论著

文章编号:1000-5404(2010)16-1720-04

零下非结冰 UW 液成功保存生物人工肝用 L-02 肝细胞

蒋知新[1],李庆勇[1,2],张清华[1],沙 杭[1],李安全[1],林 虎[1],王丽丽[1],高 毅[3] (100017 北京,解放军305医院老年病中心[1];510515 广州,南方医科大学研究生院[2];510253 广州,南方医科大学珠江医院肝胆二科[3])

【摘要】 **目的** 比较零下非结冰(-0.8 ℃)与常规低温(4 ℃)分别用于人工肝用永生化 L-02 细胞保存的效果,探索零下非结冰保存肝细胞与细胞凋亡的关系。**方法** 制备好的 UW 液保存的 L-02 细胞悬液分为以下2组:-0.8 ℃组(零下非结冰组),4 ℃组(对照组)。低温保存24、48 h及72 h后,分别测定细胞存活率、凋亡率、坏死率(流式细胞术)及ALT释放、尿素合成功能、白蛋白分泌功能。**结果** -0.8 ℃(零下非结冰)较4 ℃明显提高了长时间低温保存 L-02 细胞的存活率[72 h:(70.17±2.82)% *vs* (60.05±3.17)%,$P<0.01$],降低了细胞凋亡率[72 h:(5.73±1.68)% *vs* (9.20±2.35)%,$P=0.02$],抑制了 ALT 释放[72 h:(6.21±0.65) U/L *vs* (8.68±1.18) U/L,$P<0.01$],更好地维持了L-02 细胞的尿素合成功能[72 h:(1.01±0.14) mmol/L *vs* (0.66±0.09) mmol/L,$P<0.01$]及白蛋白分泌功能[72 h:(9.04±0.53) μg/ml *vs* (7.70±0.52) μg/ml,$P<0.01$]。2组间细胞坏死率差异无统计学意义[72 h:(18.45±1.88)% *vs* (21.82±3.86)%,$P>0.05$]。**结论** 零下非结冰可明显维持 L-02 细胞存活率,降低低温损伤引起的细胞凋亡,有效保护肝细胞尿素合成和白蛋白分泌功能。

【关键词】 生物人工肝;零下非结冰;细胞凋亡

【中图法分类号】 R322.47;R329 【文献标志码】 A

Storage of L-02 hepatocytes for bioartificial liver in UW solution at non-freezing points below zero

Jiang Zhixin[1], Li Qingyong[1,2], Zhang Qinghua[1], Sha Hang[1], Li Anquan[1], Lin Hu[1], Wang Lili[1], Gao Yi[3] ([1]Department of Gerontology, No. 305 Hospital of PLA, Beijing, 100017; [2]College of Postgraduate, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510515; [3]Department of Hepatobiliary Surgery (Division Ⅱ), Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510253, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the effect of subzero nonfreezing storage temperature (-0.8 ℃) compared with that of conventional hypothermic storage temperature (4 ℃) for L-02 hepatocytes in UW solution in bioartificial liver support system (BLASS) and the relationship of this storage with cells apoptosis. **Methods** L-02 hepatocytes suspended in UW solution were divided into the following 2 groups, subzero nonfreezing group (-0.8 ℃) and control group (4 ℃). After 24, 48 and 72 h of hypothermic storage, the cell viability and cell apoptosis were measured with flow cytometry. Alanine transferase (ALT) release, the ability of hepatocytes to synthesize urea and secrete albumin were also studied. **Results** Significant improvement of cell viability was observed in subzero nonfreezing group compared with that in the control group [72 h: (70.17±2.82)% *vs* (60.05±3.17)%, $P<0.01$]. Cell apoptosis was inhibited in subzero nonfreezing group [72 h: (5.73±1.68)% *vs* (9.20±2.35)%, $P=0.02$], and so did ALT secretion [72 h: (6.21±0.65) U/L *vs* (8.68±1.18) U/L, $P<0.01$]. The ability of hepatocytes to synthesize urea [72 h: (1.01±0.14) mmol/L *vs* (0.66±0.09) mmol/L, $P<0.01$] and to secrete albumin [72 h: (9.04±0.53) μg/ml *vs* (7.70±0.52) μg/ml, $P<0.01$] were also better maintained in subzero nonfreezing group. There was no difference between the 2 groups in the cellular necrosis rate [72 h: (18.45±1.88)% *vs* (21.82±3.86)%, $P>0.05$]. **Conclusion** Subzero nonfreezing storage (-0.8 ℃) of L-02 hepatocytes in UW solution provides bet-

