

간섬유화가 유도된 백서에서 이식된 간세포 착상과 증식에 관여하는 인자

The Factors Affecting Transplanted Hepatocytes Repopulation in Rats with Liver Fibrosis

Purpose: Cell therapy for various diseases has gained wide acceptance. Because most patients with chronic liver failure have mild-to-severe liver cirrhosis, there are many limitations to clinical applications. We analyzed how to increase cell engraftment in rats with liver fibrosis.

Methods: We used analbuminemic SD rats (NARs) as recipients of syngeneic CAG-EGFP SD hepatocytes obtained by the 2 perfusion method. Hepatic fibrosis was induced with thioacetamide in drinking water for 6 weeks in the recipient NARs. NARs were pre-treated with gadolinium, doxorubicin, and gliotoxin before hepatocyte transplantation. We evaluated the degree of cell engraftment by RT-PCR and immunofluorescent staining for GFP and albumin. The transplanted cells were detected by immunostaining for albumin, and serum albumin was also measured.

Results: Although detection of GFP by RT-PCR was variable, albumin was detected in all groups 4 wks after hepatocyte transplantation. GFP and albumin were also detected by immunofluorescent staining 1 and 4 wks after cell transplantation. In control rats, albumin production was maximal at 3 wks, and after that it rapidly decreased. In the gadolinium and doxorubicin-treated group, albumin production was increased up to 4 wks. Albumin production in the gadolinium-treated group was superior to that of the doxorubicin-treated group.

Conclusion: Kupffer cells play the most important role in cell engraftment in hepatic fibrosis. Therefore, perturbation of kupffer cells in hepatic fibrosis is needed to increase cell engraftment.

Key Words : Hepatocyte transplantation, Engraftment, Liver fibrosis, Kupffer cell, Analbuminemic rat (NAR)

중심단어 : 간세포이식, 착상, 간섬유화, 쿠퍼세포, 알부민생성부전 백서

이상우^{1,2}, 민선옥¹, 최세별³, 김경식^{1,4}

¹연세대학교 의과대학 외과학교실,
²연세대학교 대학원 나노과학 기술
협동과정, ³고려대학교 의과대학
외과학교실, ⁴세브란스병원 세포치료센터

Sang Woo Lee, B.S.^{1,2}, Seon Ok
Min, B.S.¹, Sae Byeol Choi, M.D.,
Ph.D.³, Kyung Sik Kim, M.D.,
Ph.D.^{1,4}

¹Department of Surgery, Yonsei
University College of Medicine,
²Graduate Program of Nano Science
and Technology, Graduate School of
Yonsei University, ³Department of
Surgery, Korea University College of
Medicine, ⁴Cell Therapy Center,
Severance Hospital, Yonsei University
College of Medicine

책임저자

김경식
서울시 서대문구 성산로 250번지
연세대학교 의과대학 외과학교실
우편번호 120-752
Tel: 02-2228-2125, 2100
Fax: 02-313-8289
E-mail: kskim88@yuhs.ac

*본 논문은 2004년 연세대학교 의과대학
교수 연구비-기초(과제번호 6-2004-1101)에
의해 지원되었음.

Received: 2009. 11. 20

Accepted: 2009. 12. 10

서 론

최근 10년간의 사망률에 대한 통계청의 자료를 살펴보면 B형 간염의 호발 지역인 우리나라의 경우 간질환에 의한 사망률은 1998년 인구 10만 명 당 24.6%에서 2008년 14.5%로 감소하였지만 간암에 의한 사망률은 1998년 19.9%와 비교해 볼 때 2008년 사망률은 22.9%로 그다지 많은 변화를 보이지 않고 매우 높은 실정이다.¹ 특히 최근 들어 A형 간염에 의한 전격성 간염이 늘어 사회적 문제가 되고 있고² 수술 후 간부전 또한 매우 위험한 상황이 되는 것이 사실이다. 그러므로 간질환에 의한 사망률을 줄이기 위해서는 보다 적극적인 치료가 요구되며 현재까지의 가장 근본적인 치료법은 간이식 수술이다.^{3,4}

그러나 간이식은 공여 장기의 부족, 평생 동안의 면역 억제제 투여, 대체 치료법의 개발이 필요하다는 점에서 많은 제한이 있다.^{5,6} 특히 한국과 같이 뇌사자의 장기의 획득이 어려운 실정에서는 간이식 수술이 활발해 지기란 그리 쉽지 않은 문제이다. 그러나 많은 의사들의 노력으로 정상인의 간 일부를 절제하여 이식하는 부분 간이식 수술이 많이 시행되고 있다는 점에서 많은 간부전 환자에게 희망이 되고 있다.⁷ 많은 간 절제술을 통한 외과 의사의 경험 축적으로 인해 합병증이 많이 줄어들었다고 해도 이 역시 정상인에서 간의 일부분을 절제한다는 점에서 안전성이 문제가 될 수 있다.

간세포 이식은 간단히 정맥내 주사 혹은 비장내 투여^{8,9} 등을 통해서 쉽게 시술할 수 있고 장기 이식이 어려운 뇌사자의 간의 경우에도 세포만 분리하여 이 세포를 이용할 수 있다는 점¹⁰과 제대혈¹¹ 혹은 골수 세포¹² 등 조혈 모세포(hematopoietic stem cell)를 이용하여 치료에 응용할 수 있다는 점에서 간부전의 치료에 있어서 하나의 대안이 될 수 있다.

