대한내과학회지 : 제53권 제4호 1997

비장에 이식된 간세포의 조직학적 특성과 알부민 유전자의 발현

연세대학교 원주의과대학 내과학교실, 병리학교실[1)]
연세대학교 의과대학 생화학교실[2)]

권상옥 · 이동기 · 김준명 · 박의련 · 심광용 · 정필호 · 조미연[1)] · 허만욱[2)]

서 론

간이식은 전격성 간염이나 말기 간질환 그리고 대사성 간질환에 가장 효과적인 치료 방법으로 알려져 있다. 그러나 간이식에 드는 비용이 비싸고 수술의 위험성이 상당하며 공여간이 절대적으로 부족하여 간세포 이식이나 유전자 치료가 최근 주목을 받고 있다. 간세포 이식은 간실질세포(이하 간세포로 표기함)만을 분리하여 여러 장기에 이식하는 것을 말하며 이식장소로는 복강과 비장이 널리 이용되고 있다. 그 중 비장내 간세포이식은 간세포이식의 실험 연구에 가장 많이 이용되어 왔으며 단일 간효소 결핍이나 간부전의 소견을 보이는 동물 모델에 시술한 결과 간 대사기능을 보조하여 생존율을 높여주는 것이 확인되었다. 최근에는 실험적이기는 하나 간부전 환자를 대상으로 치료에 이용되기 시작하였다. 또한 비장내 간세포 이식은 이소성 간세포(hepatocyte on the ectopic site) 연구의 유용한 실험방법으로 이에 대한 관심이 일고 있다.

유전자 발현 연구에 널리 이용되고 있는 일차 간세포는 일주일이상 배양할 때 간특유의 유전자 발현이 거의 멈추기 때문에 장기간 유전자발현의 연구 방법으로는 문제가 있었다. 동계 간세포(syngeneic hepatocyte)를 비장에 이식할 경우 이식된 간세포는 장기간 생존하는 것으로 알려져 있어 이식된 간세포가 간특유의 유전자발현을 하는 경우 비장에 이식된 간세포는 이소성 간세포(liver parenchymal cell on the ectopic site)의 장기간 유전자발현[1)]뿐만 아니라 생착(engraft)이나 증식[2)]의 연구에 이용될 수 있을 것으로 생각한다.

국내에서도 백서를 이용한 비장내 간세포이식 연구가 있었으나 주된 관심은 간세포 이식의 기술적인 측면[3)]과 치료 효과[4)]에 국한되어 있었다. 이 연구에서는 동계백서를 이용하여 비장내 간세포 이식을 시행하고 장기간 경과한 뒤 이식된 간세포의 조직학적 특성를 관찰하고, 이식된 간세포가 알부민 유전자 발현을 하는지 확인하고자 하였다. 이러한 연구결과는 이식된 간세포가 일종의 체내 간세포 배양(liver cell culture in vivo)으로 장기간 유전자발현 연구에 유용한 실험방법이 될 수 있는지 여부를 아는데 도움이 될 것으로 생각한다.

재료 및 방법

1. 실험동물

수컷의 동계 백서 Fischer 344를 화학연구소(대전)에서 구입하여 모든 실험에서 간세포의 공여자와 수여자로 하였다. 보통의 동물실에서 사육하였으며 사료와 물은 임의로 먹게 하였다. 간세포 분리하기에 적합하도록 몸무게가 250-280gm이 되었을 때 실험을 시행하였다.

2. 간세포 분리 및 비장내 간세포 이식

간세포 분리는 two-stage in situ collagenase perfusion technique[5)]을 약간 변형하여 시행하였다.

entobar마취후 복부를 절개하여 복부 대동맥에 heparin 0.3cc를 정맥주사하고 문정맥(portal vein)에 17G의 polyethlene tube를 삽관하였다. calciumfree

접 수 : 1996년 8월 24일
통 과 : 1996년 12월 3일
* 본 논문의 요지는 1995년 대한간학회 추계 학술대회에서 발표되었음.