【基金项目】 全军医学科研"十一五"计划专项课题(08Z0170);国家高技术研究发展计划(863计划,2006AA02A141)

【通信作者】 张清华,电话:(010)63096916,E-mail:mdlqy@yahoo.com.cn

ter cell viability and abilities of hepatocytes to synthesize urea and secrete albumin, and lower cell apoptosis. Subzero nonfreezing storage (-0.8 ℃) of hepatocytes and constructing a "ready to use" hepatocytes bank will efficiently promote the development of the BLASS.

[Key words] bioartificial liver support system; subzero nonfreezing; cell apoptosis

Supported by the Special Fund of "Eleventh Five-year" Plan for Medical Research of PLA (08Z017), and the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2006AA02A141). Corresponding author: Zhang Qinghua, Tel: 86-10-63096916, E-mail: mdlqy@yahoo.com.cn

生物人工肝(bioartificial liver support system, BALSS)的发展为急性肝功能衰竭的治疗开辟了新的途径,而高质量的肝细胞是 BALSS 的核心,所以探索出一种可靠的肝细胞保存方法并建立一个肝细胞库是 BALSS 推广的基础[1]。温度是影响低温保存效果的关键因素,一般而言温度越低细胞代谢活性就越低,保存时间就越长[2]。零下非结冰温度(subzero nonfreezing temperature, SZNFT)是指 0 ℃到某溶液冰点之间的温度范围,一方面可使代谢降至最低不同于常规低温(4 ℃)保存,另一方面可以避免深低温(-196 ℃)冻存引起的"细胞内冰晶"、"渗透性休克"等冻存损伤[3]。理论上零下非结冰是一种理想的细胞保存形式[4],因此本研究将用 UW 液(冰点 -1 ℃)-0.8 ℃保存 L-02 细胞,同常规低温(4 ℃)比较,以明确零下非结冰保存 L-02 细胞的效果以及同细胞凋亡的关系。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器

L-02 肝细胞株(中国科学院细胞库)。DMEM/F-12 培养基、FBS、青霉素/链霉素(100X)、0.25% 胰酶及 PBS 缓冲液(Invitrogen,美国),UW 液(Bristol-Myers Squibb),50 ml 培养瓶、2 ml 冻存管及 6 孔培养板(Costar Corning),氯化铵(Sigma 公司),人白蛋白 ELISA 试剂盒(R&D 公司,美国)。Mode1450 型酶标仪(Bio-Rad 公司),CK2 型倒置显微镜(Olympus 公司,日本),AnnexinV-FITC 凋亡试剂盒(南京凯基公司),DXC800 型全自动生化仪及 FACScan 型流式细胞仪(Beckman coulter,美国),MIR-151 型微电脑程控低温培养箱(温度范围:-10 ~ +60 ℃,精度:±0.1 ℃)及 MCO-175 型 CO_2 培养箱(SANYO,日本),海尔智能温度记录仪(温度范围:-100 ~ +120 ℃,精度 ±0.1 ℃)。

1.2 细胞培养及制备

所用基础培养液为 DMEM/F-12,添加青霉素 10 U/ml,链霉素 10 mg/ml,10% FBS(体积比)。于 37 ℃,5% CO_2,100% 湿度的培养箱内培养。内壁长满后,0.25% 胰酶消化,制备成 L-02 细胞悬液,细胞计数板计数,最终将细胞浓度调至 2×10^6/ml,置换为 2 ml UW 液,分装至 2 ml 冻存管。

