

· 思路与方法学 ·

# HepG2. 2. 15 用于中药复方治疗乙型肝炎研究的相关问题探讨

陈少芳 万石川 王章林

**摘要** 本课题组前期完成了经方小柴胡汤含药血清对 HepG2. 2. 15 细胞干预作用的相关研究, 在 HepG2. 2. 15 用于中药复方治疗乙型肝炎研究过程中摸索出一些经验, 现就此细胞培养及相关血清药理学运用等方面内容与心得进行回顾与总结, 以期为同仁提供参考与借鉴。

**关键词** HepG2. 2. 15 细胞; 中药复方; 含药血清; 乙型肝炎

Discussion on Application of HepG2. 2. 15 Cells in Chinese Medicine Compound for Treating Hepatitis B CHEN Shao-fang, WAN Shi-chuan, and WANG Zhang-lin College of TCM, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350122)

**ABSTRACT** Related studies on intervention of Xiaochaihu Decoction containing serum on HepG2. 2. 15 cells were previously completed in this topic group. Authors have obtained some experiences during using HepG2. 2. 15 cell in Chinese medicine compound for treating hepatitis B. Now authors reviewed and summarized contents and experiences in the culture of HepG2. 2. 15 cells and seropharmacological uses, aiming to provide references and mirrors for colleagues.

**KEYWORDS** HepG2. 2. 15 cell; compounds of Chinese medicine; drug containing serum; hepatitis B

乙型肝炎是我国感染人数最多、危害最大的传染病, 乙肝的治疗一直是医学界的一个难题<sup>[1]</sup>。中药复方治疗乙型肝炎是我国特有的、有效的治疗手段, 尤其在调节免疫、改善症状、调节肝功能、防治肝纤维化等方面显示了巨大的潜力与优势<sup>[2-5]</sup>, 从中药中挖掘能使乙肝病毒转阴的药物或复方, 值得期待。本课题组前期完成了经方小柴胡汤含药血清对 HepG2. 2. 15 细胞蛋白酪氨酸激酶 2/信号转导子与激活 3 (Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3, JAK2/STAT3) 信号通路干预作用的相关研究, 在 HepG2. 2. 15 用于中药复方治疗慢性乙型肝炎研究过程中摸索出一些经验, 现就此细胞培养及相关血清药理学运用等进行回顾与总结。

## 1 关于 HepG2. 2. 15 培养与接种问题

### 1.1 购买 HepG2. 2. 15 细胞前准备 细胞株可

从国家实验细胞资源共享平台 (<http://www.cellresou->

[rce.cn/](http://www.cellresou-))、中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心、中国典型培养物保藏中心细胞库等处咨询后购买。HepG2. 2. 15 为表达 HBV 病毒的人肝细胞, 国内较少机构有保藏, 笔者由中国典型培养物保藏中心购得。

细胞购买前需详细了解所购细胞的原培养基种类、品牌、配方等。细胞培养过程中, 要确保所用培养基的成分稳定, 建议不要更换不同成分培养基, 更换会对后续实验造成很大影响, 甚至可能导致细胞死亡。本课题组使用与细胞提供方中国典型培养物保藏中心相同的培养基, 即选用 MEM 培养基 (GIBCO, 货号 41500 - 034)。该培养基为粉末状, 在细胞到达前要先行配制好可用的液态培养基。烧杯、量筒、搅拌棒等经清洗高压消毒后烘干备用。MEM 培养基配制使用超纯水, 1 包粉末培养基 (9.6 g/包) 先用 800 mL 超纯水溶解, 加入 100 mmol/L 丙酮酸钠 10 mL, pH 仪监测下 7.5% 碳酸氢钠每次 1 ~ 2 mL 少量多次加入小心调节 pH 至 7.0 ~ 7.2, 超纯水定容至 1L, 磁力搅拌 2 ~ 3 h 后在细胞房洁净工作台内用 33 mm 0.22 μm 针头式过滤器过滤除菌, 加入双抗即青霉素—链霉素溶液 (100 ×) 10 mL。将配好的空白培养基取 90 mL 加入 10 mL 胎牛血清 (GIBCO, 货号 10099 - 141), 配成含 10% 胎牛血清的完全培养基, 4℃ 冷藏, 使用期限 1 个

