

# 不同途径移植羊膜上皮细胞在肝脏的定居\*\*\*○

张海燕<sup>1,2</sup>, 朴正福<sup>1,2</sup>, 丁淑芹<sup>1,2</sup>, 任 锋<sup>1,2</sup>, 加茂功<sup>3</sup>○, 樱川宣男<sup>3</sup>○, 李 宁<sup>1,2</sup>

## Engraftment of human amniotic epithelial cells injected by different routes in the liver

Zhang Hai-yan<sup>1,2</sup>, Piao Zheng-fu<sup>1,2</sup>, Ding Shu-qin<sup>2</sup>, Ren Feng<sup>1,2</sup>, Isao Kamo<sup>3</sup>○, Norio Sakuragawa<sup>3</sup>○, Li Ning<sup>1,2</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** Cell transplantation has a certain effect for liver disease, and it has its own advantages compared with the liver transplantation, but there are many issues to be resolved.

**OBJECTIVE:** To investigate the engraftment of human amniotic epithelial cells (hAECs) injected by different routes in liver of rats.

**METHODS:** hAECs were separated from placenta and labeled by PKH26 fluorochrome. hAECs ( $1 \times 10^7$  cells) were transplanted into SD rats through enterocoelia, portal vein, caudal vein or injected directly into the liver. Liver frozen sections were prepared after 3 days. The distribution of hAECs in liver was detected by converted fluorescence microscope. And survival condition of hAECs injected through portal vein in liver was observed by time dependent.

**RESULTS AND CONCLUSION:** hAECs were successfully transplanted into SD rat liver injected by portal vein, caudal vein and the route of liver injection, but hAECs injected intraperitoneally were not found in the liver. The hAECs that injected by portal vein could live for at least 16 days. Excessive cell injection causes the vascular thrombosis in liver and leading to necrosis. hAECs can live 16 days above without transplantation rejection. It indicates that amnion source cells may become one of the biomaterials for the treatment of liver diseases.

Zhang HY, Piao ZF, Ding SQ, Ren F, Kamo I, Sakuragawa N, Li N. Engraftment of human amniotic epithelial cells injected by different routes in the liver. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(5): 775-778.  
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 细胞移植对肝脏疾病具有一定的疗效, 与肝脏移植相比有其自身的优点, 但有多问题尚待解决。

**目的:** 探讨不同途径移植的人羊膜上皮细胞在肝脏内定居情况。

**方法:** 从剖腹产后的人胎盘羊膜中分离人羊膜上皮细胞, PKH26 荧光标记后计数  $1 \times 10^7$  细胞通过大鼠腹腔、门静脉、尾静脉及肝脏内直接注入方式移植入大鼠体内。

**结果与结论:** 门静脉、尾静脉及肝脏直接注入途径移植的细胞均在肝脏内定居, 但移植细胞数过量时造成局部肝组织的缺血坏死等不良反应。腹腔途径移植入体内的细胞未转移肝脏内。通过门静脉移植入体内的人羊膜上皮细胞在大鼠肝脏内维持存活至少 16 d。移植细胞过量时, 导致肝脏血管堵塞及坏死。证明人羊膜上皮细胞至少在大鼠肝脏中存活 2 周, 提示低免疫原性的羊膜来源细胞可成为肝脏病治疗的候选细胞之一。

**关键词:** 羊膜上皮细胞; 细胞移植; 肝脏; 生物材料; 终末期肝病

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.05.004

张海燕, 朴正福, 丁淑芹, 任锋, 加茂功, 樱川宣男, 李宁. 不同途径移植羊膜上皮细胞在肝脏的定居[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(5): 775-778. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

<sup>1</sup>Beijing You-an Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100069, China;  
<sup>2</sup>Beijing Institute of Liver Disease, Beijing 100069, China;  
<sup>3</sup>Department of Regenerative Medicine, School of Allied Health Sciences, Kitasato University, Kanagawa, Japan

Zhang Hai-yan★, Master, Beijing You-an Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100069, China; Beijing Institute of Liver Disease, Beijing 100069, China  
cellzhy@yahoo.com.cn

Piao Zheng-fu★, Doctor, Beijing You-an Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100069, China; Beijing Institute of Liver Disease, Beijing 100069, China  
zfpiao88@yahoo.com.cn

Zhang Hai-yan and Piao Zheng-fu contributed equally to this work.

