

文章编号:1005-6947(2008)11-1088-05

· 基础研究 ·

PLA-O-CMC 纳米粒子培养的猪肝细胞大鼠腹腔内移植后凋亡相关蛋白的变化

陈钟, 汤飞, 蔡鸿宇, 官伟军

(南通大学附属医院 肝胆外科, 江苏 南通 226001)

摘要:目的 探讨聚乳酸-O-羧甲基壳聚糖(PLA-O-CMC)纳米粒子培养的猪肝细胞大鼠腹腔内移植后移植肝细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2, Bax 和 Fas 表达的变化。方法 原位胶原酶循环肝灌注法分离猪肝细胞。D-氨基半乳糖腹腔内注射制作大鼠急性肝衰竭模型。随机分为 2 组, 48 h 后分别将 5 mL I 型胶原凝胶包埋的 PLA-O-CMC 纳米粒子黏附培养 24 h 的猪肝细胞(A 组), 5 mL I 型胶原凝胶固定培养 24 h 的猪肝细胞(B 组)移植至急性肝衰竭大鼠腹腔内。移植量均为 5.0×10^7 个肝细胞。采用免疫组化法检测移植后 3 d 内移植肝细胞 Bcl-2, Bax 和 Fas 的表达情况。结果 移植后 1, 2, 3 d, A 组 Bcl-2 阳性细胞百分数明显高于 B 组 ($P < 0.05$), Bax 和 Fas 阳性细胞百分数明显低于 B 组 ($P < 0.05$)。结论 PLA-O-CMC 纳米粒子能上调移植猪肝细胞的抗凋亡蛋白的水平和下调凋亡蛋白的水平, 具有良好的抗凋亡作用。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(11):1088-1092]

关键词: 肝细胞/移植; 异种肝细胞移植; 肝功能衰竭, 急性; 纳米粒子; 细胞凋亡

中图分类号: R 617

文献标识码: A

The changes of expression of apoptosis-related proteins of the transplanted hepatocytes after intraperitoneal transplantation in rats using porcine hepatocytes cultured with polylactic acid-O-carboxymethylated chitosan nanoparticles

CHEN Zhong, TANG Fei, CAI Hongyu, GUAN Weijun

(Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the changes of expression of apoptosis-related proteins Bcl-2, Bax and Fas of the transplanted hepatocytes after intraperitoneal transplantation in rats using porcine hepatocytes cultured with polylactic acid-O-carboxymethylated chitosan nanoparticles. **Methods** Recirculating collagenase perfusion method was used to isolate porcine hepatocytes. At 48 h after D-galactosamine intraperitoneal injection, 5 mL polylactic acid-O-carboxymethylated chitosan nanoparticles-cultured porcine hepatocytes embedded in collagen gel (group A) and 5 mL porcine hepatocytes embedded in collagen gel (group B) were transplanted into peritoneal cavity of SD rats, respectively. The amount of transplanted porcine hepatocytes was 5.0×10^7 hepatocytes in two groups. The expression of Bcl-2, Bax and Fas in transplanted hepatocytes three days after transplantation was detected with immunohistochemistry. **Results** At 1, 2 and 3 d after transplantation, the rates of Bcl-2 positive cells in group A was significant higher than those in group B, whereas the rates of Bax and Fas positive cells in group A were significant lower than those in group B ($P < 0.05$). **Conclusions** Polylactic acid-O-carboxymethylated chitosan nanoparticles can upregulate antiapoptosis protein expression and downregulate apoptosis proteins expression of xenotransplanted porcine

基金项目:江苏省自然科学基金资助项目(BK200544);南通大学创新基金资助项目(CX0301)。

收稿日期:2008-08-07; **修订日期:**2008-10-08。

作者简介:陈钟,男,南通大学附属医院主任医师,主要从事肝细胞移植和肝胆外科方面的研究。

通讯作者:陈钟 E-mail:chenz99@hotmail.com

hepatocytes in rats, and the anti-apoptosis effect is better.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17 (11) : 1088 - 1092]