간세포 이식의 기전을 살펴보면 비장 내에 이식된 경우 주입한 간세포는 문맥 혈류를 통해 간단히 간으로 가게 된다. 간에서는 이식된 간세포가 색전(emboli)을 이루어 허혈성 손상을 유발하게 되고 허혈성 손상으로 인해 간내 동양 세포(sinusoidal cell)이 파괴되면 간실질 내로 이동하여 주위의 간세포에 합체됨으로써 기능을 하게 된다.^{13,14} 또한 이식된 간세포는 착상전에 대망세포, 혈관내피세포, 성상세포 등에 의해 많은 영향을 받게 된다. 특히 본 연구자들은 혈관내피세포를 파괴하여 이식세포의 착상을 증명한 바 있다.¹⁵ 그러나 간경변

이 있는 경우에도 간세포 이식이 동물 실험에서 유용하다는 보고¹⁶가 있지만 이 경우 간 내에 존재하는 다른 세포들이 어떤 영향을 주는지에 대한 연구는 전무한 실정이다. 그러므로 간경변이 유발된 동물에서 대망 세포, 내피세포 및 성상 세포의 작용을 억제하는 약물을 투여하여 각각의 조건에서 간세포 착상 및 증식 과정을 비교 관찰하여 간세포의 착상 및 증식에 영향을 주는 인자들을 찾아내고 이들 인자들이 이식된 간세포의 착상 및 증식 과정에 어떻게 관여하는 것을 밝혀내어 이들 인자들의 상호 연관성 분석하여 실제로 임상에서 간경변을 동반한 환자에 대해 간세포 이식을 할 경우 도움을 얻고자 한다.

방 법

1. 실험 동물의 선정

연세대학교 의과대학 임상 연구 센터 실험 동물부에서 제정한 윤리적 동물실험 지침에 따라 실험 절차에 대한 사전 심의를 얻은 후 동물 실험을 진행하였다(동물 실험 번호: 09-092). 이식된 간세포를 쉽게 구별하고 이식된 간세포의 효능을 검증하기 위해 수혜자로 NAR (Nagase Analbuminemic Rat) (Japan SLC inc., Shizuoka, Japan)을, 면역 거부 반응을 배제하기 위해 공여자로서는 공통 유전형인 GFP를 발현하는 CAG-EGFP SD-Tg Rat (Japan SLC inc., Shizuoka, Japan)을 사용하였다. 공여자 및 수혜자 모두 80~100 g의 실험용 쥐를 구입하여 2주간 실험실에서 순화시킨 뒤 150~200g의 쥐만을 선별하여 실험을 수행하였다.

2. 간섬유화의 유도

간섬유화를 유도하기 위해 thioacetamide (Sigma, St. Louis, USA)를 0.03%의 농도로 식수에 희석시킨 뒤 6주간 음용 투여하였다.

3. 각종 약물의 희석방법 및 전처치

간경변이 유도된 백서(n=15)를 대조군(n=3), 대식세포(Kupffer cell) 저해제(inhibitor)인 Gadolinium 투여군(n=4), 내막세포(endothelial cell) 저해제인 Doxorubicin 투여군(n=4) 및 성상세포(Stellate cell) 저해제인 Gliotoxin 투여군(n=4)을 구분하여 전처치 하였다. 각각의 약물의 희석방법, 투여 용량 및 투여 방법은 Table 1과 같다.

Table 1. Information of adjuvant & dose for treatment

Adjuvant	Dose (mg/kg)	Diluted sol.	Inj. type & time	Target
Gadolinium	14	D/W	i.p. & 24 hrs before Tx.	Kupffer cell
Gliotoxin	3	DMSO	i.p. & 48 hrs before Tx.	Stellate cell
Doxorubicin	10	D/W	i.p. & 24 hrs before Tx.	Endothelial cell in liver

Table 2. Primer Sequence for PCR analysis

Primer	Sequence	Size	Tm.	Cycle
Albumin	S 5'-ATA CAC CCA GAA AGC ACC TC-3'	305	58	35
	A 5'-CAG AGT GGA AGG TGA AGG TC-3'			
eGFP	S 5'-GAC GTA AAC GGC CAC AAG TTC-3'	291	55	35
	A 5'-GTC GCC CTC GAA CTT CAC CTC-3'			
GAPDH	S 5'-TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA-3'	300	60	35
	A 5'-AGA TCC ACA AAC GGA TAC AT-3'			

4. 간세포의 분리

간세포를 얻기 위한 공여자 쥐로 GFP 발현 SD rat을 30 mg/kg의 zoletil (Virbac, Carros, France)을 복강내 주사한 뒤에 완전히 마취가 되면 정중 개복하여 상장간 정맥을 노출한 뒤 21 G vinca needle를 삽관하여 두 과정 관류 기법(Two-step perfusion technique)을 이용하여 관류하였다. 관류액으로는 liver perfusion medium (GIBCO, Carlsbad, USA)와 liver digest medium solution (GIBCO, Carlsbad, USA)을 차례대로 제조사에서 권유하는 방법에 따라 간세포 분리를 시행하였으며 자세한 방법은 다음과 같다. Perfusion roller pump에 의한 관류액의 관류 속도(flow)는 쥐의 무게 100 g 당 10 mL/min으로 하며 10~12분 동안 관류한다. 관류액의 온도는 37°C를 유지하도록 한다.

