

出國報告（出國類別：實習）

赴美國南加州大學肝炎中心研習肝病 變診療研究之最新發展及技術

服務機關：核能研究所

姓名職稱：王屏燕 研究助理

派赴國家：美國

出國期間：100年8月30日~100年10月16日

報告日期：100年11月17日

摘要

本次出國主要的實習目的在學習肝病變動物模式技術，以及肝病變診療之最新方向。實習地點位於美國加州洛杉磯市，南加州大學肝炎中心 The Southern California Research Center for ALPD & Cirrhosis，該中心接受美國境內以及其他國家之實驗室委託，進行多種肝病動物模式研究，經驗豐富。其中酒精性脂肪肝動物模式(Tsukamoto French Model)更是獨步全球。此行實習的內容包括 (1) 學習小鼠胃內灌注技術，建立小鼠酒精性脂肪肝動物模式。(2) 初代非實質肝細胞分離技術及經驗。本次實習所學之技術可應用於本所肝病變診療劑之開發及相關技術服務等，並有助於本所生技製藥國家型計畫之推動以及對外爭取經費之利基。

目次

一、目的	3
二、過程	4
三、心得	5
四、建議事項	12
五、附圖、附表及附錄	14

一、目的

肝衰竭、肝硬化與肝癌是國人重大死因，在全球也是極受重視之疾病，無論就診斷或治療，均亟待新的研究發展，以提供臨床上之需求與應用。Hidekazu Tsukamoto 教授領導美國南加州大學肝炎中心，有中、美、日、台跨國際之肝病研究合作案在執行。本次前往該中心研習，可獲取各國在肝病變診療之最新發展及研究現況，對本所肝病變診療極具助益。

本次出國實習目的在學習肝病變動物模式技術，以及肝病變診療之最新方向。實習地點位於美國加州洛杉磯市，南加州大學肝炎中心 The Southern California Research Center for ALPD & Cirrhosis，該中心接受美國境內以及其他國家之實驗室委託，進行多種肝病動物模式研究，相關經驗十分豐富。其中酒精性脂肪肝動物模式(Tsukamoto French Model)更是獨步全球。此行實習的內容包括 (1) 學習小鼠胃內灌注技術，建立小鼠酒精性脂肪肝動物模式。(2) 初代非實質肝細胞分離技術及經驗。肝病變動物模式及各類肝臟細胞的分離培養，為研究及開發肝病變診療藥物不可或缺之技術及資源。借助南加大的肝病研究中心在肝病基礎研究、肝病動物模式以及初代非實質肝細胞分離技術等豐富之經驗，有助於本所建立相關藥物研發、篩選、療效評估及技術服務所需之技術平台，並藉本次參訪研習增進本所基礎研究之能量及未來雙方技術交流與合作。

二、過程

本次實習行程如下:

日期	星期	地點	內容
8月30日	二		去程: 桃園至美國洛杉磯市
8月31日 9月21日	三 三	洛杉磯	Animal Core(動物中心)
9月22日 10月14日	四 五	洛杉磯	Non-parenchymal Core(非實質細胞中心)
10月15-16日	六-日		回程:美國洛杉磯市至桃園

三、心得

1. 胃內灌注動物模式—酒精性脂肪肝動物模式

脂肪肝，肝細胞含脂肪重量達 5%以上時稱之。近年來國內成年人口脂肪肝盛行率高達 26-34%。脂肪肝可分為酒精性及非酒精性，酒精性脂肪肝起因於飲酒過量，非酒精性脂肪肝則多與肥胖、糖尿病及代謝疾病等相關。近來研究顯示，有相當比例酒精性及非酒精性脂肪肝會發展為肝纖維化、肝硬化甚至是肝癌。為進行相關的酒精性或代謝性肝病的藥物研發，胃內灌注的動物模式可充分發揮其特性，尤其對於研究多病因之代謝性疾病，以及小鼠對酒精的攝取。其原因在於使用胃內埋管的方式，小鼠所攝取的營養成分以及攝取量都可獲得完全的控制，只需將食物都轉換成液態的形式。這對於研究肝臟疾病有很大的幫助，因為許多肝臟疾病都是多因子的代謝性疾病，透過胃內埋管可進行任意單一因子的研究，並維持其他因子不變。可謂是研究代謝性疾病的利器。另外，藥物或是酒精的攝取在許多實驗當中，無法透過任意攝取的方式，使動物達到致病所需之攝取量。特別是酒精，無法以單一大量的方式投與，而必須持續慢慢地給予，才能維持小鼠的生命，並且小鼠本身對酒精的排斥反應，使之無法透過自然地攝取來達到實驗所需之攝取量。所以，胃內灌注的方式是建立酒精性的肝病變動物模式，不可或缺的重要技術。

