DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.06.003
第25卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 6
2003年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2003

文章编号:1000-5404(2003)06-0469-03

论著

新型中空纤维编织型生物人工肝反应器的初步构建

王英杰,郭海涛,刘鸿凌,刘 俊,王宇明 (第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 为体外生物人工肝支持系统构建一种新型中空纤维编织型生物反应器,提高传统中空纤维生物反应器的性能。方法 采用中空纤维编织方法,制作三维立体型生物反应器,对反应器进行物质传输试验后,将分离的新生实验小型猪肝细胞接种于中空纤维支架上,用培养液循环式人工毛细管培养系统进行培养,检测生物反应器的生物功能,观察培养猪肝细胞的酶漏出量。结果 传输试验显示,中空纤维编织型反应器的半透膜能快速传输含人白蛋白和酚红的RPMI 1640培养液。加入肝细胞并培养后,用SDS/PAGE可从生物反应器内检测出猪肝细胞分泌的白蛋白,生物反应器内的猪肝细胞有效地将氯化铵转换成尿素。反应器实验中,肝细胞仅释放了少量的ALT、LDH。结论 初步研制出一种新的、符合生物人工肝基本要求的实验型生物反应器,该反应器内培养的肝细胞保持较好的细胞活力,具有生物合成与转换功能。

关键词:生物反应器;肝细胞;细胞培养;生物人工肝
中图法分类号:R318;R318.14 文献标识码:A

Preliminary design of a novel bioreactor with woven hollow fibers

WANG Ying-jie, GUO Hai-tao, LIU Hong-ling, LU Jun, WANG Yu-ming (Research Institute of Infectious Disease, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To design a novel 3-D network bioreactor of extracorporeal bioartificial liver support system with woven hollow fibers so as to improve the functions of traditional hollow fiber bioreactor. **Methods** 3-D network bioreactor was made of hollow fibers by a weave method. After the transmission test, the hepatocytes isolated from experimental suckling minipigs were seeded onto the hollow fiber scaffold of bioreactor and cultured with an artificial capillary cell culture system. Both the biological function and enzyme release of the bioreactor and hepatocytes were examined. **Results** Transmission test revealed that the woven hollow fibers could transmit the RPMI 1640 medium containing human albumin and phenol red at high speed. After the cells were seeded and cultured, porcine albumin could be estimated by SDS/PAGE in the culture media of the bioreactor. The bioreactor and porcine hepatocytes could transform ammonia chloride into urea effectively. During the experiment, only a little of ALT and LDH was released from the cultured hepatocytes into the medium. **Conclusion** A novel experimental bioreactor that meets the needs of bioartificial liver has been preliminarily designed. The porcine hepatocytes in the bioreactor can maintain viability and keep the functions of biosynthesis and biotransformation.

Key words: bioreactor; hepatocytes; cell culture; bioartificial liver

生物反应器是以培养肝细胞为基础的体外生物人工肝支持系统的核心,既承担着大量培养和维持肝细胞功能的重任,又要实现肝细胞与肝衰竭患者血液之间的双向物质交换与作用[1]。因此,研制性能优良的生物反应器一直是体外生物人工肝系统研究的重要内容。目前研究较多,并已应用于生物人工肝临床研究的普通中空纤维型反应器虽具备上述生物反应器的两大基本功能,但在实际应用中仍存在一定的缺陷,如肝细胞数量欠足,不易高活性培养,物质交换有限。鉴于此,本研究采用中空纤维编织技术,初步设计并研制了一种三维立体中空纤维型纤维反应器,以期更有利于肝细胞的生存和功能的发挥,提高传统中空纤维反应器的性能。

1 材料与方法

1.1 反应器的设计与制作

采用中空纤维编织技术研制三维立体型生物反应器。中空纤维半透膜材料为聚醚酯,半透膜微孔直径0.15~0.18 μm,将中空纤维半透膜交叉编织成三维立体结构,其间用数层100

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970214,30027001);全国优秀博士基金资助项目(199947)
作者简介:王英杰(1960-),男,陕西省延安市人,博士,教授,主要从事肝衰竭与人工肝方面的研究,发表论文90余篇。电话:(023)68754475-8062
收稿日期:2003-01-21;修回日期:2003-02-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

目尼龙膜相隔,共同对肝细胞立体培养起支撑作用。纤维编织物放置于立方形有机玻璃壳内,聚氨酯封各端纤维口,安装中空纤维腔流入、流出接头,见图1。制作的反应器由中空纤维分隔出三个腔。其中,编织中空纤维与玻璃外壳之间为反应器外腔,用于三维立体培养肝细胞;中空纤维内部自然构成两个独立的反应器内腔,分别用于循环培养液和血液。用PBS反复循环冲洗后用于实验。



