

终末期肝病干细胞与组织工程修复的关键策略



胡德宇^{1,2}, 闫敏^{1,3}, 林恒¹, 赖洁娟¹, 杨志清¹, 帅领¹, 孙哲⁴, 张宏宇¹, 张雷达¹, 李哲海^{4,*}, 白莲花^{1,2,3,*}

¹陆军军医大学第一附属医院全军肝胆外科研究所肝胆外科, 重庆 400038

²重庆大学生物工程学院, 重庆 400044

³山西医科大学第一附属特种医学部, 山西太原 030000

⁴北京大学第三附属医院骨科, 北京 100191

摘要: 终末期肝病 (ESLD) 是各种慢性肝脏疾病的终结点, 临床发病和死亡率均高, 目前尚无有效根治药物。肝移植 (LTx) 是 ESLD 最佳治疗方案, 但限于肝源供体束缚了 LTx 展开。为解决这一瓶颈问题, 研究者们努力探索, 相继尝试了人工肝、干细胞、生物组织工程肝、异种移植肝等技术以期对 ESLD 修复替代的治疗作用, 尤其成体干细胞干预和采用脱细胞化/再细胞化工程策略构建功能性大体积肝组织近年备受关注, 且这项技术已成为当今构建复杂器官的首选。前期我们在中华消化外科杂志上就脱细胞肝支架材料优化工程肝与 ESLD 替代治疗方面讨论了几点问题。现就 ESLD 干细胞干预, 以及其作为种子细胞在脱细胞肝支架重建肝组织主要结构修复替代等问题研究进展、面临挑战和未来预期进行予以综述, 希望领域内人们有所启发, 为解决干细胞移植疗效不稳定和肝源短缺问题提供思考。

关键词: 组织工程; 终末期肝病; 肝移植; 干细胞; 脱细胞支架; 肝内胆管; 肝血窦

DOI: [10.57237/j.mrf.2023.01.003](https://doi.org/10.57237/j.mrf.2023.01.003)

Key Issues and Novel Strategies of Stem Cell Intervention and Decellularized Scaffold Liver Tissue Engineer for End-Stage Liver Disease

Hu Deyu^{1,2}, Yan Min^{1,3}, Lin Heng¹, Lai Jiejuan¹, Yang Zhiqing¹, Shuai Ling¹, Sun Zhe⁴, Zhang Hongyu¹, Zhang Leida¹, Li Zhehai^{4,*}, Bai Lianhua^{1,2,3,*}

¹Hepatobiliary Institute, Southwest Hospital, Army Medical University, Chongqing 400038, China

²Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400044, China

³Department of Special Medicine, Shanxi Medical University, Taiyuan 030000, China

⁴Department of Orthopaedics, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

基金项目: 国家自然科学基金 (no. 81873586); 陆军军医大学创新项目 (no. 2021-20180-52);
重庆市重点项目 (no. cslc2018jscx-mszdx0016).

*通信作者: 白莲花, qqg63@outlook.com; 李哲海, lizhehai0472@163.com

收稿日期: 2022-12-09; 接受日期: 2023-02-09; 在线出版日期: 2023-02-16

<http://www.medresfront.com>

Abstract: End-stage liver disease (ESLD) is ultimatum of all kinds of chronic liver diseases. It is highly morbidity and mortality disease and currently no effective treatment is available. Liver transplantation (LTx) is the only way for the treatment. However, the organ source limitation interferes with clinical application of LTx. For the goal of crossing liver source shortage barrier, researches attempt to explore techniques or methods like stem cells and tissue engineering, and recent years sounds developed rapidly and bright prospects, for example, artificial liver, tissue-engineered liver and xenotransplantation etc., in particular adult stem cells like bone marrow-derived mesenchymal stem cells ($_{BM}MSCs$) and decellularized liver scaffold for large scale liver tissue engineer seems more eye-catching, and such decellularization / recellularization technology used has become the first strategy to build complex organs. We have previously discussed some points in the <Chinese Journal of Digestive Surgery> about optimizing bioscaffold materials that probably will be beneficial for tissue engineer. In the present review, we would like to discuss some new developments based on research status and provide a little new thoughts, hopefully those can help people in this field in order to treat ESLD in the near future.

Keywords: Tissue Engineering; End-Stage Liver Disease; Liver Transplantation; Stem Cells; Decellularized Liver Scaffold; Biliary Epithelial Cells; Hepatic Sinusoid

1 引言

终末期肝病 (End-stage liver disease, ESLD) 是一种以肝功能异常及全身表现为特点的临床综合征。包括急性肝衰竭 (acute liver failure, ALF) 和失代偿期肝硬化 (decompensated liver cirrhosis, DLC), 是临床常见和病死率较高的疾病, 严重威胁人类健康。在我国肝病高发, 据统计, 各类肝病患者达 1 亿余, 现有 ALF、DLC 等患者约 800 余万例, 每年约有 50 万患者死于 ESLD, 死亡率高达 50%-70% [1]。ESLD 由多种原因所致。首要病因是乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV), 感染者高达 9300 万例, 在肝移植 (liver transplantation, LTx) 受者中 HBV 相关肝病患者约占 71.25% [2]; 其次是肝毒性物质。在欧美国家, 药物和乙醇是引起 ESLD 的主要原因[3, 4]。儿童中 ESLD 常见于遗传代谢性疾病[5]。近年, 肥胖性、非酒精性肝硬化所致全球 ESLD 发病率逐年增高, 也不容忽视[6]。迄今对于 ESLD 患者, 药物治疗非常有限[7]。

肝移植 (LTx) 是 ESLD 治疗的唯一有效手段, 但受供肝来源限制, 仅有不到 1% 的待肝患者受益治疗[8, 9]。尽管我国近年捐献率有所上升 (从 2010 年的 0.03% 升至 2017 年的 3.72% [10]), 但与国际器官捐献率相比依然是最低捐献国家之一。此外, 限于供肝质量、移植术后并发症、管理等系列因素依然制约 LTx 疗效的进一步改善[11]。因此, 为解决这些热点问题, 研究者们亟待发展更多新的 LTx 替代治疗方案和建立关键技术。例如, 相继开展了干细胞干预、组织工程肝、混合型人工肝、异种 LTx 等技术修复替代。尤其近年提出的再生外

科学理念[12], 采用优化脱细胞肝支架再细胞化的新型成体组织干细胞, 用于构建功能性主要组织结构, 如肝内胆管和窦状结构肝再生研究, 均有可喜的进展。本文就此研究中优劣、关键问题和未来预期给予系统简述和探讨, 为 ESLD 干细胞干预和替代治疗提供思考。

