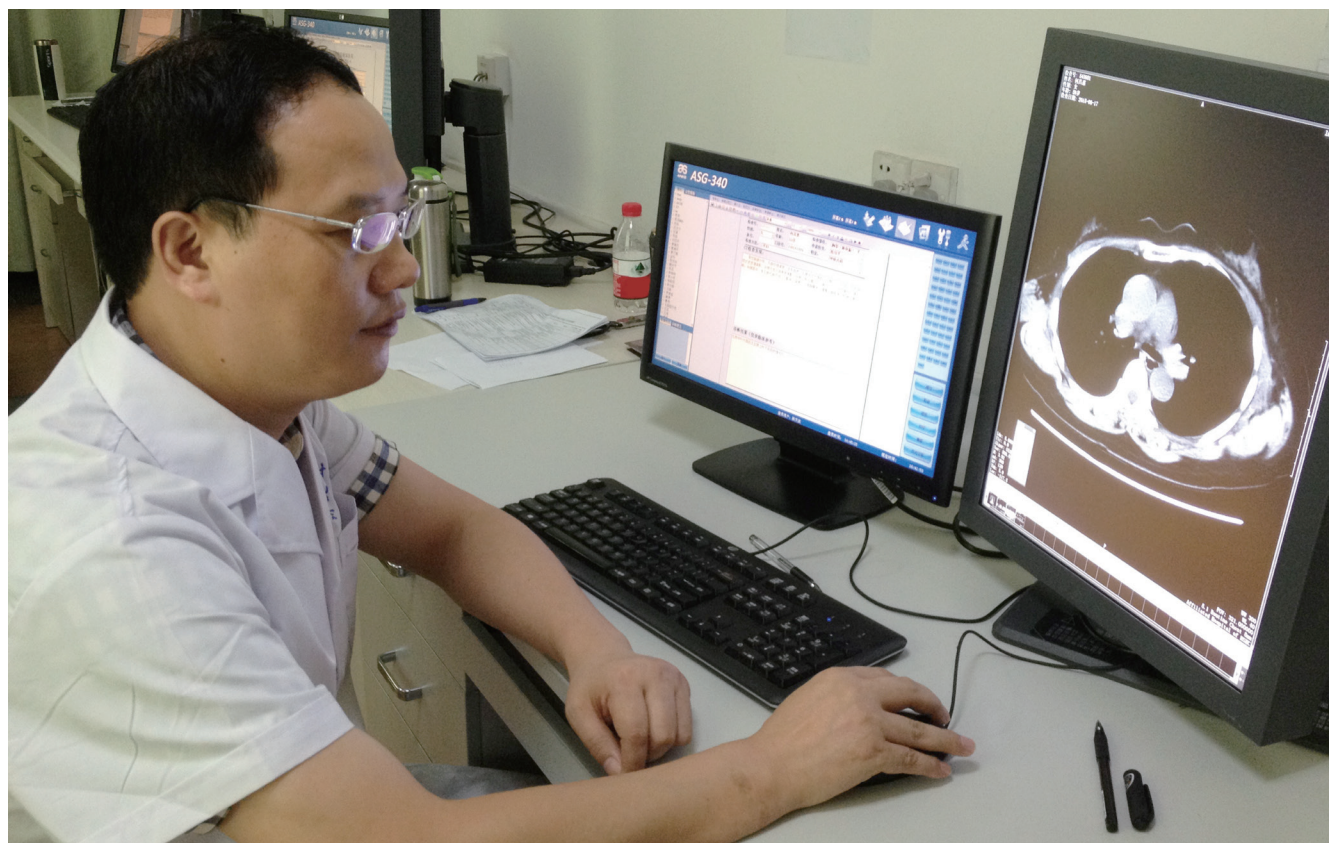


世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2020 年 8 月 8 日 第 28 卷 第 15 期 (Volume 28 Number 15)



15/2020

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

《世界华人消化杂志》是一本高质量的同行评议, 开放获取和在线出版的学术刊物. 本刊被国际检索系统《化学文摘(Chemical Abstracts, CA)》、《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》、《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》、Scopus、中国知网《中国期刊全文数据库(CNKI)》、《中文科技期刊数据库(CSTJ)》和《超星期刊域出版平台(Superstar Journals Database)》数据库收录.

目次

2020年8月8日 第28卷 第15期 (总第659期)

述评

- 655 肝硬化患者肝外肿瘤的发病风险及治疗措施
王硕, 郭晓钟, 徐士雪, 祁兴顺
- 660 强化克罗恩病监测和优化患者管理
王静静, 范一宏, 黄蓉
- 669 CD8⁺ T细胞干细胞样亚群在肿瘤免疫治疗中的应用前景
刘红涛, 孙青

基础研究

- 673 长链非编码RNA ASB16-AS1调控miR-670-3p/ATXN7L3轴影响胃癌细胞增殖、迁移和侵袭
罗俊, 张晓革, 郑园园, 马阿火
- 683 紫外线照射对成人原代肝细胞免疫原性及蛋白合成性的影响
邓兰, 唐世刚

临床研究

- 691 新型冠状病毒肺炎患者肝功能损伤的危险因素分析
唐裕福, 姜鹏, 张怡冰, 王新伟, 王渊博, 张权宇, 滕玥, 于浩, 孟浩, 张巍, 马壮
- 699 内放射支架与普通覆膜支架治疗中晚期食管癌疗效及并发症比较的Meta分析: 943例
黄妹, 韩明, 文剑波
- 710 钛夹预防结直肠息肉切除术后不良事件疗效的Meta分析
高利英, 刘希樵, 黄宣

文献综述

- 719 中医药对肠道微生态的影响
唐圆, 谭周进
- 725 中医药对溃疡性结肠炎肠黏膜屏障调控作用的研究进展
陈继超

临床实践

- 730 不同程度高甘油三酯血症对于急性胰腺炎病情严重性的影响
姜景平, 盛锦义, 方聪

研究快报

- 735 心理弹性在老年胃食管反流病患者抑郁水平与睡眠障碍间的中介作用分析
丁妙慧, 叶雅玲, 严莉

病例报告

- 740 胃癌根治术后迟发性大出血3例临床分析及防治策略
李龙龙, 李俊

消 息

- 668 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费
709 《世界华人消化杂志》书讯
724 《世界华人消化杂志》消化护理学领域征稿启事
739 《肠道微生物与消化系统疾病》栏目设置

封面故事

陈天武, 博士, 教授, 暨南大学博士生导师, 医学影像四川省重点实验室副主任、川北医学院附属医院放射科副主任, 食管癌发病机制与临床诊治四川省青年科技创新研究团队带头人,《欧洲放射学杂志》编委. 以负责人主持国家级、省部级课题8项, 其中国家自然科学基金2项. 获省部级科技进步奖4项, 其中以第1完成人获二等奖1项. 参编教材1部、学术专著3部. 以第1及通讯作者发表论文100余篇, 其中SCI论文55篇. 研究方向为消化系统放射学.

