

* 专题评述 *

肝细胞微囊化移植——肝病细胞治疗的新希望^{*}

滕 越 王 韞 芳 裴雪涛^{**}

军事医学科学院输血医学研究所干细胞与再生医学研究室, 北京 100850

摘要 介绍了一种新的肝病细胞治疗方法, 即肝细胞微囊化移植. 对其概念、优缺点、安全性、时效性及其在国际医学界的使用和发展情况做一简要综述.

关键词 肝细胞 微囊化 肝衰竭 细胞治疗

肝脏是机体中重要的代谢器官, 有“化学工厂”之称. 各种原因造成的肝细胞大量坏死引发的肝功能衰竭, 导致机体代谢的严重紊乱和毒性物质的大量堆积; 二者又反过来进一步加重肝损伤, 影响残存肝细胞的再生, 从而形成肝功能衰竭的恶性循环. 我国是著名的肝病大国, 临床上以重型肝炎为代表的肝功能衰竭, 尤其是急性肝功能衰竭(ALF)十分常见. 目前传统内科对症治疗很难奏效, 病情凶险, 预后极差. 原位肝移植(OLT)是目前治疗 ALF 最有效的方法, 但由于供体缺乏, 很多患者在等待移植供体期间死亡. 及时有效的肝功能支持和促进肝细胞再生, 可能帮助肝衰竭患者无须肝移植而自行恢复或者渡过等待移植的难关.

体外生物型人工肝为肝衰竭的治疗开辟了新途径. 虽然, 近年来几种以培养肝细胞为基础的生物型人工肝已进行 I—II 期临床试验, 取得了令人鼓舞的疗效^[1], 但这些系统要真正得到临床推广应用, 必须获得足够数量具有高度活性及良好功能的肝细胞. 这也成为限制其发展的最主要因素. 目前研究的焦点集中在利用肝细胞来替代肝功能, 但免疫排斥是其发展瓶颈. 与传统的治疗肝病的方法相比, 近几年发展起来的微囊化包裹肝细胞技术具有

有效的免疫隔离屏障作用^[2], 并随着该技术的发展, 扩大了供肝细胞来源, 解决了供体缺乏这一难题. 微囊化肝细胞移植在治疗各种肝病中的研究正受到越来越多的关注, 其临床效果也更加值得期待.

1 肝细胞微囊化技术

1.1 原理

肝细胞微囊化是一种采用无毒的高分子聚合物膜材料包裹肝细胞形成直径数十微米至数百微米微囊的技术. 微囊由多聚物构成的超薄、半通透性细胞膜样球形结构, 能容纳组织或细胞、酶或其他生理活性物质. 微囊膜可提供细胞附着的基质, 使囊内细胞相互接触并形成一种三维结构, 该结构通过改善细胞间相互作用在维持肝细胞功能方面发挥着重要作用. 此外, 微囊膜的多孔性结构允许白蛋白、营养物质及代谢物的自由弥散, 肝细胞可以跨膜获得养分, 但又能阻止高分子量物质如免疫球蛋白和补体通过, 从而避免免疫细胞及免疫分子对囊内细胞的损伤, 起到免疫屏障作用, 故囊内肝细胞可不受宿主的免疫排斥影响而长期存活, 发挥其生物学功能, 以达到治疗目的且不需使用免疫抑制

2006-10-30 收稿, 2006-12-04 收修改稿

* 国家高技术计划领域重大项目(批准号: 2006AA02A107)、国家重点基础研究发展计划(批准号: 2005CB522702)和国家自然科学基金(批准号: 30400415)资助项目

** 通信作者, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

©1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

剂. 因此, 该技术也为同种或异种细胞移植的发展, 提供独特的平台^[3,4].

