

• 研究报告 •

# 肝衰竭患者体外灌流血浆对 C3A 细胞生物转化功能影响的研究

张桓虎 高虹 陈煜 郑素军 段钟平

【关键词】 血液灌流； C3A 细胞； 肝衰竭； 生物转化

C3A 细胞是培养于体外人工肝支持装置(ELAD)系统的细胞株,来源于人肝肿瘤细胞,是克隆化的建株细胞株,其最大特点是来源稳定,能在短时间内大量培养增殖,因此可以满足生物型人工肝装置对肝细胞数量上的需求;此外,该细胞在培养中不需要培养载体,并具有一些肝细胞的特异功能。外源化学物的生物转化作用在肝脏的诸多功能中尤为重要,并意义重大。人工肝的治疗多用于肝衰竭患者,而流经生物反应器的肝衰竭患者的血浆对 C3A 细胞功能影响的研究尚少。本研究中对体外灌流处理后肝衰竭患者的血浆对 C3A 细胞生物转化功能的影响进行了观察,报告如下。

## 1 材料与方法

1.1 主要材料:珠海健帆 HA330-I 型树脂血液灌流器;特优级胎牛血清购自美国 Hyclone 公司;MEM 培养基、胰蛋白酶均为美国 Gibco 公司产品;地西洋(安定)代谢试剂盒(美国康奈尔大学 TCC 公司)。C3A 细胞来源于首都医科大学附属北京佑安医院人工肝细胞生物研究中心。

## 1.2 实验方法

1.2.1 血浆来源及分组:肝衰竭患者的血浆来自首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心 2005 年 5 月至 2006 年 6 月进行人工肝治疗的 16 例患者,丢弃分离初始 100 ml 血浆,取随后 200 ml 血浆过滤除菌。实验分为体外灌流处理的肝衰竭患者血浆(HPP)组和肝衰竭患

表 1 两组肝衰竭患者血浆内毒素、C3A 细胞活性及地西洋代谢量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	内毒素(EU/ml)	C3A 细胞活性(A 值)	地西洋代谢量( $\mu\text{g}$ )
HPP 组	16	0.12 ± 0.04*	0.95 ± 0.12*	6.34 ± 0.16*
HFP 组	16	0.96 ± 0.20	1.18 ± 0.12	5.45 ± 0.14

注:HPP:体外灌流处理的肝衰竭患者血浆,HFP:肝衰竭患者血浆;与 HFP 组比较,\* $P < 0.05$

者血浆(HFP)组。

1.2.2 体外灌流血浆的制备:取出灌流器内的吸附材料,自然风干后称取 2 g 置入 50 ml 离心管中;向离心管中注入 20 ml 生理盐水,静置 5 min 后抽出生理盐水,再注入 20 ml 生理盐水,静置 5 min,再抽出生理盐水;向离心管中注入收集好的肝衰竭患者血浆 12 ml,静置 30 min 后提取出血浆备用。

1.2.3 C3A 细胞活性检测:用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法。

1.2.4 血浆内毒素定量检测:在测定管内加 100  $\mu\text{l}$  血浆,空白管加 100  $\mu\text{l}$  无热源水,各加 200  $\mu\text{l}$  高氯酸(PCA),37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 20 min;离心 15 min 后取上清液 65  $\mu\text{l}$ ,加 0.18 mol/L NaOH 95  $\mu\text{l}$ ,加催化剂 75  $\mu\text{l}$ ;37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 25 min,加合成基质 50  $\mu\text{l}$ ;37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 8 min,加亚硝酸钠 0.5  $\mu\text{l}$ ,10 min;加氨基磺酸钠 0.5 ml,室温 10 min;加奈乙二胺 0.5 ml,10 min 后,于波长 545 nm 处测定吸光度(A)值。内毒素(EU/ml)=A 值 $\times$ 1.26。