本期责任人

编务 王栋梅; 送审编辑 张晗; 组版编辑 刘继红; 英文编辑 王天奇;
形式规范审核编辑部主任 李香; 最终清样审核总编辑 马连生

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名

陈可冀 题写版权刊名

(半月刊)

创 刊 1993-01-15

改 刊 1998-01-25

出 版 2020-08-08

原刊名 新消化病学杂志

期刊名称

世界华人消化杂志

国际标准连续出版物号

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

主编

党双锁, 教授, 710004, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科

江学良, 教授, 250031, 山东省济南市, 中国人民解放军济南军区总医院消化科

刘占举, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院消化内科

吕宾, 教授, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院)消化科

马大烈, 教授, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科

王俊平, 教授, 030001, 山西省太原市, 山西省人民医院消化科

王小众, 教授, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院消化内科

姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床医学研究中心

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

编辑委员会

编辑委员会成员在线名单, 详见:

<https://www.wjgnet.com/1009-3079/editorialboard.htm>

编辑部

马亚娟, 主任

《世界华人消化杂志》编辑部

Baishideng Publishing Group Inc

7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,

CA 94588, USA

Telephone: +1-925-3991568

E-mail: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

出版

百世登出版集团有限公司

Baishideng Publishing Group Inc

7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,

CA 94588, USA

Telephone: +1-925-3991568

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com

<https://www.wjgnet.com>

制作

北京百世登生物医学科技有限公司
100025, 北京市朝阳区东四环中路
62号, 远洋国际中心D座903室
电话: +86-10-85381892

《世界华人消化杂志》是一本高质量的同行评议, 开放获取和在线出版的学术刊物. 本刊被国际检索系统《化学文摘(Chemical Abstracts, CA)》、《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》、《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》、Scopus、中国知网《中国期刊全文数据库(CNKI)》、《中文科技期刊数据库(CSTJ)》和《超星期刊出版平台(Superstar Journals Database)》数据库收录.

《世界华人消化杂志》正式开通了在线办公系统(<https://www.baishideng.com>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者和编者之间的信息反馈交流.

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.

定价

每期136.00元 全年24期3264.00元

© 2020 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Contents

Volume 28 Number 15 August 8, 2020

EDITORIAL

- 655 Risk and treatment of non-hepatic cancers in patients with cirrhosis
Wang S, Guo XZ, Xu SX, Qi XS
- 660 Strengthened monitoring and optimized management of Crohn's disease patients
Wang JJ, Fan YH, Hang R
- 669 Application prospect of stem cell-like subpopulations of CD8⁺ T cells in tumor immunotherapy
Liu HT, Sun Q

BASIC RESEARCH

- 673 Long non-coding RNA ASB16-AS1 inhibits proliferation, migration, and invasion of gastric cancer cells by regulating miR-670-3p/ATXN7L3 axis
Luo J, Zhang XP, Zheng YY, Ma AH
- 683 Effect of ultraviolet irradiation on immunogenicity and biological activity of primary adult human hepatocytes
Deng L, Tang SG

CLINICAL RESEARCH

- 691 Risk factors for COVID-19-related liver injury
Tang YF, Jiang P, Zhang YB, Wang XW, Wang YB, Zhang QY, Teng Y, Yu H, Meng H, Zhang W, Ma Z
- 699 Meta-analysis of efficacy and complications of intraluminal radioactive stent and common covered stent in treatment of advanced esophageal cancer
Huang M, Han M, Wen JB
- 710 Effect of prophylactic clipping on adverse events after colorectal endoscopic resection: A meta-analysis
Gao LY, Liu XQ, Huang X

REVIEW

- 719 Influence of traditional Chinese medicine on intestinal microecology
Tang Y, Tan ZJ
- 725 Research progress on regulation of intestinal mucosal barrier of patients with ulcerative colitis with traditional Chinese medicine
Chen JC

CLINICAL PRACTICE

- 730 Effect of different degrees of hypertriglyceridemia on severity of acute pancreatitis
Jiang JP, Sheng JY, Fang C

RAPID COMMUNICATION

- 735 Mediating effect of mental resilience on depression level and sleep disturbance in elderly patients with gastroesophageal reflux disease

Ding MH, Ye YL, Yan L

CASE REPORT

- 740 Clinical characteristics of and preventive strategies for delayed hemorrhage following radical gastrectomy for gastric cancer

Li LL, Li J

Contents

World Chinese Journal of Digestology
Volume 28 Number 15 August 8, 2020

COVER

Editorial Board Member of *World Chinese Journal of Digestology*, Tian-Wu Chen, Professor, Doctoral Supervisor, Department of Radiology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, No. 63 Wenhua Road, Shunqing District, Nanchong 637000, Sichuan Province, China

Indexed/Abstracted by

Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica, Abstract Journals, Scopus, CNKI, CSTJ and Superstar Journals Database.

RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE

Assistant Editor: *Dong-Mei Wang*

Review Editor: *Han Zhang*

Production Editor: *Ji-Hong Liu*

English Language Editor: *Tian-Qi Wang*

Proof Editor: *Xiang Li*

Layout Reviewer: *Lian-Sheng Ma*

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date August 8, 2020

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

ISSN

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

EDITOR-IN-CHIEF

Shuang-Suo Dang, Professor, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Xue-Liang Jiang, Professor, Department of Gastroenterology, General Hospital of Jinan Military Command of Chinese PLA, Jinan 250031, Shandong Province, China

Zhan-Ju Liu, Professor, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

Bin Lv, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China

Da-Lie Ma, Professor, Department of Pathology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

Jun-Ping Wang, Professor, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Shanxi,

Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Xiao-Zhong Wang, Professor, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Deng-Fu Yao, Professor, Clinical Research Center, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Zong-Ming Zhang, Professor, Department of General Surgery, Beijing Electric Power Hospital, Capital Medical University, Beijing 100073, China

EDITORIAL BOARD MEMBERS

All editorial board members resources online at <https://www.wjgnet.com/1009-3079/editorialboard.htm>

EDITORIAL OFFICE

Ya-Juan Ma, Director

World Chinese Journal of Digestology

Baishideng Publishing Group Inc

7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton, CA 94588, USA

Telephone: +1-925-3991568

E-mail: wjcd@wjgnet.com

<https://www.wjgnet.com>

PUBLISHER

Baishideng Publishing Group Inc

7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton, CA 94588, USA

Telephone: +1-925-3991568

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com

<https://www.wjgnet.com>

PRODUCTION CENTER

Beijing Baishideng BioMed Scientific Co., Limited Room 903, Building D, Ocean International Center, No. 62 Dongsihuan Zhonglu, Chaoyang District, Beijing 100025, China
Telephone: +86-10-85381892

PRINT SUBSCRIPTION

RMB 136 Yuan for each issue

RMB 3264 Yuan for one year

COPYRIGHT

© 2020 Baishideng Publishing Group Inc. Articles published by this open access journal are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-commercial License, which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non commercial and is otherwise in compliance with the license.

SPECIAL STATEMENT

All articles published in journals owned by the Baishideng Publishing Group (BPG) represent the views and opinions of their authors, but not the views, opinions or policies of the BPG, except where otherwise explicitly indicated.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Full instructions are available online at <https://www.wjgnet.com/1009-3079/Nav/36>. If you do not have web access, please contact the editorial office.

紫外线照射对成人原代肝细胞免疫原性及蛋白合成性的影响

邓兰, 唐世刚

邓兰, 唐世刚, 湖南省人民医院/湖南师范大学第一附属医院感染科
湖南省长沙市 410005

邓兰, 研究生, 主要从事肝衰竭和肝脏细胞生物学研究.

基金项目: 长沙市科技计划项目, No. kq1701048.

作者贡献分布: 唐世刚负责课题设计, 资料分析及撰写论文; 邓兰负责实验和收集数据.