1.2 囊膜材料

理想的微囊应该具备以下条件: (i) 良好的生物相容性; (ii) 合理的机械强度; (iii) 适当的孔径. 目前常用的微囊材料, 按来源基本可分为3类: 天然材料、半合成材料和合成材料, 其中主要包括海藻酸盐、壳聚糖、多聚赖氨酸、羟乙基甲基丙烯酸酯(HEMA)、甲基丙二酸盐(MMA)、2-甲基丙烯酸(MAA)、琼脂糖、聚丙烯胺及羟甲基纤维素等^[5]. 最常用海藻酸盐(alginate, Alg)-聚赖氨酸(polylysine, PLL)-海藻酸盐微胶囊(APA微胶囊)包裹肝细胞. 包裹细胞的APA微胶囊呈圆球形, 表面光滑, 直径400—700 μm , 细胞悬浮于微囊内, 每个微囊约含100—150个细胞. APA囊膜可截留分子质量大于110 ku的物质, 故分子质量160 ku左右的抗体和免疫细胞不能进入微囊. 该技术首先被应用于胰岛移植. Lim, Sun和Chang等先期人工细胞工作为微囊化肝细胞移植作出贡献. 但是, 其生物相容性一直颇受争议. 2003年, King等^[6]采用酶修饰来改善海藻酸钠的生物相容性, 这种酶可以将海藻酸钠中的M向G转化, 从而产生高G的海藻酸钠.

聚乙二醇(PEG)同海藻酸钠相比, 也是聚阴离子聚合物, 但它的生物相容性可显著改善, 目前已用于制备微囊并申请专利. 有些学者使用聚鸟氨酸(PLO)或壳聚糖(chitosan)来取代PLL改善微囊的生物相容性, 而且壳聚糖来源广泛、易于加工且价格低廉. 中国科学院大连化学物理研究所生物医用材料工程组通过筛选改性, 获得了可用于细胞微囊化的壳聚糖. 将制备的海藻酸壳聚糖-海藻酸(ACA)微囊移植入小鼠腹腔, 8个月后微囊不但成功回收, 而且小鼠腹腔内无炎症等免疫排斥现象, 初步证明了ACA微囊具有良好的生物相容性^[7].

1.3 微囊化肝细胞中的种子细胞

肝细胞微囊化研究中备选的种子细胞包括: 直接分离得到的成熟肝细胞、肝细胞系、肝干细胞、骨髓源干细胞、胚胎干细胞等. 通过原位胶原酶灌注可以获得原代肝细胞, 由于是终末性细胞, 很难传代培养. 原代细胞研究较多的是猪肝细胞, 并已

构建了体外人工肝装置用于临床试验. 例如, Desille^[8]等分析了体外BAL(整个人工肝系统包括1只恒温反应箱、1个血浆分离器、1个血浆循环池以及1个流化床式生物反应器, 内含海藻酸盐包裹的肝细胞)治疗ALF猪的疗效. 结果表明, 微囊化猪肝细胞BAL治疗组能很好地清除肝细胞坏死释放的毒性物质, 显著改善ALF猪的肝性脑病症状. Sun^[9]等将肝衰竭大鼠的血浆以1—2 mL/min的速度流入具有填充床的生物反应器(内置微囊化肝细胞数目是 1.15×10^8 — 2×10^8 个), 血液灌流在肝衰竭诱导5h后开始并持续7h, 其生存时间和代谢指标如血氨、总胆红素都有明显的改善. 由于遗传背景显著不同可能引发严重的免疫排斥反应, 以及人畜之间病原体的传播等风险, 使得动物细胞很难直接应用于人体内. 已建系的肝细胞株, 如Hep G2/C3A或SV40 Tag, 虽然能在体外大量长期培养, 且具有一定肝细胞的功能, 但是这些细胞来源于肿瘤, 所以亦不能直接用于体内^[10].

与上述种子细胞相比, 干细胞是一类具有自我更新、长期产生各种分化细胞能力的细胞. 经过多年的努力, 学者们在实验中观察到有可能转化为肝细胞的干细胞包括: (1) 肝脏干细胞(hepatic stem cell, HSC), 包括: (i) 肝卵圆细胞(hepatic oval cell, HOC); (ii) 小肝细胞(small hepatocyte); (2) 胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC); (3) 骨髓细胞, 包括: (i) 造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC); (ii) 间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC); (4) 胰腺干细胞(pancreatic stem cell); (5) 胎肝干细胞(fetal hepatic stem cell). 这并不意味着上述所有类型干细胞均能运用于临床进行干细胞移植从而治疗肝病^[11,12]. 例如, 由于胰腺、成熟或胚胎肝细胞的来源及数量有限, 其在体内外的增殖能力较差, 移植后免疫排斥问题不可避免, 使得其应用受到极大限制; 胚胎干细胞的应用存在着伦理冲突、免疫排斥、其扩增和定向分化较难控制而存在致瘤性等问题尚难解决; 永生代肝细胞也同样存在致瘤的风险^[13,14]. 相比较而言, 骨髓来源的干细胞不仅具有高度增殖、多向性分化的特性和体外操作的可行性, 更重要的是它来源于同种或自体, 可避免排斥反应. 骨髓来源的干细胞不仅可以为肝细胞移植提供细胞供体, 也可以