1.2.5 地西洋代谢功能检测

1.2.5.1 试剂准备:据所需第二抗体量,用第二抗体稀释液以 1:2 500 进行稀释;将试剂盒中浓缩的磷酸盐缓冲液(PBS)用去离子水 20 倍稀释;用去离子水 20 倍稀释试剂盒中浓缩的工作液;标准品为标准品浓缩液:甲醇水溶液:PBS 以 1:1:8 均匀混合,阴性对照用 PBS 代替标准品。

1.2.5.2 标本准备及检测:将处于分裂周期的 C3A 细胞以  $2 \times 10^5$ /孔的密度接种于 6 孔板中,待细胞完全贴壁后,分别更换为含 100% HPP、100% HFP 各 2 ml 的培养基,同时每孔中加入地西洋纯品 10  $\mu\text{g}$  (0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ),于  $\text{CO}_2$  加湿孵箱中

培养;72 h 后收集各孔培养基 180  $\mu\text{l}$  分别加入小离心管(EP 管)中,各管中加入 180  $\mu\text{l}$  碳酸盐缓冲液(15 mmol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 35 mmol/L  $\text{NaHCO}_3$ , pH 值 9.5)和 240  $\mu\text{l}$  醋酸乙酯,振荡 5 min,离心 5 min,于各 EP 管中取 30  $\mu\text{l}$  有机相,分批置于干燥蒸发仪内,80  $^{\circ}\text{C}$  下于通风橱中蒸干,再分别加入甲醇水溶液和 PBS,取 50  $\mu\text{l}$  样品直接加到微孔中,用酶标仪检测。

1.3 统计学处理:采用 SPSS 11.5 统计软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用  $t$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 内毒素含量(表 1):HPP 组内毒素含量较 HFP 组明显减少,差异有统计学意义( $t = 15.29, P < 0.05$ )。

2.2 C3A 细胞活性(表 1):HPP 组 C3A 细胞活性明显低于 HFP 组,差异有统计学意义( $t = 6.096, P < 0.05$ )。

2.3 C3A 细胞中地西洋代谢量(表 1):C3A 细胞在 HFP 和经血液灌流器处理的 HPP 中连续生长 72 h 后,HPP 中细胞的地西洋代谢量明显大于 HFP 中,差异有统计学意义( $t = 20.034, P < 0.05$ )。

## 3 讨论

在肝脏的诸多功能中,生物转化功能尤为重要,肝衰竭时此功能受损严重,应用组合型人工肝支持系统可改善患者存活率,其中 C3A 细胞的功能状态直接影响临床治疗效果<sup>[1]</sup>。

本实验显示,HFP 组中的细胞增殖能力大于 HPP 组,说明血液灌流在有效清除内毒素的同时,也清除了一部分有益于肝脏再生的因素。而内毒素是参与肝细胞坏死过程的主要分子<sup>[2]</sup>,同时与

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.01.018

基金项目:国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA02A410A);国家重点基础研究发展规划(973)项目(2007CB512801)

作者单位:030000 太原,山西医科大学第二医院肝病中心(张桓虎、高虹);100069 首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心(陈煜、郑素军、段钟平)

通信作者:段钟平,Email:duan2517@sohu.com

体外循环后全身炎症反应关系密切<sup>[3]</sup>。地西洋主要通过细胞色素 P450 酶 (CYP) 氧化后进行代谢。肝衰竭时, CYP 的功能、活性会遭受破坏, 整个肝脏的 CYP 含量会显著下降<sup>[4]</sup>。CYP 基因受很多内源性因子的影响, 如白细胞介素-1 (IL-1)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、干扰素- $\beta$  等因子在体内可以抑制 CYP 的功能<sup>[5]</sup>; 而只有 IL-1 的抑制作用是直接的<sup>[6]</sup>, 通过抑制肝细胞 CYP 的基因转录而下调其功能<sup>[7]</sup>。也有实验表明, 胆汁酸可以降低原代大鼠肝细胞 P450 的活性<sup>[8]</sup>。本研究结果显示, 与培养在 HFP 中的 C3A 细胞相比, HPP 中的 C3A 细胞地西洋代谢能力得到改善, 可能与之前进行血液灌流清除了 IL-1、TNF、胆汁酸有关。清除内毒素后延缓发生随后的级联反应也有助于地西洋代谢能力的改善。有研究发现, 慢性重型肝炎患者的血浆能抑制 C3A 细胞的生物转化功能, 细胞内还原型谷胱甘肽 (GSH) 消耗也明显增加, 导致其解毒功能下降<sup>[9]</sup>; 血液灌流可能减少了 GSH 的损耗, 但这也是 HPP 中细胞地西洋代谢能力改善的原因之一。

