

I 号冻存液改善小鼠肝细胞冻存质量研究

刘 莉¹, 唐世刚², 胡小宣¹

(1 湖南省人民医院, 湖南 长沙 410005; 2 大连中山大學附属医院, 辽宁 大连 116001)

[摘 要] **目的** 对自行配制组方的 I 号冻存液冻存小鼠肝细胞进行研究, 探索一种效果较好的冻存液以改善冻存肝细胞质量。**方法** 以体重 20~30 g 的昆明小鼠为肝细胞供体, 用改良的胶原酶灌注法分离肝细胞。将分离好的肝细胞分别以 I 号冻存液(实验组)和标准冻存液(对照组)进行逐级降温缓慢冻存, 置液氮中。于 0.5、1、1.5、2 个月快速复苏肝细胞, 观察并测定细胞活率、功能和形态学。**结果** 冻存小鼠肝细胞 2 个月后复苏检测, 实验组的肝细胞活率台盼蓝(TB)染色为(80.18±2.44)%, 对照组肝细胞活率 TB 染色为(49.71±3.51)%, 两组差异有显著性($t=23.64, P<0.05$); 血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸转氨酶(AST)和乳酸脱氢酶(LDH)漏出率的值, 实验组分别为(14.03±2.21)U/L、(15.14±3.03)U/L、(15.11±2.10)U/L, 而对照组分别为(24.28±1.96)U/L、(25.44±2.06)U/L、(26.22±3.23)U/L, 两两比较, 差异均有显著性(t 分别为 8.84、8.58、8.32, 均 $P<0.05$); 合成清蛋白的值, 实验组为(3.24±0.18)g/L, 对照组为(2.56±0.33)g/L, 两组差异有显著性($t=9.25, P<0.05$)。同一组各个复苏时段, 实验组与对照组的肝细胞活率, 肝细胞 ALT、AST、LDH 的漏出率, 合成清蛋白的能力之间无差别(均 $P>0.05$)。**结论** 在本研究中, 冻存小鼠肝细胞 2 个月, I 号冻存液较常规冻存液能有效减轻小鼠肝细胞的损伤, 发挥良好保护作用。小鼠肝细胞在 I 号冻存液的保护下, 置液氮中保存 2 个月, 不影响肝细胞活性。

[关键词] 肝细胞; 冻存; 复苏; 肝移植; 细胞活性

[中图分类号] R657.3 Q813.1⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2009)04-0232-05

Effect of cryoprotectant I on the improvement of cryopreservation quality of mice hepatocytes

LIU Li¹, TANG Shi-gang², HU Xiao-xuan¹ (1 Hunan Peoples' Hospital, Changsha 410005, China 2 The Affiliated Hospital of Zhongshan University, Dalian 116001, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of cryoprotectant I on the cryopreservation of mice hepatocytes, so as to explore a cryoprotectant with better effect for improving the cryopreservation quality of hepatocytes. **Methods** Kunming mice weighting 20~30g were as donors, an improved collagenase perfusion technique was established to isolate the mice hepatocytes. The isolated mice hepatocyte were cryopreserved respectively with cryoprotectant I (trial group) and the standard cryoprotectant (control group) in nitrogen liquid. Cryopreserved mice hepatocytes were thawed at 0.5 month, 1 month, 1.5 months, 2 months respectively. The viability, function and morphology of hepatocytes were observed. **Results** After 2 months cryopreservation, the viability of thawed hepatocytes in trial group were (80.18±2.44)% with trypan-blue staining, while the control group were (49.71±3.51)%, there was significant difference between two groups ($t=23.64, P<0.05$); the leakage rate of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH) of trial group were (14.03±2.21)U/L, (15.14±3.03)U/L, and (15.11±2.10)U/L respectively, and the control group were (24.28±1.96)U/L, (25.44±2.06)U/L and (26.22±3.23)U/L respectively, there were significant differences between two groups respectively ($t=8.84, 8.58, 8.32$; all $P<0.05$); the synthesis of albumin (ALB) of the trial group and control group were (3.24±0.18)g/L and (2.56±0.33)g/L respectively, there was significant differences between two groups ($t=9.25, P<0.05$). There were no obvious differences in the same group of its viability, the leakage rates of ALT, AST and LDH and synthesis of ALB at each stage of thawing (all $P>0.05$). **Conclusion** In this research, compared with

[收稿日期] 2008-10-09

[作者简介] 刘莉(1982-), 女(汉族), 湖南省湘潭县人, 医师, 主要从事病毒性肝炎临床研究。

[通讯作者] 刘莉 E-mail: liulixiangya@126.com

standard cryoprotectant, the cryoprotectant I can effectively protect the mice hepatocytes from cryopreserved injury, mice hepatocytes can be cryopreserved in nitrogen liquid for two months with no changes in viability.