为微囊化肝细胞提供细胞来源,使其成为目前最有希望的种子细胞。但是,现阶段对于这些干细胞转化为肝细胞所需的条件尚知之不全,涉及病理、生理、信号传导、细胞因子及组织微环境等各个方面的机制。在探讨这些调控机制的同时,也有尝试运用某种类型干细胞移植治疗动物模型肝病,以从另一个角度阐明机制。虽然这与我们运用这些细胞治愈人类各种肝脏疾病的最终目标还相差甚远,但终究是迈出了可喜的一步。

为满足微囊化肝细胞移植的需要,除了选择适宜的肝细胞来源,还要考虑如何在体外扩增得到足够数量的功能细胞。因此,肝细胞的体外培养必须重视与强调如下几个问题。第一,肝细胞在体外培养过程中的去分化问题。显然,为维持肝细胞的正常生理功能,肝细胞不能去分化。第二,细胞间、细胞与支持物之间的通讯问题。细胞连接、间隙连接、化学信号和细胞外基质(ECM)信号等都会影响到细胞的生长、分化、功能和凋亡。尤其是细胞与ECM间的通讯,直接决定了细胞的活性、细胞结构、黏附、生长、分化、极性、迁移、自组织与形态发生^[15]。应当指出的是细胞在体外培养后可能不完全具有和体内肝细胞相同的表型和功能,原因在于体外培养环境不能完全模拟体内的生长环境,同时也缺少其他细胞类型信号的影响。

为了解决上述问题,我室利用重组逆转录病毒构建了高效、稳定表达肝细胞生长因子(hepatic growth factor, HGF)的肝星状细胞株 CFSC / HGF^[16],并证明其不仅对成熟肝细胞生物学功能的发挥和寿命维持,而且对骨髓来源的 Thy-1⁺β₂M⁻ 细胞(bone marrow derived Thy-1⁺β₂M⁻ cell, BDTC)向肝细胞诱导分化都具有良好的支持作用^[17]。在此基础上,采用共微囊化技术混合包裹肝细胞、CFSC / HGF 和/或大鼠骨髓干细胞,观察囊内其他细胞对肝细胞寿命和功能维持的支持作用,并将其植入急性肝衰竭大鼠腹腔内,证实 CFSC / HGF 和/或骨髓中的干/祖细胞存在能通过维持移植的微囊内肝细胞的功能,明显促进肝衰竭大鼠的肝再生,从而有利于大鼠的长期存活。另外,本实验异体间应用微囊化技术,免疫隔离作用肯定,有利于移植血管化。观察微囊化肝细胞及微囊化混合肝细胞对肝衰竭大鼠肝功能恢复的促进作用,为

肝细胞移植及生物人工肝等提供新的途径。

1.4 微囊化肝细胞的冻存

冻存游离肝细胞的操作过程比较烦琐,而且冻存过程中易形成冰晶,从而导致肝细胞损伤。Dixit 等^[18]把冻存的微囊化肝细胞复苏后对高胆红素血症的 Gunn 大鼠进行腹腔内移植,发现鼠体内的血清总胆红素值在 30 d 内保持在较低水平。Canaple 等^[19]将微囊化小鼠肝细胞经液氮冻存 4 个月后,发现微囊化的肝细胞依然保持尿素合成和蛋白分泌等特异性功能。Mahler 等^[20]比较了不同条件下微囊对小鼠肝细胞的保护作用,发现在 4 °C 环境中悬浮肝细胞活性 24 h 后下降 13%, 48 h 后下降 33%, 液氮冻存下降 19%, 而微囊化肝细胞活性依次为 4%, 15% 和 9%; 并且微囊化肝细胞乙氧基-9-羟基异吩唑酮-邻-去乙酰基酶(EROD)和谷胱甘肽-S-转移酶活性都明显高于悬浮的肝细胞;另外,微囊化肝细胞的 caspase-3 在低温尤其是液氮冻存时活性较低,这说明微囊可有效保护肝细胞,减轻因低温条件下诱导的肝细胞凋亡,进而促进肝细胞活性和功能的维持。

