DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.04.059
第23卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 4
2001年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2001

文章编号:1000-5404(2001)04-0487-02

技术方法

分离人肝细胞的超低温保存

Preservation of isolated human hepatocytes in ultra-low temperature

刘 俊,王英杰,王宇明,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 探索一种肝细胞超低温冻存的方法。方法 将分离的肝细胞洗涤(50× g,3 min)后,用自制配方的肝细胞保存液制成悬浮液,置于-80 ℃超低温冰箱内冻存,两周后取冻存的肝细胞常规方法复苏,台盼蓝染色、计数,普通方法接种培养观察,以同期分离的细胞接种培养为对照。结果 冻存的肝细胞解冻后存活率较高,经台盼蓝染色其活率为95%±1%,接种培养的细胞贴壁率为80%±2%,其白蛋白的合成功能与对照组的白蛋白合成功能差异无显著性,细胞生长良好。结论 人肝细胞可在-80 ℃超低温条件下保存,这可望成为贮存肝细胞的有效办法之一。

近年来应用肝细胞移植和混合生物人工肝支持系统治疗重肝病人在临床上已取得良好的效果,为需肝移植的危重病人赢得了等待肝脏供体的时间,但正如肝移植所面临肝脏供体来源不足的问题一样,肝细胞移植和混合生物人工肝支持治疗所需肝细胞往往也面临来源不足。故研究建立一种肝细胞的长期冻存方法显得迫在眉睫,为此我们探索了一种-80 ℃超低温冻存肝细胞的方法。

1 材料和方法

1.1 肝细胞分离[1,2]

取4~7月胎龄的引产死胎(本院妇产科提供),用碘酒及75%的消毒酒精消毒腹腔的皮肤,打开腹腔无菌摘取肝脏,先以预温37 ℃无Ca^{2+}/Mg^{2+}的Hanks液沿肝组织血管进行第一步灌流,待流出液体转清后,改用37 ℃含Ca^{2+}的0.05%胶原酶(Sigma产品)液进行第二步灌流,速度为5 ml/min,待肝包膜下组织呈龟背状裂隙,胶原酶液充满包膜下后停止,用镊子钝性撕碎,去除其它结缔组织,置胶原酶液37 ℃水浴振荡消化20 min,200目钢网过滤,50× g离心3 min,弃上清加RPMI-1640培养液如上述离心,反复洗涤3次获取肝细胞。分离的细胞经台盼蓝染色、计数。

1.2 肝细胞冻存与复苏

将细胞用自制的冻存液制成1×10^7/ml的细胞悬液,取无菌冻存管(2 ml)2支,分别加入1.2 ml肝细胞悬液,再加入20%小牛血清,同时轻轻加入10%~15%的二甲亚酚等,用逐级降温法置于-80 ℃冰箱(SANYO公司)内冻存。取同批分离的部分肝细胞用RPMI-1640培养液制成2×10^5/ml的细胞悬液,再加20%小牛血清接种培养做为对照。2周后取出冻存的肝细胞立即置于37 ℃水浴箱内解冻复苏。

1.3 观察方法

将复苏的肝细胞立即用台盼蓝染色、计数、计算成活率。常规方法接种培养24 h后,倒置显微镜下计数,换算出细胞的贴壁率,观察其生长与形态变化定期收集培养上清,用Beckman全自动生化分析仪检测其白蛋白含量。

2 结果

2.1 复苏后肝细胞的存活率

取出冻存的肝细胞立即复苏其活率为95%±1%,与对照组97%±2%差异无显著性($P>0.05$)。

2.2 复苏后培养的肝细胞的形态及贴壁率

复苏的肝细胞常规培养24 h后观察其贴壁率为80%±2%,与对照组82%±1%差异无显著性($P>0.05$),细胞生长较好,见图1。

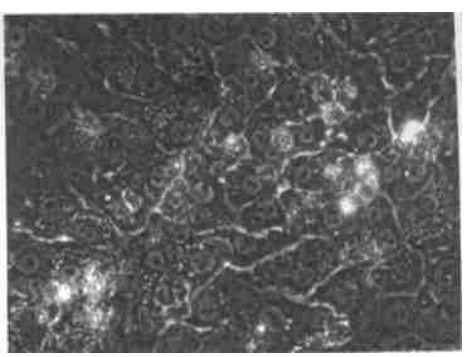


图1 冻存肝细胞复苏后培养第6天

2.3 冻存前后培养的肝细胞合成白蛋白的变化

分别于24、48、72及96 h收集冻存培养和对照组肝细胞的上清,并补充含同样浓度小牛血清的RPMI-1640培养液,将收集的培养液经13 000 r/min离心3 min,测白蛋白含量,两组合成白蛋白的功能差异不显著,见图2。

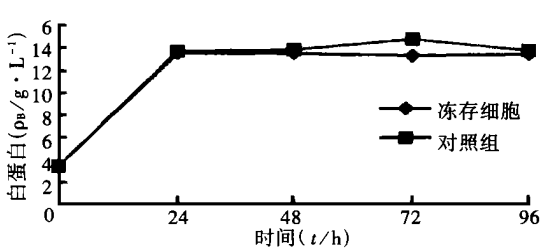


图2 冻存前后培养的肝细胞不同时间合成白蛋白的变化

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30027001);国家"九五"攻关资助项目(96-920-12-02)
作者简介:刘 俊(1973-),男,安徽省无为县人,技师。电话:(023)68754289
收稿日期:2000-07-10;修回日期:2000-09-21

