

## · 实验研究 Experiment research ·

夹层胶原“三明治”法冻存复苏肝细胞的  
实验研究

殷海涛, 滕皋军, 刘宝瑞

**【摘要】** 目的 研究胶原、表皮生长因子对新鲜分离及冻存复苏后 Sprague-Dawley (SD) 大鼠肝细胞活率、形态和功能的影响, 期望建立一种较为完善的肝细胞体外培养及冻存复苏体系, 为肝细胞移植、生物人工肝及相关肝细胞研究获取充足有效的肝细胞来源提供必须的技术支持和理论依据。方法 采用胶原酶二步原位循环肝脏灌注法分离 SD 大鼠肝细胞, 测定不同条件培养及冻存复苏后各组肝细胞的活性及功能。结果 双层胶原及双层胶原 + 表皮生长因子组细胞活率、蛋白质含量及细胞功能均优于普通组 ( $P < 0.05$ )。结论 双层胶原体外培养体系更接近于肝细胞体内生长环境, 能有效的减少各种理化因素对肝细胞的损伤, 有利于肝细胞在体外长期保存, 是一种较为理想的培养及冻存复苏体系。

**【关键词】** 肝细胞; 胶原; 表皮生长因子; 冻存复苏

**Experimental research on culturation, cryopreservation and thawing with sandwiched-cultured rat hepatocytes between two collagen gel layers** YIN Hai-tao, TENG Gao-jun, LIU Bao-rui. Institute of Interventional Radiology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China

**【Abstract】 Objective** To evaluate the effects of double collagen and epidermal growth factor (EGF) on morphology, viability and function of Sprague-Dawley (SD) rat hepatocytes after cryopreservation and thawing. To investigate a kind of more ideal liver cell cultivation in situ, for offering the most basic material in liver cell transplantation. **Methods** Rat hepatocytes were isolated by a two-step collagenase technique and cultured in different conditions. After freeze-thaw-cycle, the viability and function of the cells were measured. **Results** The viability and function of hepatocytes in collagen and in collagen with EGF groups were prior to those in other groups. ( $P < 0.05$ ) **Conclusions** The Double Gel (sandwich) culture configuration provides a stable three dimensional matrix for hepatocytes to maintain their morphological and functional differentiation for a long term periods. (J Intervent Radiol, 2005, 14: 404-408.)

**【Key words】** Hepatocyte; Collagen; Epithelial growth factor; Cryopreservation and thawing

肝细胞移植术始于 20 世纪 70 年代, 但在临床应用报告中均未能证实其临床有效性。90 年代以来, 随着肝细胞冷藏复苏技术和分子生物学的进展、移植肝细胞标记技术的改进以及介入放射新技术在这一领域的应用, 肝细胞移植再次成为新的研究热点<sup>[1]</sup>。肝细胞移植术具有操作相对简单、对机体影响较小、可重复多次进行以及一个供体可为多个受体使用, 甚至有望建立肝细胞库等优点。迄今, 有大量有关肝细胞移植治疗急性肝功能衰竭的实验及临床应用报道, 证实了移植的肝细胞在宿主器官生长繁殖并产生明显的抗肝功能衰竭作用<sup>[2-4]</sup>。但肝细

胞在体外增殖能力差, 原代培养难以成功, 故在一定程度上限制了肝细胞移植的广泛开展。肝细胞移植, 不但要求随时可获得充足有效的高质量肝细胞, 而且需要植入体内的肝细胞能保持其形态特征、增殖分化和功能的稳定性。因此, 肝细胞移植要想广泛应用于临床并部分替代原位肝移植, 必须建立一整套完善的肝细胞分离制备、培养及保存技术。

本实验以 SD 大鼠肝细胞为研究对象, 通过改良 Seglen 胶原酶原位灌注法分离制备高产量、高活性的肝细胞, 从细胞生存的基本条件出发, 采用不同的培养及冻存复苏体系, 比较各组肝细胞在相同时间段各项功能的差异, 并研究各种培养及冻存复苏体系对肝细胞冻存复苏的影响, 期望探索出一种较为理想的肝细胞培养及深低温贮存方法, 为肝细胞移植的开展提供合理、有效、充足的肝细胞来源。

作者单位: 210009 东南大学医学院附属中大医院介入放射研究所(殷海涛、滕皋军); 南京大学医学院附属南京市鼓楼医院肿瘤科(刘宝瑞); 殷海涛现在南京鼓楼医院工作

通讯作者: 滕皋军

## 材料和方法

### 一、材料

(一)实验动物 东南大学医学院动物实验中心提供的健康 SD 大鼠,体重( $180 \pm 20$ ) g,雌雄不拘,普通清洁级。

(二)培养基 RPMI Medium 1640 培养基,为 GIBCO BRL 公司产品。

(三)试剂和酶 D-Hank's 液和 Hank's 液、PBS 及胶原均自行制备,Ⅳ型胶原酶购自 Worthington biochemical corporation 公司,小牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所,二甲亚砜(DMSO)购自上海生工生物工程有限公司,MTT 溶液为 Fluka 公司产品,2,5-二苯基唑(PPO)购自华美生物工程公司,闪烁纯(POPO)为上海试剂一厂产品, $^3\text{H}$ -亮氨酸由北京原子能研究所提供。