2 微囊化肝细胞移植的临床研究进展

2.1 微囊化肝细胞植入途径

2.1.1 门静脉和肝实质途径 从理论上讲,肝脏本身的微环境及门静脉血含丰富营养成分的解剖生理结构特点,对植入的肝细胞有利,门静脉途径和肝实质应为肝细胞移植的理想场所。然而经门静脉途径可导致广泛肝坏死,严重门静脉高压和肺动脉高压,可能因植入肝细胞在远端门静脉分支、窦状隙和中央静脉细胞聚集,直接阻碍受体肝脏供血所致。这就限制了植入肝细胞的数量,进而降低其代谢支持功能。

2.1.2 腹膜腔途径 该途径由于简单易行,对受体动物创伤小,可反复多次进行,在进行肝细胞移植时常首先被选用。先期腹腔内肝细胞移植显示出令人鼓舞的短期效果。但大多因肝细胞没有可充分黏附的腹膜环境,游离肝细胞寿命短暂。随着微囊和微载体技术的发展,这一途径取得进展,微囊技

术可延长腹腔内肝细胞的生命。

2.1.3 经脾途径 Ebata^[21] 等首先报告将肝细胞悬液注入同系动物脾脏, 移植 1 年后出现“肝化脾”, 脾内移植肝细胞 1 年后功能活跃, 可明显纠正 Gunn 鼠先天性葡萄糖醛酸转移酶缺陷所致高胆红素血症。经脾移植时游离的肝细胞悬液注入脾髓, 继而黏附并生长于红脾髓, 形成肝索和窦状隙, 脾白髓不利于植入肝细胞的增殖。如非同系肝细胞移植, 则需使用免疫抑制剂。另外, 脾脏仅能容纳不超过 3% 的正常肝组织, 这些不足以支持严重肝衰动物, 在 Ebata^[21] 等的研究中, “肝化脾”需很长时间, 大约 1 年。经脾肝细胞移植不易复制, 且移

植肝细胞常栓塞肝脏或进入循环而失活。因此, 从治疗观点看, 经脾肝细胞移植不能成为人工肝支持的实用方法。

2.1.4 其他部位 经皮下组织、背部脂肪垫囊内、肌肉、肺等部位移植者少见成功报告。

2.2 微囊化肝细胞的功能与活性的评价

在研究微囊化肝细胞移植治疗肝病的过程中, 各研究机构所使用的微囊化肝细胞材料不尽相同, 其功能与活性的测定过程较复杂, 目前国际上并无此方面的标准。根据不同文献报道, 将微囊材料及部分研究结果整理如表 1。

