论著

文章编号:1000-5404(2006)10-1010-03

猪肝细胞在聚砜膜生物界面生长的初步研究

陈 志,王英杰,张世昌,刘 俊,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 初步了解中国实验乳猪肝细胞在聚砜膜生物界面生长的情况,探索聚砜膜作为生物人工肝中空纤维反应器膜材料的可行性。**方法** 将分离的新生实验小型猪肝细胞接种到聚砜膜和聚苯乙烯界面,进行形态学观察及生物学功能测定,观察培养猪肝细胞的酶漏出量。**结果** 乳猪肝细胞在聚砜膜界面培养呈球型黏附、铺展,形成多细胞聚集体。与聚苯乙烯组相比较,聚砜膜组的尿素合成和蛋白分泌能力更强,氨转化率也明显提高,LDH 和 AST 的漏出量无显著差异。**结论** 聚砜膜是良好的乳猪肝细胞生长的生物界面,可以作为生物人工肝中空纤维反应器的膜材料。

关键词: 猪肝细胞;聚砜膜;生物人工肝;生物反应器

中图法分类号: R318.08; R322.47; R329.24 **文献标识码:** A

Preliminary study of porcine hepatocytes cultured on organism interface of polysulfone membrane

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

Abstract: Objective To preliminarily understand the situations of porcine hepatocytes cultured on the organism interface of polysulfone membrane and explore the feasibility of polysulfone membrane as bioartificial liver hollow fibers bioreactor's membrane material. **Methods** The hepatocytes isolated from experimental suckling minipigs were seeded onto the surfaces of polysulfone membrane and polystyrene. Cellular morphology was observed and both the biological function and enzyme release of porcine hepatocytes were examined. **Results** Porcine hepatocytes attached and spread on polysulfone membrane surface and formed spheroidal aggregates. As compared with hepatocytes cultured on polystyrene surface, the ability of urea synthesis and albumin secretion was increased significantly and the rate of ammonia elimination was raised significantly on polysulfone membrane surface. There was no significant difference in enzyme release of the hepatocytes cultured on the surfaces of polysulfone membrane and polystyrene. **Conclusion** Polysulfone membrane is a kind of fine organism interfaces and could be used as inartificial liver hollow fibers bioreactor's membrane material.

Key words: porcine hepatocytes; polysulfone membrane; bioartificial liver; bioreactor

实验研究表明[1,2],在诸多类型人工肝中,只有以体外培养的肝细胞为核心组成的生物型人工肝具有解毒、分泌、合成及转化等多种类似自然肝的功能及作用,是理想的人工肝治疗方法。生物人工肝反应器最基本的功能就是要为肝细胞提供理想的生存环境及反应界面,故反应器的半透膜材料的选择尤为重要。有关生物反应器的设计日趋合理,而半透膜材料的研究相对滞后,随着生物人工肝研究的不断深入,迫切需要合成、开发性能优越的半透膜,更有利于肝细胞的附着生长,尽可能保证肝细胞的生物学活性,才能更有利于反应器功能的发挥。本实验采用聚砜膜作为猪肝细胞培养界面,从形态学和生物学性能等方面进行观察,探索聚砜膜作为生物反应器膜材料的可行性,为进一步优化生物反应器提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

用于分离肝细胞的实验动物为中国实验小型猪,共5只,由本校实验动物中心提供,均为新生1~7 d的乳猪,体质量300~500 g,雌雄不限。实验前12 h断乳,清洁皮毛后备用。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470458);重庆市攻关项目(2004AC5041)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470458) and the Sci & Tech Research Project Foundation of Scientific committee of Chongqing (2004AC5041)

作者简介:陈 志(1977-),男,贵州省贵阳市人,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:2005-05-10;修回日期:2005-11-13

1.2　主要试剂和材料

聚砜膜由上海德宏生物医学科技发展有限公司研制惠赠；Ⅳ型胶原酶、台盼蓝等购自美国 Sigma 公司；细胞培养板为 Nuculon 公司产品（为聚苯乙烯制品）；小牛血清（NCS）、RPMI-1640 培养液等购于 Hyclone 公司。