간이 부드러워지며 간 표면에 균열이 생기면 간을 제거하여 멸균된 Hood에서 칼슘이 들어 있는 Hepatocyte wash medium (GIBCO, Carlsbad, USA)을 이용하여 간세포를 살며시 분리한다. 분리된 세포는 4°C에서 50 G에서 5분간 원심 분리한다. 상층액은 제거한 뒤 남아 있는 세포를 RPMI 배양액으로 세척하고 약간을 간세포 배양을 위해 준비하고 세포의 활력도(viability)는 trypan blue dye exclusion 방법으로 측정하였다. 죽은 세포에 의해 면역 반응이 유도되는 것을 막기 위해 세포의 활력도가 85% 이상인 경우에 이식에 사용하였다.

5. 간세포 이식

각각의 약물로 전처치 된 각 군의 NAR (Nagase Analbuminemic Rat)을 zoletil로 마취한 뒤 좌측 늑골 하연에서 1 cm 아래 부위를 절개하였다. 절개창을 통해 비장을 체외로 꺼낸 뒤 비장 하부를 수술용 봉합사(#3 silk)로 부분 결찰하고 0.5 cc의 간세포 분리액(5×10⁶개의 간세포를 함유)을 24 G의 주사기를 이용하여 비장 하부에 주사하였으며 주사기 제거와 동시에 부분 결찰한 봉합사를 완전 결찰하여 주사된 세포액의 누출을 방지하였다. 비장을 다시 복강 내에 넣어 두고 보통의 방법으로 폐복하였다.

6. 이식된 세포의 확인을 위한 GFP 및 albumin에 대한 RT-PCR

간세포 이식후 7일째 간좌엽에 대해 간 부분 절제술을 시행하였고 이식후 1달째 쥐를 희생하여 전간을 얻어 GFP 및 albumin에 대해 RT-PCR 시행하였으며 GFP 및 albumin의 Primer는 Table 2와 같다.

7. 이식된 세포의 확인을 위한 면역 형광 염색

이식된 간세포가 간실질 내로 들어가 증식하는 것을 평가하기 위해서 GFP과 albumin 발현을 관찰한다, 간세포이식 후 1개월에 간조직 생검을 희생하여 간조직을 액체 질소 탱크에 넣어 급속 냉동시킨 후 5 um의 두께로 절편을 만들어 4°C에서 10분간 chloroform-acetone (1 : 1, vol/vol) 용액에서 고정

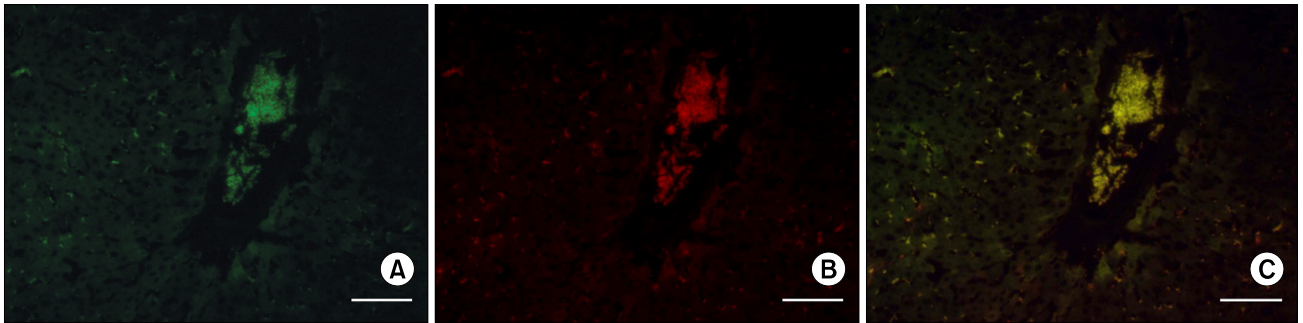


Fig. 1. Immunofluorescence assay. (A) autofluorescence for eGFP, (B) immunofluorescent staining for albumin with Texas-red, (C) the merge image. Scale bar: 100 μ m.

한 뒤 상온에서 30분간 건조시킨다. 그 후 슬라이드를 PBS로 세척한 뒤 Hematoxylin으로 약하게 반대 염색한다. Glycerol로 slide를 덮고 사진을 촬영한다. Paraffin에 의한 간조직 샘플을 5 μ m의 두께로 절편하여 slide에 옮겨서 xylene으로 paraffin을 제거한 후 100%, 75%의 Ethanol으로 고정을 한다. 3% H₂O₂를 10분간 처리한 후 PBS 용액에 anti-Albumin primary antibody를 넣어서 조직을 염색하여 4°C의 조건에서 overnight한다. PBS로 3번 수세한 후 PBS 용액에 secondary antibody를 넣어서 염색을 하고 다시 PBS로 3번 수세한다. DAPI로 핵을 염색한 후 cover-slide를 덮고 형광현미경으로 알부민(Albumin)의 발현을 관찰한다. 이식된 eGFP (녹색) 발현 세포가 알부민을 생성하는지를 확인하기 위하여 알부민을 발현하는 2차 항체를 Texas-red (적색)로 사용하였으며 각각 발현되는 세포가 일치하는 지를 영상 분석 프로그램(DP manager version 3, Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 합체 (merge)하였다(Fig. 1).