Correspondence to: Li Ning, Chief physician, Professor, Doctoral supervisor, Beijing You-an Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100069, China; Beijing Institute of Liver Disease, Beijing 100069, China

## 0 引言

终末期肝病有效的治疗方法目前仍是原位肝脏移植, 但供体的缺乏、价格昂贵、免疫抑制剂终身使用等限制了临床广泛应用。细胞移植对终末期肝病及肝脏遗传性疾病具有一定的疗效, 且与肝移植比较具有如下特点<sup>[1-2]</sup>: ①操作简单、安全。②可多次进行移植, 价格低廉。③移植细胞发挥功能快。细胞移植治疗终末期肝病中诸多问题尚待解决, 包括细胞种类、移植途径及数量, 还有移植后定居、增殖分化及肝组织重建等机制。通过不同途径移植人羊膜上皮细胞(human amniotic epithelial cells, hAECs), 比较hAECs在大鼠肝脏定居情况, 为终末期肝病的细胞移植治疗提供必要的实验室

数据。

## 1 材料和方法

**设计:** 体外细胞培养, 细胞移植。

**时间及地点:** 2010-09/2011-04在北京市肝病研究所细胞生物学实验室完成。

**材料:** 健康SD大鼠29只, 雄性, 体质量170~200 g, 购于军事医学科学院, 实验动物许可证号: SCXK-(军)-2007-004, SPF级, 在恒温(25 °C)、光照周期12/12 h环境中饲养1周后进行实验。实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

**羊膜:** 取自剖腹产手术遗弃胎盘, 由北京佑安医院妇产科提供, 实验使用得到医院伦理委

Supported by:  
Science and  
Technology  
Development  
(General Program) of  
Education Committee  
of Beijing, No.  
KM200810025009;  
Science and  
Technology Activities  
Foundation for  
Selected Returned  
Overseas Chinese  
Scholars, No.  
20080015

Received: 2011-07-14  
Accepted: 2011-09-18

员会批准。

**主要试剂:** 荧光染料PKH26购自日本制药株式会社, DMEM/F12培养液购自sigma公司。

**方法:**

**细胞悬液制备及细胞荧光染色:** 在无菌环境下剥取胎盘羊膜, 37 °C下 0.125%胰酶(含 1.3 mmol/L EDTA)消化羊膜3次, 每次 15 min, 收集所有消化液离心, 获得的细胞即 hAECs。所获 hAECs 按荧光染料 PKH26 试剂盒说明书操作进行染色。

**细胞免疫染色:** 提取分离的 hAECs, 在体外进行培养3代。制备  $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$  细胞悬浮液, 24 孔板培养, 每孔 1 mL 细胞液。24 h 后进行固定、封闭等操作。白蛋白染色。在倒置显微镜下观察。

**大鼠分组及细胞移植干预:** 29 只大鼠随机摸球法分为以下 5 组进行不同干预。

**腹腔注射组(n=3):** 直接将细胞悬液注射于大鼠左下腹,  $1 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$  细胞悬液 1 mL。注入后反复轻揉腹部皮肤。

**尾静脉注射组(n=3):** 穿刺前用乙醇反复擦拭, 针头小心刺入尾静脉, 回血后缓慢注入注射  $1 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$  细胞悬液 1 mL, 拔针后局部按压止血。

**门静脉注射组(n=16):** 0.6%戊巴比妥钠按 0.3  $\mu\text{L/g}$  腹腔麻醉后, 将大鼠固定于消毒手术台上, 消毒腹部皮肤, 沿腹正中切口开腹, 显露门静脉主干。1 mL 注射器抽取细胞悬液, 缓慢注入门静脉主干, 轻压门静脉穿刺点止血, 见无明显渗血后, 逐层关腹。术后注意保暖。

