文章编号:1000-5404(2006)11-1167-03

论著

多孔聚醚砜平板膜培养肝细胞的初步研究

刘 涛,王英杰,张世昌,陈 志,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 初步观察一种多孔聚醚砜平板膜上支持人肝细胞系L02细胞生长能力,探讨聚醚砜膜材料用于生物人工肝的可行性。**方法** 将正常人肝细胞系L02细胞接种在多孔聚醚砜平板膜片上,用倒置相差显微镜、激光共聚焦显微镜以及扫描电镜观察L02细胞在此种平板膜上的贴壁和生长情况。**结果** 倒置相差显微镜下可以观察到L02细胞能够在多孔聚醚砜平板膜较好生长,细胞培养到7 d时,细胞仍然保持良好生长增殖状态。激光共聚焦显微镜证实了该结果,且随着培养时间延长,细胞可呈多细胞聚集状态生长,保持活性。扫描电镜下膜表面微孔和微小孔结构得以观察,并能观察到部分细胞可以向微孔中延伸密集生长。**结论** 多孔聚醚砜平板膜能够有效的支持L02细胞在其表面生长,有望成为生物人工肝支持系统理想的生物支架材料。

关键词:聚醚砜;膜材料;细胞培养;生物人工肝
中图法分类号:R318.14;R322.47;R329.2 **文献标识码**:A

Culturing human hepatocyte L02 on porous polyether sulfone flat membrane

LIU Tao, WANG Ying-jie, ZHANG Shi-chang, CHEN Zhi, LIU Jun (Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 40038, China)

Abstract: Objective To examine the ability of a novel material of porous flat membrane made of polyether sulfone (PES) to support the growth of human hepatocyte L02. Methods Human hepatocyte L02 was added to PES fiber and then investigated for adherence, growth, spread and survival by invert phase contrast microscope, confocal laser scanning microscope and scanning electron microscope. Results Human hepatocyte L02 was seen growing well in porous PES flat membrane in 7 d. The results by confocal laser scanning microscope coincided with that by invert phase contrast microscope. With time prolonged, hepatocyte spheroids formed. Pores and micropores were observed by scanning electron microscope. Conclusion The PES flat membrane we used supported the growth of human hepatocyte L02 and may serve as a novel scaffolding biomaterial in bioartificial liver.

Key words: polyether sulfone; membrane material; cell culture; bioartificial liver

由半透膜材料制成的中空纤维是体外生物人工肝支持系统中生物反应器的关键材料,其性能既关系到肝细胞的生长和代谢功能,又关系到肝功能衰竭患者血液与肝细胞之间的相互物质传输和作用。因此,与生物人工肝对肝功能衰竭患者的支持治疗作用密切相关。目前实验研究与初步临床应用的中空纤维膜普遍存在通量较低、肝细胞培养欠佳两大不足,限制了生物人工肝功能的发挥[1]。本实验应用体外细胞培养和不同种类显微镜观察手段,对一种新的多孔聚醚砜平板膜支持培养肝细胞进行了初步的研究,旨在为生物人工肝制备性能优良的聚醚砜中空纤维反应器提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与生长条件

L02细胞由重庆医科大学附属第二医院惠赠,系正常人肝细胞株。细胞生长在含10%小牛血清的RPMI1640培养液中,在37 ℃,5% CO_2 孵箱里培养。小牛血清与RPMI1640培养液均为Hyclone公司产品。

1.2 多孔聚醚砜平板膜的制备与细胞接种

多孔聚醚砜平板膜由成都高分子材料研究所研制惠赠。使用前将多孔聚醚砜平板膜剪成边长2 cm×2 cm的膜片,70%的乙醇里浸泡12 h,PBS浸泡12 h。使用时再用无菌PBS全面冲洗3次,置入12孔培养板(Nuculon公司产品)中。将对数生长

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 Foundation for the Key Sci & Tech Research Project of Chongqing(2004AC5041)
作者简介:刘 涛(1977-),男,湖北省钟祥市人,硕士研究生,医师,主要从事生物人工肝及相关基础方面的研究。电话:(023)68754475
通讯作者:王英杰,电话:(023)68754475-8062
收稿日期:2005-11-14;修回日期:2006-03-14

