

# 肝细胞系固定化反应器的构建及体外功能测定

石强 俞耀庭

(南开大学分子生物学研究所 天津 300071)

克林克曼

(International Faculty for Artificial Organs, Glasgow, G4/ONW, UK)

**摘要** 采用肝癌细胞系与聚砜中空纤维建立了固定化细胞反应器,观察并测定了反应器的运行及体外功能。实验结果表明 SMMC-7721 肝细胞系不仅可在聚砜纤维表面生长繁殖,而且保留其在体外静态培养时的生物学特性如尿素合成及极低的苯巴比妥生物转化。由于细胞功能与中空纤维材质性能有关,因此,用这一个反应器可以筛选和评价聚砜及其它中空纤维,为人工肝装置选材打下基础。

**关键词** 人工肝,反应器,中空纤维

肝脏是人体内保持再生潜能最旺盛的重要脏器。当肝脏大面积损伤后,它仍能在一定时间内恢复其原体积和生理功能。这为人工肝的研究与应用提供了生理学及病理学基础<sup>[1,2]</sup>。

生物活性人工肝中最重要的成分是细胞反应器。它是将肝细胞种植在具有支持肝细胞体外生长的中空纤维毛细管网络上。生物活性人工肝在体外的功能效率取决于种植肝细胞的生理活性与数量;以及支持肝细胞的生长环境如反应器的构型,高分子材料的生物相容性,培养基组成及操作方式,供氧等。用聚砜和肝癌细胞,我们试图构建肝细胞反应器,来研究材料对细胞生长动力学和生理功能的影响。肝癌细胞易得,且具有某些肝细胞功能故用它来研究与各种材料的反应。

## 1 材料及方法

### 1.1 细胞系及组织培养

SMMC-7721 是由第二军医大学自一名男性肝癌患者病理标本中建立的肝癌细胞系。该细胞系培养在 20% FCS William's E (Gibco) 培养基中,并添加 10mmol/L HEPES, 0.1% 谷氨酰胺, 100u/ml 青霉素, 100 $\mu$ g/ml 链霉素, 80u/ml 庆大霉素, 静置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中。培养瓶表面积为 225cm<sup>2</sup>, 体积为 1L (IVSP)。

### 2.2 中空纤维

聚砜中空纤维透析器由日本 JMS 公司赠送, 表面积为 2m<sup>2</sup>, 型号 SPS4005-4, 德国 FRESenius 生产, MWCO 为 3~5 千道尔顿, 内径 200 $\mu$ m。

本工作是“博士点基金”和“生物活性材料开放实验室”资助项目。

本文于 1995 年 9 月 19 日收到。

### 2.3 中空纤维反应器的构建

所有培养器皿及透析器均经辐射消毒,剂量为 250 万拉德。当细胞布满培养瓶后用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液收集细胞,离心清洗后重新悬浮于 20% FCS William's E 培养基中。将约 100ml 细胞密度为  $1\sim 2 \times 10^8$ /ml 悬浮液种植于透析器中空纤维外腔,不断震摇以使细胞均匀地分布至纤维外腔中。约 40min 后,用无血清 William's E 培养基经中空纤维内腔闭路循环,流速为 5.0ml/min。反应器置于 37℃ 水浴中,培养物采用流动加入方式,加入体积取决于出口葡萄糖浓度含量,使其维持在 1.2mg/ml 以上。供氧方式为向培养基间歇式充气泡,流速为 50ml/min,并不断搅拌。pH 由培养基中酚红指示剂指示,间隔式充 CO<sub>2</sub>,使其维持在 pH7.0~7.2 之间。试验标本采用灌流液入口与出口,所有标本在测试前置于 -20℃ 保存。图 1 示出细胞反应器的模型图。