**肝脏直接注射组(n=3):** 0.6%戊巴比妥钠按 0.3  $\mu\text{L/g}$  腹腔麻醉后, 将大鼠固定于消毒手术台上, 消毒腹部皮肤, 沿腹正中切口开腹, 显露肝脏, 1 mL 注射器抽取细胞悬液, 缓慢注入肝脏。3 只鼠分别注射高、中、低浓度的细胞悬液( $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ )1 mL。逐层关腹。术后注意保暖。

**对照组(n=4):** 分别经腹腔、尾静脉、门静脉、肝脏注射生理盐水。

为探讨 hAECs 在大鼠体内存活时间, 通过门静脉注射  $1 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$  的 hAECs 后, 分别取门静脉移植组注射后 1~16 d 解剖制作冰冻切片。其他各组均在 3 d 后解剖制作冰冻切片。

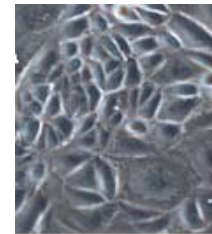
**肝脏组织取材:** 小心切取约 20 mm×20 mm×5 mm 的肝脏左叶组织块, 平铺于大小合适的支撑物上, 包埋剂浸润肝脏组织, 迅速放入液氮中, -80 °C 保存。

**主要观察指标:** 不同注射途径的hAECs在肝脏内定居情况比较。

## 2 结果

**2.1 实验动物数量分析** 纳入29只大鼠, 细胞移植过程中无脱落, 均进入结果分析。

**2.2 hAECs免疫染色** hAECs在体外培养呈多形性, 大多表现为多角形, 见图1a。hAECs白蛋白表达明显, 其表达程度与间充质干细胞和HepG2细胞相比更为显著, 见图1b。糖原染色结果, 羊膜上皮细胞与HepG2细胞和间充质干细胞相比表达更为明显, 见图1c。



a: Morphological observation of hAECs cultured in vitro



b: Expression of albumin in hAECs (Immunostaining)



c: Expression of heparin in hAECs (Glycogen staining)

**Figure 1** Morphological observation of human amniotic epithelial cells (hAECs), expression of albumin and heparin in human amniotic epithelial cells ( $\times 200$ )

**图 1** 羊膜上皮细胞形态学观察、白蛋白表达、糖原表达

**2.3 移植途径结果** 分离后的hAECs染色前后的形态观察, 见图2a, b。对照组图片见图2c。通过尾静脉及门静脉途径移植的细胞均在肝脏内分布, 见图2d, e。细胞移植后各组大鼠活动自如, 无不良反应及死亡。腹腔注射细胞组在大鼠肝脏内未发现染色细胞, 见图2f。肝脏内直接注射移植的细胞, 主要定居在注射部位, 见图2g~i。

<sup>1</sup>首都医科大学附属北京佑安医院, 北京市 100069;  
<sup>2</sup>北京市肝病研究所, 北京市 100069;  
<sup>3</sup>北里大学医疗卫生学部再生医学讲座, 日本神奈川县 229-1131

