨及尿素以生化仪检测, 安定以 ELISA 法测定。



注:1:外培养液袋, 2:泵, 3:滤器, 4:培养箱, 5:内培养液袋, 6:气体(95%O₂+5% CO₂), 7:培养液

图 1 人骨髓间充质干细胞在中空纤维滤器内培养时培养液循环示意图

1.6 生物反应器内细胞鉴定:细胞在滤器内培养诱导 21 d, 弃培养液, PBS 液 1 000 ml 冲洗, 0.25%胰酶充分消化, 锥虫蓝染色, 细胞计数, 计算细胞总量及细胞活性, 并用流式细胞仪检测 Alb 表达率。

2 结果

2.1 细胞在滤器内生长情况(图 2):细胞种植量为 (1.8~2.6)×10⁷, 种植后在滤器内存在明显的氧消耗和葡萄糖摄取, 有乳酸等代谢产物产生, 随培养时间的延长, 其葡萄糖摄取量呈明显上升趋势。

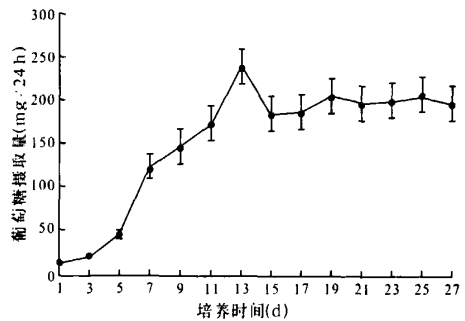


图 2 人骨髓间充质干细胞在中空纤维滤器内培养诱导过程中细胞葡萄糖摄取量的变化

2.2 诱导后细胞分泌及代谢功能检测结果(图 3):诱导 6 d 后滤器内培养液中开始检测出 AFP, 并呈进行性升高, 在 12 d 时产生速率达高峰, 后呈缓慢下降趋势; 诱导 9 d 时出现 Alb 并逐渐升高, 到 18 d 仍呈上升趋势, 但上升速率已趋平缓。诱导 18 d 时

氨清除速率为 2.0~2.7 mmol/24 h, 尿素产生速率为 1.8~2.2 mmol/24 h, 安定清除速率为 3.2~3.8 mg/24 h。

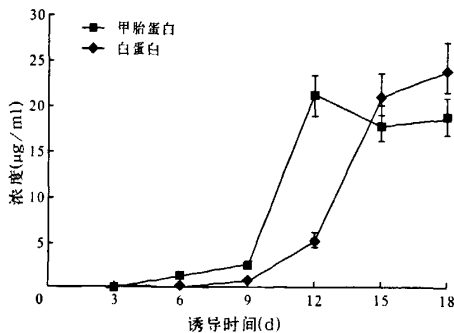


图3 人骨髓间充质干细胞在中空纤维滤器内培养诱导过程中培养液中白蛋白及甲胎蛋白产生速率的变化

2.3 细胞总量、活性及 Alb 表达量结果 (图 4): 滤器内细胞总量达 $(2.6 \sim 4.8) \times 10^9$, 细胞活性为 98%, 细胞 Alb 表达率为 66.18%~76.91%。

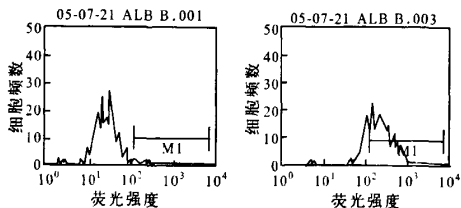


图4 流式细胞仪检测人骨髓间充质干细胞在中空纤维滤器内培养诱导 21 d 时白蛋白阳性表达率结果

3 讨论

鉴于人工肾对肾衰竭治疗的成功, 人们对人工肝治疗肝衰竭寄予厚望, 但单纯机械性人工肝的疗效尚不能令人满意^[3], 因而以含生物活性肝细胞的反应器为核心的生物人工肝受到重视^[2]。但高活性的同种肝细胞来源稀缺, 不能满足临床需要, 其他替代细胞则在生物相容性、安全性或细胞活性等方面存在明显缺陷而难以在临床推广^[2,4]。

干细胞具有多向分化潜能, 在一定条件下可向心、肝、神经等多种器官系统分化^[1-2], 这在理论上为构建生物人工肝反应器提供了新的细胞来源。事实上, 许多研究中心在实验室也成功地将干细胞诱导分化为类肝细胞^[5-7]。但以干细胞为基础诱导分化构建生物人工肝, 需要培养大量的细胞, 细胞总量需在 $10^9 \sim 10^{10}$ 数量级。常规的细胞培养以培养瓶为载体进行平面培养, 一般 25 cm^2 最大培养密度不超过