Hanks solution으로 관류시키며 신속하게 간상부의 하대정맥을 절개하여 관류액이 배액되도록 하는 non-recirculation perfusion을 시행하였다. Hanks solution으로 약 5분 관류한 후 절제한 간을 1mM calcium chloride와 0.05% collagenase type IV (Sigma, USA)를 넣은 새로운 관류액으로 약 15분간 recirculation perfusion을 실시하였다. 관류량은 30 ml/min, PH와 온도는 각각 7.4와 37℃를 유지하도록 하였다. 약 15분이 경과하여 간이 종대되고 표면에 열상이 나타나기 시작하면 관류를 끝내고 간을 꺼내어 개빗으로 빗겨 간표면에 충분한 열상을 가한 후 부드럽게 흔들었다. 간이 해체되며 방출되는 cell suspension을 완충액을 넣은 용기에 받았다. metalic sieve를 통해 여과한 후 50g에서 1분간 3회 원심분리를 시행하여 비실질세포(nonparenchymal cell)와 죽은 세포를 제거하였다. trypan blue exclusion test를 실시하여 viability와 세포수를 계산하였고 viability 가 80%이상인 경우 간세포이식을 시행하였다.

다른 쥐를 개복하여 비장실질에 약 3×10^7개의 간세포를 0.5ml의 배양액에 섞어 25G 나비침으로 직접 주입하였다.

3. 간과 비장으로부터 total RNA 분리 및 Northern blot analysis

동계 백서의 정상 간과 비장, 그리고 간세포이식하고 6개월과 12개월이 경과한 비장에서 각각 분리한 total RNA(10ug)를 이용하여 간세포 특이 유전자인 albumin mRAN의 발현을 조사하였다. total RNA를 얻기 위하여 간조직은 2g, 비장은 전체를 solution D (4M guanidium thiocynate, 25mM Na-citrate pH=7.0, 0.5% sarcosyl, 0.1M 2-mercaptoethanol, 6ml phenol, 1.2ml chloroform/isoamyl alcohol)에 넣은 뒤 polytron probe(Omni Interantional Waterbury, CT, USA)를 사용하여 아주 잘게 분쇄하였다. 여기에 0.6ml의 2M Na-citrate(pH=4.0)을 섞은 후 10,000×g, 40℃에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 취했다. 동량의 isopropyl alcohol을 더하여 -20℃에서 20분 정도 방치한 후 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 침전물을 취했다. 이를 solution D (500ul)에 녹이고 500ul의 isopropyl alcohol를 넣은 후 -20℃에서 한시간 방치한 뒤 원심 분리하여 얻어진 RNA침전물을 500ul의 DEPC(diethyl pyrocarbonate)로 처리된 ddH20(0.5% sodium dodexyl sulfate, SDS)에 녹여 -70℃에 얼려 보관하였다[6].

10ug의 total RNA를 1.1% formaldehyde agarose gel 전기 영동으로 분리하고 nitrcoellulose막에 전이시켰다[7]. 그리고 막을 80℃ 진공 상태에서 가열 건조시켜 RNA를 막에 고정시켰다. 막을 prehybridization 용액(50% formamide, 5×SSC, 2×Denhardt's Soln., 0.1% SDS)으로 55℃에서 2시간 처리 후 같은 용액에 random hexamer 표지방법 (rediprime random primer labeling kit, Amersham International PLC, Bukinghamshire, England)으로 α-[32P]-dCTP로 표지한 백서 albumin cDNA(1.2kb Pst I 제한 효소 절편, 미국 Emory대학 분자생물학과의 Dr. Morgan 에게서 얻음)를 더하고 42℃에서 밤새 반응시켰다. 막에 붙어있는 RNA와 비특이적으로 결합된 cDNA probe를 제거하기 위하여 6×SSC 용액으로 40℃에서 15분간 2번, 50℃에서 1×SSC, 0.1% SDS에 각각 5분간 세척하였다. 최종적으로 50℃에 1×SSC, 1% SDS용액으로 5분간 세척하고 nitrocellulose막을 -70℃에서 Intensifying screen을 사용하여 X-ray film에 밤새 노출시켜 autoradiogram을 얻었다.