Key words: Hepatocytes/ transpl; Xenotransplantation, Hepatocytes; Liver Failure, Acute; Nanoparticles; Apoptosis

CLC number: R 617

Document code: A

肝细胞移植因肝细胞来源广泛、对受体影响小、简单易行及价格相对低廉等优点,有望成为继肝移植后又一治疗急性肝衰竭的有效手段^[1-4]。但实验和临床结果表明,凋亡是肝细胞移植排斥的主要机制^[5]。笔者研究发现,异种猪肝细胞腹腔内移植后,早期免疫排斥以肝细胞凋亡为主^[6];已报道采用流式细胞仪观察到聚乳酸-O-羧甲基壳聚糖(Poly-lactic acid-O-carboxymethylated chitosan, PLA-O-CMC)纳米粒子对急性肝衰竭大鼠腹腔内移植猪肝细胞凋亡具有明显的抑制作用^[7]。本研究采用免疫组织化学方法研究 PLA-O-CMC 纳米粒子对腹腔内异种猪肝细胞移植后的凋亡相关蛋白 Bcl-2, Bax 和 Fas 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 中国实验用小型猪($n=5$),雌雄不限,体重 $2\sim 4$ kg;SD大鼠($n=120$),雌雄不限,体重 $250\sim 280$ g。动物均由南通大学动物实验中心提供。

1.1.2 主要试剂及材料 D-氨基半乳糖购自重庆医科大学化学教研室。胶原酶 IV, RPMI1640, 新生牛血清(NBS), 表皮生长因子(EGF), 肝细胞生长因子(HGF)均购自 Gibco 公司;聚乳酸购自美国 Sigma 公司;O-羧甲基壳聚糖购自上海伟康生物制品有限公司;I型胶原购自北京益尔康公司;免疫组化检测试剂 Bcl-2, Bax 和 Fas 多克隆一抗及二抗均购自武汉博士德生物工程有限公司。其他试剂为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 PLA-O-CMC 纳米粒子的制 以 PLA-O-CMC 为原料,按文献^[8]方法制备 PLA-O-CMC 纳米粒子。

1.2.2 大鼠急性肝衰竭模型的建立及分组 将 SD 大鼠一次性腹腔内注射 10% D-氨基半乳糖 1.2 g/kg。取成模 SD 大鼠 120 只,随机分成 PLA-O-CMC 纳米胶原肝细胞移植组(A组)和胶原肝细胞移植组(B组),每组 60 只。

1.2.3 猪肝细胞分离和培养 采用原位胶原酶

循环肝灌注法分离猪肝细胞^[9]。猪肝细胞产量为 $(4.5\sim 5.0)\times 10^7$ 个/g,肝细胞活率为 97%。将分离的肝细胞以 5×10^6 个/mL 加于含 10% NBS, 1 mg/L HGF 和 20 μ g/L EGF 的 RPMI1640 培养基中分成 2 组进行培养、移植。(1)A组:将分离的肝细胞以 5×10^6 个/mL 和 PLA-O-CMC 纳米粒子混合置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱内培养 12 h, 纳米粒子的浓度为 100 mg/L。每 30 min 摇动 1 次,每次持续 5 min。12 h 后,800 r/min 低速离心,以 4×10^7 个/mL 浓度与 I 型胶原混合,胶原浓度 2 mg/mL,细胞密度 1×10^7 个/mL,纳米粒子浓度为 100 mg/L, pH 为 7.4。将纳米、胶原、细胞混合物以每孔 5 mL 滴加到 6 孔培养板中,凝固成胶状物后,再加入 5 mL (1 \times) RPMI1640 培养液,使胶状物悬浮于培养液中,在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱内再培养 12 h 后进行移植。(2)B组:将分离的肝细胞以 5×10^6 个/mL 浓度置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱内培养,每 30 min 摇动 1 次,每次持续 5 min。12 h 后,800 r/min 低速离心,以 4×10^7 个/mL 浓度与 I 型胶原混合,胶原浓度 2 mg/mL,细胞密度 1×10^7 个/mL, pH 为 7.4。将胶原、细胞混合物以每孔 5 mL 滴加到 6 孔培养板中,凝固成多孔海绵样胶状物后,再加入 5 mL (1 \times) RPMI1640 培养液,使胶状物悬浮于培养液中,在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱内再培养 12 h 后进行移植。