### 二、方法

(一)肝细胞的分离 肝细胞的分离采用改良 Seglen 门静脉-下腔静脉双插管交替循环灌注法,最终经过离心除去杂质即可在较短时间内获得高产量高活力的肝细胞。

(二)肝细胞的短期培养 采用本实验室成熟的常规细胞培养方法。

(三)肝细胞的冻存 按如下程序降温  $0 \sim -8$   $^{\circ}\text{C}$ ( $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ),  $-8 \sim -15$   $^{\circ}\text{C}$ ( $6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ),  $-15$   $^{\circ}\text{C}$ (维持 10 min),  $-15 \sim -30$   $^{\circ}\text{C}$ ( $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )和  $-30 \sim -80$   $^{\circ}\text{C}$ ( $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ );当冻存标本的温度降至  $-80^{\circ}\text{C}$  时,快速打开冷冻箱门,将装有冻存管的纱布口袋迅速投入液氮中( $-196^{\circ}\text{C}$ )保存。

(四)肝细胞的复苏 将冻存期满的标本从液氮中取出,快速放入预热至  $37^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$  的水浴恒温箱中,并不时摇动使标本快速均匀融化,复制成细胞浓度为  $0.5 \times 10^6/\text{ml}$  的溶液。

### 三、实验设计

将制成  $0.5 \times 10^6/\text{ml}$  的肝细胞悬液,正常培养 3 d 后随机分成 4 组:A 组(正常短期原代培养肝细胞组,培养液中不含表皮生长因子,作为对照组);B 组(夹层胶原“三明治”法短期原代培养肝细胞,培养液中不含表皮生长因子);C 组(正常短期原代培养肝细胞组,培养液中含表皮生长因子);D 组(夹层胶原“三明治”法短期原代培养肝细胞,培养液中含表皮生长因子)。上述 4 组分别经冻存复苏后复制成  $0.5 \times 10^6/\text{ml}$  的肝细胞悬液,再分别在  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 3 d。

## 四、观察指标及测定方法

(一)冻存复苏后肝细胞回收率、活率的测定 锥虫蓝拒染色法检测活性肝细胞,肝细胞冻存复苏回收率 = 复苏后细胞总数/冻存前细胞总数,肝细胞冻存复苏活率 = 复苏后活细胞总数/冻存前活细胞总数。

(二)形态学观察 用 OLYMPAS 倒置相差生物显微镜及透射电镜观察细胞形态。

(三)MTT 法活性检测 将复苏后肝细胞制成浓度为  $5.0 \times 10^5/\text{ml}$  的悬液,接种于 96 孔培养板中(每孔体积  $200 \mu\text{l}$ );向每孔加入终浓度为  $0.5 \text{ g/L}$  MTT 试剂  $20 \mu\text{l}$ ,于  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下孵育 4 h 后,再添加 20% SDS ~ 50% DMF 溶液  $150 \mu\text{l}$  继续孵育 4 h。其后用平板离心机以 1000 转/min 离心 5 min,小心吸除孔内培养上清液;每孔内再加入 DMSO  $150 \mu\text{l}$  并振荡 10 min,使结晶物充分溶解;选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值。吸光度值与活细胞数呈正相关。

(四)各组冻存复苏后培养的不同时间段蛋白质合成量测定 采用可以掺入细胞蛋白质合成代谢中的核素标记  $^3\text{H}$ -亮氨酸,通过测定细胞的放射性强度,可了解细胞蛋白质合成代谢状况。

### 五、统计学处理

所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 统计软件,先进行方差分析,差异显著进行组间两两比较, $P < 0.05$  定为有统计意义。

## 结 果

### 一、肝细胞形态学观察

(一)光镜 光镜下可见在培养过程中冻存复苏后肝细胞伸展、贴附能力降低。A 组培养 24 h 后仍未贴壁,B、C、D 组贴壁所需时间延长,依次平均为 7、8.5 和 5 h。部分活力欠佳及凋亡的肝细胞悬浮于培养液中,相比活的肝细胞,其颜色暗淡、细胞膜欠光滑呈皱褶样改变。在培养液中还可见较多细胞碎片(图 1~4)。

(二)电镜观察 冻存复苏后肝细胞形态学的改变多为生物膜系统受影响,可出现膜相分离、膜的萎缩、膜成分的丧失甚至膜结构的消失;胞质内细胞器减少,线粒体肿大呈球形,嵴断裂和空泡性变;内质网结构不清,网状结构断裂消失;高尔基体膨胀;细胞核内染色质变性和凝聚,分布不均匀,有的细胞还可见到核固缩、核溶解、核碎裂等破坏现象(图 5、6)。

