DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.08.037
第25卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 8
738 2003年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2003

技术方法

文章编号:1000-5404(2003)08-0738-03

2-乙酰氨基芴对大鼠肝卵圆细胞增殖模型的影响

Effects of 2-acetaminofluorene on hepatic oval cell proliferation in rats

蔡尚原,郎 松,陈耀凯,王宇明,李俊刚,刘国栋 (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 在建立大鼠肝卵圆细胞增殖模型的基础上,进一步研究2-乙酰氨基芴(AAF)对大鼠肝卵圆细胞增殖的影响。方法 按本室建立和改进的方案建立大鼠肝卵圆细胞增殖模型,AAF剂量分别按10、20及25 mg/kg给予,同时设单纯切肝对照组、假手术对照组及生理盐水对照组,重点观察大鼠肝组织结构变化及不同剂量下肝卵圆细胞增殖情况。结果 3个对照组大鼠肝组织内均未见到肝卵圆细胞,而3个实验组均见肝卵圆细胞增生;与10 mg/kg剂量组比较,20 mg/kg及25 mg/kg两个剂量组大鼠肝组织内的肝卵圆细胞增殖更加明显,但25 mg/kg剂量组大鼠死亡率较高,存活大鼠健康状况差。结论 AAF可诱导大鼠肝卵圆细胞增殖,剂量以20 mg/kg较为理想。

近年来,对肝细胞再生机制的探索研究已进入了新的阶段。肝干细胞(Hepatic stem cells)因为其在肝脏胚胎发育、生长、再生及癌变等过程中可能发挥的重要作用而备受关注[1],其中肝卵圆细胞(Hepatic oval cells)是研究的重点之一。此前我们利用2-乙酰氨基芴(2-acetaminofluorene,AAF)已成功建立了大鼠肝卵圆细胞增殖模型[2],为进一步研究AAF对大鼠肝卵圆细胞增殖程度的影响,本研究观察了不同剂量AAF对大鼠肝卵圆细胞增殖参数及肝组织结构的影响。

1 材料与方法

1.1 动物和试剂

190只雄性健康Wistar大鼠由第三军医大学实验动物中心提供,3~4月龄,体质量130~150 g。AAF为Sigma公司产品,溶于分子量为400的聚乙二醇(Sigma公司产品)。小鼠大鼠OV6抗体由美国Brown大学Hixson教授惠赠,细胞角蛋白CK19抗体为Chemicon公司产品(克隆号E6)。小鼠抗大鼠甲胎蛋白(AFP)抗体购自北京中山生物制品公司。

1.2 大鼠肝卵圆细胞增殖模型的建立[2]

全部大鼠共分为3个实验组和3个对照组。①实验Ⅰ组(n=40):实验第1天开始分笼饲养,自由饮水,基础饲料(第三军医大学实验动物中心制备),于第3周开始,除基础饲料外,每天以0.02%AAF灌喂,剂量为10 mg/kg。第5天将实验动物在戊巴比妥钠麻醉下行70%切肝术(切除肝左叶与中叶),术后继续灌喂AAF,7 d后改基础饲料至实验结束。②实验Ⅱ组(n=40):除按20 mg/kg给予AAF灌喂外,其余同实验Ⅰ组。③实验Ⅲ组(n=40):除按25 mg/kg给予AAF灌喂外,其余同实验Ⅰ组。④单纯切肝对照组(n=30):于实验第1天起给基础饲料,自由饮水,第5天行70%切肝术,给基础饲料至实验结束。⑤假手术对照组(n=20):手术时仅将肝左叶与中叶于腹腔外置适当时间,然后送还腹腔,缝合切口,其余同单纯切肝对照组。⑥生理盐水对照组(n=20):用生理盐水替代AAF灌喂大鼠,其余同实验组。

1.3 标本处理

实验大鼠在2%戊巴比妥纳麻醉下开腹,观察记录肝脏大体病变后,经门静脉插管灌注预冷4%多聚甲醛PBS缓冲液至肝脏呈黄白色,于肝脏病变部位或右肝前叶,取小块组织用4%多聚甲醛继续固定12~48 h,常规石蜡包埋,5 μm连续切片备用。