图1 设计与制作的纤维编织型生物反应器

Fig 1 Woven hollow fiber bioreactor

1.2 猪肝细胞的分离

腹腔注射戊巴比妥钠(30 mg/kg),麻醉1周龄的中国实验小型猪(由本校实验动物中心提供),无菌条件下取肝(取肝前门静脉注入肝素钠 100~150 U),置自制的体外灌流装置进行整体肝两步循环灌流[2]。灌流结束后,划破肝包膜,剔除纤维结缔组织,收集细胞悬液,酬情再置37 ℃条件下消化10~15 min。用RPMI 1640培养液终止消化,三层纱布过滤,50 g反复离心洗涤肝细胞。台盼蓝拒染试验判断细胞活率>95%者用于生物反应器的制备。

1.3 生物反应器的制备

将刚分离的总量约1×10^9的肝细胞接种于反应器外腔,编织中空纤维以及100目尼龙膜为肝细胞的大规模、高密度培养提供附壁生长支架,反应器内腔(中空纤维内腔)开口通过氧和二氧化碳弥散管、培养液贮池与Cellco培养液循环式人工毛细管培养系统(Spectrum公司提供)连接,见图2。培养液主要含10 μl/L地塞米松、30 μl/L胰岛素、10 μl/L胰高血糖素、30 mg/L卡那霉素的无血清DMEM培养液。在37 ℃、95%O_2、5%CO_2条件下,以30 ml/min的速度循环培养液对反应器内的肝细胞进行培养。每24 h换液一次,72 h后结束实验。

1.4 生物反应器的性能检测

1.4.1 物质传输 用含10%人白蛋白和酚红的RPMI 1640培养液,反复循环于反应器内腔,同时观察培养液由反应器内腔向外腔弥散的情况和培养液的色泽变化,并用生化分析仪检测反应器内、外腔的总蛋白浓度。

1.4.2 合成功能 吸取反应器外腔液,在丙烯酰胺终浓度为12%的SDS-PAGE(SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳)中分离出猪白蛋白条带,经0.5%考马斯亮蓝染色,凝胶成像仪上获取图像。



图2 猪肝细胞的生物反应器培养

Fig 2 Porcine hepatocytes cultured in fiber woven bioreactor connected with artificial capillary cell culture system

1.4.3 氯化铵转化 在反应器培养液中加入4 mmol/L氯化铵,于0、2、6、12 h分别用生化分析仪检测尿素量。

1.4.4 肝酶释放 用全自动生化分析仪动态检测培养液中转氨酶(ALT)、乳酸脱氢酶(LDH)含量。

1.5 统计学处理

应用SPSS10.0系统软件包,进行 t 检验。

2 结果

2.1 反应器的传输

未培养肝细胞的编织中空纤维型反应器能很好的通透RPMI 1640培养液。实验中,反应器内腔的培养液开始循环后,立即向外腔快速渗透,其速率与培养液循环速度成正比,约20 min即使反应器外腔充满培养液,且内外腔培养液的色泽几近一致。抽取试验1 h的内外腔培养液,检测总蛋白含量已基本相同。提示的反应器所用半透膜通透与传输性能较好。

2.2 猪肝细胞的白蛋白分泌

反应器内加入并培养肝细胞24、48、72 h,均可通过SDS-PAGE电泳检测到猪肝细胞合成分泌的白蛋白。其中,实验72 h的白蛋白检测结果如图3所示。



M: protein molecular weight markers; A: cultured supernatant of 72 h

图3 猪白蛋白的检测

Fig 3 Porcine albumin by SDS-PAGE

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

反应器内的肝细胞对氯化铵有较高的转换能力。动态检测显示, 加入氯化铵 12 h 内, 培养液中尿素含量随时间延长而明显增加, 至 12 h 时尿素含量接近实验初的 2 倍。

2.3　反应器内肝细胞漏出量

动态检测循环液中的 ATL、LDH 显示, 在肝细胞接种培养伊始, LDH 含量均< 150 IU/ L。培养 24、48 h 时, 肝细胞的 LDH 释放量逐渐下降, 至 72 h 时, 肝细胞的 LDH 释放量开始回升, 但升高值在 200 IU/ L 以内, 较前无显著差异($P > 0.05$)。与 LDH 相比, ALT 释放量更少, 且变化较小, 呈小幅逐日递减趋势, 见图 4。