通讯作者: 唐世刚, 主任医师, 410005, 湖南省长沙市解放西路61号, 湖南省人民医院/湖南师范大学第一附属医院感染科. sjtangq@hunnu.edu.cn

收稿日期: 2020-05-09

修回日期: 2020-06-11

接受日期: 2020-06-18

在线出版日期: 2020-08-08

Effect of ultraviolet irradiation on immunogenicity and biological activity of primary adult human hepatocytes

Lan Deng, Shi-Gang Tang

Lan Deng, Shi-Gang Tang, Department of Infectious Diseases, Peoples' Hospital of Hunan Province/First Affiliated Hospital of Hunan Normal University, Changsha 410005, Hunan Province, China

Supported by: Changsha Science and Technology Project, No. kq1701048.

Corresponding author: Shi-Gang Tang, Chief Physician, Department of Infectious Diseases, People's Hospital of Hunan Province/First Affiliated Hospital of Hunan Normal University, 61 Jiefang West Road, Changsha 410005, Hunan Province, China. sjtangq@hunnu.edu.cn

Received: 2020-05-09

Revised: 2020-06-11

Accepted: 2020-06-18

Published online: 2020-08-08

Abstract BACKGROUND

The immune rejection of the recipient is the main factor affecting the therapeutic effect of hepatocyte transplantation, and ultraviolet can cause immunosuppression. Appropriate intensity of ultraviolet irradiation can not only reduce the immunogenicity of hepatocytes, but also avoid excessive damage to hepatocytes caused by ultraviolet irradiation, so as to better preserve the stability of hepatocytes and cell synthesis function.

AIM

To investigate the effect of ultraviolet radiation on the immunogenicity and biological activity of primary adult human hepatocytes.

METHODS

Hepatocytes were isolated from benign adult liver tissues by collagenase perfusion and divided into a control group (0 J/m²) and four experimental groups with different UV irradiation intensities (200, 350, 550, and 750 J/m²). Trypan blue and CCK-8 were used to detect the cell viability. Mitochondrial membrane potential changes were detected with JC-1 dye. The proliferation of recipient T cells was determined by mixed lymphocyte hepatocyte culture (MLHC). The levels of albumin and lactate dehydrogenase in culture supernatant were tested.

RESULTS

The viable rate of newly isolated hepatocytes was more than 90%. CCK-8 detection revealed that the viability of hepatocytes in the 200 J/m² group was the highest, which had no significant difference compared with that of the control group, but was significantly higher than that of other experimental groups. In the presence of JC-1 dye, the

hepatocytes in the control group and the 200 J/m² group mainly exhibited red fluorescence, and brown (350 J/m²), yellow green (550 J/m²), and green (750 J/m²) changes were noted with the increase of irradiation intensity. The OD value of the 200 J/m² group was the highest, which had no significant difference compared with that of the control group, indicating that the membrane potential of hepatocytes was stable and the cell activity was the best; with the increase of irradiation intensity, the membrane potential of hepatocytes decreased significantly. The MLHC test showed that the 200 J/m²-irradiated hepatocytes had a significantly reduced lymphocyte proliferative ability compared with the control group, while that in the 350, 550, and 750 J/m² irradiation groups was increased. Biochemical test showed that the level of albumin was the highest in the 200 J/m² group, which had no difference compared with that of the control group. On the third day of culture, the secretory and synthetic functions of hepatocytes were in the best state.

CONCLUSION

Ultraviolet radiation at an intensity of 200 J/m² can reduce the ability of adult primary hepatocytes to cause T cell proliferation, while the vitality and synthesis function of hepatocytes are well preserved.

© The Author(s) 2020. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Primary adult human hepatocyte; Immunogenicity; Ultraviolet; Biological activity

Citation: Deng L, Tang SG. Effect of ultraviolet irradiation on immunogenicity and biological activity of primary adult human hepatocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2020; 28(15): 683-690
URL: <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v28/i15/683.htm>
DOI: <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v28.i15.683>

摘要

背景

受体的免疫排斥反应是影响肝细胞移植疗效的主要因素, 而紫外线可以引起免疫抑制的作用; 寻找适当的紫外线照射强度, 既能降低肝细胞免疫原性, 又能避免紫外线对肝细胞的过度损伤, 从而较好保存肝细胞的稳定性和细胞合成功能。

目的

探讨紫外线照射降低成人原代肝细胞免疫原性和对细胞生物活性的影响。

方法

取成人良性病变肝组织以胶原酶灌注分离肝细胞, 分为对照组(0 J/m²)及200、350、550和750 J/m² 4个不同紫外线照射强度的实验组。台盼蓝拒染法

和CCK-8法检测细胞活率; JC-1检测线粒体膜电位变化; 混合淋巴细胞肝细胞培养(mixed lymphocyte hepatocyte culture, MLHC)检测受体T细胞增殖; 并检测培养上清液中血白蛋白(serum albumin, ALB)、乳酸脱氢酶水平。

结果

(1)新分离的肝细胞活率大于90%; (2)CCK-8检测发现实验组200 J/m²照射强度的肝细胞活力最高, 与对照组无明显区别, 明显高于其他实验组; (3)荧光显微镜观察到对照组和200 J/m²实验组在JC-1液作用下肝细胞以红色荧光为主, 随着照射强度的增大, 而呈现棕色(350 J/m²)、黄绿色(550 J/m²)、绿色(750 J/m²)的变化。酶标检测显示200 J/m²组OD值最高, 与对照组无显著差异, 说明肝细胞膜电位稳定, 细胞活性最好; 随着照射强度增大, 细胞膜电位随之下降, 差异显著; (4)MLHC检测显示200 J/m²照射组的肝细胞引起淋巴细胞增殖能力较对照组显著降低, 而350 J/m²、550 J/m²、750 J/m²组则有所增强; (5)生化检测提示200 J/m²组的ALB水平最高, 与对照组无差别。培养第3天肝细胞的分泌和合成功能处于最佳状态。

结论

强度200 J/m²紫外线照射可降低成人原代肝细胞引起T细胞增殖能力; 肝细胞的活力和合成功能得到较好保留。

© The Author(s) 2020. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

关键词: 成人原代肝细胞; 免疫原性; 紫外线

核心提要: 本研究选用手术来源的成人原代肝细胞, 经不同紫外线强度照射, 通过四种不同检测手段, 发现200 J/m²照射强度, 既可以保持肝细胞的线粒体膜稳定性和较好的细胞活力以及细胞合成功能, 又能适当降低原代肝细胞引起淋巴细胞增殖活性。

文献来源: 邓兰, 唐世刚. 紫外线照射对成人原代肝细胞免疫原性及蛋白合成性的影响. *世界华人消化杂志* 2020; 28(15): 683-690

URL: <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v28/i15/683.htm>

DOI: <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v28.i15.683>

0 引言

近年随着细胞生物工程技术的发展, 肝衰竭的细胞治疗也取得了一定的进展, 肝细胞移植(hepatocyte transplantation, HCT)也被认为是一种可替代整肝移植的可行方法^[1,2]。目前肝细胞主要来源于不适合原位肝移植的供体肝、异种肝细胞、肝干细胞^[3,4], 本研究中的肝细胞来源于外科肝切除的良性病变组织标本。