4. 비장내 이식된 간세포의 형태학적 관찰

1) 비장에 간세포를 이식하고 1개월과 7개월이 지난 뒤 비장을 절제하여 중성 formalin에 고정하여 탈수와 침투과정을 거치고 파라핀에 포매하여 4μm 두께로 박절한 후 hematoxylin-eosin염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

2) 이식하고 7개월이 경과된 비장조직은 0.1M cacodylate buffer(pH 7.4)로 희석한 3% glutaldehyde로 4℃에서 2시간 동안 전고정하여 동일 완충액으로 세척한 후 1% OsO_4로 90분간 후고정하였다. 동일 고정액으로 20분씩 3회 세척하였으며 알코홀로 탈수시킨 후 propyl oxide로 치환하고 epon혼합액에 포매하여 60-70nm 두께로 초박절편하여 uranyl acetate와 lead nitrate로 이중염색하여 JEOL-1200EX II형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

Fig. 1. At 1 month after transplantation, the small clumps of hepatocytes(H) are dispersed through the perilymphoid red pulp(RP), sparing white pulp(WP) (H&E, ×40).

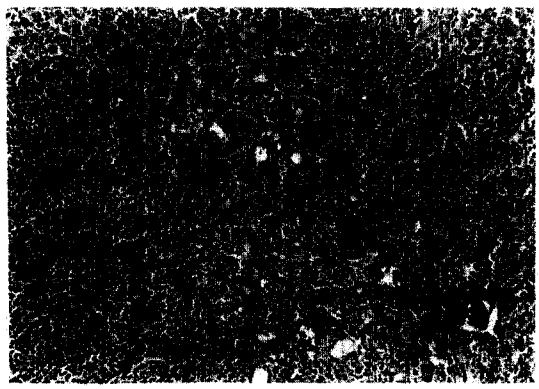

Fig. 2. The scattered hepatocytes are not organized and have round nuclei, prominent nucleoli, abundant cytoplasm with vacuoles. The oval round cells with occasional ductular lumen are also found (H&E, ×100).

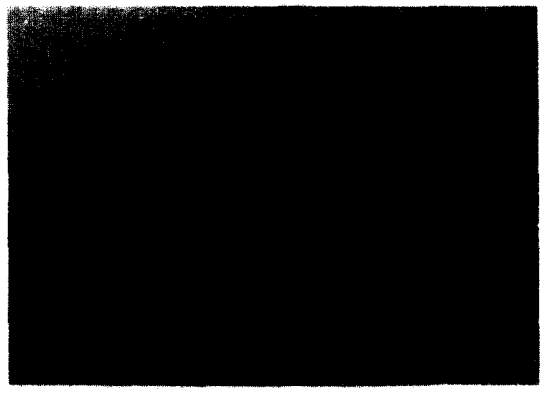

Fig. 3. At 7 months after transplantation, the splenic red pulp(RP) is totally replaced by proliferating hepatocytes. The white pulp (WP) is not involved (H&E, ×40).

Fig. 4. The hepatocytes are arranged in the cord-like pattern with sinusoidal lining. The organized acinar structure and bile duct are not seen (H&E, ×200).

결 과

1. 비장내 이식된 간세포의 형태학적 소견

비장은 육안적으로 볼 때 정상에 비하여 미만성으로 커져 있었고 표면은 매끈하였다. 피막에서는 회백색의 변색이 국소적으로 관찰되었다. 이식 1개월 후 현미경으로 관찰한 결과 이식된 간세포들은 비장의 적색 수질(red pulp)내에서 관찰 되었고 뚜렷한 코오드 구조를 형성하지 못한 채 작은 군락이나 개개로 흩어져 있었다(Fig. 1). 세포질이 적고 둥근핵을 갖는 난원형의 세포들도 혼재해 있었으며 이들 중 일부는 내강이 있는 담소관 구조를 형성하였으나 나머지는 간세포에 각각 붙어 있었다. 고배율 소견상 간세포는 다각형으로서 둥근 핵, 뚜렷한 핵소체, 풍부한 호산성의 세포질을 갖고 있었으며 세포질에서는 공포등의 변성이 관찰되어 경미한 세포손상이 있었음을 알 수 있었다(Fig. 2). 이식 7개월 후 시행한 현미경 검사에서 비장의 적색 수질은 현저히 증식한 간세포에 의하여 거의 대부분 대체되어 있었으나 백색 수질의 침범은 관찰할 수 없었다(Fig. 3). 증식한 간세포는 정상적인 선방구조를 형성하지는 못하였으나 한층 혹은 두층 두께의 간세포 코오드와 동양구조(sinusoidal structure)를 부분적으로 형성하고 있었으며(Fig. 4) 담소관은 관찰되지 않았다. 전자 현미경 소견상 담세관내

Fig. 5. Electron microscopically, the hepatocytes have numerous mitochondria, endoplasmic reticulum, glycogen and bile canaliculi(bc) (×6,000).