本实验提示, 为充分保障人工肝支持系统生物反应器中细胞的功能活性,

在进行生物人工肝治疗之前要对患者进行血液灌流治疗, 滤除血浆中的内毒素、IL-1 及胆汁酸等毒性物质, 消除了有毒物质对肝细胞生物转化功能的不利影响, 可提高生物反应器内 C3A 细胞生物转化能力, 也就是提高了其解毒能力。

参考文献

[1] Hughes RD, Nicolaou N, Langley PG, et al. Plasma cytokine levels and coagulation and complement activation during use of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Artif Organs*, 1998, 22:854-858.  
 [2] Masai T, Sawa Y, Ohtake S, et al. Hepatic dysfunction after left ventricular mechanical assist in patients with end-stage heart failure; role of inflammatory response and hepatic microcirculation. *Ann Thorac Surg*, 2002, 73:549-555.  
 [3] Hoebe KH, Witkamp RF, Fink-Gremmels J, et al. Direct cell-to-cell contact between Kupffer cells and hepatocytes augments endotoxin-induced hepatic injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, 280:G720-728.  
 [4] Morgan ET. Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. *Drug Metab Rev*, 1997, 29:1129-

1188.  
 [5] Siewert E, Bort R, Kluge R, et al. Hepatic cytochrome P450 down-regulation during aseptic inflammation in the mouse is interleukin 6 dependent. *Hepatology*, 2000, 32:49-55.  
 [6] Bertini R, Bianchi M, Villa P, et al. Depression of liver drug metabolism and increase in plasma fibrinogen by interleukin 1 and tumor necrosis factor; a comparison with lymphotoxin and interferon. *Int J Immunopharmacol*, 1998, 10:525-530.  
 [7] Kurokohchi K, Yoneyama H, Matsuo Y, et al. Effects of interleukin 1 alpha on the activities and gene expressions of the cytochrome P450 I D subfamily. *Biochem Pharmacol*, 1992, 44:1669-1674.  
 [8] Smirthwaite AD, Gaylor JD, Cousins RB, et al. Cytotoxicity of bile in human Hep G2 cells and in primary cultures of rat hepatocytes. *Artif Organs*, 1998, 22:831-836.  
 [9] 陈煜, 赵丽莉, 王海燕, 等. 慢性重型肝炎患者血浆对 C3A 细胞增殖功能的影响. *传染病信息*, 2005, 18:77-79.

(收稿日期: 2009-11-20)  
 (本文编辑: 李银平)