由于成熟肝细胞只表达MHC I类分子, 而无MHC II类分子, 因此理论上免疫原性相对较弱^[5,6], 但分离后的单个肝细胞MHC I类分子依然具有识别和提呈内源性抗原肽的功能, 而诱发免疫排斥反应; 肝细胞分离过程中肝细胞膜损伤, 导致细胞表型改变, 细胞间表面粘附分子被受体免疫系统识别而受到细胞毒性T细胞的攻击, 导致移植后的肝细胞凋亡^[7]; 有动物实验证实移植的肝细胞在未使用免疫抑制剂的情况下仅能存活7-10 d^[8], 所以如何降低移植肝细胞免疫原性, 提高移植细胞的存活是值得进行探讨的方向^[9]。

本研究通过紫外线照射, 探讨不同强度和照射时间对成人原代肝细胞免疫原性及对细胞稳定性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂配制及仪器: (1)胶原酶IV型、胎牛血清, Sigma公司; (2)CCK-8检测试剂盒, DOGINDO公司; (3)膜电位试剂盒, 碧云天公司; (4)荧光显微镜, ASONE公司; (5)紫外灯, 飞利浦公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验对象: 取本院手术切除的成人肝组织。入选标准: (1)肝脏良性病变(胆管结石、血管瘤、囊肿、外伤等), 病理无明显萎缩及纤维化; (2)年龄<60岁, 白蛋白(serum albumin, ALB) >30 g/L; (3)无胆道急性感染; (4)乙肝、丙肝、艾滋、梅毒等检测为阴性。尽量在肝叶离体后30 min内分离肝细胞。

1.2.2 实验分组: 根据紫外线照射强度将肝细胞分为对照组(0 J/m²), 4个实验组(分别为200、350、550和750 J/m²), 紫外灯功率固定, 照射强度由照射时间调控, 对照组和4个实验组照射强度所对应的照射时间分别为0、2、4、6和8 min。

1.2.3 肝细胞分离和纯化: 无菌条件下将肝叶组织称重, 4 °C D-Hanks液漂洗, 去除结石或损伤组织, 封闭胆管。改良的两步胶原酶灌注法分离肝细胞^[10]。

1.2.4 淋巴细胞提取: 淋巴细胞分离液标准流程分离提取。

1.2.5 紫外线处理肝细胞: 将肝细胞接种在96孔板[CCK-8和混合淋巴细胞肝细胞培养(mixed lymphocyte hepatocyte culture, MLHC)实验]或放有盖玻片的六孔板(细胞跨膜电位检测)中, 以窄谱中波紫外线灯(波峰为311 nm, 光源距离实验细胞垂直距离为10 cm), 按分组要求的照射剂量进行照射后, 换新鲜培养基置37 °C 5%CO₂恒温箱24 h, 每组3个平行孔, OD值以3孔的平均值表示。

1.2.6 紫外光照射后检测: CCK-8法检测活率: (1)在96孔板中接种肝细胞悬液(10⁴/mL) 100 μL/孔, 每孔>1000个

细胞; (2)于培养的1、3、5 d, 按各组紫外线处理后的肝细胞, 避光加入10 μLCCK-8溶液, 恒温箱孵育1.5 h; (3)酶标仪(450 nm)检测。

跨膜电位检测: 按线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)操作步骤进行: (1)紫外线处理的六孔板培养的肝细胞, 按1:1加完全培养基和JC-1工作液, 5%CO₂孵育30 min, 冰浴1×JC-1染色缓冲液洗后取出爬满肝细胞的盖玻片翻转覆盖在滴有甘油载玻片上; 设置阳性对照; (2)荧光显微镜观察: 绿色荧光提示细胞处于凋亡早期, 线粒体膜电位下降, 红色荧光提示细胞线粒体膜电位正常, 细胞状态较好。

MLHC: (1)96孔板中每孔接种5000个肝细胞, 经紫外线处理后, 加入5×10⁵个淋巴细胞, 设空白肝细胞、淋巴细胞各一组, 37 °C, 72 h; (2)每孔加入5 ng/mL的CCK-8 10 μL, 4 h; 加100% DMSO 100 μL/孔; (3)酶标仪(450 nm)检测。

细胞分泌功能的变化: 肝细胞培养液3500 g/min离心8 min, 取上清自动生化仪检测ALB水平。

统计学处理 所有实验数据均以mean±SD表示, 采用SPSS 17.0统计软件进行数据分析, 各组间差异比较采用方差分析, 各时间点组间比较采用t检验, P<0.05有统计学差异。

2 结果

2.1 分离的肝细胞台盼蓝计数和培养后细胞形态变化 新分离的肝细胞调细胞数为1×10⁵/mL, 台盼蓝拒染法检测活率>90%。

光镜下: 细胞透亮, 呈圆形或球形, 边界清楚, 胞质丰富, 大小均匀。2 h后细胞开始贴壁, 细胞由圆形向多边形伸展。同时细胞体积增大, 48 h后可达到80%-90%的融合, 培养第5天, 肝细胞融合成岛状。小剂量紫外线照射(200 J/m²)处理的肝细胞与对照组比较形态无明显差异, 贴壁率无明显下降(图1)。

2.2 CCK-8法检测各组肝细胞活力变化 CCK-8检测结果(表1): 200 J/m²照射后的肝细胞活率最高, 与未照射组无明显区别, 明显高于其他组。肝细胞处理后培养时间对肝细胞活率有影响; 与对照组比较, 不同强度紫外线照射后培养第1天活率最高, 到第5天200 J/m²组活率与对照组相比无显著差异, 而其他组则显著下降。

2.3 紫外线处理后膜电位检测 线粒体膜电位正常时, JC-1在线粒体的基质中聚集, 呈红色荧光; 反之则形成单体, 呈绿色荧光。实验显示对照组和紫外线照射200 J/m²的肝细胞以红色荧光为主, 随着照射强度的增大, 而呈现棕色(350 J/m²)、黄绿色(550 J/m²)、绿色(750 J/m²)的变化。细胞培养第一天, 细胞状态良好, 膜电位检测以红

表 1 不同强度紫外线处理后不同培养时间肝细胞活率

| 肝细胞活率% | 0 J/m ² | 200 J/m ² | 350 J/m ² | 550 J/m ² | 750 J/m ² |
|--------|--------------------|------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 1 d | 100 | 104.11 ¹ | 88.31 ² | 71.14 | 51.70 |
| 3 d | 100 | 102.28 | 59.68 | 45.67 | 35.53 |
| 5 d | 100 ³ | 89.14 ^{1,3,4} | 54.55 ^{2,4} | 38.37 | 35.48 |

¹ $F = 7.687, P = 0.082$; ² $F = 17.989, P = 0.001$; ³ $F = 8.311, P = 0.069$; ⁴ $F = 36.919, P = 0.000$.