1.2.4 肝细胞移植 在注射 D-氨基半乳糖 48 h 后进行腹腔内肝细胞移植。乙醚麻醉下,常规消毒后打开腹腔,将经培养的相应移植植物(PLA-O-CMC 纳米胶原肝细胞、胶原肝细胞)植入大鼠腹腔内,并用大网膜适当包裹。移植细胞量均为 5×10^7 个/只,分层缝合腹壁,术中注意充分止血。移植后两组给予同等条件,分笼饲养,予 10% 葡萄糖液供饮用。

1.2.5 移植猪肝细胞 Bcl-2, Bax 和 Fas 表达的检测 肝细胞移植后 1, 2, 3 d, 各组随机选取大鼠各 20 只,麻醉后剖腹取移植肝细胞胶原组织块,4% 多聚甲醛固定,免疫组化检测 Bcl-2, Bax 和 Fas 阳性细胞百分数。采用 SABC 法,石蜡切片脱蜡至水,加 0.3% H₂O₂ 以灭活内源性过氧化物

酶,微波抗原修复,正常血清封闭,依次加一抗,生物素化二抗,SABC复合物37℃孵育,二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,显微镜观察。切片中棕黄色或黄褐色颗粒为阳性染色细胞。每张切片随机选取5个高倍视野观察100个细胞,取均值作为样本阳性细胞百分数。阳性细胞百分数取值:0~5%=1,>5%~10%=2,>10%~15%=3,>15%~20%=4,>20%=5。

1.3 统计学处理

所有数据采用Stata8.0统计软件进行分析。

两组大鼠移植猪肝细胞Bcl-2,Bax和Fas阳性细胞百分数(率)差异采用两样本等级资料秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

移植后1,2,3d,A组移植猪肝细胞表达Bcl-2阳性细胞百分数显著高于B组($P < 0.05$)(表1)(图1-2);B组移植猪肝细胞表达Bax和Fas阳性细胞百分数显著高于A组(表2-3)(图3-6)。

表1 两组大鼠移植猪肝细胞Bcl-2表达比较

移植后天数(d)	组别	n	阳性细胞例数					总分值	平均分值	P值
			0~5%	>5%~10%	>10%~15%	>15%~20%	>20%			
1	A	20	0	4	4	8	4	72	3.60	<0.05
	B	20	4	6	6	4	0	50	2.50	
2	A	20	0	2	4	10	4	76	3.80	<0.05
	B	20	4	4	8	2	2	54	2.70	
3	A	20	0	2	4	6	8	80	4.00	<0.05
	B	20	2	6	8	2	2	56	2.80	

表2 两组大鼠移植猪肝细胞Bax表达比较

移植后天数(d)	组别	n	阳性细胞例数					总分值	平均分值	P值
			0~5%	>5%~10%	>10%~15%	>15%~20%	>20%			
1	A	20	4	5	7	2	2	53	2.65	<0.05
	B	20	2	2	5	6	5	70	3.50	
2	A	20	5	8	3	2	2	48	2.40	<0.05
	B	20	3	3	4	5	5	66	3.30	
3	A	20	5	5	4	4	2	53	2.65	<0.05
	B	20	2	3	3	6	6	71	3.55	

