

反相高效液相色谱内标法检测球体培养猪肝细胞利多卡因代谢功能

Determination of lidocaine metabolism capacity in cultured porcine hepatocyte spheroids by RP-HPLC with internal standard

徐新¹, 陈钟^{2*}

(1. 南通大学附属医院药剂科, 南通 226001; 2. 南通大学附属医院肝胆外科)

[摘要] **目的:** 采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)内标法测定培养的猪肝细胞利多卡因浓度, 以初步评价球体培养的猪肝细胞利多卡因代谢功能。**方法:** 采用原位胶原酶循环灌注法分离猪肝细胞, 以 1×10^7 /ml 密度接种至无血清培养基中, 分别采用球体培养法和贴壁培养法培养 0~7 d。分别于培养 0、1、3、5、7 d 在培养液中加入利多卡因 100 ng/ml。用锥虫蓝拒染试验检测培养肝细胞的活率; 在倒置显微镜下观察肝细胞形态; 采用 RP-HPLC 内标法测定培养 24 h 后上清液中利多卡因浓度。**结果:** 培养 3~7 d, 球体培养组肝细胞活率高于贴壁培养组($P < 0.05$)。球体培养 24 h 后 80%~90% 的肝细胞形成多细胞球形聚集体。培养 1~7 d, 球体培养组利多卡因浓度低于贴壁培养组($P < 0.05$); 两组在培养第 3 天时利多卡因浓度最低。**结论:** RP-HPLC 内标法可用于测定培养的猪肝细胞利多卡因浓度, 方法灵敏、准确、快速。高密度下球体培养猪肝细胞利多卡因代谢功能高于贴壁培养, 以培养第 3 天为最强。

[关键词] 肝, 人工; 肝细胞; 细胞培养技术; 利多卡因

[中图分类号] R 318.14 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2006)12-1377-03

生物人工肝(bioartificial liver, BAL)是急性肝衰竭(acute liver failure, ALF)和等待肝移植患者的一种有前途的治疗手段。猪肝细胞是最合适的异种肝细胞来源^[1]。理想的生物人工肝应当包含大量有功能的肝细胞。利多卡因试验最能反映肝细胞 P450 系统的代谢功能^[2]。为了探讨保持肝细胞良好功能, 本研究采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法, 以盐酸萘啶酮为内标测定猪肝细胞培养液中的利多卡因浓度, 以猪肝细胞球体培养和贴壁培养进行对比研究。结果表明本法准确可靠、简单快速, 肝细胞球体培养有助于提高培养肝细胞的功能。

1 材料和方法

1.1 仪器与材料 中国实验用小型猪($n=5$), 雌雄不限, 体重 2~4 kg, 由南通大学动物实验中心提供。Perkin Elmer 100 (HP) 高效液相色谱系统, 包括 LC-290 可变波长紫外检测器、TL-9900 色谱数据工作站; 利多卡因对照品(中国药品生物制品检定所); 内标盐酸萘啶酮(Napp Technologies Inc.); 胶原酶 IV 型、RPMI 1640 均购于 Gibco 公司; 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

1.2 肝细胞分离和培养 采用原位胶原酶循环灌注法分离猪肝细胞^[3]。分离的肝细胞清洗后悬浮在 RPMI 1640 中。肝细胞以高密度(1×10^7 /ml)培养接种至含 200 μ g/L 氢化可的松、1 mg/L 肝细胞生长因子(HGF)、10 μ g/L 表皮生长因子(EGF)、20 μ g/L 神经生长因子(NGF)、100 μ g/L 胰岛素、4 μ g/L 胰高血糖素、6.25 mg/L 转铁蛋白、10 mg/L 亚油酸、2 mmol/L 谷氨酰胺、0.5 g/L 牛血清白蛋白、3 nmol/L

硒酸钠、0.1 μ mol/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、50 pmol/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、15 mmol/L N-2-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、200 μ g/L 头孢哌酮钠、10 万 U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的无血清 RPMI 1640 培养液中, 采用以下两种方式进行肝细胞培养: (1)球体培养组, 将上述接种物注入到预先用聚羟乙基异丁烯酸被覆的培养瓶内, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱持续旋转培养 7 d(转速 12 r/h)。(2)贴壁培养组, 将上述接种物注入到预先用鼠尾胶原覆盖的培养瓶内, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 7 d, 分别于培养 0、1、3、5、7 d 在培养液中加入利多卡因 100 ng/ml。

1.3 观察指标 (1)肝细胞存活率: 用锥虫蓝拒染试验检测。(2)肝细胞形态: 用倒置显微镜观察肝细胞形态。(3)肝细胞利多卡因代谢情况: 在球体培养组和贴壁培养组的细胞培养液中, 分别收集 1、3、5、7 d 培养 24 h 的上清液, 测定利多卡因浓度。样品处理及 HPLC 色谱条件: 精密量取培养上清液 0.5 ml, 置 10 ml 具塞刻度离心管中, 加内标溶液(0.05 mg/ml)10 μ l, 1 mol/ml 氢氧化钠溶液 100 μ l, 涡旋 10 s, 加入氯仿 5 ml 涡旋 1 min, 离心 5 min(3 000 r/min), 弃水层取氯仿层 4 ml, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴氮气吹干, 100 μ l 流动相复溶, 20 μ l 进

[基金项目] 江苏省卫生厅重大项目资助课题(BQ200020); 江苏省高校“青蓝工程”中青年学术带头人培养基金资助课题。Supported by Key Project of Health Department of Jiangsu Province(BQ200020) and 2002 “Qinglan Project” for Training Yong Academic Leaders of Universities of Jiangsu Province.

