

文章编号:1005-6947(2005)05-0365-05

· 实验研究 ·

新型微囊系统体外培养原代肝细胞的研究

王宪伟, 吕新生, 汤辉焕, 马娜

(中南大学湘雅医院 普通外科, 湖南 长沙 410008)

摘要: **目的** 探讨一种新型微囊系统以体外培养原代肝细胞。**方法** 使用新型微囊系统体外培养大鼠原代肝细胞,检测微囊系统各项特性,检测肝细胞的生存率、尿素合成和白蛋白合成功能。**结果** 微囊具有良好的通透能力,白蛋白可自由通过,具有一定的机械稳定性,并具有良好的免疫保护能力,分子量在150kD以上的物质不能进入微囊,肝细胞在微囊内保持较高的活性和功能,其尿素合成和白蛋白合成功能比对照组高1~3倍。**结论** 此微囊具有良好的生物和机械特性,可以在生物性人工肝和细胞移植中发挥重大作用。

关键词: 肝,人工;肝细胞;微囊系统

中图分类号: R318.1; R322.47

文献标识码: A

An experimental novel microcapsular system for in vitro culture of primary generation hepatocytes

WANG Xian-wei, LU Xin-sheng, TANG Hui-huan, MA Na

(Department of General Surgery, Xiangya Hospital, South Central University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To investigate a new microcapsular system for culture of primary generation hepatocytes in vitro. **Methods** A novel microcapsular system was used for in vitro culture of primary generation rat hepatocytes. The various characteristics of the microcapsular system were examined. The survival rate of hepatocytes and the functions of urea and albumin synthesis were observed. **Results** The microcapsule had good permeability, a certain degree of mechanical stability and favorable immunological protective ability. Hepatocytes within the microcapsule maintained a high degree of viability and function, and the synthesis of urea and albumin was 1~3 times higher than that of controls. **Conclusions** This microcapsule has excellent biological and mechanical properties. This system can be of great benefit for use in bioartificial liver and cell transplantation.

Key words: Liver, Artificial; Hepatocytes; Microencapsul System

CLC number: R318.1; R322.47

Document code: A

一台有效的生物性人工肝可以延长急性肝衰竭患者的生命。人工肝的核心是生物反应器,在各种类型的生物反应器中,微囊化肝细胞以其能满足人工肝设计的多种条件而受到重视^[1]。目前常用

的微囊材料是海藻酸钠-聚赖氨酸-海藻酸钠,但其制作过程复杂,海藻酸钠和钙离子对肝细胞具有用^[2],伴随着中空型纤维半透膜出现,对微毒性作囊的研究逐渐减少。但微囊本身具有肝细胞密集生长、细胞生长呈三维结构、有利于肝细胞功能的保持、微囊与外界接触面广泛、取用方便等优点,故对微囊的改进一直没有中断。笔者设计了一种复合凝集法形成的双层微囊系统,并研究检测此微囊的物理学和生物学特性,探讨其是否可以适应体外生物性人工肝的设计要求。报告如下。

收稿日期:2005-01-30; 修订日期:2005-03-10。

作者简介:王宪伟(1971-),男,山东茌平人,中南大学湘雅医院主治医师,主要从事肝胆外科方面的研究。

通讯作者:王宪伟 电话:0731-4327021(O), 13574107700(手机); E-mail:wxwlq@hotmail.com。

1 材料和方法

1.1 材料

2, 2'-azobisisobutyronitrile (AIBN), 单体 MAA, HEMA, 和 MMA 均购置于 Sigma-Aldrich 公司。胶原质 (Vitrogen 100,) 购于 Palo Alto (加拿大)。胶原酶, HEPATOZYME 培养液 (无血清) 购于 GIBCO Laboratories (美国)。Carl Zeiss 共轭焦显微镜 (LSM 510); 尿素和成检测盒, Sigma-Aldrich 公司。直接酶连免疫吸附法白蛋白含量检测试剂盒, Sigma-Aldrich 公司。恒温摇床 (Model 420, Forma Scientific, USA)。低温离心机 (Eppendorf, model No. 5804 R), Wistar 大鼠, 雄性体重 250 ~ 300 g, 由新加坡国立大学医学院动物室提供。

1.2 微囊的制备和培养

1.2.1 Terpolymer 的合成 terpolymers 的合成采用溶液自由基聚合, 异丙醇为溶剂, 2, 2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) 为引发剂, 单体 MAA, HEMA, and MMA 配比固定为 50: 25: 25, 合成中通过改变反应温度与引发剂用量调节 terpolymer 的分子量大小。使用胶体透析层析仪以四氢呋喃 (tetrahydrofuran THF) 作为洗提液检测多聚物的分子量为 113 000 和 373 000 之间。