表3 两组大鼠移植猪肝细胞Fas表达比较

移植后天数(d)	组别	n	阳性细胞例数					总分值	平均分值	P值
			0~5%	>5%~10%	>10%~15%	>15%~20%	>20%			
1	A	20	5	4	6	3	2	53	2.65	<0.05
	B	20	2	2	5	5	6	81	4.05	
2	A	20	6	7	3	2	2	47	2.35	<0.05
	B	20	3	2	4	6	5	68	3.40	
3	A	20	6	4	4	4	2	42	2.10	<0.05
	B	20	2	3	3	5	7	72	3.60	

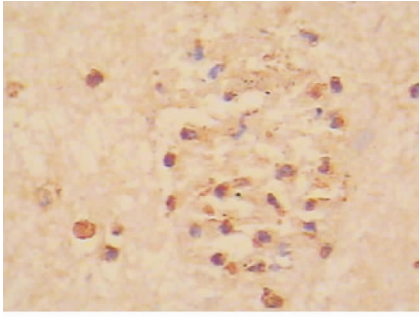


图1 A组移植后2 d移植肝细胞 Bcl-2 免疫组化(×400)

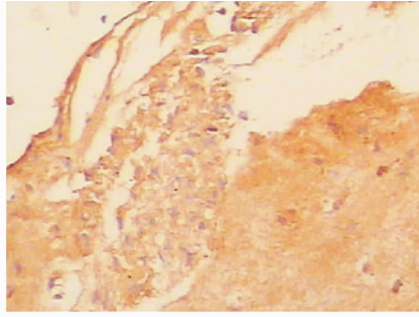


图2 B组移植后2 d移植肝细胞 Bcl-2 免疫组化(×400)

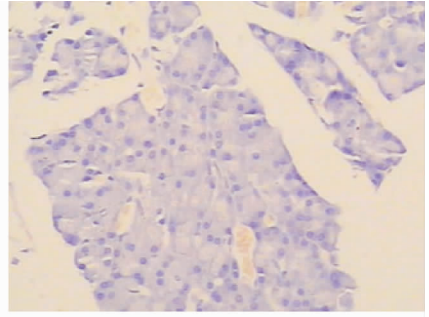


图3 A组移植后2 d移植肝细胞 Bax 免疫组化(×400)

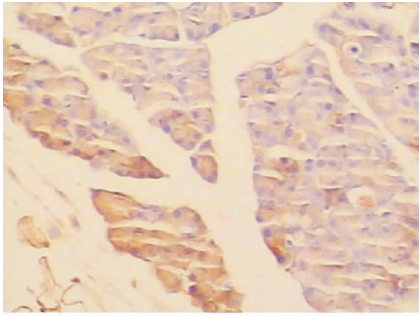


图4 B组移植后2 d移植肝细胞 Bax 免疫组化(×400)

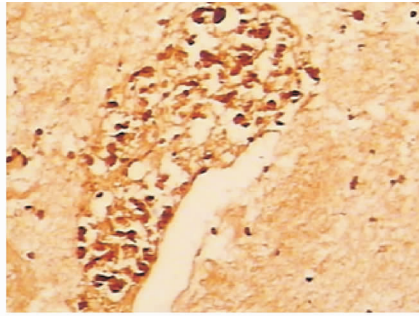


图5 A组移植后2 d移植肝细胞 Fas 免疫组化(×400)

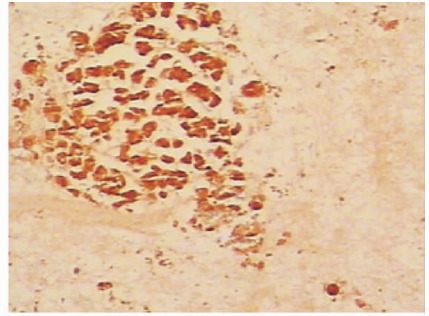


图6 B组移植后2 d移植肝细胞 Fas 免疫组化(×400)

3 讨论

由于人肝细胞的缺乏,异种肝细胞移植是目前肝细胞移植研究的热点之一。然而,异种肝细胞在体内过快被排斥是阻碍其临床应用的重要原因之一。研究表明凋亡在异种肝细胞移植早期免疫排斥反应中起主要作用^[6]。