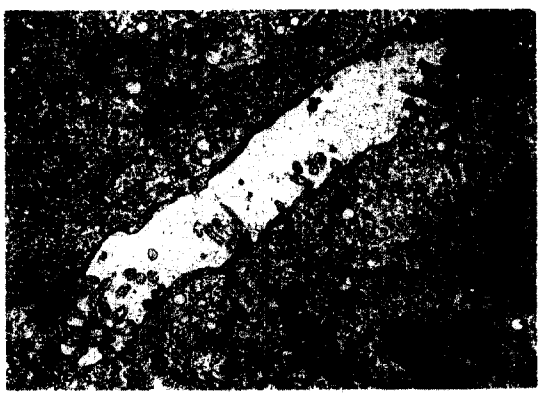

Fig. 6. Microvilli in bile canaliculi are seen (×20,000).

에서 미세융모가 관찰되었으며 간세포의 세포질내 미세구조는 정상이었다(Fig. 5, 6).

2. Northern blotting에 의한 알부민 유전자 발현

이식하고 6개월이 경과한 후 mouse albumin cDNA를 이용하여 Northern blotting한 결과 약 2.0 Kb의 18S rRNA size marker의 band와 함께 lane 1에서는 간의 알부민 mRNA의 band가 선명하게 나타났다. 대조군 비장에서는 어떠한 band도 보이지 않았으나 간세포 이식된 비장에서는 lane 1과 동일한 band가 관찰되었다(그림으로 제시하지는 않음). 이러한 band는 간세포 이식 후 12개월이 경과한 비장에서도 뚜렷하게 관찰되어 비장내 이식된 간세포

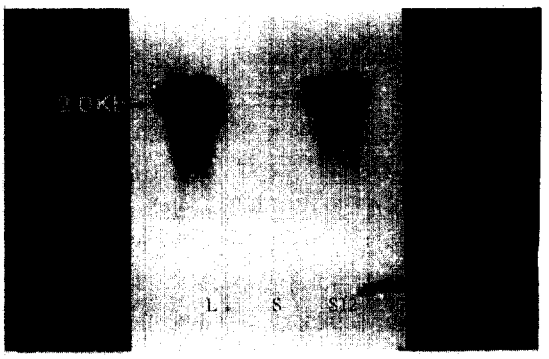

Fig. 7. Albumin mRNA levels by Northern blotting of RNA extracted from liver, spleen and hepatocyte-tranplanted spleen. Albumin mRNA extracted from spleen transplanted with hepatocytes was strongly expressed. L : liver. S : nontransplnted control spleen. S12: spleen, 12 month after hepatocyte trans plantation.

는 12개월이 경과한 후에도 알부민 유전자의 발현이 계속되고 있음을 알 수 있었다(Fig. 7).

고 안

간세포이식은 간이식에 비하여 시술이 간단하며 반복할 수 있고, 공여자의 간에서 분리한 간세포는 냉동보관하여 여러 명의 수여자에게 동시에 사용할 수 있는 장점이 있어 간부전이나 대사성 간질환의 치료방법으로 관심을 끌고 있다. 간세포이식 장소로는 복강과 함께 비장[8]이 가장 선호되고 있다. 특히 비장내 간세포이식은 생착이 잘되고 이식된 간세포가 비장뿐만 아니라 문맥혈을 통하여 간으로 이동하여 생존할 수 있다는 장점을 갖고 있다. 이식된 간세포가 간대사 기능에 기여하기 위해서는 이식 간세포의 적절한 생착, 조직화(organization) 그리고 생존및 기능의 지속적인 유지가 필수적이다. 동물 실험으로 시작된 간세포 이식연구는 이식된 간세포에 대한 지식의 축적과 함께 기술적인 진보의 덕택으로 최근 간부전 환자를 대상으로 임상 적용이 시작되었다[9, 10].

in vitro에서 간을 연구하기 위한 방법으로는 간관류(isolated liver perfusion), organ slice, homogenates, 일차 간세포 배양 등이 있다. 이 중에서 일차 간세포 배양은 실험이 수시간내에 끝나는 다른 연구 방법과 달리 실험을 약 일주일 정도 계속할 수 있

