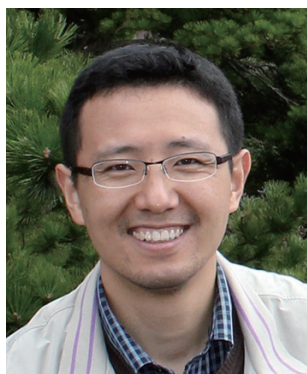


DOI: 10.13376/j.cbls/2016123

文章编号: 1004-0374(2016)08-0915-06



惠利健, 中国科学院上海生命科学研究院研究员, 中科院百人计划、国家杰出青年基金获得者。曾获中国青年科技奖、谈家桢生命科学创新奖等。目前为 *Journal of Biological Chemistry* 等杂志编委。研究工作以肝脏细胞为对象, 着力于细胞属性维持与转分化、癌化等研究, 以图揭示细胞属性维持和转换的调控机制。对细胞转分化和癌化研究的一系列工作, 已发表在 *Nature* 等国际著名学术期刊。关于肝细胞转分化的研究获科技部“中国科学十大进展”(2011)及美国 Cell 出版社“中国年度论文”(2014)。

## 生物人工肝研究进展

高义萌, 孙露露, 惠利健\*

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

**摘要:** 将通过干细胞技术产生的功能肝细胞应用于人类肝脏疾病的治疗一直是近几年科学家们努力的方向。目前, 除了肝移植以外, 尚没有其他有效手段治疗肝衰竭等疾病。惠利健实验室在中科院“干细胞与再生医学研究”战略性科技先导专项的攻关项目“生物人工肝的研发”支持下, 以研制新的生物人工肝种子细胞, 搭建全新的生物人工肝反应器和支撑系统为突破点, 期望为肝衰竭患者提供短暂的肝功能支持, 从而拯救肝衰竭患者的生命并为肝移植患者争取宝贵的时间。特对项目启动 5 年以来惠利健实验室所取得的主要研究成果进行综述。

**关键词:** 肝衰竭; 生物人工肝; 功能肝细胞

**中图分类号:** Q813    **文献标志码:** A

## Advances in research of bioartificial liver

GAO Yi-Meng, SUN Lu-Lu, HUI Li-Jian\*

(Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**Abstract:** It is still an unmet goal to use functional hepatocytes generated by stem cell technology for treatment of human liver diseases. Liver transplantation is so far the only efficient treatment for end-stage liver failures, which is however limited by the shortage of donor organs. “The research and development of the bioartificial liver supporting system” is one of the key programs of the Strategic Priority Research Project Stem Cell and Regenerative Medicine launched by Chinese Academy of Sciences. By development of new functional hepatocytes (hiHep cells)

收稿日期: 2016-05-18

基金项目: 中国科学院“干细胞与再生医学研究”战略性先导科技专项(XDA01030601), 国家自然科学基金项目(31225016, 91319307和81471948), 科技部(2013CB967103 和 2012CB945001), 上海市科委(14XD1404200和15JC1400200), 上海市大张江项目(ZJ2014-ZD-002)

\*通信作者: E-mail: huilab@sibcb.ac.cn

and adapting them into available bioreactors, we generate a new model of bioartificial liver supporting system (hiHep-BAL) with the aim to providing hepatic function support for patients with acute liver failures or acute-on-chronic liver failure. Recently, the pre-clinical studies of hiHep-BAL on large animals demonstrated its therapeutic effect on liver failure pigs. Here, we reviewed our research progress and achievements in this five-year project.