2 干细胞异质性与疗效提升

干细胞是指一类具有自我复制和功能分化等多潜能细胞群, 按起源主要分为胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs), 多能诱导干细胞 (induced pluripotent stem, iPS) 和成体干细胞 (somatic stem cells, SSCs) [13]。鉴于 SSCs 对比 ESCs 和 iPS 易获取、伦理争议少、致瘤风险低、组织相容性好等优点[14], 成为当今干预 ESLD 基础和临床研究的热点, 例如骨髓间充质干细胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, $_{BM}MSCs$) 属于成体 SSCs。

2.1 $_{BM}MSCs$ 临床治疗效果不稳定关键问题-异质性

$_{BM}MSCs$ 起源于中胚层, 是中胚层发育的早期细胞, 存在于骨髓基质内的非造血细胞来源的细胞群, 经体外扩增和诱导后可多向分化如成骨、成脂、成软骨等, 且具备低免疫原性和多分化潜能。 $_{BM}MSCs$ 是学术界较为认可和临床研究用以治疗 ESLD 相对较多的

干细胞群[15]。然而临床研究显示,虽然 BM MSCs 治疗可以不同程度改善ESLD肝功能,但治疗效果参差不齐,严重影响了治疗效果,目前机制不清。大量研究基础和临床研究提示,治疗效果不稳定的根源可能是 BM MSCs 的异质性所致[16]。

所谓异质性从遗传学角度定义是指一种遗传性状可以由多个不同的遗传物质改变所致[17]。从干细胞脚底定义是指混合细胞群体中存在不同功能特性亚群细胞[18],主要分为表型异质性和功能异质性。 M MSCs 异质性而言可以形象理解为: BM MSCs 好像“修复工程师”负责协调身体内各类损坏零件修复以重复使用。 BM MSCs 等干细胞疗法就相当于通过在体外“培训(培养)”各类工程师补充到体内“各尽其责”。在此过程中,每位工程师受环境因素影响反应不尽相同,表现个体差异,这种同源但是个性不同的细胞集群构成了 BM MSCs 等干细胞的异质性。 BM MSCs 的异质性可以在其原代培养中观察到。例如,贴壁培养的 BM MSCs 呈现克隆大小不一的混合细胞群体,主要呈现为成纤维细胞状的较小梭形和胞体宽大扁平上皮细胞形状[21]。人类 BM MSCs 的异质性由德国科学家Bühring等在2003年首次报道[19],2017年被美国生物学家Caplan教授正式命名[20]。2001年Prockop研究团队[22]从形态学角度将培养中较小梭形 BM MSCs 分型为自我更新活跃型,即非成熟型或I型,而将宽大扁平上皮状 BM MSCs 型定名为衰老型,即成熟型或II型,提示,不同形态 BM MSCs 可能与不同功能特性或因子表达谱差异有关,即该项研究提示了 BM MSCs 中功能异质性亚群。

2.2 BM MSCs 异质群体中存在增殖活跃表达 NG2 表型的亚群

2013年美国Connor研究团队在人类 BM MSCs 中发现了一种表达神经胶质2型抗原(neuro-glial antigen 2, NG2)侧群细胞(side population, SP)[23]。NG2抗

原是一种中枢神经系统(central nervous system, CNS)干细胞的经典标志物[24]。研究显示,它也可以作为多器官组织成体干细胞标志物[Zhang et al 2013]。Connor等采用免疫荧光靶向增殖标志物Ki-67和流式细胞仪检测发现,表达NG2阳性的侧群细胞($\text{NG2}^+/\text{SP}$)相对亲本 BM MSCs 增殖活性[23]。根据其它生物体研究显示的NG2阳性干细胞从形态学角度显著大于梭形 BM MSCs [Lai et al 2021]我们推测, BM MSCs 中扁平宽大的表达NG2阳性的细胞亚群可能是非成熟型,与Prockop研究团队[22]观点有所不同,有待深入研究。

2.3 从 BM MSCs 异质群体中分离纯化 NG2 表型亚群细胞的新技术

针对限于从异质 BM MSCs 群体纯化 $\text{NG2}^+/\text{SP}$ 方法,我们研究团队研发了一种具有自主知识产权的原创技术(Percoll-Plate-Wait procedure)[25],从培养中的(动物、人类) BM MSCs 异质群体中成功纯化了 $\text{NG2}^+/\text{SP}$ 亚群细胞(本文暂命名为 $\text{NG2}^+/\text{BM MSCs}$) (图1)。我们的研究结果显示,纯化后的 $\text{NG2}^+/\text{BM MSCs}$ 亚群除表达 BM MSCs 特异标志物CD73、CD90、CD105(>95%)、CD45(<2%)外,NG2抗原表达率高达>95%(尚未发表的数据),表明该方法的高效纯化。从形态学观察我们发现,小鼠和人类 BM MSCs 纯化的 $\text{NG2}^+/\text{BM MSCs}$ (图2,左图)是 BM MSCs 异质群体中的扁平宽大状(宽箭头,图2,中图),明显大于梭形细胞(细箭头,图2,右图)。采用免疫荧光检测增殖活性,发现标记Ki-67数量明显多于亲本 BM MSCs (尚未发表的数据),进一步提示 BM MSCs 中扁平宽大的表达NG2阳性的细胞亚群可能是非成熟型。近期我们将纯化的 $\text{NG2}^+/\text{BM MSCs}$ 和亲本 BM MSCs 分别移植入肝胆损伤动物模型进行治疗发现, $\text{NG2}^+/\text{BM MSCs}$ 对比 BM MSCs 显示改善肝功能优势(尚未发表数据),提示 $\text{NG2}^+/\text{BM MSCs}$ 提升 BM MSCs 治疗EDLS功效的可能性。

