

文章编号:1005-6947(2006)10-0745-04

· 基础研究 ·

玻璃化法保存微囊化大鼠原代肝细胞的研究

王宪伟, 汤恢煊, 吕新生

(中南大学湘雅医院 普通外科, 湖南 长沙 410008)

摘要:目的 探讨采用玻璃化法低温保存微囊化肝细胞的效果, 优化最佳冷冻条件。方法 使用33%, 37%, 40% 3种不同浓度的乙二醇保护剂, 以不同的冷冻速度低温保存微囊化的肝细胞, 并检测冷冻后微囊内的肝细胞功能。结果 40%乙二醇浓度的保护剂配方能最有效保护肝细胞, 3种冷冻速度的冷冻效果相同, 冷冻后肝细胞P450功能和尿素合成功能与冷冻前相同。结论 玻璃化法能够有效的保存微囊化的肝细胞。

关键词: 肝细胞; 玻璃化法; 微囊化; 肝, 人工

中图分类号: R333.4 **文献标识码:** A

Study of vitrification in preservation of microencapsulated rats hepatocytes

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

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

Abstract: Objective To study the effect of cryopreservation of vitrified microcapsule in preserving the rat hepatocytes, and to select the best cryopreservation condition of hepatocytes. **Methods** 33%, 37%, 40% ethyl hydroxide was respectively used as the cryopreserving agent of hepatocytes, and the effect of different speeds of cryopreservation on hepatocytes conservation was tested. **Results** The best cryopreservation agent of hepatocytes was 40% ethyl hydroxide; the effect of different speeds of cryopreservation on hepatocytes preservation was the same. The P450 activation and urea synthesis function of cryopreserved hepatocytes were as same as before and after cryopreservation. **Conclusions** Vitrification can preserve the microencapsulated rats hepatocytes effectively.

Key words: Hepatocytes; Vitrification; Microcapsule; Liver, Artificial

CLC number: R333.4 **Document code:** A

低温冷冻是保存细胞和建立组织库的主要方法,它在组织工程学中具有重要作用。如果能有效的大量保存肝细胞和培养的细胞的三维结构,对生物性人工肝的研究有重要作用。笔者已经报道过一种新型的微囊系统,它既能保护其内的细胞免受免疫攻击,又能允许细胞代谢物质自由进出微囊,同时原代大鼠肝细胞在其内保持其较高的功能,是一种有希望的生物人工肝三维生物反应器^[1]。

传统的冷冻方法对脆弱的原代肝细胞的保存效果一直不太理想,如何寻找一种全新的方法保存原

代肝细胞,保存微囊化的肝细胞是目前研究中亟待解决的问题。本研究采用玻璃化法来保存微囊化的肝细胞,探讨此方法是否能够良好的保存细胞的生存率和功能,以及是否能完整保存微囊。

1 材料和方法

1.1 材料

健康雄性 Wistar 大鼠,清洁级,体重 250g,由新加坡国立大学医学院动物实验室提供。HEP-TOZYME 培养液(SFM)(美国 GIBCO Laboratories);乙二醇(EG 62.07 MW),7-ethoxyresorufin O-dealkylation(7-EROD),paraformaldehyde(PFA),尿素合成功能检测盒均为 Sigma-Aldrich 公司提供。Confocal microscope(LSM 510)(Carl Zeiss 公司);低温离心机

收稿日期:2006-06-17; 修订日期:2006-09-12。

作者简介:王宪伟,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 E-mail:wxwqlq@hotmail.com。

(model no. 5804R) (Eppendorf 公司); 凝胶渗透色谱仪 (WATERS 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 微囊化肝细胞的制备和培养 肝细胞游离采用传统的两步酶灌注法并加以改进^[2]。肝细胞微囊制备采用复合凝集法制备。整个过程在无菌环境下进行, 胶原浓度为 1.5 mg/mL, terpolymer 浓度为 10% (W/V)。微囊形成后离心沉淀收集微囊, 用 PBS 沉淀 3 次即可进一步实验。

