

贝数。较短的展示肽分子淘洗时易获得较强结合力的众多位点,其表位较小而构象受限,难以满足构象依赖表位的研究需要,也较难筛选出较长的弱结合位点。虽然较长的展示肽库构建困难(所需的库容与肽长度呈指数递增),但它增加氨基酸排列组合的随机性,也有利于其形成空间构象,从而筛选出多个较长和较弱的结合位点,并确定蛋白分子中的占优势地位的构象依赖表位。因此,最初多用的5~7肽库现有被长肽库取代的趋势。本实验采用NEB公司的随机12肽库对DEN2抗原表位进行研究,其库容为 1.5×10^{13} PFU/mL,库内含有 2.7×10^9 的随机排列肽分子,能确保筛选出与靶分子结合的各种特异肽,为DEN的构象依赖表位或较长的弱结合位点的筛选提供了可能。

目前国外应用噬菌体展示肽库对DEN E蛋白分子抗原表位的研究刚起步,而国内尚未见相关的报道,本试验用RPL成功筛选出E蛋白的一线性B细胞表位,为E蛋白功能表位的深入研究提供了基础条件。

参考文献:

- [1] Halstead S B. Dengue virus and mononuclear phagocytes infected enhancement by non-neutralizing antibody [J]. *J Exp Med*, 1997, 146(1): 210.
- [2] 闻玉梅. 现代医学微生物学[M]. 上海:上海医科大学出版社, 1999. 1180~1221.
- [3] Megret F, Hurgnot P, Deubel V, *et al.* Use of recombinant fusion

proteins and monoclonal antibodies to define linear and discontinuous antigenic sites on dengue virus envelope glycoprotein [J]. *Virology*, 1992, 187(2): 480.

- [4] Lin B, Parrish C R, Murray J M, *et al.* Localization of a neutralizing epitope on the envelope protein of dengue virus type 2 [J]. *Virology*, 1994, 202(4): 885.
- [5] Smith G P, Scott J K. Libraries of peptides and protein display on filamentous phage [J]. *Methods Enzymol*, 1993, 217(2): 228.
- [6] Wang L F, Plessis D H, White J R, *et al.* Use of a gene-targeted phage display random epitope library to map an antigenic determinant on the bluetongue virus outer capsid protein VP5 [J]. *J Immunol Methods*, 1995, 178(1): 1.
- [7] Pereboeva L A, Pereboev A V, Wang L F, *et al.* Hepatitis C epitopes from phagedisplayed cDNA diagnosis with a chimeric antigen [J]. *J Med Virology*, 2000, 60(2): 144.
- [8] Wu H C, Huang Y L, Chao T T, *et al.* Identification of B-cell epitope of dengue virus type 1 and its application in diagnosis of patients [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(3): 977.
- [9] Thullier P, Demangel C, Bedouelle H. Mapping of a dengue virus neutralizing epitope critical for the infectivity of all serotypes: insight into the neutralization mechanism [J]. *J Gen Virol*, 2001, 82(5): 1885.
- [10] Adey N B, Mataragnon A H, Rider J E. Characterization of phage that bind plastic from phage-displayed random peptide libraries [J]. *Gene*, 1995, 156(1): 27.

(编辑 张敏瑞)

高效分离屠宰成年猪肝细胞用于生物人工肝方法的建立

巴明臣¹, 周晓东², 陈积圣¹, 刘丽²

(1. 中山大学附属第二医院普外科, 2. 林佰欣医学研究中心, 广东广州 510120)

摘要:【目的】探讨氧合 dispase 及胶原酶组酶消化法从屠宰成年猪肝脏高效分离肝细胞的方法及分离肝细胞的生物活性。【方法】部分肝叶逆行灌注、氧合组酶 dispase 及胶原酶消化、密度梯度离心法分离、纯化肝细胞, 并对其生物活性进行检测。【结果】肝组织细胞的收获量达 10×10^6 个/g, 细胞平均存活率可达 92.5%, 且无泡状变性的发生, 原代培养生物活性与原代培养鼠肝细胞一致, 随着时间的延长而减退。【结论】氧合组酶 dispase 及胶原酶消化、密度梯度离心法自屠宰成年猪分离肝细胞产量高、且保持着良好的生物活性, 可作为生物人工肝的理想肝细胞源用于肝脏终末性疾患的治疗。

关键词: 肝细胞学; 细胞分离; 细胞培养; 肝; 人工

中图分类号: R657.4 文献标识码: A 文献编号: 1000-257X(2002)5S-0013-02

国内外学者已对肝细胞移植及肝细胞生物人工肝体外支持系统治疗肝脏终末性疾进行了系统研究, 积累了丰富的临床经验。生物人工肝体外支持系统制作技术的发展使对高分化具有代谢机能的原代肝细胞供应的要求不断增加, 屠宰猪肝已成为满足这一要求极具潜力的来源^[1,2]。本课题拟对从屠宰成年猪肝脏有效获取大量高活性肝细胞的方法进行简要探讨。

1 材料与方 法

刚屠宰的成年猪肝脏 15 个, 切取质量相等、肝静脉易于插管的左外或右后叶随机分成 5 组, 将硅胶管直接插入肝静脉并固定, 37℃恒温下恒流泵逆行持续灌注, 灌注液回收循环利用。1~4 组为实验对照组, 1 组肝脏仅用 50 g/L 的胶原酶灌注; 2~4 组分别使用 10^4 pU/L, 5×10^5 pU/L 或 10^6 pU/L dispase 消化液及 50 g/L 的胶原酶组酶消化, 各消化灌流液体均不做氧合处理; 5 组为实验组, 使用氧合的 5×10^5

