文章编号:1000-5404(2005)08-0707-03

论著

28 ℃条件下短期培养新生广西巴马小型猪肝细胞的初步观察

张世昌,王英杰,陈 志,刘 俊,程永波,刘 涛 (第三军医大学西南医院全军感染病研究所,重庆 400038)

提 要: 目的 对28 ℃条件下短期培养猪肝细胞的可行性进行初步评价。**方法** 将刚分离的新生广西巴马小型猪肝细胞采用28 ℃条件下的短期培养1~3 d后,恢复37 ℃继续培养,观察升温前后肝细胞的形态及LDH、AST的释放量,检测28 ℃短期培养后肝细胞的氨清除率和尿素合成量。**结果** 在28 ℃短期培养的肝细胞,用倒置相差显微镜观察到典型的形态特征,细胞未见明显增殖,恢复37 ℃继续培养后,肝细胞迅速增殖并维持典型的肝细胞形态;经28 ℃短期培养后的肝细胞和未经28 ℃短期培养的肝细胞均保持较强的尿素合成和氨清除能力,但在28 ℃培养2 d和3 d后的肝细胞尿素合成量较在28 ℃培养1 d后的肝细胞尿素合成量显著降低($P<0.01$);培养期内LDH、AST漏出量较少。**结论** 28 ℃短期培养能较好地维持猪肝细胞的形态学特征和功能,有望成为一种有效的保存和运输生物人工肝细胞材料的方法。

关键词: 猪肝细胞;低温;培养
中图法分类号: R322.47; R329.24 **文献标识码**: A

A preliminary study of short-term incubation of Guangxi BAMA suckling mini-pig hepatocytes at 28 ℃

ZHANG Shi-chang, WANG Ying-jie, CHEN Zhi, LIU Jun, CHENG Yong-bo, LIU Tao (Institute of Infectious Diseases, Southwest Hopital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the feasibility of short-term incubation of Guangxi BAMA suckling mini-pig hepatocytes at 28 ℃. **Methods** Freshly isolated porcine hepatocytes were incubated at 37 ℃ for 24 h, then divided into 4 groups: control (continued to culture at 37 ℃), group A, B, C (cultured at 28 ℃ for 24, 48, 72 h respectively), finally returned to culture at 37 ℃ for 24 h. Cellular morphological characteristics, the content of lactate dehydrogenase (LDH) and aspartate aminotransferase (AST), and ammonia clearance rate and urea synthesis were examined after all hepatocytes recultured at 37 ℃ for 24 h. **Results** The typical cellular charactisterics of cultured hepatocytes could be observed in control group and groups A, B, C. The proliferation of hepatocytes was inhibited in groups A, B, C, but proliferative ability was restored quickly as the temperature changed to 37 ℃. Ammonia clearance and urea synthesis of groups A, B, C were close to those of control group. While the activity of urea synthesis gradually decreased as the hypothermic incubation at 28 ℃ prolonged. A slight release of LDH and AST into the culture medium was found during the culture of hepatocytes. **Conclusion** The liver-specific functions and morphological characteristics of hepatocytes can be kept unchanged by short-term incubation at 28 ℃, which would be an effective method for preservation and delivery of hepatocytes for a bioartificial liver system.

Key words: porcine hepatocytes; hypothermia; culture

肝细胞是生物人工肝的核心原材料,生物人工肝对肝功能衰竭患者的治疗作用完全依赖于所用肝细胞的生物学功能。目前生物人工肝研究的主要细胞材料是人肝细胞、肝细胞株和猪肝细胞,由于人肝细胞来源匮乏以及肿瘤细胞株潜在的不安全性,猪肝细胞已经逐步成为生物人工肝研究和临床应用的主要对象,随着其研究的不断深入,迫切需要有效的保存和运输方法以促进生物人工肝在临床上的广泛应用[1,2]。本实验对刚分离的新生巴马小型猪肝细胞进行了28 ℃条件下的短期培养后,恢复37 ℃继续培养,通过观察肝细胞形态、氨清除率、尿素合成能力以及乳酸脱氢酶(LDH)、草酸乙酸氨基转移酶(AST)的释放等变化,以探讨非常规37 ℃下短期培养肝细胞的可行性,为生物人工肝细胞材料肝细胞的保存和运输提供实验依据。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470458);全国优秀博士学位论文作者专项资金资助项目(199947)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470458) and Academic Foundation for Authors of National Excellent Doctoral Dissertation of China (199947)
作者简介:张世昌(1975-),男,湖北省随州市人,硕士研究生,医师,主要从事生物人工肝及相关基础课题方面的研究。电话:(023)68754475
通讯作者:王英杰,电话:(023)68754475-8062
收稿日期:2004-09-24;**修回日期**:2004-11-21