1.3 实验分组

L-02 细胞悬液分以下 2 组:-0.8 ℃组(零下非结冰组,$n=6$);4 ℃组(对照组,$n=6$)。

1.4 低温保存及复温

分别保存 24、48 h 及 72 h 后,每组取 6 个标本,放入 37 ℃水浴中震荡 1 ~ 2 min;复温后将 UW 液置换为培养液 2 ml,于培养箱内培养 30 min。

1.5 复温后指标测定

取 1 ml 细胞悬液,加到 1 ml 含 4 mmol/L 氯化铵培养液的 6 孔培养板中,于培养箱内培养 24 h 后,取上清,测定尿素的浓度及人白蛋白含量(按照白蛋白 ELISA kit 说明)。另 1 ml 细胞悬液,1 000 r/min 离心 2 min。一方面取上清测定 ALT,另一方面沉淀的细胞按照 AnnexinV-FITC 凋亡试剂盒要求于流式细胞仪定量测定细胞存活率、凋亡率及坏死率。

1.6 统计学分析

所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件分析。同时间点 2 组样本均数比较采用完全随机样本的 t 检验。同一组不同时间点多个样本均数之间的比较采用重复测量方差分析(多重比较 LSD 法)。

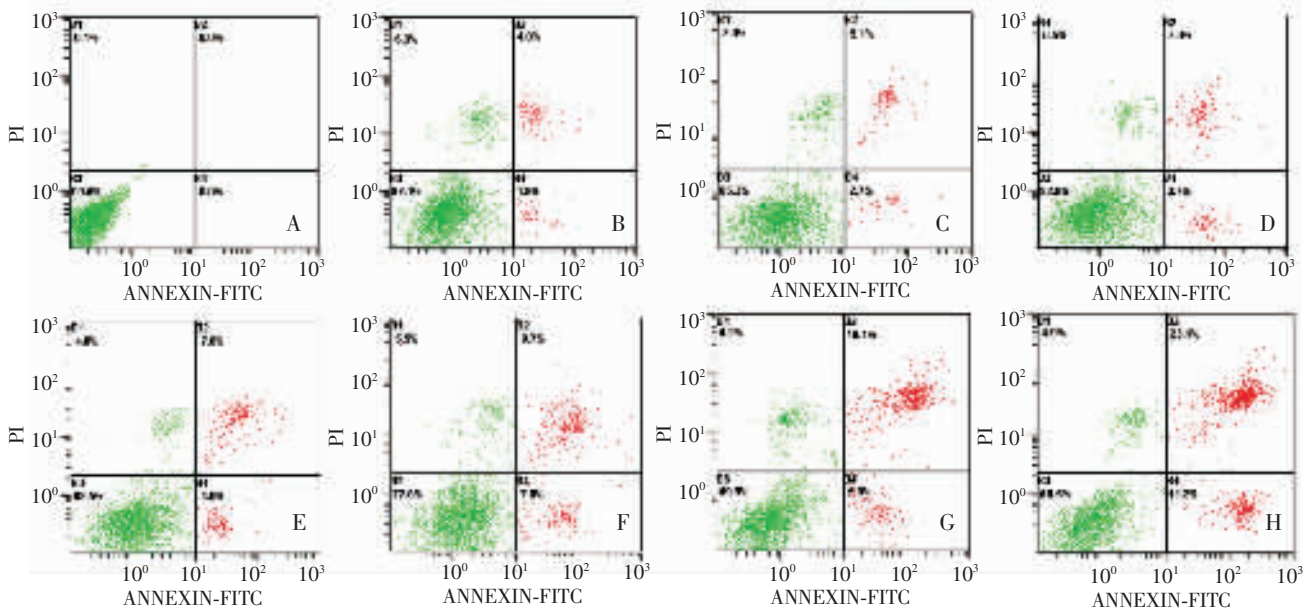
2 结果

2.1 不同低温保存时间细胞存活率、凋亡率及坏死率

新鲜细胞存活率为(86.95 ± 1.43)%,凋亡率为(1.73 ± 0.20)%,坏死率为(4.72 ± 0.93)%。随低温保存时间的延长,细胞存活率呈下降趋势($P<0.01$):48 h,2 组开始出现差异($P<0.01$);72 h,-0.8 ℃组显著高于 4 ℃组($P<0.01$)。随低温保存时间延长,细胞凋亡率及坏死率呈上升的趋势($P<0.01$):48 h,2 组细胞凋亡率开始出现差异($P<0.05$),72 h,-0.8 ℃组明显低于 4 ℃组($P<0.05$);但是 2 组细胞坏死率差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1、图 1。