Bcl-2、Bax 和 Fas 等凋亡相关蛋白已成为近年来国内外普遍采用以检测细胞凋亡的重要指标之一。Bcl-2 是一个凋亡抑制基因^[10]。正常肝细胞缺乏 Bcl-2 表达。本研究结果显示,移植后 1~3 d,两组移植肝细胞均出现 Bcl-2 抗凋亡蛋白的表达,其中 A 组表达率显著高于 B 组。表明 PLA-O-CMC 纳米粒子和胶原凝胶均具有上调 Bcl-2 表达的作用,从而抑制移植肝细胞的凋亡;两者联合使用则上调 Bcl-2 表达的作用更强。

Bax 基因属于 Bcl-2 基因家族成员,其功能与 Bcl-2 基因相反,为促凋亡基因^[11],可抑制 Bcl-2 基因的抗凋亡作用。有研究表明,在大鼠同种肝移植中,移植物内 Bax mRNA 表达水平在急性排斥期增高;说明同种肝移植排斥反应所致细胞凋

亡中伴有 Bax 促凋亡基因表达的上调^[12]。本研究结果显示,移植后 1~3 d,A 组移植肝细胞促凋亡蛋白 Bax 表达率显著低于 B 组,表明 PLA-O-CMC 纳米粒子可通过下调凋亡蛋白 Bax 的表达而抑制移植肝细胞的凋亡。

Fas 分子是典型的 I 型膜蛋白,属肿瘤坏死因子(TNF)/神经生长因子(NGF)受体家族中的一员。肝细胞表面有丰富的 Fas 受体。Fas 受体与其天然配体 FasL 或抗 Fas 抗体一并,启动 caspase 的活化,从而启动细胞凋亡的信号传导链之一。因此,Fas 信号途径也是细胞凋亡调节的基础环节。Fas 与 FasL 或抗 Fas 抗体相结合,导致 Fas 相关死亡决定簇的募集。Fas 相关死亡决定簇通过死亡效应决定簇与 caspase-8 前体结合,形成死亡诱导信号传导复合物。后者活化 caspase-8,从而启动了 caspase 家族酶链反应尤其是 caspase-3 蛋白酶,最终作用于细胞的结构蛋白,导致细胞凋亡的发生。Kawahara 等^[13]将低表达 Fas 抗原的 C57BL/6 lpr/lpr (B6 lpr) 小鼠肝细胞移植于表达无功能 FasL 的 C3H/He gld/gld (C3H gld) 小鼠脾内,7 d 后也未观察到 Fas/Fas-L 介导的排斥反应所导致的细胞凋亡。Ota 等^[14]认

为,在异种肝细胞移植中,Fas/FasL 通路对异种肝细胞排斥反应起重要作用。本研究结果显示,移植后 1~3 d,A 组肝细胞促凋亡蛋白 Fas 表达率低于 B 组;表明 PLA-O-CMC 纳米粒子可通过下调凋亡蛋白 Fas 表达而抑制移植肝细胞的凋亡。

Xie 等^[15]的研究表明,纳米尺寸粗糙表面能适度地调控细胞的黏附、增殖、分化和凋亡。同时 I 型胶原提供肝细胞生长所必需的细胞外基质,能促进其黏附、生长、功能表达,并能通过移植肝细胞表面的 $\beta 1$ 亚型整合素,激活胞内酪氨酸蛋白,使其磷酸化,传导抗凋亡的信息^[16-17]。因此,PLA-O-CMC 纳米粒子和 I 型胶原结合具有增强抑制异种移植肝细胞凋亡的作用。

本研究显示 PLA-O-CMC 纳米粒子组移植肝细胞抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达率高于单纯胶原培养组,而凋亡蛋白 Bax 和 Fas 表达率低于单纯胶原培养组。据此表明,PLA-O-CMC 纳米粒子是通过影响异种移植肝细胞凋亡相关蛋白的表达而发挥抗凋亡作用的。

参考文献:

[1] Nagata H, Ito M, Cai J, *et al.* Treatment of cirrhosis and liver failure in rats by hepatocyte xenotransplantation [J]. *Gastroenterology*, 2003,124(2):422-431.