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂和材料

用于分离肝细胞的实验动物为广西巴马小型猪，共4只，由本校实验动物中心提供，均为新生1～7 d的乳猪，伊朗无病原体感染，雌雄不限。实验前4 h断乳，清洁皮毛后备用。Ⅳ型胶原酶、台盼蓝等由Sigma公司提供；培养瓶、培养板及离心管等为Nuculon公司产品；小牛血清(NCS)、RPMI1640培养液等购于Hyclone公司。

1.2 肝细胞的分离

腹腔注射戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉新生广西巴马小型猪。常规方法消毒皮肤，开腹，暴露门静脉并注入肝素钠100～150 U。游离肝脏，于肝门处剪下取出，先用前灌流液(含EDTA、无Ca^{2+}、Mg^{2+}的Hanks液)以80～100 ml/min的速度灌流10～15 min，再用浓度为0.05%的胶原酶液以50～70 ml/min的速度灌流10 min。两种灌流液均保持在37～38 ℃。灌流结束后，用剪刀划破肝包膜，剔除大块纤维结缔组织，收集细胞悬液，酌情再置37 ℃条件下消化10～15 min。用RPMI1640培养液终止消化，3层纱布过滤，然后50×g、离心3 min洗涤肝细胞3～4次，获得肝细胞。台盼蓝拒染实验判断细胞活率＞90%者用于培养。

1.3 肝细胞28 ℃条件下的短期培养

将刚分离的肝细胞按1×10^6/ml浓度接种于6孔培养板，用RPMI1640培养液加10%小牛血清培养。所有肝细胞先置37 ℃孵箱预培养1 d后，然后分4组：对照组(control)始终在37 ℃培养的肝细胞为对照组，另外3组(A，B，C)转入28 ℃孵箱分别培养1、2、3 d，然后恢复到37 ℃孵箱继续培养。每24小时换液1次，共5 d后结束培养。

1.4 形态观察

每天换液前后在倒置相差显微镜(Olympus Ⅸ-70)下观察28 ℃及37 ℃培养猪肝细胞的形态变化。

1.5 肝细胞功能检测

1.5.1 氯化铵清除　恢复37 ℃培养时，取3孔肝细胞用含1 mmol/L氯化铵的无血清RPMI1640培养液培养，24 h后收集标本，用谷氨酸脱氢酶-紫外法(英国Randox公司)检测上清中氨的浓度。

1.5.2 尿素合成　各组用RPMI1640培养液加10%小牛血清培养肝细胞，恢复37 ℃培养24 h后收集标本，用脲酶-波氏比色法(英国Randox公司)检测上清中尿素的浓度。同时检测RPMI1640培养液加10%小牛血清培养中尿素浓度为本底，计算每天肝细胞培养液中尿素的增加量作为肝细胞的尿素合成量。

