文章编号:1000-5404(2005)12-1247-03

论著

冷冻猪肝细胞在生物型人工肝系统中的生存状态研究

周　霖[1],薛毅珑[2],楼　敏[1],田　磊[2],李雁凌[2],张佐云[2],杨永平[1]　([1]解放军 302 医院感染内科,北京 100039; [2]解放军总医院老年医学研究所细胞生物学研究室,北京 100853)

提　要: 目的　研究冷冻复温后猪肝细胞在生物型人工肝支持系统(BALSS)中的生存状态。**方法**　用酶法从中国实验用小型猪肝脏分离出猪肝细胞;将 1×10^{10} 猪肝细胞冷冻保存在 -196 ℃液氮中;1 个月后复温,将等量的冷冻和新鲜猪肝细胞分别培养在 BALSS 中,比较其形态、存活率和白蛋白、尿素、葡萄糖合成功能及对利多卡因的转化功能。**结果**　冷冻保存的猪肝细胞,复温后其存活率较高;在培养于 BALSS 时其生化功能、利多卡因转化功能及超微结构与新鲜肝细胞类似。**结论**　用该冻存方法保存的猪肝细胞可试用于 BALSS 系统。

关键词: 猪肝细胞;低温保存;生物型人工肝
中图法分类号: R318.14; R322.47; R329.28　　**文献标识码**: A

Living states of cryopreserved porcine hepatocytes in biological artificial liver support system

ZHOU Lin[1], XUE Yi-long[2], LOU Min[1], TIAN Lei[2], LI Yan-ling[2], ZHANG Zuo-yun[2], YANG Yong-ping[1] ([1]Department of Infectious Diseases, No. 302 Hospital of PLA, Beijing 100039; [2]Department of Cell Biology, Institute of Geraeology, The General Hospital of PLA, Beijing 100853, China)

Abstract: Objective　To study the living states of cryopreserved porcine hepatocytes under the support of biological artificial liver system. **Methods**　Porcine hepatocytes were isolated from Chinese experimental miniature swines by collagenase digestion and stored with aliquots of 1 × 1 010 cells at -196 ℃ liquid nitrogen. After 1 month, the stored cells were resuscitated and cultured in bioartificial liver support system (BALSS). Fresh hepatocytes at same amount were served as control. The morphology, survival rate, and functions of synthesizing albumin, urea and glucose and transforming lidocaine were observed. **Results**　The survival rate of the frozen hepatocytes was high. There was no obvious difference of the two group in the cell function and microstructure. **Conclusion**　The results indicate that cryopreserved hepatocytes can be used in BALSS.

Key words: porcine hepatocytes; cryopreservation; bioartificial liver

近 10 年来,生物型人工肝支持系统(bioartificial liver support system, BALSS)的研究方兴未艾[1~3]。国内外动物及临床实验[4~7]表明它是治疗暴发型肝衰竭(fulminant hepatic failure, FHF)及肝移植桥接的有效方法。储备大规模的肝细胞以备 BALSS 治疗之需,是 BALSS 技术广泛应用的基础。我们通过对降温过程、冷冻保护液、细胞密度和复温后洗脱条件的探索,建立了自己的大规模猪肝细胞的低温保存方法[8]。但尚不明确冷冻复温后猪肝细胞是否能够在生物反应器中大规模培养。本研究对培养于 TECA-Ⅰ型 BALSS 的新鲜猪肝细胞和冷冻复温后猪肝细胞的功能、形态及活率进行比较,以探讨冷冻猪肝细胞在 BALSS 中的生存状态。

作者简介:周　霖(1974-),男,湖北省黄冈县人,硕士,主治医师,主要从事生物型人工肝及肝细胞移植的基础与临床方面的研究。电话:(010)6693342

收稿日期:2004-04-08;修回日期:2004-10-15

1　材料与方法

1.1　材料

中国实验用小型猪 10 只,体质量 6~8 kg,雌雄不限,由解放军总医院实验动物中心提供;冻存袋由美国 Baxter 公司提供;WKL-97 型程控降温仪购自军事医学科学院仪器厂;Nuaire -85 ℃低温冰箱;HW1 型电热恒温水浴箱;TECA-I 型 BALSS 系统、混合胶原酶、营养液粉剂由香港德矩国际有限公司提供;DMSO 为北京石鹰化工厂产品;牛血清白蛋白购自华美公司。

