

# 表达人肝再生增强因子肝细胞系生物人工肝治疗安全性的动物实验初步研究

朱冰<sup>1</sup> 游绍莉<sup>2</sup> 刘鸿凌<sup>2</sup> 荣义辉<sup>2</sup> 常彬霞<sup>2</sup> 辛绍杰<sup>2△</sup>

(1 军医进修学院 北京 100853 2 解放军 302 医院肝衰竭诊疗与研究中心 北京 100039)

**摘要** 目的:评价表达人肝再生增强因子基因的 HepG2 细胞系的细胞培养上清及细胞裂解物的小鼠急性毒性和近期致癌性。方法:SPF 级昆明种小鼠 18 只,随机分为空白对照组、细胞培养上清组、细胞裂解物组,每组小鼠各 6 只,腹腔分别接种空白培养液、细胞培养上清、细胞裂解物 0.5ml。连续 14 天,每天观察记录动物毒性反应,14d 后宰杀小鼠,取血测血生化指标,及观察病理改变。结果:各组小鼠均存活。除对照组 1 例小鼠,细胞培养上清组 1 例小鼠,细胞裂解物组 2 例小鼠次日活动稍减少外,均未见异常反应。血液生化检测 ALT、AST、AFP、TBIL 无明显异常,且各组间无差别。普通光镜下各组动物肝脏病理切片染色均未见明显异常。结论:目的细胞系细胞培养上清、细胞裂解物对实验用昆明小鼠无明确毒副作用及短期致癌性,可能提供一种安全的可用于生物人工肝新的细胞来源。

**关键词** 肝细胞;生物人工肝;动物实验

中图分类号:Q95-3 R322.61 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)11-2068-03

## Study on Safety of HepG2 Cell Line Expressing Augmenter of Liver Regeneration for Bioartificial Liver in Mice

ZHU Bing<sup>1</sup>, YOU Shao-li<sup>2</sup>, LIU Hong-ling<sup>2</sup>, RONG Yi-hui<sup>2</sup>, CHANG Bin-xia<sup>2</sup>, XIN Shao-jie<sup>2△</sup>

(1 PLA Postgraduate Medical school, 100853, Beijing, China; 2 302 Hospital of the PLA, 100039, Beijing, China)

**ABSTRACT Objective:** To evaluate the acute toxicity and short-term tumorigenicity of mice intraperitoneal injection with the culture supernatants or lysates from HepG2 cell line expressed the augmenter of liver regeneration gene. **Methods:** 18 SPF grade-Kunming mice were randomly divided into 3 groups including control, cell culture supernatant and cell lysate. 6 mice in each group were injected intraperitoneally with culture medium, cell culture supernatant, and cell lysate of 0.5ml, respectively. The behaviors of mice in each group were observed each day for two weeks. After two weeks, the mice were killed to measure blood biochemical index and pathological change. **Results:** All mice were survived throughout the experiment and no abnormal behaviors observed in the mice except for 4 mice (1 in control group, 1 in culture supernatant group and 2 in lysate group), whose activity slightly decreased. The levels of ALT, AST, AFP, and TBIL were normal and there was no significant difference among three groups. There was no obvious pathological change of liver section from three groups observed by light microscope. **Conclusion:** There are no acute toxicity and short-term tumorigenicity in experimental SPF-Kunming mice intraperitoneal injection with the culture supernatants or lysates from HepG2 cell line expressed the augmenter of liver regeneration gene. The cell line may provide a potential safe cell source for bioartificial liver.