**Key words:** liver failure; bioartificial liver supporting system; functional hepatocytes

在我国, 由于乙肝病毒 (HBV) 感染以及食物霉变等因素导致的肝衰竭疾病具有较高的病死率。肝衰竭患者会呈现出严重的肝脏损害, 导致其合成、解毒、排泄和生物转化等功能发生严重障碍或失常, 出现凝血障碍、黄疸、肝性脑病和腹水等症状。肝衰竭中又以急性肝衰竭和慢加急性肝衰竭最为危险。急性肝衰竭指患者急性起病, 无基础肝病史, 2 周以内出现以 II 度以上肝性脑病为特征的肝衰竭临床表现。慢加急性肝衰竭是指在慢性肝病基础上, 出现急性肝功能失代偿的临床表现<sup>[1]</sup>。

除了肝脏移植外, 肝衰竭目前尚无其他有效的治愈方法。近些年, 国内外在积极研发人工肝支持系统 (artificial liver support system, ALSS), 作为肝移植过渡支持手段, 以及用于缓解病情, 并促进肝脏自然恢复。人工肝的治疗基本原理是将患者的血浆和血细胞分离, 血浆部分进入人工肝装置, 血浆中的有毒成分会在人工肝内分解吸收, 同时人工肝也会提供一些人体所需营养成分。经过人工肝净化的血浆会再流回患者体内。这样, 人工肝在短期内提供部分肝脏功能, 让肝衰竭患者缓解病情, 为肝脏再生和功能恢复创造条件, 同时也可以为病情严重者提供等待肝移植的机会。

人工肝支持系统包括非生物型人工肝和生物型人工肝。非生物型人工肝主要是依靠过滤或者吸附等化学物理方法来去除代谢毒物, 并不能完全代替肝脏的生物作用。生物人工肝 (bioartificial liver system, BAL) 则含有人工分离培养的肝细胞, 不仅具有解毒功能, 还具备合成和代谢功能, 是未来发展的方向。为了研制新型生物人工肝应用于肝衰竭等肝脏疾病的治疗, 2011 年中国科学院设立了“生物人工肝的研发”作为“干细胞与再生医学研究”战略性科技先导专项的攻关项目之一, 给予了大力支持。

## 1 新的功能肝细胞

在生物人工肝支持系统中, 有功能的肝细胞被装填在生物反应器内, 模拟了人体正常肝脏, 代替受损肝脏的功能。因此, 决定生物人工肝成功应用

的关键因素是: 功能肝细胞和生物反应器。功能肝细胞来源是最为基础的因素, 细胞质量的好坏、获得的难易以及使用的安全性决定了使用该种细胞的生物人工肝未来应用前景。

### 1.1 生物人工肝的瓶颈

在此之前, 各种生物人工肝系统中使用的肝细胞主要有类原代肝细胞、猪肝细胞和人肝癌细胞系<sup>[2]</sup>。类原代肝细胞功能最好, 但是受到肝脏器官供应的限制, 来源有限, 目前基本不再考虑。猪肝细胞功能较为全面而且容易获取, 但是由于异种动物免疫排斥和病毒携带问题, 很难获得监管部门批准。肝癌细胞由于肝细胞功能下降和潜在的致癌性风险, 也限制了其应用的前景。因此, 缺乏优质的种子细胞导致生物人工肝的临床应用一直难以推广。如何获得大量优质安全的功能肝细胞成为了亟待科学家们解决的问题。

### 1.2 细胞谱系转变

2006 年, 日本科学家 Yamanaka 等发现, 可以将终末分化的皮肤成纤维细胞去分化为多能干细胞<sup>[3]</sup>。证明了终末分化细胞的去分化潜能, 也指出了细胞的属性的可塑性。受到这个研究的启发, 我们在 2008 年开始研究是否可以以皮肤成纤维细胞这种易于获得的材料作为来源, 生产出新的肝细胞呢?