기 때문에 단기간의 유전자발현 연구가 가능하고, 조건의 변화에 대한 반응의 해석이 용이한 장점이 있다. 간세포의 간특유 유전자발현은 간의 구조나 간혈류에 의해 유지되는 것으로 알려져 있으며 간조직이 분해될 경우 간특유 유전자의 전사 기능(transcritional activity)은 멈추게 된다[11]. 따라서 일차 간세포를 배양하는 경우 간특유 유전자발현은 1주일이 되면 거의 멈추며, 2주일 이상 경과하면 간세포는 대부분 죽게된다[12]. 간세포 배양을 이용한 간특유의 유전자발현 연구는 대개 5일 이내에 끝나기 때문에 장기간의 유전자 발현 연구에는 적합하지 않으며 이를 위해서는 배양조건의 개선[13-15]이나 새로운 실험방법의 개발이 필요하다.

이식된 간세포는 적색 수질에서만 증식 및 생존을 하고 형태는 군락을 이루거나 간의 cord 모양을 하는 특징을 보였다. 백색 수질은 세포의 분포가 너무 촘촘하여 이식 간세포의 증식이 불가능한 것으로 알려져 있다[16]. 이식하고 4개월 정도 경과하면 증식된 간세포에 의해 비장의 40% 정도는 간세포로 대치되며 (splenic hepatization) 6개월이 경과하면 담소관및 junctional complex같은 구조가 관찰되고 12개월 후에는 subcellular organell의 형태가 거의 정상을 유지하게 된다[8]. 이 연구에서도 시간이 경과함에 따라 이식 간세포는 원래의 제 모습을 보였으며 담소관및 동양구조가 관찰되는 것은 이식된 간세포가 본래의 간구조의 형태를 재현하고 극성(polarity)을 복원하려는 경향을 보여주는 것으로 생각한다.

이식된 간세포가 간특유의 분화된 기능을 수행하는지 여부는 간특유의 세포질 표식자에 해당하는 albumin, glucose-6-phosphatase및 urea cycle enzyme과 cytochrome P450 system 등의 발현을 단백질이나 유전자 수준에서 측정하여 알 수 있다[16]. 이 연구에서는 알부민 발현을 Northern blotting을 통해 유전자 수준에서 관찰하였고 12개월이 경과한 후에도 이식된 간세포는 알부민 유전자발현을 계속하고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 동계백서(syngeneic rat)을 이용하면 면역거부 작용이 없기 때문에 이식된 간세포는 장기간 생존하면서 유전자 발현을 계속할 수 있어[1, 8] 비장내 간세포 이식은 전통적인 일차 간세포 배양 방법을 대신하여 장기간의 유전자 발현 연구에 이용될 수 있을 것으로 생각한다.

문정맥에는 다양한 간친화성 인자(hepatotrophic factor)가 있어 간의 증식에 관여하는 것으로 알려져 있다. 문정맥혈의 공급이 없는 경우 이식된 간은 위축(atrophy)을 보이게 되나[17] 비장에 이식된 간세포는 장기간 생존과 증식에 지장을 보이지 않았다. 비장의 미세환경이 이식된 간세포에 특별한 역활을 미칠 것으로 추측하나 확인되지 않고 있다[18]. DNA합성의 관점에서 볼 때 이식된 간세포의 증식은 숙주 간세포보다 활발한 것으로 알려져 있으며, 숙주 간의 부분 절제술을 한 경우 이식된 간세포의 증식은 더욱 활발해지는 것으로 보아 전신 순환속에도 간세포의 증식에 관련된 인자가 존재할 가능성이 있을 것으로 생각한다[2].

비장에 이식된 간세포의 효소 표현형(enzymatic phenotype)을 면역조직학적으로 보면 문맥주변(periportal)세포의 특징을 보이는[19] 반면 interscapular fat pad에 이식된 간세포의 경우는 중심정맥주변(pericentral)세포의 특징[20]을 보이고 있다. 이러한 현상은 이미 zonal microenvironment으로 설명될 수 없으며 이식된 간세포를 둘러 싼 환경이 간세포 효소의 선택적 발현에 관여할 것으로 생각한다. 이식된 간세포의 유전자발현의 정도는 이식 장소에 따라 다르게 나타나는 것으로 알려져 있으며[21], Phenobarbital을 이용한 비장내 이식 간세포의 cytochrome P450의 유전자 발현 유도(expression induction)는 정상 간세포와 거의 비슷하게 나타난다[1]. 이식된 간세포를 이용한 연구 결과 유전자발현이나 선택적 발현 그리고 세포증식은 문정맥혈이나 zonal microenvironment 없이도 가능하며 비장의 미세구조가 중요한 역할을 할 것으로 생각한다. 이러한 연구 결과는 간세포의 증식이나 유전자 발현이 문정맥혈이나 간의 구조적 특성에 의해 조절된다는 전통적인 견해에 일치하지 않기 때문에 이에 대한 연구가 앞으로 더 필요할 것으로 생각한다.