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81403331); 福建省自然科学基金资助项目 (No. 2014J01363)

作者单位: 福建中医药大学中医学院 (福州 350122)

通讯作者: 陈少芳, Tel: 0591 - 22861152, E-mail: csf2013@aliyun.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2016. 10. 1265

月。细菌污染可直接导致整个实验前功尽弃,一定要尽量避免,细胞培养过程无菌观念至关重要。接收细胞前要全面细致地作好 CO<sub>2</sub> 培养箱、洁净工作台、移液器、吸头等清洁消毒工作。另外,由于 HepG2. 2. 15 可表达 HBV 病毒,实验者在操作过程中要注意个人防护,必要时进行乙肝疫苗接种免疫。

1.2 细胞接收后的处理 收到细胞后,严格无菌操作,打开细胞培养瓶,将细胞培养瓶内培养基完全吸出,严禁直接倾倒,放入另一无菌容器中(此培养基可再用)。加入消化液 2 mL, 37℃ 消化至细胞脱落,接种至一新的 25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶,加入原培养基 5 mL,再置于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。再次换液或传代时需要循序渐进,可将原培养基与自配培养基按 2:1, 1:1 比例过渡,最终完全替换成自配的培养基。为避免过大温差对细胞的影响,冷藏的培养基需要回复到室温后再使用。

合成培养基中均含有较大量的谷氨酰胺,其作用非常重要,细胞需要谷氨酰胺合成核酸和蛋白质,谷氨酰胺缺乏可导致细胞生长不良甚至死亡。由于谷氨酰胺在溶液中很不稳定,4℃ 下放置 1 周可分解 50%。含有谷氨酰胺的培养液在 4℃ 冰箱中储存 2 周以上时,应重新按比例加入谷氨酰胺。细胞培养过程中如发现状态不好,生长缓慢,成团成簇,需要考虑为培养基中谷氨酰胺降解所致,必要时可补加一定量的谷氨酰胺。

细胞生长状态良好时,要进行传代,扩大数量,先行保种,即冻存。从增殖期到形成致密的单层细胞前的培养细胞都可用于冻存。一般待 HepG2. 2. 15 细胞生长汇合度达 80%~90% 时冻存最好,已经长满的细胞不宜冻存。由于冻存后生存率低。在冻存前一天最好换一次培养液。1 个 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶的细胞可收集在 1 mL 冻存培养液中,冻存前检测细胞存活率需大于 90%。冻存培养液可按二甲基亚砜(DMSO):胎牛血清:空白培养基按 1:2:7 或 1:4:5 比例配制,推荐用 1:2:7 比例。装有细胞悬液的冻存管放入程序降温盒,然后将此盒置于 -80℃ 保存。

1.3 正式实验细胞接种 统计学上要求实验至少应有 3 次生物学重复,因此应至少进行 3 批次的细胞培养与干预。根据实验检测指标数量选用 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶或 6 孔板, HepG2. 2. 15 细胞可根据实验需要按  $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$  个/mL 密度接种,根据实验分组及各组复孔(或瓶)数计算需要细胞总量,可先用 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶扩大培养。细胞在 75 cm<sup>2</sup> 的培养瓶里培养,长得更快更均匀,重叠少,空泡也少。1 瓶 75 cm<sup>2</sup> 的培养瓶细胞生长汇合度达 80%~90% 时可传代接种至 3 个同样规格的瓶中。当细胞生长状态良好,一般经 48~72 h 汇合度再度达 80%~90%,若活细胞率超过 90%,可按前述密度接

种至各组 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶或 6 孔板开始正式实验。

1.4 是否使用 G418 筛选 G418 是一种氨基糖苷类抗生素,是稳定转染最常用的抗性筛选试剂。HepG2. 2. 15 是一个由 HepG2 稳定转染了 HBV 全基因组质粒,在某些情况下可能会发生转染质粒的丢失而使 HepG2 细胞占优势,可适当加一些 G418 培养,使 HepG2 细胞死亡,剩余的 HepG2. 2. 15 更纯。本课题组整个细胞培养前后历时约 5 个月,实验过程中每隔 3~4 周均有进行 HBV 标志物 HBsAg、HBeAg 检测,发现 HepG2. 2. 15 始终能稳定表达分泌 HBV 相关抗原,故而未行 G418 筛选。

