文章编号:1000-5404(2005)19-1953-04

论著

重型肝炎病人血浆对体外培养 HepG2 细胞生长和解毒功能的影响

程永波,陈 志,王英杰,张世昌,刘 俊 (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 了解重型肝炎病人血浆(severe-hepatitis plasma,SHP)对 HepG2 细胞生长和解毒功能的影响,为保持生物人工肝反应器内肝细胞活性研究提供实验依据。**方法** 复苏培养 HepG2 细胞,通过细胞总蛋白含量和细胞周期测定、形态变化观察了解 SHP 对细胞生长的影响,从细胞周期角度探讨这种影响的机制。同时,通过谷胱甘肽含量检测了解 SHP 对细胞解毒功能的影响。**结果** ①SHP 培养 HepG2 细胞总蛋白合成显著下降($F=46.852$,$P<0.01$),浓度越高下降幅度越大,形态观察细胞细小,明显稀疏;终止 SHP 培养,换用普通培养液后细胞仍有 LDH 漏出,24 h 时高出对照组近 1 倍;细胞生长周期测定发现 SHP 培养的 HepG2 细胞 S 期所占比例比对照组增高,第 1 天差异非常显著($F=92.239$,$P<0.01$),第 3 天只有 100% SHP 组增幅差异非常显著(多重比较 $P<0.01$)。②各种浓度 SHP 培养的 HepG2 细胞谷胱甘肽含量第 1 天均显著升高($F=10.097$,$P<0.01$),但第 3 天开始下降;不同浓度间 GSH 含量差异显著($F=8.097$,$P<0.05$)。**结论** SHP 抑制 HepG2 细胞生长,短时间内可促进 HepG2 细胞解毒,但随时间延长解毒功能耗竭。

关键词: HepG2 细胞;重型肝炎;血浆;细胞周期;解毒
中图法分类号: R322.47; R329.25; R512.6 **文献标识码**: A

Effect of plasma from patients with severe hepatitis on growth and detoxification of HepG2 cells

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

Abstract: **Objective** To investigate the effect of plasma from severe hepatitis patients (SHP) on the growth and detoxification of HepG2 cells. **Methods** HepG2 cells were recovered and cultured in SHP of different concentration. Total protein, the leakage of LDH, the morphologic changes, cell cycles, glutathione of HepG2 cells were investigated. **Results** The synthesis of total protein was inhibited ($F=46.852$, $P<0.01$) in 100% SHP group. Exposed to SHP for 24 h, LDH leakage of HepG2 cells was approximately one-fold higher than that of controls and the cell morphology turned to be thin and sparse. The percentage of cells at S phase was significantly increased on day 1 ($F=92.239$, $P<0.01$). Exposure of HepG2 cells to SHP resulted in an increase ($F=10.097$, $P<0.01$) in the GSH content within 24 h as compared to that of controls. On day 3, the GSH level declined to below the levels of controls. The statistical difference of GSH in different-concentration SHP groups was significant ($F=8.097$, $P<0.05$). **Conclusion** SHP inhibits the growth of HepG2 cells, increases the detoxification in 24 h but declines after 3 days.

Key words: HepG2 cells; severe hepatitis; plasma; cell cycle; detoxification

生物人工肝是以培养肝细胞为基础,与正常肝脏较为接近的人工肝支持系统,可为肝衰竭患者提供可靠的过渡支持治疗,是目前人工肝的重要研究领域之一。近年来的研究表明,肝衰竭患者体内的大量毒性产物在被生物人工肝解除的同时,会对反应器中的肝细胞产生不利影响[1,2],降低治疗效果。相关研究中所采用的血浆或血清基本来自对乙酰氨基酚致药物性肝衰竭患者,在我国进行人工肝治疗的多为乙型肝炎病毒引起的慢性重型肝炎患者,此类患者血浆(severe

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30027001)
Supported by the National Natural Science foundation of China(30027001)
作者简介:程永波(1970-),男,山东省海阳市人,硕士研究生,主治医师,主要从事生物人工肝相关基础课题方面的研究。电话:(023)68772804
通讯作者:王英杰,电话:(023)68754475,E-mail: wangyj103@263.com
收稿日期:2005-01-22;修回日期:2005-03-17

hepatitis plasma, SHP)对肝细胞的影响尚不清楚。因此有必要观察重型肝炎患者血浆作用下肝细胞的生长状态和解毒功能变化,为保持生物反应器内肝细胞材料生物活性的研究提供实验依据,并进而不断提高生物人工肝的临床治疗效果。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和材料