采用干细胞技术手段产生功能肝细胞, 是科学家努力实现的技术。目前再生医学研究中备受关注的人多能干细胞 (pluripotent stem cells), 具有巨大的潜力分化为肝细胞, 作为移植的替代肝细胞来源。科学家们已经可以将多分化潜能的胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC) 或 iPS 细胞定向分化为肝实质细胞<sup>[4-6]</sup>, 甚至可以利用分化的肝实质细胞模拟体内的三维结构或者和其他类型的细胞共培养形成类肝芽, 使获得的肝细胞功能更加成熟<sup>[7-8]</sup>。但此种方法获得细胞步骤复杂, 成本昂贵, 而且细胞的扩增难度非常大。

绕过 iPS 阶段, 直接将成纤维细胞分化为肝细胞样细胞, 既可以加快产生肝细胞的速度, 同时可以增加此操作方法的可靠性。通过对多个肝细胞转录因子的筛选, 我们发现, *Foxa3*、*Hnf1a*、*Gata4*

三个转录因子可以成功将 *p19* 失活的小鼠鼠尾成纤维细胞转分化为肝细胞样细胞 (iHep)<sup>[9]</sup>。iHep 细胞具有与小鼠原代肝实质细胞类似的基因表达谱, 并获得了许多肝实质细胞的体外功能, 如分泌血清白蛋白、积累肝糖原、转运 ac-LDL、药物代谢等。我们将 iHep 细胞移植到因 *Fah* 基因缺失引起的肝衰竭小鼠肝脏中, 接受 iHep 细胞移植后, 有 40% 的肝衰竭小鼠被救活。免疫组化分析也确认 iHep 细胞成功整合到了小鼠肝脏中。被救活的 *Fah*<sup>-/-</sup> 小鼠肝功能指标, 如总胆红素、ALT、AST 水平均显著恢复, 说明 iHep 细胞不仅能整合到小鼠肝脏中, 还在体内发挥了肝实质细胞的功能。此外, 移植 iHep 细胞的 *Fah*<sup>-/-</sup> 小鼠和 NOD/SCID 小鼠均没有肿瘤形成, 进一步说明了 iHep 细胞的安全性。

### 1.3 hiHep细胞的获得

既然小鼠的成纤维细胞可以被转分化为肝实质细胞, 那么人类的体细胞能否实现类似的转化, 从而为生物人工肝系统提供合适的功能肝细胞呢? 我们的研究表明, 诱导小鼠 iHep 细胞的方法并不能简单移植到人的细胞上。2014 年, 我们发现需要 *FOXA3*、*HNF1A*、*HNF4A* 三个转录因子才能将人胚胎成纤维细胞诱导转分化为肝实质细胞 (命名为 hiHep 细胞)<sup>[10]</sup>。hiHep 细胞具有与人类原代肝细胞相似的基因表达谱, 也获得了肝脏的体外功能, 如分泌蛋白和  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶 (AAT), 积累肝糖原、转运乙酰化低密度脂蛋白 (ac-LDL)、药物代谢等。尤为重要的是, hiHep 具有良好的胆汁排泄能力, 可应用于药物开发过程中药物胆汁排泄能力的评估。

由于上述转分化方法获得的 hiHep 细胞像人的原代肝实质细胞一样无法体外增殖, 因此无法获得足够的细胞用于体内功能验证。为解决该问题, 我们通过在 hiHep 细胞中表达 SV40 Large T, 获得了具有增殖能力的 hiHep 细胞。hiHep 细胞在扩增之后依然维持了肝脏基因的表达和肝脏的体外功能。将 hiHep 细胞移植到免疫缺陷的 *Fah*<sup>-/-</sup>*Rag2*<sup>-/-</sup> 肝衰竭模型小鼠体内后, hiHep 细胞成功整合到小鼠肝脏中, 且有 37.5% 的小鼠最终存活。在存活的小鼠体内检测到了人血清白蛋白的分泌, 且其肝功能指标 AST、ALT 均恢复正常水平, 说明 hiHep 细胞具有体内整合能力, 有可能应用于肝脏疾病的治疗。

