DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.03.004

培养人肝细胞用于生物人工肝的初步研究*

王英杰** 李梦东 王宇明 聂青和 陈国致 顾长海 王小红 黄艳萍 (第三军医大学附属西南医院传染病中心) 重庆, 630038

提 要 目的: 探讨培养人肝细胞与肝非实质细胞用于体外生物人工肝支持系统(EBLSS)及其对暴发性肝衰竭(FHF)进行支持治疗的可能性。方法: 首先将由简易体外两步灌流法分离获取的肝细胞、肝非实质细胞进行限制贴壁条件下的混合培养。然后置空心纤维型生物反应器和辅助循环系统组成的 EBLSS,对无肝模型犬进行人工肝支持。结果: 分离所得成活率高达 94% 以上的肝细胞、肝非实质细胞经定时反复旋转振荡后形成多细胞球形聚集体,浮游生长并保持良好的形态特征和白蛋白分泌功能。在约含 1× 10^8个肝细胞、肝非实质细胞的 EBLSS支持下,无肝犬血氨浓度升高缓慢,与对照组差异显著($P < 0.01$)。EBLSS循环过程中,肝细胞及肝非实质细胞在 5 h 内仍能保持较好的细胞活力。结论: 选择人肝细胞用高密度球形聚集培养技术加以培养,可用于生物人工肝,对 FHF起到支持治疗作用。

关键词 细胞培养;肝细胞;生物人工肝

中图法分类号 R318.1, R575.3

近年来,将培养肝细胞应用于人工肝支持系统(EBLSS)所产生的新一代生物型人工肝正在迅速发展。大量的实验研究证明,这种以培养肝细胞为主要材料的生物人工肝系统,较以往非生物型人工肝更具解毒代谢作用,同时兼有肝细胞特殊的生物合成功能,因而可起到更满意的人工肝支持效果[1,2]。

目前国外应用于生物人工肝系统的细胞主要来源于动物的肝细胞和肿瘤的细胞株[3,4]。从临床治疗肝衰竭患者的角度分析,上述细胞显然不及同源人肝细胞更为理想[5]。然因受供体等因素的限制,迄今有关研究及应用尚未见报道。作者选择人肝细胞及肝非实质细胞为材料,经较长时间原代球形聚集培养后,进行了体外生物人工肝支持系统(EBLSS)的初步研究。

1 材料和方法

1.1 肝细胞、肝非实质细胞的分离

选择人肝细胞,肝组织来自非肝病死亡的供肝者,低温条件下移入实验室,简易体外两步灌流法[6]分离细胞,灌流液分别为无 Ca^{2+}/Mg^{2+} 的 Hanks液和 0.05% 的胶原酶液(Sigma产品),消化细胞经差速离心后获肝细胞和肝非实质细胞。

1.2 肝细胞、肝非实质细胞的混合聚集培养

培养方法在文献[7]的基础上稍加改进。先将所得肝细胞、肝非实质细胞按 2:1比例混合,在 37℃水浴中轻轻旋转振荡 1 h,再移入被覆聚羟乙基异丁烯酸的培养瓶,常规条件下继续定时旋转振荡培养,以自然静置沉降法每 24 h换液 1次。

1.3 EBLSS的组成

由上述方法分离培养的肝细胞-肝非实质细胞与生物反应器、辅助循环装置三部分组成 EBLSS。其中生物反应器为空心纤维型,其有效交换面积为 0.34 m^2,辅助循环装置由血液透析仪改装而成。

1.4 动物模型的建立

实验动物为犬,由本校实验动物中心提供,体重 11 kg~ 14 kg, 性别不限。戊巴比妥钠(30 mg/kg)静脉麻醉后,常规方法消毒、开腹、分离血管,行门静脉-下腔静脉侧侧吻合术。吻合成功后,结扎吻合口上方门静脉和肝动脉,形成"无肝"模型。

1.5 EBLSS实验方法

犬无肝模型建立之后,将 10只动物随机分为两组进行 EBLSS支持与空白对照实验,支持组使用 20 ml混合球形体细胞悬液(约 10^8个细胞)。EBLSS用肝素液预冲后与犬股动、静脉插管连接,形成闭路循环,血液循环 5 h,速度(30~ 50) ml/min,循环过程肝素抗凝量为 50 u·kg^{-1}·h^{-1},用犬血氨变化和支持过程中肝细胞活力作为 EBLSS性能评价指标。