1.4 肝卵圆细胞增殖面积测定

采用Tiger细胞图像分析系统(购自重庆大学ICT中心)测定大鼠肝组织内肝卵圆细胞增殖面积。

1.5 肝卵圆细胞鉴定

内容包括:①在光学显微镜下观察细胞形态特征;②采用免疫组织化学方法检测增殖细胞CK19、OV6及AFP作为肝卵圆细胞标志物。连续石蜡切片经脱蜡至水后,以3%过氧化氢溶液浸泡10 min灭活内源性过氧化物酶;抗原热修复后以正常山羊血清封闭,然后加第一抗体工作液4 ℃过夜;加生物素标记的第二抗体37 ℃ 45 min;加结合过氧化物酶链霉亲和素37 ℃ 45 min;加新鲜配制的DAB,显微镜下观察5~10 min,棕黄色染色为阳性信号;以PBS化替第一抗体作为阴性对照。

1.6 统计学处理

采用t检验。

2 结果

2.1 实验动物耐受情况

3个实验组大鼠因感染及意外死亡损失情况是:Ⅰ组2只,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070347)

作者简介:蔡尚原(1964-),男,河南省开封市人,主治医师,主要从事肝病临床方面的研究,发表论文5篇,现在河南省开封市传染病院工作,开封 475001。电话:(0378)2873154
通信作者:陈耀凯,电话:(023)68754475-8006

收稿日期:2002-05-18;修回日期:2003-03-15

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

Ⅱ组4 只, Ⅲ组 9 只死亡。实验Ⅲ组中存活的 31 只大鼠健康状况较差, 食欲及体质量下降较为明显。

2.2　肝脏标本大体变化

实验Ⅰ组在整个实验阶段以肝脏充血、饱满为主要表现, 实验Ⅱ组及Ⅲ组除肝脏明显充血、肝叶边缘圆钝外, 约从第 6 天起肝脏表面及切面可见散在针尖大小圆形病灶, 多数不凸出肝表面, 尤以第 10 天左右为甚。在 3 个对照组中, 除单独切肝对照组大鼠于术后肝体积增大外, 余未见异常改变。

2.3　肝卵圆细胞增殖情况

实验组术后初期肝小叶完整、肝板排列规则, 肝内充血明显、部分肝细胞胞质疏松, 个别肝细胞呈小灶状坏死、肝汇管区内偶见体积小、胞质少、核呈卵圆形或不规则形的小细胞。约在 1 周左右, 多数肝小叶出现体积较小、胞质嗜碱性的卵圆形细胞增生灶, 这种增生灶多位于汇管区, 其内可见增生的小胆管。随后几天, 在肝细胞及卵圆形细胞增生灶中出现大量新生胆小管。后期增生结节明显减少, 汇管区可见少数卵圆形细胞聚集, 而更多的肝细胞胞质疏松, 出现肿胀, 肝血窦扩张, 见图 1。对照组大鼠肝组织内未见到卵圆形细胞增殖, 10 mg/kg 剂量组可见一定数量的卵圆形细胞增殖, 而 15、20 mg/kg 两个剂量组肝组织内均见明显的卵圆形细胞增殖反应且细胞增殖期明显长于实验Ⅰ组。免疫组化染色结果显示, 增生的卵圆形细胞胞浆 CK19、OV6 及 AFP 呈阳性信号, 见图 2。