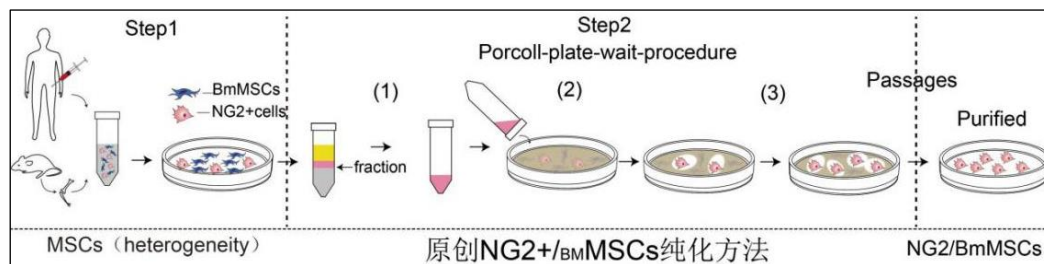


图1 原创方法分离 $\text{NG2}^+/\text{BM MSCs}$ 亚群干细胞流程

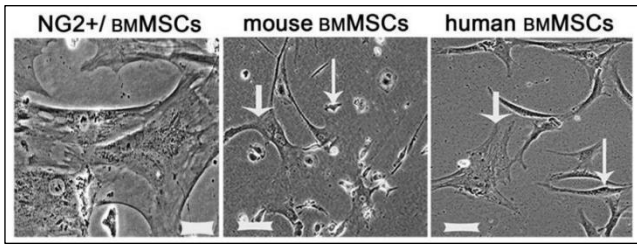


图2 源于小鼠和人类的 NG2⁺/BM MSCs 亚群干细胞形态学特征

由于存在 BM MSCs 异质性导致临床治疗不稳定, NG2⁺/BM MSCs 表型异质亚群的纯化方法在基础研究和临床提升疗效方面均具有重要意义。同时 NG2⁺/BM MSCs 可能也会成为脱细胞肝支架组织工程肝主要结构构建提供优于 BM MSCs 的新型种子细胞。

3 干细胞与脱细胞肝支架组织工程肝主要结构构建与修复替代治疗

组织工程概念是在 1987 年由美国麻省理工学院 Langer 和马萨诸塞州立大学医院 Vacanti 等首次定义[26],是指运用生命科学与工程学原理与技术,创造新的生物类型和改造生产方式,研究和开发用于修复人体损伤组织或器官、恢复形态和功能的生物替代物的一门新兴学科[27],其核心是采用工程学原理建立由细胞和生物材料构成的三维(three dimension, 3D)空间复合体[28],以达到器官和组织的完美修复。目前干细胞与组织工程领域发展迅速,已成为再生医学研究的核心内容和主要研究方向,如在肝、心、肺等生物工程化人工器官等研究方面均取得了一定的成果,尤其在采用实体器官首选技术-脱细胞化/再细胞化策略构建复杂器官主要组织结构如组织工程肝内胆管、窦状结构等方面有了新的进展。本部分就此研究现状和新发现予以聚焦讨论。

3.1 成体种子干细胞胆管细胞分化与脱细胞肝支架组织工程肝胆管修复重构

胆管系统是由胆管上皮细胞(Bile duct epithelial cells, BECs)组成,是肝脏器官主要结构之一,衬附肝内外胆管系统。BECs 占肝细胞总数的 3%-5%,构成了对抗微生物的第一道防线[29]。ESLD 或手术均可导致

胆管损伤和狭窄,对其修复重建是再生医学和外科学领域面临的一道难题。损伤胆管修复重建需要合适的种子细胞。研究显示, BECs 是最为理想种子细胞,但由于其体外增殖能力弱,不易培养,难以提供研究所需细胞量[30],为此,人们考虑选择干细胞作为 BECs 替代品。BECs 特征性标记物为细胞角蛋白(Cytokeratin, CK)中间纤维蛋白家族,成员众多、分布广泛。根据组织来源和免疫原性主要分为角蛋白(Keratin)、结蛋白(Desmin)、胶质原纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acidic protein)、波形纤维蛋白(Vimentin)、神经纤维丝蛋白(Neurofilament protein)和核纤肽(lamin)5类。CK 家族是免疫组织化学中较为常用的分子标记物,例如如 CK19、CK7、CK18 等[31]。

BM MSCs 是目前较为公认的组织工程理想种子细胞,选择其作为 BECs 替代品诱导分化 BECs 的研究倍受关注[32]。研究者们对修饰 BM MSCs 培养微环境加以修饰,以期获得理想转换。例如,人们尝试在正常条件培养中增添相应营养因子(trophic factor, TF)如丙戊酸钠(Sodium valproate, VPA)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、白细胞介素 6(IL-6)、Insulin growth factor like-I (IGF-I)等[33, 34];或选择将这些 TF 相互组合如 HGF 与 VPA, HGF 与 EGF 等方法长时间双重诱导,发现表达 BM MSCs 的 BEC 转化效率明显提升[35],表明 BM MSCs 在特定条件下的 BECs 分化潜能。然而问题是,常规条件下 BM MSCs 转化效率仍然较低,如上述研究的转化至少需要 6 周时间,这种低效率增加了深入了解 BM MSCs 功能和及其在疾病中作用的难度。

对此,人们尝试在发育微环境中诱导 BM MSCs 向 BECs 转化发现明显加快。例如将 BM MSCs 与发育期小鼠肝上清液并用营养因子(IF)共培养,发现短时间内形态学改变,高表达 CK19(胆管细胞标志物)和相关基因,且表达量随时间延长而逐渐成上升趋势[35],为 BM MSCs 在肝发育环境下向 BECs 快速和高效分化提供了实验证据,同时也表明模拟肝胚胎或发育过程采用多因子联合逐步刺激 BM MSCs,可提高转化效率,使其向 BECs 方向分化,也是目前人们选择与肝发育相关因子诱导 BM MSCs 向 BECs 分化原因所在[33, 34]。

我们近期一项对比研究显示[36],肝外骨髓来源的 BM MSCs 对比肝内来源的干细胞在肝损伤微环境下体内 BECs 分化优势,提示髓来源的 BM MSCs 肝损伤修复可能与 BECs 修复重构胆管有关。为了证实此点,我们将 NG2⁺/BM MSCs 和亲本 BM MSCs 分别共培养与肝损

伤条件培养基意外发现, 虽然两种干细胞均表现 BECs 分化能力, 但形态学和免疫荧光染色检测均显示 $NG2^{+}/BMSCs$ 的明显优势, 仅 1-2 小时, $NG2^{+}/BMSCs$ 形态学明显改变, 从原本扁平宽大上皮状 ($NG2^{+}/BMSCs$, 粗箭头) 向蚕豆样转换 (BECs, 方框中) (图 3A), 而在此短时间内 $BMSCs$ (梭形, 细白箭头) 的变化甚微 (图 3B); 从 $NG2^{+}/BMSCs$ ($NG2$, 红色) 分化的 CK19 阳性细胞 (绿箭头, 绿色) (图 3C, 棕色, Merged, 方框中) 也明显多于 $BMSCs$ ($CD90$, 红色) (图 3D, 棕色, Merged) (尚未发表数据)。在发育微环境中 $NG2^{+}/BMSCs$ 也表现出类似结果, 其机制可能与 cEBPs/IL-6 通路相关[36]。