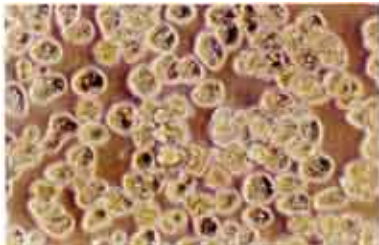


图 1 光镜下新鲜分离肝细胞呈椭圆形或圆形

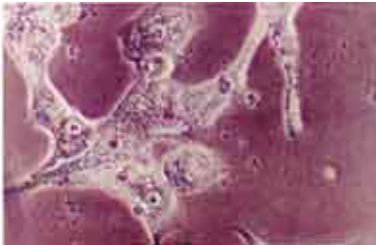


图 2 光镜下培养 72 h 肝细胞之间呈多种形式连接集落生长,聚集成片,并可见大量双核及三核肝细胞



图 3 光镜下的冻存复苏后肝细胞,呈圆形或椭圆形,轮廓清晰,与新鲜细胞无明显区别

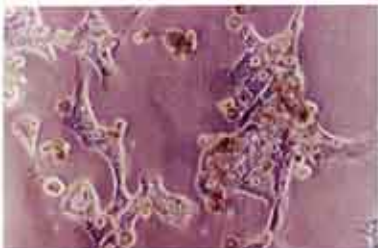


图 4 光镜下的冻存复苏后肝细胞经培养 48 h 后,显示贴壁生长良好

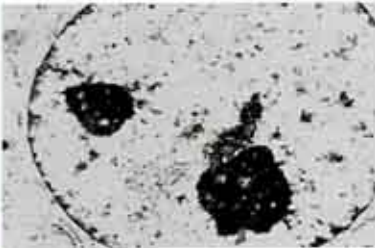


图 5 电镜下的新鲜分离肝细胞,核膜完整,染色质分布均匀,核仁清晰,细胞器仍可见

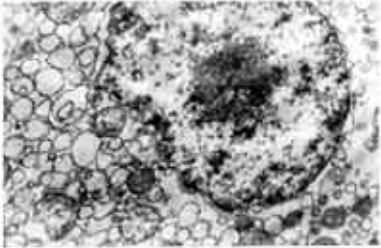


图 6 电镜下的冻存复苏后肝细胞,线粒体肿大,核膜尚完整,染色质浓缩

二、各组肝细胞复苏回收率及存活率

胰蛋白酶和 EDTA 混合液消化后制成肝细胞悬液,经血细胞计数板计数,锥虫蓝拒染色法检测其活率。各组肝细胞冻存复苏后的回收率及活率见表 1。

三、MTT 代谢活性检测

肝细胞冻存复苏后,于培养的不同时间段加入 MTT 溶液,继续孵育 4 h,在酶联免疫检测仪上测定

各组 MTT 吸收值见表 2。

表 1 各组肝细胞冻存复苏后平均回收率及活率

组 别	复苏回收率(%)	复苏活率(%)
A	32.75 ± 2.48	28.56 ± 1.82
B	54.35 ± 2.87	43.65 ± 3.28
C	69.88 ± 2.46	55.28 ± 3.24
D	80.75 ± 2.99	79.52 ± 3.68

注:组间两两比较,按 0.05 检验水准均有统计学意义(P < 0.05)

表 2 冻存复苏后肝细胞培养的不同时间段 MTT 平均吸收值

组别	MTT 平均吸收值/10 <sup>6</sup> 细胞			
	12 h	36 h	60 h	72 h
A	0.292 ± 0.035	0.258 ± 0.033	0.272 ± 0.028	0.209 ± 0.021
B	0.758 ± 0.035*	0.727 ± 0.032*	0.709 ± 0.025*	0.688 ± 0.027*
C	0.548 ± 0.040*	0.529 ± 0.035*	0.505 ± 0.026*	0.497 ± 0.023*
D	0.942 ± 0.031**○	0.935 ± 0.028**○	0.914 ± 0.021**○	0.905 ± 0.020**○

注:n = 5, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 与对照组比较;○ P < 0.05 与 B、C 组比较

四、蛋白质合成功能检测

人<sup>3</sup>H-亮氨酸培养 8 h 后,检测各组蛋白质合成量,结果见表 3。

肝细胞冻存复苏后,于培养的不同时间段掺

表 3 冻存复苏后肝细胞培养的不同时间段平均蛋白质合成量

组别	蛋白质合成量(dpm/mg)			
	12 h	36 h	60 h	72 h
A	16962 ± 1963	12874 ± 1882	8980 ± 238	5038 ± 349
B	23176 ± 1801**○	20701 ± 1697**○	16934 ± 1059**○	13098 ± 2077**○
C	20572 ± 1906*	16860 ± 2379*	12594 ± 2109*	9132 ± 1094*
D	25874 ± 1641**○	23849 ± 1258**○	20948 ± 1456**○	16950 ± 1437**○

注:n = 5, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 与对照组比较;○ P < 0.05 与 B、C 组比较,\*\* P < 0.05 与 C 组比较。

## 讨 论

用体外培养的肝细胞辅助肝功能支持的研究已开展了多年<sup>[5,6]</sup>,但这一技术进入临床应用仍有许多问题需要解决。其中之一就是如何长期保持肝细胞的活性及其功能。解决这一问题的关键是建立一种较为完善的肝细胞培养及冻存复苏体系。本实验中,我们从细胞生长的基本条件——营养和环境出发,研究了表皮生长因子及自制鼠尾胶原对冻存复苏前后原代培养肝细胞的影响。

