文章编号:1000-5404(2007)24-2307-04

论著

乳猪肝细胞的生物学特性观察

张世昌,王英杰,陈 志,刘 涛,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 从细胞数量和细胞功能上探讨乳猪肝细胞用于生物人工肝的可行性。**方法** 采用RPMI1640培养液37 ℃培养分离的乳猪肝细胞,观察乳猪肝细胞生长和增殖特征,检测乳猪肝细胞白蛋白合成、尿素合成、氨清除量、细胞色素P450(cytochrome P450,CYP)和葡萄糖醛酸基转移酶(UDP-glucuronyl transferases,UGT)活性。**结果** 在7 d的培养过程中,乳猪肝细胞呈典型的多角形,至少可增殖7倍以上,细胞生长曲线无明显潜伏期;乳猪肝细胞白蛋白和尿素合成量分别在130 ng·10^{-6}cells·h^{-1}和150 μmol·10^{-6}cells·h^{-1}以上,氨清除量和UGT活性在第3天较第1天显著下降($P<0.05$),其后基本维持稳定,CYP活性逐渐下降。**结论** 体外分离培养的乳猪肝细胞具有较强的增殖能力、合成功能和生物转化功能,能够为生物人工肝提供大量高活性的肝细胞。

关键词: 乳猪;肝细胞;生物人工肝

中图法分类号: R332;R322.47;R329.2 **文献标识码:** A

Biological characteristics of suckling porcine hepatocytes for bioartificial liver

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

Abstract: Objective To evaluate the applicability of suckling porcine hepatocytes to the bioartificial liver in cellular quantity and function. **Methods** The isolated porcine hepatocytes were cultivated by RPMI1640 medium at 37 ℃ *in vitro*. The characteristics of the proliferating and growing suckling porcine hepatocytes were observed. Their synthesis of albumin and urea was detected. Their clearance of ammonia and activities of cytochrome P450 (CYP) and UDP-glucuronyl transferases (UGT) were analyzed. **Results** The growth curve of suckling porcine hepatocytes showed an obvious exponential phase of cell growth and stationary phase. There was no marked stage of latency in the growth curve. Seven-fold proliferation of suckling porcine hepatocytes were found in the cultivation period of 7 days. The functional capacity of hepatocytes (10^6 cells) was above 130 ng/h and 150 μmol/h for albumin and urea excretion, respectively. The clearance of ammonia and the activities of UGT significantly decreased at culture days 1 and 3 ($P<0.05$), and maintained stably later. The activities of CYP decreased continuously duiring 7-day culture. **Conclusion** The suckling porcine hepatocytes have good proliferation abilities and biotransformation function, which could provide a great quantity and high activity of hepatocytes for bioartificial liver.

Key words: suckling porcine; hepatocytes; bioartificial liver

肝细胞是体外生物人工肝支持系统(简称生物人工肝,bioartificial liver, BAL)的核心材料,BAL对肝功能衰竭患者的肝支持作用几乎完全依赖于所用肝细胞的生物学功能[1]。由于人肝细胞来源的匮乏、胎肝细胞的伦理问题、肝细胞株的瘤源性、干细胞尚处于研究阶段等原因[2,3],寻找新的肝细胞来源已成为BAL研究的重要内容之一。本研究旨在观察乳猪肝细胞的生长特性、合成功能、生物转化功能等,以评价乳猪肝细

基金项目: 国家自然科学基金(30470458);重庆市重点攻关项目(2004AC5041) Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470458) and the Sci & Tech Research Project of Chongqing (2004AC5041)

作者简介: 张世昌(1975-),男,湖北省随州市人,博士研究生,主管技师,主要从事生物人工肝及肝组织工程方面的研究。电话:(023)68754475

通讯作者: 王英杰,电话:(023)68754475-8062,E-mail: yingjiewng@yahoo.com.cm

收稿日期: 2007-07-02;**修回日期:** 2007-09-20

胞是否能够满足 BAL 对肝细胞材料的大量高活性的要求，为乳猪肝细胞应用于生物人工肝提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