这些研究高度提示, $NG2^{+}/BMSCs$ 作为 BEMs 新型种子细胞损伤胆管修复重建可能性及对比 $BMSCs$ 的分化优势。

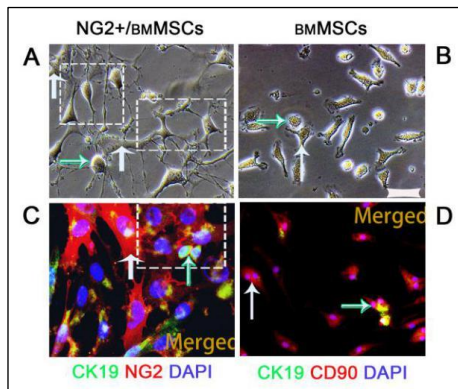


图 3 $NG2^{+}/BMSCs$ 亚群干细胞向胆管上皮细胞 (BECs) 分化优势

3.2 肝窦内皮细胞种子细胞选择与肝窦状结构修复重构启动组织工程肝再生

肝血窦内皮细胞 (liver sinusoidal endothelial cells, LSECs) 是肝脏器官的另一主要结构之一, 构成肝血窦 (hepatic sinusoid)。肝血窦是一种特殊的毛细血管, 是相邻肝板之间的腔隙 (称窦周隙, Disse 腔), 通透性较大, 故称肝血窦内皮细胞 (liver sinusoidal endothelial cells, LSECs) [45]。窦腔隙内充满血浆, 有利于肝细胞与血流 (血浆) 之间进行物质交换。肝血窦内壁由内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 构成。ECs 或血管 ECs 是分布在脑、肝、肺、淋巴结、脾等器官组织中的一些有共同特点的上皮细胞总称, 是沿着整个循环系统, 由心脏直至少的微血管。研究显示, ECs 的种子细胞来源

是当今血管组织工程瓶颈问题, 而 ECs 是解决这一瓶颈的关键[37], 而目前认为, $BMSCs$ 是组织工程中尤其是血管组织工作中不可替代的内皮细胞来源, 故在组织工程血管修复构建中具有重要价值[38]。

选择 $BMSCs$ 作为种子细胞向血管内皮细胞分化在 1999 年被 Zaia 研究团队首次报道[39]。Zaia 等采用 SH2 单克隆抗体发现 $BMSCs$ 特异性抗原 endoglin (CD105) 在 ECs 中的分布, 首次证明 $BMSCs$ 与 ECs 有关性, 继而表明与血管发育的相关性。随后陆续被报道的 $BMSCs$ 的 ECs 分化研究备受瞩目。人们在培养环境中添加血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF), 转化生长因子 (transforming growth factor- β , TGF- β), 血管生成素 II (Angiopoietins, Ang-II), 或通过各种组合等方法发现, $BMSCs$ 通过向内皮细胞增殖和分化促进血管形成, 表明 $BMSCs$ 与血管发育和形成有关[40]。然而值得注意的是, 迄今对 ECs 标志物的选择因为繁多比较混乱, 尤其对选择血管内皮细胞粘附分子 PECAM/CD31、CD34, 生长因子受体转录因子 GATA-2/3, AC133/CD133 细胞表面标志 (血管/定向造血干细胞的表面标志) 等。值得提示的是, CD34, CD31 和 vWf 是目前血管 ECs 较为公认的标记物[41]; 常规培养中的 $BMSCs$ 不表达 CD31 和 CD34 [42]。

我们近期对比研究提示, 选择 $NG2^{+}/BMSCs$ 作为 ECs 种子细胞优于 $BMSCs$ 的可能性和可行性。我们在研究中首先证实了 $BMSCs$ 的确不表达 CD31 和 CD34, 但对于 $NG2^{+}/BMSCs$ 对 CD31 略有表达 (>2.5)。介于知悉外周血内皮前体细胞表达 CD31 [52]我们推测, CD31 可能与血管 ECs 分化成熟有关。根据上述 $NG2^{+}/BMSCs$ 的非成熟型我们推测, $NG2^{+}/BMSCs$ 可能是内皮细胞祖先细胞。对此, 我们做了一些对比实验研究。体外实验, 我们将细胞分别与添加 VEGF 条件培养基共培养, 发现 $NG2^{+}/BMSCs$ ($NG2$ 绿色) 向 ECs (vWf^{+} 红或绿色, 红色箭头示意 ECs) 分化效率 (图 4A) 明显强于 $BMSCs$ ($CD90$ 红色) (图 4B), $NG2^{+}/BMSCs$ 还有明显的血管形成 (图 4A, 方框示意) 而未见于 $BMSCs$ 组别 (尚未发表数据)。体内实验采用化学制剂诱导胆管损伤动物模型转输色彩标记细胞我们发现, 4 周后免疫荧光检测发现, 两者均可分化为表达 CD31, CD34, 和 vWf 的 ECs。但与 $BMSCs$ 相比, $NG2^{+}/BMSCs$ 具有更好分化活性。重要的是, 我们在肝脏局部检测到了促肝再生的细胞因子如 HGF、TGF- α 、IL-6、VEGF 等 (尚未发表数据), 提示肝血窦的修复和重建可能改变了微环境继而启动了肝再生[43, 44]。

这些实验证据为 $NG2^{+}/_{BM}BSCs$ 作为优于 $_{BM}BSCs$ 新型 ECs 前体祖先种子细胞在脱细胞肝支架重构肝血窦结构重启肝再生, 奠定了理论和实验基础。