表 1 低温保存不同时间 2 组细胞存活率、凋亡率及坏死率的比较 [$n=6$, ($\bar{x} \pm s$)%]

组别	存活率			凋亡率			坏死率		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
-0.8 ℃组	84.53 ± 1.38	82.00 ± 1.57	70.17 ± 2.82	3.22 ± 1.24	4.53 ± 0.83	5.73 ± 1.68	6.05 ± 2.19	7.90 ± 0.94	18.45 ± 1.88
4 ℃组	83.17 ± 1.59	77.62 ± 2.42	60.05 ± 3.17	3.78 ± 1.28	6.38 ± 1.76	9.20 ± 2.35	7.10 ± 1.94	9.20 ± 1.28	21.82 ± 3.86
P	>0.05	<0.01	<0.01	>0.05	<0.05	<0.05	>0.05	>0.05	>0.05



A：空白细胞；B：新鲜细胞；C：-0.8 ℃组 24 h；D：4 ℃组 24 h；E：-0.8 ℃组 48 h；F：4 ℃组 48 h；G：-0.8 ℃组 72 h；H：4 ℃组 72 h；B3：(An-PI-)表示正常存活细胞；B4：(An+PI-)表示凋亡细胞；B2：(An-PI+)表示坏死细胞；B1：(An-PI+)表示操作过程中损伤的细胞

图 1　流式细胞术测定低温保存不同时间 2 组细胞存活率、凋亡率及坏死率

表 2　低温保存不同时间 2 组细胞上清 ALT 释放、尿素合成及白蛋白分泌值的比较（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	ALT 释放(U/L)			尿素合成(mmoL/L)			白蛋白分泌量(μg/ml)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
-0.8 ℃组	5.38±1.15	5.85±0.90	6.21±0.65	2.02±0.44	1.58±0.24	1.01±0.14	10.78±0.53	9.85±0.56	9.04±0.53
4 ℃组	5.70±1.14	8.30±1.46	8.68±1.18	1.78±0.38	1.15±0.34	0.66±0.09	10.51±0.51	8.74±0.72	7.70±0.52
P	>0.05	<0.01	<0.01	>0.05	<0.05	<0.01	>0.05	>0.05	<0.01

2.2　不同低温保存时间 ALT 释放

新鲜细胞 ALT 值为(3.83±0.48) U/L。随低温保存时间延长，反映细胞损伤程度的 ALT 释放呈上升的趋势($P<0.05$)。48 h，2 组开始出现差异($P<0.01$)。72 h，ALT 释放明显增加($P<0.01$)，但是 -0.8 ℃组明显低于 4 ℃组($P<0.01$)，见表 2。

2.3　不同低温保存时间尿素合成

新鲜细胞尿素合成为(2.63±0.46) mmol/L。随低温保存时间延长，尿素合成功能呈下降趋势($P<0.01$)。48 h，2 组开始出现差异($P<0.05$)。72 h，-0.8 ℃组合成功能明显优于 4 ℃ 组($P<0.01$)，见表 2。

2.4　不同低温保存时间白蛋白分泌量

新鲜细胞白蛋白分泌量为(11.90±0.39) μg/ml。随低温保存时间延长，细胞白蛋白分泌功能呈下降趋势($P<0.01$)。24、48 h 2 组差异无统计学意义($P>0.05$)。但 72 h，-0.8 ℃组白蛋白分泌量明显高于 4 ℃组($P<0.01$)，见表 2。