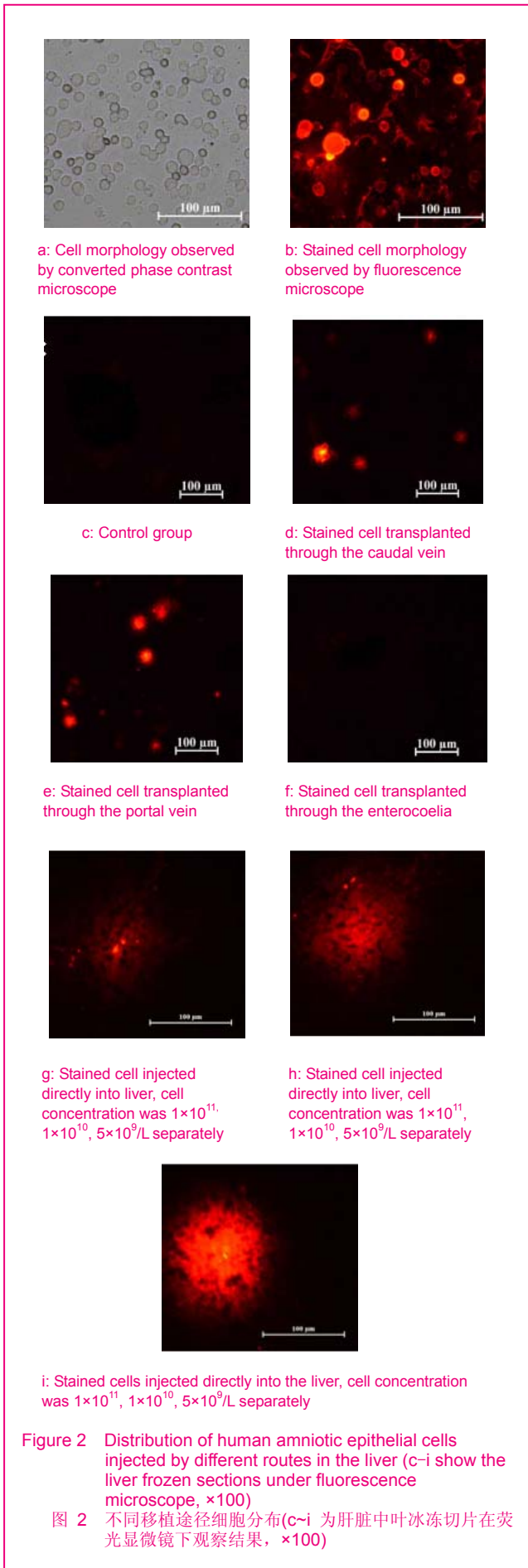
张海燕★, 女, 1980年生, 河北省唐山市人, 汉族, 2004年中国协和医科大学毕业, 硕士, 主要从事肝病基础方面的研究。  
cellzhy@  
yahoo.com.cn

并列第一作者: 朴正福☆, 男, 1965年生, 吉林省吉林人, 汉族, 2002年日本医科大学毕业, 博士, 主要从事肝病基础方面的研究。  
zfpiao88@  
yahoo.com.cn

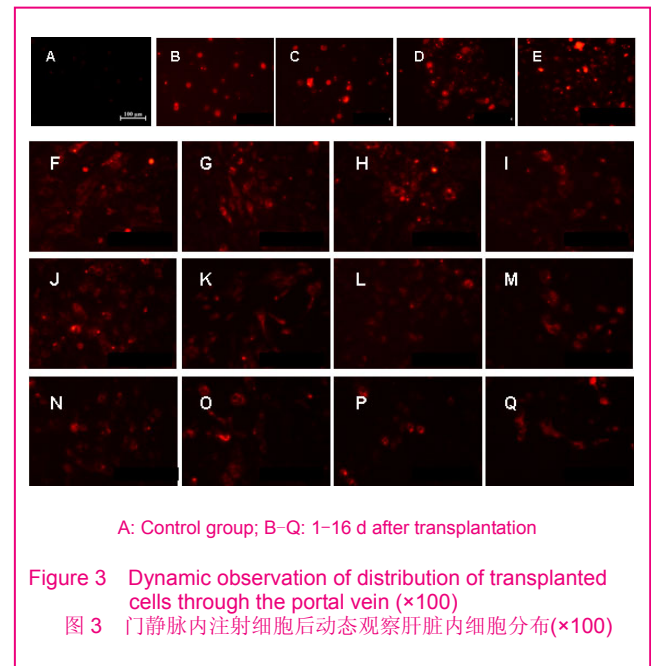
通讯作者: 李宁, 主任医师, 教授, 博士生导师, 首都医科大学附属北京佑安医院, 北京市 100069

中图分类号: R617  
文献标识码: A  
文章编号: 1673-8225  
(2012)05-00775-04

收稿日期: 2011-07-14  
修回日期: 2011-09-18  
(20110614001/D · S)



2.4 移植后细胞生存结果 移植后1~16 d均有完整形态的hAECs, 分布均匀。开始1~7 d细胞数量没有明显的减少, 之后随移植时间延长, hAECs数量逐渐减少, 但仍可见较多形态完整的移植细胞, 见图3。