[Key words] hepatocyte; cryopreservation; resuscitation; hepatocyte transplantation; cell viability

[Chin Infect Control, 2009, 8(4): 232-236]

肝细胞移植 (hepatocyte transplantation) 由于其技术相对简单, 对机体影响不大, 一个供体可供多个受体, 可反复进行并可提供较好的肝功能支持, 正受到越来越广泛的重视, 为急性、亚急性、慢性肝脏疾病和遗传代谢性肝病的治疗提供了一条新的途径^[1-5]。

肝细胞移植在大量的动物实验和一些有限的临床实践中获得了良好效果, 成为有前途的肝病治疗方法^[6-9]。随着肝细胞移植的发展, 肝细胞的需求成为目前主要难题。若有实用可靠的低温储存技术, 建立一个肝细胞库, 危重患者随时都可得到大量高活力、有功能的肝细胞, 肝细胞移植就可以大力推广了。

本实验以中南大学湘雅医学院动物部昆明小鼠为肝细胞供体, 用胶原酶灌注法分离肝细胞, 自行配制以二甲基亚砜 (DMSO) 为主加入细胞保护剂的冻存液进行肝细胞的冷冻保存。用对比的方法研究肝细胞冻存前后活率 and 功能变化情况。通过实验, 我们发现该冻存液能更好地保存冻存肝细胞的形态、活力及其生物学功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 以中南大学湘雅医学院动物部昆明小鼠为肝细胞供体, 体重 20~30 g, 雌雄不限。

1.1.2 冷冻保存液的配制及分组 按冻存液的不同成分分为以下 2 组。(1) 对照组冻存液: 在体积 27 mL, 含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中加入 3 mL 的 DMSO, 使 DMSO 的最终浓度为 10%; (2) 实验组冻存液: 采用自行配制组方的以 DMSO 为主的 I 号冻存液。

1.2 方法

1.2.1 小鼠肝细胞的分离 用乙醚麻醉小鼠后, 以 75% 的乙醇常规消毒, 做下腹弧形切口, 依次切开皮肤、腹膜后暴露腹腔, 将胃肠移至小鼠腹部左侧, 暴露门静脉和下腔静脉, 整个过程均按照手术无菌原则执行。用 5 号针穿刺肝下腔静脉, 以 6~8 mL/min 的胶原酶灌注液灌注, 充分消化肝脏。取下肝脏, 去除肝包膜、胆囊、大血管等纤维结缔组织, 钝性

撕裂肝组织, 使大量的肝细胞悬液混于 4℃ 预冷的 RPMI-1640 液中, 经 100 μm 尼龙网筛过滤去除细胞团块及组织纤维, 得到细胞悬液。继续将细胞悬液用 RPMI-1640 培养液洗涤 3 次, 低速离心 (500 r/min, 3 min) 后, 用 PBS 液洗一遍, 再用 Percoll 液梯度离心 (2 000 r/min, 10 min) 后, 用含血清的完全培养基重悬 2 遍, 把离心后沉淀的细胞用定量的完全培养基制成细胞悬液备用。

将获得的肝细胞悬液的密度调整至浓度为 $1.0 \times 10^7 \sim 2.0 \times 10^7$ /mL (方法): 血细胞计数法, 肝细胞数/mL 原液 = 4 大格肝细胞数 / 4×10^4 , 装入 4 支冻存管各 0.7 mL, 备用, 同时取少量做台盼蓝 (TB) 染色和细胞形态学检查。

1.2.2 小鼠肝细胞冷冻保存 (1) 将 2 支装有细胞悬液的冻存管以 500 r/min 低速离心 3 min 后, 弃去上清液, 分别加入对照组冻存液和实验组冻存液, 此时细胞的终浓度为 2.0×10^6 /mL, 用吸管轻轻吹打使细胞均匀。(2) 旋紧冻存管, 于 4℃ 下平衡 30 min, 开始冷冻, 冻存采用逐级降温法, 将细胞置冻存仪中过夜, 然后移入液氮罐中。