用于分离肝细胞的实验动物为中国实验小型猪 4 只，由本校实验动物中心提供，均为新生 1 ~ 7 d 的乳猪，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、7-甲氧基-试卤灵、试卤灵、P-硝基苯酚、β-葡萄糖醛酸酶、酰基硫酸酯酶均由 Sigma 公司提供；培养瓶、培养板、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；猪白蛋白 ELISA 检测试剂盒购自美国 Bythyl 公司，尿素和氨检测试剂盒购自英国 Randox 公司。

1.2 肝细胞的分离和培养

腹腔注射戊巴比妥钠（30 mg/kg）麻醉新生中国实验小型猪。常规方法消毒皮肤，开腹，暴露门静脉并注入肝素钠 100 ~ 150 U/L，游离肝脏，并于肝门处剪下取出，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、3 min 离心洗涤肝细胞 3 ~4 次，获得肝细胞。台盼蓝拒染试验判断细胞活率 > 90% 者用于实验。将新分离的乳猪肝细胞悬液按 2×10^5/ml 浓度等量加入 6 孔培养板，用含 10% 新生小牛血清的 RPMI1640 培养液于 37 ℃，5% CO_2 培养箱培养 7 d，每 24 小时更换培养液，观察肝细胞的生长代谢特性。

1.3 倒置相差显微镜观察细胞形态

从培养 4 h 开始，每天换液前后在倒置相差显微镜（Olympus Ⅸ-70）下观察乳猪肝细胞的生长情况和形态变化，并通过显微摄像记录。

1.4 乳猪肝细胞生长曲线的测定

每隔 24 h 吸去 3 个孔的培养液，用胰蛋白酶消化液消化，制成单个肝细胞悬液，用血细胞计数池在显微镜下计数细胞数目，得出细胞浓度平均值。以培养时间为横坐标，细胞浓度为纵坐标，绘制乳猪肝细胞生长曲线。

1.5 乳猪肝细胞合成功能的测定

从接种细胞开始，每隔 24 h 分别收集乳猪肝细胞培养液上清，用特异性猪白蛋白抗体 ELISA 法检测乳猪肝细胞培养上清中猪白蛋白含量；在收集培养液上清的同时收集含 10% 新生小牛血清的培养液作为本底，用脲酶-波氏比色法分别检测培养液上清和本底中尿素的含量，上清中尿素含量减去本底中尿素含量即为每天乳猪肝细胞的尿素合成量。

1.6 乳猪肝细胞生物转化功能的测定

1.6.1 氨清除量　在乳猪肝细胞 7 d 的培养过程中，每天各取 3 孔细胞，PBS 洗 3 遍，加含 5 mmol/L 氯化铵无血清 RPMI1640 培养液培养 4 h，收集培养液上清。用谷氨酸脱氢酶-紫外法检测上清中氨的浓度。

1.6.2 细胞色素 P450（Cytchrome P450，CYP）活性　利用肝细胞能够将 7-甲氧基-试卤灵（7-methoxyresorufin）转化为具有荧光的试卤灵（resorufin）检测肝细胞 CYP 的活性。每天各取取 3 孔细胞，PBS 洗 3 遍，加含 10 μmol/L 7-甲氧基-试卤灵的底物液 2 ml，孵育 30 min，收集培养液上清。取 450 μl 培养液上清加 150 μl 含 600 U/L β-葡萄糖醛酸酶和 4 800 U/L 酰基硫酸酯酶的酶液，37 ℃振荡 2 h，加 1.2 ml 乙醇，3 000 r/min 离心 10 min，用荧光分光光度计在吸收波长 530 nm，发射波长 590 nm下比色测得吸光度值。并用相同步骤处理不同浓度的试卤灵，绘制标准曲线。根据样本吸光度值，从标准曲线中查得试卤灵浓度。