3　讨论

目前肝细胞低温保存分深低温冻存(cryopreservation)和 4 ℃低温保存(hypothermic preservation)两大类。不同溶液的 SZNFT 不同，蒸馏水为 0 ℃，UW 液为 -1～0 ℃[5]。

BLASS 所用肝细胞来源至今尚未得到满意解决。理论上原代肝细胞最理想，但原代肝细胞因来源有限、体外培养和扩增困难等而难以作为 BLASS 的细胞材料。人胎肝细胞具有一定的增殖活性，但其分化不成熟，功能不完善，并涉及伦理学问题也难以广泛应用[6]。猪肝细胞是 BLASS 比较常用的细胞，但猪肝细胞存在免疫排斥及异种病毒感染等安全隐患[7]。C3A 是一种高分化肿瘤细胞，增殖活性好，具有部分肝细胞功能，如分泌 ALB、参与糖原合成等[8]，但肿瘤细胞迁移的危险性严重阻碍了其在 BALSS 中的应用。L-02 肝细胞是国内筛选出的正常人肝细胞[9]，已有学者用其进行 BALSS 的基础研究，发现 L-02 细胞增殖迅速且传代稳定，具备尿素合成及 ALB 分泌等功能，其氨基清除能力优于 C3A 细胞且无致瘤的危险性[5,8]，但 L-02 细胞零下非结冰保存时功能变化且低温保存后是否满足 BLASS 的需要仍然不明确。因此，本研究采用 UW 液于 -0.8 ℃低温保存 L-02 细胞。

完整的细胞膜是维持肝细胞功能的重要因素。本研究通过流式细胞仪分析低温保存后肝细胞存活率、凋亡率及坏死率发现：随低温保存时间的延长，细胞存活率呈下降的趋势（$P<0.01$），细胞凋亡率呈增高的趋势（$P<0.01$），但细胞坏死率无明显差异（$P>0.05$）。其中 72 h 细胞存活率较 48 h 明显下降（$P<0.01$），可能系 4 ℃或者 -0.8 ℃并未完全阻断细胞内无氧代谢进程，48 h 后细胞内 ATP 含量明显降低有关[10]；-0.8 ℃较 4 ℃明显维持了细胞膜的完整性、提高了低温保存 48 h 及 72 h L-02 细胞的存活率，减少了 L-02 细胞凋亡率（$P<0.05$），但细胞坏死率无差异（$P>0.05$）。不同低温保存时间点，-0.8 ℃较4 ℃均明显抑制了反映细胞膜损伤程度的 ALT 的释放（$P<0.01$）。作为 BLASS 生物材料体外培养的肝细胞，应具备体内肝细胞氨基清除功能（氯化铵转化实验）及白蛋白分泌等主要功能[11]，而低温保存均可不同程度的损伤肝细胞转化、分泌功能。本研究发现零下非结冰保存 L-02 细胞氨基清除功能及白蛋白分泌功能呈下降的趋势（$P<0.01$），同 Calligaris 等[12] UW 液 4 ℃保存鼠肝细胞 72 h 的结果不一致，可能系 L-02 肝细胞部分酶系不全，不同于原代肝细胞。但各时间点 -0.8 ℃明显好于 4 ℃组（$P<0.01$）。

大量研究发现细胞凋亡是低温保存肝细胞死亡的另一个重要途径[13]。本研究通过流式细胞仪分析发现，-0.8 ℃较 4 ℃提高了低温保存 L-02 细胞的存活率，而存活率的提高是通过降低细胞凋亡实现的，但低温保存引起细胞凋亡的具体机制还不明确，而线粒体途径相关的细胞凋亡在细胞冻存损伤中发挥了重要的作用：研究发现广谱蛋白酶抑制剂 IDN-1965 可以明显抑制冻存复温后凋亡蛋白酶 3 活性及细胞色素 C 的释放[14]。Bcl-2/Bax 是一对很重要的调节凋亡的基因（Bcl-2 可通过不同途径抑制凋亡的发生，Bax 则促进凋亡的发生），Bcl-2/Bax 比值是衡量细胞凋亡指数的一个指标，研究发现 Bcl-2/Bax 比值同冻存诱导的细胞凋亡明显相关[15]。但零下非结冰是否是通过线粒体途径抑制了低温损伤引起的细胞凋亡有待进一步研究。

