DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.06.004
第25卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 6
472 2003年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)06-0472-03

乳猪肝细胞-196 ℃保存的初步研究

刘鸿凌,王英杰,郭海涛,王宇明,于乐成,刘 俊,谭朝霞 (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 探索适合于乳猪肝细胞-196 ℃冷冻保存的条件和方法。方法 体外分离新生乳猪肝细胞,以含不同浓度二甲亚砜(DMSO)的冻存液及不同的细胞浓度在液氮中保存。2个月后复苏接种培养,对其存活率、贴壁率、尿素合成能力、猪白蛋白mRNA的表达等进行检测,并观察其形态结构变化。结果 不同DMSO浓度保存猪肝细胞复苏后的活力及形态均有所不同,其中含5% DMSO冻存液组保存效果最差;10%组次之;15%组最佳。15% DMSO冻存液组复苏后肝细胞的存活率为(83±4)%,贴壁率是(81±5)%,细胞形态与未冻存组相似,均保持较强的尿素合成能力及猪白蛋白mRNA的表达,较5%与10% DMSO冻存液组有显著性差别($P<0.05$)。冻存时肝细胞浓度为(5~10)×10^6个/ml组复苏后细胞存活率明显优于(1~2.5)×10^6个/ml组。结论 15% DMSO浓度适合于乳猪肝细胞的长期保存。高浓度组猪肝细胞的冻存效果优于低浓度组。

关键词:猪肝细胞;培养;冻存保护剂;二甲亚砜
中图法分类号:R318.14;R318.52 文献标识码:A

A preliminary study of cryopreservation of suckling porcine hepatocytes at -196 ℃

LIU Hong-ling, WANG Ying-jie, GUO Hai-tao, WANG Yu-ming, YU Le-cheng, LIU Jun, TAN Zhao-xia (Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the conditions and methods for cryopreservation of suckling porcine hepatocytes at -196 ℃. Methods Porcine hepatocytes were harvested by modified two-step perfusion collagenase method, and then stored in 5%, 10%, 15% or 20% DMSO cryopreservation medium at different concentrations of hepatocytes. After 2 months of cryopreservation, the hepatocytes were thawed and inoculated for culture and then the viability, attachment rate, drug metabolic function and expression of porcine albumin mRNA were detected and the intracellular structure changes were observed with light microscope. Results There were differences in cell viability and forms between different concentrations of DMSO for the cryopreservation of porcine hepatocytes. After storage in 5% DMSO cryopreservation medium, cell viability and attachment rate were significantly reduced, but the hepatocytes stored in 15% DMSO cryopreservation solution kept their function well. Porcine albumin mRNA, extracellular LDH and drug metabolic reaction were close to those found in fresh hepatocytes. Significant difference was found between 15% DMSO group and 5% and 10% DMSO groups ($P<0.05$). Conclusion The ideal concentration of DMSO for -196 ℃ cryopreservation of porcine hepatocytes is 15%. The cryoprotective effect of hepatocytes in high concentration is better than that in low concentration.

Key words: porcine hepatocytes; culture; DMSO; cryoprotective agent

人肝细胞、肝肿瘤细胞株及猪肝细胞是目前生物人工肝研究的主要细胞材料,但由于人肝细胞来源匮乏以及肝肿瘤细胞株潜在的不安全性,猪肝细胞已逐步成为生物人工肝研究的主要对象,随着其研究的不断深入,迫切需要有效的保存方法以促进生物人工肝在临床上的应用[1~3]。本实验采用含不同二甲亚砜(DMSO)浓度的保存液以及不同的细胞浓度,在-196 ℃下对猪肝细胞进行冷冻保存,从形态学和生物学性状方面进行比较,以期筛选出合适的条件和方法,进一步提高冻存肝细胞的活力。

1 材料和方法

1.1 材料和主要试剂

健康1~7 d龄中国实验小型猪(本校实验动物中心提供);Ⅳ型胶原酶、台盼蓝、琼脂糖、DMSO等由Sigma公司提供;塑料

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30027001);全国优秀博士基金资助项目(199947)
作者简介:刘鸿凌(1971-),男,江苏省滨海市人,硕士研究生,主治医师,主要从事生物人工肝细胞材料方面的研究。电话:(023)68754289
收稿日期:2002-10-21;修回日期:2002-12-05

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

培养瓶、离心管及冻存管等为 Nuculon 公司产品; 胎牛血清(FBS)、L-15培养液、DMEM 培养液等购于 Gibco 公司; Tripure 试剂购自 Roche 公司; RT-PCR 试剂盒由 Promega 公司生产; 引物由上海生工合成。