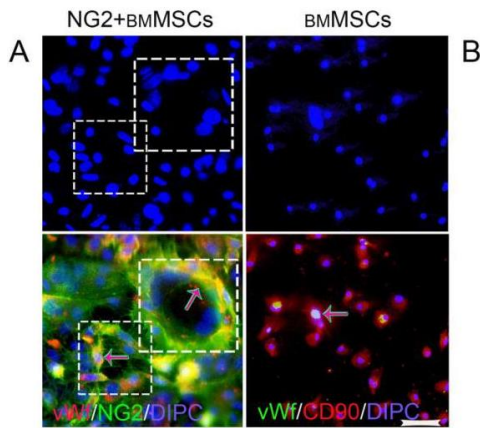


图 4 $NG2^{+}/_{BM}BSCs$ 亚群细胞向血内皮细胞 (ECs) 分化优势

4 脱细胞肝支架组织工程肝关键问题和对策

脱细胞肝支架 (decellularized liver scaffold, DLS) 是指通过物理、化学、酶等方法对肝脏器官进行无细

胞处理获得的一种生物支架材料。目前, DLS 已成为组织工程复杂肝组织研究的核心方向, 具有强大转化价值[45, 46]。与人工合成型生物材料如分子聚合物聚乳酸、聚己内酯、聚乙二醇等相比, DLS 即完好保留了肝脏的主要细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 成分, 也很好保存了肝内脉管结构, 使其最大限度还原肝内肝细胞生长微环境, 为种子细胞生长、分化、衍生为类肝样器官组织提供了适宜的生物微环境。另外, DLS 具备低免疫原性和高组织相容性等优势, 是肝脏再生理想的生物材料[47]。脱细胞肝支架组织工程肝核心技术是脱细胞化/再细胞化技术, 其策略是利用脱细胞化 DLS 和再细胞化种子细胞在 3D 培养体系中构建的组织工程肝脏 (图 5), 构建的类肝组织可以在一定程度上模拟肝脏的合成、解毒、代谢和分泌等生理性功能, 可经体内移植治疗 ESLD [48], 是实体器官组织工程领域的研究热点, 已为当今构建复杂器官的首选技术[49]。DLS 分为全肝或正常 (normal) 肝 DLS (nDLS) 和部分肝/或再生期 (regeneration) 肝 DLS (rDLS) [50]。本部分就 nDLS、rDLS 在肝组织工程研究方面优劣和关键问题以及相应措施进行讨论。

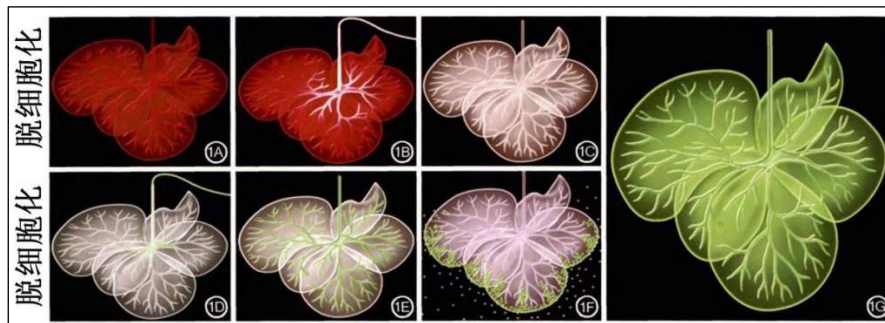


图 5 脱细胞肝支架再细胞化组织工程肝脏器官构建策略

4.1 nDLS 组织工程肝关键问题-凝血

nDLS 是通过上述灌注方法对完整肝脏器官进行脱细胞处理获得的生物支架材料, 是目前学术界常用以多细胞联合种植肝支架材料。nDLS 用于多细胞联合种植构建组织工程类肝组织发起于美国 UYGUN 研究团队[51]。2010 年 UYGUN 等首次将再细胞化的 nDLS 进行大鼠体内移植, 虽然移植物仅存活 8 小时, 但此项研究起到了引领作用, 开拓了脱细胞肝支架生物组织工程肝替代治疗领域, 激发了众多随后的研究。例如, BAO [52]和我们实验室[53-55] [2015; 1x 2018]先

后将再细胞化的 nDLS 植入预先经 90%肝切的大、小鼠体内, 72 小时后移植物仍保持活性, 并表达肝功能相关蛋白和基因。

总结这些实验发现了移植后系列问题。例如小肝综合征 (Small-for-size Syndrome, SFSS) [56], 一种移植导致的肝功能不全临床现象, 可以通过门脉和肝血窦减压加以改善[57]。然而, 是 nDLS 内凝血成为棘手问题, 是决定移植物是否长期有效存活的关键问题。虽然目前学术界采用众多方法如内皮细胞化[58, 59]、肝素化[60]、抗凝药物[61]等尝试解决 nDLD 凝血问题, 但仍未取得实质性进展。

4.2 优化 nDLS 支架材料是解决凝血问题对策之一

支架材料优化是指可以改善用于再生受损和有缺陷组织的细胞的迁移、增殖、分化和生长的技术,是组织工程程序成功的关键因素。根据众多 nDLS 研究我们推测,nDLS 的“劣势”可能是其 ECM 成分相对处于“静息状态”,缺乏“生物活性微环境”,影响对种子细胞的向 nDLS 招募和兼容,缺乏特异性,故需要修饰予以优化或特化,促使种子细胞定向迁移促进黏附、提高增殖活性、存活效率和功能分化。为了这一目标,我们做了许多相关研究,研发了一种具有自主知识产权的新支架,称之为部分肝或再生期(regeneration)肝脱细胞支架。其核心技

术是先行 15%~30% 的肝切除术(partial hepatectomy, PHx), 1-5 天后,再实施灌注方案获取的去细胞肝支架。由于该支架取之肝脏再生期(术后 1-5 间),故称为去细胞再生肝支架(rDLS)。研究显示,与 nDLS/ECM 对比 rDLS/ECM 中具备急性肝再生微环境和多种再生所需细胞因子如 HGF、TGF- α 、IL-6、EGF、ALR、VEGF 等。重要的是,rDLS/ECM 抗凝的显著优势。实验中我们采用近红外激光多普勒流量测量血氧饱和度(SO_2 ,%,图 6A)和血流速度(AU,图 6B)发现,rDLS/ECM(红线)比 nDLS/ECM(黑线)具有明显的血/氧亲和和血流通畅性,表明 rDLS/ECM 支架材料表面的“天然抗凝修饰效应”,这种效应不仅在生物医学领域中[62],而且在新兴的再生外科学领域中均具有重要应用价值。