10^6 细胞量, 要达到需要的数量细胞, 理论上需要数千个培养瓶, 以常规的培养方式显然很难达到上述要求, 这就需要寻找新的培养载体。

单纯增加培养表面积的方法很多, 如微载体培养、多孔高分子材料等, 但一方面这些材料在扩增培养方面有一些不可克服的缺陷, 且与患者的生物相容性还不确定; 另一方面, 培养诱导后还需另行构建特殊的生物人工肝装置^[6-7]。

目前, 中空纤维滤器是生物人工肝最常用的方式, 较大规模临床实验 Hepatassist[®] 生物人工肝系统和 ELAD[®] 生物人工肝系统均已将细胞直接或间接培养在中空纤维滤器内^[2]。该方法具有以下优点: ①比表面积大, 适于大量细胞生长。如本研究中采用的日本旭化成公司生产的 Cascadeflo EC-40 滤器, 虽然直径仅为 5.7 cm, 长度仅为 28 cm, 但其单侧膜表面积达 2 m^2 。②由于中空纤维滤器为成熟的商品化医疗用品, 生物相容性好, 细胞易附着生长, 并能安全过渡至临床治疗。③由于滤器膜为半透膜, 能很好地进行选择性的物质隔离和物质交换, 可以直接用于临床或动物实验。④与目前的血液透析或滤过治疗机完全配套, 可以直接连接于血液滤过机或分子吸附再循环系统 (MARS), 进行单独或联合治疗, 不需另外设计专门的生物人工肝治疗装置。

本实验中选择的 Cascadeflo EC-40 滤器半透膜孔径为 $0.03 \mu\text{m}$, 截留分子质量为 $(1 \sim 3) \times 10^6$, 能允许 Alb 自由通过。肝衰竭时许多毒物质如胆红素等与 Alb 有极强的结合率^[6], 因此普通的血液滤过和血液透析治疗均无法清除。Cascadeflo EC-40 滤器半透膜由于能透过 Alb, 因此与 Alb 结合的毒性物质即可能得到有效清除, 而细胞合成的 Alb、凝血因子、生长因子等生物活性物质也能顺利进入血液循环而补充人体内。同时, Cascadeflo EC-40 滤器孔径对球蛋白的通透性明显低于 Alb, IgG 的通过系数 < 0.50 , IgM 的通过系数 < 0.02 , 补体则完全不能通过。这就在利用异种或异体细胞治疗时避免了对细胞的免疫攻击, 减少了细胞失活, 延长了生物反应器寿命, 提高了治疗效率, 增加了治疗时间。

本实验结果显示, 细胞种植进入滤器后, 氧和葡萄糖等营养物质的摄取量进行性升高, 间接证明细胞在滤器内生长良好; 最终诱导结束后, 滤器内细胞总数达 $(2.6 \sim 4.8) \times 10^9$, 直接证明细胞能在滤器内生长并有效扩增。但细胞总数未能达到 10^{10} 数量级, 分析原因, 可能仍应归结于没有足够的膜面积, 如考虑用于临床, 可将 2~3 个上述生物反应器串联, 应

能满足要求。诱导后细胞 Alb 表达率达 66.18%~76.91%，证明诱导有效，虽略低于在培养板诱导结果^[5]，但还在可接受范围内，且代谢功能检测结果良好，具有一定的氮摄取和安定转化能力。

综上所述，以骨髓干细胞在体外扩增后种植于中空纤维滤器内进一步扩增并诱导为类肝细胞而构建的生物反应器，具有一定的肝细胞合成和代谢功能，可尝试用于构建生物人工肝。

参考文献

[1] 李海红, 付小兵. 干细胞可塑性与细胞融合. 中国危重病急救医学, 2006, 18: 255-256.

[2] 丁义涛, 江春平. 生物人工肝研究进展和应用前景. 世界华人消化杂志, 2008, 16: 2907-2915.

[3] 李敏如, 黄正宇, 蔡常洁, 等. 人工肝支持系统对高危患者肝移

植术后生存率的影响. 中国危重病急救医学, 2010, 22: 12-15.

[4] 张桓虎, 高虹, 陈煜, 等. 肝衰竭患者体外灌注血浆对 C3A 细胞生物转化功能影响的研究. 中国危重病急救医学, 2010, 22: 48-49.

[5] 朱章华, 仇毓东, 施晓雷, 等. 人骨髓间充质干细胞体外扩增并诱导为肝细胞的试验研究. 生物医学工程与临床, 2010, 14: 187-192, 封 2.

[6] Shi XL, Mao L, Xu BY, et al. Optimization of an effective directed differentiation medium for differentiating mouse bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocytes in vitro. Cell Biol Int, 2008, 32: 959-965.