表 1 微囊化肝细胞的功能与活性的评价

研究者	微囊化肝细胞的材料	研究内容及结果
Khalil 等 ^[22]	海藻酸钠分别包裹 HepG2 和 HHY41	培养 20 d 后两种细胞均保持增殖能力, 释放白蛋白、凝血因子、纤维蛋白原、 α 1-糖蛋白和抗胰蛋白酶, 培养 8—10 d 时上述蛋白分泌达顶峰; 电子显微镜观察肝细胞聚集成球形, 微绒毛丰富, 细胞间可见紧密连接, 表明微囊化 HepG2 和 HHY41 的蛋白合成及解毒功能增强。
Rahman 等 ^[23]	海藻酸钠包裹 HepG2	微囊化 HepG2 保持其生物功能, 白蛋白、 α 1-抗胰蛋白酶、纤维蛋白原、凝血酶原及 α 1-酸性糖蛋白等水平明显高于平板培养者。微囊化 HepG2 继续培养至 15 d 后依然可见细胞增殖, 但细胞功能消失, 提示海藻酸钠包裹的肝细胞难以长期维持特异性功能。
Yang 等 ^[24]	半乳糖残基修饰海藻酸钠包裹 ICR 小鼠原代肝细胞	肝细胞贴壁率随着半乳糖残基修饰海藻酸钠浓度的增高而增加。细胞功能检查发现半乳糖残基修饰海藻酸钠微囊内肝细胞培养 20 d 后依然保持较高水平。提示半乳糖残基可提供细胞肝细胞锚定位点, 促进微囊化肝细胞形成聚集体并维持较强功能。
	双层聚合物膜包裹大鼠肝细胞; 微囊外膜由 25% HEMA, 25% MMA 及 50% MAA 三聚体组成, 厚度 2—3 μ m, 内膜由带正电荷的修饰胶原组成。	与单层微囊相比, 双层微囊内肝细胞功能增强 3 倍。
Chia 等 ^[25, 26]	I 型微囊平均直径 400 μ m, 由修饰胶原外被覆 HEMA-MMA-MAA 三聚体组成, 膜厚度为 2—5 μ m, 包裹原代猪肝细胞。	I 型微囊具有较好的物质通透性, 微囊化猪肝细胞功能明显增强, 但其免疫隔离作用远比 II 型微囊差, 仅适用于不需要免疫隔离的生物型人工肝, 而 III、IV 微囊具有较强的机械稳定性, 则适用于高流体动力的生物反应器 ^[25] 。
	II 型微囊是用另外一层 HEMA-MMA-MAA 三聚体包裹 I 型微囊而成, 两层三聚体之间增加一厚度 5 μ m 左右的胶原层, 包裹原代猪肝细胞。	
	II 型微囊由氧化铝溶胶包裹 I 型微囊, 包裹原代猪肝细胞而成。	
	IV 型微囊是以 HEMA-MMA-MAA 三聚体包裹 II 型微囊, 包裹原代猪肝细胞而成。	
Quek 等 ^[27]	应用光交联材料 4-苯基异丁烯酸与 HEMA, MMA, MAA 合成阴离子四聚体包裹大鼠肝细胞, 囊内壁为修饰胶原, 外壁为光交联四聚体。	经紫外线照射后, 微囊机械张力和肝细胞功能增强, 尤其是微囊机械稳定性显著提高。

3 微囊肝细胞应用中存在的问题与展望

微囊技术已成功应用于微囊胰岛移植治疗链脲霉素诱导大鼠糖尿病。微囊肝细胞移植替代肝功能的可行性已通过各种急性肝衰和先天性代谢性肝病动物模型得到证实。在 D-氨基半乳糖诱导急性肝衰鼠模型肝昏迷前期移植, 可显著增加肝衰鼠生存时间。Dixit 等用微囊肝细胞每月 1 次重复移植给 Gunn 大鼠共 6 个月的研究, 成功维持血胆红素显著降低, 并能耐受反复多次的腹腔移植。因此, 重复微囊化肝细胞移植可能改善先天性代谢性肝疾病的肝功能。微囊肝细胞移植要成为慢性肝病的治疗手段, 须进一步改善肝细胞的长期活力。腹腔内移植微囊肝细胞生理寿命 6 个月, 移植后 6—8 周以内其功能尚可充分发挥, 随后开始退化, 最后肝细胞变性坏死, 微囊生理破溃。Dixit 等推测微囊肝细胞退化(自溶)导致其微环境离子和 pH 改变, 进而通过改变微囊膜分子电荷, 削弱微囊海藻酸多聚赖氨酸复合多聚膜, 反复微囊肝细胞移植能克服这种肝细胞功能丢失。