8. 간기능 평가를 위한 아미노 전이 효소 측정 및 이식된 세포의 기능 평가를 위한 혈청내 알부민 측정

혈청내 간세포 이식전, 간세포 이식후 1주일, 2주일 및 1달째에 쥐의 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 실온에서 30분간 incubation한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리를 한다. 혈청(serum)만 분리한 후 생화학분석기를 이용하여 혈청내 아미노전이효소 및 알부민을 측정하였다.

9. 이식된 간세포의 착상과 증식의 형태학적 분석

이식된 간세포의 갯수는 각 실험동물 당 여러 개의 절편에서 측정한다. 이식한 세포의 수는 고배율($\times 100$)에서 간문부

를 30개 연속하여 측정한 뒤 점수화한다. 이식한 간세포의 착상은 완전하게 간세포에서 알부민이 발현되는 것으로 하였다 (Fig. 2).

결 과

1. 분리된 간세포의 활력도

간세포 분리를 위한 관류액 관류 후 적출된 간의 무게는 34 gm였고 간세포 분리 후 남은 간의 무게는 32 gm였다. 분리된 간세포는 1.86×10^8 개로 간 gm당 9.3×10^7 개였다. 분리 직후 활력도는 91%였고 간세포 이식이 끝난 뒤 측정된 활력도는 84%였다(Fig. 3).

2. 각 군별 albumin 및 GFP에 대한 RT-PCR

모든 실험군에서 이식 후 4주에도 알부민의 발현이 있었지만 GFP의 발현은 각 실험군 및 개체에 따라 다양한 양상을 보였다(Fig. 4).

3. 면역 형광 분석

이식된 세포의 착상 여부와 알부민 생성 여부를 확인하기 위해 시행한 면역 형광 분석에서 모든 실험군에서 이식된 세포가 이식 후 7일째와 28일째 모두 착상이 되어 알부민을 생성하고 있는 것을 확인하였다(Fig. 5).

4. 아미노 전이 효소 및 알부민의 변화

이식하기 전에 시행한 간기능 검사상 모든 군에서 ALT가 AST보다 상승된 수치를 보였으며 이는 투여된 약물로 인한 간손상이 유발되는 것으로 생각되었다. 하지만 이식 후 2주가

