

苦参碱对 L-02 人肝细胞系液氮下冻存复苏后功能的影响

朱应乾, 高毅, 汪燕

朱应乾, 高毅, 汪燕, 南方医科大学珠江医院普外科 广东省广州市 510280
广东省科技计划重大项目, No. 2002A3020206

通讯作者: 高毅, 510280, 广东省广州市工业大道, 南方医科大学珠江医院
普外科. Gaoyi6146@163.com

电话: 020-61643211

收稿日期: 2005-01-24 接受日期: 2005-03-03

摘要

目的: 了解苦参碱(matrine)对 L-02 人肝细胞系超低温冻存复苏后功能的影响, 探索一种合适肝细胞保存的方法。

方法: 常规培养的 L-02 人细胞系用胰酶消化后, 将收集的 L-02 人细胞系分别以六种不同的冻存液(二甲基亚砜、二甲基亚砜+低分子右旋糖苷、二甲基亚砜+低分子右旋糖苷+0.2 mg/L 苦参碱、二甲基亚砜+低分子右旋糖苷+2 mg/L 苦参碱、二甲基亚砜+低分子右旋糖苷+6 mg/L 苦参碱、二甲基亚砜+低分子右旋糖苷+10 mg/L 苦参碱)在液氮中冷冻保存 1 mo. 1 mo 后快速复苏 L-02 人肝细胞系, 做存活率、形态学及功能检测。

结果: 含有不同浓度的苦参碱冻存液保存的 L-02 人肝细胞系其活率、形态学及功能表现均有所不同, 其中单用二甲基亚砜(DMSO)的冻存液效果最差;二甲基亚砜+低分子右旋糖苷(Detrax-40)+6 mg/L 苦参碱冻存液效果最佳.二甲基亚砜+低分子右旋糖苷(Detrax-40)+6 mg/L 苦参碱冻存液组复苏后 L-02 人肝细胞系存活率为(89.6 ± 3.4%), 细胞形态与未冻存组相似, 其尿素及白蛋白分泌量与其他冻存液组有显著差异($P < 0.05$).

结论: 二甲基亚砜+低分子右旋糖苷+6 mg/L 苦参碱联合冻存液显著提高了 L-02 人肝细胞系的冻存质量。

朱应乾, 高毅, 汪燕. 苦参碱对 L-02 人肝细胞系液氮下冻存复苏后功能的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(7):919-922

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/919.asp>

0 引言

终末期肝病常需要生物人工肝(bioartificial liver BLA)来维持患者的生命, 为患者等待肝移植提供条件和时间, 目前用生物人工肝治疗肝衰的研究已经越来越得到医学界的重视, 但是生物人工肝的核心是需要大量有活性的肝细胞来进行肝功能支持, 这就大大地限制了生物人工肝的发展, 所以探索出一种实用可靠的低温保存方法, 建立一个肝细胞库, 临床随时可以得到大量高活率、有功能的肝细胞, 生物人工肝技术才能得以普遍推广. 临床上用苦参碱对肝脏疾病进行护肝治疗, 且体外实验证实苦参碱对肝细胞有抗损伤和改善肝细胞分泌蛋白作

用^[1]. 我们通过对含有苦参碱的不同冻存液冻存 L-02 人细胞系进行对照研究, 以探讨其低温下对肝细胞是否有保护作用, 寻求一种效果较好的冻存液, 来进一步改善冻存肝细胞的活率及功能。

1 材料和方法

1.1 材料 L-02 人肝细胞系由中国医学科学院上海细胞生物研究所提供. 苦参碱(西安, 富捷), Hepes、Trypabblue(上海华美公司), HAMF12、RPMI-1640(HyClone), 低分子右旋糖苷(Baxter), 胰酶、DMSO(Sigma), 胎牛血清(杭州四季公司). CO₂ 孵箱(Heraeus), 超净工作台(Y F-1 型), 冰箱(SANYO Medical Freeze), 六孔培养板、1.8 mL 冻存管、75 m² 培养瓶(CORNING).