1.2.2 冷冻及溶解过程 先将微囊化的细胞悬液置于试管内, 去除培养液, 然后依次在培养液中加入 10% 的乙二醇 1 mL, 2 min 后以 10g 速度离心 1 min, 去除保护剂, 再加入 25% 乙二醇 1 mL, 混悬再静置 2 min, 仍然 10g 离心 1 min 去除保护剂, 最后加入 1 mL 40% 乙二醇和 0.6 M 蔗糖混合液 1 mL 制成微囊细胞混悬液。将微囊悬液吸入 250 μ L 和 500 μ L 吸管内, 然后将 250 μ L 吸管置于 500 μ L 吸管内封闭。再将各吸管直接放入液氮中。冷冻所有步骤均在 4 $^{\circ}$ C 低温下进行。所有试验步骤约在 10 min 之内完成。在溶解过程中各组溶解步骤相同, 即将吸管自液氮中取出来, 立即浸入 38 $^{\circ}$ C ~ 39 $^{\circ}$ C 水浴箱内, 在 30 s 内溶解完全后, 将吸管内的微囊先混悬于 1 mL 的 1 M 蔗糖溶液中, 然后将蔗糖溶液降到 0.7 M, 接着依次将每步骤所用蔗糖溶液减低 0.2 M, 最后溶液无蔗糖, 完全由培养液所代替, 每步骤约 2 min。

1.2.3 实验分组

(1) 测定 3 种不同冷冻保护剂浓度对冷冻效果的影响。第 1 组保护剂的 EG 浓度为 40%, 第 2 组保护剂的 EG 浓度为 37%, 第 3 组保护剂的 EG 浓度为 33%, 试验过程与前述步骤相同。分别检测冷冻后的肝细胞生存率。

(2) 选用 3 种冷冻速度, 分别是 2 900 $^{\circ}$ C/min, 1 450 $^{\circ}$ C/min, 400 $^{\circ}$ C/min, 分别检测冷冻后的肝细胞生存率。

1.3 微囊内肝细胞生存率及其功能检测

1.3.1 酚酞兰排除试验 酚酞兰溶液浓度 4 g/L, 将酚酞兰溶液与细胞悬液以 1:1 的容积比混合, 20 min 后显微镜下观察, 兰染细胞即为死亡细胞。

1.3.2 高效液相色谱仪定量检测 P450 活性 首先将 39.2 μ M 7-hydroxycoumarin 和 1 mL 新鲜培养液加入肝细胞中, 放入培养箱中培养 5 h。5 h 后取培

养液待检测。培养液加入葡萄糖苷酸酶和硫酸酯酶, 37 $^{\circ}$ C 下混合反应 1 h 进行水解。水解后溶液和标准液和氯仿、硼酸钠缓冲液混合, 震荡 10 min, 取氯仿溶液干燥, 使用高效液相色谱仪检测, 测定标准曲线并计算标本含量。

1.3.3 肝细胞的尿素合成功能 使用检测盒检测, 反应后溶液在波长 550 nm 处读取反应液吸光值测定标准曲线并计算标本含量。

1.4 统计检验

各组生存率之间和功能之间统计使用 ANOVA 法, 两组样本之间对比统计分析使用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 认为是有显著性差异。

2 结果

2.1 微囊的机械性能

实验结果显示在整个快速冷冻和溶解的过程中, 未见明显的微囊破碎的情况, 微囊完好率接近 100%。

2.2 不同浓度冷冻剂对微囊保存的影响

当冷冻保护剂的乙二醇浓度为 40% 时, 微囊内肝细胞相对生存率为 99%; 当将乙二醇浓度降低 3%, 达到 37% 时, 生存率就降低了 12%, 为 87%; 将乙二醇浓度降低到 33% 时, 生存率明显下降到 54%, 并且在培养液中发现了游离的肝细胞, 也可见多个破碎的微囊, 3 组微囊内相对生存率之间均有显著性差异 (均 $P < 0.05$) (图 1)。说明当冷冻保护剂中乙二醇浓度为 40% 时冷冻效果最佳, 后续试验均采用 40% 乙二醇浓度。

2.3 冷冻速度对微囊内肝细胞的生存率影响

将冷冻前生存率作为 100%, 冷冻后生存率与冷冻前相比, 3 种冷冻速度冷冻后均保持较高生存率, 均在 96% 以上, 3 组之间无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 2)。故后续试验均采用 1 000 $^{\circ}$ C/min, 且这种速度比较简单易行。

2.4 冷冻对微囊内肝细胞 P450 功能的影响

本经过冷冻保护剂处理后和冷冻后微囊内肝细胞 P450 活性无下降, 处理前 P450 酶反应物 7-hydroxycoumarin 的量为 4.37 μ g/mL, 经冷冻保护剂处理后的产量为 4.68 μ g/mL, 经冷冻后的产量为 4.85 μ g/mL, 与冷冻前比较, 均差异无显著性 (均 $P > 0.05$) (图 3)。