1.6.3 UGT 活性测定　P-硝基苯酚在波长 405 nm 下具有最大吸收峰，与葡萄糖醛酸基结合后在 405 nm 没有吸收峰，因此，利用肝细胞的 UGT 使 P-硝基苯酚与葡萄糖醛酸基结合后，P-硝基苯酚的减少检测 UGT 的活性。每天取 3 孔细胞，PBS 洗 3 遍，加含 1 mmol/L PNP 底物溶液（另含 5 mmol/L UDPGA、100 μmol/L 水杨酰胺、1 mmol/L 吡啶）2 ml，孵育 60 min，收集培养液上清。取 200 μl 培养液上清加 3.8 ml NaOH（0.1 mol/L）终止反应，用酶标仪 405 nm 波长下比色测吸光度值 D（405）。并用相同步骤处理不同浓度的 P-硝基苯酚，绘制标准曲线。根据样本 D（405），从标准曲线中查得 P-硝基苯酚的浓度。

1.7 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，使用 Excel 2000 和 SPSS 12.0 统计软件进行 t 检验和 u 检验。

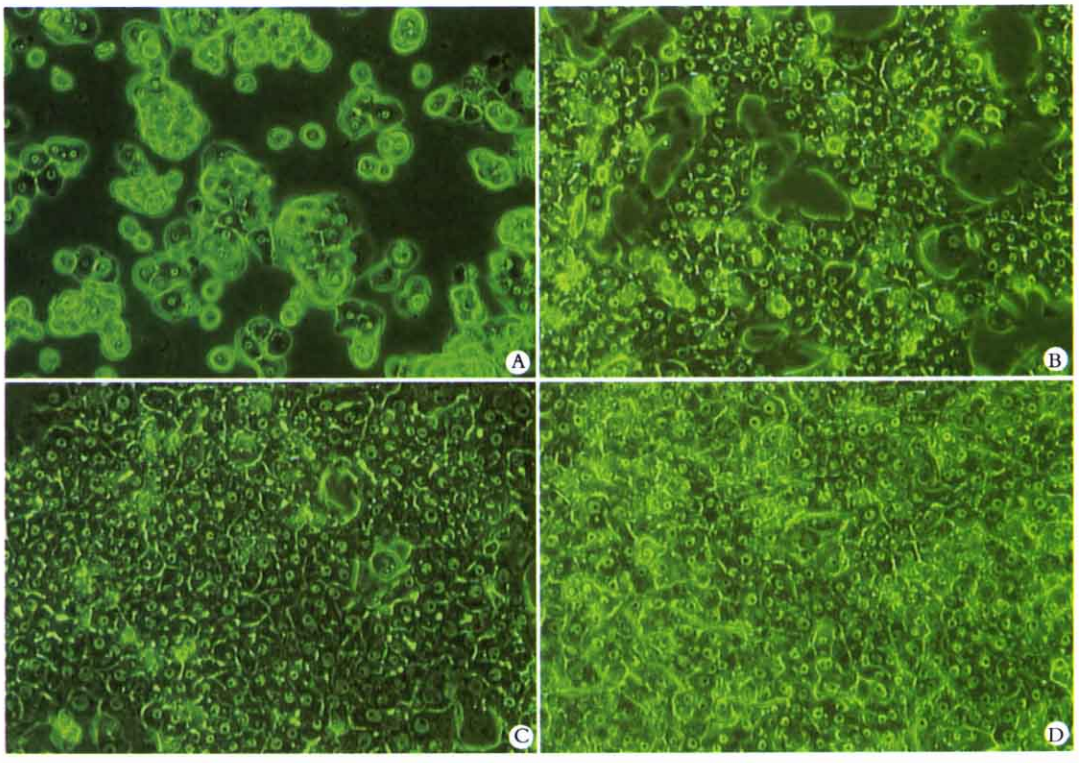
2 结果

2.1 培养乳猪肝细胞形态观察

倒置显微镜下观察乳猪肝细胞在接种 4 h 后基本贴壁，细胞多呈圆形，细胞核明显并见少量双核细胞（图 1A）。1 d 后乳猪肝细胞完全贴壁并伸展开，体积明显增大，可见许多双核细胞，呈条索样生长，细胞数量增殖明显，尽显典型的、较均匀一致的多角形形态特征；肝细胞与肝细胞之间的边界清晰、明亮，提示有微胆管形成（图 1B）。2 d 后细胞增殖较快，细胞维持典型的多角形（图 1C）。第 7 天有细胞已经长满整个培养板，细胞之间的边界依然清晰、明亮（图 1D）。