### 3 讨论

细胞移植首先选择合适的细胞种类、数量及有效的注入途径。间充质干细胞具有很强的自我复制能力和多向分化潜能。这些干细胞移植入肝脏时, ①肝脏组织的微环境下分化为肝细胞或肝细胞样的功能细胞, 发挥正常肝细胞功能。②分泌多种生长因子, 促进肝细胞再生。③有些干细胞直接承担部分肝细胞功能。近年来部分研究表明, hAECs 具有干细胞功能特性, 在某种条件下可诱导转化为神经细胞、心肌细胞及肝细胞。本课题组研究中发现 hAECs 表达白蛋白、糖原等肝细胞特异性标志蛋白(图 1)。hAECs 的优势在于: ①来源丰富, 且分离操作简便, 羊膜中没有神经、肌肉及淋巴管。可在不涉及细胞的水平上轻易将其从绒毛膜上分离。②具有干细胞特性。③MHC I 低表达而不表达 MHC II 抗原<sup>[4-5]</sup>。④羊膜组织系产后废弃物, 不涉及伦理学问题。⑤体外实验已经发现 hAECs 表达多种肝功能特异性转录因子, 如 HNF3, C/EBPa 等, 同时还有肝细胞基因表达, 如白蛋白等<sup>[6-7]</sup>。经本实验证明 hAECs 在不同种族肝脏内能维持存活 16 d 以上, 提示低免疫原性的羊膜来源细胞用于肝脏病治疗时能长时间发挥作用, 适合于治疗终末期肝病的细胞生物材料之一。

至于注入多少细胞才能改善肝功能衰竭的问题, 目前还没有确切的研究报道。临床上一般认为正常人肝脏总细胞数的 1%~5% 足够改善肝功能代谢障碍。正常成

年人通过脾动脉途径安全接受的细胞数为  $6 \times 10^8 \sim 6 \times 10^9$ 。大鼠血管内注入细胞不应超过  $1 \times 10^7$  个细胞数。实验结果表明, 门静脉内或直接肝内注入多于  $1 \times 10^7$  个细胞时可见肝脏表面多处出现淡黄色的坏死灶, 局部肝组织表面苍白, 缺血状态, 提示肝内血管堵塞导致的血运障碍。由此可见, 大鼠实验中门静脉血管途径注入多量细胞时容易引起动静脉栓塞, 并加重肝细胞坏死。本课题组实验数据提示  $(1 \sim 5) \times 10^6$  适合于大鼠门静脉细胞移植研究。

移植部位的选择非常重要, 移植部位的不同直接影响到移植细胞的定居、分化及治疗效果。不同的移植方法存在有一定的不良反应。门静脉内细胞移植可引起门脉高压, 并可阻碍受体肝脏的血液供应, 引起肝脏的梗阻和坏死。但本实验结果提示注入适量的细胞数对门静脉移植是安全的。目前临床上通过介入的方法把细胞轻易注入门静脉内, 是一种较为理想的植入途径。此外, 肝动脉移植途径在临床上也有报道<sup>[8]</sup>, 多采用微创介入的方法进行移植, 具有一定的效果。但在大鼠中应用此方法还有一定难度, 因此本实验中未采取该方法。尾静脉移植方法较为简单, 不需开腹, 移植后肝脏、脾脏中都有一定的分布, 但尾静脉注入的细胞通过血循环到肝脏时细胞丢失较多, 肝脏内定居的细胞数量有限, 很难达到满意的治疗效果。肝脏局部注射优点在于移植细胞无损耗丢失, 细胞直接定位于肝脏。本实验中, 健康 SD 大鼠的肝脏注射过程中未发生肝脏破裂出血现象, 但局部有肝组织缺血坏死的表现。考虑终末期肝病患者肝脏质地脆弱、肝功能及凝血功能明显降低等因素, 此方法仍有一定的危险性。腹腔内移植的肝细胞由于容易使宿主致敏, 大多在短时间内被清除, 血供较差且可能引起腹膜炎或肠粘连<sup>[9-10]</sup>。前期实验研究发现, 虽然腹腔注入细胞未移至肝脏内, 但这些细胞通过分泌各种小分子量的可溶性蛋白或多肽等细胞因子, 发挥抗感染、促进细胞生长和分化、免疫调节等生物学功效, 最终改善肝细胞功能。