1.2 方法

1.2.1 将 RPMI-1640 常规培养的 L-02 人肝细胞系用胰酶消化, 用全培养基终止胰酶, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 将肝细胞用 HAMF12 液调至浓度为 1.0×10^{10} – 2.0×10^{10} /L, 分装入冻存管(CORNING)各 0.7 mL 备用. 并取 1.0×10^9 /L 为细胞接种培养板常规培养作对照组(I组:未冻存组), 收集上清液(低温保存)备检。

1.2.2 将已配好的六种冻存液各取 0.7 mL, 等量分装入有 0.7 mL 肝细胞悬液的冻存管中, 用吸管轻轻吹打使细胞均匀. 此时, 冻存管中各成分终浓度为: II 组 10% DMSO(100 mL/L)+20% FBS(200 mL/L); III 组: 5% DMSO+20% FBS+5% Detrax-40(50 g/L); IV 组: 5% DMSO+20% FBS+5% Detrax-40 +0.2 mg/L 苦参碱; V 组: 5% DMSO+20% FBS+5% Detrax-40+2 mg/L 苦参碱; VI 组: 5% DMSO+20% FBS+5% Detrax-40+6 mg/L 苦参碱; VII 组: 5% DMSO+20% FBS+5% Detrax-40 +10 mg/L 苦参碱. 细胞终浓度为 0.5×10^{10} /L– 1.0×10^{10} /L. 冷冻时采用逐级降温方法: 先将冻存管在 0℃ 下冻存 30 min, 然后放入 -30℃ 冻存 h, 再放入 -80℃ 冻存 4 h, 最后移入液氮罐中, 保存 1 mo.

1.2.3 L-02 人肝细胞系复苏 1 mo 取出冻存管快速置于 37℃ 水浴 1–2 min, 震荡直至细胞悬液完全融化, 然后用 10 倍 HAMF12 液稀释离心后, 去除上清液, 再重复 3 次。

1.2.4 用含 FBS(100 mL/L) RPMI-1640 培养液调节细胞浓度为 1×10^9 /L, 按等同于未冻存组量接种于培养板, 在 37℃ 含 50 mL/L CO₂ 的培养箱里培养 7 d, 每 24 h 换一次液, 并收集第 1、3、5、7 d 培养液(低温保存)备检. (1) 人白蛋白含量测定: 用人白蛋白放免试剂盒(北方原

子能研究所提供)检测培养上清中人白蛋白含量,采用放射免疫抗原竞争法,与牛血清白蛋白无交叉反应^[2]。(2)尿素含量测定:cx7全自动生化分析仪测定,采用Beckman传导电极的电导法。

1.2.5 肝细胞活率的测定 将上述六种冻存系在冷冻保存复温后分别取样,用苔盼蓝拒染法测定活率。每天换液前后在倒置相差显微镜下观察培养肝细胞的生长情况及形态变化。

统计学处理 数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,采用 SPSS10.0 软件对数据作单向方差分析。

2 结果

2.1 复苏后 L-02 人肝细胞系的生存率结果 胰酶刚消化的细胞活率 $96.2 \pm 1.4\%$, II 组 $76.6 \pm 3.8\%$, III 组 $81.9 \pm 3.6\%$, IV 组 $81.6 \pm 2.4\%$, V 组 $84.7 \pm 2.8\%$, VI 组 $89.6 \pm 3.4\%$, 组 $86.9 \pm 1.6\%$ 。实验 VI 组生存率明显高于其他处理组 ($P < 0.05$)。

2.2 复苏后 L-02 人肝细胞系倒置显微镜下形态学变化 复苏后 L-02 人肝细胞系 24 h 大部分贴壁, L-02 人肝细胞系生长快, 第 5 d 细胞已平铺满细胞形态均一规则, 细胞间的接触密实, 尤以 VI 组肝细胞极性恢复快, 肝细胞生长旺盛, 细胞膜完整, 胞浆内有丰富颗粒, 核仁清楚, 少数细胞内出现空泡, 与未冻存组肝细胞形态相似 (图 1)。

2.3 尿素分泌量 肝细胞复苏后苦参碱浓度 6 mg/L 组明显优于其他处理组, 与对照组相似; 单用 DMSO 组均低于其他处理组; 苦参碱浓度低于 6 mg/L 组之间无显著差异, 明显低于苦参碱浓度高于 6 mg/L 组 (表 1)。

表 1 各组复温后 L-02 人肝细胞系尿素合成量 (mmol/L)