无酚红 RPMI1640(美国 HyClone 公司),自动生化分析仪所用试剂(瑞士罗氏公司和中国成都迈克公司),谷胱甘肽、过氧化氢酶、总蛋白定量测试盒(南京建成生物工程研究所),新生牛血清(newborn calf serum, NCS)中美合资兰州民生物工程有限公司。塑料培养板(美国 Nuculon 公司)。

HepG2 细胞为本实验室液氮冻存细胞。6 例患者为本科住院患者,男女各 3 人,年龄 34 ~ 60 岁,其中肝性脑病Ⅱ期 2 例,Ⅲ期 3 例,Ⅳ期 1 例,诊断均符合 2000 年西安全国传染病与寄生虫病学术会议修订的诊断标准; 6 份 SHP 取自上述 6 人做血浆置换时分离血浆,丢弃分离初始的 100 ml,留随后 300 ml。患者凝血功能和生化等检查如下:凝血酶原时间(25.7 ± 3.2)s;总胆汁酸(309.8 ± 74.7)μmol/L,总胆红素(611.8 ± 107.6)μmol/L,病毒标志物 HBsAg 全阳性,HBV-DNA 都在 10^5 copy/ml 以上。所有与 SHP 有关实验都采用 6 个 SHP 样本同时进行,最后取平均值;均采用 10% NCS 培养细胞作为对照。

1.2 总蛋白含量检测

以 1×10^5/ml 细胞密度接种 HepG2 细胞于 12 孔板中,24 h 后加入 10%、50%、100% SHP,培养 24 h 后消化,离心,500 μl 双蒸水重悬于 1.5 ml 离心管中, -70℃冻存,3 h 后取出融化,再次冻融,重复 3 次。第 3 次融后离心,取上清,按说明操作,SmartSpec3000 型紫外分光光度计(美国 Bio-Rad 公司)测定总蛋白。

1.3 SHP 培养终止后 LDH 漏出量检测

以 2.6×10^4/ml 细胞密度接种于 12 孔板,培养 24 h 加入 100% SHP,再作用 24 h 后吸弃上清, PBS 洗 3 遍,加入不含酚红的 RPMI1640 1 ml(用 1 ml 滴管加入,不加血清),24 h 后取上清液, 90 × g 离心 10 min,紫外动力学方法在 7020 型日立自动生化分析仪(日本 HITACH 公司)上检测 LDH 漏出量。

1.4 细胞周期测定

HepG2 细胞消化后重悬约 1×10^5/ml,接种于 6 孔板培养 24 h,加入 10%、50%、100% SHP,10% NCS 作对照。加 SHP 1 d 和 3 d 后胰酶消化,30 × g 离心,PBS 重悬至 2×10^5/ml,取1 ml,在微振荡器上加 4 ℃预冷 70% 乙醇固定,4 ℃冰箱保存。1 周内在第三军医大学中心实验室用 FACSC alibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)检测 G_1、S、G_2 期细胞比例。

1.5 谷胱甘肽含量检测

以 1×10^5/ml 细胞密度接种于 12 孔板,细胞已长满孔底时加入 10%、50%、100% SHP,谷胱甘肽(glutathione, GSH)分别在 0、1、3、5 d 检测,冻融法取样(步骤同上)。按试剂盒说明用 Fortune Labsystems 酶标仪(芬兰雷勃公司)检测。

1.6 形态观察

做上述各项实验时,同时采用 IX70 型倒置相差显微镜(phase-contract microscope, PCM,日本 Olympus 公司)对 SHP 培养组和对照组 HepG2 细胞生长状况进行动态观察,早晚各观察 1 次,同时照相记录。

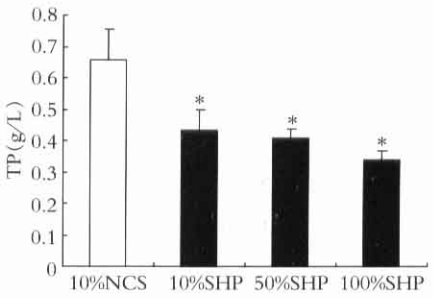
1.7 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行正态性方差齐性检验和相应的方差分析及 t 检验。

2 结果

2.1 总蛋白检测

通过单因素方差分析,SHP 培养各组 HepG2 细胞总蛋白(total protein, TP)合成显著下降($F = 46.852$, $P < 0.01$),多重比较 100% SHP 组下降幅度最大($P = 0.001$),其值仅为对照组的 49%,见图 1。