1.2　方法

1.2.1　肝细胞分离　采用改良的胶原酶灌注法分离猪肝细

胞(见另文阐述)。

1.2.2 实验分组 实验分成两组:①新鲜肝细胞组(对照组):新鲜分离获得的猪肝细胞 0.8×10^{10} 个,活率 80% 以上;②冷冻肝细胞组(实验组):将 1×10^{10} 个新鲜肝细胞(因考虑冷冻复温洗涤后有 20% 左右的肝细胞损失)采用 4 ℃/ - 85 ℃/ - 196 ℃的方法[8]梯度降温,最后入液氮罐(- 196 ℃)中保存。将在液氮中保存 1 个月的肝细胞取出,迅速浸入 39 ℃水浴中复温,复温后肝细胞活率在 70% 以上。

1.2.3 BALSS 培养 TECA-I 型 BALSS 由细胞环路、血液环路及中空纤维管式半透膜组成,两个环路中的液体及中、小分子的物质通过中空纤维管的半透膜进行顺浓度差的交换。分别将新鲜及冷冻复温后的猪肝细胞置于细胞环路(生物反应器)中循环培养 6 h;在血液环路中串连 1 个三角烧瓶,使 250 ml DMEM 细胞培养液在血液环路中循环流经中空纤维管。为测定肝细胞的功能,在 DMEM 细胞培养液中加入 0.2 mg/ml 的利多卡因、30 mg/L 的 NH_4Cl 及 10 mmol/L 的果糖[9]。

1.2.4 肝细胞活率测定 各组分别于 BALSS 培养的 0、2、4、6 h 时从细胞环路中取 1 ml 肝细胞液,用台盼蓝(typran blue)拒染法测定肝细胞的活率。

1.2.5 肝细胞药物代谢功能及生化功能的测定 各组分别于培养的 0、2、4、6 h 从血液环路取 100 μl 细胞培养液,于解放军总医院医学仪器中心用高效液相层析法[10]测定利多卡因的浓度;另取 500 μl 送解放军总医院生化科用全自动生化检测仪测定白蛋白(ALB)、尿素氮(BUN)、葡萄糖(GLU)及乳酸脱氢酶(LDH)的浓度。

1.2.6 肝细胞形态学的观察 各组分别于培养的 0、3、6 h 从细胞环路中取 2 ml 肝细胞悬液,125 × g,离心 10 min,用 2.5% 戊二醛固定,送解放军总医院电镜室行 TEM 观察肝细胞超微结构的变化;另取 1 ml 细胞,于倒置相差显微镜下观察其显微结构。

1.3 统计学处理

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,实验数据用 Stata4.0 软件进行双因素重复设计资料的方差分析检验。

2 结果

2.1 存活率的变化

新鲜猪肝细胞在培养的前 4 h 活率变化不大($P>0.05$);而冷冻猪肝细胞在培养 4 h 的活率与 0 h 相比即有显著差异,下降了 13%,见表 1。这表明冷冻猪肝细胞在 BALSS 中培养时死亡较快,提示在培养 4 h 时即应更换猪肝细胞,以更好的发挥其肝脏支持功能。

表 1 猪肝细胞存活率(%, $n=10$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Survival rate of porcine hepatocytes (%, $n=10$, $\bar{x}\pm s$)

Time (h)	Fresh	Cryopreserved
0	83.6 ± 2.3	75.4 ± 4.2△
2	81.4 ± 2.4	68.1 ± 3.3△
4	79.3 ± 1.4	62.4 ± 6.5△★
6	75.9 ± 6.3★	60 ± 4.5△★

△: $P<0.05$, *vs* fresh hepatocytes; ★: $P<0.05$, *vs* 0 h

2.2 生化功能的变化

表 2 显示了两组细胞培养 0、2、4、6 h 白蛋白(ALB)、尿素氮(BUN)、葡萄糖(GLU)及乳酸脱氢酶(LDH)浓度的变化。新鲜与冻存猪肝细胞的白蛋白、尿素氮及葡萄糖含量均随着培养时间的延长而增加,在培养的同一时间点两组之间无显著差异($P>0.05$)。培养 0 h 时两组细胞的乳酸脱氢酶浓度无显著差异,均随着培养时间的延长而增加,但新鲜肝细胞组的乳酸脱氢酶浓度上升幅度较冷冻肝细胞组小,在培养 4 h 后二者即有显著差异($P<0.05$),这与培养 4 h 时冷冻猪肝细胞的存活率即有显著下降的结果是一致的。

表 2 血液环路中白蛋白、尿素氮、葡萄糖和乳酸脱氢酶的浓度($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Concentration of albumin, urea nitrogen, glucose, LDH in blood circle ($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