	1 d	3 d	5 d	7 d
I 组	0.34 ± 0.05	0.48 ± 0.03	0.63 ± 0.02	0.56 ± 0.12
II 组	0.24 ± 0.02	0.28 ± 0.02^c	0.51 ± 0.02^c	0.35 ± 0.02
III 组	0.27 ± 0.02	0.35 ± 0.02	0.54 ± 0.02	0.39 ± 0.02
IV 组	0.27 ± 0.01	0.35 ± 0.02	0.54 ± 0.02	0.39 ± 0.02
V 组	0.27 ± 0.01	0.35 ± 0.02	0.54 ± 0.02	0.39 ± 0.02
VI 组	0.33 ± 0.04^a	0.47 ± 0.03^a	0.61 ± 0.02^a	0.55 ± 0.03^a
VII 组	0.29 ± 0.02	0.45 ± 0.02	0.58 ± 0.02	0.51 ± 0.02

^a $P < 0.05$ vs 其他处理组 (除 VII 组 1、3 d); ^c $P < 0.05$ vs 其他所有组。

2.4 白蛋白分泌量 肝细胞复苏后苦参碱浓度 6 mg/L 组白蛋白分泌量明显高于其他处理组, 与对照组无显著差异; 其他处理组之间相似, 均低于对照组。 (表 2)

表 2 各组复温后 L-02 人肝细胞系白蛋白合成量 (mg/L)

	1 d	3 d	5 d	7 d
I 组	8.54 ± 0.09	11.11 ± 0.13	13.46 ± 0.17	12.70 ± 0.18
II 组	7.52 ± 0.20	10.54 ± 0.20	12.13 ± 0.26	11.41 ± 0.07
III 组	7.44 ± 0.16	10.54 ± 0.21	12.13 ± 0.29	11.41 ± 0.12
IV 组	7.43 ± 0.19	10.55 ± 0.25	12.35 ± 0.20	11.42 ± 0.13
V 组	7.59 ± 0.23	10.62 ± 0.24	12.45 ± 0.20	11.34 ± 0.36
VI 组	8.52 ± 0.12^a	11.05 ± 0.14^a	13.43 ± 0.20^a	12.65 ± 0.20^a
VII 组	7.62 ± 0.14	10.65 ± 0.15	12.38 ± 0.16	11.35 ± 0.31