[作者简介] 徐新, 主管药师。E-mail: xiner-nt@163.com

* Corresponding author. E-mail: chenz@ahnmc.com

样。色谱柱为 Kromasil C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 4.0, 含 0.5% 三乙胺)-甲醇 (40 : 65); 流速: 1 ml/min; 检测波长 220 nm, 灵敏度 0.01 AUFS。

1.4 统计学处理 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 STATS 6.0 软件进行方差分析 (ANOVA)。当 $P < 0.05$ 时, 认为有差异有显著性意义。

2 结果

2.1 肝细胞存活率 培养 1~7 d 内球体培养组和贴壁培养组肝细胞存活率见表 1。培养 0, 1 d, 两组间肝细胞存活率均无统计学差异。培养 3~7 d, 球体培养组肝细胞存活率均高于贴壁培养组 ($P < 0.05$)。

表 1 培养肝细胞存活率

培养时间 (t/d)	(% , n=5, $\bar{x} \pm s$)	
	球体培养组	贴壁培养组
0	98.6 ± 1.3	98.5 ± 1.2
1	96.1 ± 2.6	96.0 ± 2.5
3	95.8 ± 2.3*	90.5 ± 1.0
5	95.1 ± 2.2*	89.0 ± 1.5
7	95.2 ± 2.3*	88.3 ± 2.0

* $P < 0.05$ 与贴壁培养组比较

2.2 肝细胞形态观察 球体培养 24 h 后 80%~90% 的肝细胞形成多细胞球形聚集体, 其形态更接近于体内的肝细胞, 在以后培养的 1 周内, 一直保持完整的多细胞球形聚集体形态。贴壁培养 12~24 h 后肝细胞贴壁, 培养 5~7 d 后, 部分肝细胞形态改变。

2.3 肝细胞利多卡因代谢情况

2.3.1 色谱分离结果 样品色谱分离结果见图 1。

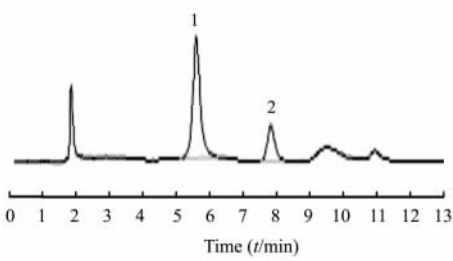


图 1 样品分离色谱图

1: 利多卡因; 2: 内标

2.3.2 线性关系 于空白培养基中加入标准利多卡因溶液, 配成已知浓度的标准液, 与样品作同样处理, 测定, 以利多卡因与内标的峰面积之比进行线性回归, 结果表明, 在 1~120 ng/ml 范围内呈良好的相关性。线性方程为 $Y = 0.2934X - 0.005661$ ($r = 0.9994$)。

2.3.3 回收率和精密度 分别取 10, 50 和 100 ng/ml 浓度的标准液, 依法测定, 计算回收率和精密度, 结果见表 2。

表 2 回收率和精密度测定结果

利多卡因浓度 ($\rho_B / \text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$)	(%)			
	天内		天间	
	平均回收率	精密度	平均回收率	精密度
10.0	99.6	4.5	101.2	3.2
50.0	100.1	3.2	100.2	4.1
100.0	98.3	3.8	98.6	2.3

2.3.4 利多卡因浓度测定结果 两组肝细胞培养上清液利多卡因浓度测定结果见表 3。统计学处理结果表明, 培养 1~7 d, 球体培养组利多卡因浓度均低于贴壁培养组 ($P < 0.05$), 提示球体培养的肝细胞利多卡因代谢功能强于贴壁培养的肝细胞。两组在培养第 3 天, 利多卡因浓度均降至最低。

表 3 培养肝细胞利多卡因浓度

培养时间 (t/d)	($\rho_B / \text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, n=5, $\bar{x} \pm s$)	
	球体培养组	贴壁培养组
0	99.56 ± 0.00	99.56 ± 0.00
1	10.06 ± 3.73*	15.32 ± 3.01
3	6.83 ± 2.02*	9.56 ± 4.12
5	7.49 ± 2.61*	10.06 ± 2.83
7	10.45 ± 3.07*	14.72 ± 3.28

* $P < 0.05$ 与贴壁培养组比较

3 讨论

动物实验及初步临床试验表明生物人工肝是治疗肝功能衰竭的一种有效方法, 但其临床应用尚有一些问题有待解决。肝细胞作为生物人工肝的生物材料必须具有特异性功能并且可满足患者的要求, 但普通方法体外培养的肝细胞很快失去其分化功能。因此, 如何保持培养肝细胞的功能是目前生物人工肝研究的热点之一。