普通的培养方法仅能给肝细胞提供二维生长的表面,这将限制肝细胞的功能分化和生长调节。我们采用了夹层胶原培养及冻存复苏体系,它改善了细胞基质的拓扑结构,使细胞的周围环境更接近于体内<sup>[7]</sup>。这一特点不仅能充分利用培养体系中的营养成分,更主要的是为细胞生长提供了三维的立体空间,从而有利于在双层基质之间的肝细胞发生形态和功能的重建。胶原是一种生物基质,对肝细胞有很强的黏附能力,维持细胞的活力状态时间亦较长,并能保持和诱导细胞分化<sup>[8]</sup>。胶原膜为半透明膜,不影响倒置显微镜观察细胞生长的情况。我们制备的胶原培养基为鼠尾胶原、1640 培养液、0.1 mol/L NaOH 的混合凝胶,其体积分数分别为 80%、10%、10%。胶原的浓度不能太低,一般应在 1 mg/ml 以上较好。这样形成的凝胶较厚,有利于细胞的接种。在胶原溶液从酸性调节到中性的过程中,为了防止胶原溶液变性和确保胶原的纯度和产出率,我们采用了 2 mmol/L NaOH 迅速调节胶原溶液 pH 值为 6 左右,接近等电点的位置。我们采用的夹层胶原“三明治”法冻存复苏肝细胞的回收率及活率均较对照组高,且双层胶原组高于表皮生长因子组,双层胶原 + 表皮生长因子组高于双层胶原组 ( $P < 0.05$ )。这说明我们采用的这种夹心式冻存法较传统的悬液冻存法效果好,更有利于细胞的复苏和培养。

一般认为,低温冻存细胞的效果,取决于冷冻保护液、降温升温的速度和方式、贮存温度和贮存时间的长短等<sup>[9]</sup>,而降温的速度和方式显得尤为重要。

我们采用了文献报道较多、较好的一种降温程序(-1 ℃/min 至 -8 ℃, -6 ℃/min 至 -15 ℃并维持 10 min, -1 ℃/min 至 -30 ℃, -3 ℃/min 至 -80 ℃)。从我们的实验结果来看,这一降温程序的确起到了良好的效果。

冻存复苏后的肝细胞要想满足移植的要求,就必须保持一定的活率和功能。在以往的研究中,对肝细胞复苏后功能状况的测定多是以细胞形态学变化和锥虫蓝拒染法为基础来评估肝细胞复苏后的活率和状态。这些方法客观性差、不稳定,只是对细胞膜完整性的检测,并不能客观反映肝细胞的代谢和合成功能。新近发展起来的测定细胞活性的 MTT 方法,灵敏、简便、客观,在淋巴细胞、肿瘤细胞的活性判断中有广泛的应用。我们对原 MTT 方法进行了改进,使其适合于测定代谢性偏低的肝细胞。线粒体是肝细胞内的一个重要细胞器,对低温极为敏感;因此 MTT 活性检测能较准确地反映冻存复苏后肝细胞的损伤程度;有的细胞虽有细胞膜的损害,但仍有酶的活性,仍属于“活细胞”。本研究结果为:双层胶原 + 表皮生长因子组培养 3 d 内均保持较高的 MTT 活性;双层胶原组、表皮生长因子组的 MTT 活性较双层胶原 + 表皮生长因子组组低,但仍保持一定水平;以上 3 组 MTT 活性值均较对照组高 ( $P < 0.05$ )。同时测定的蛋白质合成水平也有类同结果。这些数据都可以说明胶原和表皮生长因子对冻存肝细胞的保护作用。

当然即使采用合宜的冷冻贮存措施,复苏后的肝细胞也可呈现出 3 种不同的发展趋势<sup>[10]</sup>:部分细胞保持正常的形态与功能;部分组织细胞受到严重伤害而死亡;部分细胞虽受到损伤,但是通过恢复培养或者移植到宿主体内有些细胞可以恢复正常的结构和功能。认识复苏后肝细胞的转归,并对其进行适宜的培养,能一定程度地恢复肝细胞在冻存复苏过程中受到的损伤。最近国外有文献报道 TNF- $\alpha$ 、IL-6 能促进冻存复苏后肝细胞的生长繁殖,值得我们重视<sup>[11]</sup>。此外,随着人们对干细胞研究的深入,干细胞(包括肝干细胞及胚胎干细胞)移植后在体内定向转化为肝细胞引起了很多研究者的兴趣,这必将对细胞移植起着根本的推动作用<sup>[12,13]</sup>。

总之,本实验只是初步探讨了表皮生长因子和胶原蛋白对肝细胞短期培养及冻存复苏过程中的保护作用,并证实了双层胶原 + 表皮生长因子体外培养体系较常规培养体系的优越性。本实验虽然获得了一定数量的复苏后肝细胞,但仍存在细胞数目的减少,活率、功能下降等问题。相信随着各种实验条件的完善,必将会探索出一种较理想的肝细胞体外培养体系,为肝细胞移植的深入发展提供最基本的物质条件。



## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Mitty RR, Hughes RD, Dhawan A, et al. Progress in human hepatocytes: isolation, culture & cryopreservation. *Semin cell devel biol*, 2002, 13:463-467.
- [ 2 ] Bilir BM, Guinette D, Karrev F, et al. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl*, 2000, 6:32-40.
- [ 3 ] Horlen SP, McIowan TC, Goertzen TC, et al. Isolated hepatocyte transplantation in an infant with a severe ureacycle disorder. *Pediatrics*, 2003, 111:1262-1267.
- [ 4 ] Strom SC, Roy Chowdhury J, Fox IJ. Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease. *Semin liver dis*, 1999, 19:39-48.
- [ 5 ] Baccarani U, Sanna A, Cariani A, et al. Isolation of human hepatocytes from livers respected for liver transplantation on a national basis: results of a 2-year experience. *Liver Transpl*, 2003, 9: 506-512.
- [ 6 ] Di Camplic, Nestola M, Piscaglia AC, et al. Cell-based therapy for liver disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2003, 7:41-44.
- [ 7 ] Dabeva MD, Petkov PM, Sandhu J, et al. Proliferation and differentiation of fetal liver epithelial progenitor cells after transplantation into adult rat liver. *Am J Pathol*, 2000, 156: 2017-2031.
- [ 8 ] Taguchi K, Matsushita M, Takahashi M, et al. Development of a bioartificial liver with sandwiched-cultured hepatocytes between two collagen gel layers. *Artific Organs*, 1996, 20:178-185.
- [ 9 ] Innes GK, Fuller BJ, Hobbs KE. Functional testing of hepatocytes following their recovery from cryopreservation. *Cryobiology*, 1998, 25:23-30.
- [ 10 ] Guillozo A, Rialland L, Fautrel A, et al. Survival and function of isolated hepatocytes after cryopreservation. *Chem Biol Interact*, 1999, 121:117-123.
- [ 11 ] Debonera F, Krasinkas AM, Gelman AE, et al. Dexamethasone inhibits early regenerative response of rat liver after cold preservation and transplantation. *Hepatology*, 2003, 38:1563-1572.
- [ 12 ] Gerlach JC, Mutig K, Saner IM, et al. Use of primary human liver cells originating from discarded grafts in a bioreactor for liver support therapy and the prospects of culturing adult liver stem cells in bioreactors: a morphologic study. *Transplantation*, 2003, 76: 781-786.
- [ 13 ] Tabei I, Hashimoto H, Ishiwata I, et al. New approach for the establishment of an hepatocyte cell line derived from rat early embryonic stem cells. *Human Cell*, 2003, 16:39-46.

(收稿日期:2004-02-24)

## · 消息 Information ·

## 中国东部第三届介入放射学学术交流会在山东烟台召开

中国东部第三届介入放射学学术交流会议于 2005 年 6 月 10 日 ~ 14 日在山东烟台新闻中心举行,我国著名的介入放射学家李麟荪、张金山、罗鹏飞、程永德、欧阳墉、王执民、王建华等 40 名参加会议。山东省放射专业委员会主任委员武乐斌教授到会,并致开幕词,介入放射学杂志主编程永德教授对本次大会作了总结发言。会议开始前,烟台市田副市长会见部分专家代表,烟台市政府宋秘书长出席开幕式,并发表了热情洋溢的讲话,十余家厂商给予大会支持。中国东部省、市、自治区已成立介入学组的负责人参加了会议,会议取得了圆满成功。

本次会议涉及范围较广,既有神经介入放射学的内容,又有心脏大血管介入放射学方面的内容,还有肿瘤介入放射学及周围血管的内容。会议有三大特点:一是参会人数之多,涉及 24 个省市自治区,共有 260 余人参会,二是内容广泛,会议形式多种多样,既有大会专题讲座,又有大会的专题讨论,参会人员人人都可以提出问题,有专家进行解答或进行讨论,使广大参会人员受益匪浅。三是参会专家之多,达 40 余人,并且在时间紧、会议多的情况下,都能按时参会。有些专家一直在会场,并对每个与会人员提出的问题进行详细解答。因此,与会人员表示,参加这样的会议收获特大,今后还会继续参加。

经参会的各省、市、自治区介入学组负责人协商,中国东部第四届介入放射学学术会议由河北省承办。

(刘作勤 供稿)

# 夹层胶原“三明治”法冻存复苏肝细胞的实验研究

作者：[殷海涛](#)，[滕皋军](#)，[刘宝瑞](#)，[YIN Hai-tao](#)，[TENG Gao-jun](#)，[LIU Bao-rui](#)  
作者单位：[殷海涛, YIN Hai-tao\(南京鼓楼医院\)](#)，[滕皋军, TENG Gao-jun\(210009, 东南大学医学院附属中大医院介入放射研究所\)](#)，[刘宝瑞, LIU Bao-rui\(南京大学医学院附属南京市鼓楼医院肿瘤科\)](#)  
刊名：[介入放射学杂志](#) **ISTIC PKU**  
英文刊名：[JOURNAL OF INTERVENTIONAL RADIOLOGY](#)  
年，卷(期)：2005，14(4)  
被引用次数：1次

## 参考文献(13条)

1. [Mitry RR, Hughes RD, Dhawan A](#) [Progress in human hepatocytes: isolation, culture & cryopreservation](#) 2002
2. [Bilir BM, Guinette D, Karrev F](#) [Hepatocyte transplantation in acute liver failure](#) 2000
3. [Horlen SP, Mclowan TC, Goertzen TC](#) [Isolated hepocyte transplantation in an infant with a severe ureacycle disorder](#) 2003
4. [Strom SC, Roy Chowdhury J, Fox IJ](#) [Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease](#) 1999
5. [Baccarani U, Sanna A, Cariani A](#) [Isolation of human hepatocytes from livers respected for liver transplantation on a national basis: results of a 2-year experience](#) 2003
6. [Di Camplic, Nestola M, Piscaglia AC](#) [Cell-based therapy for liver disease](#) 2003
7. [Dabeva MD, Petkov PM, Sandhu J](#) [Proliferation and differentiation of fetal liver epithelial progenitor cells after transplantation into adult rat liver](#) 2000
8. [Taguchi K, Matsushita M, Takahashi M](#) [Development of a bioartificial liver with sandwiched-cultured hepatocytes between two collagen gel layers](#) 1996
9. [Innes GK, Fuller B J, Hobbs KE](#) [Functional testing of hepatocytes following their recovery from cryopreservation](#) 1998
10. [Guillouzo A, Rialland L, Fautrel A](#) [Survival and function of isolated hepatocytes after cryopreservation](#) 1999
11. [Debonera F, Krasinkas AM, Gelman AE](#) [Dexamethasone inhibits early regenerative response of rat liver after cold preservation and transplantation](#) 2003
12. [Gerlach JC, Mutig K, Saner IM](#) [Use of primary human liver cells originating from discarded grafts in a bioreator for liver support therapy and the prospects of culturing adult liver stem cells in bioreactors: a morphologic study](#) 2003
13. [Tabei I, Hashimoto H, Ishiwata I](#) [New approach for the establishment of an hepatocyte cell line derived from rat early embryonic stem cells](#) 2003