胃內灌注模式由於至少需維持胃內的埋管四周，所以許多的細節都變得非常重要，並非只要胃內埋管的手術技術良好即可。從術前 catheter 的製作，液態 Diet 的配製，到手術的操作以至於術後恢復及給予酒精及 Diet 後的動物行為監控，都是環環相扣，只有每一個細節都注意到，才能順利地進行實驗，有的缺失可以事後彌補，但有的缺失像術中胃最後的置放位置，如果不佳則動物會死亡，且在屍解的時候才能明白動物的死亡原因。因此每一個步驟有缺失都可能會造成動物的死亡，都需詳加注意。

首先談到 catheter (結構如圖 1.) 的製備，由於埋管在胃部所以 catheter 的材質很重要，他們是選用 silicone，特別在進入胃的部分是具彈性及柔軟的材料 (如圖 1. f)，並且從胃部到背部的距離依據老鼠的體重有一定的距離(以體重 26g 的小鼠而言，是 33mm)，並利用加熱的方

式來製造理想的彎角，使得老鼠在埋管的情況下仍能自由活動，不會被管子限制或拉扯。爲了避免管子因老鼠的活動而扭轉，動物中心特別選用輕量的鐵絲固定在管子的外側（如圖 1. d），減輕老鼠的負擔又達到維持管子通暢的目的，然而鐵絲的固定並不容易，因爲固定的材料是 silicone（如圖 1. c）透過泡在氯仿管徑會短暫變大，操作需靈巧快速。另外一個避免管子纏繞的巧思是圖 1. a 及圖 2. a 的 swivel（透過軟木塞固定於固定架上），她可以 360 度旋轉，使得小鼠可各方向移動。導管的保護裝置還有最靠近老鼠背部的尼龍管，可避免導管被老鼠啃咬，產生液漏。導管在 catheter 的底端及彎曲部，各利用膠水固定住一塊圓型（圖 1. g）及水滴型（圖 1. e）的 Dacron 以利導管縫合在胃部及背部。膠水的使用也需注意太多會不利手術中的縫合。換言之，好的 catheter 是手術成功的根本。在 swivel 的上方需接上不鏽鋼的 Y 型管（圖 2. c），並連接 silicone 導管（圖 2. d）、adapter（圖 2. e）和針筒，至於整體的裝置實圖則如圖 3。連接的這些耗材看似很小但單價都不便宜，而且是耗材。導管製作完成後還需要進行滅菌，才能避免手術的感染。

手術的部分需注意基礎的無菌操作，才能避免術後腹腔內的組織沾黏，影響消化系統正常運作。麻醉的部分始採用液體麻醉 ketamine 與 xylazine 並用，好處是較液麻更能在手術中翻轉動物，達到有利的操作角度。麻醉時深度需控制的恰到好處，以利術後的甦醒。手術操作方面，皮下的鈍撥需完全才有助於在正確的位置做肌肉層的開口，但也不宜過度才能使導管在胃部的背側有一個角度，使導管容易維持，不易脫出。再暴露胃部時需避免肝臟受傷，胃部的提拉也有特定的位置才不會受損，這同時也是胃部造口及縫合的位置。再縫合 Dacron 時要將 Dacron 吸收的血液及組織液用紗布吸乾，才不會在術後三周以後出現胃部的膿瘍。埋管完成後，需將胃置放於脾臟上方及肝臟下方，擺放的位置很重要，才不會對脾臟造成不當的壓力，引發脾臟缺血及多重器官衰竭。背側的 Dacron 前方的部分需縫合在肌肉上，因爲拉力較大縫合在肌肉上可避免 Dacron 滑脫，在未來需進行緊急的補救手術。皮膚的縫合需要比一般的手術間距更小，才能快速癒合。術後利用 Buprenorphine 做術後的止痛，不過有時會出現小鼠對藥物過於敏感而死亡的案例，所以在無法損失任何動物的實驗中可考慮不要使用。