图1 不同保护剂对微囊保存的影响

图2 不同冷冻速度对微囊内肝细胞

图3 冷冻对肝细胞 P450 功能的影响

生存率的影响

2.5 尿素合成功能

冷冻前微囊内的肝细胞尿素合成功能为 $23.35 \mu\text{g}/\text{mL}$,高于平面培养的肝细胞 $11.20 \mu\text{g}/\text{mL}$,在经过平衡,冷冻,溶解各阶段后微囊内肝细胞尿素合成功能为 $25.19 \mu\text{g}/\text{mL}$,与冷冻前相比差异无显著性($P > 0.05$)。

3 讨论

以细胞为基础的生物工程治疗方法目前在广泛开展,因此探索一种既能保持微囊结构,又同时能保持细胞的活性和功能的冷冻方法就显得很重要。冷冻研究要与生物工程研究同步进行,可使生物性人工肝方法及时直接应用于临床。

目前多采用慢速冷冻方法保存肝细胞,但对此方法的保存效果存在很大争议,结果往往相差很大,冷冻后生存率较冷冻前下降的程度由10%至40%不等^[3-4],且这些结果并没有检测冷冻后肝细胞的功能。需要指出的是多数死亡的肝细胞在冷冻后的梯度离心过程中已经被除去,因此实际上冷冻后只有将近20%的肝细胞贴壁生存^[5]。

为探讨新的有效的保存肝细胞的方法,本试验采取玻璃化法快速冷冻微囊化肝细胞,并寻找快速冷冻肝细胞的最佳条件。为达到能够快速冷冻的效果,冷冻前的平衡阶段很重要。本试验使用乙二醇和蔗糖作为冷冻保护剂,使得微囊在冷冻前能达到符合快速冷冻的条件。平衡阶段前侵入性的冷冻保护剂可取代细胞内和微囊内大部分水分。虽然胶原质、半透膜和肝细胞的热膨胀比不一样,但是使用合适比例的冷冻保护剂和适宜的冷冻前平衡处理,微囊整体可以被同时冷冻,冷冻过程中未见到冰晶体的形成,避免了冰晶体形成这一主要损

害冷冻结果的因素。冷冻后微囊几乎100%保持其完整性,说明本试验冷冻设计是成功的。

玻璃化法的另一个优点是节省时间和设备,因为它是直接将微囊浸入 -196°C 的液氮中。而传统的冷冻方法不仅需要昂贵的仪器设备,而且冷冻过程的时间长,复杂的冷冻过程势必延长冷冻保护剂对细胞的毒害作用^[6]。

本试验使用乙二醇和蔗糖为基础的冷冻保护剂配方,此配方的特点是可减低侵入性保护剂的浓度,同时又保持整个冷冻保护剂的整体特性不改变,为此,本研究使用蔗糖来代替部分乙二醇,结果显示,此种配方对细胞的毒性很小,经此配方冷冻剂处理过的细胞功能与冷冻前比较无显著性差异。本试验同时测定了3种冷冻速度对保存效果的影响,结果显示3种冷冻速度的保存效果相同。最慢冷冻速度 $400^\circ\text{C}/\text{min}$ 已经接近实践中大批量冷冻微囊化肝细胞所能达到的冷冻速度,为今后大量冷冻微囊化肝细胞研究提供了可行性数据。

本实验结果显示,快速冷冻过程中并没有显著性降低微囊内的肝细胞功能。本试验采用高效色谱法定量分析P450的活性,结果显示冷冻过程仅轻微影响肝细胞内P450酶的转化能力,但与冷冻前无显著性差异。同样经冷冻后的肝细胞尿素合成功能与冷冻前也无显著性差异,说明冷冻后微囊内肝细胞的功能并无明显下降,至于冷冻后肝细胞功能的维持时间,还需要进一步的检测。

笔者认为,使用快速冷冻的方法可以很好的保存微囊,并不影响微囊内肝细胞的功能,同时也不会破坏微囊。本研究采用改进的方法,可以很有效的保存微囊化肝细胞及其功能。这也是国内首次使用玻璃化进行组织工程构件(肝细胞)保存。

参考文献:

- [1] 王宪伟, 吕新生, 汤辉焕, 等. 新型微囊系统体外培养原代肝细胞的研究[J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(5): 365-369.
- [2] Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells[J]. Method Cell Bio, 1976, 13:29-83.
- [3] Gillouzo A, Rialland L, Fautrel A, *et al*. Survival and function of isolated hepatocytes after cryopreservation[J]. Chem Biol Interact, 1999, 121(1):7-16.
- [4] Fautrel A, Joly B, Guyonard C, *et al*. Long-term maintenance of drug-metabolizing enzyme activities in rat hepatocytes after cryopreservation[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1997, 147(1): 110-114.
- [5] Hengstler JG, Ringel M, Biefang K, *et al*. Cultures with cryopreserved hepatocytes: applicability for studies of enzyme induction[J]. Chem Biol Interact, 2000, 15, 125(1):51-73.
- [6] Diener B, Utesch D, Beer N, *et al*. A method for the cryopreservation of liver parenchymal cells for studies of xenobiotics[J]. Cryobiology, 1993, 30(2):116-127.