1.5 细胞培养中添加含药血清优于粗制剂 研究中药复方对 HepG2. 2. 15 的干预机制笔者采用血清药理学方法,加入细胞培养体系中的为含药血清,同以往直接加入水煎等粗制剂相比有更大的优越性,中药粗制剂中含有大量杂质,若直接加入反应体系中,反应体系会受到粗制剂鞣质、无机盐、渗透性、pH 等非特异性理化因素的影响,造成假阳性或假阴性结果,其科学性难以被认可。药物进入人体吸收后,有效物质移行,经代谢可产生新的活性物质或刺激机体产生其他的活性物质,因而含药血清添加法与体内结果更为相近。

## 2 关于人含药血清添加问题

2.1 添加人的含药血清优于动物血清 模拟中医证候是中医学实验动物模型的本质性要素。现阶段中医证候动物模型研制尚处于探索阶段,还不能为中医学基础理论及其辨证论治研究提供较为理想的实验载体。研究者试图通过一些实验方法让动物具有相应的“证”,但动物造模成功评价缺乏可靠标准,难以全面反映中医证所要求的本质,在可靠性方面难以有说服力,因此在实际应用中广受质疑<sup>[6,7]</sup>。

在血清药理学中,由于血清供体的种属、性别、个体、年龄的不同,会导致血清中所含药物有效活性成分“质”和“量”的差异。不同种属的动物血清对同一细胞的生长增殖存在差异,因此,为避免多种血清的干扰,在体外培养实验中宜采用同种单一含药血清,既为细胞提供营养,又为药物载体。同时供体动物血清对受体细胞生长影响与其种属亲缘有关。种属亲缘性越近,对细胞的毒性越小,更利于细胞生长与增殖<sup>[8]</sup>。值得注意的是,现代医学血清药理学研究中制备的含药血清多是作用于离体人源细胞,如本课题组研究中用到的人肝细胞 HepG2. 2. 15、人胃黏膜上皮细胞 GES-1 等。既往该方面研究均为药物饲喂于大鼠、兔等实验动物,再抽取动物血清作用于体外细胞。由于异种动物血清对人源细胞的潜在毒性作用,使用供体为人的含药血清才可能最大限度地减少因种属差异对实验造成的干扰。因此,在不违背医学伦理学原

则和受试者知情同意前提下,采集人的含药血清这一离体标本作用于人源细胞进行研究,还原了正常给药途径即药物口服吸收经体内代谢的过程,更切合药物人体内代谢实际情况。这种实验方法不仅体现了药物在人体内的生物转化,同时克服或减少了诸如其他种属血清潜在毒性或免疫反应等因素的干扰。而且人的药物血清来源于临床,取材方便,不易污染,一次获取量大,可操作性强。当然由于使用中药复方含药血清涉及临床血清收集,使得实验设计之初即要明确中医诊断与辨证分型标准,对接受采样的临床受试者进行统一规范的辨证分型与治疗。这样采集的带有中医证信息的人含药血清正是动物含药血清所无法比拟的。

## 2.2 HepG2. 2. 15 添加人含药血清的注意事项

临床血清采集、离心及体外细胞培养、含药血清干预等均遵循无菌操作,杜绝了细菌感染的隐患。为避免细菌感染,常规加双抗。本课题组研究曾使用人含药血清加入细胞培养体系最长达 14 天,未出现细菌污染情况。

关于含药血清是否灭活问题,血清灭活对大多数的细胞而言是不需要的,甚至可能因灭活处理影响血清的质量,造成细胞生长速率降低。灭活还可能将药物诱生的活性成分去除,减弱血清药效。经热处理的血清,沉淀物会显著增多,这些沉淀物在倒置显微镜下观察,像是“小黑点”,常会让研究者误以为是血清遭受污染,而把血清放在 37℃ 环境中,又会使此沉淀物更增多,使研究者误认为是微生物的分裂扩增。为最大限度地保留各种活性物质,减少沉淀干扰,本研究课题使用的含药人血清均不灭活。