## 相似文献(10条)

1. 期刊论文 [王英杰](#), [刘鸿凌](#), [文红伟](#), [刘俊](#), [郭海涛](#) [胶原凝胶固定培养大鼠肝细胞的功能与形态观察 -肝脏](#) 2003, 8(1)

目的探索混合胶原凝胶培养肝细胞的方法, 观察培养鼠肝细胞的功能与形态特征. 方法两步法分离大鼠肝细胞, 与I型鼠尾胶原溶液混合接种于培养瓶, 待胶原液形成凝胶后, 加培养液常规培养, 观察培养鼠肝细胞的形态学特征和尿素合成及酶漏出量. 结果成功将大鼠肝细胞混合固定于胶原中, 形成凝胶状进行培养. 培养期间, 始终能检测出鼠肝细胞合成分泌的尿素, 而肝细胞乳酸脱氢酶漏出量较少, 倒置相差显微镜下观察到典型的形态特征. 结论混合胶原凝胶培养方法能为肝细胞提供更接近体内的培养环境, 可能适用于生物人工肝研究.

2. 学位论文 [戚红丹](#) [川芎嗪对大鼠肝纤维化胶原干预及肝细胞基因谱影响的研究](#) 2007

目的：本实验采用的源于生物发酵的川芎嗪提取物晶体由上海爱普香料有限公司提供，观察了川芎嗪对CCl<sub>4</sub>诱导的大鼠肝纤维化Ⅰ、Ⅲ型胶原的干预作用及肝细胞基因谱的影响，以探讨川芎嗪抗肝纤维化的作用机制。

- 方法：
1. 实验动物  
健康SD雄性大鼠72只，体重180-220g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司。
  2. 动物分组  
实验动物随机分为12组。  
对照组：腹腔注射精制橄榄油0.2ml/只，3次/周。  
模型组：参照并改进Hernandez-Munoz法建立肝纤维化动物模型，腹腔注射0.2mlCCl<sub>4</sub>（精制橄榄油1：6稀释）/只，3次/周。  
药物组：腹腔注射川芎嗪混合液0.2ml/只，3次/周。  
每组再分为2周、4周、6周、8周四个不同的时相。
  3. 试剂及仪器  
Van Gieson染色液，PBS缓冲液，胃蛋白酶消化液，兔抗大鼠Ⅰ型胶原单克隆抗体、兔抗大鼠Ⅲ型胶原单克隆抗体和抗胶原修复液，Power VisionTMTwo-Step Histostaining Reagent (PV-6001) 兔二抗试剂盒和DAB试剂盒，Ⅳ型胶原酶、TRIzol，杂交芯片，DMEM合成培养基和胎牛血清，DEPC处理的生理盐水，图像分析仪：美国Tractor Northern Co. 产品，TN-8502 Image Analysis System，酶标仪，UVP杂交炉，Agilent扫描仪，Agilent 2100 Bioanalyzer，分析软件：Genespring和Cluster，倒置相差显微镜，CO<sub>2</sub>培养箱，台式低温离心机，恒温水浴锅，蠕动泵。
  4. 实验步骤  
4.1 复制大鼠肝纤维化模型，制备各组肝组织切片；  
4.2 肝组织进行Van Gieson和H-E染色，显示胶原纤维的增生程度和肝组织病理改变程度；  
4.3 肝组织进行免疫组织化学方法检测Ⅰ、Ⅲ型胶原表达情况，利用图像分析仪分析结果；  
4.4 制备各组肝组织血清，检测ALT、AST，显示肝功的改变和肝细胞坏死程度；  
4.5 分离各组肝细胞，培养贴壁，提取RNA，制备基因芯片，对结果进行分析。
- 结果：