总之，UW 液零下非结冰（-0.8 ℃）保存肝细胞可显著提高复温后 L-02 细胞存活率，降低低温损伤引起的细胞凋亡，有效的保护 L-02 细胞的氨基清除功能和白蛋白分泌功能，但保存时间不宜超过 72 h。

参考文献：

[1] Fiegel H C, Kaufmann P M, Bruns H, *et al*. Hepatic tissue engineering: from transplantation to customized cell-based liver directed therapies from laboratory[J]. J Cell Mol Med, 2008, 12(1): 56-66.

[2] Llarrull M S, Pizarro M D, Scandizzi A L, *et al*. Cold preservation of isolated hepatocytes in UW solution: experimental studies on the respiratory activity at 0 degrees C [J]. Cryo Letters, 2007, 28(5): 313-328.

[3] Fleming K K, Hubel A. Cryopreservation of hematopoietic and non-hematopoietic stem cells [J]. Transfus Apher Sci, 2006, 34(3): 309-315.

[4] Guibert E E, Almada L L, Mamprin M E, *et al*. Subzero nonfreezing storage of rat hepatocytes using UW solution and 1, 4-butanediol. Ⅱ-functional testing on rewarming and gene expression of urea cycle enzymes [J]. Ann Hepatol, 2009, 8(2): 129-133.

[5] 李庆勇，张清华，蒋知新，等. 生物人工肝用 C3A 细胞在零下非结冰时的保存[J]. 世界华人消化杂志，2010，18(5)：428-436.

[6] Poyck P P, Hoekstra R, VanWijk A C, *et al*. Functional and morphological comparison of three primary liver cell types cultured in the AMC bioartificial liver[J]. Liver Transpl, 2007, 13(4): 589-598.

[7] Wang H H, Wang Y J, Liu H L, *et al*. Detection of PERV by polymerase chain reaction and its safety in bioartificial liver support system [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12: 1287-1291.

[8] Filippi C, Keatch S A, Rangar D, *et al*. Improvement of C3A cell metabolism for usage in bioartificial liver support systems[J]. J Hepatol, 2004, 41(4): 599-605.

[9] 刘潇聪，陈耀凯，李俊刚，等. 腺病毒介导 CTLA4Ig 转染正常人肝细胞株的研究[J]. 第三军医大学学报，2010，32(8)：810-813.

[10] Dabos K J, Parkinson J A, Nelson L J, *et al*. The effect of hypothermia on primary porcine hepatocyte metabolism monitored by (1H) nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2003, 15(3): 283-293.

[11] Demetriou A A, Brown R S Jr, Busuttil R W, *et al*. Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure[J]. Ann Surg, 2004, 239(5): 660-667.

[12] Calligaris S D, Almada L L, Guibert E E, *et al*. Ammonium detoxifying activity is maintained after 72 hours of cold preservation of rat hepatocytes in University of Wisconsin (UW) solution [J]. Cryo Letters, 2002, 23(4): 245-254.

[13] Kao Y H, Goto S, Jawan B, *et al*. Heat preconditioning ameliorates hepatocyte viability after cold preservation and rewarming, and modulates its immunoactivity[J]. Transpl Immunol, 2008, 18(3): 220-231.

[14] Matsushita T, Yagi T, Hardin J A, *et al*. Apoptotic cell death and function of cryopreserved porcine hepatocytes in a bioartificial liver [J]. Cell Transplant, 2003, 12(2): 109-121.

[15] Baust J M, Vogel M J, Snyder K K, *et al*. Activation of mitochondrial-associated apoptosis contributes to cryopreservation failure[J]. Cell Preserv Technol, 2007, 5(3): 155-164.

（收稿：2010-01-25 修回：2010-03-30）

（编辑 栾 嘉）