这项技术首次实现了将人成纤维细胞转分化为肝实质细胞, 并利用 SV40 Large T 实现了 hiHep 细胞的大规模扩增。hiHep 细胞技术为细胞移植、生

物人工肝脏组织、生物人工肝装置等新兴治疗方法提供了潜在的细胞来源。

## 2 生物反应器的构建

生物反应器是生物人工肝应用的核心部分。在临床治疗中, 功能肝细胞在生物反应器中行使肝功能, 替代受损肝脏的作用。常见的反应器有中空纤维膜式反应器和灌注床/支架反应器<sup>[11]</sup>。中空纤维膜式反应器通过半透膜将肝细胞和患者血浆分别隔离于外管和内管, 血浆从内管流过的时候便可和肝细胞进行物质交换。在灌注床/支架生物反应器中, 细胞能够均匀地分布, 具有良好的功能活性。一些采用这两种反应器的生物人工肝已经进入临床试验阶段。与此同时, 我国科学家也开发了一系列的生物人工肝反应器。

南京鼓楼医院丁义涛团队研发了多层平板生物反应器<sup>[12]</sup>。此种生物反应器将多层平板放置于一个筒体内, 经过管路导入的液体可以均匀地分散到每层平板的各个角落, 与肝细胞充分交换后再回输回患者体内。该生物反应器可以与猪原代肝细胞配合, 救治罹患急性肝衰竭的狗, 使肝衰竭动物的各项指征在七天内都恢复到正常水平<sup>[13]</sup>。通过安全性验证, 确认并没有猪逆转录病毒 (PERV) 进入到接受人工肝治疗的动物体内<sup>[14]</sup>。在此基础上, 鼓楼医院利用基于猪肝细胞作为种子细胞的生物人工肝对急性肝衰竭的患者进行治疗, 取得了较好的效果, 一共治疗 128 例患者, 好转率达到 83.6%。尽管临床治疗效果良好, 但是猪肝细胞存在的潜在风险一直为研究者所忧虑。hiHep 细胞的出现为其种子细胞提供了新的选择。

## 3 生物人工肝救治肝衰竭大动物

### 3.1 大规模扩增

为了将 hiHep 细胞与新型的生物反应器结合应用到临床治疗中, 首先要在大型哺乳动物上进行尝试。而大型哺乳动物的治疗, 首先要解决的就是种子细胞的大规模扩增问题, 其次是扩增后的细胞能否继续维持其原有的功能。为了解决这些问题, 我们与华东理工大学周燕老师组合作, 通过尝试转瓶培养和多层培养皿等不同手段, 最终确定了通过 Hyperflask 扩增 hiHep 细胞的方式。在 1 个月的时间内, 我们可以将 hiHep 细胞扩增到  $3 \times 10^9$  用于急性肝衰竭小型猪的治疗。扩增前后的 hiHep 细胞都能够保持良好的肝细胞形态与基因表达, 并且



hiHep 细胞的药物解毒与氨代谢等功能都得到了较好的维持, 证明在不同的扩增批次之间 hiHep 细胞数量和功能可以保持稳定, 可以用于急性肝衰竭大型哺乳动物的生物人工肝治疗实验。

### 3.2 肝衰竭小型猪救治

为了在大型哺乳动物上验证 hiHep 生物人工肝的有效性, 我们与南京鼓楼医院合作进行了 hiHep 生物人工肝对肝衰竭小型猪的救治实验。我们首先摸索建立了小型猪肝衰竭模型。在之前的研究中, 科学家探索了不同的肝衰竭诱导方式, 如四氯化碳诱导、D-半乳糖胺诱导和对乙酰氨基酚诱导模型<sup>[15]</sup>。经过不同药物剂量的尝试与摸索, 我们最终确立了以 D-半乳糖胺诱导小型猪急性肝衰竭的模型, 使小型猪在药物诱导肝衰竭后 3 d 左右死亡。

在药物诱导后 24 h, 小型猪已经出现明显的肝衰竭症状, 食欲不振, 精神萎靡, 转氨酶升高, 血氨浓度升高, 总胆红素提升, 凝血时间延长。因此, 将我们生产的 hiHep 细胞填充入生物人工肝反应器中, 南京鼓楼医院的研究人员利用 hiHep 生物人工肝对肝衰竭小型猪进行治疗 3 h。实验组接受治疗的 8 头小型猪有 7 头存活到 7 d 以上, 存活率高达 87.5%, 而对照组的小型猪几乎全部死亡。血液指标检测和深入的肝脏病理分析显示, 在第 7 天, 接