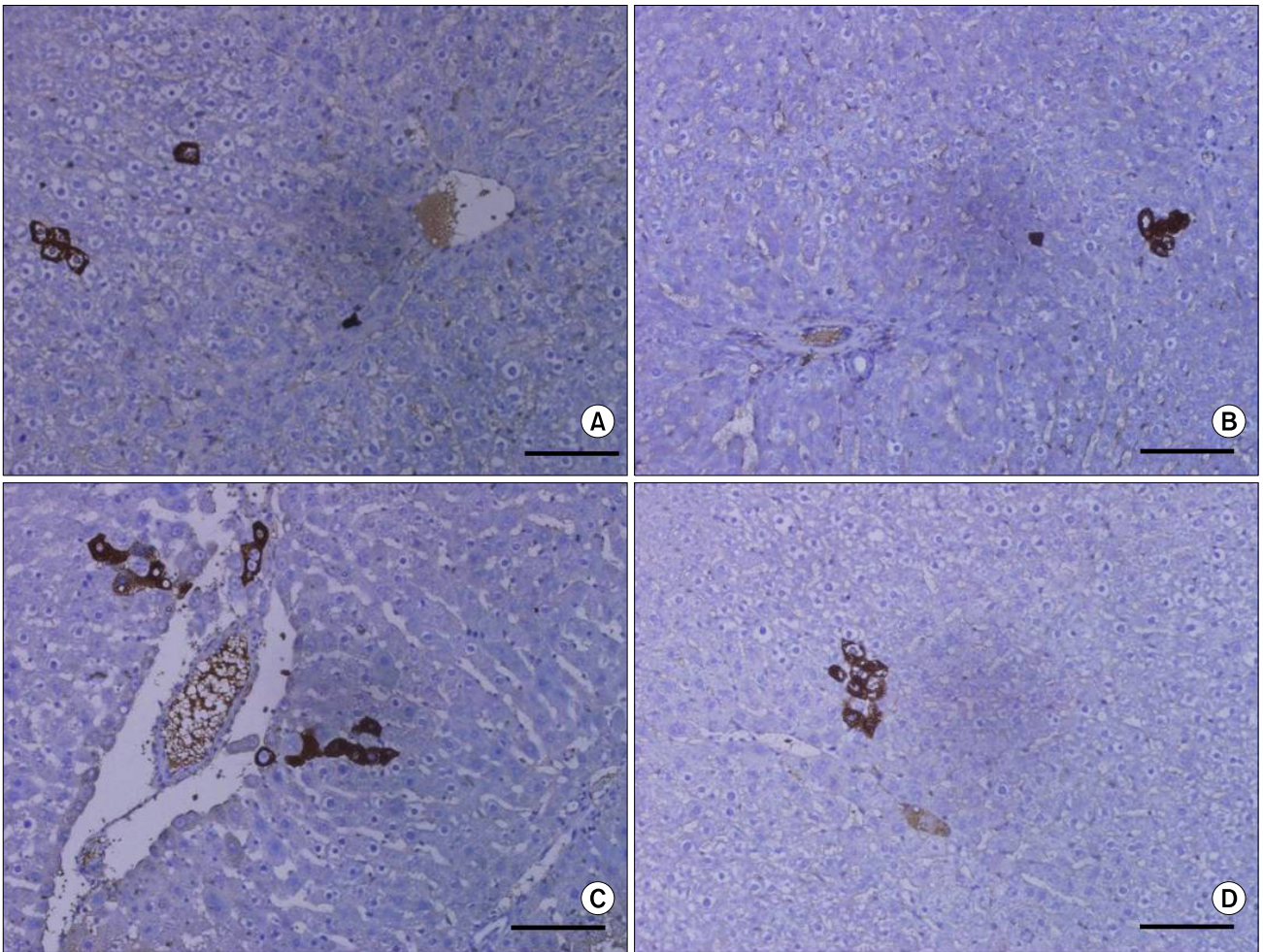


Fig. 2. Immunohistochemistry staining for albumin on 7 days after transplantation. (A) control, (B) Gadonilium, (C) Doxorubicin, (D) Gliotoxin, and Brown colored cells-positive for albumin. Scale bar: 100 μ m.

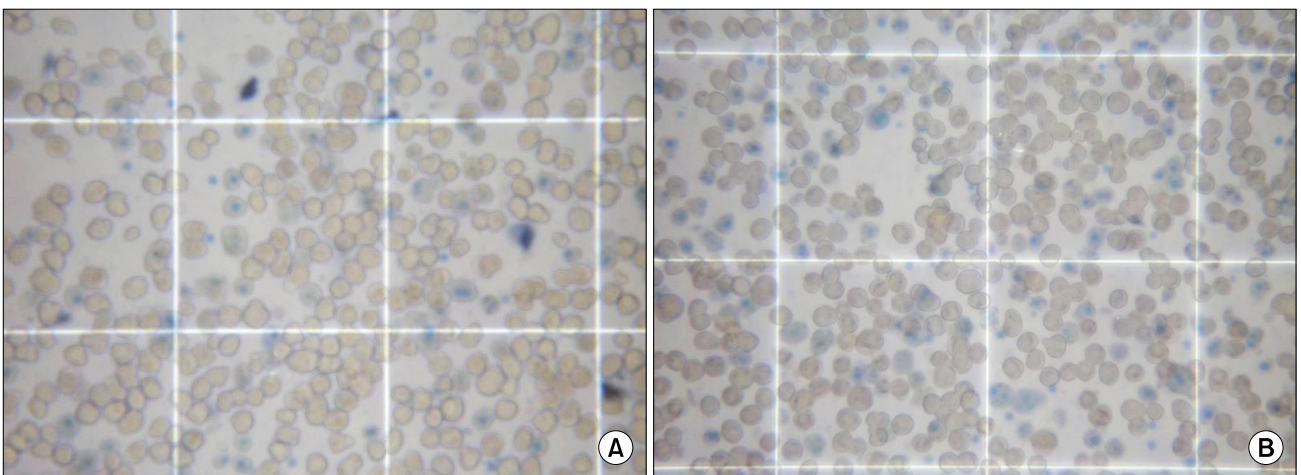


Fig. 3. The cell viability by Trypan Blue staining (A) Pre-cell transplantation, (B) post-cell transplantation.

지나면서 간수치가 안정화되었다(Fig. 6).

알부민 생성은 이식 3주 후 정상군에서 가장 높았으며 이식 4주 후 최대 감소하였다. Gliotoxin 처치군에서도 이식 4주 후 생성이 감소하는 경향을 보였으나 Gadolinium 처치군 및 doxorubicin 처치군에서는 이식 3주 후에 비해 4주 후에 알부민 생성이 증가하였다. 특히 Gadolinium 처치군에서 doxorubicin 처치군에 비해 알부민의 생성이 더 많은 것을 알 수 있었다(Fig. 7).

5. 이식 세포의 확인

1주일 후 이식된 세포는 간문맥 부위당 대조군 1.4 ± 0.7 , gadolinium 처치군 1.3 ± 0.4 , doxorubicin 처치군 1.7 ± 0.1 , gliotoxin 처치군 1.8 ± 0.3 개였고 이식 4주 후 이식된 세포는 간문맥 부위당 gadolinium 처치군 0.6 ± 0.4 , doxorubicin 처치군 1.8 ± 0.1 , gliotoxin 처치군 1.1 ± 0.3 개였다(Fig. 8).

고 찰

임상에 적용하기에 앞서 이식된 세포가 효과적으로 착상하는가에 대한 평가가 동물 실험 모델을 통해 반드시 선행되어야 한다.¹⁷ 특히 임상에서 만나는 환자들은 대부분 간경변을 동반하고 있어 동물 실험에 있어서도 이런 조건을 맞추어야 한다. 이식된 세포가 착상이 되어 간 기능을 수행하는지 여부를 평가하기 위해서 알부민을 생성할 수 있는 간세포를 알부민 생성 부전 동물에 이식하여 형태학적 및 기능적 평가를 시행하였다. 알부민을 생성하지 못하는 백서의 종류로는 Sprague-Dawley (SD)에서 온 Nagase analbuminemic rat과

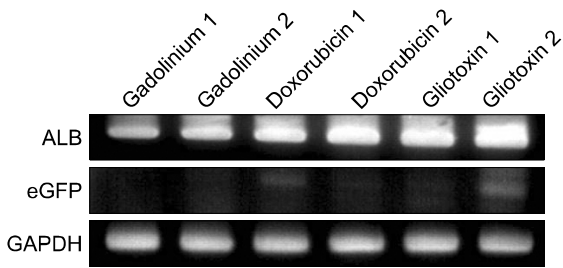


Fig. 4. RT-PCR analysis on 28 days after transplantation.

