DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.06.005
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)06-0475-03

论著

三明治培养新生实验小型猪肝细胞的功能与形态

杨 杰,王英杰,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 探索双层胶原夹心培养猪肝细胞的方法,观察培养猪肝细胞的功能与形态特征。方法 将两步法分离的新生中国实验小型猪肝细胞接种于胶原被覆的培养板常规培养,24 h后,肝细胞上再加一层胶原形成双层胶原夹心(三明治)培养,观察培养猪肝细胞的白蛋白分泌、形态学特征和乳酸脱氢酶(LDH)漏出量。结果 成功将新生实验小型猪肝细胞固定于双层胶原中,形成三明治状。培养1周内,用SDS/PAGE可检测出猪肝细胞分泌的白蛋白,倒置相差显微镜下观察到典型的形态特征,培养期内LDH漏出量较少。结论 可用双层胶原对新生乳猪肝细胞进行三明治样培养,为肝细胞提供更接近体内的培养环境,有助于维持特殊的肝功能和形态学特征。

关键词:肝细胞;小型猪;培养;三明治
中图法分类号:Q813.11;R322.47 文献标识码:A

Function and morphological characteristics of Chinese experimental suckling mini-pig hepatocytes cultured in sandwich

YANG Jie, WANG Ying-jie, LIU Hong-ling, LU jun, WANG Yu-ming (Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the method for the culture of porcine hepatocytes between 2 layers of gelled collagen and to observe the function and morphological characteristics of the cultured porcine hepatocytes. Methods Porcine hepatocytes isolated from Chinese experimental suckling minipigs by two-step perfusion with collagenase using an extracorporeal perfusion apparatus were inoculated onto collagen-coated dishes for culture. After culture for 24 h, a layer of gelled collagen was added on the porcine hepatocytes to form sandwich for culture. The albumin-excretion, cellular morphological characteristics and release of lactate dehydrogenase (LDH) content were examined within 1 week in the collagen sandwich culture. Results The freshly isolated hepatocytes of Chinese experimental suckling minipigs were cultured between 2 layers of gelled collagen as sandwich configuration with success. For up to 7 days of culture, the porcine albumin could be estimated by SDS/PAGE and the typical cellular morphological characteristics of cultured hepatocytes could be observed. With hepatocytes cultured in the sandwich configuration, a slight release of the LDH into the culture medium could also be found. Conclusion The hepatocytes of Chinese experimental suckling minipigs can be sandwich-cultured by two layers of collagenous matrix, which provides an environment that more closely resembles the one *in vivo* and allows the maintenance of certain liver-specific functions and morphological characteristics of hepatocytes.

Key words: hepatocytes; minipig; cell culture; sandwich

体外分离与培养的肝细胞是肝脏疾病研究的重要工具,已广泛应用于肝病基础和病理生理,药理学等相关学科的研究,并成为近年来迅速发展的体外生物人工肝的核心材料[1]。随着有关研究的不断深入,迫切需要具有高活性的肝细胞培养系统,以满足有关研究中对培养肝细胞的质量要求。本研究采用胶原双层夹心法(三明治)对新生中国小型实验猪肝细胞进行了培养,以期为生物人工肝等研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

用于肝细胞三明治培养的实验动物为中国实验小型猪,共5只,由本校实验动物中心提供,均为新生1周龄的乳猪,雌雄

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:杨 杰(1960-),男,陕西省延安市人,副教授,主要从事神经生理学方面的研究,发表论文11篇,现在延安大学医学院。电话:(0911)2413700
通信作者:王英杰,电话:(023)68754475-8062
收稿日期:2002-08-12;修回日期:2002-12-20

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

不限。实验前4 h断乳，清洁皮毛后备用。

1.2 主要试剂和材料

collagenase Ⅳ、collagen Ⅶ等由Sigma公司提供；DMEM培养液、RPMI 1640培养液等购于Gibco公司；丙烯酰胺、双甲叉丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠(SDS)及考马斯亮蓝购于上海生物工程有限公司；培养板为Nunc公司产品。

1.3 肝细胞的分离

腹腔注射戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉实验小型猪。常规方法消毒皮肤，开腹，暴露门静脉并注入肝素钠100～150 U。游离肝脏，于肝门处剪下取出，置自制的体外灌流装置[2]进行整体肝两步循环灌流。前灌流液为含EDTA、无Ca^{2+}、Mg^{2+}的Hanks液，速度80～100 ml/min，时间10～15 min。第二步灌流液为胶原酶液，浓度0.05%，灌速50～70 ml/min，时间10 min。两种灌流液在系统内均保持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，酬情再置37 ℃条件下消化10～15 min。用RPMI 1640培养液终止消化，3层纱布过滤，50 g反复离心3～4次获取肝细胞。台盼蓝拒染试验判断细胞活率>95%者用于三明治培养。