1.6 观察指标

1.6.1 细胞存活率 采用台盼蓝拒染试验。

1.6.2 细胞形态学观察 分别采用 Olympus倒置相差生物显微镜、AMRAY-1000B型扫描电镜(常规方法制样)对细胞的形态进行动态观察。

1.6.3 培养细胞的白蛋白合成能力 以溴甲酚绿法在 CX-7 Beckman全自动生化分析仪上测定白蛋白含量。

1.6.4 球形聚集细胞贴壁能力 定期吸取少量聚集细胞,于被覆胶原的 24孔培养板静置培养 24 h,相差显微镜下随机计

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39370189

** 王英杰,男,36岁,博士

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

数视野内贴壁球体所占比例。

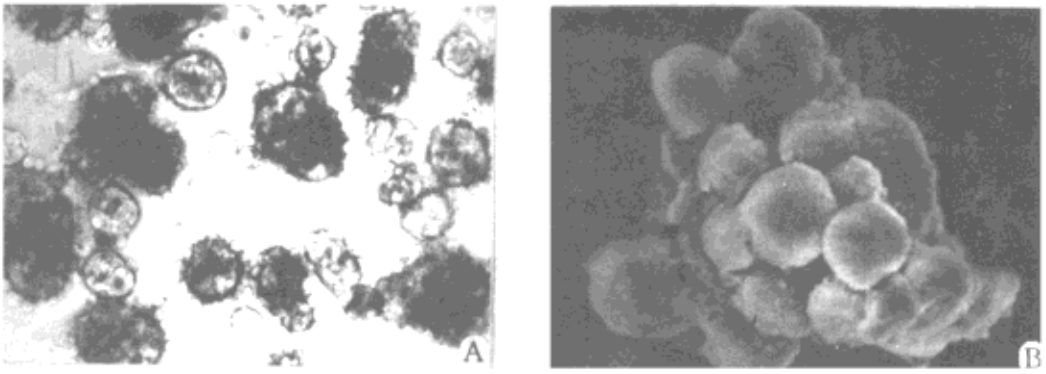
2 结果

2.1 分离细胞的产量和存活率

采用体外灌流法对肝组织标本进行细胞分离,以每 100 g体重活细胞量计,所得肝细胞、肝非实质细胞的混合产量为(13.6~14.7)×10^7/100 g,总产量分别为 1.9×10^9和 3.4×10^9个。分离细胞的即时存活率达 94%。

2.2 多细胞球形聚集培养及其形态特征

肝细胞、肝非实质细胞混合置于 50 ml离心管内,在 37℃水浴中轻轻旋转振荡 1 h后,分离的两类细胞出现明显的聚集粘连倾向,呈大小不等的斑片状或串珠状细胞聚集体,悬浮于培养液中。移入被覆贴壁抑制剂的玻璃培养瓶内定时旋转振荡培养 4 h~48 h,细胞间的粘附聚集逐步紧密,形态由细胞团块渐过渡至典型的多细胞球形聚集体,见附图。在以后培养的 3周时间内,一直保持完整的多细胞混合聚集特征,悬浮生长。



附图　肝细胞-肝非实质细胞多细胞球形聚集体　A:相差显微镜(× 200)　B:扫描电镜(× 1300)

Fig　Multicellular spheroid aggregates of human hepatocytes and non-parenchymal liver cells

A: Phase-contrast microscope(× 200)　B: SEM(× 1300)

2.3 混合聚集培养肝细胞的白蛋白合成

混合肝细胞聚集培养开始后,培养上清中白蛋白含量逐日增加,至培养 1周~2周时达到高峰,第 3周开始有所减少。

2.4 实验犬血氨浓度比较

支持组与对照组经 EBLSS循环 5 h后,对照组犬血氨浓度明显高于支持组(382.6± 79.5 μmol/L),二者差异显著($P < 0.01$)。

2.5 EBLSS循环过程肝细胞活力变化

动态观察 EBLSS循环 5 h内混合肝细胞、肝非实质细胞的细胞活力,结果显示,细胞存活率和球形体贴壁率仍保持较高水平,仅在 3 h后有一定的下降趋势。

3 讨论

迄今,有关肝细胞的选择为生物人工肝研究和应用所面临的重要问题。已有的研究主要集中在动物肝细胞和肿瘤来源的肝细胞株,前者,如鼠、猪、狗等肝细胞,具有来源广泛,分离简便等优点,且因 FHF时机体免疫功能降低,动物实验尚未发现明显的副反应[3]。但在临床应用中,动物肝细胞所产生的蛋白、酶产物等不可避免地会进到患者血液中,故异性蛋白及酶反应有可能发生。此外,肝衰竭病人所需的白蛋白根本不可能由动物肝细胞为材料的人工肝提供[5]。肝细胞株生长、培养条件要求不甚严格,易达到人工肝支持所需的数量。但其特异功能常与肝组织不同,尽管已有成功支持 FHF病人的个例报道[8],但这些细胞必竟源于肝肿瘤或经病毒感染转化而成,其远期副作用尚未可知。故在对 FHF患者的临床支持治疗中,同源的人肝细胞是理想的选择。本研究借助我国人肝组织来源相对较广的有利条件,优先选择人肝细胞为材料,探讨其用于生物人工肝的可能性。研究结果显示,分离所得肝细胞及肝非实质细胞活力好,数量大,能满足 EBLSS的要求,并已发挥出较好的人工肝支持效果,具有一定的临床应用价值。