1.2.2 胶原质的修饰 通过侧链的羧基改性或者氨基改性, 将胶原质根据需要修饰成带负电荷或者带正电荷两种。本实验通过侧链羧基甲基化使胶原质带正电荷, 以与 terpolymer 的负电荷匹配组合成适合的微胶囊体系。将 20 mL 3 mg/mL 的胶原质首先置于 400 mL; 丙酮沉淀得到固体胶原质, 然后将沉淀的胶原质溶解于 200 mL 含有 0.1 HCL 的甲醇中重新溶解。于 4°C 下持续搅拌 6d, 反应液在 4°C 蒸馏水中透析 4d, 冷冻干燥得到白色固体修饰胶原质。修饰后的固体胶原质可在 -20°C 下保持 6 个月。修饰胶原质通过滴定进行检测 pH 值在 7.2 ~ 7.4。全过程均在无菌条件下进行。

1.2.3 原代肝细胞的分离 肝细胞游离采用传统的两步酶灌注法并加以改进^[3], 首先在大鼠门静脉内置管并加以固定, 然后迅速切断下腔静脉, 接着自门静脉以无钙灌注液灌注肝脏, 速度为 50 mL/min。经过约 10 ~ 15 min 的无钙溶液灌注, 改换 0.05% 胶原酶继续进行循环灌注, 持续 10 min, 然后剥离肝外膜, 将肝细胞游离于清洗液中。细胞悬

液置于培养箱内培养 30 min 后, 使细胞恢复一段时间。以 60 μm 孔径的滤网过滤肝细胞悬液, 剩余的肝细胞用清洗液清洗 2 次, 离心速度为 20 g × 2 min。收集细胞进行细胞计数和细胞存活率鉴定。

1.2.4 细胞计数和细胞存活率鉴定 将新鲜肝细胞悬浮于溶液内混合, 取 10 ~ 15 μL 加入细胞计数器, 显微镜下计算细胞数据, 依计数器比例计算细胞浓度。细胞活性采用酚肽兰法鉴定, 存活率在 90% 以上的肝细胞被采用进一步试验。

1.2.5 微胶囊的制备 肝细胞微囊制备采用复合凝集法制备, 整个过程在室温无菌环境下进行。(1) 首先使用 1 × PBS 溶液在无菌状态下溶解修饰的胶原质, 胶原质浓度为 1.5 mg/mL; 使用 1 × PBS 溶解 terpolymer, 浓度为 10% (w/v)。(2) 将新鲜游离的肝细胞混悬于胶原质溶液内, 细胞浓度为 2.5 × 10⁶/mL, 使用前将胶原质肝细胞悬液保存于 4°C 防止胶原质胶化。(3) 用 30 G (新加坡标准) 注射针头将此肝细胞悬液滴入 10% terpolymer 溶液中, 由于修饰的胶原质和 terpolymer 之间电荷的作用, 在胶原质肝细胞液滴表面形成一层 terpolymer 外膜, 形成具有内外两层膜的微胶囊。(4) 将微囊置于培养箱内培养 1h, 待微囊形成完全后, 离心收集微囊, 用 PBS 洗涤 3 次, 即可进行进一步试验。

1.2.6 平面培养 肝细胞使用无血清的 HEPATOZYME 培养液进行培养, 培养液中添加 10⁻⁷ M 地塞米松。以胶原质作为培养底物。首先取胶原质 8 mL, 加入 1 mL 0.1 M NaOH、1 mL 10 × PBS 和 6 mL 1 × PBS, 以中和酸性的胶原质使之达到中性, 取 0.5 mL 中和后的胶原质平铺于培养皿中, 在培养箱内过夜, 在中性条件下胶原质胶化, 在培养皿表现形成一层固态底物, 薄膜封闭待用。

取新鲜分离肝细胞 2.5 × 10⁶ 平铺于 35 mm 聚苯乙烯培养皿中, 加入 1.5 mL 培养液, 在 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养。培养液每隔 24h 更换新鲜培养液, 更换后的培养液离心, 上清液标记备用, 测定白蛋白合成能力。离心沉淀为脱落死亡细胞, 计算细胞数, 明确培养皿内实际存活细胞数目。

1.3 微囊各特性检测

1.3.1 微囊通透性测定 膜通透性能使用 FITC 标记的 BSA 测定。在修饰的胶原质溶液中加入 FITC - 右旋糖苷, 形成 1% FITC - 右旋糖苷, 1.5 mg/mL 胶原质的混合悬液。将微囊转移至含有同