1.2　乳猪肝细胞的分离培养

采用改良 Seglen 体外二步胶原酶灌注法[4,5] 分离新生乳猪肝细胞, 双层消毒纱布过滤, 然后 50× g、3 min 离心 3 次, 获取肝细胞。于倒置相差显微镜下用血细胞计数板计算肝细胞数量, 4 g/L 台盼蓝拒染法计存活率, 存活率超过 85%的肝细胞用于实验。取 10^6 个肝细胞, 接种于培养瓶中普通培养作为对照组, 基础培养液为 L-15 液, 加有 10% FBS、胰岛素 100 ng/ml、青霉素 100 U/ml 及链霉素 100 μg/ml 等。然后置于 37 ℃、5% CO_2、100% 湿度的培养箱中培养, 24 h 后更换培养液, 上清液离心后计数, 计算贴壁率, 以后每 24 h 更换一次培养液, 上清液离心后置－20 ℃ 保存待检。

1.3　肝细胞的冻存及复苏

以含 20% FBS 的 L-15 培养液为基本冷冻保存液, 其中分别含 5%、10%、15%和 20% 浓度的 DMSO(简称 5% DMSO 组、10% DMSO 组、15% DMSO 组及 20% DMSO 组)。以 5× 10^6 个/ml 的浓度将乳猪细胞重悬于含 5% ~20% DMSO 的冷冻保存液中(缓慢加入, 轻轻摇匀); 另以含 15%DMSO 冷冻保存液分别保存浓度为 1× 10^6、2.5× 10^6、5× 10^6、7.5× 10^6、10× 10^6 个/ml 的猪肝细胞。具体的降温步骤如下: 分装入 1 ml 冻存管, 室温下放置 10 ~ 15 min, 然后置于 4 ℃ 20 min, 以－1 ℃/min 降至－20 ℃, 保存 30 min, 再以－1 ℃/min 降至－80 ℃, 隔夜后直接放入液氮。2 月后取出肝细胞, 快速置于 37 ℃ 水浴 1 ~ 2 min, 震荡直至细胞悬液完全融化, 然后等倍缓慢稀释, 共加入培养液 20 ~ 30 ml, 4 ℃, 30× g、离心 3 min, 弃上清液, 重新混悬于含 10%FBS 的新鲜培养液中[6,7], 然后用台盼蓝拒染法计算细胞存活率。复苏肝细胞的接种培养、贴壁率计算及上清液的保存均同对照组。

1.4　肝细胞功能检测

1.4.1　肝细胞猪白蛋白 mRNA 水平的表达　　取 10^6 个复苏后的猪肝细胞, 培养 48 h 后去上清液, 用 Tripure 试剂提取猪肝细胞的总 RNA, 经紫外分光光度计测定其纯度及含量。取肝细胞总 RNA、猪白蛋白引物按逆转录试剂盒操作说明逆转录成 cDNA, 并进行 PCR 扩增。所用引物为: 5′-CTTATTCCAGGGGTCTGTTTC-3′(正链)和 5′-TCGTTTCTCTCAGGCTCTTCT-3′(副链), 合成 cDNA 大小为 324 bp。反应条件如下: 94 ℃ 30 s, 61 ℃ 45 s, 72 ℃ 1 min, 共 35 个循环。PCR 结束时产物积累处于指数生长期, 1.5%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪上获取图像[8]。

1.4.2　氯化铵转化试验　　取 1× 10^6 个复苏后的猪肝细胞, 培养 48 h 后去上清液, 用 PBS 缓冲液冲洗 2 次, 然后加入含 4 mmol/L 氯化铵、无血清的 DMEM 培养液, 于 1、2、6、24 h 分别留取标本, 在生化分析仪上检测上清液中尿素水平[9]。

1.4.3　上清液中的草酰乙酸氨基转移酶(AST)检测　　在生化分析仪上检测对照组、10% ~ 20% DMSO 4 组细胞培养上清液中 AST 水平。

1.5　光镜观察

每天换液前后在倒置相差显微镜下观察培养肝细胞的生长情况及形态变化。

1.6　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS11.0 软件对数据进行单位组设计资料的方差分析。

2　结果

2.1　猪肝细胞存活率与贴壁率

2.1.1　刚分离乳猪肝细胞存活率为(90±4)%, 24 h 贴壁率为(89±4)%。复苏肝细胞的存活率和 24 h 贴壁率见表 1。

表 1　冻存复苏后肝细胞的存活率与贴壁率($\bar{x} \pm s$, %)

Tab 1　The survival and attachment rates of thawed hepatocytes($\bar{x} \pm s$, %)

	5% DMSO	10% DMSO	15% DMSO	20% DMSO
Survival rate	51±3	71±4 *	83±4 *#	79±5 *#
Attachment rate	32±6	70±5 *	81±5 *#	77±6 *