*: $P < 0.01$, *vs* 10% NCS

图 1 SHP 培养 HepG2 细胞 24 h 后的总蛋白量

Fig 1 Total protein content of HepG2 cells cultured in SHP for 24 h

2.2 SHP 培养终止后 LDH 漏出量检测

终止 SHP 培养,换用普通培养液后细胞仍有 LDH 漏出,24 h时 100% SHP 组为 42 U/L,对照组(10% NCS)为 20 U/L,二者相差近 1 倍。

2.3 细胞周期测定

SHP 可使肝细胞周期发生改变,不同浓度、不同作用时间引起的变化不同。与对照组相比:第 1 天浓度加大,G_1 期细胞比例逐渐减少而 S 期和 G_2 期的逐渐增多,S 期的增幅差异非常显著($F = 92.239$, $P < 0.01$),100% SHP 组几乎是对照组的 2 倍;第 3 天 G_1 期细胞比例只有 100% SHP 组减少,G_2 期各组都减少,S 期各组都高于对照组,多重比较只 100% SHP 组增幅差异非常显著($P < 0.01$)。具体见表 1。

2.4 谷胱甘肽含量检测

第 1 天 SHP 组所测 GSH 均显著升高($F = 10.097$, $P < 0.01$),第 3、5 天开始下降,而对照组持续增高,第 5 天时 SHP 组全低于对照组,100% SHP 组最显著($P < 0.01$)。通过双因素方差分析,不同浓度间 GSH 含量差异显著($F = 8.097$, $P < 0.05$),10% SHP 组最高,随浓度升高 GSH 逐渐降低。见表 2。

表 1　SHP 作用 1 d 和 3 d HepG2 细胞周期变化（$\bar{x} \pm s$，%）

Tab 1　Cell cycle of HepG2 cells cultured in SHP on day 1 and 3（$\bar{x} \pm s$，%）

Group	Day 1			Day 2		
	G_1	S	G_2	G_1	S	G_2
10% NCS	59.28 ± 5.98	22.46 ± 3.21	17.16 ± 3.20	56.11 ± 4.98	23.04 ± 2.09	20.36 ± 3.46
10% SHP	59.07 ± 3.57	25.30 ± 0.59	15.13 ± 2.63	62.84 ± 1.24	23.42 ± 2.34	13.13 ± 2.69 *
50% SHP	38.43 ± 2.01 **	38.08 ± 1.30 **	23.08 ± 1.19 *	60.25 ± 3.51	25.25 ± 1.61	14.26 ± 0.67 *
100% SHP	32.34 ± 1.69 **	44.89 ± 2.42 **	22.05 ± 2.67 *	48.29 ± 1.68	49.79 ± 2.93 **	1.75 ± 0.73 **

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* 10% NCS

表 2　不同浓度 SHP 培养 HepG2 细胞 GSH 变化（mg/L，$\bar{x} \pm s$）

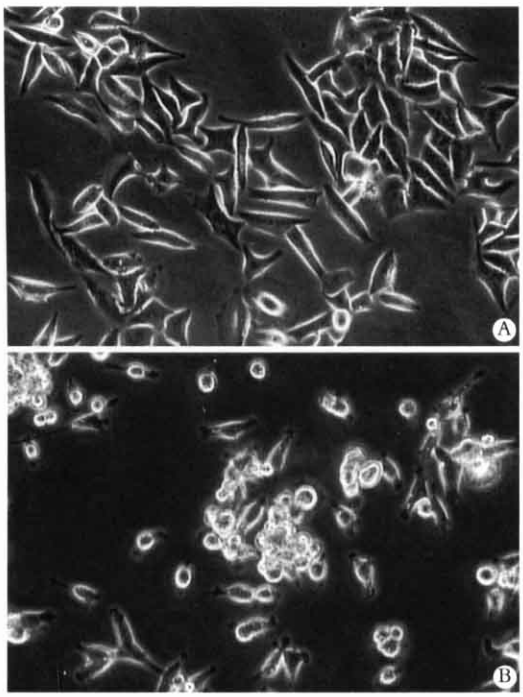
Tab 2　GSH changes of HepG2 cells cultured in SHP（mg/L，$\bar{x} \pm s$）

Group	Day 1	Day 3	Day 5
10% NCS	217.89 ± 25.20	289.56 ± 23.15	308.21 ± 27.52
10% SHP	312.26 ± 20.01 **	342.66 ± 21.69 *	289.67 ± 15.92
50% SHP	295.43 ± 11.28 **	309.33 ± 17.85	254.37 ± 20.64 *
100% SHP	273.34 ± 28.50 *	232.24 ± 14.50 *	209.58 ± 23.96 **