[2] Hammer C. Xenotransplantation for liver therapy or: Can porcine hepatocytes generate physiological functions sufficient for a human patient in ALF? [J]. *Int J Artif Organs*, 2002,25(10):1019-1028.

[3] 郭峰,卢永刚,何建平. 肝细胞移植研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2007,16(8):803-805.

[4] 蔡宏波, Strom S, 吕新生. 临床肝细胞移植的现状和前景[J]. *中国普通外科杂志*, 2003,12(9):704-707.

[5] Gómez-Lechón MJ, Serralta A, Donato MT, *et al.* The immunosuppressant drug FK506 prevents Fas-induced apoptosis in human hepatocytes [J]. *Biochem Pharmacol*, 2004,68(12):2427-2433.

[6] 陈钟,杨欣荣,戴新征. 猪肝细胞异种移植过程中移

植肝细胞的凋亡研究[J]. *江苏医药*, 2007,33(3):253-256.

- [7] 陈钟,杨欣荣,戴新征. PLA-O-CMC 纳米粒子对异种移植猪肝细胞凋亡的抑制作用[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007,11(31):6178-6182.
- [8] 陈钟,戴新征,杨欣荣,等. PLA-O-CMC 纳米粒子的制备及其对培养猪肝细胞的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2006,14(17):1669-1674.
- [9] 陈钟,丁义涛. 原位胶原酶循环灌注法分离肝细胞[J]. *细胞生物学杂志*, 2003,25(2):124-127.
- [10] Song E, Chen J, Antus B, *et al.* Adenovirus-mediated Bcl-2 gene transfer inhibits apoptosis and promotes survival of allogeneic transplanted hepatocytes [J]. *Surgery*, 2001,130(3):502-511.
- [11] Tanaka K, Kobayashi N, Gutierrez AS, *et al.* Prolonged survival of mice with acute liver failure with transplantation of monkey hepatocytes cultured with an antiapoptotic pentapeptide V5 [J]. *Transplantation*, 2006,81(3):427-437.
- [12] Shintaku S, Ohdan H, Yamamoto H, *et al.* Expression of Bcl-2 homologue mRNAs in rat liver allograft: rejection-induced cell apoptosis is associated with upregulation of bax and bcl-xs expression [J]. *Transpl Int*, 1998,11(Suppl 1):S284-288.
- [13] Kawahara T, Kasai S, Yagita H, *et al.* Critical role of Fas/Fas ligand interaction in CD28-independent pathway of allogeneic murine hepatocyte rejection [J]. *Hepatology*, 1997,26(4):944-948.
- [14] Ota K, Yagi T, Iwagaki H, *et al.* Fas-mediated cytotoxicity by gammadelta T cells during acute rejection in xenotransplantation of spheroidal aggregate-cultured hepatocytes [J]. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 1999,105(1-2):43-45.
- [15] Xie Y, Sproule T, Li Y, *et al.* Nanoscale modifications of PET polymer surfaces via oxygen-plasma discharge yield minimal changes in attachment and growth of mammalian epithelial and mesenchymal cells in vitro [J]. *J Biomed Mater Res*, 2002,61(2):234-245.
- [16] Ito A, Takizawa Y, Honda H, *et al.* Tissue engineering using magnetite nanoparticles and magnetic force: heterotypic layers of cocultured hepatocytes and endothelial cells [J]. *Tissue Eng*, 2004,10(5-6):833-840.
- [17] 宋尔卫,陈积圣,张磊,等. 可溶性 I 型胶原蛋白对移植肝细胞凋亡的抑制作用[J]. *中华器官移植杂志*, 2001,22(1):39-41.