1.3　肝细胞的分离

腹腔注射戊巴比妥钠（30 mg/kg）麻醉实验小型猪。常规方法消毒皮肤、开腹、暴露门静脉并注入肝素钠（125 IU/ml）1～2 ml 抗凝。无菌摘取肝脏，先用 37 ℃前灌流液（含 HEPES 无钙、镁离子的 Hanks 液），按 80 ml/min 左右的流速灌流，待流出液体转清后停止（约 15 min），改用 37 ℃含钙离子的 0.05% Ⅳ型胶原酶，按 60 ml/min 流速进行第 2 步灌流。待肝细胞包膜下组织呈龟背状裂隙，剔除大块纤维、结缔组织，收集细胞置于 37 ℃水浴箱内振荡消化 10～15 min 后用 RPMI1640 培养液终止消化，经 200 目钢网或 3 层无菌纱布过滤，新鲜培养液重悬，4 ℃、50 × g 离心 3 min，重复 3 次。台盼蓝拒染实验判断细胞活率 >90% 者用于本实验。

1.4　聚砜膜实验前准备

实验前用聚砜膜中空纤维管缠绕洁净盖玻片制备聚砜膜膜片，75% 乙醇浸泡 24 h，接种细胞前用无热原生理盐水冲洗至符合细胞培养要求。

1.5　肝细胞的培养及分组

选用 6 孔培养板，实验组为聚砜膜膜片放入培养板铺垫整个孔底，环氧乙烷消毒；对照组为聚苯乙烯界面。将刚分离的肝细胞按 5×10^5/ml 的浓度分别接种于聚砜膜膜片和聚苯乙烯界面，用 RPMI1640 培养液加 10% 小牛血清，置 5% CO_2、37 ℃孵箱培养，每 24 小时换液 1 次，72 h 后结束实验。

1.6　形态观察

每天换液前后在倒置相差显微镜（Olympus IX-70）下观察 2 组肝细胞的生长情况及形态变化，培养 72 h 后，取出聚砜膜，2.5% 戊二醛固定，扫描电镜观察肝细胞形态及与聚砜膜附着情况。

1.7　肝细胞功能检测

1.7.1　白蛋白合成　　每 24 小时换液前留取上清液标本，ELISA 法测猪白蛋白浓度（美国 Bythyl 公司）。

1.7.2　尿素合成　　每 24 小时换液前留取上清液标本，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% 小牛血清的尿素浓度为本底，计算每 24 h 培养液上清中尿素的增加量为肝细胞的尿素合成量。

1.7.3　氯化铵清除　　在各组的培养液中再加入 1 mmol/L 氯化铵培养肝细胞，每 24 小时换液前留取上清液标本，用谷氨酸脱氢酶-紫外法（英国 Randox 公司）检测上清中氨的浓度。

1.7.4　酶漏出量　　每 24 小时换液前留取上清液标本，在日立-7020 型全自动生化分析仪上检测 AST 和 LDH 的水平。

1.8　统计学处理

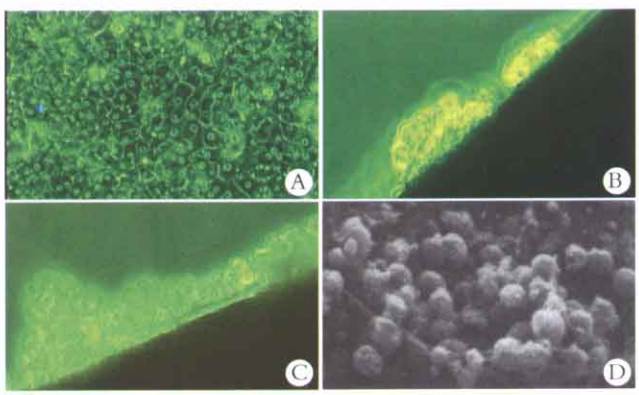
数据以 $x \pm s$ 表示，用软件 SPSS 11.0 进行方差分析和 t 检验。