Time (h)	Fresh				Cryopreserved			
	Albumin (g/h)	Urea nitrogen (mol/L)	Glucose (mmol/L)	LDH (mmol/L)	Albumin (g/h)	Urea nitrogen (mol/L)	Glucose (mmol/L)	LDH (mmol/L)
0	0.15 ± 0.04	0.17 ± 0.06	1.53 ± 0.27	1.54 ± 0.31	5.52 ± 0.66	5.43 ± 0.95△	4.04 ± 2.65	8.00 ± 12.22
2	0.34 ± 0.18	0.34 ± 0.16	2.33 ± 0.28★	2.15 ± 0.35★	12.05 ± 1.45★	12.3 ± 0.89★	173.86 ± 18.36★	203.95 ± 35.3★
4	0.46 ± 0.22★	0.51 ± 0.24★	2.82 ± 0.45★	2.83 ± 0.34★	13.62 ± 0.96★	13.23 ± 0.31★	252.97 ± 35.76★	329.11 ± 68.1△★
6	0.64 ± 0.2★	0.58 ± 0.19★	3.35 ± 0.88★	3.53 ± 0.25★	14.54 ± 0.57★	14.28 ± 0.92★	327.36 ± 49.5★	405.96 ± 60.38△★

△: $P<0.05$, *vs* fresh hepatocytes; ★: $P<0.05$, *vs* 0 h

2.3 利多卡因转化功能的变化

表 3 显示两组肝细胞均具有利多卡因转化功能,利多卡因浓度均随着培养时间的延长而下降,在培养的同一时间段,两组之间利多卡因浓度无显著差异($P>0.05$)。在 BALSS 中培养 2 h 时,二者都可将约 75% 的利多卡因转化,4 h 时可转化 90%、6 h 时可转化 95% 的利多卡因。

表 3 血液环路中利多卡因的浓度(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Concentration of lidocaine in blood circle (mmol/L, $\bar{x}\pm s$)

Time (h)	Fresh	Cryopreserved
0	0.2	0.2
2	0.046 ± 0.019★	0.044 ± 0.016★
4	0.022 ± 0.008★	0.023 ± 0.008★
6	0.010 ± 0.004★	0.011 ± 0.004★

★: $P<0.05$, *vs* 0 h

2.4　猪肝细胞形态的变化

2.4.1　显微结构　　新鲜分离出的猪肝细胞呈现为较暗淡的不规则圆形；培养 2 h 后呈现为光亮的圆球状，细胞核及细胞膜清楚，但破裂的细胞碎片也随之增加。冻存复温后的肝细胞膜边界清楚，经离心洗脱 DMSO 后，有部分细胞破裂，经 BALSS 培养后破裂的细胞较新鲜肝细胞明显增加，但存活的肝细胞形态较刚复温时变得更圆、更亮。

2.4.2　超微结构　　新鲜分离猪肝细胞的胞膜基本完整，部分胞膜有小裂孔，内含丰富细胞器，肝细胞胞浆内可见大量的粗面内质网、核糖体、线粒体，线粒体嵴清晰可见；在中空纤维管中培养 3 h 及 6 h 后，破裂的肝细胞逐渐增加，部分细胞器溢出，但存活的肝细胞形态完整，细胞器丰富，可见细胞膜表面的微绒毛，相邻细胞聚集成团。

冻存复温后的猪肝细胞形态完整，线粒体呈圆形、轻度浊肿，少部分细胞破裂；在中空纤维管中培养 3 h 及 6 h 后，破裂的肝细胞比新鲜肝细胞组明显增加，但是存活的肝细胞同样形态完整，具有丰富的细胞器，胞膜表面的微绒毛恢复。

3　讨论

建立大规模肝细胞的低温保存方法，是 BALSS 技术推广应用的关键环节。少量肝细胞低温保存的技术已被建立，但其保存的细胞量难以满足治疗需要。虽然美国已采用冷冻保存的肝细胞于治疗急性肝功能衰竭(FHF)患者[1]，但是该方法操作复杂，费用昂贵，难以推广。

为了保证人工肝的治疗效果，其冷冻肝细胞的数量应能达到 1×10^{10} 以上，并且复温后肝细胞应保持较高的存活率、仍具备肝细胞的主要功能。本研究的前一阶段成果[8]表明，用梯度降温方法能够一次性保存大量的猪肝细胞，而且复温后的肝细胞活率高、功能强、超微结构正常；本实验模拟冷冻复温后猪肝细胞用于 BALSS 系统的情形，以探讨冷冻猪肝细胞在 BALSS 中的生存状态。