### 2.4 反应器中细胞活性的评估

**细胞完整性:**0.6% 苔酚兰拒染试验:取一定体积细胞悬液与等体积 0.6% 苔酚兰混匀,静置 2min 后,在显微镜下计数着色与总细胞数之比。细胞生长与增殖;细胞贴壁率:细胞接种 24h 后贴壁细胞与接种细胞的百分率。

$$\frac{\text{贴壁细胞数}}{\text{接种细胞数}} \times 100\%$$

**细胞增殖率代表符号:**24 × 7h 后细胞总数与接种总数百分率。

$$\frac{24 \times 7\text{h 后细胞总数}}{\text{接种细胞总数}} \times 100\%$$

### 2.5 肝癌细胞功能的测定

**NH<sub>4</sub>Cl 负载试验:**200ml 5mmol/L NH<sub>4</sub>Cl 培养基以 0.5ml/min 开路灌流反应,收集出口灌流液,测定尿素浓度(分光光度法,Beckman CX5 自动生化分析仪。)

**P450 单胺氧化酶药物转化试验:**15μg/ml 苯巴比妥溶于培养基中,以 0.5ml/min 流速灌流,收集出口灌流液,用高效液相色谱法测定苯巴比妥浓度。

## 3 结果

### 3.1 SMMC-7721 肝癌细胞特征及肝细胞相关功能

SMMC-7721 是来源于恶性组织中的细胞系,但它保留了部分与肝细胞特异生理功能相

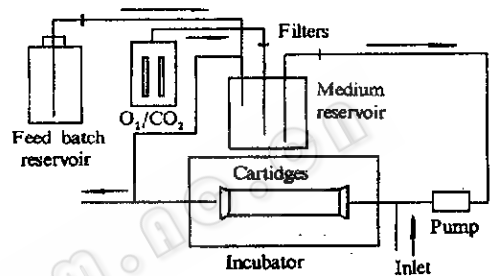


图 1 细胞反应器的模型图

Fig. 1 Model of cell bioreactor

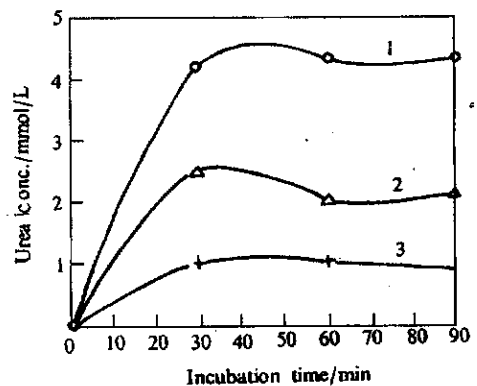


图 2 在 3 个不同浓度的 NH<sub>4</sub>Cl 条件下尿素的合成

Fig. 2 Urea synthesis by 3 different concentrations of NH<sub>4</sub>Cl

Conc. of NH<sub>4</sub>Cl, /mmol/L: 1.1, 2.5, 3.10

关的活性。表 1 列出了体外静态培养过程中该细胞系的生物学特性。

表 1 SMMC-7721 体外静态培养时生物学特征

Table 1 SMMC-7721 biological characteristics of cell culture in vitro

Enzymes	Gluconeogenic	Not detectable
	Microsomal P450	Not detectable
	Urea cycle	existed
	Transamination	GOP, GPT existedd
	Secretory	Proteins
Secretory	Albumin	Extremely low by RIA
	Transferrin	Extremely low by RIA
	A - fetoprotein	Not detectable by EIA
	HBsAg	Negative by EIA
Others	Insulin response existed but irregularly	
	Aromatic amino acids clearance existed	

The characteristics of SMMC-7721 in static culture. Gluconeogenesis was tested with 2mmol/L lactic acid and 2mmol/L alanine and the synthesis of glucose was detected. Microsomal P450 transformation used the substrate of 15 $\mu$ g/ml diazepam.

SMMC-7721 细胞系的一个重要特征是它在体外可将  $\text{NH}_4^+$  转化为尿素,而且这一合成反应有明显的剂量反应曲线(见图 2)。在建立反应器过程中,我们将尿素合成这一参数作为评估细胞在反应器内生长动力学改变的指标。

### 3.2 反应器灌流过程反应器中细胞生长与活性

**3.2.1 SMMC-7721 细胞系贴壁与增殖:**由于 SMMC-7721 细胞系是贴壁依赖性细胞,其生长繁殖依赖反应器中空纤维系统。当一定数量肝细胞种植在中空纤维后,75% 细胞可贴附到聚砜纤维表面,24 $\times$ 7h 后,细胞总数增殖了 20%。见表 2。

表 2 SMMC-7721 细胞在反应器中的贴壁及增殖( $\times 10^8$ )

Table 2 The features of attachment and proliferation of SMMC-7721 in different membranes bioreactors( $\times 10^8$ ).