^a $P < 0.05$ vs 其他处理组。

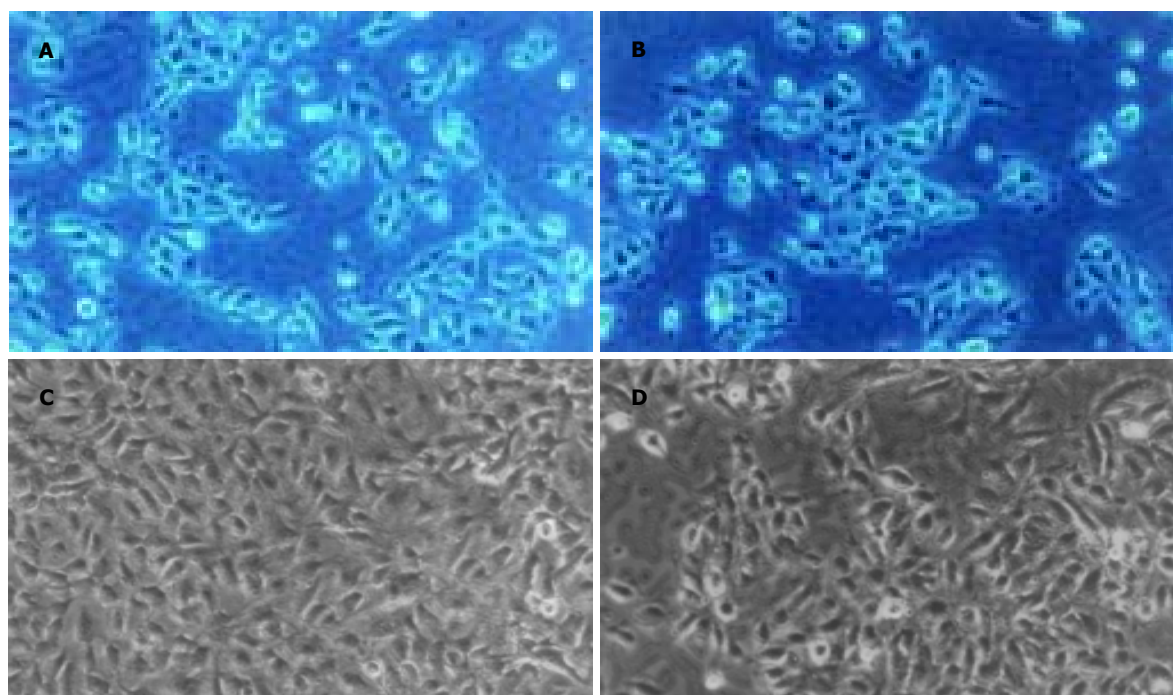


图 1 L-02 人肝细胞系倒置显微镜下形态学变化, $\times 200$ 。A: 对照组, 培养 1 d 肝细胞; B: VI 组, 冻存复苏后培养 1 d 肝细胞; C: 对照组, 培养 5 d 肝细胞; D: VI 组, 冻存复苏后培养 5 d 肝细胞。

3 讨论

BLA 已经过了多年广泛深入的实验研究,但其细胞材料来源问题至今尚未解决^[3]. BLA 要代替肝脏,必须具备两个条件:一是细胞必须具有肝脏特异性代谢功能;二是细胞数量至少达到 15% 的人肝细胞数量,即约 10^{10} 个数量级才有临床意义^[4-6]. 目前肝细胞来源有人肝细胞、异种动物的肝细胞、肝干细胞、永生化肝细胞株. 人肝细胞多来源于临床上肝硬化或其他肝疾病患者手术切除的部分肝脏,但数量相当有限;动物来源细胞可能有病毒感染的危险^[7-8];肝干细胞还处于研究起步阶段,目前还不可能用于 BLA. 人肝细胞系是有活性的生物材料的潜在来源^[9],有易获得、形态一致、功能稳定等优点,且分泌的白蛋白等物质与人体内的物质结构一致. Sussman *et al*^[10]建立了一种人肝细胞系,保存了正常肝细胞包括生物功能在内的许多特性,用于 BLA 成功地抢救了肝衰动物模型和一例患者,证明高分化的人肝细胞系可以为爆发性肝功能衰竭提供充分的肝功能支持. Kuddus *et al*^[11]也证实高分化的人肝细胞系细胞可以为急性肝功能衰竭的患者提供充分的肝功能支持.

解决临床上所需大量肝细胞来源,传统上采取传代培养及用特殊材料为载体进行高密度培养方法,但其工作量大、易污染、费用高、对环境要求高,而且肝细胞经多次传代后,其活性、功能将降低. 然而,肝细胞冻存可以克服肝细胞培养缺点,是解决大量肝细胞来源的较好方法之一.

合适的冻存液将有效帮助肝细胞在冻存过程中抵抗渗透压的变化,减少肝细胞冻存中损伤. 传统用的保护体系为 DMSO 与血清及冻存液配置而成, DMSO 终浓度为 10%^[12-13]. DMSO 是渗透性保护剂,能够降低细胞冰点,减少冰晶的形成,减轻自由基对细胞损害,改变生物膜对电解质、药物、毒物和代谢产物的通透性,是肝细胞冻存最常用的保护剂;但是研究表明, DMSO 存在严重的毒性作用,与蛋白质疏水集团发生作用,导致蛋白质变性. 已证实非渗透性保护剂羟乙基淀粉 (HES) 和渗透性保护剂 DMSO 的联合使用,发挥了细胞内与细胞外两种冷冻保护剂的协同作用,且降低了 DMSO 的浓度 (由 10% 降至 5%),抑制了核蛋白和溶酶体酶的释出,减少冻存过程中由胞内冰晶引起的肝细胞损伤,其效果明显优于单用 DMSO 的冷冻保存方法^[14-15]. Detrax-40 也是非渗透性保护剂,在冻存过程中可减少细胞内冰晶的形成,复温时还可以减轻由于渗透压改变而引起的细胞肿胀. 刘斌 *et al*^[16]用 DMSO+ Detrax-40 液氮下冻存脐血造血细胞比单用 DMSO 效果好,且降低 DMSO 的用量,同时缩短复温时间. 我们采用 10% DMSO、5% DMSO+5% Detrax-40 冻存 L-02 人肝细胞系,实验结果表明 DMSO 和 Detrax-40 有协同作用,比单用 DMSO 好.