实验结果显示, 经门静脉移植的细胞, 沿着汇管区周围分布较多。尾静脉与门静脉途径相比, 肝脏内定居的移植细胞数明显低于门静脉, 这是由于尾静脉途径移植的细胞经过心脏后才流入到肝脏, 因此分布量减少。

反而通过门静脉移植的细胞直接流入到肝内并容易定居在肝脏内。由此可见门静脉途径的细胞移植与尾静脉相比对肝病的治疗中较为理想。虽然实验中动物需要做剖腹, 创伤较大, 但临床上通过介入的方法把细胞顺利注入到门静脉内, 操作方便, 效果好, 并发症少。

移植细胞在体内分布、生存时间及增殖分化能力等

研究是国际上细胞治疗研究的主要问题, 因此这也是我们下一步的主要研究方向。hAECs 作为肝细胞移植的候选细胞, 对肝脏病治疗中的方法及机制在很多细节上需要深入探讨。

**致谢:** 感谢北里大学医疗卫生学部加茂功、樱川宣男教授给予羊膜上皮细胞提取的指导。

#### 4 参考文献

- [1] Sgroi A, Serre-Beinier V, Morel P, et al. What clinical alternatives to whole liver transplantation? Current status of artificial devices and hepatocyte transplantation. *Transplantation*. 2009;87(4):457-466.
- [2] Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A. Hepatocyte transplantation in the treatment of liver diseases - future seems bright after all. *Pediatr Transplant*. 2008;12(1):4-5.
- [3] Whittle WL, Gibb W, Challis JR. The characterization of human amnion epithelial and mesenchymal cells: the cellular expression, activity and glucocorticoid regulation of prostaglandin output. *Placenta*. 2002;21(4):394-401.
- [4] Sakuragawa N, Tohyama J, Yamamoto H. Immunostaining of human amniotic epithelial cells: possible use as a transgene carrier in gene therapy for inborn errors of metabolism. *Cell Transplant*. 1995;4(3):343-346.
- [5] Akle, CA, Adinolfi M, Welsh KL, et al. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet*. 1981;2(8254):1003-1005.
- [6] Koyano S, Fukui A, Uchida S, et al. Synthesis and release of activin and noggin by cultured human amniotic epithelial cells. *Dev Growth Differ*. 2002;44(2):103-112.
- [7] Takashima S, Ise H, Zhao P, et al. Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions. *Cell Struct Funct*. 2004;29(3):73-84. [8] Yao P, Hu DR, Wang S, et al. *Shiyong Yixue Zazhi*. 2005;21(9):2143-2145.
- [8] Yao P, Hu DR, Wang S, et al. *Shiyong Yixue Zazhi*. 2005;21(19):2143-2145.
- [9] 姚鹏, 胡大荣, 王帅, 等. 自体骨髓干细胞移植治疗慢性重症肝病 60 例 [J]. *实用医学杂志*, 2005, 21(19):2143-2145.
- [9] Wu XB, Han BS, Zhang R, et al. *Zhongguo Zazhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2009;13(53):10517-10520.
- [10] 吴旭波, 韩三宝, 张瑞, 等. 肝细胞移植的临床应用 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(53):10517-10520.
- [10] Ahrlund-Richter L, De Luca M, Marshak DR, et al. Isolation and production of cells suitable for human therapy: challenges ahead. *Cell Stem Cell*. 2009;4(1):20-26.

#### 来自本文课题的更多信息--

**基金声明:** 北京市教育委员会科技发展计划面上项目 (KM200810025009); 留学人员科技活动择优资助 (20080015)。

**作者贡献:** 李宁进行实验设计, 张海燕, 朴正福, 丁淑芹进行实施, 张海燕成文, 朴正福修改。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理批准:** 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

**本文创新性:** 检索 CNKI, PubMed 数据库, 检索时间 1981-0/2011-05, 检索关键词设定为: 羊膜上皮细胞、细胞移植、肝脏。人羊膜上皮细胞提取技术为本文创新点之一。本文采用多种移植方法比较, 系统分析了常见几种移植途径的优缺点。