[7] Fang S, Qiu YD, Mao L, et al. Differentiation of embryoid-body cells derived from embryonic stem cells into hepatocytes in alginate microbeads in vitro. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28: 1924-1930.

(收稿日期: 2010-11-22)
(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

合成配体 T0901317 激活的肝 X 受体 α 可减轻失血性休克引起的肺部损伤及炎症

肝 X 受体 α(LXRα)是动物体内一种调节脂类代谢的核转录因子。以往研究证明，由合成配体激活的 LXRα 在动脉粥样硬化和化学诱导型皮炎中具有抗炎作用。最近美国研究人员应用大鼠失血性休克模型对合成配体 T0901317 激活的 LXRα 的抗肺部炎症作用进行了研究。学者们首先对大鼠放血至平均动脉压 50 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)制作失血性休克模型，并维持 3 h 后迅速回输失血，腹膜内注射 T0901317 或对照物，于回输失血后 1、2、3 h 处死大鼠。结果显示：与对照组相比，T0901317 组在复苏过程中每搏量和心率都有明显改善，血浆中乳酸盐水平有明显改善，碱不足和碳酸氢盐的水平也有改善趋势，同时促炎因子单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、巨噬细胞炎症蛋白-1α(MIP-1α)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、肝巨噬细胞(KC)和白细胞介素-6(IL-6)水平较低，并且肺损伤和中性粒细胞浸润的程度均有所减轻。通过分子水平分析，T0901317 促进了核转录因子 LXRα 的表达以及 DNA 的合成，但同时也抑制了核转录因子-κB(NF-κB)通路的激活。研究人员得出结论：对于严重失血性休克后的肺损伤，LXRα 是重要的炎症反应调节因子，其作用很可能就是通过抑制 NF-κB 通路实现的。

钟毓贤, 编译自《Shock》, 2010-01-12(电子版); 胡森, 审校

人小肠缺血/再灌注后潘氏细胞凋亡相关的未折叠蛋白质反应活化程度增高

近日荷兰学者对肠缺血/再灌注损伤是否可引起内质网应激并激活未折叠蛋白质反应(UPR)，以及 UPR 的过度激活是否影响潘氏细胞物理屏障破坏后潘氏细胞功能障碍的后果进行了研究。研究人员对 30 例人空肠缺血/再灌注模型进行了研究，应用免疫荧光和聚合酶链反应(PCR)定量技术检测 UPR 的活性，应用溶菌酶和 M30 负染色法检测潘氏细胞的凋亡程度；同时制作雄性 SD 大鼠肠缺血/再灌注模型，研究 UPR 活性和潘氏细胞的凋亡；应用雄性 SD 大鼠制作失血性休克模型，研究潘氏细胞功能异常的影响和肠道细菌移位，并检测循环中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和白细胞介素-6(IL-6)的含量。研究结果显示：在大鼠和人空肠中，缺血/再灌注激活了 UPR，过度的 UPR 反应诱导了潘氏细胞的凋亡，细胞内质网应激征象明显，且潘氏细胞凋亡程度与内质网应激程度相关；在失血性休克大鼠体内，肠损伤所致潘氏细胞凋亡增加了细菌移位和炎症程度。由此研究者得出结论：内质网应激诱导的潘氏细胞凋亡是肠上皮细胞对缺血/再灌注的反应，且增加了细菌移位和全身炎症反应程度。

刘先奇, 编译自《Gastroenterology》, 2010-10-18(电子版); 胡森, 审校

神经钙蛋白磷酸酶抑制剂可促发肝移植术后慢性肾脏疾病

临床上肝移植术后患者常并发慢性肾脏疾病(CKD)，其发病率约为 20%~80%。对肝移植术后并发肾功能不全的研究目前尚存争议，由于定义肾功能不全的标准及测定肾功能的方法不同，因而导致各种研究中肝移植术后 CKD 发生率的不同。最近，美国研究人员对引发肝移植术后 CKD 的因素进行研究，发现神经钙蛋白磷酸酶抑制剂的免疫抑制作用是肝移植术后出现慢性肾功能不全的一个重要原因，其他因素还包括：肝移植术前肾功能水平，术中是否出现过急性肾衰竭，年龄差异及是否患有丙型肝炎等。急性肾功能不全会在肝移植术后立即出现，而 CKD 则会在肝移植术后随着时间的累积而逐渐进展，研究中还发现，肝移植术后发生 CKD 会显著增加心血管系统的负担。研究者通过实验推测，应用西罗莫司(可对神经钙蛋白磷酸酶抑制剂的免疫抑制作用进行调节)可能对治疗肝移植术后并发 CKD 有效。

方涛, 编译自《Int J Artif Organs》, 2010, 33: 803-811; 胡森, 审校