1.2.3 小鼠肝细胞的复苏 在冻存后 0.5、1、1.5、2 个月, 分别取出各组冻存的肝细胞, 立即 37℃ 水浴, 快速解冻, 低速离心 (500 r/min, 3 min), 弃去上清液, 加入培养基, 用吸管将细胞吹打均匀。取出少量的细胞悬液, 用 TB 染色检测细胞活率和细胞形态。

1.2.4 肝细胞活率的测定 将上述冻存前及复温后的肝细胞悬液分别取样, 用 TB 拒染法测定细胞活率。具体方法: 取 90 μL 细胞悬液移入小试管中, 加入 10 μL 0.4% TB 染色液混匀, 静置 1~2 min 后, 用血球计数板分别计数活细胞和死细胞, 镜下死细胞被染成蓝色, 而活细胞不着色。活细胞率 = 活细胞总数 / (活细胞总数 + 死细胞总数) × 100%。

1.2.5 肝细胞血清丙氨酸转氨酶 (ALT)、天门冬氨酸转氨酶 (AST) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 的漏出率测定 将 2 组肝细胞液于冻存前及复温后分别取样进行培养, 并于培养 24 h 后分别取细胞上清液, 用日式 7170 型生化分析仪测定 ALT、AST 和 LDH 的浓度。

1.2.6 肝细胞血清清蛋白(ALB)合成能力测定
将 2 组肝细胞于冻存前及复温后分别取样进行培养,并于培养 24 h 后分别取细胞上清液,用日式 7170 型生化分析仪测定 ALB 浓度。

1.2.7 肝细胞的形态观察 用 Olympus 倒置相差生物显微镜观察肝细胞的形态变化。

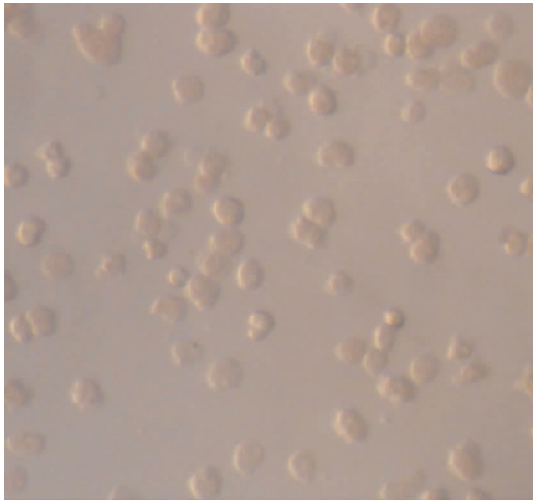
1.2.8 统计学处理 所有统计指标均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组之间的比较采用两样本 *t* 检验,同一组各时段间的比较采用 *F* 检验。

2 结果

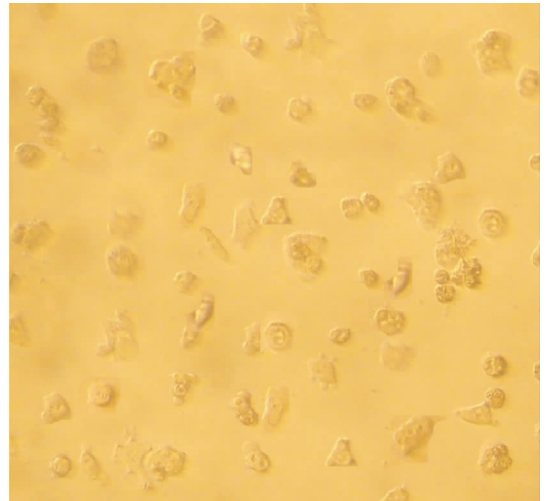
2.1 肝细胞的分离纯化、形态和产率

2.1.1 肝细胞的分离纯化 本实验以胶原酶灌注法分离肝细胞,每只鼠肝均可获得大量肝细胞,实验即时分离的肝细胞活率为 $(80 \pm 10)\%$,在光镜下可观察到少量红细胞及细胞碎片。而经 Percoll 分离液梯度分离后,肝细胞的活率显著增高,均在 90% 以上,光镜下几乎不见红细胞等杂质及细胞碎片。