• 启事 •

中国科技信息研究所万方数据 2009 年版《中国期刊引证报告》(扩刊版)  
 ——基础医学类期刊影响因子和总被引频次及中国医学类期刊影响因子前 20 位排序表

期刊名称	影响因子	排位	期刊名称	总被引频次	排位	期刊名称	影响因子	排位
中国疫苗和免疫	2.143	1	中华医院管理杂志	4 256	1	中西医结合学报	1.286	1
中国危重病急救医学	1.780	2	中国危重病急救医学	3 942	2	中国中西医结合杂志	1.266	2
中华医院管理杂志	1.720	3	中华麻醉学杂志	3 723	3	中国中药杂志	1.072	3
中国医院管理	1.438	4	中国医院管理	3 261	4	针刺研究	0.958	4
中华高血压杂志	1.351	5	中国病理生理杂志	2 942	5	世界科学技术-中医药现代化	0.950	5
免疫学杂志	1.197	6	中国健康心理学杂志	2 207	6	中国中西医结合急救杂志	0.907	6
中国健康心理学杂志	0.878	7	中华血液学杂志	2 163	7	中医杂志	0.835	7
中国病理生理杂志	0.792	8	解放军医学杂志	2 114	8	中国中医药科技	0.824	8
中国寄生虫学与寄生虫病杂志	0.777	9	中华高血压杂志	2 032	9	中国针灸	0.823	9
中华病理学杂志	0.760	10	医疗卫生装备	1 941	10	中华中医药杂志	0.781	10
中华男科学杂志	0.759	11	中国疫苗和免疫	1 922	11	中草药	0.772	11
中华麻醉学杂志	0.758	12	解放军医院管理杂志	1 908	12	上海针灸杂志	0.770	12
中国实验血液学杂志	0.736	13	中华病理学杂志	1 873	13	中药药理与临床	0.746	13
解放军医院管理杂志	0.726	14	中国人兽共患病学报	1 721	14	中药材	0.721	14
细胞与分子免疫学杂志	0.715	并列 15	免疫学杂志	1 672	15	吉林中医药	0.719	15
医疗卫生装备	0.715	并列 15	中华微生物学和免疫学杂志	1 472	16	上海中医药杂志	0.715	16
中华医学遗传学杂志	0.687	17	中华男科学杂志	1 423	17	中国骨伤	0.674	17
解剖科学进展	0.682	18	生物医学工程学杂志	1 239	18	中成药	0.667	18
生理科学进展	0.663	19	中国免疫学杂志	1 238	19	中国现代中药	0.663	19
解放军医学杂志	0.632	20	中国微生物学杂志	1 219	20	中国实验方剂学杂志	0.629	20

作者: 张桓虎, 高虹, 陈煜, 郑素军, 段钟平  
作者单位: 张桓虎, 高虹(山西医科大学第二医院肝病中心, 太原, 030000), 陈煜, 郑素军, 段钟平(首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心, 100069)  
刊名: 中国危重病急救医学 **ISTIC PKU**  
英文刊名: CHINESE CRITICAL CARE MEDICINE  
年, 卷(期): 2010, 22(1)  
被引用次数: 1次

## 参考文献(9条)

1. 陈煜;赵丽莉;王海燕 慢性重型肝病患者血浆对C3A细胞增殖功能的影响[期刊论文]-传染病信息 2005(2)
2. Smirthwaite AD;Gaylor JD;Cousins RB Cytotoxicity of bile in human Hep G2 cells and in primary cultures of rat hepatocytes 1998
3. Kurokohchi K;Yoneyama H;Matsuo Y Effects of interleukin 1 alpha on the activities and gene expressions of the cytochrome P450 II D subfamily 1992
4. Bertini R;Bianchi M;Villa P Depression of liver drug metabolism and increase in plasma fibrinogen by interleukin 1 and tumor necrosis factor:a comparison with lymphotoxin and interferon 1998
5. Siewert E;Bort R;Kluge R Hepatic cytochrome P450 down-regulation during aseptic inflammation in the mouse is interleukin 6 dependent 2000
6. Morgan ET Regulation of cytochrome P450 during inflammation and infection 1997
7. Hoehe KH;Witkamp RF;rink-Gremmels J Direct cell-to-cell contact between Kupffer cells and hepatocytes augments endotoxin-induced hepatic injury 2001
8. Masai T;Saws Y;Ohtake S Hepatic dysfunction after left ventricular mechanical assist in patients with endstage heart failure:role of inflammatory response and hepatic microcirculation 2002
9. Hughes RD;Nicolaou N;Langley PG Plasma cytokine levels and coagulation and complement activation during use of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure 1998

## 引证文献(2条)

1. 朱章华, 仇毓东, 施晓雷, 谢婷, 丁义涛 人骨髓干细胞在中空纤维滤器中诱导分化构建生物人工肝反应器的可行性研究[期刊论文]-中国危重病急救医学 2010(12)
2. 朱章华, 仇毓东, 施晓雷, 谢婷, 丁义涛 人骨髓干细胞在中空纤维滤器中诱导分化构建生物人工肝反应器的可行性研究[期刊论文]-中国危重病急救医学 2010(12)

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zgwbjyxx201001015.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgwbjyxx201001015.aspx)