이 연구결과 동계 백서의 비장에 이식된 간세포는 이식후 12개월이 경과한 후에도 간세포 특유의 알부민 유전자 발현을 보였고, 이식된 간세포는 비장의 적색 수질을 따라 생존 및 증식을 하면서 극성을 유지하고 있었다. 동계 백서의 비장내 간세포이식은 간세포 이식 치료의 연구에 유용한 동물 모델일 뿐만 아니라 이소성 간세포의 유전자 발현 조절과 증식을 규명하는 체내 간세포 배양(hepatocyte culture in vivo)의 역

활을 할 수 있을 것으로 생각한다.

요 약

목 적 : in vitro에서 유전자 발현에 널리 이용하고 있는 일차 간세포 배양법은 단기간 유전자 발현 연구에는 유용하나 장기간 연구에는 이용할 수 없는 단점이 있다. 간세포이식을 시행하고 장기간 경과한 뒤 이식된 간세포의 미세구조 및 알부민 유전자 발현 여부를 확인하여 동계백서를 이용한 비장내 간세포이식이 이소성 간세포의 증식과 유전자 발현 연구에 유용한 방법이 될 수 있는지 알아보고자 하였다.

대상 및 방법 : 동계 백서 Fischer 344의 간세포를 in situ collagenase perfusion method로 분리하여 다른 쥐의 비장에 약 3×10^7개의 세포를 이식하였다. 약 1개월과 7개월이 경과한 후 비장에 이식된 간세포의 형태학적 특성을 관찰하였고 12개월이 경과한 비장의 RNA을 분리하여 알부민 유전자에 대한 Northern blotting을 시행하였다.

결 과 : 이식된 간세포는 비장의 적색 수질에서만 증식하는 특성을 보였고 시간의 경과에 따라 담소관과 동양구조가 관찰되었다. 약 12개월이 경과한 후에도 알부민 유전자 발현은 계속되고 있었다.

결 론 : 동계 백서를 이용하여 비장에 이식한 간세포는 시간이 경과한 후에도 증식과 유전자 발현을 계속하기 때문에 이소성 간세포의 증식과 유전자 발현을 연구하는데 유용한 방법이 될 것으로 생각한다.

= **Abstract** =

Fine Structure and Albumin Gene Expression in Intrasplenically Transplanted Hepatocytes

Sang Ok Kwon, M.D., **Dong Ki Lee**, M.D.
Jun Myeong Kim, M.D., **Eui Ryun Park**, M.D.
Kwang Yong Shim, M.D., **Phil Ho Jung**, M.D.
Mee Yon Cho, M.D.[1] and **Mann Uk Hur**, Ph, M.D.[2]

Department of Internal Medicine, and Department of Pathology[1], Wonju College of Medicine and Departmenrt of Biochemistry[2], College of Medicine, Yonsei University, Wonju Korea

Background : The morphological characteristics of hepatocytes transplanted into the spleen have been studied. However few attempts has been made to determine the expression of genes in intrasplenically transplanted hepatocytes. The aim of this study was to explore whether the pattern of expression of albumin gene in intrasplenically tranplanted hepatocytes is similar to that in adult liver, resulting in the long term expression of this hepatocyte-specific gene.

Methods : Hepatocytes isolated from liver of syngeneic Fischer 344 rats and transplanted into the spleen of rats from the same strain survived for 12 months in the absence of immunosuppressive drugs. Microscopic examination of intrasplenic hepatocytes and Northern blotting for albumin gene expression of RNA extracted from liver and spleen was performed.

Results : Microscopy demonstrated that hepatocytes attached themselves only in the red pulp of the spleen and isolated hepatocytes preserved the fine structures chacteristic of normal hepatic parenchymal cells. Throughout the 12 months period, intrasplenically transplanted hepatocytes expressed albumin mRNA.