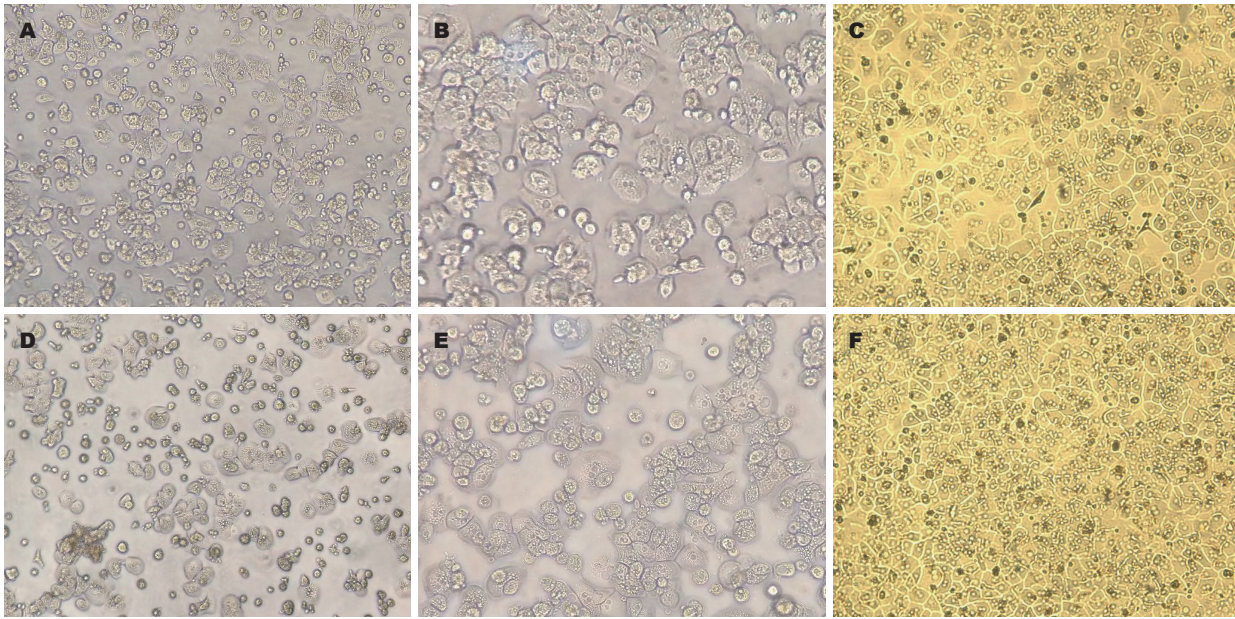


图 1 对照组和紫外线处理组肝细胞形态及贴壁情况图(200×). A, B, C: 分别为对照组培养的第1、3、5天; D, E, F: 分别为接受200 J/m²紫外线照射后培养的第1、3、5天.

色荧光为主(图2); 随着培养时间的延长, 第3天细胞贴壁融合达到80%, 细胞凋亡率也随着时间的延长而上升, 膜电位以棕色为主(图3); 培养第5天膜电位以黄绿色为主(图4); 说明随着培养时间的延长, 细胞膜电位呈下降趋势.

为进一步阐明紫外线对肝细胞的影响, 以酶标仪检测红色荧光(590 nm)和绿色荧光(530 nm), 计算出红色荧光的OD值比上绿色荧光的OD值的比值(表2). 紫外线照射200 J/m²后的比值最高, 说明肝细胞膜电位稳定, 细胞活性最好, 随着照射强度增大, 细胞膜电位随之下降, 差异显著. 随着培养时间延长, 细胞性有所下降, 但在200 J/m²照射强度下无显著性差异.

2.4 MLHC实验 CCK-8实验得出紫外线照射后培养第1天活率最高, 在进行紫外线照射后选定第1天进行MLHC. 共培养3 d后检测不同照射强度下的OD值分别为0 J/m² 1.45±0.06; 200 J/m² 0.80±0.04; 350 J/m² 1.77±0.03; 550 J/m² 1.76±0.10; 750 J/m² 1.71±0.07. 本实验结果表明, 经紫外线照射后的肝细胞, 用MLHC检

测受体淋巴细胞对供体肝细胞反应, 显示其并未丧失对同种MHC抗原的免疫应答能力, 但发现200 J/m²照射组的肝细胞引起淋巴细胞增值能力下降, 与对照组有显著区别($t = 2.787, P = 0.012$), 而350 J/m²、550 J/m²、750 J/m²组则引起淋巴细胞增殖能力有所增强.

2.5 对照组和紫外线处理组肝细胞在不同培养时间分泌合成功能的变化 检测第1、3、5天各实验组上清液白蛋白(表3), 200 J/m²紫外线组白蛋白水平稍高于对照组, 随着照射强度的增大, 肝细胞合成分泌功能下降.

3 讨论

自上世纪90年代Alessandri等^[1]与Ribbert等首次进行HCT以来, HCT技术有了较大进展, 目前HCT在人体的临床报道仅有140例, 部分患者胆红素水平下降, 症状改善, 但没有临床资料证实患者进行HCT后得到完全的临床愈合^[12], 主要是作为等待原位肝移植的过度治疗. 有研究认为移植细胞的稳定性和移植细胞抗宿主的免疫排斥反应是导致移植疗效欠佳的主要原因^[13].

表 2 不同强度紫外线处理后不同培养时间肝细胞膜电位变化

| 培养时间 | 照射强度 | | | | |
|------|--------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------|----------------------|
| | 0 J/m ² | 200 J/m ² | 350 J/m ² | 550 J/m ² | 750 J/m ² |
| 1 d | 0.881 ± 0.06 | 1.106 ± 0.05 ^{1,2} | 0.757 ± 0.08 ¹ | 0.731 ± 0.09 | 0.666 ± 0.02 |
| 3 d | 0.922 ± 0.12 | 1.115 ± 0.15 | 0.686 ± 0.21 | 0.635 ± 0.17 | 0.565 ± 0.15 |
| 5 d | 0.931 ± 0.21 | 0.966 ± 0.24 ² | 0.654 ± 0.08 | 0.555 ± 0.05 | 0.434 ± 0.11 |

¹*t* = 2.21, *P* = 0.011; ²*t* = 0.749, *P* = 0.448.

表 3 紫外线照射后肝细胞分泌功能测定

| 检测项 | 时间 | 0 J/m ² | 200 J/m ² | 350 J/m ² | 550 J/m ² | 750 J/m ² |
|----------|-----|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 白蛋白(U/L) | 第1天 | 28.45 ± 0.10 | 30.21 ± 0.09 | 26.92 ± 0.12 | 18.38 ± 0.14 | 15.76 ± 0.06 |
| | 第3天 | 38.62 ± 0.11 | 39.10 ± 0.07 | 31.52 ± 0.10 | 22.32 ± 0.13 | 21.01 ± 0.13 |
| | 第5天 | 28.89 ± 0.05 | 26.25 ± 0.05 | 26.92 ± 0.10 | 17.07 ± 0.07 | 11.17 ± 0.08 |

