研究报告

人源化鼠嵌合肝动物模型研究进展

李瑞生[1],李晓娟[1],沈宏辉[1],郭立新[2]

(1.解放军第 302 医院实验技术研究保障中心,北京　100039;2.北京大学首钢医院内分泌科,北京　1000144)

【摘要】　动物模型是人类疾病研究、发病机制、药物研发的重要工具,对于困扰人类健康的肝脏疾病还没有理想的动物模型能有效地反映出人类疾病发病的机制。建立人源化鼠嵌合肝动物模型,对于研究人类肝脏疾病的发病机制、疫苗和药物的研发及疾病的诊治等方面都具有十分广阔的应用前景。

【关键词】　鼠嵌合肝;肝细胞移植;干细胞移植;模型,动物
【中图分类号】R332　　【文献标识码】A　　【文章编号】1671-7856(2012)07-0072-03
doi: 10.3969.j.issn.1671.7856.2012.007.018

Research Progression of Establishment of Animal model of Tolerant Rats with Chimeric Human Liver

LI Rui-sheng[1], LI Xiao-juan[1], SHEN Hong-hui[1], GUO Li-xin[2]
(1. Experimental Research Support Center, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China;
2. Peking University Shougang Hospital endocrine department, Beijing 100144, China)

【Abstract】　Animal model is an important instrument for human diseases research, pathogenesis, medicine research. At present, liver diseases still damage human healthy seriously because there are no proper animal models to effectively reflect procedures of human diseases. Therefore establishment of animal model of tolerant rats with chimeric human liver will have extensive application prospects for pathogenesis of human liver diseases, vaccine and medicine exploitation and treatment of human liver diseases.

【Key words】　Mice chimeric liver; Hepatocyte transplantation; Stem cell transplantation; Model, animal

人类动物模型是医学研究和药物研发的重要支撑条件,尤其对肝病学的研究起着非常重要的作用,很多重要的肝病研究成果均来源于建立的各种各样的动物模型。但多数采用传统方法复制的肝病动物模型与人类在生理结构、功能结构和病理变化等方面存在许多差异,其实验结果不能完全准确地推导到人体,这样就给人类肝病学的研究带来许多不便。近年来人们采用人的原代肝细胞直接移植到模型动物体内形成人源化鼠嵌合肝动物模型,它可以在模型动物体内来研究人的肝细胞功能、药物代谢动力学和嗜肝性病毒分型,并成为临床前研究由模型动物到人类之间的一种重要载体和桥梁[1]。本文就人源化鼠嵌合肝的相关研究进行探讨。

1　移植细胞

1.1　干细胞

人干细胞是一类具有无限期自我更新能力,能

[作者简介]李瑞生(1969 -),男,副研究员,博士,研究方向:主要从事实验动物遗传监测与模型研究,E-mail:lrsheng@sohu.com。
[通讯作者]李瑞生。

在体外长期培养、高度未分化的全能干细胞系。在适当条件刺激下可分化为各种类型的细胞。干细胞具有自我更新和自我维持能力，具有多分化潜能，具有生理性的更新能力、对损伤的修复能力和特定的微环境等特点[2]。干细胞的研究在动物体内进行能更真实地反映其表型和分化特点。干细胞移植要求动物具有免疫缺陷或免疫耐受，不易发生免疫逃逸，已植入的人干细胞才能在宿主内生长或形成嵌合体。

1.2　成熟肝细胞

成熟肝细胞移植后可呈克隆样生长，但必须在肝脏受到中度损伤时才可以进行自身复制，一般为一到两个周期。使用成熟肝细胞比其他肝细胞更方便、更容易获得，如果采用在胚胎期建立免疫耐受鼠进行成熟肝细胞移植，将大大增加其移植成活率。

1.3　胚胎肝细胞

胚胎期的肝细胞具有很强的分化增殖能力，能够抵御损伤，对许多激素和生长因子的诱导更加敏感[3]。早期、原始的胚胎干细胞（ES）增殖分化能力则更强于成熟肝细胞，更适易于进行肝细胞的移植。但胚胎肝细胞移植的研究大多集中于胚胎肝细胞移植后的功能表达，并未对胚胎肝细胞脾内移植后的增殖变化规律进行系统分析。

1.4　永生化肝细胞

肝细胞永生化是指体外培养的肝细胞经过自发或受外界因素的影响从增殖衰老危机中逃逸，从而具有无限增殖能力的过程。人肝细胞虽在体内有极强的增殖能力，但在体外培养时增殖困难。因此肝细胞自发永生化的几率很小，通常要通过基因转染，诱导衰老相关基因突变等方法来获得细胞的“永生性”，以达到永生化的目的。目前应用最多的是 SV40 T 抗原基因转染的永生化肝细胞[4]。