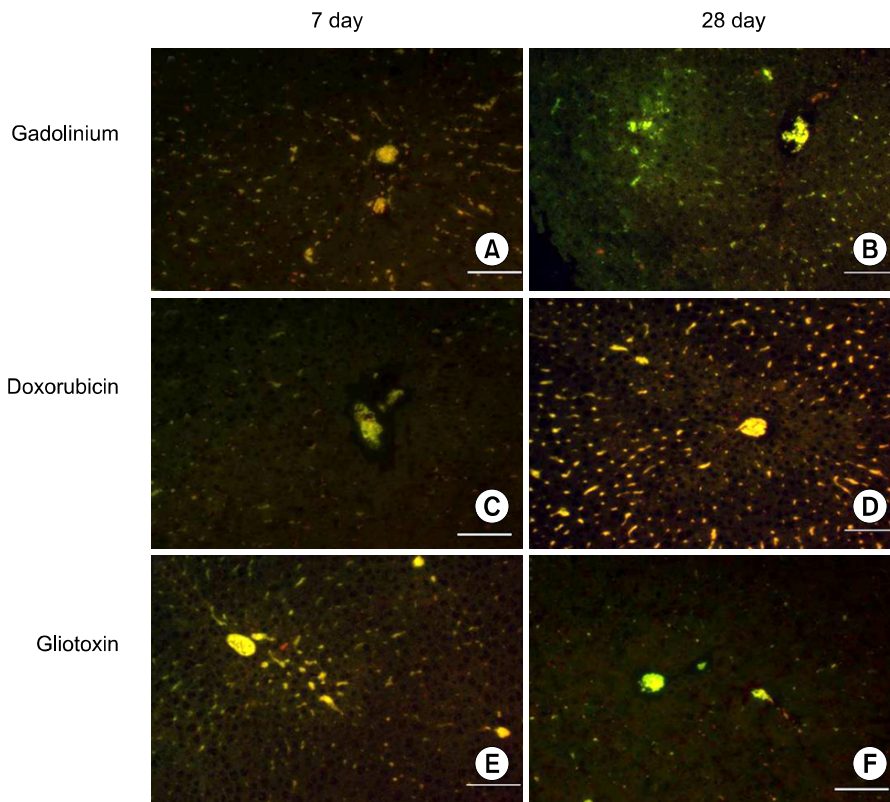


Fig. 5. Immunofluorescence Assay (Yellow cells are transplanted cells), (A, C, E) at 7 days after cell transplantation, (B, D, F) at 28 days after cell transplantation. (A, B) gadolinium treated. (C, D) Doxorubicin treated, (E, F) Gliotoxin treated. Scale bar: 100 μ m.

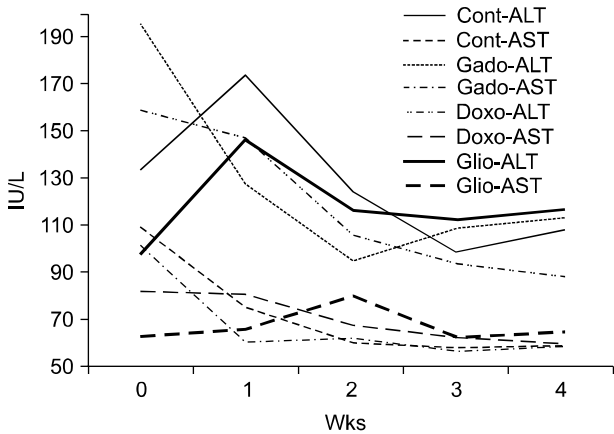


Fig. 6. The changes of liver enzymes after perturbation and after hepatocyte transplantation.

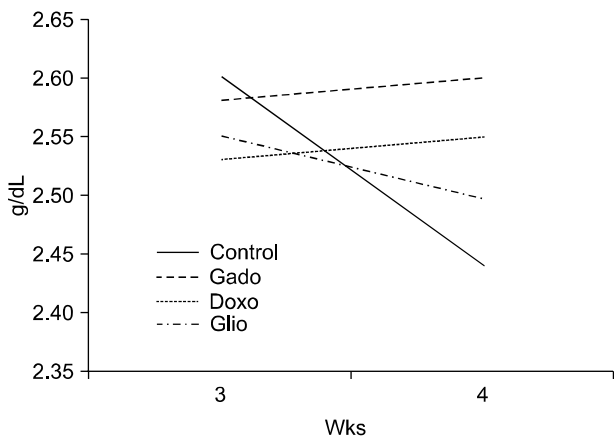


Fig. 7. The changes of serum albumin level at 3 wks and 4 wks after hepatocyte transplantation.