苦参碱是苦参、山豆根等中药中的主要药效成分,为四环喹啉啶 (quinoilizidine) 类衍生物,属于生物碱类.

苦参碱能清除自由基,保护肝细胞膜结构,减轻肝细胞的损伤. 甘乐文 *et al*^[17]证实苦参碱对 CCl_4 引起的大鼠慢性肝损伤具有一定的防护作用. 目前研究发现苦参碱明显抑制由肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 及放线菌素 D (ActD) 所诱导的体外大鼠肝细胞的凋亡,且对肝细胞分泌 ALB 的功能有很强的促进作用^[1, 18]. 本实验分 6 个处理组 10% DMSO、5% DMSO+5% Detrax-40 和 5% DMSO+5% Detrax-40+ 不同浓度 (0.2 mg/L、2 mg/L、6 mg/L、10 mg/L) 的苦参碱,来冻存 L-02 人肝细胞系,其结果含有 6 mg/L 苦参碱组冻存肝细胞复苏后,肝细胞生存率及其白蛋白、尿素分泌功能明显优于其他组,与对照组无显著差异;其他各组肝细胞生存率、白蛋白分泌与对照组有显著差异,所有 DMSO+ Detrax-40 组或 DMSO+ Detrax-40+ 苦参碱组肝细胞生存率、尿素合成均优于单用 DMSO 组;苦参碱高浓度 (6-10 mg/L) 组肝细胞复苏后细胞活率、功能好于低浓度 (0.2-2 mg/L) 组 ($P < 0.05$), 这表明了低温保存 L-02 人肝细胞系时苦参碱浓度对其复苏后活率、功能有较大影响,但随着苦参碱浓度升高 (6-10 mg/L),肝细胞复苏后活率、功能下降,可能是苦参碱对肝细胞有毒作用. 因此,我们的结果表明苦参碱对液氮下冻存 L-02 人肝细胞系有保护作用,与 DMSO、Detrax-40 有很好协同作用,且有浓度效应. 但苦参碱与 DMSO、Detrax-40 之间浓度关系,以及长期低温保存时对肝细胞活性影响,还待于进一步研究.

4 参考文献

- 1 胡聪,韩聚强,修贺明,徐铮,郝晓东,刘景东,郝勇. 氧化苦参碱及苦参碱对大鼠肝细胞凋亡的影响. 中华传染病杂志 2003;21:50-52
- 2 薛国柱,刘冰艳,高毅,杨继震,黄祖汉. 体外培养肝细胞合成微量人白蛋白测定. 世界华人消化杂志 2000;8:473-4
- 3 Tsiaoussis J, Newsome PN, Nelson LJ, Hayes PC, Plevris JN. Which hepatocyte will it be? Hepatocyte choice for bioartificial liver support sustems. *Liver Transpl* 2001;7:2-10
- 4 Hughes RD, Williams R. Use of artificial and bioartificial liver support devices. *Semin Liver Dis* 1996;16:435-444
- 5 Sielaff TD, Hu MY, Rao S, Groehler K, Olson D, Mann HJ, Rimmel RP, Shatford RA, Amiot B, Hu WS. A technique for porcine hepatocyte harvest and description of differentiated functions in static culture. *Transplantation* 1995;59:1459-1463
- 6 Watanabe FD, Mullon CJ, Hewitt WR, Arkadopoulos N, Kahaku E, Eguchi S, Khalili T, Arnaout W, Shackleton CR, Rozga J, Solomon B, Demetriou AA. Clinical experience with a bioartificial liver in the treatment of severe liver failure. A phase I clinical trial. *Ann Surg* 1997;225:484-494
- 7 Paradis K, Langford G, Long Z, Heneine W, Sandstrom P, Switzer WM, Chapman LE, Lockey C, Onions D, Otto E. Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. *Science* 1999;285:1236-1241
- 8 Weiss RA. The Leeuwenhoek Lecture 2001. Animal origins of human infectious disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001;356:957-977
- 9 李浩,高毅,薛国柱,杨继震. 中国人肝细胞系作为生物人工肝细胞材料的可行性探讨. 中国临床康复 2004;8:240-241
- 10 Sussman NL, Kelly JH. Improved liver function following treatment with an extracorporeal liver assist device. *Artif Organs* 1993;17:27-30