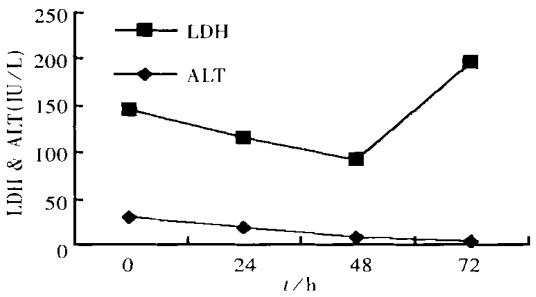


图 4　反应器内猪肝细胞 DH、ALT 释放量

Fig 4　LDH and ALT changes of porcine hepatocytes in bioreactor

3　讨论

传统意义上的生物反应器是在细胞培养技术发展及其产业化过程中, 为满足越来越大的细胞培养规模及其特殊需要而产生的细胞培养系统或培养装置, 主要应用于组织细胞的大量培养和提取制备重要的生物活性物质。在体外生物人工肝支持系统的研究过程中, 研究者借鉴了生物反应器的特殊功能和作用, 使之成为生物人工肝的核心装置。生物人工肝的反应器, 在细胞培养方面继承了传统生物反应器的方法和技术, 但由于其同时担负着进行体外血液循环, 发挥反应器及培养肝细胞对肝衰竭患者血液进行生物转化、代谢支持等作用, 故在较大程度上有别于普遍生物反应器, 因其性能直接关系到人工肝支持的效率与效果, 生物人工肝反应器的设计与研制备受重视[3]。

双向物质传输是生物人工肝支持系统的重要特征, 也是生物反应器必备的条件[4]。反应器双向物质传输功能欠缺, 将无法实现肝细胞对急性肝衰竭患者的人工肝支持治疗, 同样也不能对培养肝细胞进行营养补充以保障其活性和功能。血液/ 血浆与肝细胞直接接触式灌流型反应器的物质传输最直接和理想, 但使用时受到异种肝细胞的限制。目前已用于临床研究的反应器大多将肝细胞通过半透膜加以阻隔, 以增加临床应用的安全性。从免疫阻隔的角度考虑, 这无疑是最佳的方式, 但对双向物质传输而言, 则会增加液体弥散的阻力, 使一些重要物质的双向转运受到限制。本研究在生物反应器的设计上, 采用分子截流量适中的中空纤维, 以期尽可能使物质传输与安全性这一矛盾达到平衡, 从传输试验和肝细胞生物功能实验的结果可以看出, 初步实现了这一设计理念。

目前, 生物人工肝尚不能为肝衰竭患者提供长时间、高效率的人工肝治疗, 关键就在于生物反应器难以维持肝细胞较高的活性和功能。已往的生物反应器大多较少考虑为肝细胞提供合适的微循环, 缺少氧合作用, 也无不断循环更新培养液系统。有研究显示[5], 对这种条件下的培养肝细胞持续性体外血浆灌流超过 20 h, 将引起培养细胞功能的下降和形态改变。提示更好地保存肝细胞活力和功能, 是生物人工肝细胞培养与反应器设计中需要优先加以考虑的问题。本研究采用三维设计和 Cellco 培养液循环式人工毛细管培养系统即是充分考虑为肝细胞提供合适的微循环、氧合作用及不断循环更新的培养液, 实验结果证实该方法能制备出性能良好的培养肝细胞型生物反应器。

此外, 反应器由实验室进入临床, 必须能放大到对肝衰竭患者提供有效肝支持所需要的大小和体积[6]。研究表明, 对于维持生命必须有 10% ~ 30%的正常肝组织存在, 相当于 150 ~ 450 g 成人肝细胞。目前, 普通中空纤维型生物反应器的肝细胞数量有限, 往往需要采用多个反应器联合使用的方式实现对反应器的放大。本研究研制的编织三维立体型中空纤维反应器, 不仅中空纤维数量多、体积大、肝细胞附着面积广, 而且可根据临床使用情况进一步放大。因此, 能够满足反应器研制中易于放大的要求。但由于受中空纤维材料和编织技术的限制, 本研究的反应器在放大的同时, 可能在一定程度上也增大了反应器的"死腔", 如何通过肝细胞培养技术克服这一不足, 需进一步深入探讨。

参考文献:

[1] Riordan S, Williams R. Bioartificial liver support: developments in hepatocyte culture and bioreactor design[J]. Br Med Bull, 1997, 53(4): 730－744

[2] 郭海涛, 王英杰, 刘　俊, 等. 体外灌流装置分离肝细胞的初步探索[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(6): 549－550.

[3] Shi Q. On bioartificial liver assist system: theoretical exploration and strategies for further development[J]. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 2000, 28(6): 535－546.

[4] Watanabe F D, Demetriou A A. Nonsurgical management of fulminant hepatic failure[J]. Curr Opin Gastroenterol, 1996, 12(2): 231－236

[5] Stefanovich P, Matthew H W T, Toner M, *et al*. Extracorporeal plasma perfusion of cultured hepatocytes: Effect of intermittent perfusion on hepatocyte function and morphology[J]. J Surg Res, 1996, 66(1): 57－63

[6] Allen J W, Hassanein T, Bhatia S N. Advances in bioartificial liver devices[J]. Hepatoloy, 2001, 34(3): 447－455.

（编辑　薛国文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net