HepG2. 2. 15 自身可表达 HBV, 当此细胞用于乙型肝炎研究时,如涉及细胞上清 HBV DNA、HBsAg、HBeAg 检测,如本课题采集和加入细胞的是慢性乙型肝炎肝郁脾虚证患者含药血清,要考虑到细胞上清中上述标志物来源除了 HepG2. 2. 15 细胞,还有可能来自人血清。当探讨中药复方对 HepG2. 2. 15 HBV 表达影响时,在课题设计之初有必要为此设立一个对照组,了解加药物血清干预即刻细胞上清中 HBV 标志物的情况。

临床收集的含药血清应小瓶分装,避免反复冻融,否则会明显影响细胞生长。正式实验时,于细胞而言培养基成分存在从胎牛血清到人含药血清的变换,因此细胞接种后最好适应性培养 24 ~ 48 h,待细胞贴壁后最好汇合度达 50% 以上时开始加含药血清干预。相较于加入胎牛血清的细胞,镜下加入中药含药血清的细胞周围可见更多碎屑残渣,但细胞状态不受影响,本课题组 MTT 实验也证实此残渣并不影响细胞活性。由于使用

人源血清,如有存在分时段换液或添加培养基等情况,同一瓶(或孔)前后应使用同一个人的血清,减少免疫反应。培养基中过高的血清含量,即使同种属也可能对细胞产生不利影响,因此如因观察量效关系需要设计有不同浓度组,人含药血清最高浓度宜控制在 20% 以下。

HepG2. 2. 15 细胞具有稳定的分泌 HBV 病毒及相关抗原的生物学功能,是比较理想的中药复方治疗乙型肝炎包括抗 HBV 研究的细胞模型。目前这方面的研究正方兴未艾<sup>[9-12]</sup>,希望笔者的总结与探讨能够对同仁有所启发与帮助。另外,课题正式实施前均有必要进行一系列预实验,不断优化实验过程,谨记细节决定成败。

## 参 考 文 献

- [1] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南(2015 年更新版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(12):1941-1954.
- [2] 朱银芳,顾锡炳,过小叶,等. 复方芪珠颗粒对慢性乙型肝炎患者细胞免疫的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(10):1178-1181.
- [3] 申弘,聂红明,陈逸云,等. 慢性乙型肝炎的中医药治疗[J]. 长春中医药大学学报, 2015, 31(4): 873-876.
- [4] 苏泉,潘光强. 中药复方汤剂辨证治疗慢性乙型肝炎 90 例观察[J]. 浙江中医杂志, 2014, 49(7):507-508.
- [5] 邢静,杨利超,刘西洋,等. 中医药治疗慢性乙型肝炎肝纤维化用药规律[J]. 山西中医, 2015, 31(3):50-51.
- [6] 李晓娟,白晓晖,陈家旭,等. 中医动物模型研制方法及展望[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(7):2263-2266.
- [7] 梁茂新,范颖. 中医证和病证结合动物模型研制的利弊与症结[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2013, 15(7):1656-1663.
- [8] 吴健宇,穆静,李仪奎. 血清药理实验中异种动物血清对细胞的毒性作用和灭活后的减毒作用[J]. 中国药理学通报, 2000, 16(1):118-119.
- [9] 朱晓骏,孙学华,刘顺庆,等. 灵猫方抑制饥饿诱导 HepG2. 2. 15 细胞自噬研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(4):499-503.
- [10] 邱华,陈月桥,石清兰. 白花苣荬解毒方对 HepG2. 2. 15 细胞 HBV 表达和复制的影响[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(12):3228-3230.
- [11] 王礼凤,李长秦,冯海杲,等. 新加达原饮对 HepG2. 2. 15 细胞表达 HBsAg、HBeAg 的影响[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(7):1604-1605.
- [12] 吴晓燕,丁永芳,朱方石,等. 乙肝健及其含药血清对 HepG2. 2. 15 细胞 HBsAg 和 HBeAg 的抑制作用研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(3):629-631.

(收稿:2016-01-20 修回:2016-06-01)