- 11 Kuddus R, Patzer JF, Lopez R, Mazariegos GV, Meighen B, Kramer DJ, Rao AS. Clinical and laboratory evaluation of the safety of a bioartificial liver assist device for potential transmission of porcine endogenous retrovirus. *Transplantation* 2002;3:420-429
- 12 Hengstler JG, Utesch D, Steinberg P, Platt KL, Diener B, Ringel M, Swales N, Fischer T, Biefang K, Gerl M, Bottger T, Oesch F. Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. *Drug Metab Rev* 2000;32: 81-118
- 13 Diener B, Utesch D, Beer N, Durk H, Oesch F. A method for the cryopreservation of liver parenchymal cells for studies of xenobiotics. *Cryobiology* 1993;30:116-127
- 14 Walter Z, Szostek M, Weglarska D, Raguszevska D, Jablonski M, Lorenz F, Skotnicki AB. Methods for freezing, thawing and viability estimation of hemopoietic stem cells. *Przegl Lek* 1999; 56:34-39
- 15 张欣, 赵军, 苏清华, 马健仓, 李小斌. 一种肝细胞联合冷冻保存的新方法. *临床外科杂志* 2002;8:12-15
- 16 刘斌, 廖灿, 辜少玲, 许遵鹏. 采用二甲基亚砷和右旋糖苷冻存脐血造血细胞的研究. *中华儿科杂志* 2000;38:635-636
- 17 甘乐文, 王国俊, 李玉莉. 苦参素对大鼠慢性肝损伤的防护作用. *中草药* 2002;33:339-341
- 18 胡聪, 韩聚强, 修贺明, 徐铮, 郝晓东. 苦参碱对体外大鼠肝细胞凋亡的影响. *中国中医药科技* 2001;8:242-243

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

无痛肠镜检查在高血压患者中的应用

张庆明

张庆明, 大同铁路中心医院麻醉科 山西省大同市 037005
通讯作者: 张庆明, 037005, 山西省大同市新华街38号, 大同铁路中心医院
麻醉科. dxgdrxb@163.com
电话: 0352-7180279 传真: 0352-7122096
收稿日期: 2005-01-06 接受日期: 2005-02-26

摘要

目的: 探讨丙泊酚复合麻醉应用于高血压患者无痛肠镜检查的安全性、可行性。

方法: 回顾性分析 50 例 I- II 期高血压患者, ASA II - III 级, 随机分为无痛肠镜组(I 组, $n = 30$), 常规肠镜组(II 组, $n = 20$)。I 组由静脉缓注芬太尼 $0.5-1 \mu\text{g/kg}$, 丙泊酚 $0.5-1.5 \text{ mg/kg}$, 使患者安静入睡, 睫毛反射消失, 即可插入肠镜。II 组按常规方法进行肠镜检查。统计患者检查前、检查中、检查后的监测指标, 评估检查后恢复情况及调查满意率。

结果: I 组肠镜完成率高于 II 组。与检查前相比, 在进行插

镜时和检查进行 5 min 时, I 组的 SBP、DBP、HR、RPP 明显下降($P < 0.05$); II 组 SBP、DBP、HR、RPP 比检查前明显增高($P < 0.05$)。两组检查后均恢复至检查前水平。患者术毕至清醒平均 $1.80 \pm 1.60 \text{ min}$, 计算及提问对答恢复正常 ($4.50 \pm 3.10 \text{ min}$), 离室观察时间 ($18.50 \pm 6.20 \text{ min}$), I 组患者满意率 100%, II 组满意率 60%。

结论: 丙泊酚复合小剂量芬太尼麻醉对高血压患者行无痛肠镜检查是安全的、可行的。

张庆明. 无痛肠镜检查在高血压患者中的应用. *世界华人消化杂志* 2005;13 (7):922-924

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/922.asp>

0 引言

纤维结肠镜检查是临床上广泛应用的一种安全有效的诊