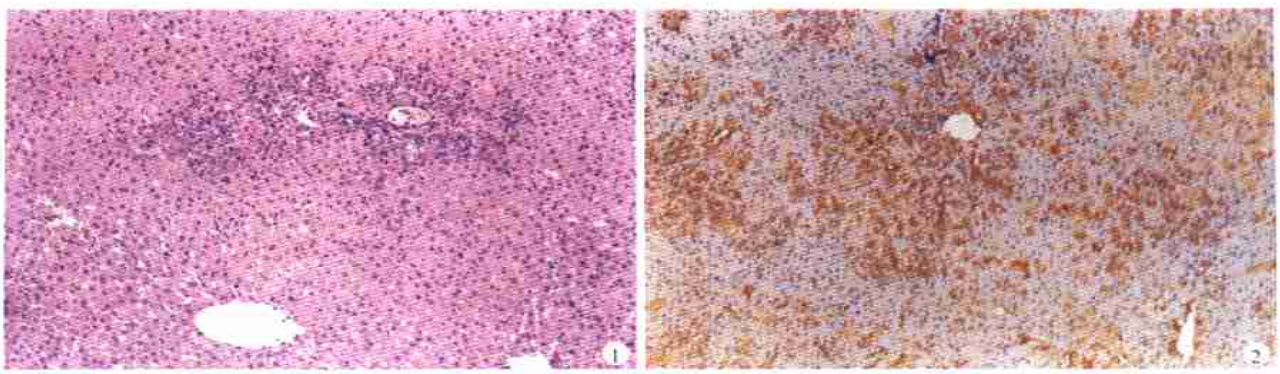


图 **1**　**20 mg/kg** 剂量组术后第 **7** 日汇管区附近可见明显的卵圆细胞增殖　(S-P× 100)

图 **2**　肝卵圆细胞增生灶 **CK19** 染色呈阳性信号　(S-P× 100)

2.4　肝卵圆细胞增生灶面积及密度

采用 Tiger 细胞图像分析系统测定了术后不同时相肝卵圆细胞增生灶面积的变化, 发现术后 9~13 d 细胞增生灶的面积最大, 见表 1。实验Ⅱ组、Ⅲ组肝组织卵圆形细胞增殖面积明显大于实验Ⅰ组, 见表 1。选择细胞增殖最为明显的视野, 观察细胞增生灶的密度。结果发现术后 7、9、11、13 d 实验Ⅱ、Ⅲ组肝卵圆细胞增生灶密度明显高于实验Ⅰ组。

表 **1**　**3** 个实验组在 **40**× 视野下肝卵圆细胞增生灶平均面积($\bar{x} \pm s$)

	7 d		9 d		11 d		13 d		15 d	
	增生灶数量	面积(μm^2)	增生灶数量	面积(μm^2)	增生灶数量	面积(μm^2)	增生灶数量	面积(μm^2)	增生灶数量	面积(μm^2)
实验Ⅰ组			5	15.2±10.2	7	22.3±9.5	6	43.3±14.0		
实验Ⅱ组	6	26.2±6.9	6	51.3±24.0*	7	72.6±30.2*	7	61.1±25.8*	6	26.3±15.5
实验Ⅲ组	6	31.3±15.1	8	55.2±17.0*	8	77.0±22.7*	9	60.3±21.1*	6	25.5±10.3

*: $P < 0.01$ 与实验Ⅰ组比较

3　讨论

肝卵圆细胞活化模型是目前最常用的肝脏干细胞动物模型[3]。此类模型的基本原理是: ①通过肝脏大部分切除或用其它方法致肝损伤, 以刺激肝再生; ②用肝脏毒性药物抑制肝细胞增殖。这样, 当肝细胞的增殖发生障碍而肝脏又有再生需求时, 肝卵细胞即开始活化并进而向肝细胞演变, 最终使肝脏得以再生。本研究着重观察了 AAF 对大鼠模型肝组织结构及肝卵圆细胞增殖的影响。结果发现在整个实验过程中, 大鼠肝组织大致经历了肝细胞损伤、肝卵圆细胞增生及肝组织重建三个阶段。在肝卵圆细胞增生方面, AAF 剂量为 20 mg/kg 时, 肝卵圆细胞增殖明显且持续时间长, 动物耐受性好。AAF 剂量为 25 mg/kg 时, 虽然肝卵圆细胞增殖很明显, 但动物耐受性差, 死亡率较高, 存活的大鼠食欲及体重亦明显下降, 表明 AAF 高于这一剂量时动物耐性差。

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

关键词：2-乙酰氨基芴；大鼠；肝卵圆细胞；增殖
中图法分类号：R322.47；R329.28 文献标识码：B

参考文献：

[1] Thorgeirsson S S. Hepatic stem cells[J]. Am J Pathol, 1993, 142(5): 1331－1333.
[2] 陈耀凯，王宇明，李俊刚，等. 大鼠肝卵圆细胞增殖模型的建立与优化[J]. 中华肝脏病杂志，2002，10(3)：185－188.
[3] Alison M, Golding M, Lalani E N, *et al*. Wholesale hepatocytic differentiation in the rat from ductular oval cells, the progeny of biliary stem cells [J]. J Hepatol, 1997, 26(2): 343－352.