2.1.2 肝细胞的形态 相差显微镜下新鲜分离的肝细胞多数散在分布均匀、透亮,球形或圆形,边界清晰,细胞核位于正中,可见双核细胞,见图 1A;肝细胞培养 2~4 h 后可见贴壁,边缘伸展,细胞体积增大,呈椭圆形或多边形,胞体变平变薄,双核肝细胞明显增多,24~48 h 贴壁生长明显,双核肝细胞进一步增多,见图 1B。



A(10×10)



B(10×10)

图 1 新鲜分离细胞和贴壁细胞

Figure 1 Fresh isolated hepatocytes and sticking hepatocytes

2.1.3 分离肝细胞的产率 对 20 只小鼠进行了胶原酶灌注分离,每只小鼠可获得大量的分离肝细胞。

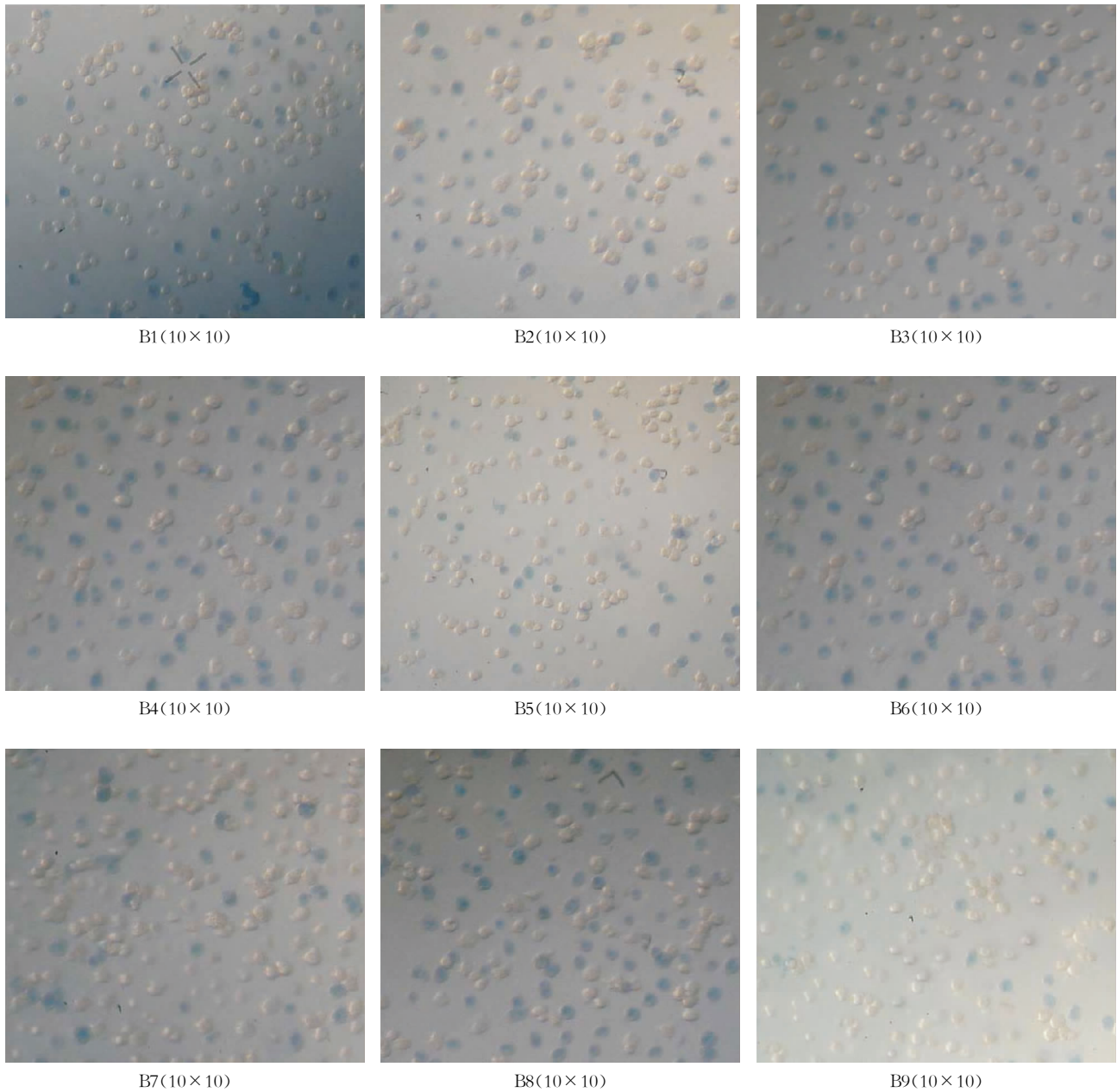
2.2 冻存前后肝细胞活率的变化 用 TB 拒染法测定游离肝细胞活率和冷冻复温后肝细胞的活率,结果见表 1。冷冻前新鲜游离肝细胞的活率高达 90%,见图 2 B1。冷冻复温后测得实验组肝细胞活率在