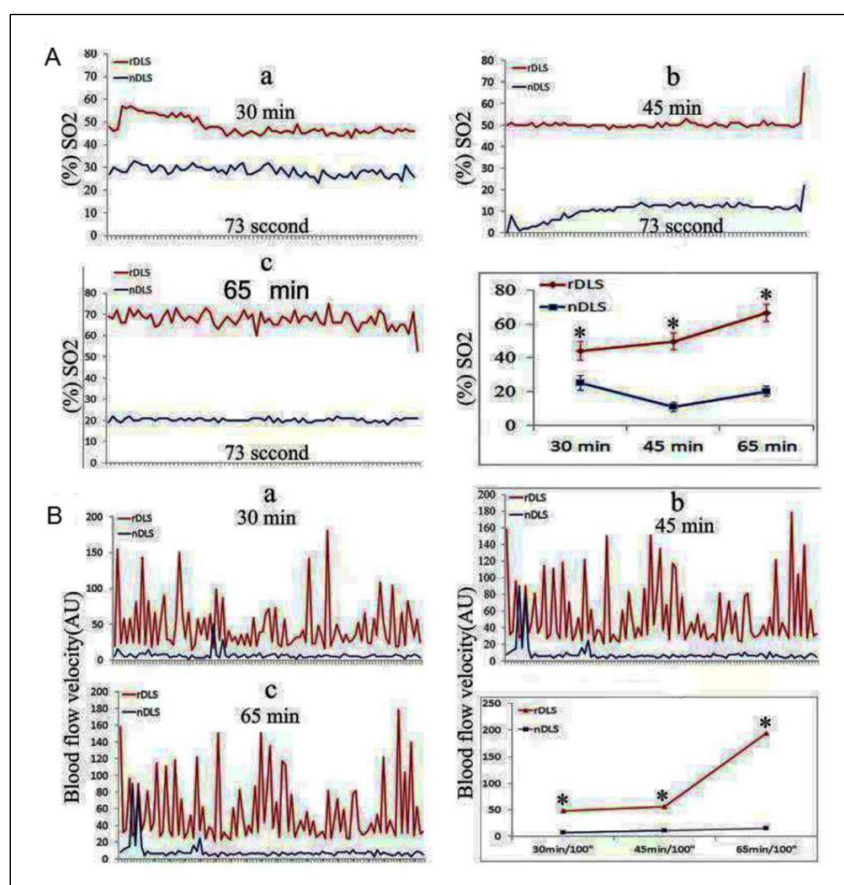


图 6 多普勒仪检测验证再生脱细胞肝支架(rDLS)对比常规脱细胞肝支架(nDLS)血流-功能重建优势(体内血氧饱和及流速)

4.3 肝支架的再细胞化技术

脱细胞肝支架的再细胞化是组织工程肝构建面临的另一关键问题。以往学术界[63, 64]和我们[55]团队的研究均显示了 nDLS 上类肝组织的形成,且诱导过程与

体内肝脏发育过程相类似。

虽然迄今为止尚无脱细胞肝支架人类肝组织报道,但已有研究将人 iPS 来源的肝样细胞、间充质干细胞和内皮细胞混合培养于基质材料内,细胞可自行组装成功功能性 3D 肝芽样聚合物[65],表明人源组织工程肝的可能性。我们利用人脐静脉内皮细胞(门静脉注射)、人类

BM MSCs（门静脉、胆管注射）和肝脏干细胞对猪的肝 rDLS 再细胞化，体外 3D 培养发现形成大体积类肝组织（肝叶）[12]。免疫荧光双染色发现有基于人类 BM MSCs 形成的胆管（CK19⁺）和肝血窦（CD31⁺）结构（尚未发表数据）。体内移植后发现，18 天未见血栓形成，同时显示凝血因子对比 nDLS 显著低表达[50]，由此可见多细胞联合种植在组织工程肝构建中的重要性以及多途径注射可能会有效阻止血管腔内血栓形成[66]。

总之，解决 nDLS 体内移植凝血问题，促进 nDLS 优化。随着对新生血管形成机制的全面深入了解和掌握，可以进一步优化细胞的培养及再细胞化方案；明确多种联合培养细胞的种植比例和多途径注射；评估支架进行体内移植的时机；通过完善上述研究关键问题促进支架内“血管化”形成，为功能性脱细胞组织工程肝体内移植修复替代治疗奠定理论和实验基础。

5 结论

总而言之，终末期肝病是目前领域备受关注的重大疾病。科学家们正在积极探索其关键瓶颈问题和相应对策（以下框图）。例如在纯化干细胞解决异质性获取高效干细胞提升疗效损伤修复方面，在无细胞肝支架重建胆管、肝血窦结构启动工程化类肝组织器官形成功能替代方面（以下 Cartoon 图）进展显著。另外在人工肝、异源器官先进技术以及精准靶向治疗等方面，未来预期可盼。

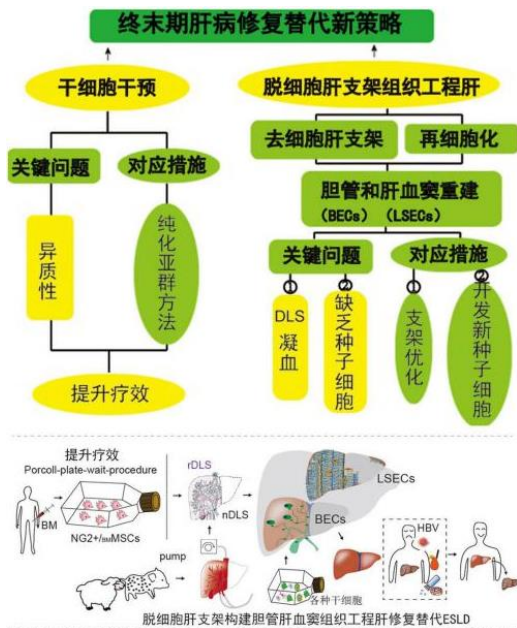


图 7 新型干细胞疗效提升及其肝脏器官工程功能替代示意图

展望

干细胞与组织工程肝 ESLD 修复替代治疗展现了良好的应用前景，但在目前的研究基础上仍有许多挑战：（1）目前能用于肝病治疗的干细胞种类偏少，应继续开发新的可用于临床治疗和生物工程肝种子细胞；（2）深化对 ESLD 再生机制的基础研究；（3）建立在病理和生化指标上更接近临床 ESLD 的动物模型，如胆管和肝窦损伤；（4）解决脱细胞生物支架和体内移植凝血问题，促进支架的血管化形成，供-受体血流功能重建，为功能性组织工程肝脏的体内移植治疗奠定基础，尽早实现生物人工肝的临床转化。我们相信，随着再生外科学医学与转化医学的进步，对于 ESLD 的干细胞与生物工程肝修复替代治疗有着光明的未来，必将彻底解决肝源短缺问题，最终造福 ESLD 患者。

文题释义

终末期肝病：是指以肝功能异常及全身表现为特点的临床综合征，包括急性肝衰竭和失代偿性肝硬化。

干细胞：是指一类具有自我复制和分化潜能的细胞群，按起源主要分为胚胎干细胞，多能诱导干细胞和成体干细胞。

脱细胞肝支架组织工程肝脏：是指利用组织工程新技术构建的由无细胞肝生物支架材料和种子细胞组成的，在 3D 培养体系中功能性类肝脏组织器官。

缩写

- ESLD: end-stage liver disease, 终末期肝病
- ALF: acute liver failure, 急性肝衰竭
- DLC: decompensated liver cirrhosis, 失代偿期肝硬化
- HBV: hepatitis B virus, 乙型肝炎病毒
- LTx: liver transplantation, 肝移植
- ESCs: embryonic stem cells, 胚胎干细胞
- iPS: induced pluripotent stem, 多能诱导干细胞
- SSCs: somatic stem cells, 成体干细胞
- BM MSCs: bone marrow-derived mesenchymal stem cells, 骨髓间充质干细胞
- SP: side population, 侧群细胞
- CNS: central nervous system, 中枢神经系统
- NG2⁺/SP: neuro-glial antigen 2-expressing cells in