受治疗的小型猪的各项肝功能指标都恢复正常水平, 而且肝脏中的炎症反应相比于对照组明显降低, 并且在第 7 天仍然能够检测到持续增殖的肝细胞, 其肝脏已经回复正常生理状态。更为重要的是, 我们在接受治疗后的小型猪的血浆中检测到了人类白蛋白和抗胰蛋白, 说明 hiHep 生物人工肝的交换系统是有效的, 能够有效透过营养物质进行交换。通过 hiHep 生物人工肝成功救治肝衰竭小型猪是我国以及国际上, 第一次通过系统优化功能肝细胞和生物反应器而实现的科学突破<sup>[16]</sup>。其大型哺乳动物救治实验的成功极大地提升了我们的信心, 也为其临床实验的推进打下了坚实的基础。

## 4 临床应用前景

纵观整个项目的进程, 我们在 2011 年转分化产生小鼠肝细胞, 被评为 2011 年中国科学十大进展; 2014 年转分化产生人类功能肝细胞 (hiHep), 被评为 Cell 出版社“2014 中国年度论文”; 2015 年完成 hiHep 生物人工肝救治急性肝衰竭小型猪实验; 并在 2016 年开展 hiHep 生物人工肝临床治疗, 取得良好效果, 受到广泛关注和良好评价 (图 1)。这一系列的成果极大地提升了我们将 hiHep 应用到临床的信心。