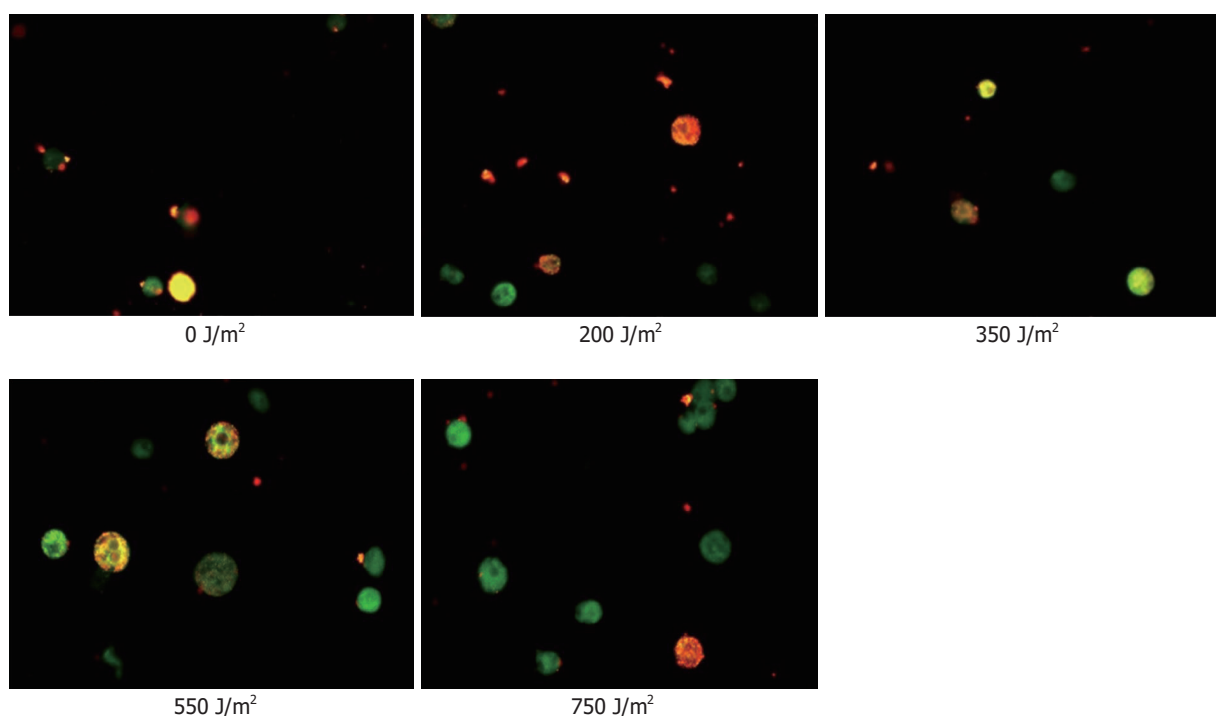


图 2 不同强度紫外线照射后培养第1天肝细胞膜电位的变化(100×).

研究证实通过调节免疫细胞的功能可以诱导免疫耐受^[14], 包括B细胞、T-reg细胞、树突状细胞和巨噬细胞都可以通过细胞直接接触或通过可溶性介质而起到这一调节能力. 免疫耐受分为中枢耐受和外周耐受, 可以诱导效应细胞的死亡或抗原表观的改变而阻止或减少激活自身反应性淋巴细胞, 这也为移植后免疫耐受的诱导提供了思路^[15,16].

新分离的单个肝细胞较易受损, 轻微损伤即可导致凋亡, 移植供体进入受体通过门静脉后仅有30%的肝细

胞存活^[17]. 因此如何保证新分离并经紫外线照射的成熟肝细胞的质量和稳定的生物学功能是非常必要的. 本研究采用改良两步胶原酶灌注法新分离的成人原代肝细胞台盼蓝拒染检测活率>90%. 以含有肝细胞生长因子^[18]的新配制的完全培养基连续培养后发现肝细胞的形态和贴壁良好, 细胞的凋亡明显改善, 且发现小剂量紫外线照射(200 J/m²)处理的肝细胞与对照组比较形态无明显差异; 同时通过检测ALB来评估细胞的合成功能, 结果发现紫外线照射200 J/m²的肝细胞在培养第3天的白

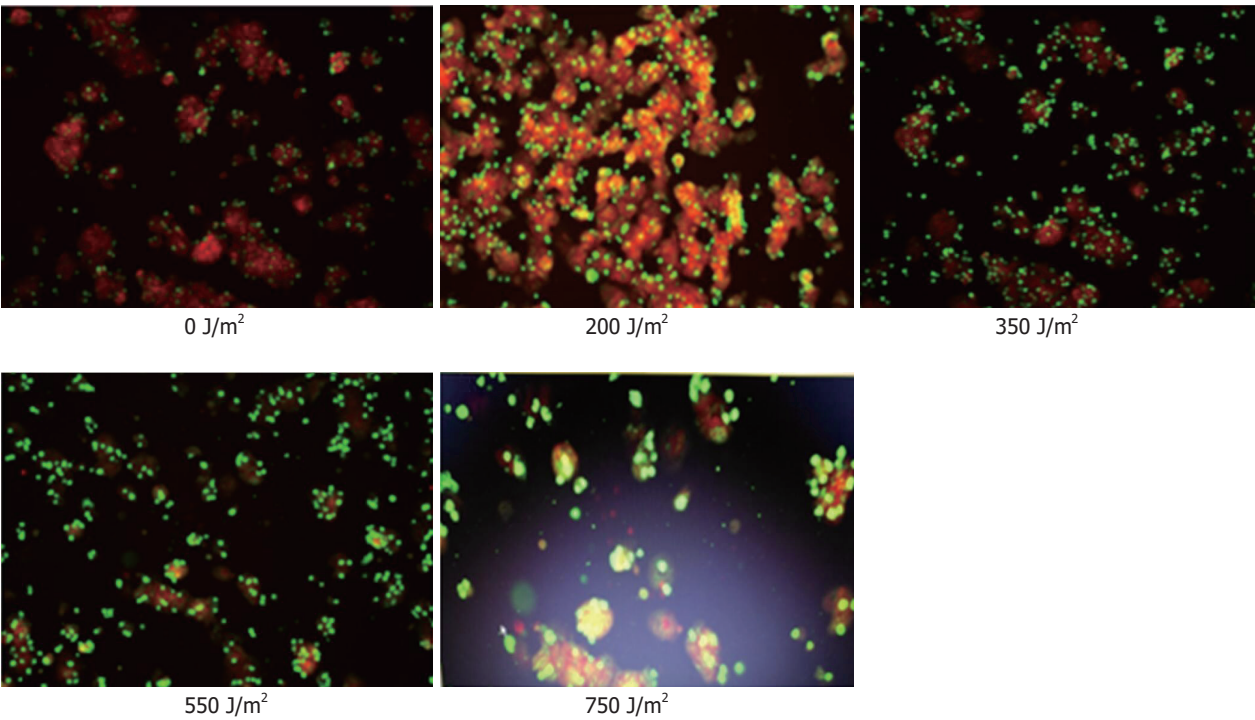


图 3 不同强度紫外线照射后培养第3天肝细胞膜电位的变化(100×).