收稿日期: 2002-07-01

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(001358); 广东省重大科技攻关基金资助项目(2KM 05402S)

作者简介: 巴明臣(1969-), 男, 河南郸城人, 博士, 主治医师

pU/L dispase 消化液及 50 g/L 的胶原酶组酶消化灌注。实验组所有缓冲灌注及分离液均行氧合处理。采用 Gerlach 等^[2]报道的方法分离肝细胞、Marsh 等^[3]报道的方法检测肝细胞尿素合成及氨代谢功能、蛋白质印迹(Western blot)测定培养肝细胞白蛋白表达^[4]。

2 结果

屠宰成年猪肝脏不同灌注分离方法肝细胞获取量、成活率及培养贴壁见表 1。实验组分离的肝细胞在胶原 I 被覆的平板表面培养易于贴壁,且无空泡状细胞出现。病原学检测分离的肝细胞无微生物生长。光学显微镜形态学观察显示所分离的肝细胞纯度大于 90%,有 1 个或 2 个细胞核及较低的核浆比率,体外培养发现在无诱导剂的情况下其活性随培养的进行而减弱。使用诱导剂时其活性明显增加,培养第 3 d 仍保持高代谢状态,且持续 7 d 以上。其尿素合成率在培养的第 1 天呈高峰,随后减弱。培养猪肝细胞白蛋白表达见图 1。

表 1 屠宰成年猪肝脏不同灌注分离方法肝细胞获取量、成活率及培养贴壁率比较

组别	细胞获取量/ g^{-1}	成活率(%)	培养贴壁率(%)
1	0.3×10^6	28	10
2	0.4×10^6	42	15
3	0.5×10^6	62	35
4	5×10^6	48	20
5	10×10^6	92.5	80

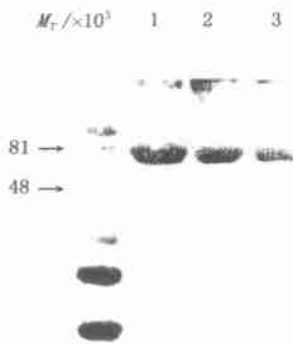


图 1 Western blot 检测原代培养猪肝细胞白蛋白表达

M: Marker; 1: Porcine albumin; 2: Day 1; 3: Day 3; 4: Day 5; 5: Day 7

3 讨论

获取足够数量的具有高生物活性的肝细胞是生物人工

肝获得理想疗效的关键。屠宰成年猪肝脏作为生物人工肝肝细胞源可节约成本、劳力、时间,避免屠杀更多的动物生命。成年猪肝脏内存在着较多的难于消化和过滤的纤维组织,消化时间过长,细胞存活率较低,消化时间过短,肝细胞的获取量较少。由于采用灌注方法的不同,猪肝细胞获取率存在着较大差异,普通灌注分离屠宰成年猪肝细胞获取量较少,细胞存活率较低,不适合作为生物人工肝肝细胞源。文献报道普通灌注法屠宰成年猪肝组织肝细胞获取率均低于 5×10^6 个/g,存活率低于 80%,且空泡状细胞较多^[1,2]。本研究采用部分肝叶逆行灌注、氧合组酶 dispase 及胶原酶消化及密度梯度离心法分离、纯化肝细胞自屠宰成年猪肝脏分离肝细胞,肝细胞获取量达 10×10^6 个/g,平均存活率达 92.5%,这一结果与 Koebe 等^[1]采用 4~8 周、质量 15~35 kg 的小猪肝脏活体灌注分离肝细胞结果相接近。本研究对灌注、分离液进行氧合处理,可降低肝细胞缺氧时间,减少或阻止泡状细胞的出现,提高其成活率;采用优化的组酶 5×10^5 pU/L dispase 消化液及 50 g/L 胶原酶组酶消化、优化的离心条件($60 \times g$, 1~2 min)离心,获得了较为理想的实验结果。分离的肝细胞在胶原 I 被覆的平板表面培养易于贴壁,其细胞色素 P450 活性、尿素合成、氨代谢、白蛋白的表达等生物活与原代培养鼠肝细胞的分化机能一致。有文献报道猪肝脏组织中存在人体致病的原病毒^[3],本实验分离的肝细胞病原学检测无致病微生物生长。

总之,氧合 dispase 及胶原酶组酶消化、密浓度梯度离心法自屠宰成年猪分离肝细胞产量高,且保持着良好的活性与分化机能,可作为生物人工肝的理想肝细胞源用于肝脏终末性疾患的治疗。

参考文献:

- [1] Tokiwa T, Kano J, Meng X Y, *et al*. Primary culture of rat hepatocytes on porous expanded polytetrafluoroethylene [J]. *Transplant Proc*, 1997, 29(4): 2120.
- [2] Gerlach J, Kloppel K, Schon M R. Comparison of pig hepatocyte isolation using intraoperative perfusion without warm ischemia and isolation of cells from slaughterhouse organs after warm ischemia [J]. *Artif Organs*, 1993, 17(11): 950.
- [3] Koebe H G, Schildberg F W. Isolation of pig hepatocytes from slaughterhouse organs [J]. *Int J Artif Organs*, 1996, 19(1): 53.
- [4] March W H, Fingerhut B, Miller H. Automated and manual direct methods for the determination of blood urea [J]. *Clin Chem*, 1985, 11(5): 624.
- [5] Hayner N T, Driscoll J, Ferayorni L, *et al*. A sensitive method for protein determination in freshly isolated and cultured cells [J]. *J Tissue Culture Methods*, 1982, 7(1): 77.

(编辑 张敏瑞)