2　结果

2.1　肝细胞的形态观察

对照组（聚苯乙烯界面）接种 4 h 乳猪肝细胞已开始有黏附，少量细胞贴壁伸展。12 h 大多数细胞已贴壁伸展，部分细胞可见双核。24 h 肝细胞呈集落状生长，增殖明显，多为典型的多边形形态，边界清晰，细胞质透亮。其后随着细胞的分裂增殖，细胞逐渐互相衔接，紧密相靠，连接成片。见图 1A。

实验组（聚砜膜界面）接种 4 h 乳猪肝细胞有不稳定的黏附。12 h 黏附细胞增多，部分有贴壁伸展，但伸展度较对照组明显小，多呈球形黏附。继续培养可见多细胞球形体集聚生长，大小不一。扫描电镜可见乳猪肝细胞形态规整，大小较均一，呈球型黏附、铺展，多个细胞聚集形成多细胞球形体。见图 1B、C、D。



A：聚苯乙烯界面培养 24 h（PCM × 200）；B：聚砜膜界面培养 12 h（PCM × 200）；C：聚砜膜界面培养 24 h（PCM × 200）；D：聚砜膜界面培养 72 h（SEM × 600）

图 1　猪肝细胞形态观察

2.2　白蛋白合成

在整个培养过程中，随着培养时间的继续，2 组的白蛋白合成量均有升高，聚砜膜界面培养肝细胞的白蛋白合成量显著高于对照组（$P < 0.05$），见图 2。

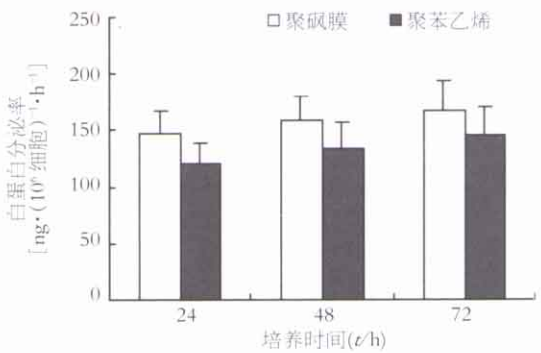


图 2　不同生物界面肝细胞白蛋白合成能力

2.3　尿素合成

在整个培养过程中，随着培养时间的继续，2 组的尿素合成

量均稍降低，聚砜膜界面培养肝细胞的尿素合成量均显著高于对照组（$P<0.05$），见图3。

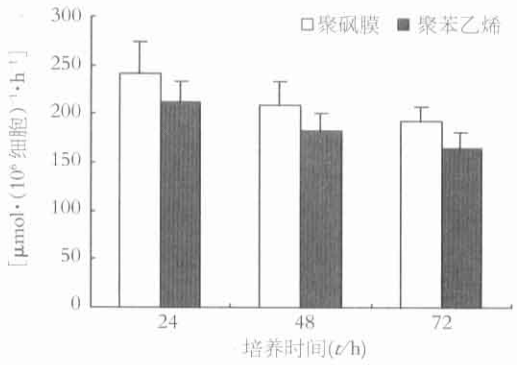


图3 不同生物界面肝细胞尿素合成能力

2.4 氯化铵清除

在整个培养过程中，随着培养时间的继续，2组肝细胞氯化铵清除率均略有降低，聚砜膜界面培养肝细胞的氯化铵清除率显著性高于对照组（$P<0.05$）。

2.5 酶漏出量

在72 h的培养过程中，实验组和对照组的肝细胞培养上清LDH的含量波动于13～33 IU/L，AST在7～25 IU/L之间波动。实验组和对照组肝细胞的LDH、AST含量无显著性差异（$P>0.05$）。

3 讨论

作为体外生物人工肝支持系统核心部分的生物反应器必须具有以下基本功能：一是为肝细胞提供良好的生长代谢环境；二是提供肝衰竭患者血液与肝细胞相互作用、进行物质交换提供理想的场所。具体的讲生物反应器的构建应考虑双向物质传输、保证肝细胞的活性与功能、具有良好的生物相容性和易于放大，可见与肝细胞生物相容性好的高分子材料界面是构建生物人工肝的关键。