期的L02细胞以 $4\times10^3/cm^2$ 密度接种到膜片。置入37℃,5% CO_2 孵箱里培养4 h,将所有平板膜移到含有新鲜培养基的12孔板中,继续培养,每天换液1次,10 d后结束实验。

1.3 膜材料与细胞生长情况观察方法

1.3.1 普通光镜 直接采用普通光学显微镜观察膜表面及微孔情况。

1.3.2 倒置显微镜 在细胞接种后的不同时间点,取出平板膜,PBS全面漂洗后,以2.5%戊二醛固定过夜,以4%台盼蓝染色后,在倒置显微镜下(Olympus Ⅸ-70)观察。在观察时,培养细胞面向下,将显微镜的电源关闭,以射灯光线投向纤维面,目镜观察。

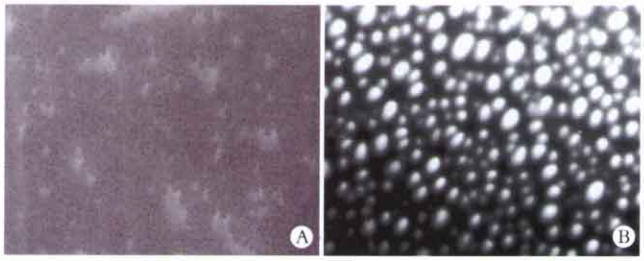
1.3.3 激光共聚焦显微镜 在细胞接种后的不同时间点,取出平板膜,PBS全面漂洗后,置入含有0.1 μmol/L Calcein-AM(Dojindo Laboratories, Japan)的培养基中,37 ℃孵育10~20 min。再将该块平板膜用固定于载玻片上,激光共聚焦显微镜(Olympus Ⅸ-71 FluoViewTM FV300)观察[2]。

1.3.4 扫描电镜 在细胞接种后的不同时间点,取出平板膜,PBS全面漂洗后,以2.5%戊二醛固定过夜,常规方法制备电镜标本,在扫描电镜(AMRAY MODEL 1000B)下观察。

2 结果

2.1 普通光镜观察

普通光学显微镜下直接观察平板膜可见,平板膜表面较为平整光滑,密布大小均匀的微孔。其中,一侧膜的孔径较小,表面欠平整光滑(图1A)。另一侧膜表面平整光滑,孔径较大,开大显微镜的光源亮度,由于微孔对光线的衍射作用,微孔显得更大(图1B)。根据实验目的和要求,表面平整光滑和孔径较大的一侧定为细胞培养面。



A:普通光镜下膜表面及微孔;B:开大光镜光源所见膜表面微孔

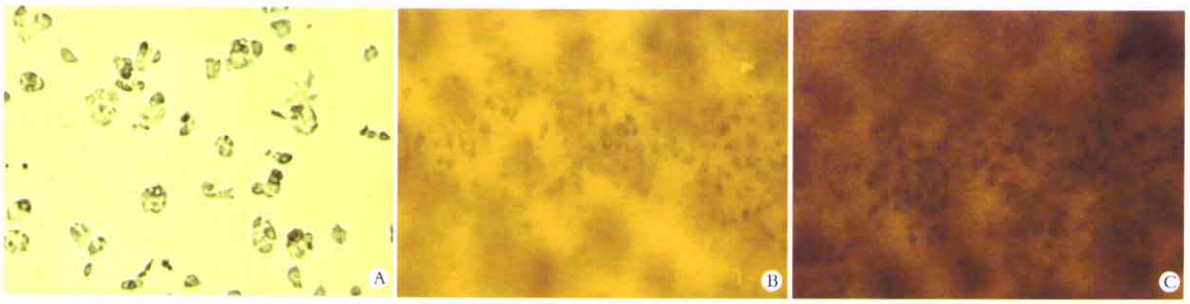
图1 聚醚砜平板膜外观图 (LM×100)