*: $P < 0.05$ *vs* 5% DMSO; #: $P < 0.05$ *vs* 10% DMSO

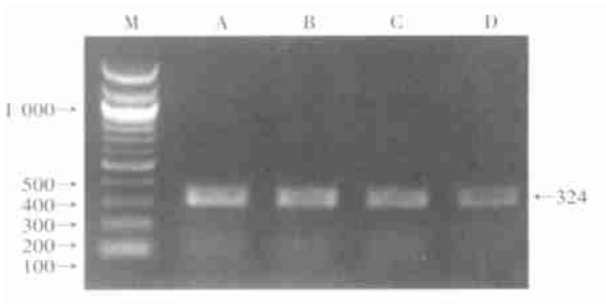
2.1.2　冻存细胞浓度为 1× 10^6、2.5× 10^6、5× 10^6、7.5× 10^6、10× 10^6 个/ml 的猪肝细胞复苏后存活率(%)分别为 67±4, 72±7, 83±4、80±4、79±6, 细胞浓度为(5 ~ 10)× 10^6/ml 组复苏后存活率明显优于(1 ~ 2.5)× 10^6/ml 组($P < 0.05$), 但(5 ~ 10)× 10^6 3 组间无显著性差异。

2.2　冻存前后肝细胞形态学变化

倒置显微镜下观察, 15% DMSO 组贴壁率高, 肝细胞生长旺盛, 细胞膜完整, 胞浆内有丰富的颗粒, 可见较多双核细胞, 核仁清楚, 少数细胞内出现空泡, 与对照组肝细胞的形态相似; 5% DMSO 组肝细胞形态最差, 未见双核细胞。

2.3　肝细胞功能检测

2.3.1　猪白蛋白 mRNA 表达　　在琼脂糖凝胶电泳中, 对照组、10% DMSO 组、15% DMSO 组与 20% DMSO 组的肝细胞均保持较高的猪白蛋白 mRNA 表达能力, 见图 1。



M: Markers; Lane A, B, C, D are groups of control, 15%, 20% and 10% DMSO

图 1　四组肝细胞培养后猪白蛋白 mRNA 的表达(RT-PCR)

Fig 1　Expression of porcine albumin mRNA in four groups of cultured hepatocytes(RT-PCR)

2.3.2　氯化铵转化实验　　10% DMSO 组、15% DMSO 组和 20% DMSO 组复苏后的肝细胞均保持较强的合成尿素能力, 但 15% DMSO 组较其他组有显著性差异($P < 0.05$), 见图 2。

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

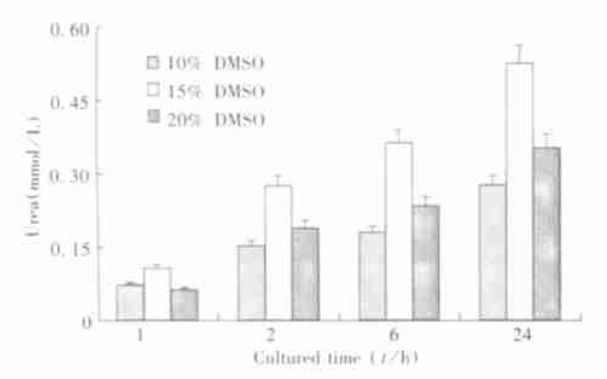


图2 培养肝细胞上清液中尿素的合成量

Fig 2 Content of urea in the supernatant of cultured hepatocytes

2.3.3 上清液中 AST 变化 对照组、10%～20% DMSO 4 组细胞培养上清液中 AST 变化见图 3, 10% DMSO 组上清液中 AST 含量明显高于其他组($P<0.05$), 其他 3 组间无显著性差异($P>0.05$)。