样浓度 FITC - 右旋糖苷的培养液中培养 2h 以平衡微囊内外的 FITC - 右旋糖苷浓度。收集微囊,用 $1 \times \text{PBS}$ 快速洗涤两遍,将微囊转至 $1 \text{ mL } 1 \times \text{PBS}$ 内,并取出 $20 \mu\text{m}$ 溶液作为起始液,其后在 2h 内每 5min 取出 $20 \mu\text{L}$ 测定液,用微盘荧光测定仪测定起始液、测定液以及 FITC - 右旋糖苷标准液的荧光强度,通过不同时间培养液中的 FITC - 右旋糖苷浓度计算从微囊中渗透到 PBS 的速度。

1.3.2 微囊化肝细胞功能检测

1.3.2.1 肝细胞的尿素合成功能 使用 Sigma-Aldrich 公司的尿素合成检测盒检测。

1.3.2.2 白蛋白含量 采用 Sigma-Aldrich 公司的直接酶连免疫吸附试验^[4],按试剂盒说明来进行。

1.3.3 光镜和共轭焦显微镜的细胞形态学检查

使用倒置相差显微镜 (Carl Zeiss) 观察细胞和微囊形态并记录相片,使用血细胞记录板记录肝细胞数目。使用 Olympus FLUOVIEW 共轭焦显微镜观察微囊的形态和外膜厚度。

1.3.4 微胶囊机械性能检测 使用剪切力方法检测。取 2 mL HEPATOZYME 细胞培养液加入 12 孔细胞培养板孔中,每孔中加入 60 粒肝细胞微囊, 37°C 平衡 24h,将细胞培养板固定在恒温摇床上,转速为 $250/\text{min}$,温度设定在 37°C ,振摇细胞培养板。对培养液中未破微囊计数。由于肝细胞微囊在固定转速与培养液条件下所受的剪切力相等,可

以通过微囊的破裂情况比较其机械性能。

2 结果

2.1 微囊的形成

通过此方法形成的新型微囊直径为 $400 \mu\text{m}$ 左右,其内所含的细胞浓度为 $5 \times 10^6/\text{mL}$ 。微囊包裹完整(图 1)。

图 1 微囊形态($\times 20$)

不同浓度的 terpolymer 形成微囊外膜厚度不一样(图 2)。以 10% 的共聚物浓度能够使微囊形成一层约 $2 \sim 3 \mu\text{m}$ 厚的外膜,效果最好,能够保持很好的通透性。增加 terpolymer 的浓度,微囊外膜变薄,很难进行操作,微囊也容易破裂。降低浓度,微囊的外膜变厚,通透性降低,影响肝细胞的活性和功能(图 3)。

图 2 不同 terpolymer 浓度形成微囊外膜厚度不同(左边为 10%,右边为 5%)

2.2 微囊的免疫保护性和通透性

将分子量为 FITC - 右旋糖苷 (150 kD) 包裹于

图 3 terpolymer 浓度对细胞存活率的影响

微囊内后,未发现其从微囊内泄漏出来,这种情况一直持续 6d,直到第 7 天才观察到有少量 FITC - 右

旋糖苷从微囊内泄漏出来。将白蛋白包裹于微囊内,同时检测培养液中白蛋白泄漏情况,发现近90%的白蛋白在15 min之内从微囊内扩散出来(图4)。

2.3 微囊的机械稳定性

将微囊置于摇床上摇动,以持续给微囊以剪切力作用,发现在前4d微囊几乎未发现破裂的情况,从第5天开始微囊开始出现破裂的情况,并且这种现象发展很快,在第7天时几乎所有的微囊都已破裂(图5)。

图4 微囊通透性检测

图5 微囊机械稳定性测定

2.4 微囊中肝细胞的功能

微囊中的肝细胞显示出良好的细胞功能,在培养的第1天,微囊内的肝细胞尿素合成功能及白蛋白合成功能均是平面培养的3倍左右,其后尿素合

成功能逐渐下降,在5d以后基本与平面培养肝细胞功能相同(图6)。相同的结果出现在肝细胞白蛋白的检测上(图7)。

图6 肝细胞尿素合成功能对比

图7 肝细胞蛋白合成功能对比

3 讨论

本研究制备的新型微囊系统来为肝细胞在体外培养提供一个有利的环境,它由带负电荷的 terpolymer 形成微囊的外膜,由带正电荷的胶原质组成微囊的内层。两者借助正负电荷的相互作用凝

集形成微囊。Terpolymer 由 HEMA-MMA-MAA 三种单体聚合而成,其中 HEMA-MMA 提供 terpolymer 的水溶性,而 MMA 则为微囊提供机械强度、韧度以及弹性,同时 MMA 还为 terpolymer 提供负电荷,以便与带正电荷的胶原质相凝集,MMA 也为微囊提供水溶性,使得微囊可以在生理溶液内存在,不致