**Key words:** Hepatocytes; Bioartificial; Liver failure

Chinese Library Classification: Q95-3, R322.61 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2011)11-2068-03

### 前言

肝肿瘤细胞株以其容易大量获取、易于培养的优势为生物人工肝看好,新型生物膜技术的应用,使得肿瘤来源的细胞株作为人工肝生物反应器用细胞成为可能。本研究组已建立了一株表达人肝再生增强因子基因的 HepG2 细胞系,拟应用于生

物人工肝治疗。目前国内外尚无该细胞系安全性试验研究资料,本试验参考国家食品药品监督管理局(SFDA state food and drug administration)《新生物制品审批办法》中传代细胞系生产生物制品规程<sup>[1]</sup>,及其他细胞系安全性动物试验研究资料<sup>[2,3]</sup>设计本试验,为该细胞临床应用的安全性提供可借鉴的评价模式和相关实验数据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 细胞系、培养上清及细胞裂解物

细胞系来源于本研究组建立的表达人肝再生增强因子基因的 HepG2 细胞系。取 10×7.5cm 铺满细胞的培养瓶(培养液 10ml/瓶),细胞培养 72h 后收集培养上清,经细胞过滤器滤过除菌得到实验用培养上清。细胞裂解物取自同批培养肝细胞,消化后悬浮于细胞培养液中( $2 \times 10^6$  个/ml)<sup>[4]</sup>,经超声细胞碎裂

作者简介:朱冰(1979-):男,硕士研究生,主治医师,主要研究方向:生物人工肝治疗肝衰竭,电话:010-66933433, E-mail: zhubing302@gmail.com

△通讯作者:辛绍杰:男,博士生导师,教授,电话:010-66933433, E-mail: xsj302@yahoo.com.cn,解放军 302 医院肝衰竭诊疗与研究中心主任,传染病专业博士生导师,从事传染病及人工肝临床 20 余年,电话:010-66933423

(收稿日期:2011-01-25 接受日期:2011-02-19)

器处理 5 分钟，收集上清。空白培养液为含 10%胎牛血清、100U/ml 青霉素、100U/ml 链霉素、2mmol/L 谷氨酰胺的 MEM 培养液。

1.2 实验动物

SPF 级昆明种小鼠 18 只,体重 22~27g,合格证号 SCXK-(军)2002-001,雌雄各半,购自军事医学科学院实验动物中心。动物试验条件符合 SPF 级标准：温度 22~28℃，湿度 50~70%。

1.3 实验仪器

细胞过滤器(孔径 0.22um)、超声细胞碎裂器(上海之信仪器有限公司 JYD-900 智能型超声粉碎机)、OLYMPUS AU5400 全自动生化仪器等。

1.4 实验方法

1.4.1 实验分组 实验使用昆明种小鼠 18 只,随机分为 3 组:空白对照组,细胞培养上清组,细胞裂解物组,给药前禁食不禁水 12h,分别腹腔接种空白培养液、接种细胞培养上清、细胞裂解物各 0.5ml。

1.4.2 观察指标 连续 14 天<sup>[5]</sup>,每天观察记录动物毒性反应表现,反应出现和恢复时间,观察 14d 后宰杀小鼠,取血测血生化指标(ALT、AST、AFP、TBIL),肉眼观察肝脏病变及留取肝、脾等标本送病理检查。

1.4.3 统计学方法 各组数据以表示,用 F 检验。

2 结果

2.1 一般情况 见表 1。

表 1 小鼠一般情况  
Table 1 General information of the mice

Group	Quantity(n)	Weight(before injection) * (g)	Weight(two weeks after injection)**	Death (n)
Control group	6	23.900± 2.385	36.022± 1.793	0
Cell culture supernatant group	6	24.003± 1.627	35.785± 1.788	0
Cell lysate group	6	24.008± 2.154	35.568± 10.62	0

\*F=0.005 P>0.5 \*\*F=0.123 P>0.5

2.2 习性存活情况

对 3 组小鼠给药的运动、进食、毛发、尿便、生存情况进行观察,除对照组 1 例小鼠,细胞培养上清组 1 例小鼠,细胞裂解物组 2 例小鼠次日活动稍减少外,均未发现有异常改变,各组