1.5.3 肝酶释放　在日立-7020型全自动生化分析仪上检测各组肝细胞培养上清液中AST和LDH的水平。

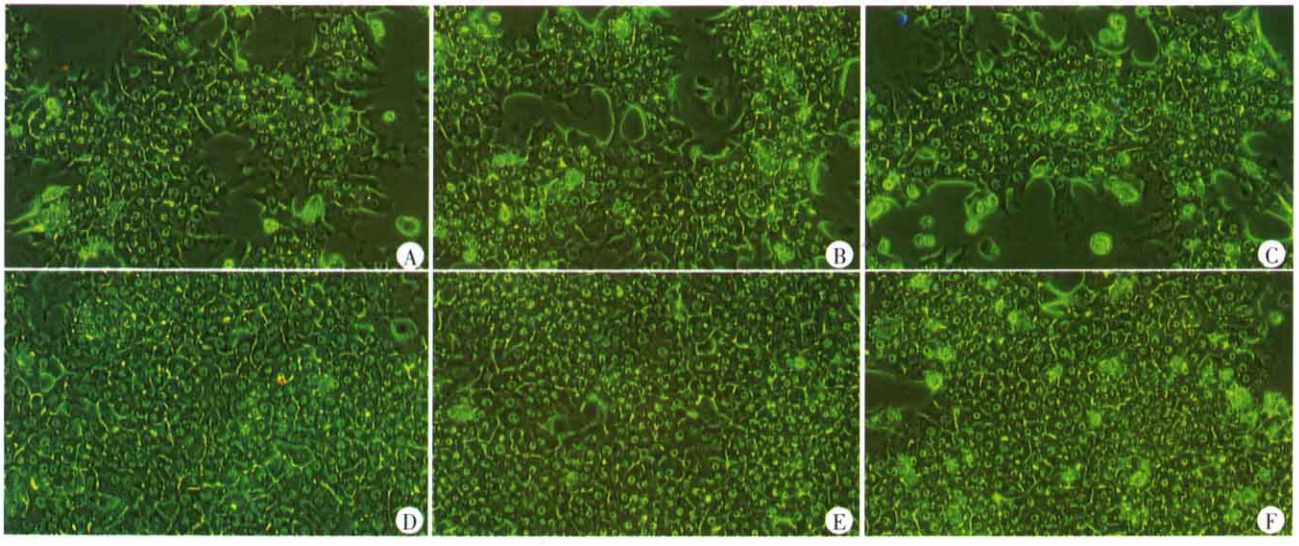
1.6 统计学处理

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 11.0统计软件进行方差分析和t检验。

2 结果

2.1 28 ℃短期培养肝细胞的形态观察

经37 ℃预培养24 h，乳猪肝细胞已经贴壁。再置28 ℃培养24～72 h后的肝细胞呈集落状成束样生长，呈典型的、较均匀一致的多边形特征，细胞与细胞之间的边界清晰明亮，细胞未见明显的增殖(图1A、B、C)。随着在28 ℃培养时间的增加，出现少量死细胞。上述经28 ℃短期培养的各组肝细胞恢复37 ℃培养后，均见细胞迅速增殖，呈典型的多边形特征(图1D、E、F)。



A, B, C: Groups A, B, C immediately after 28 ℃ incubation; D, E, F: Groups A, B, C after 24-hour cultue at 37 ℃

图1 倒置相差显微镜下28 ℃短期培养的肝细胞 (TEM×200)

Fig 1 Phase-contrast photomicrographs of hepatocytes with short-term incubation at 28 ℃ (TEM×200)

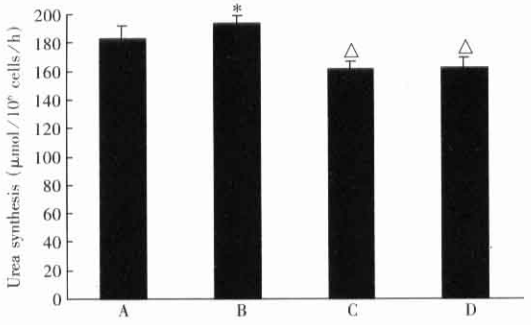
2.2 28 ℃短期培养对肝细胞氨清除率影响

经28 ℃短期培养1～3 d后，肝细胞的氨清除率较对照组无显著差异($F=1.392$，$P>0.05$)，而且各实验组肝细胞恢复37 ℃继续培养24 h的氨清除率之间亦无显著差异($F=0.325\ 3$，$P>0.05$)。

2.3 28 ℃短期培养对肝细胞尿素合成量影响

在28 ℃培养1～3 d后恢复37 ℃培养24 h的肝细胞以及对照组的肝细胞均保持较强的尿素合成能力。在28 ℃培养1

d 后的肝细胞尿素合成量较对照组显著升高（$F = 203.0$，$P < 0.01$），但在 28 ℃培养 2 d 和 3 d 后的肝细胞尿素合成量较在 28 ℃培养 1 d 的肝细胞显著降低（$F = 49.25$，$P < 0.01$），见图 2。



A: Control; B, C, D: The activity of urea synthesis of groups A, B, C after 24-hour culture at 37 ℃; *: $P < 0.01$, *vs* A; △: $P < 0.01$, *vs* B

图 2　28 ℃短期培养对肝细胞尿素合成量影响

Fig 2　Effects of the short-term incubation at 28 ℃ on the activity of urea synthesis

2.4　培养上清 LDH 和 AST 检测

在 28 ℃短期培养和恢复 37 ℃继续培养的肝细胞培养上清 LDH 的含量波动于 15 ~ 32 U/L，AST 在 9 ~ 40 U/L 之间波动。在 28 ℃培养的肝细胞 LDH（17.5 ± 1.8）U/L、AST（20.5 ± 10.6）U/L 释放量与恢复 37 ℃培养的肝细胞 LDH（19.0 ± 4.1）U/L、AST（16.1 ± 3.5）U/L 无显著性差异（$t_{LDH} = 0.58$，$t_{AST} = 0.68$，$P > 0.05$）。