2.2 乳猪肝细胞生长曲线

乳猪肝细胞在 7 d 的培养过程中，可增殖至少 7 倍以上。乳猪肝细胞在接种贴壁后即开始增殖，未见明显的潜伏期；在 1 ~3 d 细胞增殖迅速，表现为明显的对数生长期；在 4 d 后细胞增殖缓慢，进入停滞期（图 2）。



A：4 h；B：1 d；C：2 d；D：7 d

图 1　培养乳猪肝细胞的形态（倒置相差显微镜 ×200）

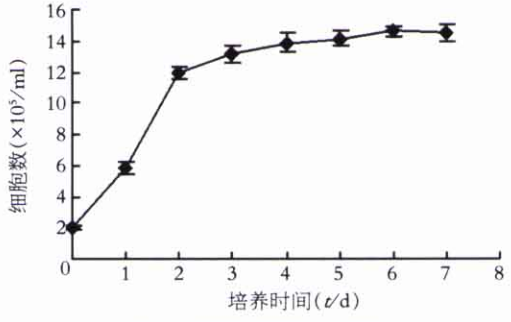


图 2　乳猪肝细胞生长曲线

2.3　乳猪肝细胞合成功能的变化

在 7 d 的培养过程中，乳猪肝细胞白蛋白合成量在 130 ~ 145 ng · 10^{-6}cells · h^{-1}之间维持稳定，各天之间无显著性差异（$P>0.05$，表 1）。尿素合成量在前 3 d 维持稳定，在第 5 天和第 7 天显著低于第 1 天（$P<0.01$），但均在 150 μmol · 10^{-6} cells · h^{-1}以上，仍具有较高水平（表 1）。

表 1　培养乳猪肝细胞白蛋白和尿素合成量变化（$\bar{x}\pm s$）

培养时间	白蛋白合成量（ng · 10^{-6}cells · h^{-1}）	尿素合成量（μmol · 10^{-6}cells · h^{-1}）
1 d	140.0 ± 12.9	237.9 ± 10.1
3 d	132.1 ± 8.1	226.9 ± 15.3
5 d	142.4 ± 6.8	185.7 ± 16.4^{ab}
7 d	134.3 ± 16.4	150.5 ± 11.8^{ab}

a：$P<0.01$，与 1 d 比较；b：$P<0.01$，与 3 d 比较

2.4　乳猪肝细胞生物转化功能

在培养过程中，乳猪肝细胞氨清除量在第 3 天较第 1 天显著下降（$P<0.05$），其后维持稳定；乳猪肝细胞 CYP 活性在培养过程中逐渐降低，但在第 7 天仍具有第 1 天的 50%；乳猪肝细胞 UGT 活性在第 3 天较第 1 天显著下降（$P<0.01$），在第 3、5、7 天基本维持稳定（$P>0.05$，表 2）。

表 2　培养乳猪肝细胞生物转化功能的变化（$\bar{x}\pm s$）

培养时间	氨清除量（μmol · 10^{-6}cells · h^{-1}）	CYP 活性（nmol · 10^{-6}cells · h^{-1}）	UGT 活性（nmol · 10^{-6}cells · h^{-1}）
1 d	107.4 ± 6.2	227.5 ± 10.3	154.9 ± 14.2
3 d	93.3 ± 5.1^{a}	160.6 ± 11.4^{b}	119.6 ± 9.4^{b}
5 d	90.8 ± 8.4^{b}	111.2 ± 9.6^{bc}	92.3 ± 12.7^{b}
7 d	82.6 ± 9.3^{b}	108.8 ± 11.9^{bc}	100.2 ± 21.5^{b}