1. Van Gieson胶原纤维染色结果显示：模型组肝脏内主要由胶原纤维组成的纤维间隔正在或已经形成，并破坏界板结构，分割、包绕肝小叶，部分标本可见假小叶形成。川芎嗪组胶原纤维增生程度明显较模型组低，未见假小叶形成。
2. H-E染色不同时相肝组织病理改变镜下观察可见：正常组肝小叶结构完整，中央静脉周围呈放射状排列的肝细胞索，彼此连接成网状；肝细胞体积较大，呈多边形，界限清楚。模型组肝小叶边界不清，结构紊乱，肝细胞索排列紊乱，门管区纤维组织增生显著排列密集，中央静脉周围纤维组织增生并向肝细胞索间延伸，部分形成假小叶，肝细胞普遍水肿，空泡变性，部分肝细胞坏死，肝窦变窄，门管区及中央静脉可见炎细胞浸润。药物组肝小叶结构清晰，肝细胞轻度肿胀、变性，少见肝细胞坏死。
3. 本实验肝功能结果可见造模4周之前ALT呈增高趋势，4周后又趋于下降，AST在造模的整个过程中都呈升高趋势，表明肝脏损伤程度加重；4周、6周和8周时药物组的ALT和AST均比模型组低，表明川芎嗪可明显降低ALT和AST活性，从而保护肝细胞，减轻肝细胞损伤及肝纤维化发展。
4. 川芎嗪对肝纤维化Ⅰ、Ⅲ型胶原表达的影响  
本实验采用免疫组织化学和图像分析技术方法，从整体观察川芎嗪对CCl<sub>4</sub>损伤大鼠肝脏Ⅰ、Ⅲ型胶原表达的影响，结果表明，肝纤维化模型组大鼠肝内有大量Ⅰ、Ⅲ型胶原沉积，而川芎嗪治疗组肝内胶原沉积较模型组少。
5. 川芎嗪对肝纤维化肝细胞基因谱表达的影响  
本实验采用基因芯片技术，从离体角度观察肝纤维化肝细胞和药物干预后肝细胞差异表达的基因，这些基因包括原癌和抑癌基因、离子通道和运输蛋白基因、细胞周期相关基因、细胞骨架和运动蛋白基因、凋亡相关蛋白基因、DNA转录和修复相关基因、细胞信号转导蛋白基因及代谢和发育相关基因等，其中与胶原有关的主要是基质金属蛋白酶(MMP)、Ⅲ型胶原(Col Ⅲ)、瘦素受体(Leptin r)、金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP)和转化生长因子(TGF-β)mRNA，而川芎嗪可以下调肝细胞Leptin r、TIMP和TGF-β mRNA的表达，从而减轻肝纤维化时肝脏胶原基因的表达。

- 结论：
1. 川芎嗪可明显减轻大鼠肝纤维化发展过程中Ⅰ型和Ⅲ型胶原的表达，提示川芎嗪对CCl<sub>4</sub>诱导的大鼠肝纤维化胶原纤维增生有一定的防治作用。
  2. 川芎嗪对肝细胞胶原基因表达并无明显的直接干预作用，但对与胶原有关的Leptin r、TIMP和TGF-β的基因表达具有下调作用，提示通过下调与胶原有关的基因表达，以减少胶原的增生途径可能是川芎嗪发挥防治肝纤维化作用机制之一。

3. 期刊论文 [刘鸿凌](#) [王慧芬](#) [王英杰](#) [郭海涛](#) [于乐成](#) [王宇明](#) [冻存乳猪肝细胞的胶原凝胶培养研究](#) - [解放军医学杂志](#) 2004, 29(11)

目的探索乳猪肝细胞的冻存以及培养条件和方法.方法采用两步法分离乳猪肝细胞,液氮冻存4个月后备复,与鼠尾胶原液混合后接种培养,或将肝细胞接种于胶原被覆的培养瓶中,然后被覆上第2层胶原培养,观察培养细胞的形态、白蛋白mRNA的表达、尿素合成及天冬氨酸氨基转移酶(AST)的漏出量等.结果冻存肝细胞的活性维持较好,并成功地被固定于混合凝胶或三明治形凝胶中,较好地保持了尿素合成以及白蛋白mRNA表达能力.结论此冻存条件适合于猪肝细胞的长期保存,胶原凝胶可为肝细胞提供更接近体内的培养环境,较好地维持了肝细胞的功能和形态学特征.

4. 学位论文 [胡颖](#) [钙拮抗剂和生长因子在肝细胞胶原合成及前胶原基因表达中的作用](#) 1996

该文应用酶液灌流分离肝细胞(Hepatocyte, HC);方法简单、快速,产量高,活率高.原代培养的HC在正常培养条件下能够合成胶原,但合成胶原的能力较低.血小板衍生生长因子Platelet-derived growth factor, PDGF)能够明显促进HC胶原的合成和Ⅰ、Ⅲ型前胶原mRNAR的表达,这种作用可能与PDGF升高细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度有关.钙拮抗剂(Calcium antagonists, Ca-A)具有抑制PDGF增高HC前胶原基因表达的作用.

5. 期刊论文 [夏雪雁](#) [彭仁琇](#) [王君](#) [胶原夹心培养大鼠肝细胞及其细胞色素P450酶活性的测定](#) - [中国药理学通报](#) 2004, 20(3)

目的自制大鼠尾腱Ⅰ型胶原培养原代大鼠肝细胞,测定肝细胞中细胞色素P450(cytochrome P450, CYP)酶活性.方法制备无菌大鼠尾腱Ⅰ型胶原,比较单层胶原铺底法(collagen coated, CC)及胶原夹心法(collagen sandwich system, CSS)培养大鼠肝细胞的生长及功能维持情况.CSS法培养肝细胞,分别加入泼尼松龙(100 μmol·L<sup>-1</sup>, 3 d)、尼莫地平(50 μmol·L<sup>-1</sup>, 2 d)和利福平(50 μmol·L<sup>-1</sup>, 2 d),测定CYP1A、CYP2E1及CYP3A酶活性.结果 CSS法培养6 d后,肝细胞生长良好.CC法培养3 d后细胞开始脱落,此后持续增多;6 d后,培养上清液中ALT、AST与LDH活性升高,均高于同期CSS法培养细胞上清液中的水平.加入经CYP3A代谢药物,CSS培养肝细胞CYP1A活性无明显改变;尼莫地平使CYP3A活性升高33%,而CYP2E1活性下降45%(P<0.05);利福平使CYP3A活性升高为对照组的1.94倍(P<0.05),对CYP2E1活性无作用.结论同为CYP3A底物,泼尼松龙、尼莫地平 and 利福平对CYP亚型的影响不同,但不改变肝细胞CYP1A对致癌物的活化.CSS培养法可作为体外模型用于药物代谢研究.