side population, 侧群细胞中 NG2 阳性细胞
 NG2⁺/_{BM}MSCs: _{BM}MSCs 中新型亚群干细胞
 BECs: Bile duct epithelial cells, 胆管上皮细胞
 LSECs: liver sinusoidal endothelial cells, 肝窦内皮细胞)
 ECs: endothelial cells, 内皮细胞
 VEGF: vascular endothelial growth factor, 血管内皮生长因子
 TGF-β1: transforming growth factor-β, 转化生长因子
 Ang-II: Angiopoietins-II, 血管生成素 II
 PECAM: Platelet endothelial cell adhesion molecule, 血管内皮细胞粘附分子
 DLS: decellularized liver scaffold, 脱细胞肝支架
 ECM: extracellular matrix, 细胞外基质
 nDLS: 正常或全肝 DLS
 rDLS: 再生期部分肝 DLS
 SFSS: Small-for-size Syndrome, 小肝综合征
 PHx: partial hepatectomy, 肝切除术

参考文献

- [1] Zhao RH, Shi Y, Zhao H, et al. Acute-on-chronic liver failure in chronic hepatitis B: an update. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018; 12 (4): 341-350.
- [2] 沈中阳, 陆伟. 中国肝移植乙型肝炎防治指南 (2016 版). *临床肝胆病杂志*, 2017, 33 (2): 213-220.
- [3] Skrzat-Klapaczynska A, Matłosz B, Otelea D, et al. Epidemiological characteristics and access to end-stage liver disease care for HIV-positive patients with HCV and/or HBV coinfections in Central/Eastern European and neighboring countries – data from the ECEE network. *Przegl Epidemiol*. 2019; 73 (1): 61-68.
- [4] Thiagarajan P, Chalmers J, Guha IN, James MW. Detecting chronic liver disease: are liver function tests the solution? *Br J Hosp Med (Lond)*. 2020; 81 (2): 1-8.
- [5] Arredondo Montero J, Antona G, Rivero Marcotegui A, et al. Discriminatory capacity of serum interleukin-6 between complicated and uncomplicated acute appendicitis in children: a prospective validation study. *World J Pediatr*. 2022; 18 (12): 810-817.
- [6] Sheka AC, Adeyi O, Thompson J, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Review. *JAMA*. 2020;323(12):1175-1183
- [7] Ratzu V, Francque S, Sanyal A. Breakthroughs in therapies for NASH and remaining challenges. *J Hepatol*. 2022; 76 (6): 1263-1278.
- [8] 刘昶荣. 卫健委: 2017 年我国器官移植手术量世界第二. <https://baijiahao.baidu.com/s?id=1607589663010107836>, 中国青年报中青在线.2018-08-01.
- [9] 中华人民共和国国家卫生健康委员会.2019 年最新公布: 169 所器官移植医疗机构名单. <http://www.nhc.gov.cn/wjw/qgyzjg/>
- [10] 中国人体器官捐献管理中心, <http://www.rcsccod.cn/>, 2018
- [11] European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu. EASL Clinical Practice Guidelines: Liver transplantation. *J Hepatol*. 2016; 64 (2): 433-485.
- [12] 张雷达, 夏广培, 张玉君, 等. 未来再生外科学: 优化脱细胞和再细胞策略构建工程化肝脏[J]. *中华消化外科杂志*, 2020, 19 (7): 795-798.
- [13] Zhu CH, Zhang DH, Zhu CW, et al. Adult stem cell transplantation combined with conventional therapy for the treatment of end-stage liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Stem Cell Res Ther*. 2021; 12 (1): 558.
- [14] Samadi P, Saki S, Manoochehri H, Sheykhasan M. Therapeutic Applications of Mesenchymal Stem Cells: A Comprehensive Review. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2021; 16 (3): 323-353.
- [15] Almeida-Porada G, Zanjani ED, Porada CD. Bone marrow stem cells and liver regeneration. *Exp Hematol*. 2010; 38 (7): 574-80.
- [16] Kessler L, Schlitter AM, Krönke M, et al. First Experience Using ¹⁸F-Flubrobenguane PET Imaging in Patients with Suspected Pheochromocytoma or Paraganglioma. *J Nucl Med*. 2021; 62 (4): 479-485.
- [17] Yoshida GJ. Metabolic reprogramming: the emerging concept and associated therapeutic strategies. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015; 34: 111.
- [18] Chorbord P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Hum Gene Ther*. 2010; 21 (9): 1045-56.
- [19] Vogel W, Grünebach F, Messam CA, et al. Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *Haematologica*. 2003; 88 (2): 126-33.
- [20] Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl Med*. 2017; 6 (6): 1445-1451.
- [21] Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*. 2007; 213 (2): 341-7.