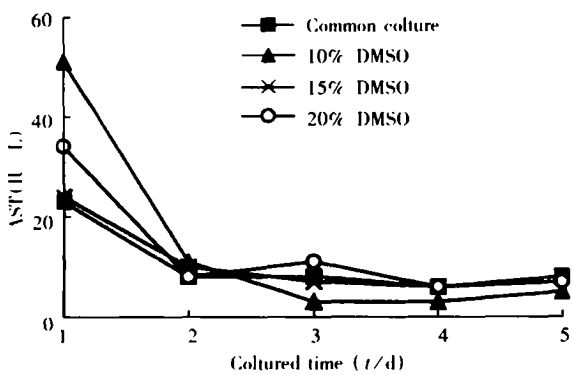


图3 培养肝细胞上清液中AST的含量

Fig 3 Content of AST in the supernatant of cultured hepatocytes

3 讨论

超低温保存是储存和积蓄肝细胞的重要方法, 但经过长时间保存后肝细胞活力都会有一定程度的降低。目前认为, 冻存效果主要与冻存保护剂(Cryoprotective agent, CPA)、冻存前肝细胞活力及能量状态、细胞浓度、降温复温速率等有关[6], 尤其是 CPA 与细胞浓度对其影响较大。DMSO 是一种小分子量、渗透性强的化学物质, 也是最常采用的肝细胞冻存保护剂[3,6], 常用浓度为 10%～20%, 不同种属细胞的最适浓度也有一定差别, 如鼠肝细胞是 16%, 人肝细胞为 10%～12%等[10], 但猪肝细胞的相关研究尚无报道。

本研究在血清浓度和降温升温速率等条件相同情况下, 采用不同 DMSO 浓度的冻存液对乳猪肝细胞在液氮下长期保存, 复苏后接种培养, 观察其生长情况、结构、尿素合成能力、以及 AST 的释放等变化。结果显示 15% DMSO 组保存效果最佳, 该组冻存 2 个月后再接种培养肝细胞的生长、代谢以及 AST 的释放等均类似于未冻存肝细胞, 而且明显优于 5% 和 10% DMSO 组。当 DMSO 浓度增至 20%时, 复苏后细胞活力反而稍有下降, 究其原因, 可能与高浓度的 CPA 引起的较高渗透压有关[6]。因此, 15% DMSO 浓度对长期冻存猪肝细胞较为适宜。同时, 经 10%～20% DMSO 浓度冻存后, 肝细胞接种培养后仍有较强的猪白蛋白 mRNA 表达。另外, 对不同细胞浓度的猪肝细胞进行冻存时发现, 高细胞浓度组的保存效果优于低细胞浓度组, 当细胞浓度低于 2.5×10^6/ml 时, 复苏后细胞的存活率显著降低, 但当细胞浓度大于 5×10^6/ml 时, 肝细胞的活力也未明显增加。说明冻存细胞的浓度对冻存有较大影响, 浓度太低, 复苏后细胞活力明显下降。

尽管如此, 如能处理好众多影响因素, 进一步优化肝细胞的冻存技术, 可减少对肝细胞的损伤, 保证细胞活力, 建立肝细胞库, 随时提供肝细胞, 从而促进肝细胞在生物人工肝和肝细胞移植等方面的应用[6,11]。

参考文献:

[1] Sarkis R, Honiger J, Chafai N, *et al*. Semiautomatic macroencapsulation of fresh or cryopreserved porcine hepatocytes maintain their ability for treatment of acute liver failure[J]. Cell Transplant, 2001, 10(7): 601－607.

[2] Nyberg S L, Hay E J, Ramin K D, *et al*. Successful pregnancy after porcine bioartificial liver treatment and liver transplantation for fulminant hepatic failure[J]. Liver Transpl, 2002, 8(2): 169－170.

[3] Nagaki M, Miki K, Kim Y I, *et al*. Development and characterization of a hybrid bioartificial liver using primary hepatocytes entrapped in a basement membrane matrix[J]. Dig Dis Sci, 2001, 40(5): 1046－1056.

[4] Seglen P O. Isolation of hepatocytes by collagenase perfusion[J]. Methods Toxicol, 1993, 1(3): 231－234.

[5] 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.

[6] Koebe H G, Muhling B, Deglmann C J, *et al*. Cryopreserved porcine hepatocyte cultures[J]. Chem Biol Interact, 1999, 121(1): 99－115.

[7] Hengstler J G, Utesch D, Steinberg P, *et al*. Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available *in vitro* model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction[J]. Drug Metabolism Rev, 2000, 32(1): 81－118.

[8] Benoist S, Sarkis R, Chafai N, *et al*. Survival and differentiation of porcine hepatocytes encapsulated by semiautomatic device and allotransplanted in large number without immunosuppression[J]. J Hepatology, 2001, 35(3): 208－216.

[9] Vilei M T, Granato A, Ferraresso C, *et al*. Comparison of pig, human and rat hepatocytes as a source of liver specific metabolic functions in culture systems-implication for use in bioartificial liver devices[J]. Int J Artif Organs, 2001, 24(6): 392－396.

[10] Guillouzo A, Rialland L, Fautrel A, *et al*. Survival and function of isolated heoatocytes after cryopreservation[J]. Chem Boil Interact, 1999, 121(1): 7－16.

[11] Baust J M, Vogel M J, Buskirk R V, *et al*. A molecular basis cryopreservation failure and its modulation to improve cell survival[J]. Cell Transplant, 2001, 10(6): 561－571.

(编辑 陈聪连)

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