引起其他不良反应。带正电荷的胶原质与带负电荷的 terpolymer 之间的不同比例决定着微囊的特性,故可根据需要选择。

采用复合凝集技术,可以很容易就形成微囊,方法简单,整个微囊形成时间短,细胞不与金属离子和细胞毒性物质接触,有效的避免了微囊形成过程中细胞的损失。通过控制细胞浓度和微囊形成的速度,能很容易地控制微囊的大小和微囊内的细胞数。微囊小,相对每个微囊内肝细胞的数目也较少,使得每个细胞与外界接触面积增大,但微囊内的肝细胞浓度并未减低,肝细胞在相互接触的情况下更容易保持其活性和功能^[5]。当微囊直径为 400 μm 左右,细胞浓度为 $5 \times 10^6/\text{mL}$ 时微囊内的肝细胞处于最佳状态,可保证微囊具有良好的物质传递能力,保证微囊内的细胞具有良好的功能。Wells 等^[6]报道另外一种微囊制作系统中,使用 polyacrylate 和表面技术(interfacial precipitation)来减少微囊与有机溶剂接触,以及控制微囊的大小。报道的平均尺寸为 400 ~ 900 μm ,这比我们的最佳尺寸大了将近两倍,因而笔者相信本研究所用的微囊在生物反应器中有较好的通透能力。微囊系统为肝细胞在体外的培养提供了有利的环境,在微囊中,肝细胞可以进行自由的物质交换并增强肝细胞功能,本研究选择尿素合成能力和白蛋白合成能力作为肝细胞代谢和合成功能的代表^[7]。试验显示微囊中的肝细胞比传统平面培养其功能提高了 3 倍。

人工肝的生物反应器设计的另一要求是免疫保护性和通透性。本研究将分子量为 FITC - 右旋糖苷(150kD)包裹于微囊内后未见有泄漏情况。因为最小的免疫球蛋白的大小与此分子量的右旋糖苷相当,因此有理由相信此微囊可以阻挡免疫球蛋白进入微囊内,故不至于诱发免疫排斥反应,可起到免疫保护作用。笔者将白蛋白包裹于微囊内时,近 90% 的白蛋白在 15 min 之内从微囊内扩散出来,表明微囊在具有免疫保护性的同时又具有良好的通透性,它可以允许营养物质和代谢物质自由进出微囊的,同时能防止免疫球蛋白进入

微囊。

机械稳定性检测提示前 4 d 微囊均保持完整。第 5 天才开始微囊才开始出现破裂的情况,这可能与长时间培养在培养液中会导致外膜的水解有关。但是微囊的此种强度已能足够短期使用的生物性人工肝的需要。但是此微囊能够耐受的最大流速还需要进一步精密仪器来检测。

综上所述,这种新型微囊系统可以为肝细胞的体外培养提供近于生理状态的良好生长环境。此微囊是半通透性的,它允许小分子量的物质自由通透,但它又将大分子物质阻挡在微囊之外,起到免疫隔离的作用。微囊内肝细胞生长情况良好。而且此种微囊具有一定的强度,最少在形成的 5 d 内适合人工肝系统的应用条件。此微囊系统有可能在生物性人工肝和细胞移植中发挥作用,进一步的工作需要根据不同的应用要求改进微囊不同的特性。

参考文献:

- [1] Dixit V, Gitnick G. Artificial liver support: state of the art. Scand [J]. J Gastroenterology, 1996, 220 (suppl): 101 - 114.
- [2] Canaple L, Nurdin N, Angelova N, *et al.* Maintenance of primary murine hepatocyte function in multicomponent polymer capsules - in vitro cryopreservation studies [J]. J Hepatol, 2001, 34 (1): 11 - 18.
- [3] Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells [J]. Methods Cell Biol, 1976, 13: 29 - 83.
- [4] Miyoshi H, Yanagi K, Fukuda H, *et al.* Long-term performance of albumin secretion of hepatocytes cultured in a packed-bed reactor utilizing porous resin [J]. Artif Organs, 1996, 20 (7): 803 - 807.
- [5] Takabatake H, Koide N, Tsuji T. Encapsulated multicellular spheroids of rat hepatocytes produce albumin and urea in a spouted bed circulating culture system [J]. Artif Organs, 1991, 15 (6): 474 - 480.
- [6] Wells GDM, Fisher MM, Sefton MV. Microencapsulation of viable hepatocytes in HEMA-MMA microcapsules: a preliminary study [J]. Biomaterials, 1993, 14 (8): 615 - 620.
- [7] Kamisaka, Maezawa H, Inagaki T, *et al.* A low molecular weight binding protein for organic anions (Z protein) from human hepatic cytosol: purification and quantitation [J]. Hepatology, 1981, 1 (3): 221 - 227.