出于安全考虑，大多数生物反应器采用膜材料将肝细胞与血液相隔离，目前使用最多的中空纤维反应器的半透膜就是从血液透析器移植而来的，所不同的是生物反应器膜材料的要求更高。聚砜膜是一种高分子聚合生物材料，以往较多应用于血液透析中的血浆分离器。有研究显示[3,4]其具有可加工性强、分子截留量合适、生物相容性好、不影响患者免疫功能等优点。但是在作为生物人工肝反应器膜材料方面，聚砜膜的细胞相容性及乳猪肝细胞在其生物界面上生长的合成、分泌、转化、解毒等功能还不清楚。

在本实验中，我们观察到在聚砜膜界面上生长的乳猪肝细胞形态规整，大小较均一，呈球型黏附、铺展，多个细胞聚集形成多细胞聚集体，而在聚苯乙烯界面的乳猪肝细胞则完全伸展、铺平，2组肝细胞黏附生长情况完全不同。有研究表明，生物材料的亲水性越高，其对蛋白质的吸附能力就越低，生物相容性就越高。聚砜膜的亲水性远高于聚苯乙烯，故乳猪肝细胞难以在聚砜膜界面伸展、铺平，乳猪肝细胞依靠自身的相互黏附，聚集形成多细胞聚集体，而多细胞聚集体则正是维持肝细胞高密度、大数量、高活性的肝细胞培养形式。Bartolo等[5]的研究中显示，在聚醚醚酮膜上生长的大鼠肝细胞聚集成多细胞聚集体，具有较高而稳定的合成、分泌、转化功能，较之单层培养肝细胞，白蛋白合成量有显著提高，这也和我们的研究结果相一致。

在实验时间里，在聚砜膜界面生长的乳猪肝细胞具有良好的白蛋白分泌功能，随着时间的延长，其白蛋白分泌量也有增加，均显著高于对照组，稳定且良好的白蛋白分泌水平也表示肝细胞具有较好的分化状态，本实验采用ELISA法测定猪白蛋白，较之以往考马斯亮蓝法和全自动生化分析仪检测法更为精确和特异。氯化铵的清除能力和尿素合成能力是判断肝细胞功能强弱的重要指标。该实验中，我们发现在聚砜膜界面生长的乳猪肝细胞具有较好的氯化铵清除率和尿素合成能力，虽然随着实验时间的延长，氯化铵清除率和尿素合成量略有下降，但较之对照组仍显著升高，这也正与生物反应器膜材料的要求一致。在72 h的实验时间里，2组肝细胞的LDH和AST在低水平波动，无显著性差异，说明酶漏出量较少，坏死肝细胞数量不多。

由以上实验结果可知，乳猪肝细胞能以较好的生长形态在聚砜膜上生长，具有良好的分泌、合成、转化、解毒功能，聚砜膜可以作为良好的生物人工肝反应器膜材料，进一步构建聚砜膜中空纤维管反应器。

参考文献：

[1] LEGALLAIS C, DAVID B, DORE E. Bioartificial livers (BAL): current technological aspects and future developments[J]. J Memb Sci, 2001, 181(1): 81-95.

[2] BORRA M, GALAVOTTI D, BELLINI C, *et al*. Advanced technology for extracorporeal liver support system devices[J]. Int J Artif Organs, 2002, 25(10): 939-949.

[3] GIRNDT M, SESTER M, SESTER U, *et al*. Molecular aspects of T- and B-cell function in uremia[J]. Kidney Int, 2001, 59(Suppl 78): S206-S211.

[4] CLARK W R, HAMBURGER R J, LYSAGHT M J. Effect of membrane composition and structure on solute removal and biocompatibility in hemodialysis[J]. Kidney Int, 1999, 56(6): 2005-2015.

[5] DE-BARTOLO L, MORELLI S, RENDE M, *et al*. New modified polyetheretherketone membrane for liver cell culture in biohybrid systems: adhesion and specific functions of isolated hepatocytes[J]. Biomaterials, 2004, 25(17): 3621-3629.

（编辑 周 芳）