1.4 肝细胞的三明治培养

首先将4倍DMEM与Ⅶ型鼠尾胶原按1∶4比例混合制成胶原凝胶，用0.1 mol/L NaOH调pH至7.2，每孔加1.2 ml胶原凝胶被覆6孔培养板，置37 ℃孵箱2 h使凝胶固定。将刚分离的肝细胞按1×10^6/ml接种于6孔培养板胶原凝胶之上，用无血清1640培养液培养。常规条件下培养24 h后，吸去培养液，将胶原凝胶液以1.2 ml/孔加于其上，置培养箱内培养1 h后，胶原凝胶固定，以同前培养液加以培养，每24 h换液一次，1周后结束培养。

1.5 观察指标

取无血清培养肝细胞1、3、5、7 d的上清液25 μl，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。采用紫外动力学法在全自动生化分析仪上检测培养上清液中乳酸脱氢酶(LDH)含量。于每天换液前后，在倒置相差显微镜下观察三明治培养肝细胞的生长情况及形态变化。

1.6 统计学处理

采用t检验。

2 结果

2.1 三明治培养猪肝细胞的形态观察

将刚分离的猪肝细胞接种于单层胶原后不久，肝细胞即贴壁生长，其形态由刚分离后的圆球形很快变化为多边形；培养4 h后，肝细胞呈集落状成束样生长，尽显典型的、较均匀一致的多边形形态特征，见图1。

加盖上层胶原凝胶培养24 h后，肝细胞仍保持多边形状态；继续培养过程中，肝细胞的多边形特征更加典型，显现独特的细胞核，其中，多数肝细胞内可见双核；另一独特性表现为，肝细胞与肝细胞之间的边界甚为清晰、明亮，提示有胆小管形成和参与，肝细胞已重建了细胞极性，形成肝板样结构，并维持该形态特征直至培养结束，见图2。

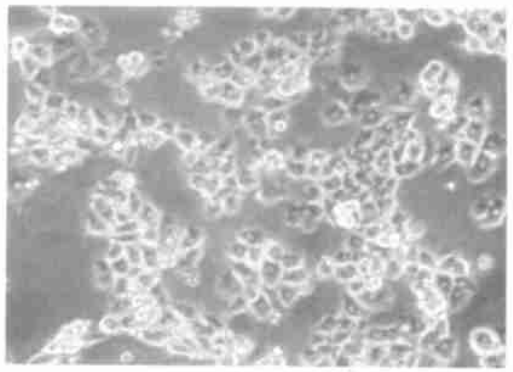


图1 倒置相差显微镜下接种培养于单层胶原4 h的猪肝细胞 (×200)

Fig 1 Phase-contrast photomicrographs of hepatocytes cultured for 4 h on a single layer of collagen (×200)

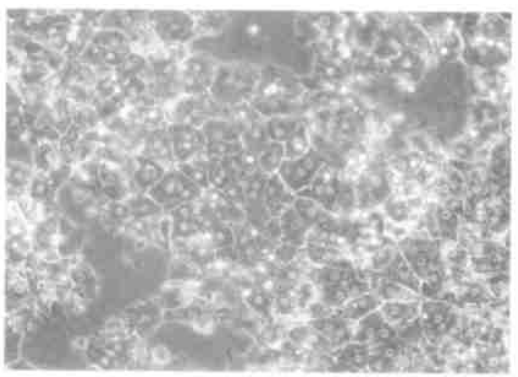


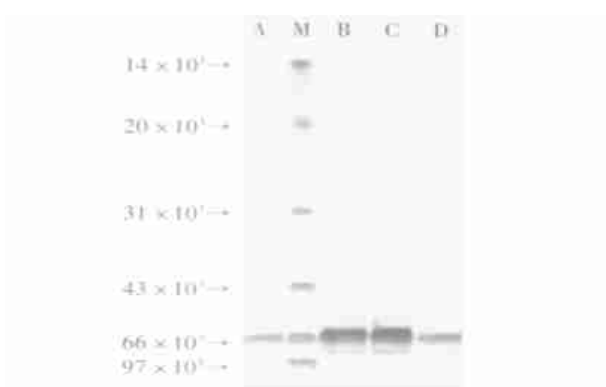
图2 倒置相差显微镜下三明治培养5 d的猪肝细胞 (×200)

Fig 2 Phase-contrast photomicrographs of hepatocytes cultured for 5 d in the sandwich system (×200)

相比之下，单层胶原培养的猪肝细胞48～72 h后，细胞进一步向扁平样伸展，胞浆变薄，肝细胞的多边形特征已不再典型。

2.2 猪肝细胞的白蛋白分泌

采用SDS-PAGE电泳在三明治培养过程中均能检测到猪肝细胞分泌的猪白蛋白，且含量较高，见图3。



M: Low-range protein molecular weight markers; Lanes A, B, C, D are culture media of 1, 3, 5, 7 d

图3 SDS-PAGE中培养猪肝细胞的白蛋白检测

Fig 3 Detection of porcine albumin in cultured hepatocytes by SDS-PAGE

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

2.3 培养上清 LDH 检测

在 1 周的培养过程中，双层胶原凝胶三明治培养肝细胞上清 LDH 的含量波动于 24.8～58.6 U/L。不同批次培养上清的 LDH 含量差别不大($P>0.05$)。