No. Seeded	Attached	Harvested	A/ %	P/ %
9.3	7.0	11.0	75	120

Attachment ration = (no. seeded-no. detached)/no. seeded %

**3.2.2 反应器中细胞代谢:**图 3 示出 SMMC-7721 细胞在反应器中葡萄糖分解代谢与尿素合成代谢情况,表明细胞在反应器中保持良好的新陈代谢能力。

**3.2.3 细胞完整性:**完整的细胞具有排斥染料特性。当细胞受到损伤后,细胞通透性增大,细胞外物质如染料可进入细胞内着色;细胞内酶分子亦可溢出胞外。表 3 示出在 24 $\times$ 7h 灌流后,反应中贴壁细胞有 10% 细胞着色,但收获的细胞中有 50% 着色。灌流液内酶活性较低,而种植细胞中空纤维外腔细胞内酶溢出较高。

### 3.3 灌流过程中细胞尿素合成

生长良好的 SMMC-7721 细胞可利用培养基中高浓度氨并通过鸟氨酸循环合成尿素。图 4 示出在灌流 36h, 60h 和 84h 后氨负载试验结果,它表明反应器中肝癌细胞仍具有完好的尿

素合成功能,并且随灌流时间增加反应器中细胞数不断增加。

表 3 SMMC-7721 细胞在反应器中的完整性

Table 3 Interyty of cells in bioreactor

	0.6% 萘酚兰阳性	LDH/IV.L <sup>-1</sup>	GP+GOT/IV.L <sup>-1</sup>
贴壁细胞	10%		
收获细胞	50%		
管腔内液		11	5
管腔外液		113	24

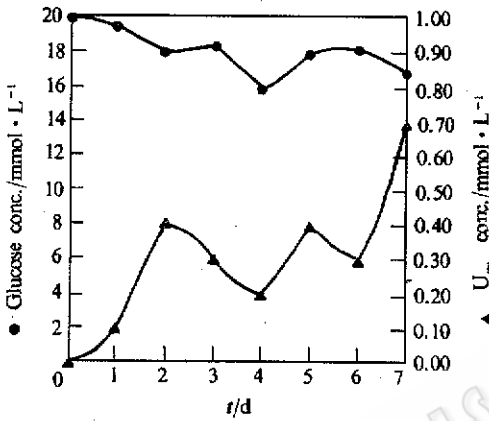


图 3 反应器中葡萄糖分解及尿素合成

Fig 3 Glucose decomposition and urea synthesis

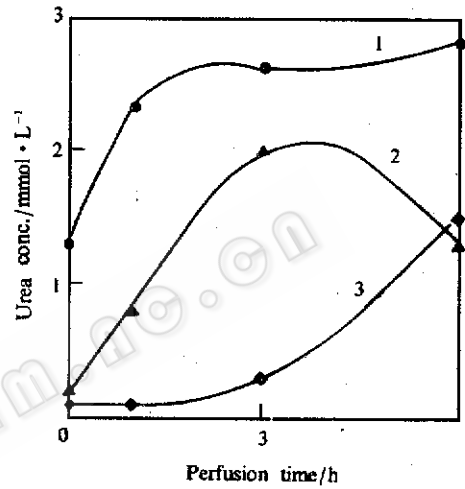


图 4 灌流过程中细胞的尿素合成

Fig 4 Urea synthesis in hemoperfusion perfusion

Time/h: 1.36, 2.60, 3.84

## 4 讨论

从目前所报道的人工肝反应器构型中,以中空纤维作为反应器的基础最为常见。中空纤维反应器的优点在于(A)具有较高面积-体积比;(B)高跨膜物质转移化;(C)临床实用性强。这些特点使肝细胞可在体外高密度地增殖,据报道反应器中细胞重量可达 200g,接近机体所需要肝脏维持生命所需的最低重量。使生物活性人工肝替代成为现实。反应器中的中空纤维与一般的透析装置不同,小分子物质不但通过中空纤维膜进行扩散,而且进行生物转化或代谢<sup>[3]</sup>。