文章编号:1005-6947(2006)10-0748-01

· 病例报告 ·

左膈膨升并胃扭转 1 例

李金霞, 王彤

(北京中医药大学东方医院 胸外科, 北京 100078)

关键词:胃扭转/并发症; 膈膨出; 病例报告

中图分类号:R656.6; R655.6

文献标识码:D

患者 男, 53岁。于入院前4d撞伤左胸部, 觉左侧胸痛、憋气, 进食后腹胀, 因症状逐渐加重而入我院。体查:气管右偏, 胸廓正常无畸形, 胸壁未见开放性伤口, 胸廓挤压征(+), 左侧自第4前肋水平以下叩诊浊音, 左上肺及右肺叩诊清音, 听诊左侧自第4前肋水平以下呼吸音未闻及, 可闻及肠鸣音, 左上肺及右肺呼吸音清, 未闻及干湿啰音, 心界右移。胸片及上消化道造影见左膈顶位于第3前肋水平, 膈顶呈弓形, 心影右移, 胃体积较大, 积气的胃和肠腔见于横膈下方, 充气的胃泡和肠腔与整个膈面接触, 胃上翻, 大弯侧与膈面接触。诊断为左胸部外伤, 左膈膨升并胃扭转(器官轴型), 肋骨骨折。行左侧开胸探查术。术中见第8, 9肋弓裂纹骨折,

左肺底与膈顶粘连, 膈顶位置上移, 膈肌菲薄。将膈肌折叠缝合, 膈肌位置降至第5前肋水平, 胃还原至正常位置。术后患者恢复良好。

讨论 膈肌膨升症即完整膈肌的一部分位置异常升高, 系膈肌麻痹、肌纤维不同程度发育不全或萎缩所致。文献报道成人X线胸片检查本病发生率约为1/1万, 男女发病率基本相等。先天性和后天性膈膨升症病理变化基本相同。膈膨升时膈肌极度松弛抬高, 肺有效通气量减少, 同时相邻的腹腔脏器突向胸腔, 压迫患侧肺、纵隔移位。患者出现气短、呼吸困难、甚至紫绀, 还可出现腹胀、食欲减退、消化不良等症状, 严重者可出现间歇性部分性肠梗阻。此外, 腹内脏器的上移压迫心脏向健侧移位, 影响静脉回流, 还可导致心律紊乱。本病早期临床表现不明显, 亦无特殊性, 极易疏忽而漏诊。曾报道有患者初始无明显不适, 但随时间推移膈肌上移加重, 纵隔显著移位, 发生猝死。由此可见本病的病理损害严重, 需引起足够重视。

左膈膨升X线征象为左膈顶面抬高, 膈面光滑, 其上无异常X线征象,

左膈活动较右侧明显减弱, 无矛盾运动, 胃泡上缘高于右侧膈顶, 下纵隔及心尖右移。胃扭转分器官轴型、肠系膜轴型和混合型。器官轴型胃扭转X线表现为大弯在头侧面, 小弯在足侧面; 网膜轴型胃扭转表现为大弯在右侧, 小弯在左侧(不包括先天性内脏反位); 混合型兼有上述两型特点。X线确定左膈膨出, 同时又有胃的部分或全部大小弯位置变换, 才能诊断左膈膨升并胃扭转。多数学者已明确指出, 左侧膈膨升是继发胃扭转的原因之一。

左膈膨升并胃扭转与左侧膈疝通过胸片、CT、口服造影剂或气腹造影可鉴别:前者膈面呈光滑完整的圆顶状, 胃泡高位, 但在膈下, 膈下可见新月形的积气带, 将膈与胃分开; 后者膈肌缘凹凸不平, 胸腔内有充造影剂的胃或肠影, 疝入的脏器在膈面上下相连, 膈肌弧面中断。强调膈膨升的膈肌完整有别于膈疝。

成人膈肌膨升症只有在产生症状时才具有临床治疗意义, 及时手术, 避免膈肌继续上移, 加重对呼吸、循环功能的影响, 及胃扭转后组织绞窄坏死。

收稿日期:2006-08-22。

作者简介:李金霞, 女, 北京人, 北京中医药大学东方医院住院医师, 主要从事外科临床方面的研究。

通讯作者:李金霞 E-mail:memory3580@sina.com。