6. 学位论文 [张斌](#) [抗纤复方影响大鼠肝贮脂细胞、肝细胞胶原表达和贮脂细胞自分泌TGFβ<sub>1</sub>的实验研究](#) 1998

该文从在体实验和体外实验两个方面观察了抗纤复方对大鼠肝贮脂细胞、肝细胞生成胶原和贮脂细胞自分泌转化生长因子β<sub>1</sub>(TGFβ<sub>1</sub>)<sub>1</sub>的影响,探讨抗纤复方的抗肝纤维化的机理.体外实验采用血清药理学方法制备抗纤复方血清,以秋水仙碱药物血清和抗纤复方药液为对照.

7. 期刊论文 [胡颖](#) [陆汉明](#) [李定国](#) [程枫](#) [细胞生长因子和维拉帕米在肝细胞胶原合成和前胶原基因表达中的作用](#) - [临床与实验病理学杂志](#) 1999, 15(2)

目的:探索肝细胞在肝纤维化形成中的可能作用.方法:用核酸原位分子杂交方法和<sup>3</sup>H-脯氨酸掺入法,观察原代培养大鼠肝细胞在血小板衍生生长因子(PDGF)刺激前后胶原合成和I、III型前胶原mRNA的表达及钙拮抗剂维拉帕米对此作用的影响.结果:肝细胞培养一定时间后能够合成胶原,能够表达I、III型前胶原基因.PDGF能促进肝细胞的胶原合成和前胶原基因表达,但此刺激作用为维拉帕米所抑制.结论:这些研究为肝细胞参与肝纤维化形成提供了实验依据.

8. 期刊论文 [赵云山, 徐迎新, 张博峰, 吴欣, 刘巨超, 张兰, 唐利安, 黄志强, ZHAO Yun-shan, XU Ying-xin, ZHANG Bo-feng, WU Xin, LIU Ju-chao, ZHANG Lan, TANG Li-an, HANG Zhi-qiang](#) [以胶原凝胶为支架构建可植入工程化肝组织的实验研究](#) -中华医学杂志2007, 87 (29)

目的 探讨肝细胞与液态I型胶原复合构建可植入的工程化肝组织的可行性.方法 SD大鼠肝细胞与液态I型胶原及DMEM复合,形成肝细胞/胶原凝胶复合物.该复合物被接种在培养板中培养,采用相差显微镜和HE染色方法对培养肝细胞形态特征进行观察,并采用MTT法和免疫组化染色方法分别对肝细胞的活性和功能进行检测.肝细胞/胶原复合物同时被植入皮下腔中观察肝细胞的分化及工程化肝组织的形成情况,采用HE染色和免疫组织化学染色方法对植入的工程化肝组织进行评价.结果 肝细胞与液态I型胶原复合后形成凝胶状复合物,可见肝细胞均匀分布在整个复合物中,呈三维立体生长.在整个体外培养过程中,肝细胞始终保持圆形的形态;肝细胞在培养初期活性稍有下降,直至第7天时仍然保持活性的87%,之后随培养时间延长而活性逐渐降低.经过2周培养,肝细胞仍具有白蛋白的合成功能.皮下植入后1周,肝细胞/胶原复合物形成工程化灶性肝组织,免疫组化染色证实这种工程化的肝组织具有白蛋白的合成功能.结论 采用胶原凝胶作为肝细胞生长和分化的支架可在体内构建类肝样的工程化肝组织.这种可植入的工程化肝组织提供了一种基于肝细胞治疗的新途径,并有望用于损伤肝组织修复和重建.

9. 学位论文 [季光](#) [扶正化瘀方对纤维肝肝细胞生成胶原及白蛋白的影响](#) 1997

10. 期刊论文 [殷海涛, 滕皋军, 刘宝瑞, Yin Haitao, TENG Gaojun, LIU Baorui](#) [夹层胶原“三明治”法短期体外培养肝细胞](#) -江苏医药2005, 31 (1)

目的研究胶原、表皮生长因子对新鲜分离SD大鼠肝细胞活率、形态和功能的影响.方法采用胶原酶二步原位循环肝脏灌注法分离SD大鼠肝细胞,测定不同条件培养后各组肝细胞的活性及功能.结果双层胶原+表皮生长因子组培养后细胞活性、细胞DNA含量及细胞功能均优于普通培养组(P<0.05).结论双层胶原体外培养体系提供了稳定的三维立体生长环境,有利于细胞在体外长期保存.

## 引证文献(1条)

1. 陈钟, 蔡鸿宇, 汤飞, 宣伟军 [聚乳酸-0-羧甲基壳聚糖纳米粒子对大鼠腹腔内猪肝细胞异种移植免疫排斥反应的影响](#) [期刊论文] - [中国组织工程研究与临床康复](#) 2008 (32)

本文链接: [http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_jrfjsxzz200504022.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_jrfjsxzz200504022.aspx)

授权使用: qkxb11(qkxb11), 授权号: c3418b3b-ff76-4240-8e6a-9e2f0101c59b

下载时间: 2010年11月15日