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 1 d 比较；c：$P<0.01$，与 3 d 比较

3　讨论

多年来，国内外学者长期致力于 BAL 的研究[1,2,4]，以期为肝功能衰竭患者等待肝移植或通过自身肝再生恢复提供过渡的“桥梁”。由于猪肝细胞来源广泛、价格低廉、可操作性强，特别是猪肝细胞的生理和代谢功能与人肝细胞最为接近[5]，同时随着半透隔膜的使用和无 α-1，3-半乳糖基转移酶转基因猪的产生，能有效地减轻免疫反应[6,7]，使之成为 BAL 研究应用最多的肝细胞，成功的临床报道愈来愈多，并已进入Ⅱ/Ⅲ期临床研究[2,4]。近年来研究显示[8,9]，乳猪肝细胞拥有比成年猪肝细胞更好的分离效果和培养特性，但迄今为止，对分离培养的乳猪肝细胞的生长代谢功能等知之甚少。用于 BAL 的肝细胞要求量大、高活性，并且容易获得，才能有效的发挥肝支持作用。因此，评价乳猪肝

细胞能否满足上述要求是其应用于 BAL 的基础。

生物人工肝要求肝细胞数量达到整个肝脏肝细胞总量的 10%～20%（2×10^{10}～6×10^{10}个肝细胞）。本实验结果显示，在普通培养液无细胞因子刺激的情况下，乳猪肝细胞仍可增殖 7 倍以上，并呈典型的多角形，提示乳猪肝细胞具有较强的增殖能力。在我们以往的研究中分离乳猪肝细胞的数量为 3.8×10^{9}～4.7×10^{9}，细胞活力为 94%～98%[8]。说明在体外培养乳猪肝细胞的数量达到 3×10^{10} 个以上，完全能够满足 BAL 对肝细胞数量的要求。细胞生长曲线反映细胞的生物学特性，每代细胞的生长过程大致可以分为潜伏期、对数生长期和停滞期或平台期。本实验证实乳猪肝细胞生长曲线无明显的潜伏期，这可能是由于乳猪肝组织含有的结缔组织较少，细胞消化分离过程对乳猪肝细胞损伤作用较小，乳猪肝细胞能够很快适应新环境，在接种后能够迅速增殖，进一步证实了乳猪肝细胞有良好的分离和培养效果。因此，分离的乳猪肝细胞有可能通过短期培养增殖为 BAL 提供大量的肝细胞。

提供高活性的肝细胞是 BAL 治疗肝功能衰竭患者的关键。肝细胞承担着正常肝脏大部分主要而又复杂的生理功能，肝功能衰竭患者需要的正是 BAL 中的肝细胞为其提供白蛋白、凝血因子、尿素、葡萄糖等生物合成功能和完成对内源性或外源性异常物质的生物转化功能。白蛋白和尿素合成是反映肝细胞生物合成功能的重要指标。在 1 周的培养时间内，乳猪肝细胞的合成能力基本维持稳定，特别在 1～3 d 肝细胞的白蛋白和尿素合成总体上维持在较高水平，说明乳猪肝细胞具有较强的生物合成功能。Garkavenko 等[9]的研究结果显示，乳猪肝细胞白蛋白合成总量呈上升趋势，但肝细胞数增殖较快。我们根据他们给出乳猪肝细胞的数量，将白蛋白合成量换算到每个肝细胞上，其结果与本实验结果基本一致。肝细胞的解毒功能主要依靠生物转化反应，生物转化过程可归纳为两相反应，Ⅰ相反应包括氧化、还原、水解反应，Ⅱ相反应主要是结合反应。体内的苯二氮、苯乙醇胺、药物等物质的代谢正是通过这些反应清除，以避免肝性脑病的发生，其中细胞色素 P450 系统（CYP）和葡萄糖醛酸基转移酶（UGT）分别是参与Ⅰ相反应和Ⅱ相反应的重要酶类，有报道认为 7-甲氧基-试卤灵的去甲氧基化和 P-硝基苯酚的结合反应能较好地评价肝细胞 CYP 和 UGT 的活性[10]。我们证实在 7 d 的培养时间内，乳猪肝细胞有较高的 CYP 和 UGT 活性，这与 Langsch 等[11]研究认为猪肝细胞有较高的生物转化功能一致。本实验还发现乳猪肝细胞的 CYP 活性在前几天的培养过程中有显著下降，这与大多数报道一致，他们认为在适当的诱导剂的作用下，体外培养的肝细胞 CYP 活性能够迅速恢复。高血氨是诱发肝功能衰竭患者发生肝性脑病的重要因素，故氨清除量就成为评价 BAL 肝支持治疗作用的重要指标。本实验中乳猪肝细胞能够有效地清除氯化铵，并且在 7 d 内维持较高水平。与大多数肝细胞株完全没有氨清除能力和极低的生物转化水平相比，乳猪肝细胞更适宜为 BAL 提供高活性的肝细胞材料。