陈小平等[6]研究发现，含新鲜猪肝细胞的 TECA 型 BALSS 对利多卡因有较高的生物转化率，提示培养于 TECA 型 BALSS 中的猪肝细胞有肝脏 P-450 酶活性；而且有明显的白蛋白、尿素氮合成功能。这些均表明在肝脏功能受损害时猪肝细胞型 BALSS 能够部分代替受损肝脏的功能。本研究同样采用使新鲜和冷冻猪肝细胞培养于 TECA 型 BALSS 的方法，以比较二者在培养的不同时间其合成、解毒能力及活率与形态学差异。结果表明，在 BALSS 中冻存与新鲜猪肝细胞均有较好的白蛋白、尿素氮与葡萄糖合成功能，其合成功能均随着培养时间的延长而增强，其中白蛋白在培养后 4 h 较 0 h 有显著差异，而后两项在培养 2 h 后即有明显增加，而且在培养的同一时间点新鲜与冷冻猪肝细胞此 3 项均无明显差异($P>0.05$)。在培养的前 2 h，二者均可以转化 75% 的利多卡因，培养 6 h 可代谢 95% 的利多卡因，表明冷冻肝细胞同样具有较强的肝脏 P-450 酶活性。使用梯度降温法所保存的猪肝细胞在 -196 ℃保存 30 d 后，其细胞活率维持在较高水平(75.4%)，仅较冷冻前下降 8.2%，这一结果与 Watanabe 等[11]相比毫不逊色。两组细胞在培养 0 h 时肝细胞的超微结构均完整，胞浆内有丰富的细胞器，随着培养时间的延长，有部分细胞胞膜破裂，细胞器溢出，胞浆内出现空泡，但是存活的肝细胞细胞膜完整，细胞器形态与培养前无明显差异，相邻细胞聚集成团，微绒毛完整。但是电镜及光镜结果均表明，破裂的冷冻肝细胞较新鲜肝细胞明显增多，这有待进一步改进其培养条件，减少细胞破坏。结果表明，本研究所建立的梯度降温法及自行研制的冻存液、洗脱方法可以较长期地保存大规模的猪肝细胞，复温后的肝细胞在 BALSS 中培养时其功能、形态与新鲜猪肝细胞无显著差异。

参考文献：

[1] Watanabe F D, Shackleton C R, Cohen S M, *et al*. Treatment of acetaminophen-induced fulminant hepatic failure with a bioartificial liver[J]. Transplant Proc, 1997, 29(1-2): 487 - 488.

[2] 赵世峰，薛毅珑，李新建，等. TECA-Ⅰ型生物人工肝支持系统治疗急性肝衰竭犬的实验研究[J]. 中国危重病急救医学，2001，13(4)：209 - 212.

[3] 陈小平，薛毅珑，李新建，等. TECA-Ⅰ型生物人工肝脏对少肝急性肝衰犬的治疗效应[J]. 世界华人消化杂志，2000，8(特刊)：101B.

[4] 薛毅珑，赵世峰，陈小平，等. TECA-Ⅰ组合型人工肝治疗 2 例急性肝衰患者[J]. 世界华人消化杂志，2000，8(特刊)：87C.

[5] Chen X P, Xue Y L, Li X J, *et al*. Experimental research on TECA-Ⅰ bioartificial liver support system to treat canines with acute liver failure[J]. World J Gastroenterol , 2001, 7(5): 706 - 709.

[6] 陈小平，薛毅珑，黄志强，等. TECA 生物型人工肝支持系统替代衰竭肝脏功能机制的实验研究[J]. 解放军医学杂志，2000，25(6)：401 - 404.

[7] Detry O, Arkadopoulos N, Ting P, *et al*. Clinical use of a bioartificial liver in the treatment of acetaminophen-induced fulminant hepatic failure[J]. Am Surg, 1999, 65(10): 934 - 938.

[8] 周　霖，薛毅珑，田　磊，等. 大规模猪肝细胞低温保存方法的建立[J]. 解放军医学杂志，2003，28(9)：816 - 818.

[9] Kasai S, Mito M. Large-scale cryopreservation of isolated dog hepatocytes [J]. Cryobiology, 1993, 30(1): 1 - 11.

[10] 王海峰，王　然，唐晓东. 反相 HPLC 法同时测定普鲁卡因和利多卡因含量[J]. 药学实践杂志，1998，16(6)：355 - 357.

[11] Watanabe F D, Mullon C J, Hewitt W R, *et al*. Clinical experience with a bioartificial liver in the treatment of serere liver failure. A phase I clinical trial[J]. Ann Surg, 1997, 225(5): 484 - 491.

(编辑　王　红)