为了开展生物活性人工肝的研究工作,我们首先选择了易在体外增殖并有部分肝细胞功能的肝癌细胞系,使研究工作可获得稳定细胞来源并易进行重复比较。正如表 1 所示,SMMC-7721 细胞系具有转化氨成为尿素的能力等肝细胞相关活性,因而使用该细胞作为研究构建生物活性人工肝反应器的基础工作是可以接受的。事实上,不少具有肝细胞功能的细胞系已用于构建杂化的生物活性人工肝,Wolf 和 Munkelf 将大鼠 Reuber 肝癌细胞种植在中空纤维外腔,可使葡萄糖醛酸化<sup>[4]</sup>,Sussman 及 Gislason 等人用人肝癌细胞 C3A 制作的人工肝反应器在临床应用曾抢救了 11 名病人<sup>[5,6]</sup>。Stange 采用 mHepR1 细胞系构建的人工肝

反应器具有药物解毒功能(P450 活性)<sup>[7]</sup>。

反应器中空纤维的材料对细胞的贴壁和生长有着重要的影响<sup>[8]</sup>。细胞在反应器中良好生长的前提是细胞表面的电性与纤维膜材料表面的电性相近。所谓材料的生物相容性,从微观上讲实际是指人工材料要具备与机体细胞相似的亲水区与疏水区结构。聚砜是一种广泛用于构建生物反应器的材料,它在体外试验中具有良好的生物相容性。当细胞接种至聚砜纤维表面时,表面带有负电荷的肝细胞借助  $\text{Ca}^{2+}$  离子及血清粘连蛋白、纤维蛋白等桥梁因子与带有负电荷的聚砜纤维桥联,贴壁后细胞伸展并开始分裂,否则细胞逐渐退化死亡。在我们的实验中,24h 后细胞贴壁率达到 75%,灌流一周后,细胞增殖率为 120%,但在收获和细胞中有较大比例的细胞呈苔酚兰阳性反应。这表明砜虽然是一种较好的细胞支持介质,但长期支持细胞的生长仍需进一步生物化处理。

### 参 考 文 献

- [1]Dixit V. *Artif Organs*, 1994, **18**:371~384.  
 [2]Kasai S, Sawa M, Mito M. A Historic Review of Biological Artificial Liver Support Systems.  
 [3]Nyberg S L, Shatbord R A, Peshwa M V *et al.* *Biotech Bioeng* 1993, **41**: 194~302.  
 [4]Wolf C F W. In: *Artificial Liver Support*, edited by G. Brunner and F. W. Schmidt, Springer-Verlag Press, 1981, pp.247~253.  
 [5]Sussman N L, Chong M G, Koussayer T *et al.* *Hepatology*, 1992 **16**:60~65.  
 [6]Gislason G T. *Artif Organs*, 1994, **18**:385~389.  
 [7]Stange J, Mitgner S, Strauss M *et al.* *The Int J of Artif Organs*, 1993, **16**:419.  
 [8]Shi Q, Yu Y T. Growth and Functions of Immobilized Human Hepatoma Cell Line SMMC-7721 on Different Membranes. 1995 unpublished

## The Construction and Function of Polysulphon Hollow Fiber Bioreactor with the Immobilization of Hepatoma Cell Line

Shi Qiang Yu Yaoting

(*Institute for Molecular Biology, Nankai University, Tianjin 300071*)

Horst Klinkmann

(*International Faculty for Artificial Organs, Glasgow, G4/ONW U.K*)

**Abstract** The development of hepatocyte bioreactor is a promising approach to the treatment of acute liver failure. In this paper reported the construction of polysulphon hollow fiber reactor with the inoculation of hepatoma cell line SMMC-7721 onto the extracapillary space of the fibers. Feb-batch perfusion system was employed in the established system to permit the optimal nutrient supply to maintain the growth and proliferation of cells in the bioreactor. Our results showed that hepatoma cells not only grew on the surface of polysulphon membranes at a high density, but maintained the characteristics of the cell line in stationary culture, such as ureogenesis and insufficiency of phenobarbital biotransformation. This culture model provides a prototype of bioartificial liver support system which enables further investigations to its widely application.

**Key words** Artificial liver, reactor, hollow fiber