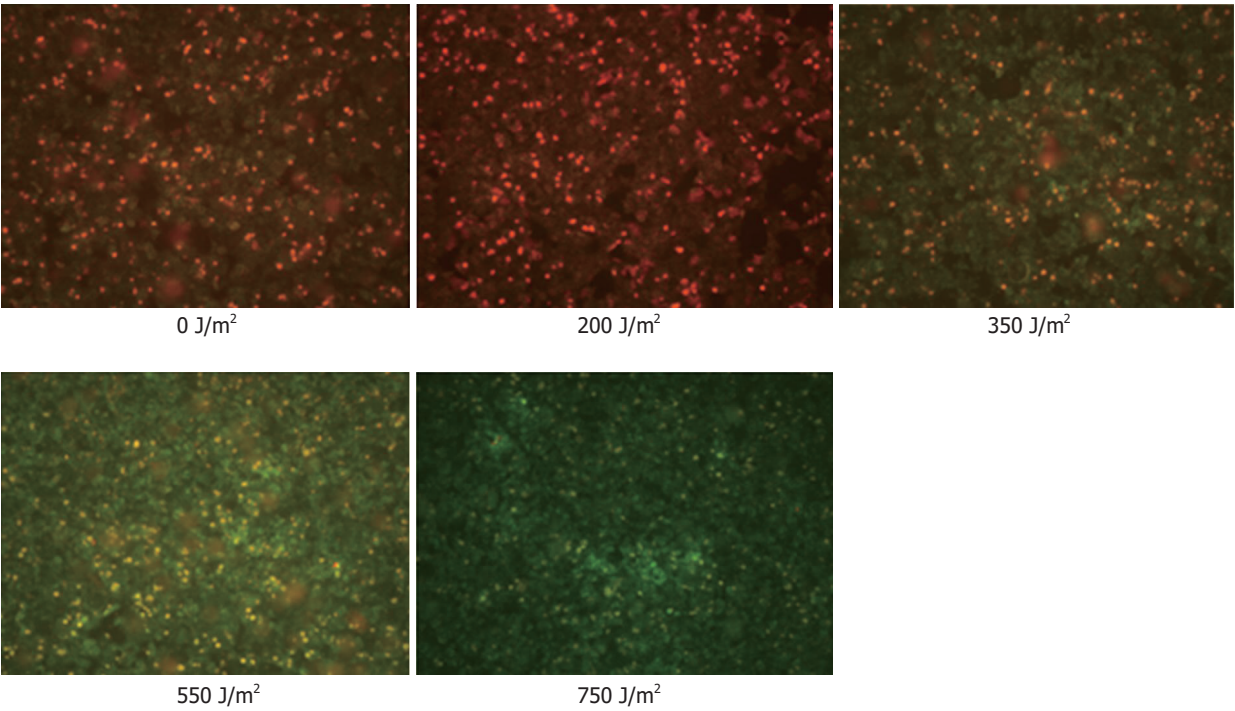


图 4 不同强度紫外线照射后培养第5天肝细胞膜电位的变化(100×).

蛋白合成处于最佳状态, 稍高于对照组, 随着照射强度的增大而下降.

由于紫外线可以导致肝细胞DNA损伤, 本研究为了确认紫外线照射对肝细胞稳定性影响的安全强度, 以CCK-8法检测细胞活力, 表明200 J/m²紫外线照射对细胞活力影响不大, 与对照组无明显差别, 但随着照射强

度的增加和培养时间的延长细胞活力逐渐降低, 说明紫外线的强度对肝细胞有一定的损伤, 而随着时间的延长肝细胞的凋亡也可能增加.

细胞凋亡早期, 细胞形态并不会发生明显的改变, 然而细胞膜电位的改变与细胞物质转运功能又是息息相关的, 能反应细胞的功能状态^[19]. 因此检测细胞的膜电位变

化,发现肝细胞膜电位在紫外线照射强度 200 J/m^2 时膜电位稳定,细胞状态良好,且培养到第五天也没有明显变化,说明经过低剂量照射的肝细胞膜稳定性较好;随着照射强度增大,膜电位的差距变大,细胞膜损伤,细胞稳定性明显下降。

有文献^[20,21]采用MLHC实验评价体外培养细胞的免疫原性大小。本研究中的肝细胞是蛋白质抗原,无供体抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APC)的存在,是受体T细胞间接识别供体肝细胞。将处理后的肝细胞与T淋巴细胞混合培养,通过T细胞的增殖评价不同照射强度下肝细胞的免疫原性大小,结果显示经紫外线照射后的肝细胞,并未丧失对同种MHC抗原的免疫应答能力。但不同的照射强度对肝细胞免疫原性的影响是有差异的,发现 200 J/m^2 照射的肝细胞引起淋巴细胞增殖能力下降,说明经过小剂量紫外线处理的肝细胞免疫原性下调;但 350 J/m^2 、 550 J/m^2 、 750 J/m^2 组却有升高,可能与肝细胞膜受损伤,表达了相应的抗原成分有关。Venkateshan等体外研究发现紫外线照射肝细胞后引起T细胞活化,产生的CD4⁺T细胞分泌细胞因子IL-10,但不分泌IL-4和IFN- γ ;另外,单核细胞/巨噬细胞和树突状细胞作为APC,供体肝细胞植入后,被APC识别并提呈给T细胞,是免疫应答发生的基础。通过紫外线照射诱导肝细胞表观遗传改变,使APC无法识别,T细胞活化受阻,从而导致免疫耐受^[22]。

综上所述, 200 J/m^2 的紫外线照射可以降低成人原代肝细胞的免疫原性,且在这个强度下,肝细胞的活力和合成功能得到较好保留,该研究结果或许在今后的HCT临床应用中减少免疫排斥有一定意义。

文章亮点

实验背景

肝细胞移植(hepatocyte transplantation, HCT)是治疗肝衰竭非常有前景的手段,虽然很多因素影响其有效性,但受体的免疫排斥反应是影响HCT疗效的主要因素,为了减少其排斥反应,临床不得不用大量的免疫抑制剂而增加其风险;有实验证实紫外线可引起免疫抑制,不过紫外线也能导致细胞DNA损伤,那么如何寻求一种平衡,既能降低肝细胞免疫原性,又能避免紫外线对肝细胞的过度损伤,从而较好保存肝细胞的稳定性和细胞合成功能。所以寻找适合的紫外线照射强度或许可以达到这样的效果。

实验动机

本研究的主题就是通过不同的实验证实适合的紫外线

强度既能引起相应的免疫抑制,又不至于引起肝细胞的稳定性的破坏而影响细胞功能。拟解决的问题是原代肝细胞的经紫外线照射对细胞活力、线粒体膜、蛋白合成功能和引起淋巴细胞增殖活性的影响。这些问题的解决对HCT的临床应用有较好的促进作用。

实验目标

通过实验确定适合的紫外线照射强度,在这一强度下可以抑制肝细胞的免疫反应,且实验肝细胞的生物学活性不受或较少受影响。实现这一目标可以提高移植细胞的存活效率,减少或避免免疫抑制剂的应用。

实验方法

本研究取外科手术切除的良性病变肝组织,经改良的胶原酶灌注法分离得到成人原代肝细胞,分为对照组(0 J/m^2)和四个不同强度紫外线照射组(分别为 200 、 350 、 550 和 750 J/m^2),台盘蓝拒染和CCK-8法检测肝细胞的活力;JC-1检测线粒体膜电位的变化,通过荧光显微镜可以观察膜电位变化导致的细胞凋亡,并通过酶标仪读取OD值进一步量化膜损伤程度;直接混合淋巴细胞肝细胞培养(mixed lymphocyte hepatocyte culture, MLHC)检测紫外线对肝细胞的引起淋巴细胞增殖的效率,全自动生化分析仪检测肝细胞的白蛋白的合成能力。从不同角度检测紫外线对肝细胞的影响。

实验结果

本研究基本达到实验目的,首先成功分离来源于成人良性病变手术切除肝组织的肝细胞,胎盘蓝拒染活率在90%以上,在 200 J/m^2 紫外线强度照射组,CCK-8检测肝细胞的活率和形态学上与对照组无差异;JC-1法无论从荧光显微镜下观察所见还是酶标仪量化计算结果都展示了较好的线粒体膜稳定性;生化结果也证实了在这一强度下肝细胞有较好的白蛋白合成功能;MLHC实验也表现出了肝细胞引起淋巴细胞增殖抑制现象,且有统计学意义。而增大照射强度则肝细胞则显示肝细胞的活力衰退、膜电位下降,细胞凋亡,从而细胞的蛋白合成能力减弱,并且发现肝细胞引起淋巴细胞增殖能力加强,这可能与因肝细胞受损表达了肝细胞相表观藏的抗原有关。