80%左右,见 TB 染色图 2 B3、B5、B7、B9;对照组肝细胞的活率在 50%左右,见 TB 染色图 2 B2、B4、B6、B8。复温冻存 0.5、1、1.5、2 个月的肝细胞,实验组与对照组复苏肝细胞活率之间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$),而同组各个不同复苏时段之间复苏肝细胞的活率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 实验组与对照组肝细胞冻存前和冻存复温后细胞活率的比较(%)

Table 1 Comparison in viability of hepatocytes before cryopreservation and post-thawing between trial group and control group (%)

组别	冻存前	复温			
		冻存 0.5 个月	冻存 1 个月	冻存 1.5 个月	冻存 2 个月
实验组 ($n = 20$)	91.20 ± 2.31	80.62 ± 2.62	81.21 ± 2.20	80.31 ± 3.03	80.18 ± 2.44
对照组 ($n = 20$)	91.20 ± 2.31	51.21 ± 3.10	50.63 ± 2.66	51.57 ± 3.96	49.71 ± 3.51
<i>t</i>		23.29	23.50	22.42	23.64
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05



B1 是新鲜分离的肝细胞 TB 染色照片,经细胞计数测得细胞活率为 90%;图 B2、B4、B6、B8 分别为对照组冻存肝细胞 0.5、1、1.5、2 个月复苏后倒置显微镜下 TB 染色照片,经细胞计数测得细胞活率为 50%;图 B3、B5、B7、B9 分别为实验组冻存肝细胞 0.5、1、1.5、2 个月复苏后倒置显微镜下 TB 染色照片,经细胞计数测得细胞活率为 80%

图 2 实验组与对照组不同时段复苏细胞 TB 染色照片

Figure 2 TB staining results of different hepatocyte thawing periods between trial group and control group

2.3 冻存前后肝细胞 ALT、AST、LDH 漏出率的比较 游离小鼠肝细胞在 2 组冻存液中冻存前后 ALT、AST、LDH 的漏出率比较见表 2。对照组和实验组冻存前的 ALT、AST、LDH 漏出率均分别为 $(10.66 \pm 1.37)\%$ 、 $(11.67 \pm 2.36)\%$ 、 $(10.98 \pm 1.66)\%$,而在冻存不同时段复温后,实验组 ALT、AST、LDH 的漏出率均明显低于对照组 ($P < 0.05$),同组各个时段复苏肝细胞的 ALT、AST、LDH 漏出率之差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 肝细胞冻存前和冻存后 ALB 合成能力的比较 2 组小鼠肝细胞在冻存前和冻存复苏后培养 24 h 的肝细胞 ALB 合成能力比较见表 3。冻存前对照组、实验组的肝细胞 ALB 合成均为 3.6 g/L 左右,而在不同冻存阶段复苏后培养 24 h 测得实验组的 ALB 合成在 3.3 g/L 左右,对照组的 ALB 合成在 2.5 g/L 左右,两组差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);同组各个复苏时段的肝细胞 ALB 合成能力无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 实验组与对照组冻存前和冻存复温后肝细胞 ALT、AST、LDH 漏出率的比较(%)

Table 2 Comparison in hepatocyte leakage rates of ALT, AST and LDH before cryopreservation and post-thawing between trial group and control group (%)