2.2 倒置相差显微镜观察

接种2 d后的细胞(图2A)与直接接种在12孔板中的细胞相比,L02细胞更能良好的贴壁生长,均匀分布,生长良好(图2B)。培养到第7天,L02细胞密度增加,生长旺盛,细胞呈典型的宽梭形状。图2B、C中稍暗模糊的是微孔开口。

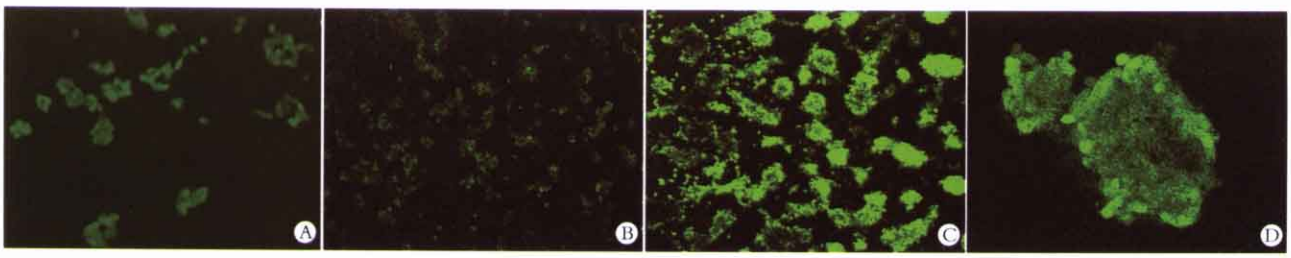
2.3 激光共聚焦显微镜观察

采用激光共聚焦显微镜定期观察的结果与倒置相差显微镜观察相似。接种细胞2 d后,相比于直接接种于12孔板中的细胞(图3A),聚醚砜平板膜上的L02细胞更能良好的贴壁生长,贴壁细胞生长的活细胞呈现绿色,生长良好(图3B)。培养到第7天,L02细胞仍然生长旺盛(图3C)。随着培养时间的延长,细胞大多呈多细胞聚集状态,并保持活性(图3D)。



A:L02细胞在聚苯乙烯板上生长;B:L02细胞在聚醚砜平板膜上生长2 d;C:L02细胞在聚醚砜平板膜上生长7 d

图2 L02细胞培养不同时间的生长情况 (倒置显微镜×150)

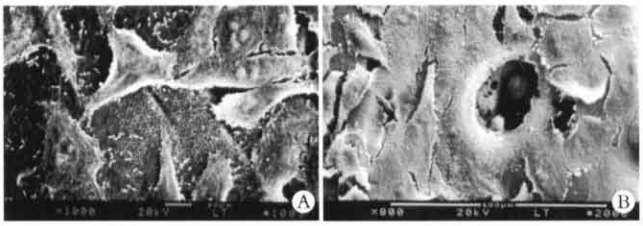


A:L02细胞在普通12孔板生长2 d (×100);B、C、D:分别为L02细胞在聚醚砜平板膜上培养2 d(×100)、7 d(×100)、10 d(×200)

图3 激光共聚焦显微镜观察培养不同时间的L02细胞

2.4　扫描电镜观察

在扫描电镜下能更清楚的看到细胞生长情况和膜表面结构。通过接种 L02 细胞在纤维膜表面培养 2 d 后，可见 L02 细胞在其上面贴壁生长，成典型的 L02 的宽梭形形态，均匀分布，细胞膜伸展，呈现良好的增殖状态，微孔之间的膜可见直径约 0.2 μm的微小孔密布（图 4A）。随着培养时间的延长，细胞生长紧密，几乎覆盖膜材料表面，不能分清单个细胞，能见到部分 L02 细胞也可向平板膜上的微孔中延伸密集生长（图 4B）。



A：L02 生长 2 d　（×1 000）；B：L02 生长 7 d　（×800）

图 4　扫描电镜观察聚醚砜平板膜上培养 L02 细胞

3　讨论

随着生物人工肝研究的不断深入，围绕着为肝细胞提供良好的生长、代谢环境和为肝衰竭患者血液或血浆与肝细胞相互作用、进行物质交换提供理想的场所两大基本功能，新的生物反应器支架材料的研究愈来愈受到重视。本研究中采用的聚醚砜材料，具有较好的生物相容性，已经广泛应用于血液净化、组织工程等领域，许多组织细胞可在其上很好的贴壁、生长[3]。然而在支持肝细胞生长方面尚罕见报道。多孔支架材料由于其表面存在适当大小的微孔样结构，细胞可以向孔状结构中蔓延生长形成 3D 组织，展示良好的应用前景[4]。