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* 10% NCS

2.5　形态观察

与对照组（图 3A）相比，SHP 培养 24 h 后 HepG2 细胞形态细小，明显稀疏，出现较多漂浮的死亡细胞，100% SHP 组最严重（图 3B）。3 d 后 10%、30%、50% 浓度组细胞生长较前加快，漂浮的死亡细胞减少，而 100% 浓度组仍生长缓慢，持续有大量漂浮的死亡细胞出现。



A：HepG2 cells cultured in 10% NCS；B：HepG2 cells after 24-hour exposure to the SHP were thin，sparse and partly dead

图 3　100%SHP 和 10%NCS 培养 HepG2 细胞形态比较（PCM ×200）

Fig 3　Comparison of HepG2 cell morphology between 100% SHP and 10% NCS groups（PCM ×200）

3　讨论

以往报道肝衰竭病人血浆或血清对肝细胞生长有抑制作用，表现为大分子合成减少，细胞呈斑状生长，不能汇合长满瓶底等[2~4]，本实验中总蛋白合成和形态观察与此一致；在培养过程中还发现终止 SHP 培养后仍有酶漏出，提示 SHP 对 HepG2 细胞的损伤可能是持续性的，对细胞生长的影响也可能是持续性的。关于 LFP（LFS）抑制细胞生长的机制研究多集中于细胞物质转运障碍、细胞器受损、细胞分子基础变化等方面[2,5]，从细胞周期角度加以探讨尚少见报道，而细胞周期与细胞的生长状况密切相关，因此本实验观察了 SHP 培养 HepG2 细胞周期的变化。结果表明 SHP 主要促使细胞从 G_1 期进入 S 期，100% SHP 组 G_1 期减少的 26.94% 中，有 22.43% 进入 S 期，仅 4.89% 进入 G_2 期；随作用时间延长，100% SHP 培养的 HepG2 细胞仍有较多进入 S 期，10% 和 50% 浓度组则大多停滞于 G_1 期。以上变化提示在 SHP 作用下，HepG2 细胞增殖主要受阻于 S 期，晚期低浓度 SHP 作用下可能受阻于 G_1 期。HepG2 细胞受阻于 S 期可能是因为 SHP 干扰细胞周期的正常信号传导，使进入 S 期的细胞不能顺利进入 G_2/M 期。换一个角度讲，S 期显著升高也可以作为肝细胞受到毒性损伤的一个信号或一种反应。晚期低浓度 SHP 作用下细胞受阻于 G_1 期，可能与 SHP 中较高的 TGF-β[6] 有关，有报道 TGF-β 可通过调节细胞周期蛋白、细胞周期蛋白依赖激酶而使肝细胞停滞于 G_1 期。

抗氧化系统是肝细胞两个重要的解毒途径之一，主要有 GSH、谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽硫转移酶等，GSH 主要解除亲电子的外源性化学物质和内源性复合物以及他们代谢物的毒性，检查其状态可揭示毒性代谢的信息。本实验中，各种浓度 SHP 培养 1 d 后 HepG2 细胞 GSH 含量均显著高于对照组，但在第 3 天时开始下降，在第 5 天下降至均低于对照组。第 1 天 GSH 升高有可能是因为 SHP 中毒性物质激活了细

胞防御系统，肝细胞天生有清除有害刺激的能力，当细胞遇到有限的毒性物质如亚致死量刺激时可激活细胞的保护性机制，GSH 在这方面发挥重要作用，因此 HepG2 细胞中 GSH 含量的升高可能是一种适应性反应。3 d 后 GSH 开始下降，预示在 SHP 中毒性成分的作用下，GSH 逐渐衰竭，这种衰竭有报道从第 4 天开始[2]，而在本实验中从第 3 天已经开始。推测 GSH 衰竭可能是因 GSH 与 SHP 中的一些成分发生直接或间接反应所致。细胞生长率可对 GSH 含量产生影响[7]，本实验中在细胞长满瓶壁时加 SHP 干预，以尽可能减少这种影响。

参考文献：

[1] 王英杰. 绪论[A]. 见：王英杰 主编. 生物人工肝[M]. 北京：人民卫生出版社，2002. 18－23.

[2] Shi Q, Gaylor J, Cousins R, *et al*. The effects of serum from patients with acute liver failure on the growth and metabolism of HepG2 Cells [J]. Artif Organs, 1998, 22(10): 1023－1030.

[3] Smirthwaite A D, Gaylor J D, Cousins R B, *et al*. Cytotoxicity of bile in human HepG2 cells and in primary cultures of rat hepatocytes[J]. Artif Organs, 1998, 22(10): 831－836.

[4] Noto H, Matsushita M, Koike M, *et al*. Effect of high concentrations of bile acids on cultured hepatocytes[J]. Artif Organs, 1998, 22(4): 300－307.