Conclusions : Intrasplenically transplanted hepatocytes represent a unique in vivo system of extrahepatic maintenance of hepatocytes. This novel transplantation system could be used to investigate hepatocyte engraft, proliferation and gene expression.

Key Words : Fine structure, Gene expression, Transplanted hepatocyte

REFERENCES

1) Maganto P, Traber PG, Rusnell C, Gummucio JJ : *Long-term maintenance of the adult pattern of liver-specific expression for P-450b, P-450e, albumin and α-fetoprotein genes in intrasplenically transplanted hepatocytes. Hepatolgy 11:585-593, 1989*
2) Gupta S, Johnstone R, Darby H : Transplanted hepatocyte : *effect of partial hepatectomy on proliferation of long-term syngeneic implants in rat spleen. Pathology 19:28-30, 1987*
3) 정파종, 이광수, 곽진영 : 실험적 간세포 이식. 대한 이식학회지 *7:39-45, 1993*
4) 김병호, 은연기, 김효종, 장영운, 이정일, 장 린 : *galactosamine*으로 급성 간부전이 유도된 흰쥐에서 간세포이식의 효과. 대한내과학회지 *40:477-483, 1991*
5) Seglen PO : *Preparation of isolated rat liver parenchymal cells. Methods Cell Biol 1:29-83, 1976*
6) Chomczynski F, Sachi N : *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-*

phenol-chloroform extraction Anal Biochem 162: 156-159, 1987

7) Thomas PS : *Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transfered to nitrocellulose Proc Natl Acad Sci 77:5201-5208, 1980*

8) Kusano M, Mito M : *Observations on the fine structure of long survived isolated hepatocytes innoculated into rat spleen. Gastroenterology 82: 616-628, 1982*

9) Mito M, Kusano M, Kawaura Y : *Hepatocyte transplantation in man. Transplant Proc 24:3052-3053, 1992*

10) Ostrowka HA, Kam I, Truillo N, Trouilot R, Shrestha R, Everson GT : *Critical analysis of intra-splenic transplantation of cryopreserved human hepatocytes in a patient with acute liver failure. Hepatology 22:203A, 1995*

11) Clayton DF, Harrelson AL, Darnell JE : *Dependence of liver-specific transcrition on tissue organization. Mol Cell Biol 5:2623-2632, 1985*

12) Jefferson DM, Clayton DF, Darnel JE, Reid LM : *Post-transcriptional modulation of gene expression in cultured rat hepatocytes. Mol Cell Biol 4:1929-1934, 1984*

13) Begue JM, Guguen-Guillouzo C, Paspadeloup N : *Prolonged maintenance of active cytochrome P-450 in adult hepatocytes co-cultured with another liver cell type. Hepatology 4:839-842, 1984*

14) Bissel DM, Arenson DM, Mahler FJ : *Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. J Clin Invest 79:801-12, 1987*

15) Dunn JC, Yarmush ML, Koebe HG : *Hepatocyte function and extracellular matrix geometry : long-term culture in a sandwich configuration. FASEB J 3:174-177, 1989*

16) Gupta S, Wilson JM, Chodhury JR : Hepatocyte transplantation : *development of new systems for liver repopulation and gene therapy. Semin Liver Dis 12:321-331, 1992*

17) Halgrimson CG, Marchioro RL, Faris TD : Auxillary liver transplantation : *effect of host portacaval shunt. Arch Surg 93:107-118, 1966*

18) Darby H, Gupta S, Johnstone R : *Observation on rat spleen reticulum during the development of syngeneic hepatocellular implants. Br J Exp Pathol 67:329-339, 1986*

19) Lamers WH, Been W, Charles R, Mooman AFN : *Hepatocytes explanted in the spleen preferentially express carbamoylphosphate synthetase rather than glutamine synthetase. Hepatology 17: 701-709, 1990*

20) Gebhardt R, jirtle R, Moorman AFM, Lamers WH, Michalopoulos C : *Induction of glutamine synthetase and transient expression with carbamoylphosphate synthetase in hepatocyte transplanted into fat pads of syngeneic hosts. Histochemistry 92:337-342, 1989*

21) Verumu RP, Davidson A, Yerneni P, Chowdhury JR, Burk RD, Gupta S : *Survival and function of hepatocytes in ectopic sites : intrasplenic delivery confers advantages. Hepatology 14:49A, 1991*