3　讨论

传统的细胞保存方法主要采用超低温 - 50 ℃、- 80 ℃、- 196 ℃长期保存或在 4 ℃或 0 ℃左右短期保存以及室温保存。大量研究显示，在超低温长期保存或在 4 ℃或 0 ℃左右短期保存肝细胞复温后，肝细胞活力和功能都会有较大程度的降低[3,4]，不能完全满足生物人工肝所需大量、高密度、高活性肝细胞的要求，故急需为生物人工肝细胞材料肝细胞的保存和运输探索一种更方便有效的方法，以进一步促进生物人工肝的临床应用。而到目前为止，室温培养细胞用于肝细胞保存和运输的相关研究尚无报道。本研究对刚分离的新生广西巴马小型猪肝细胞采用 28 ℃短期培养后，恢复 37 ℃继续培养，观察其形态、氨清除率、尿素合成能力以及 LDH、AST 的释放等变化。结果表明，经28 ℃短期培养的肝细胞能维持较好其典型的细胞形态和有效的细胞功能，提示有可能成为生物人工肝细胞材料肝细胞运输和保存的有效方法。

肝细胞的保存和运输必须维持有效的细胞功能，这也是生物人工肝治疗肝衰竭的基本要求。目前认为，血氨增高及其毒性作用与肝性脑病的发生密切相关，而尿素合成量是评价肝细胞合成能力的重要指标之一。Mikio Katsuki 等[5]报道采用亚低温（25 ~ 33 ℃）培养肝细胞可很好地维持其尿素合成能力。本研究证实在 2 8℃短期培养后，恢复 37 ℃继续培养的肝细胞氨清除率和尿素合成能力较对照组无显著差异，提示经 28 ℃短期培养后的肝细胞仍能较好地维持其有效的功能；在 28 ℃分别培养 24、48、72 h 后，恢复 37 ℃继续培养，各组肝细胞氨清除率之间无显著差异，但在 28 ℃培养 2 d 和 3 d 后的肝细胞尿素合成量较在 28 ℃培养 1 d 的肝细胞显著降低，说明在 28 ℃培养时间对肝细胞氨清除能力没有影响而对尿素合成能力有一定影响。

有研究显示[6]，在亚低温（25 ℃）条件下，用碳酸氢盐缓冲液保存肝细胞 24 ~ 48 h，肝细胞活性仅维持在 75% 左右，提示可能由于在缓冲液中没有营养物质，使肝细胞内储存能量很快耗尽而影响细胞膜的完整性。本研究用普通培养基在 28 ℃下保存肝细胞 24 ~ 72 h 显示，在 28 ℃培养肝细胞能很好地维持肝细胞的形态，并抑制肝细胞的增殖，恢复 37 ℃培养后肝细胞能保持典型多边形特征和进一步增殖；在 28 ℃培养肝细胞与恢复 37 ℃培养肝细胞的 LDH、AST 的释放量变化无显著差异；提示 28 ℃短期培养条件下能维持肝细胞形态和完整的细胞膜，这与本实验采用的普通培养基较碳酸氢盐缓冲液含有更多的营养物质可能有关。

28 ℃短期培养肝细胞虽能较好地维持肝细胞的形态和功能，但该方法能否满足生物人工肝所需大量、高密度保存和运输肝细胞的需求，以及在室温不恒定的情况下肝细胞的形态和功能是否能维持稳定，尚需要经一步探索。

参考文献：

[1] Demetriou A A, Brown R S Jr, Busuttil R W, *et al*. Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure[J]. Ann Surg, 2004, 239(5): 660 - 670.

[2] Sarkis R, Honiger J, Chafai N, *et al*. Semiautomatic macroencapsulation of fresh or cryopreserved porcine hepatocytes maintain their ability for treatment of acute liver failure[J]. Cell Transplant, 2001, 10(7): 601 - 607.

[3] Koebe H G, Muhling B, Deglmann C J, *et al*. Cryopreserved porcine hepatocyte cultures[J]. Chem Biol Interact, 1999, 121(1): 99 - 115.

[4] Abrahamse S L, van Runnard Heimel P, Hartman R J, *et al*. Induction of necrosis and DNA fragmentation during hypothermic preservation of hepatocytes in UW, HTK, and Celsior solutions[J]. Cell Transplant, 2003, 12(1): 59 - 68.

[5] Mikio Katsuki, Hiroshi Kurosawa, Yoshifumi Amano. Enhancement of albumin secretion by short-term hypothermic incubation of primary rat hepatocytes[J]. Biochemical Engineering Journal, 2004, 20(2-3): 137 - 141.

[6] Wigg A J, Phillips J W, Berry M N. Maintenance of integrity and function of isolated hepatocytes during extended suspension culture at 25 degrees C [J]. Liver, 2003, 23(3): 201 - 211.

[7] Mischiati C, Puviani A C, Brogli M, *et al*. Modulation of pro-apoptotic (Bax) and anti-apoptotic (Bcl-2) gene expression in isolated porcine hepatocytes perfused within a radial-flow bioreactor after low-temperature storing [J]. Int J Artif Organs, 2003, 26(2): 139 - 148.

（编辑　薛国文）