[5] Hiromitsu N, Michiaki M, Makoto N, *et al*. Injuriousness of glycochenodeoxycholate and taurochenodeoxycholate to cultured hepatocytes [J]. J Artif Organs, 2002, 5(1): 30－36.

[6] Nozato E, Shiraishi M, Nishimaki T. Up-regulation of hepatocyte growth factor caused by an over-expression of transforming growth factor beta, in the rat model of fulminant hepatic failure[J]. J Surg Res, 2003, 115(2): 226－234.

[7] Doostdar H, Demoz A, Burke M D, *et al*. Variation in drug-metabolizing enzyme activities during the growth of human HepG2 hepatoma cells[J]. Xenobiotica, 1990, 20(4): 435－441.

（编辑 龙 亮）

（上接 1952 页）

25 日来我院神经内科就诊，查体血压 177/108 mmHg，意识清楚，言语清，左侧偏身痛觉减退，左上肢肌力Ⅳ级，左下肢 0 级，肌张力低，右侧肢体肌力肌张力正常，腱反射稍活跃，左侧 Babinski(＋)，Chadock(＋)。深感觉无异常。行康复评定，采用功能试验评定，其中绘钟面，串念珠，作过身体中线活动，从钟面上看时间，按要求放方块积木等均出现阳性，Barthel 指数 20 分。

入院后进行综合的康复治疗 4 周，患者明显恢复，功能试验 4 项转阴，Barthel 指数 45 分。

2 讨论

空间位置与空间关系紊乱均属于失认症的范畴，主要由大脑次侧顶叶病变引起。临床上采用功能试验评定法，阳性患者有如下特征：①绘钟面：让患者绘一有阿拉伯数字表示的钟面，可明显看出其位置关系不正常；②串念珠：不知道珠和线放在自己何方，也分不清珠和线的关系，因此无法完成；③作越过身体中线的动作有困难，不知何处为中；④不能从钟面上了解时间，因不了解长短针的关系；⑤按要求方块积木，取两小块积木放在患者面前，一块不动，让患者将另一块放在它的上面、前面、左面、右面，不能完成为阳性；⑥向患者出示牙刷和漱口杯、把牙刷分别放在杯内、杯上、杯下，让患者说出其位置，不能说出者为阳性。

本例患者临床表现典型，功能试验多项阳性，除相应的物理治疗外，在作业治疗中主要采用训练转移法（transfer of training approach，TTA）和感觉整合法（sensory integration approach，SI）。训练转移法的理论基础是在治疗室作业台上重复地进行某种知觉作业，会得到能转移到相似知觉作业上去的改善，并且有可能最后泛化或转用到每日功能活动中去。治疗时采用有关空间关系知觉的训练，方法如下：①训练患者自己在空间的定向，如练习走迷宫、把物体放在自己的前后左右；②训练患者的物体与物体间的定向，如用积木搭构立体模型、组装拼图等。感觉整合法是利用机体为了适应而将感觉组织起来，整合可将初级的感觉转变为有意义的知觉，例如空间感的形成是以视、听、运动觉的整合为基础的。在感觉整合法时，治疗师向患者提供控制好的感觉刺激，特别是来自肌肉、关节、皮肤和前庭的刺激，接着是由患者整合这些刺激而作出适应性的反应。例如让患者作越过中线的活动；让患者将放在左侧的积木移至右侧，治疗师发出指令，同时在右侧给予敲打刺激，随患者的进步逐渐减少刺激[1]。

上述两种训练法在失认症治疗中应用较多，早期介入对大脑的可塑性、感觉整合功能均能起到良好的促进作用，而缺少有关练习可能产生继发性神经萎缩或形成不正常的神经突触[2]。

空间位置与空间关系紊乱是大脑损伤的表现之一，常被其它功能障碍掩盖，由于早期缺乏针对性功能训练，造成了患者日常生活能力低下。早期发现并采取有效合理的治疗措施进行干预，能够取得较好的疗效，在临床工作中有着极其重要的意义。

关键词：空间位置；空间关系；紊乱

中图法分类号：R743.3 文献标识码：B

参考文献：

[1] 缪鸿石. 康复医学理论与实践[M]. 上海：上海科学技术出版社，2000. 1257－1270.

[2] 恽晓平. 脑外伤后的知觉功能障碍[J]. 现代康复，2001，5(10)：8－9，15.

[3] Baier B, Karnath H O. Incidence and diagnosis of anosognosia for hemiparesis revisited[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2005, 76(3): 358－361.

（编辑 张大春）