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

3 讨论

目前，体外混合生物人工肝支持系统和肝细胞移植在治疗肝衰竭的临床应用中已取得了良好的效果，但肝细胞来源不足成了较重要的问题。肝细胞的低温保存技术研究已开展多年，但迄今为止，仍然没有一种较为理想的冷冻保存肝细胞的标准方法，冻存后肝细胞的活率明显降低，稍长时间低温保存肝细胞的功能受到影响。因此人们正在探索，试图找到一种更好的保存肝细胞的方法。目前国外有用 UW 液低温保存肝细胞的方法[3,4]，是将分离的肝细胞用 UW 液制成细胞悬液置于 4 ℃冰箱内保存。这种方法简便，能达到保存肝细胞的目的。但是 UW 液价格昂贵，只能短期保存肝细胞，且复苏后细胞的活率不高。而本室所采用自制配方的超低温保存肝细胞的方法，所用试剂价格便宜，能够较长时间保存肝细胞，且复苏后活率较好，经台盼蓝染色发现其存活率大于 90%，且保持了肝细胞的组织特异蛋白的合成功能，将复苏的肝细胞培养 24 h 后取上清液离心测白蛋白，发现其含量每升约增长了 10 g 左右。因此，本法是一种较好的肝细胞冻存的方法。它给生物人工肝支持系统应用于临床的推广起到了推动作用，为肝细胞的远程运输提供了一种可行的方法。

关键词：肝细胞；超低温冻存
中图法分类号：R318.52；R322.47 文献标识码：B

参考文献：

[1] 王英杰，李梦东，王宇明，等. 体外生物人工肝支持作用的实验研究[J]. 中华肝脏病杂志，1999，7(1)：31－33.
[2] 王宇明，陈国致，董家鸿，等. 分离肝细胞的体外灌流法及其应用[J]. 中华实验外科杂志，1994，11(增刊)：45－46.
[3] Olinga P，Merema M，Sloff M J，*et al*. Influence of 48 hours of cold storage in University of Wisconsin organ preservation solution on metabolic capacity of rat hepatocytes[J]. J Hepatol，1997，27(4)：738－743.
[4] Marsh D，Hjelmhaug J A，Vreugdenhil P K，*et al*. Hypothermic preservation of hepatocytes. III. effects of resuspension media on viability after up to 7 day of storage[J]. Hepatology，1991，13(3)：500－508.

（编辑 汪勤俭）

技术方法

文章编号：1000-5404(2001)04-0488-02

可生物降解材料聚乳酸及聚乙二醇改性共聚物的合成与回收试验

Experiment on the synthesis and retrieval of biodegradable polymers of polylactide and polylactide-polyethylene glycol

任建敏[1]，彭承琳[1]，王缚鲲[2]，邹全明[2]，王 宁[2]（[1] 重庆大学生物工程学院，重庆 400044；[2] 第三军医大学医学检验系临床微生物学与免疫学教研室，重庆 400038）

提 要：目的 以廉价易得的食用乳酸为原料，采用两步法合成聚乳酸(PLA)及聚乙二醇改性共聚物(PLEA)，并介绍了该类聚合物的回收再用技术。方法 利用测定聚合物的特性粘度与分子量分布，探讨合宜的反应条件。结果 该聚合反应条件为：反应温度为 140～160 ℃、反应时间 24～48 h、引发剂/单体(*W*/*W*)在 0.01%～0.04%范围较为合宜。利用本法的回收再用技术，丙交酯的回收率在 80%以上。结论 聚乳酸及共聚物的聚合反应，伴随有分子内与分子间的酯转移，与反应条件密切相关。

聚乳酸(Polylactide，PLA)及聚乙二醇改性共聚物(PLEA)毒性小、可生物降解，可有效改善与蛋白质等亲水性物质的生物相容性，延长在生物体内存留的半衰期，在靶向药物载体的研究中意义重大[1,2]。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及规格

乳酸(食品级，80%～85%)，PEG(M_w＝2 000)分析纯，La_2O_3 国产分装，ZnO 分析纯，Sn(Oct)$_2$ 为 Sigma 公司提供，其它溶剂为国产分析纯。

作者简介：任建敏(1964－)，男，四川省渠县人，博士研究生，讲师，主要从事生物医学材料与缓释靶向药物载体方面的研究，发表论文 20 余篇。电话：(023)68752315
收稿日期：2000-07-20；修回日期：2000-11-17

1.2 D,L-丙交酯制备

丙交酯的合成参照参考文献[3]，经改进催化剂用 ZnO/La_2O_3(4∶1 比例，*W*/*W*)，母液回收循环再用，产率由 30%提高到 40%。

1.3 PLA 与 PLEA 的合成

参考文献[1,4]方法，分别在 140 ℃，160 ℃，180 ℃聚合数小时，白色固体(或淡黄色)用丙酮-水体系纯化，真空干燥 24 h，测聚合物特性粘度与分子量分布。

1.4 聚合物特性粘度与分子量分布的测定

所用仪器：Waters，HPLC/GPC 244 高效液相色谱仪。

1.5 聚合物降解与回收试验

聚合物加入一定量的稀盐酸溶液，在水浴中搅拌加热，待聚合物降解成的乳白色粉状微粒后，置于圆底烧瓶中，加入催化剂搅匀，后同丙交酯的制备方法。

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