3 讨论

传统的肝细胞培养为普通单层贴壁培养，一般系借助肝细胞的粘附贴壁生长特性，将其接种于玻璃或塑料培养板/瓶内，用培养液在 37 ℃、5%CO_2、95%O_2 条件下培养。由于此种培养方式很难模拟体内肝细胞状态，故培养效果欠佳，仅能满足一般实验，不符合一些特殊肝细胞研究的要求，特别是生物人工肝等所需高密度、高活性培养肝细胞的需求，故探索高活性培养肝细胞的方法成为相关研究的重要内容之一。

已知，正常肝细胞呈三维立体结构排列于肝小叶内，肝细胞-肝细胞之间、肝细胞-肝非实质细胞之间以及肝细胞-生物基质之间均存在着复杂的联系。其中，基质在维持肝细胞功能方面起着重要的作用[3]。大量研究显示，采用胶原凝胶将鼠肝细胞固定成三明治状培养，可提供近似于体内状态的基质环境，更有利于肝细胞的生长和特殊功能的发挥[4,5]。本实验在对刚分离的新生中国实验小型猪肝细胞的双层胶原夹心培养过程中显示，三明治培养的猪肝细胞保持了良好的蛋白分泌功能和形态学特征，其 LDH 漏出量较少。提示双层胶原凝胶三明治式固定法能为乳猪肝细胞提供较好的培养与生长条件，有利于猪肝细胞高活性的培养和在生物人工肝等研究中的应用[6,7]。

胶原三明治夹心培养肝细胞虽能为肝细胞提供良好的基质环境，但该培养方式的肝细胞仍为单层贴壁状态，即使形式肝板样，仍不能像体内肝细胞那样具备正常的三维立体结构，也缺乏与肝脏其它种类细胞的联系。因此，很有必要在三明治夹心培养的基础上，进一步进行肝细胞－肝非实质细胞－胶原凝胶混合三维立体培养的探索，通过提供更加近似于体内状态的环境，培养出符合生物人工肝等研究要求的肝细胞。

参考文献：

[1] Stange J, Mitzner S. Cell sorces for bioartificial liver support[J]. Int J Artif Organs, 1996, 19(1): 14－17.
[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] Moghe P V, Berthiaume F, Ezzell R M, *et al*. Culture matrix configuration and composition in the maintenance of hepatocyte polarity and function[J]. Biomaterials, 1996, 17(3): 373－385.
[4] 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, 46(5): 1046－1056.
[5] Liu X, LeCluyse E L, Brouwer K R, *et al*. Biliary excretion in primary rat hepatocytes cultured in a collagen-sandwich configuration[J]. Am J Physiol, 1999, 277(1 Pt 1): G12－21.
[6] 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.
[7] Sielaff T D, Hu M Y, Amiot B, *et al*. Gel-emtrapment bioartificial liver therapy in galactosamine hepatitis[J]. J Surg Res, 1995, 59(1): 179－184.

（编辑 薛国文）

文章编号：1000-5404(2003)06-0477-01

个案与短篇

垂体腺瘤组织质地的术前判定

Preoperative evaluation of the tissue in pituitary tumor

田 军，陈 忠，曹楚南 （贵阳市脑科医院神经外科，贵阳 550005）

我们通过对 45 例垂体腺瘤手术病人的回顾性分析，以期了解病人的临床表现、相关激素及 CT、MRI 与肿瘤组织质地软硬韧度的关系，现报告如下。

本组 45 例，男性 14 例，女性 31 例，年龄 16～67 岁，视力障碍 20 例(有光感 2 例)；内分泌改变 27 例，其中停经或月经不正常 25 例，泌乳 22 例，25 例病人泌乳素(测定增高 20 例，血清 PRL 平均值＞100 μg/L)。5 例肢端肥大症，生长素平均＞100～750 μg/L，同时伴有高血糖症。4 例柯兴综合征，肾上腺皮质激素平均＞100 μg/L。

CT 平扫低密度、等密度 18 例，高密度 4 例，CT 增强明显 27 例，稍有增强 6 例，无增强 7 例。MRI 平扫低信号、等信号 23 例。MRI 检查：T_1 有增强的 22 例。MRI 无明显增强 8 例。MRI 检查：T_1 低信号 7 例，T_2 低信号 5 例，T_2 高信号 23 例。

手术方式：采用经额下垂体腺瘤切除术，经翼点垂体腺瘤切除术，经口～鼻蝶入路垂体腺瘤切除术。术中见肿瘤组织质地较软有 23 例，肿瘤组织质地较硬 4 例，质地韧硬 3 例。3 例肿瘤组织质地较韧硬的特殊病例；手术中切除肿瘤非常困难。回顾术前检查，ACTH 偏高，临床表现以 Cushing 综合征为主。CT 检查：肿瘤组织密度偏高；MRI 检查：T_1 像肿瘤组织信号偏低，均提示肿瘤组织无明显强化。

（下转 480 页）

作者简介：田 军(1960－)，男，山东省成武县人，副主任医师，主要从事神经外科专业方面的研究。电话：(0851)5524926

收稿日期：2002-10-21；修回日期：2002-12-30

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