August×Copenhagen Irish (ACI), F344 및 spontaneous Hypertensive rat (SHR)에서 유래된 알부민 형성 부전 백서 등 4가지가 있다.^{18,19} F344 알부민 형성 부전 백서에 F344 백서의 간세포를 이식하는 경우에는 면역화학염색을 시행하지 않고도 화학염색만으로 손쉽게 이식된 세포를 찾을 수 있어 아주 좋은 동물 모델이지만²⁰ ACI 백서, F344 및 SHR에서 유래된 알부민 형성 부전 백서는 국내에 반입이 되어 있지 않아 본 저자들은 SD 백서에서 thioacetamide (Sigma, St. Louis, USA)로 간경변을 유도하였으며 이를 가지고 실험을 진행하였다.²¹ 그러나 SD 백서에서 유래한 알부민을 형성하지 못하는 NAR은 고지혈증과 고콜레스테롤혈증을 동반하고 있기 때문

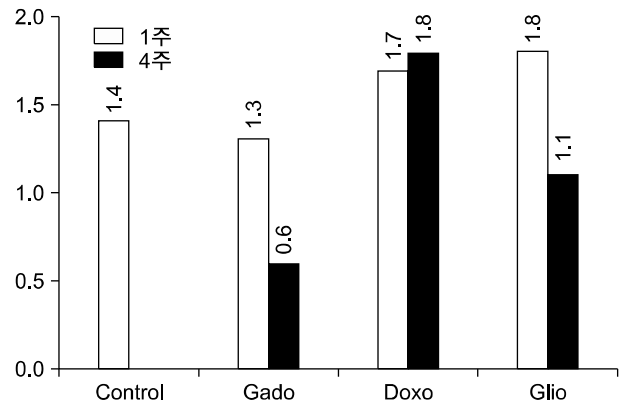


Fig. 8. The numbers of engrafted cells at 7 days and 28 days after cell transplantation.

에 thioacetamide로 간섬유화는 유도할 수 있지만 간경변의 유도는 불가능한 것으로 알려져 있다.²²

이식된 간세포의 착상 기전을 간단히 살펴보면 이식된 세포가 간문맥을 통해 간내 sinusoid에 도달하면 색전을 유발하여 내피세포에 손상을 주어 간 실질내로 들어 가서 간세포와 합체하는 것으로 알려져 있다.¹³ 이 과정에서 착상과 증식을 유도하기 위해서 혈관 확장제를 사용하여 sinusoid로 대량의 세포를 보내거나²³ 간절제²⁴ 혹은 방사선조사²⁵를 통해서 간재생을 촉진하는 인자들을 유도하는 방법, 내막 세포와의 고착을 증강시키는 방법²⁶ 등이 소개되어 왔다. 최근 들어 간 내에 존재하는 Kupffer 세포,²⁷ 내막세포,¹⁵ 정상세포²⁸ 등과의 상호작용에 의한 연구가 활발히 진행되고 있다. 하지만 간섬유화가 유도된 백서에서 간 내에 존재하는 세포들과의 상호작용에 대해 알려진 바가 없어 Kupffer 세포를 억제하는 gadolinium과 내막세포를 억제하는 doxorubin 및 정상세포 저해제인 gliotoxin을 간섬유화가 유도된 백서에 투여하여 이식된 간세포의 착상과 기능을 살펴보았다.

이식된 간세포의 착상을 규명하기 위해 수혜자로 NAR (Japan SLC inc., Shizuoka, Japan)을, 면역 거부 반응을 배제하기 위해 공여자로서는 공통 유전형인 GFP를 발현하는 CAG-EGFP SD-Tg Rat (Japan SLC inc., Shizuoka, Japan)을 사용하여 GFP와 알부민의 발현을 관찰하였다. 정상 NAR에 간세포를 이식한 경우 간세포가 착상하여 알부민을 생성하는데 걸리는 시간은 3주가 걸리는 것으로 알려져 있지만²⁹ 이식된 세포들을 이식 후 7일째 및 28일째 각각의 실험군에서 모두 발견할 수 있었으며 알부민을 합성하고 있는 것을 알 수

있었다(Fig. 5). David 등의 연구를 살펴보면²² NAR의 알부민 참고치는 0.025 ± 0.005 mg/mL이고 SD의 참고치는 30 ± 5 mg/mL로 이식후 3주에 측정된 혈청 알부민 검사상 대조군 26 mg/mL, gadolinium 처치군 25.8 mg/mL, doxorubicin 처치군 25.3 mg/mL, gliotoxin 처치군 25.5 mg/mL로 이식된 간세포가 각 실험군 모두 알부민을 생성하는 것을 알 수 있었다. 간기능 검사상 이식 후 3주부터 간효소치가 안정화되는 것을 보아(Fig. 6) 그 이후는 이식된 간세포의 증식을 유도할 수 있는 인자가 없고 이식된 세포의 증식에 제한이 있어서 알부민 합성이 많이 증가하지 못한 것으로 추정된다. 이식 4주 후의 혈청 알부민 수치만을 단순 비교해 볼 때 gadolinium투여군 > doxorubicin 투여군 > gliotoxin 투여군 > 대조군의 순서로 kupffer 세포를 억제하는 것이 간섬유화 유도 군에서도 가장 좋으며 이는 초기의 이식 세포의 제거를 가장 중요한 요인에 의한 것으로 생각된다.²⁷