综上所述，无论是从肝细胞数量上讲，还是从细胞功能上讲，体外分离培养的乳猪肝细胞均能够为 BAL 提供大量和高活性的肝细胞，特别是在培养的第 3～4 天，细胞增殖到达停滞期，细胞合成功能和生物转化功能维持在较高水平，适合用于 BAL 治疗肝功能衰竭患者。但乳猪肝细胞作为异种肝细胞用于 BAL，在免疫反应和内源性逆转录病毒方面还需要进一步研究。

参考文献：

[1] Morsiani E, Brogli M, Galavotti D, *et al*. Biologic liver support: optimal cell source and mass[J]. Int J Artif Organs, 2002, 25(10): 985-993.

[2] Poyck P P, Pless G, Hoekstra R, *et al*. *In vitro* comparison of two bioartificial liver support systems: MELS Cell Module and AMC-BAL[J]. Int J Artif Organs, 2007, 30(3): 183-191.

[3] Soto-Gutierrez A, Kobayashi N, Rivas-Carrillo J D, *et al*. Reversal of mouse hepatic failure using an implanted liver-assist device containing ES cell-derived hepatocytes[J]. Nat Biotechnol, 2006, 24(11): 1412-1419.

[4] 王英杰，何念海，刘 俊，等. 用猪肝细胞型混合生物人工肝支持系统治疗肝衰竭的初步研究[J]. 第三军医大学学报，2003，25(6)：484-486.

[5] Gerlach J C, Zeilinger K, Sauer I M, *et al*. Extracorporeal liver support: porcine or human cell based systems? [J]. Int J Artif Organs, 2002, 25(10): 1013-1018.

[6] Matsushita T, Amiot B, Hardin J, *et al*. Membrane pore size impacts performance of a xenogeneic bioartificial liver[J]. Transplantation, 2003, 76(9): 1299-1305.

[7] Phelps C J, Koike C, Vaught T D, *et al*. Production of alpha-1, 3-galactosyltransferase-deficient pigs[J]. Science, 2003, 299(5605): 411-414.

[8] 王英杰，刘国栋，刘 俊，等. 大量分离乳猪肝细胞的方法[J]. 世界华人消化杂志，1999，7(8)：661-662.

[9] Garkavenko O, Emerich D F, Muzina M, *et al*. Xenotransplantation of neonatal porcine liver cells[J]. Transplant Proc, 2005, 37(1): 477-480.

[10] Kim D, Guengerich F P. Enhancement of 7-methoxyresorufin O-demethylation activity of human cytochrome P450 1A2 by molecular breeding[J]. Arch Biochem Biophys, 2004, 432(1): 102-108.

[11] Langsch A, Bader A. Longterm stability of phase Ⅰ and phase Ⅱ enzymes of porcine liver cells in flat membrane bioreactors[J]. Biotechnol Bioeng, 2001, 76(2): 115-125.

（编辑 栾 嘉）