1.5　脐血干细胞

人脐带血来源丰富、且富含人脐血干细胞（hUCBSCs），脐血干细胞在诱导因子作用下可分化为肝细胞，用于终末期肝病的治疗。脐血干细胞的含量高于骨髓，在鼠体内可以自分泌方式提供自身某些生长因子，促进自身增殖分化是比较理想的造血干细胞来源[5]。

2　受体鼠

选择适当的移植细胞同时也应选择适易的受体鼠才能形成好的人源化嵌合肝动物模型。由于肝细胞种属的不同，移植后会受到受体鼠免疫系统的排斥。因此，应选择具有免疫缺陷或诱导免疫耐受的鼠作为受体鼠。

2.1　免疫缺陷转基因小鼠

尿激酶纤维蛋白溶酶原活化子（uPA）转基因小鼠：该鼠比正常小鼠的凝血时间长，血浆尿激酶型血浆素原激活剂活动度高，因此可致宿主肝细胞的损伤、肝功能缺陷，最终导致死亡。uPA 转基因小鼠与免疫缺陷背景（与 SCID 或 RAG2 小鼠杂交）小鼠结合后可作为人肝细胞移植的模型。Dandri M 等[6]把人肝细胞移植 uPA/RAG-2 转基因鼠脾脏内，肝细胞会经血液流进肝脏而形成人源化嵌合肝鼠。而 Brass V 等[7]是把人肝细胞移植到 SCID-Alb-uPA 转基因杂交纯合子鼠脾脏中（Alb-uPA 转基因鼠×联合免疫缺陷鼠（Cb-17/SCID/bg）杂交），建立了人源化嵌合肝鼠。延胡索酰乙酰乙酸水解酶（Fah）基因剔除小鼠由于 Fah 的缺失，酪氨酸代谢受阻，导致酪氨酸在体内蓄积，而造成肝损伤[8]。$Fah^{-/-}$ 纯合子小鼠存在广泛而持续的肝损伤，特别适合于移植细胞的再殖，是比较理想的肝脏再殖模型。

2.2 诱导免疫耐受大鼠

诱导免疫耐受大鼠的建立，主要在胚胎发育期通过采用人的胎肝细胞来诱导胎鼠对其产生免疫耐受，然后再把人的肝细胞植入受体鼠肝脏内，来建立免疫耐受大鼠动物模型[9]。该模型对多种肝炎致病因子易感，可进行已知和未知肝炎致病因子的研究。Ouyang EC 等[10]和蒋黎[11]均采用类似方法建立了大鼠的人鼠嵌合肝动物模型，且在大鼠肝脏中检测到人肝脏的各种指标，还具有人肝脏的生物学功能，说明该模型能成功复制。

3　建立人源化鼠嵌合肝的途径与方法

肝细胞移植的途径主要有脾内、门静脉、腹腔内、皮下和肌肉等，其效果最佳的是经脾内和门静脉内移植[12]。主要是由于脾红髓的网状结构组织有利于细胞之间的相互作用和门静脉血营养丰富，使得肝细胞植入受体鼠后，可表达 Alb、酶及胆汁代谢。其分化、增殖潜能既受自身特性及活性影响，又受到受体鼠肝内环境的影响。

4　建立人源化嵌合肝鼠动物模型的关键

实验证明移植肝细胞可在人源化嵌合鼠肝中

存活,但存活时间较短,因此,如何来提高肝细胞的增殖能力及存活时间,是今后研究人鼠嵌合肝动物模型亟待解决的关键问题[13]。

4.1 提高肝细胞的活性及数量

移植肝细胞多采用冻存复苏后的细胞,这就要求在解冻过程中速度要快来保持细胞的质量,为了保证肝细胞的质量,在冻存前可将肝细胞贴于微载体,目的是为了防止贴壁,这样可明显提高肝细胞冻存复苏后的活性和数量[14]。

4.2 增加接种次数提高成活率

脾内移植的肝细胞数量因动物种属不同而存在差异,植入肝细胞的数量也非常关键,如移植过多也会引起肝功能的损害造成肝细胞活性降低。Rajvanshi P 等[15]采用分 3 次可达到宿主肝细胞量 15% 的肝细胞植入鼠脾内,结果显示并没有影响到移植肝细胞与受体鼠肝实质的结合,这样就大大提高了移植细胞的成活率。

4.3 诱导移植细胞增殖

移植细胞在鼠肝内要大量增殖需要抑制宿主细胞增殖,同时要增加移植细胞的生长优势。由于受体鼠内缺乏移植肝细胞生长所需的各种生长因子及营养激素,使得植入的肝细胞在体内增殖困难。对移植肝细胞的增殖,可采用手术、联合细胞移植、应用外源性激素、转基因肝细胞移植和化学性肝损伤等外源性刺激来诱导[16]。而再生刺激不仅对抑制细胞有加速增殖作用,对宿主细胞也具有同样的作用,因此应先使用生物碱、丝裂霉素和放射线等措施来抑制受体鼠肝细胞的增殖,然后再进行外源性刺激,这样可大大提高移植肝细胞在体内的增殖[17]。