我们初步探讨了一种新型的多孔聚醚砜平板膜材料支持肝细胞生长的能力。采用 3 种不同的观察方法从不同角度观察了聚醚砜平板膜的形态特点和肝细胞系 L02 细胞在其表面生长的情况，都展示 L02 细胞在其表面不仅能够贴壁生长，而且生长情况良好。该膜分光滑面和粗糙面，光滑面微孔较粗糙面孔径大，为细胞培养面。倒置相差显微镜下侧光观察到 L02 细胞在该纤维膜贴壁生长情况，与普通 12 孔板相比，细胞生长状态更佳，展示了该材料良好的生物相容性和支持成人肝细胞系 L02 生长能力。激光共聚焦显微镜为观察活细胞和细胞生长的立体空间结构特点提供了可能。观察前对样本进行 Calcein-AM 处理，Calcein-AM 是一种细胞质荧光标记物，本身无荧光，进入活细胞后细胞内酯酶催化生成的水溶性绿色荧光物质不易透出细胞，它只能对活细胞染色，呈现绿色。从而直观观察到活着的 L02 细胞在聚醚砜平板膜生长情况良好，在培养 7 d 时，仍然保持旺盛的生长活性，随着时间的延长，细胞呈多细胞聚集状态，保持活性。研究表明，肝细胞球形聚集体的形成有利于肝细胞功能的发挥[5]。扫描电镜进一步证实了以上观察结果，而且可以观察到该材料微孔之间的膜密布直径约 0.2 μm 的微小孔，该直径大小保证了膜的对肝细胞与患者血清的分离作用和双向物质交换能力，同时也可观察随培养时间延长，在膜表面上的生长的细胞部分可以向微孔中延伸生长，这种微孔的存在增加了细胞的生长空间和面积，同时可能局部形成微肝组织样结构。该平板膜与以往的中空纤维材料的优点在于能很好支持细胞生长，并通过膜上的多孔结构，增加细胞生长空间，增加球形聚集体形成的可能，提高物质交换能力。

以上研究结果显示，新型聚醚砜多孔平面膜与成人肝细胞系 L02 有良好的生物相容性，并具有良好的支持 L02 贴壁生长能力，其表面的多孔表面结构可以为 L02 细胞在其上生长提供较大的生长空间。其前景在于可以在截留分子量不变的情况下，制备传输效率更高，支持细胞生长空间更大，支持肝细胞生长能力更强的中空纤维膜材料。由于其良好的生物相容性和多孔支架结构，亦有望成为肝细胞移植的理想支架材料。对在其上生长的肝细胞的细胞功能评价以及物质传输的动力学研究正在进一步的探索中。

参考文献：

[1] PLANCHAMP C, VU T L, MAYER J M, *et al*. Hepatocyte hollow-fibre bioreactors: design, set-up, validation and applications[J]. J Pharm Pharmacol, 2003, 55(9): 1181 - 1198.

[2] PETERS K, SCHMIDT H, UNGER R E, *et al*. Software-supported image quantification of angiogenesis in an *in vitro* culture system: application to studies of biocompatibility[J]. Biomaterials, 2002, 23(16): 3413 - 3419.

[3] UNGER R E, HUANG Q, PETERS K, *et al*. Growth of human cells on polyethersulfone (PES) hollow fiber membranes[J]. Biomaterials, 2005, 26(14): 1877 - 1884.

[4] HUTMACHER D W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage[J]. Biomaterials, 2000, 21(24): 2529 - 2543.

[5] HASEBE Y, OKUMURA N, KOH T, *et al*. Formation of rat hepatocyte spheroids on agarose[J]. Hepatol Res, 2005, 32: 89 - 95.

（编辑　张大春）