实验结论

发现低剂量的紫外线照射可降低肝细胞引起淋巴细胞增殖活性;同时还能较好的保存肝细胞的活力、线粒体膜电位的稳定性,从而保证了细胞功能的正常发挥,通过本研究也证实了适当的紫外线照射可引起免疫抑制现象。这些发现或许对HCT的临床实践有一定的应用价值。

展望前景

本研究的教训是做增殖实验只用了经典的MLHC实验检验肝细胞引起淋巴细胞增殖活力下降, 而应该选用更多的方法证实这一现象, 比如EdU实验检测细胞增殖过程中的DNA来进一步说明其增殖效应。未来的研究方向是探索更好的肝细胞培养技术减少和组长肝细胞凋亡, 并一步研究紫外线对肝细胞表观生物学性状的影响, 说明其导致免疫抑制的机制。

4 参考文献

- 1 李爱民. 多点穿刺灌注法分离成人肝细胞及其体外功能的实验研究. 广州市: 南方医科大学 2009 [DOI: 10.7666/d.y1553525]
- 2 Freshney RI. Culture of specific cell types. John Wiley Sons, Inc., 2005 [DOI: 10.1002/0471747599.cac023]
- 3 Tolosa L, Pareja-Ibars E, Donato MT, Cortés M, López S, Jiménez N, Mir J, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. Neonatal livers: a source for the isolation of good-performing hepatocytes for cell transplantation. *Cell Transplant* 2014; 23: 1229-1242 [PMID: 23803290 DOI: 10.3727/096368913X669743]
- 4 Ibars EP, Cortes M, Tolosa L, Gómez-Lechón MJ, López S, Castell JV, Mir J. Hepatocyte transplantation program: Lessons learned and future strategies. *World J Gastroenterol* 2016; 22: 874-886 [PMID: 26811633 DOI: 10.3748/wjg.v22.i2.874]
- 5 李兰娟. 肝细胞移植免疫排斥反应的机制与处理策略. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 52 [DOI: 10.3760/j.issn:1007-3418.2003.06.019]
- 6 蔡鸿宇, 陈钟. 肝细胞移植免疫排斥反应的研究与应用. 中国组织工程研究与临床康复 2007; 11: 9538-9542 [DOI: 10.3321/j.issn:1673-8225.2007.47.013]
- 7 Oldhafer F, Bock M, Falk CS, Vondran FW. Immunological aspects of liver cell transplantation. *World J Transplant* 2016; 6: 42-53 [PMID: 27011904 DOI: 10.5500/wjt.v6.i1.42]
- 8 Han B, Lu Y, Meng B, Qu B. Cellular loss after allogenic hepatocyte transplantation. *Transplantation* 2009; 87: 1-5 [PMID: 19136883 DOI: 10.1097/TP.0b013e3181919212]
- 9 Puppi J, Strom SC, Hughes RD, Bansal S, Castell JV, Dagher I, Ellis EC, Nowak G, Ericzon BG, Fox IJ, Gómez-Lechón MJ, Guha C, Gupta S, Mitry RR, Ohashi K, Ott M, Reid LM, Roy-Chowdhury J, Sokal E, Weber A, Dhawan A. Improving the techniques for human hepatocyte transplantation: report from a consensus meeting in London. *Cell Transplant* 2012; 21: 1-10 [PMID: 21457616 DOI: 10.3727/096368911X566208]
- 10 刘莉, 唐世刚. 一种改良的胶原酶灌注流高效分离肝细胞技术的建立. 临床肝胆病杂志 2012; 28: 227-229 [DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2012.03.018]
- 11 Alessandri C, Basili S, Maurelli M, Andreozzi P, Violi F, Cordova C. Relationship between lipoprotein(a) levels in serum and some indices of protein synthesis in liver cirrhosis. *Clin Chim Acta* 1994; 224: 125-129 [PMID: 8004782 DOI: 10.1016/0009-8981(94)90178-3]
- 12 Khan Z, Strom SC. Hepatocyte Transplantation in Special Populations: Clinical Use in Children. *Methods Mol Biol* 2017; 1506: 3-16 [PMID: 27830542 DOI: 10.1007/978-1-4939-6506-9_1]
- 13 傅一鸣. 肝细胞移植研究进展. 齐鲁师范学院学报 2011; 26: 56-59 [DOI: 10.3969/j.issn.1008-2816.2011.03.013]
- 14 杜传福, 于立新. 供体肝细胞诱导受体移植免疫耐受机制. 肝脏 2006; 11: 128-129 [DOI: 10.3969/j.issn.1008-1704.2006.02.025]
- 15 Takeuchi H, Yoshikawa M, Kanda S, Nonaka M, Nishimura F, Yamada T, Ishizaka S, Sakaki T. Implantation of xenografts into the parkinsonian rat brain after portal venous administration of xenogeneic donor spleen cells. *J Neurosurg* 2001; 94: 775-781 [PMID: 11354409 DOI: 10.3171/jns.2001.94.5.0775]
- 16 康克非. 中波紫外线免疫抑制机制的研究. 国际皮肤性病学杂志 2007; 33: 337-339 [DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4173.2007.06.005]
- 17 Gupta S, Rajvanshi P, Sokhi R, Sleheria S, Yam A, Kerr A, Novikoff PM. Entry and integration of transplanted hepatocytes in rat liver plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium. *Hepatology* 1999; 29: 509-519 [PMID: 9918929 DOI: 10.1002/hep.510290213]
- 18 吴福生. 肝细胞生长因子及其受体在肝癌进展中的作用及骨化三醇调控肝癌细胞的机制研究. 博士论文, 浙江大学 2006. Available from: http://www.wanfangdata.com.cn/details/detail.do?_type=degree&id=Y878068
- 19 陈楠楠, 刘春雨, 黄世林, 向阳, 张晨, 张德杰. 线粒体膜电位在PUVA诱导HL-60、K562细胞凋亡时的变化. 中草药 2008; 31: 1679-1681 [DOI: 10.3321/j.issn:1001-4454.2008.11.027]
- 20 于海华. 肝癌患者细胞免疫状态的研究及肝癌切除对细胞免疫的影响. 博士论文, 复旦大学. 2008 [DOI: 10.7666/d.y1965256]
- 21 房崇芸, 吴雄文, 韩军艳, 刘敏, 梁智辉, 龚非力. 长期混合淋巴细胞培养-细胞毒实验模型的建立. 中华器官移植杂志 2001; 22: 277-279 [DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2001.05.008]
- 22 Venkateshan V, Shakeel NB, Rao NM, Amash V, Rangarajan N, Habibullah CM. Differential responses of UV-B irradiation on the viability and intracellular calcium influx in goat hepatocytes-in vitro effect. *Mol Cell Biochem* 2004; 266: 161-166 [PMID: 15646038 DOI: 10.1023/b:mcbi.0000049155.32426.10]

科学编辑: 张晗 制作编辑: 刘继红





Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7041 Koll Center Parkway, Suite 160, Pleasanton,
CA 94566, USA
Telephone: +1-925-3991568
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
https://www.wjgnet.com



ISSN 1009-3079