- [22] Javazon EH, Colter DC, Schwarz EJ, Prockop DJ. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells*. 2001; 19 (3): 219-25.
- [23] Russell KC, Tucker HA, Bunnell BA, et al. Cell-surface expression of neuron-glia antigen 2 (NG2) and melanoma cell adhesion molecule (CD146) in heterogeneous cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2013; 19 (19-20): 2253-66.
- [24] Busch SA, Horn KP, Cuascut FX, et al. Adult NG2+ cells are permissive to neurite outgrowth and stabilize sensory axons during macrophage-induced axonal dieback after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2010; 30 (1): 255-65.
- [25] Zhang H, Siegel CT, Shuai L, et al. Repair of liver mediated by adult mouse liver neuro-glia antigen 2-positive progenitor cell transplantation in a mouse model of cirrhosis. *Sci Rep*. 2016; 6: 21783.
- [26] Yannas IV, Burke JF, Gordon PL, et al. Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition. *J Biomed Mater Res*. 1980; 14 (2): 107-32.
- [27] Hollister SJ, Murphy WL. Scaffold translation: barriers between concept and clinic. *Tissue Eng Part B Rev*. 2011; 17 (6): 459-74.
- [28] Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM, et al. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J Pediatr Surg*. 1988; 23 (1 Pt 2): 3-9.
- [29] Roberts SK, Ludwig J, Larusso NF. The pathobiology of biliary epithelia. *Gastroenterology*. 1997; 112 (1): 269-79.
- [30] Wang Z, Faria J, Penning LC, et al. Tissue-Engineered Bile Ducts for Disease Modeling and Therapy. *Tissue Eng Part C Methods*. 2021; 27 (2): 59-76.
- [31] Uenishi T, Kubo S, Yamamoto T, et al. Cytokeratin 19 expression in hepatocellular carcinoma predicts early postoperative recurrence. *Cancer Sci*. 2003; 94 (10): 851-7.
- [32] Eom YW, Yoon Y, Baik SK. Mesenchymal stem cell therapy for liver disease: current status and future perspectives. *Curr Opin Gastroenterol*. 2021; 37 (3): 216-223.
- [33] Fiore EJ, Bayo JM, Garcia MG, et al. Mesenchymal stromal cells engineered to produce IGF-I by recombinant adenovirus ameliorate liver fibrosis in mice. *Stem Cells Dev*. 2015; 24 (6): 791-801.
- [34] Tanimizu N and Miyajima A. Notch signaling controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors. *Journal of Cell Science*. 2004; 117 (15): 3165-3174.
- [35] Mohamed HE, Elswefy SE, Rashed LA, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells effectively regenerate fibrotic liver in bile duct ligation rat model. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2016; 241 (6): 581-91.
- [36] Lai J, Jiang S, Shuai L, et al. Comparison of the biological and functional characteristics of mesenchymal stem cells from intrahepatic and identical bone marrow. *Stem Cell Res*. 2021; 55: 102477.
- [37] Shi X, He L, Zhang SM, Luo J. Human iPS Cell-derived Tissue Engineered Vascular Graft: Recent Advances and Future Directions. *Stem Cell Rev Rep*. 2021; 17 (3): 862-877.
- [38] Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36 (4): 568-84.
- [39] Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, et al. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 265 (1): 134-9.
- [40] Ohneda O, Ohneda K, Arai F, et al. ALCAM (CD166): its role in hematopoietic and endothelial development. *Blood*. 2001; 98 (7): 2134-42. Silva GV, Litovsky S, Assad JA, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*. 2005; 111 (2): 150-6.
- [41] Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem*. 2006; 54 (4): 385-95.
- [42] Han Q, Sun Z, Liu L, et al. Impairment in immuno-modulatory function of Flk1 (+)CD31 (-)CD34 (-) MSCs from MDS-RA patients. *Leuk Res*. 2007; 31 (11): 1469-78.
- [43] Große-Segerath L, Lammert E. Role of vasodilation in liver regeneration and health. *Biol Chem*. 2021; 402 (9): 1009-1019.
- [44] Meyer J, Balaphas A, Fontana P, et al. Platelet Interactions with Liver Sinusoidal Endothelial Cells and Hepatic Stellate Cells Lead to Hepatocyte Proliferation. *Cells*. 2020; 9 (5): 1243.
- [45] Vazirzadeh M, Azarpira N, Davoodi P, et al. Natural Scaffolds Used for Liver Regeneration: A Narrative Update. *Stem Cell Rev Rep*. 2022; 18 (7): 2262-2278.
- [46] Li K, Tharwat M, Larson EL, et al. Re-Endothelialization of Decellularized Liver Scaffolds: A Step for Bioengineered Liver Transplantation. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022; 10: 833163.

- [47] Zhang X, Chen X, Hong H, et al. Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering. *Bioact Mater.* 2021; 10: 15-31.
- [48] Khajavi M, Hashemi M, Kalalinia F. Recent advances in optimization of liver decellularization procedures used for liver regeneration. *Life Sci.* 2021; 281: 119801.
- [49] Zheng CX, Sui BD, Hu CH, et al. Reconstruction of structure and function in tissue engineering of solid organs: Toward simulation of natural development based on decellularization. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018; 12 (6): 1432-1447.
- [50] Yang W, Chen Q, Xia R, et al. A novel bioscaffold with naturally-occurring extracellular matrix promotes hepatocyte survival and vessel patency in mouse models of heterologous transplantation. *Biomaterials.* 2018; 177: 52-66.
- [51] Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med.* 2010; 16 (7): 814-20.
- [52] Bao J, Shi Y, Sun H, et al. Construction of a portal implantable functional tissue-engineered liver using perfusion-decellularized matrix and hepatocytes in rats. *Cell Transplant.* 2011; 20 (5): 753-66.
- [53] Zhang H, Zhang Y, Ma F, et al. Orthotopic transplantation of decellularized liver scaffold in mice. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8 (1): 598-606.
- [54] Yang W, Xia R, Zhang Y, et al. Decellularized Liver Scaffold for Liver Regeneration. *Methods Mol Biol.* 2018; 1577: 11-23.
- [55] Zhang H, Siegel CT, Li J, et al. Functional liver tissue engineering by an adult mouse liver-derived neuro-glia antigen 2-expressing stem/progenitor population. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018; 12 (1): e190-e202.
- [56] Kojima H, Nakamura K, Kupiec-Weglinski JW. Therapeutic targets for liver regeneration after acute severe injury: a preclinical overview. *Expert Opin Ther Targets.* 2020; 24 (1): 13-24.
- [57] Debbaut C, De Wilde D, Casteleyn C, et al. Modeling the impact of partial hepatectomy on the hepatic hemodynamics using a rat model. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2012; 59 (12): 3293-303.
- [58] Kim DH, Ahn J, Kang HK, et al. Development of highly functional bioengineered human liver with perfusable vasculature. *Biomaterials.* 2021; 265: 120417.
- [59] Du C, Narayanan K, Leong MF, et al. Induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes and endothelial cells in multi-component hydrogel fibers for liver tissue engineering. *Biomaterials.* 2014; 35 (23): 6006-14.
- [60] Hussein KH, Park KM, Kang KS, Woo HM. Heparin-gelatin mixture improves vascular reconstruction efficiency and hepatic function in bioengineered livers. *Acta Biomater.* 2016; 38: 82-93.
- [61] Rojas-Hernandez CM, Garcia DA. The novel oral anticoagulants. *Semin Thromb Hemost.* 2013; 39 (2): 117-26.
- [62] Duque Sánchez L, Brack N, Postma A, et al. Surface modification of electrospun fibres for biomedical applications: A focus on radical polymerization methods. *Biomaterials.* 2016; 106: 24-45.
- [63] Linke K, Schanz J, Hansmann J, et al. Engineered liver-like tissue on a capillarized matrix for applied research. *Tissue Eng.* 2007; 13 (11): 2699-707.
- [64] Verma P, Verma V, Ray P, et al. Agar-gelatin hybrid sponge-induced three-dimensional in vitro 'liver-like' HepG2 spheroids for the evaluation of drug cytotoxicity. *J Tissue Eng Regen Med.* 2009; 3 (5): 368-76.
- [65] Takebe T, Sekine K, Enomura M, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature.* 2013; 499 (7459): 481-4.
- [66] Baptista PM, Siddiqui MM, Lozier G, et al. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology.* 2011; 53 (2): 604-17.