（编辑 刘洪娥）

技术方法

文章编号：1000-5404(2003)08-0740-02

应用生物反应器培养Vero细胞制备甲肝病毒

Preparation of hepatitis A virus by cultivation of vero cells with bioreactor

孙明波，李国良，李卫东，张丽旌，徐其武，匡祥晶，姜述德，廖国阳 （中国医学科学院中国协和医科大学医学生物学研究所，昆明 650118）

提 要：目的 研究用生物反应器培养Vero细胞制备甲肝病毒W株的可行性。方法 Vero细胞悬浮吸附HAV W株后，接种到搅拌式生物反应器中，用微载体进行培养，对营养物质、代谢产物及病毒的增殖进行分析。结果 经四周的培养，病毒收获时，细胞密度达1.4×10^6/ml，甲肝病毒抗原滴度达1∶64。结论 W株已适应于Vero细胞中，用生物反应器培养产毒，有较好的应用前景。

甲肝病毒(Hepatitis A virus, HAV)灭活疫苗经过10多年的研究开发，目前已有HAVRIX®、VAQTA®、AVAXIM®及EPAXAL®等商品疫苗在全世界广泛使用，我国目前还没有甲肝灭活疫苗投放市场。由于甲肝灭活疫苗使用的抗原量远大于减毒活疫苗，传统的静置和转瓶培养方法难以满足需要。应用微载体培养技术能克服传统方法的缺陷，可大规模自动化培养细胞及病毒，满足市场对疫苗的需求。目前，应用微载体培养Vero细胞已成功制备了狂犬疫苗和小儿麻痹疫苗等病毒疫苗，取得了良好的效果。若能将此技术应用到甲肝灭活疫苗的生产中，将会取得良好的社会效益和经济效益。

HAV适应于Vero细胞的报道很有限，国内应用Vero细胞分离及适应甲肝病毒很不理想。国外也未见用微载体系统培养Vero细胞制备甲肝疫苗的成功报道。为此，我们用本实验室分离并在Vero细胞上适应的甲肝病毒W株，采用微载体Vero细胞进行培养，与静置培养相比较，研究生物反应器培养W株的可行性，探索较为合理的培养方法[1~3]。

基金项目：云南省自然科学基金资助项目(1999C0023Q)
作者简介：孙明波(1969－)，男，云南省昆明市人，硕士，助理研究员，主要从事病毒疫苗方面的研究，发表论文5篇。电话：(0871)8334519
通信作者：廖国阳，电话：(0871)8334330
收稿日期：2002-04-15；修回日期：2002-09-11

1 材料与方法

1.1 生物反应器

7 L生物反应器为荷兰Applikon公司产品。工作体积4 L，培养时设定控制值后，设备自动调节O_2、N_2、CO_2(纯度99.9%)和空气的混合比例以及碳酸氢钠的加入量来控制溶氧和pH。

1.2 微载体

使用Phamacia Cytodex-I型微载体。

1.3 培养基

培养基使用MEM(Gibco)。补加青链霉素100 U/ml，葡萄糖10 mmol/l，谷氨酰胺5 mmol/L，细胞培养加入10%新生牛血清，病毒培养及灌流液加入2%新生牛血清。

1.4 细胞和病毒

Vero细胞来源于ATCC。本室保存，实验时使用传代细胞为142~146代。病毒株为W株，由本实验室分离和适应，抗原滴度为1∶128。

1.5 病毒吸附

将细胞在T250培养瓶上进行静止培养，待培养5~6 d细胞长成单层后，消化收集细胞制成细胞悬液，装入Bellco搅拌瓶中，加入甲肝病毒W株，置于35 ℃，以30 r/min悬浮吸附6 h。

1.6 细胞及病毒培养

Vero细胞吸附HAV后，接种到发酵罐中，接种细胞浓度1×10^5/ml。进入发酵罐培养后，pH控制在(7.2±0.2)，温度(37±0.2) ℃，溶氧控制在40%空气饱和度，搅拌速度40 r/min。待细胞数达到1×10^6/ml左右时，转入病毒培养，此时，pH控制在(7.2±0.2)，温度(35±0.2) ℃，溶氧控制在25%空气饱和度，搅拌速度50 r/min。同时进行灌流，流量为20 ml/h。当培养28

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