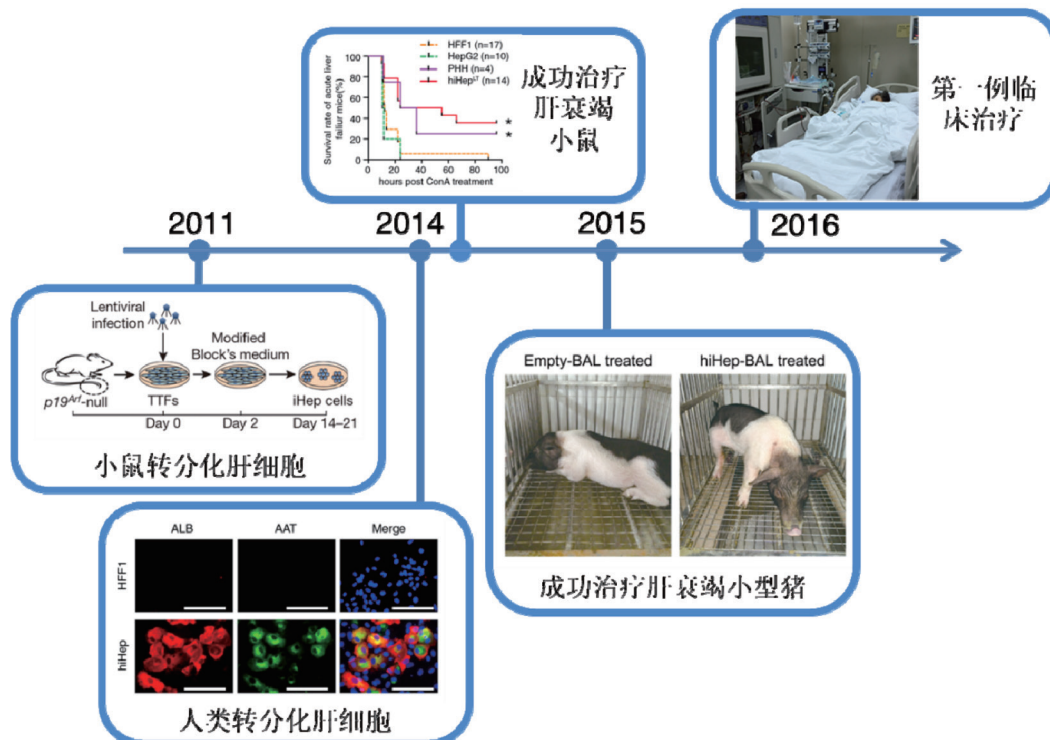


图1 项目进展历程和亮点总结

hiHep 生物人工肝大动物实验的成功证明了它的有效性和安全性, 也极大地提升了我们将其继续应用到临床的信心。而如何将 hiHep 生物人工肝应用到临床也有一些挑战和困难需要克服: 一个是更加大规模的细胞扩增, 需要达到  $1 \times 10^{10}$ ; 其次是要与临床医生进行良好的沟通, 从而合理地选取患者, 制定详细的观察指标, 通过严谨的统计分析得出可靠的结论, 进一步促进 hiHep 生物人工肝的持续改进。最终, 在 2016 年 1 月, 我们与南京鼓楼医院合作成功进行了第一例急性肝衰竭患者的救治实验, 成功救治一位罹患乙肝 40 年并突发急性肝衰竭的患者。患者在接受 hiHep 生物人工肝治疗后各项肝功能指标均明显好转, 且无任何不良反应。这一病例标志着新型 hiHep 生物人工肝第一例临床治疗成功完成。

在国内外, 已经有多款生物人工肝系统进入了临床试验阶段, 但是都由于自身的问题, 未能在临床展开良好的应用。如美国 HepaAssist 生物人工肝系统在三期临床中体现出较好的结果, 但是一直未获得 FDA 的批准<sup>[17]</sup>。对于临床应用而言, 猪来源的肝细胞在安全性上一直受到大家的质疑。荷兰的科学家发明的 AMC-BAL 系统采用 HepRG 细胞作为肝细胞来源的生物人工肝系统成功救治急性肝衰竭的大鼠模型<sup>[18-19]</sup>, HepRG 是具有双向分化潜能的肝祖细胞系, 尽管有些研究说明其分化的肝细胞功能较强, 但该细胞自身增殖缓慢, 而且存在分化后的细胞仍然有异质性的问题, 临床试验推进十分缓慢。美国公司 Vital Therapies 的产品 ELAD 生物人工肝采用中空纤维式反应器和 C3A 肿瘤细胞系结合, 在大动物实验和早期临床中取得了较好的效果, 已经进入三期临床试验<sup>[20-21]</sup>。但是由于三期临床治疗效果不佳, Vital Therapies 于 2015 年 8 月宣布 ELAD 三期临床试验失败。

近几年, 国内的生物人工肝研制也取得了一些进展。浙大医学院李兰娟院士团队采用在流化床生物反应器中培养猪肝细胞的生物人工肝系统, 提升肝衰竭猪的存活时间<sup>[22]</sup>。此外, 不少研究团队也仍旧使用永生化肝细胞来设计生物人工肝系统。比如南方医科大学高毅团队采用在微载体上培养 L-02 永生化肝细胞系的混合型生物人工肝救治急性肝衰竭猴子<sup>[23]</sup>。武汉全干生物公司采用 L-02 永生化肝细胞系作为种子细胞, 在中空纤维生物反应器中治疗肝衰竭猪。北京中日友好医院的娄晋宁教授采用

永生化人肝细胞 IHH 细胞系组建的生物人工肝系统完成 2 例临床病例治疗。

由此可见, 生物人工肝系统在临床的应用是全世界科学家都在努力推进和实现的事业。鉴于 hiHep 生物人工肝在肝衰竭大型哺乳动物和第一次临床治疗中体现出的良好效果, 顺利推进 hiHep 生物人工肝的临床应用将极大地促进我国科研成果转化的进程。同时, 符合中科院战略性科技先导专项的要求, 用科研成果造福广大人民群众, 以科学研究提升人民健康水平, 做出人民用得上的国际前沿科研成果。