无微囊包裹的肝细胞移植之所以活力有限, 与其失去特殊黏附有关。良好黏附基质胶 (Matrigel™), 是一种鼠肉瘤原性复合蛋白, 与肝基质膜蛋白极其相似, 可显著改善移植微囊肝细胞功能活力。联合培养技术 (coculture) 提供改善游离肝细胞长期功能活力的有效手段。研究证实微囊肝细胞移植与非微囊肝细胞在替代肝功缺陷 Gunn 鼠效能相当, 但微囊化肝细胞却在减少免疫反应与冻存方面有明显的优势^[28]。在新近体外模型研究中, 肝细胞以藻酸盐微囊化流动培养于生物反应器中, 微囊的三维结构为细胞提供了合适的微环境, 使得细胞的总蛋白和尿素合成功能得到有效保持。这种微囊化和流动培养联合运用的技术加强了物质的传输和微囊内细胞产物的释放, 应用于 BAL 进行体外肝支持的潜力极大。

综上所述, 微囊化肝细胞制备及移植涉及以下关键问题: (1) 肝细胞是锚定依赖细胞, 需要一种不溶的细胞外基质获得生存、重组、增殖和发挥功能, 要求微囊内有适宜的基质物质存在; (2) 肝细胞是高代谢细胞, 需要及时供给氧和营养, 这对微囊的通透性提出较高的要求; (3) 肝细胞在体内受

肝营养因子刺激有极大再生能力, 但是这些因子(如 TNF 等)在人工肝应用中是否引起机体强烈的反应尚不得而知; (4) 肝细胞微囊化移植实验中, 大多出现了包裹了肝细胞的微囊移植 1 个月后表面已出现纤维化反应的现象。这与实验对照组, 即空囊植入组相比呈现出明显的差异, 提示囊外的纤维化反应可能是因囊内肝细胞的抗原成分透过微囊引起的, 而非微囊本身所致^[29]; (5) 聚合物的标准化问题, 如它的理化性质、成分、纯度、反应时间和来源的再生等方面均无统一标准, 采用标准化的材料制备微囊可以充分满足生物安全性的需求, 并且可以解决不同实验室结果多样性问题; (6) 微囊化肝细胞的大规模生产是一个主要挑战, 同时也是微囊肝细胞移植技术应用于临床的关键环节。此外, 微囊回收、适当来源细胞的培养与扩增都有待解决。所有问题的最终解决将不断改善细胞的寿命和功能, 从而建立一种永久性的细胞再生模式。随着化学、材料学、生物物理学、生物化学、生物组织工程学和医学等学科的不断交叉与融合, 对微囊甚至纳米囊的制备方法、应用环境的动态变化规律、膜内外物质传递规律、控制释放行为等的深入认识, 微囊化肝细胞移植技术的基础研究和实际应用必然能够取得重大进展。

参 考 文 献

- 1 Park JK, Lee DH. Bioartificial liver systems; Current status and future perspective. *J Biosci Bioeng*, 2005, 99(4): 311—319
- 2 Cascalho M, Platt JL. New technologies for organ replacement and augmentation. *Mayo Clin Proc*, 2005, 80(3): 370—378
- 3 Aleem Khan A, Parveen N, Habeeb MA, et al. Journey from hepatocyte transplantation to hepatic stem cells; A novel treatment strategy for liver diseases. *Indian J Med Res*, 2006; 123(5): 601—614
- 4 Orive G, Hernandez RM, Rodriguez Gascon A, et al. History, challenges and perspectives of cell microencapsulation. *Trends Biotechnol*, 2004, 22(2): 87—92
- 5 Haque T, Chen H, Ouyang W, et al. *In vitro* study of alginate-chitosan microcapsules; An alternative to liver cell transplants for the treatment of liver failure. *Biotechnol Lett*, 2005, 27(5): 317—322
- 6 King A, Strand B, Rokstad AM. Improvement of the biocompatibility of alginate/ poly 2L2lysine/ alginate microcapsules by the use of epimerized alginate as a coating. *J Biomed Mater Res A*, 2003, 64: 533