4.4 移植肝细胞的检测与鉴定

移植肝细胞在受体鼠内是否成活可采用免疫组化技术、Western 印迹技术和 RT-PCR 检测技术来检测受体鼠肝组织中人的肝细胞角蛋白(CK18)、人 Alb 和人 Alb mRNA,检测鼠肝组织基因组人特异性 Alu 序列。其检测结果完全能反映人肝细胞在鼠肝组织中的表达,提示该模型建立的质量。鼠肝体内发育成活的移植肝细胞通常采用定量和标记技术来鉴定。细胞光度测量技术可以鉴定移植肝细胞的数量和特性,并在此基础上分离移植的肝细胞;而标记鉴定技术主要借助荧光显微镜,更直观更清晰地对人肝细胞与受体肝细胞进行分析鉴定[18]。

5 应用前景

人鼠嵌合肝动物模型的成功建立,不仅可进行人类嗜肝病毒、病毒性肝炎等肝病方面的研究,还可用以比较人和啮齿类动物肝细胞在代谢途径、速度、代谢产物上的差异,评估人源化鼠肝的代谢状况,而且对肝脏细胞生物学理论的研究及重大肝病的临床诊治都具有十分重要的意义。虽然目前人源化鼠嵌合肝细胞的存活时间较短,其移植肝细胞的成活率仅占 15%,但是如何改进实验设计、提高嵌合肝中人肝细胞的比例、产生足够实验用的异种肝内人肝细胞群、完善对人鼠嵌合肝的检测手段和人鼠嵌合肝动物模型,最终能够达到完全用于人肝细胞在实验动物体内重建人肝组织是今后研究的重点,这将对人类肝病的治疗具有非常好的应用前景。

参考文献:

[1] 张海斌,何志颖,杨广顺. 人源化肝脏嵌合体小鼠的研究进展[J]. 中华肝脏病杂志,2011,19(5):398-400.

[2] 姚鹏. 干细胞移植与肝脏疾病[J]. 中华肝脏病杂志,2007,15(3):219-220.

[3] 林沪,毛青,王宇明. 人鼠嵌合肝模型的建立与鉴定[J]. 中华传染病杂志,2007,25(8):510-512.

[4] Mikula M, Fuchs E, Huber H, et al. Immortalized p19ARF null hepatocytes restore liver injury and generate hepatic progenitors after transplantation[J]. Hepatology, 2004, 39:628-634.

[5] 杨尚琪,夏穗生. T 淋巴细胞疫苗诱导大鼠移植心存活时间延长的机制探讨[J]. 中华器官移植杂志,2000,21(5):303.

[6] Dandri M, Burda MR, Torok E, et al. Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus[J]. Hepatology, 2001, 33:981-988.

[7] Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, et al. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers[J]. Nat Med, 2001, 7:927-933.

[8] Meuleman P, Libbrecht L, De Vos R, et al. Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera[J]. Hepatology, 2005, 41:847-856.

[9] Wu GY, Konishi M, Walton CM, et al. A novel immunocompetent rat model of HCV infection and hepatitis[J]. Gastroenterology, 2005, 128:1416-1423.

[10] Ouyang EC, Wu CH, Walton C, et al. Transplantation of human hepatcotyes into toleirzed genetically immuncomeptent rats[J]. World J Gastroenterol, 2001, 7:324-330.

[11] 蒋黎,毛青,王宇明,等. HBV 感染的人鼠嵌合肝动物模型的建立[J]. 第三军医大学学报,2003,25:38.

[12] 周晓东,佘丽君. 肝细胞移植的细胞来源与适应症[J]. 中华肝病杂志,2003,11:368.

[13] 林沪, 毛青, 王宇明. 人鼠嵌合肝研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(12): 1373 - 1376.

[14] Selden C, Hodgson H. Cellular therapies for liver replacement [J]. Transpl Immunol, 2004, 12: 273 - 288.

[15] Rajvanshi P, Kerr A, Bhargava KK, et al. Efficacy and safety of repeated hepatocyte transplantation for significant liver repopulation in rodents [J]. Gastroenterology, 1999, 111: 1092 - 1102.

[16] Guha C, Deb NJ, Sappal BS, et al. Amplification of engrafted hepatocytes by preparative manipulation of the host liver [J]. Artif organs, 2001, 25: 522 - 528.

[17] Witek RP, Fisher SH, Petersen BE. Monocrotaline, an alternative to retrorsine-based transplantation in rodents [J]. Cell Transplant, 2005, 14: 41 - 47.

[18] Oertel M, Rosencrantz R, Chen YQ, et al. Repopulation of rat liver by fetal hepatoblasts and adult hepotacytes transduced ex vivo with lentiviral vectors [J]. Hepatology, 2003, 37: 994 - 1005.

〔修回日期〕2012-07-06