小鼠均存活。各组小鼠体重均有增加(表 1)。

2.3 血液生化检测结果

给药后各组动物血液生化检测结果见表 2。

表 2 小鼠生化检测结果( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 2 Biochemical test results in mice

Group	Quantity(n)	ALT(U/L)*	AST(U/L)**	TBIL(umol/L)#	AFP(ng/L)##
Control group	6	23.333± 11.219	32.667± 8.311	9.917± 3.268	10.333± 3.327
Cell culture supernatant group	6	22.167± 7.808	31.333± 9.374	11.167± 2.79	8.167± 3.920
Cell lysate group	6	23.167± 6.524	33.833± 4.491	9.850± 1.502	8.333± 2.582

\*F=0.031 P>0.5 \*\*F=0.159 P>0.5 #F=0.478 P>0.5 ##F=0.791 P>0.5

2.4 病理结果

各组动物肝脏病理切片普通光镜下观察均未见异常(细胞培养上清组肝脏病理片见图 1,细胞裂解物组肝脏病理片见图

2)。对照组及细胞培养上清组小鼠脾脏病理片镜下观察未见异常(细胞培养上清组脾脏病理片见图 3),细胞裂解物组脾脏病理切片可见少许多核巨噬细胞(图 4)。

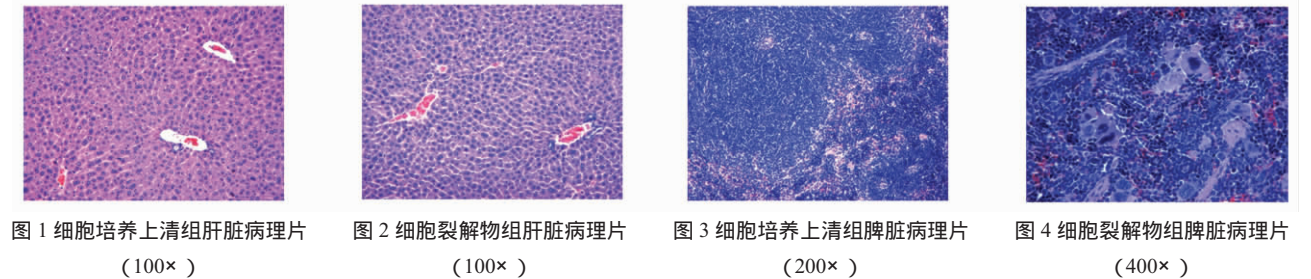


图 1 细胞培养上清组肝脏病理片 (100×)      图 2 细胞裂解物组肝脏病理片 (100×)      图 3 细胞培养上清组脾脏病理片 (200×)      图 4 细胞裂解物组脾脏病理片 (400×)  
Fig.1 Liver pathology of cell culture supernatant group(100×)      Fig.2 Liver pathology of cell lysate group(100×)      Fig.3 Spleen pathology of cell culture supernatant group(200×)      Fig.4 Spleen pathology of cell lysate group(400×)

3 讨论

无论异种肝细胞还是人肝细胞在体外培养时均受生长条件限制,其存活时间有限、不能增殖传代,而肝肿瘤细胞系培养条件要求低,细胞间无接触抑制,培养后迅速达到生物人工肝的肝细胞数量要求,在既往的国内外细胞生物人工肝研究中取得了较好的效果<sup>[5]</sup>。但肿瘤细胞的肿瘤相关因子或其他基因产物释放入血是否会导致毒性或致瘤反应并不清楚,使其临床应用受到限制<sup>[6]</sup>。我们将表达人肝再生增强因子基因的肝细胞系培养上清、细胞裂解物注射入小鼠腹腔,观察 14 天后除个别小鼠在注射次日活动略减少外未发现小鼠出现基本生活习性发生明显改变,细胞培养上清、细胞裂解物组与对照组比较,小鼠未出现明显毒副作用。在生化及特异性的肿瘤标志物检测中各组小鼠均未发现有明显异常。肉眼观察及病理检测中肝、脾、肺、肾、脑等组织也未发现有肿瘤发生。细胞裂解物组脾脏病理切片可见许多核巨噬细胞,考虑为腹腔注射细胞碎片引起轻微免疫反应所致,其余肝脏、肾脏病理均未见明显异常,以上结果说明该细胞系细胞培养上清、细胞裂解物对于实验用昆明小鼠无明确毒副作用及短期致瘤作用。