- 7 付颖丽, 雄鹰, 于炜婷, 等. 海藻酸钠/壳聚糖微胶囊生物相容性的研究. 自然科学进展, 2002, 12(8): 845—847
- 8 Desille M, Fremont B, Mahler S, et al. Improvement of the neurological status of pigs with acute liver failure by hepatocytes immobilized in alginate gel beads inoculated in an extracorporeal bioartificial liver. Transplant Proc, 2001, 33(1—2): 1932—1934
- 9 Sun T, Chan M L, Zhou Y, et al. Use of ultrathin shell microcapsules of hepatocytes in bioartificial liver-assist device. Tissue Eng, 2003, 9(Suppl 1): S65—75
- 10 Kashofer K, Bonnet D. Gene therapy progress and prospects; Stem cell plasticity. Gene Ther, 2005; 12(16): 1229—1234
- 11 Shafritz DA, Oertel M, Menthen A, et al. Liver stem cells and prospects for liver reconstitution by transplanted cells. Hepatology, 2006, 43(2 Suppl 1): S89—98
- 12 Bae SH. Problems and prospects of stem cells for clinical use in hepatology. Korean J Hepatol, 2005, 11(2): 106—115
- 13 Trounson A. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. Endocr Rev, 2006, 27(2): 208—219
- 14 Chamuleau RA, Deurholt T, Hoekstra R. Which are the right cells to be used in a bioartificial liver? Metab Brain Dis, 2005, 20(4): 327—335
- 15 Cho CS, Seo SJ, Park IK, et al. Galactose carrying polymers as extracellular matrices for liver tissue engineering. Biomaterials, 2006, 27(4): 576—585
- 16 王韞芳, 南雪, 李艳华, 等. 稳定表达 hHGF 的肝星状细胞株的建立及其生物学特性研究. 中华实验外科杂志, 2004, 21: 1465—1467
- 17 Wang YF, Nan X, Li YH, et al. Induction of umbilical cord blood derived $\beta_2m^-cMet^+$ cells into hepatocyte-like cells by coculture with CFSC/HGF cell strain. Liver Transplantation, 2005, 11: 635—643
- 18 Dixit V, Darvasi R, Arthur M, et al. Cryopreservation microencapsulated hepatocytes transplantation studies in Gunn rats. Transplantation, 1993, 55: 616—622
- 19 Canaple L, Nurdin N, Angelova N, et al. Maintenance of primary murine hepatocyte functions in multicomponent polymer capsules—*in vitro* cryopreservation studies. J Hepatol, 2001, 34(1): 11—18
- 20 Mahler S, Desille M, Fremont B, et al. Hypothermic storage and cryopreservation of hepatocytes: The protective effect of alginate gel against cell damages. Cell Transplant, 2003, 12(6): 579—592
- 21 Ebata H, Kusano M, Onishi T, et al. Liver regeneration utilizing isolated hepatocytes transplanted into the rat spleen. Surg Forum, 1978, 29: 338
- 22 Khalil M, Shariat-Panahi A, Tootle R, et al. Human hepatocyte cell lines proliferating as cohesive spheroid colonies in alginate markedly up regulate both synthetic and detoxificatory liver function. J Hepatol, 2001, 34(1): 68—77
- 23 Rahman TM, Selden C, Khalil M, et al. Alginate-encapsulated human hepatoblastoma cells in an extracorporeal perfusion system improve some systemic parameters of liver failure in a xenogeneic model. Artif Organs, 2004, 28(5): 476—482
- 24 Yang J, Goto M, Ise H, et al. Galactosylated alginate as a scaffold for hepatocytes entrapment. Biomaterials, 2002, 23(2): 471—479
- 25 Chia SM, Leong KW, Li J, et al. Hepatocyte encapsulation for enhanced cellular functions. Tissue Eng, 2000, 6(5): 481—495
- 26 Chia SM, Wan AC, Quek CH, et al. Multi-layered microcapsules for cell encapsulation. Biomaterials, 2002, 23(3): 849—856
- 27 Quek CH, Li J, Sun T, et al. Photo-crosslinkable microcapsules formed by polyelectrolyte copolymer and modified collagen for rat hepatocyte encapsulation. Biomaterials, 2004, 25(17): 3531—3540
- 28 Weber A, Delgado JP, Parouchev A, et al. Primate hepatic foetal progenitor cells and their therapeutic potential. Pathol Biol (Paris), 2006, 54(2): 58—63
- 29 Haque T, Chen H, Ouyang W, et al. Investigation of a new microcapsule membrane combining alginate-chitosan, polyethylene glycol and poly-L-lysine for cell transplantation applications. Int J Artif Organs, 2005, 28(6): 631—637