효소 결핍 간질환의 경우에는 전체 간의 5% 정도만 이식하여도 효소 결핍 질환이 교정되는 것을 보고하였지만³⁰ 알부민 합성 부전 동물에서도 알부민 합성에 있어서 이와 같은 경향을 보이는지는 알 수 없다. 그러므로 이식된 간세포를 정량적으로 측정할 결과와 혈청 알부민 수치와 일치하지 못하기 때문에 이식된 간세포의 증식을 유도하는 방법을 병합하여 이식된 간세포의 수와 관련이 있는지에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Korean Statistical Information Service. *The statistical Results of causes of death in 2008*.
2. Jeong SH. *Current status and vaccine indication for hepatitis A virus infection in Korea*. *Korean J Gastroenterol* 2008;51:331-337.
3. Gotthardt D, Riediger C, Weiss KH, et al. *Fulminant hepatic failure: etiology and indications for liver transplantation*. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22(Suppl 8):viii5-8.
4. Lidofsky SD. *Liver transplantation for fulminant hepatic failure*. *Gastroenterol Clin North Am* 1993;22:257-269.
5. Starzl TE, Demetris AJ, Van Thiel D. *Liver transplantation (2)*. *N Engl J Med* 1989;321:1092-1096.
6. Lo CM, Fan ST, Liu CL, Chan SC, Wong J. *The role and limitation of living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma*. *Liver Transpl* 2004;10:440-447.
7. Lee SG, Hwang S, Kim KH, et al. *Toward 300 liver transplants a year*. *Surg Today* 2009;39:367-373.
8. Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, et al. *Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia*. *Nat Genet* 1994;6:335-341.
9. Bilir BM, Guinette D, Karrer F, et al. *Hepatocyte transplantation in acute liver failure*. *Liver Transpl* 2000;6:32-40.
10. Pietrosi G, Vizzini GB, Gruttadauria S, Gridelli B. *Clinical applications of hepatocyte transplantation*. *World J Gastroenterol* 2009;15:2074-2077.
11. Kakinuma S, Tanaka Y, Chinzei R, et al. *Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells*. *Stem Cells* 2003;21:217-227.
12. Sakaida I. *Autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis*. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:1349-1353.
13. Gupta S, Bhargava KK, Novikoff PM. *Mechanisms of cell engraftment during liver repopulation with hepatocyte transplantation*. *Semin Liver Dis* 1999;19:15-26.
14. Gupta S, Rajvanshi P, Malhi H, et al. *Cell transplantation causes loss of gap junctions and activates GGT expression permanently in host liver*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G815-826.
15. Kim KS, Joseph B, Inada M, Gupta S. *Regulation of hepatocyte engraftment and proliferation after cytotoxic drug-induced perturbation of the rat liver*. *Transplantation* 2005;80:653-659.
16. Kobayashi N, Ito M, Nakamura J, et al. *Hepatocyte transplantation in rats with decompensated cirrhosis*. *Hepatology* 2000;31:851-857.
17. Wu YM, Gupta S. *Hepatic preconditioning for transplanted cell engraftment and proliferation*. *Methods Mol Biol* 2009;481:107-116.
18. Nagase S, Shimamune K, Shumiya S. *Albumin-deficient rat mutant*. *Science* 1979;205:590-591.
19. Shumiya S, Nagase S. *Establishment and characteristics of three analbuminemic congenic strains of rats*. *Jikken Dobutsu* 1986;35:409-416.
20. Gupta S, Rajvanshi P, Lee CD. *Integration of transplanted hepatocytes into host liver plates demonstrated with dipeptidyl peptidase IV-deficient rats*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5860-5864.
21. Cui FJ, Choi SB, Cho JA, et al. *The development of an efficient rat hepatic cirrhosis model*. *Korean J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2007;11:46-52.
22. David P, Alexandre E, Chenard-Neu MP, Wolf P, Jaeck D, Richert L. *Failure of liver cirrhosis induction by thioacetamide in nagase analbuminaemic rats*. *Lab Anim* 2002;36:158-164.
23. Slehria S, Rajvanshi P, Ito Y, et al. *Hepatic sinusoidal vasodilators improve transplanted cell engraftment and ameliorate microcirculatory perturbations in the liver*. *Hepatology* 2002;35:1320-1328.
24. Lesage G, Glaser SS, Gubba S, et al. *Regrowth of the rat biliary tree after 70% partial hepatectomy is coupled to increased secretin-induced ductal secretion*. *Gastroenterology*

- 1996;111:1633-1644.
25. Guha C, Deb NJ, Sappal BS, Ghosh SS, Roy-Chowdhury N, Roy-Chowdhury J. *Amplification of engrafted hepatocytes by preparative manipulation of the host liver. Artif Organs 2001; 25:522-528.*
26. Kumaran V, Joseph B, Benten D, Gupta S. *Integrin and extracellular matrix interactions regulate engraftment of transplanted hepatocytes in the rat liver. Gastroenterology 2005; 129:1643-1653.*
27. Joseph B, Malhi H, Bhargava KK, Palestro CJ, McCuskey RS, Gupta S. *Kupffer cells participate in early clearance of syngeneic hepatocytes transplanted in the rat liver. Gastroenterology 2002;123:1677-1685.*
28. Benten D, Kumaran V, Joseph B, et al. *Hepatocyte transplantation activates hepatic stellate cells with beneficial modulation of cell engraftment in the rat. Hepatology 2005; 42:1072-1081.*
29. Oren R, Dabeva MD, Petkov PM, Hurston E, Laconi E, Shafritz DA. *Restoration of serum albumin levels in nagase analbuminemic rats by hepatocyte transplantation. Hepatology 1999;29:75-81.*
30. Lee KW, Lee JH, Shin SW, et al. *Hepatocyte transplantation for glycogen storage disease type Ib. Cell Transplant 2007; 16:629-637.*
-