近年广泛应用于生物人工肝研究的微载体培养技术,较圆满地解决了生物人工肝的细胞培养问题[9]。该技术虽简便,但需要特殊的载体,用微载体最大限度地粘附培养肝细胞尚属不易,加之载体本身粘性强,贴壁后清洗不便。因此,我们选用另一种效同微载体法的聚集球形体培养技术,经综合限制细胞贴壁、促进互相聚集后,肝细胞与肝非实质细胞形成多细胞球形聚集体,不仅显著提高了培养细胞的数量和密度,较长时间保持白蛋白分泌功能,而且用于 EBLSS支持无肝动物,使其血氨升高速度显著减缓,发挥出良好的细胞生物功能。更为重要的是肝细胞与肝非实质细胞的混合球形体培养,即维持了较好的正常肝细胞存在环境和立

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

体结构,又可借助肝非实质细胞产生的大量肝细胞生长因子,更好地发挥生物人工肝的生物合成作用,符合Nyberg等[8]提出的理想的体外生物人工肝支持系统是肝细胞-肝非实质细胞混合培养细胞的观点。

(参加本工作的还有丁健、刘国栋、谭朝霞同志,本院肝胆外科中心段恒春、董家鸿老师协助建立动物模型,特致谢意)

参考文献

1 王英杰.生物人工肝支持系统及其治疗急性肝衰竭的研究进展.国外医学流行病学与传染病学分册,1995,22(6):241
2 Gerlach J. Special issue: hybrid liver support. Int J Artif Organs, 1996; 19(1): 1
3 Rozga J, Holzman M D, Ro M S *et al*. Development of a hybrid bioartificial liver. Ann Surg, 1993, 217(5): 502
4 Melkonian AD, Gaylor JDS, Cousins R B *et al*. Culture of a differentiated liver cell line, Hep G2, in serum with application to a bioartificial liver: effect of supplementation of serum with amino acids. Artif Organs, 1994; 18(8): 611
5 Stange J, Mitzner S. Cell sources for bioartificial liver support. Int Artif Organs, 1996; 19(1): 14
6 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.中华实验外科杂志,1994; 11(增刊): 45
7 王英杰,李梦东,王宇明等.大鼠肝细胞的简易分离与聚集培养.中华肝脏病杂志,1996,4(3):178
8 Sussman N L, Finogold M J, Barish J P *et al*. A case of syncytial giant-cell hepatitis treated with an extracorporeal liver assist device. Am J Gastroenterology, 1994; 89(7): 1077
9 Shnyra A, Bocharov A, Bochkova N *et al*. Large-scale production and cultivation of hepatocytes on biosilon microcarriers. Artif Organs, 1990; 14(6): 421

(收稿: 1996-10-15;修回: 1997-02-22)
(编辑 刘 鹏)

Application of cultured human liver cells in bioartificial liver*

Wang Yingjie, Li Mengdong, Wang Yuming Nie Qinghe, Chen Guozheng, Gu Changhai, Wang Xiaohong, Huang Yanping (Department of Infectious Disease, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract **Objective**: To explore the possibility of using cultured human hepatocytes and non-parenchymal liver cells to establish an extracorporeal bioartificial liver support system (EBLSS) to provide a support treatment for fulminate hepatic failure (FHF). **Methods**: The two-stage perfusion method was employed to isolate and culture the hepatocytes and non-parenchymal liver cells and then the aggregates were put into a hollow fiber bioreactor as the main part of EBLSS. Their efficiency was assessed by the changes of ammonia in anhepatic dogs. **Results**: Hepatocytes and nonparenchymal liver cells with a viability of 96% formed multicellular spheroids which suspended in media by stirring at regular intervals and retained typical morphological appearance and albumin secretion. After treatment with EBLSS for 5 hours, anhepatic dogs had significantly lower serum ammonia as compared with the controls. Meanwhile, the cells still maintained a good viability. **Conclusion**: The human hepatocytes cultured with aggregate method can be used in bioartificial liver to play an optimal supporting role in FHF.

Key words cell culture; liver cell; bioartificial liver

* This project was supported by National Natural Science Foundation of China No, 39370198

(上接193页)

约10 ml,逐层寻找颈6~7平面,未发现异物。立即术中拍片,见异物已上移至颈5且变为纵向位。延长切口至颈5平面反复查找,未见异物,最后在颈内静脉内扪及缝针,缝针完全在静脉内,将缝针刺破静脉壁,取出异物,缝合静脉壁。术后大剂量抗菌素抗感染,7 d后拆缝线,伤口痊愈出院。

讨论

食道缝针异物具有游走性特点[1]。本例异物最初位于食道内,经手术刺激,吞咽及颈部肌群牵拉,使异物向外移位,最后进入颈内静脉实属罕见,更增加了术中寻找异物的难度。复习近年国内外文献,未见同类报道。回顾我科近10年的经验,我们认为食道缝针异物的患者应尽早在全麻下行食道镜检查[2],取出异物,必要时术中拍X线片以准确定位。

关键词 异物游走;食管异物
中图法分类号 R768.22

参考文献

1 Mohlala M L, Cormick P A. A technical approch to tracheal and oesphageal injuries. S Afr J Surg, 1994; 32(3): 114
2 Mansour K A, Koepke J D, Fountlize G *et al*. Surgery for scleroderma of the esophagus: a 12-year experience. Ann Thorac Surg, 1995; 60(1): 227

(收稿: 1996-08-01;修回: 1997-01-15)
(编辑 冷怀明)

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