贴壁培养是将培养瓶壁预先用鼠尾胶覆盖促使肝细胞贴壁。通常情况下, 肝细胞的形态和功能可维持 1~2 周。但在高密度培养情况下, 培养 72 h 后, 肝细胞存活率和功能便降低。本研究将分离的肝细胞注入到预先用聚羟乙基异丁烯酸被覆的培养瓶中旋转培养, 以限制肝细胞贴壁, 促进肝细胞球形聚集生长。实验结果表明, 采用球体培养方法 24 h 后 80%~90% 的肝细胞形成多细胞球形聚集体, 其形态更接近于体内的肝细胞, 在培养 1 周内细胞活率保持在 95% 以上。

肝脏的 P450 系统是正常肝脏功能的重要组成部分。该系统直接完成肝脏转化和代谢功能。生物人工肝是否具有 P450 系统的作用, 成为评价其人工肝性能的可靠与实用的指标。而其中最能反映 P450 系统代谢功能的当属利多卡因试验。

利多卡因的化学结构是双乙基甘氨酸二甲苯。90%以上的利多卡因在肝内经 P450 系统氧化代谢, N 位去乙基化生成单乙基甘氨酸二甲苯胺和甘氨酸二甲苯胺。

文献报道生物样品中利多卡因的检测方法有 TDX 荧光偏正免疫法(FPIA)、高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)、液相色谱-质谱联用法(LC-MS)、高效毛细管电泳法(CZE)等^[4,5]。其中 FPIA 易受到一些内源性物质的干扰, 其结果可靠性差。色谱-质谱联用资金投入较高, 其使用受到限制。HPLC 具有专属性强、样品用量少、检测灵敏度高、稳定性好、快捷方便等特点, 但外标法因提取过程和进样量引起的误差较大, 所以本文建立了 RP-HPLC 内标法定测定培养猪肝细胞利多卡因代谢功能, 结果更为准确。本研究在强碱性条件下以氯仿提取, 内标与利多卡因的提取率均很高, 保证了方法的检测限和灵敏度。同时在碱性条件下提取, 杂质含量少。在此色谱条件下测定, 无干扰、准确、简便、快捷, 适用于肝细胞培养液中利多卡因的浓度测定。

本研究表明, 培养 3~7 d, 球体培养肝细胞的存活率高于贴壁培养肝细胞($P < 0.05$); 培养 1~7 d, 球体培养肝细胞利多卡因浓度均高于贴壁培养肝细胞($P < 0.05$); 所建立的 RP-HPLC 内标法在 1~120 ng/ml 范围内呈良好的相关性, 回收率和精密度均较高, 提示可将 RP-HPLC 内标法用于初步评价球体培养的猪肝细胞利多卡因代谢功能, 方法准确可靠、简单快速。此外, 本研究还发现, 培养第 3 天, 球体培养组和贴壁培养组利多卡因浓度均降至最低, 提示培养的肝细胞利多卡因代谢功能在培养 3 d 左右较好。Poyck 等^[6]研究发现, 15℃ 低温保存的猪肝细胞, 其利多卡因消除

第 3 天明显升高; Lorenti 等^[7]研究猪肝细胞培养外源性基质的重要性时也发现利多卡因代谢物在第 4 天达到最高。本研究结果与文献报告基本一致。

[参 考 文 献]

- [1] Patzer JF, Lopez RC, Zhu Y, et al. Bioartificial liver assist devices in support of patients with liver failure[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2002, 1:18-25.
- [2] Oellerich M, Raude E, Burdelski M, et al. Monoethylglycine xylidide formation kinetics: a novel approach to assessment of liver function[J]. *J Clin Chem Clin Biochem*, 1987, 25:845-853.
- [3] 陈 钟, 丁义涛. 原位胶原酶循环灌注法分离猪肝细胞[J]. *细胞生物学杂志*, 2003, 25:124-127.
- [4] 林宇星, 施俊人. 肝硬化患者与正常人利多卡因及其代谢物 MEGX 的药代动力学比较[J]. *中国生化药物杂志*, 2001, 22:155.
- [5] 尉志文, 张 楠, 贺文艳, 等. 血液和脑脊液中利多卡因的气相色谱-质谱检测研究[J]. *法医学杂志*, 2005, 21:124.
- [6] Poyck PP, Hoekstra R, van Wijk AC, et al. Mildhypothermic preservation for transport purposes of the AMC bioartificial liver charged with porcine hepatocytes[J]. *Transplantation*, 2005, 80:1153-1160.
- [7] Lorenti A, Barbich M, Hidalgo A, et al. Culture of porcine hepatocytes: the dogma of exogenous matrix revisited[J]. *Artif Organs*, 2001, 25:546-550.

[收稿日期] 2006-09-04

[修回日期] 2006-11-28

[本文编辑] 邓晓群