酶类	组别	冻存前	复温			
			冻存 0.5 个月	冻存 1 个月	冻存 1.5 个月	冻存 2 个月
ALT	实验组 (n=20)	10.66 ± 1.37	13.52 ± 2.10	13.65 ± 2.03	13.10 ± 1.81	14.03 ± 2.21
	对照组 (n=20)	10.66 ± 1.37	23.44 ± 1.83	23.69 ± 2.07	24.14 ± 2.22	24.28 ± 1.96
	t		8.86	8.85	8.78	8.84
	P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
AST	实验组 (n=20)	11.67 ± 2.36	14.84 ± 2.56	15.02 ± 2.84	14.76 ± 2.43	15.14 ± 3.03
	对照组 (n=20)	11.67 ± 2.36	25.28 ± 2.50	24.96 ± 2.98	25.09 ± 2.77	25.44 ± 2.06
	t		8.51	8.60	8.55	8.58
	P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
LDH	实验组 (n=20)	10.98 ± 1.66	14.65 ± 2.24	15.05 ± 2.54	14.84 ± 2.01	15.11 ± 2.10
	对照组 (n=20)	10.98 ± 1.66	25.87 ± 3.09	26.16 ± 1.97	25.98 ± 3.19	26.22 ± 3.23
	t		8.21	8.18	8.20	8.32
	P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 3 实验组与对照组冻存前和冻存复苏后肝细胞培养 24 h 合成 ALB 能力的比较(g/L)

Table 3 Comparison in synthesis of ALB of hepatocytes cultured 24 hours before cryopreservation and post-thawing between trial group and control group (g/L)

组别	冻存前	复苏			
		冻存 0.5 个月	冻存 1 个月	冻存 1.5 个月	冻存 2 个月
实验组 (n=20)	3.60 ± 0.21	3.40 ± 0.21	3.37 ± 0.16	3.25 ± 0.20	3.24 ± 0.18
对照组 (n=20)	3.60 ± 0.21	2.60 ± 0.30	2.51 ± 0.50	2.58 ± 0.46	2.56 ± 0.33
t		9.35	9.12	8.94	9.25
P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

3 讨论

传统的冻存保护体系为 DMSO 与血清以及 RPMI-1640 液配制而成, DMSO 的最终浓度为 10%。研究表明^[10], DMSO 存在严重的毒副作用, 它与蛋白巯基基团发生作用, 导致蛋白质变性, 损害肝细胞膜。因此, 我们在应用的冻存液中加用了相应的细胞膜保护剂和对抗 DMSO 毒副作用物质, 减轻肝细胞脂质过氧化, 保持自由基清除能力, 以减轻肝细胞的钙超载, 从而减轻肝细胞的损害和坏死。本实验证实, I 号冻存液在肝细胞保存中发挥了很好的作用, 既起到了理想的保护效果, 又减轻了 DMSO 对肝细胞的损伤。

Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation[J]. *New Engl J Med*, 1998, 338: 1422-1426.

[4] Hughes R D, Mitry R R, Dhawan A, *et al.* Hepatocyte transplantation for metabolic liver disease: UK experience[J]. *J Roy Soc Med*, 2005, 98(8): 341-345.

[5] Strom S C, Fisher R A, Melissa T, *et al.* Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure[J]. *Transplantation*, 1997, 63(4): 559-569.

[6] Sarkis R, Honiger J, Chafai N, *et al.* Semiautomatic macroencapsulation of fresh or cryopreserved porcine hepatocytes maintain their ability for treatment of acute liver failure[J]. *cell transplant*, 2001, 10(7): 601-607.

[7] Bilir B M, Kumpe D, Krysl J, *et al.* Hepatocyte transplantation in patients with liver cirrhosis [J]. *Gastroenterology*, 1998, 114: 1212.

[8] Dhawan A, Mitry R R, Hughes R D, *et al.* Hepatocyte transplantation for inherited factor VII deficiency[J]. *Transplantation*, 2004, 78(12): 1812-1814.

[9] Hubel A, Conroy M, Darr T B. Influence of preculture on the prefreeze and postthaw characteristics of hepatocytes[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 71(3): 173-183.

[10] Avakawa T, Carpenter J F, Kita Y A, *et al.* The basis for toxicity of certain cryoprotectants; A[J]. *hypothesis cryobiology*, 1990, 27: 401-415.

[参考文献]

[1] Bilir B M, Guinette D, Karrer F, *et al.* Hepatocyte transplantation in acute liver failure[J]. *Liver Transpl*, 2000, 6(1): 32-40.

[2] Strom S C, Roy Chowdhury J, Fox I J, *et al.* Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease[J]. *Semin Liver Dis*, 1999, 19(1): 39-48.

[3] Fox I J, Chowdhury J R, Kaufman S S, *et al.* Treatment of the