**致谢:** 本项目的顺利完成, 要感谢各个合作团队的支持与配合, 包括南京大学附属鼓楼医院丁义涛团队、中科院药物所潘国宇团队、华东理工大学周燕团队、中科院大连物化所马小军团队和中科院力学所龙勉团队。

#### [参 考 文 献]

- [1] 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组, 中华医学会感染病学分会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊治指南(2012年版). 中华临床感染病杂志, 2012, 5: 321-37
- [2] Struecker B, Raschzok N, Sauer IM. Liver support strategies: cutting-edge technologies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014, 11: 166-76
- [3] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126: 663-76
- [4] Sullivan GJ, Hay DC, Park IH, et al. Generation of functional human hepatic endoderm from human induced pluripotent stem cells. *Hepatology*, 2010, 51: 329-35
- [5] Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, et al. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology*, 2010, 51: 297-305
- [6] Hay DC, Fletcher J, Payne C, et al. Highly efficient differentiation of hESCs to functional hepatic endoderm requires ActivinA and Wnt3a signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 12301-6
- [7] Ogawa S, Surapisitchat J, Virtanen C, et al. Three-dimensional culture and cAMP signaling promote the maturation of human pluripotent stem cell-derived hepatocytes. *Development*, 2013, 140: 3285-96
- [8] Takebe T, Sekine K, Enomura M, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*, 2013, 499: 481-4
- [9] Huang P, He Z, Ji S, et al. Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature*, 2011, 475: 386-9
- [10] Huang P, Zhang L, Gao Y, et al. Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable

- hepatocytes. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 370-84
- [11] Bhatia SN, Underhill GH, Zaret KS, et al. Cell and tissue engineering for liver disease. *Sci Transl Med*, 2014, 6: 245sr2
- [12] Chu XH, Shi XL, Feng ZQ, et al. *In vitro* evaluation of a multi-layer radial-flow bioreactor based on galactosylated chitosan nanofiber scaffolds. *Biomaterials*, 2009, 30: 4533-8
- [13] Shi XL, Zhang Y, Chu XH, et al. Evaluation of a novel hybrid bioartificial liver based on a multi-layer flat-plate bioreactor. *World J Gastroenterol*, 2012, 18: 3752-60
- [14] Han B, Shi XL, Zhang Y, et al. Microbiological safety of a novel bio-artificial liver support system based on porcine hepatocytes: a experimental study. *Eur J Med Res*, 2012, 17: 13
- [15] Mao SA, Glorioso JM, Nyberg SL. Liver regeneration. *Transl Res*, 2014, 163: 352-62
- [16] Shi XL, Gao Y, Yan Y, et al. Improved survival of porcine acute liver failure by a bioartificial liver device implanted with induced human functional hepatocytes. *Cell Res*, 2016, 26: 206-16
- [17] Demetriou AA, Brown RS, Busuttil RW, et al. Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. *Ann Surg*, 2004, 239: 660-70
- [18] Nibourg GA, Hoekstra R, van der Hoeven TV, et al. Increased hepatic functionality of the human hepatoma cell line HepaRG cultured in the AMC bioreactor. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45: 1860-8
- [19] Nibourg GA, Chamuleau RA, van der Hoeven TV, et al. Liver progenitor cell line HepaRG differentiated in a bioartificial liver effectively supplies liver support to rats with acute liver failure. *PLoS One*, 2012, 7: e38778
- [20] Sussman NL, Chong MG, Koussayer T, et al. Reversal of fulminant hepatic-failure using an extracorporeal liver assist device. *Hepatology*, 1992, 16: 60-5
- [21] Sussman NL, Kelly JH. Artificial liver. *Clin Gastr-oenterol Hepatol*, 2014, 12: 1439-42
- [22] Lv G, Zhao L, Zhang A, et al. Bioartificial liver system based on choanoid fluidized bed bioreactor improve the survival time of fulminant hepatic failure pigs. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108: 2229-36
- [23] Zhang Z, Zhao YC, Cheng Y, et al. Hybrid bioartificial liver support in cynomolgus monkeys with D-galactosamine-induced acute liver failure. *World J Gastroenterol*, 2014, 20: 17399-406