由于时间限制,关于长期的毒副作用及致瘤作用需要进一步试验证实,同时我们也考虑到如果肿瘤细胞逃逸入血液中是否会导致肿瘤,因此我们在后续的实验中增加了细胞组实验和试验小鼠的数量,将进一步观察该细胞的长期毒性及致瘤性。

参 考 文 献(References)

[1] 国家食品药品监督管理局.新生物制品审批办法[J].中国新药杂志, 1999,8(6):1  
State Food and Drug Administration. Chinese new drugs journal, 1999,8(6):1

[2] 杨志明,魏人前、项舟等.转化人胚胎腱细胞致瘤性实验研究[J].中华显微外科杂志, 2001, 24(1):36-39  
Yang Zhi-ming, Wei Ren-qian, Xiang Zhou, et al. Experimental study on tumorigenicity of human embryonic tendon cell transformed by pbsA58H plasmid[J]. Chin J Microsurg, 2001,24(1):36-39

[3] 金澎,徐如祥,姜晓丹等.成人骨髓源性神经肝细胞的致瘤性研究[J].中华神经医学杂志,2005,4(1):10  
Jim Peng, Xu Ru-xiang, Jiang Xiao-dan, et al. Tumorigenicity of adult bone marrow-derived neural stem cells [J]. Chin J Neuromed, 2005,4(1):10

[4] Kjonniksen I, Hoifodt HK, Pihl A, et al. Different metastasis patterns of a human melanoma cell line in nude mice and rats: Influence of microenvironment[J]. Natl Cancer Inst, 1991, 82 (14): 1020

[5] Risbud MV, Karamuk E, Schlosser V, et al. Hydrogel-coated tex-tile scaffolds as candidate in liver tissue engineering: II.Evaluation of spheroid formation and viability of hepatocytes [J]. J Bio-mater Sci polym Ed, 2003,14 (7):719-731

[6] Mazariegos GV, Patzer JF2nd, Lopez RC, et al. First clinical use of a novel bioartificial liver support system (BLSS)[J]. AmJTransplant, 2002,2(3):260-266

(上接第 2052 页)

[12] Wang XY, Huizinga JD, Diamond J, Liu LW. Loss of intramuscular and submuscular interstitial cells of Cajal and associated enteric nerves is related to decreased gastric emptying in streptozotocin-induced diabetes[J]. Neurogastroenterol Motil, 2009,21(10):1095-e92

[13] Lammers WJ, Ver Donck L, Stephen B, Smets D, Schuurkes JA. Origin and propagation of the slow wave in the canine stomach: the outlines of a gastric conduction system [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009, 296(6):G1200-1210

[14] Egbuji JU, o'grady G, du P, Cheng LK, Lammers WJ, Windsor JA,

Pullan AJ. Origin, propagation and regional characteristics of porcine gastric slow wave activity determined by high-resolution mapping[J]. Neurogastroenterol Motil. 2010, 22(10):e292-300

[15] Monnikes H, van der Voort IR.Gastric electrical stimulation in gastroparesis: where do we stand[J]. Dig Dis, 2006, 24(3-4):260-266

[16] Hayashi T, Kinami S, Fushida S, Fujimura T, Miwa K, Inoue K. Evaluation of residual stomach motility after proximal gastrectomy for gastric cancer by electrogastrography[J]. Dig Dis Sci, 2006, 51(2): 268-273