利用手術後，小鼠進行術後恢復的一周內可進行高脂肪液態食物（HFD, High Fat Diet）的製備。一般需要兩個人及三天的時間來製作，相當耗時。製備的部分主要分爲三部分，所有的成分如表 1。第一部分爲十種礦物質溶液的製備，注意 Ferric ammonium citrate 需要避光，而 Potassium phosphate 不易溶解，冷卻後會沉澱，所以要使用時需再加熱。

配製好的礦物質溶液在 4°C 可存放 2 個月。第二部分為溶解表 1. 的 solution A 和 solution B（這兩個溶液主要提供蛋白質和醣類）然後放置 4°C 冰箱隔夜。第三部分為最後的混和步驟，注意礦物質溶液的加入順序需依照表 1. 的順序，才能順利的溶解。最後加入玉米油等需利用攪拌器（如圖 4.）並依攪拌器的容量去等分溶解。過濾後置放 4°C 冰箱隔夜，隔天再進行氣泡的吸除（如圖 5.），然後保存於 -20°C 冰箱，要用時再解凍，以保持 HFD 的新鮮。

小鼠術後的恢復期是 1 周，以利胃部的傷口癒合及未來的胃內灌注。在恢復期是給予一般的飼料，並給予築巢的材料，小鼠的體力恢復便會開始築巢，可視為恢復的指標。另外術後的當天即應排便及排尿，表示消化及代謝都正常。一周後視動物恢復狀況進行分組，狀況好的為實驗組，恢復較差的為對照組。實驗組給予酒精，對照組則給予相同濃度的葡萄糖溶液，給予的濃度參見表 2.。原則上前三周的餵食計畫都依照表 2.，之後的餵食濃度則需參考動物對劑量的反應。

在酒精灌注的實驗當中，小鼠對酒精的中毒反應需仔細地評估，一天至少需進行 3 次。小鼠對酒精的反應需詳加監控，才能使小鼠酒精的攝取量達到實驗的要求，而又不造成小鼠的死亡，導致實驗提前終止。因此小鼠的行為觀察顯得格外重要，攸關實驗是否能達到所需程度的肝臟病變，又必須兼顧維持動物的生命。動物對酒精的毒性反應可分為 -1~4 級。-1 級是給予動物的酒精突然停止後發生的，通常是因為管路阻塞造成的，可以見到動物的身體及尾巴顫抖，反應敏感，如出現跳躍動作等，此時需馬上給予酒精，有時可給予 bolus。0 級是動物未出現明顯毒性反應，當用手接觸時會嘗試逃跑。1 級是動物對接觸的反應稍微變慢，有時在實驗後期尤其是白天可不作處置再作觀察。2 級動物的後肢明顯不協調但仍能移動，但移動方式會由籠子的一角至另一角。此時應將針筒內的酒精拿出 0.4~0.6ml 並持續觀察。3 級是動物只有前肢能動後肢則無法使用，此時可減少酒精 0.6~0.8ml 或完全停止幫浦並詳細觀察，直到動物回復至緩慢移動再開始幫浦，開始時先給予 diet 1 小時再開始給予酒精，避免空腹給予酒精。此級的死亡率也很高。4 級時動物完全無法移動，且常有低體溫的現象，此時非常容易死亡。處置上應馬上停止幫浦，對動物進行保溫，並將胃內的酒精先抽出給予少量生理食鹽水，必要時可皮下給予溫熱的生理食鹽水。回復給予酒精的方式和 3 級相同。

四周後，動物中心會依客戶的需求，進行動物的犧牲及採樣，通常包括肝臟及體重比（通常對照組在 0.04 左右，實驗組則明顯肝臟變大），

並採集肝組織進行固定並送病理切片，剩餘的肝臟則做冷凍包埋及歸檔，以應付可能的實驗需求。另外也採集血液，進行 ALT 及 BAL (blood alcohol level) 的檢驗 (如圖 6.) 一般而言，ALT 的數值在第四周會達到 250 dl/L 以上，並出現肝臟的纖維化。BAL 則要達到 300 以上，才表示動物有達到所需的酒醉程度。相關數據如表 3.

2. 非實質初代肝細胞分離技術

肝臟的實質細胞為肝細胞 (hepatocyte)，佔肝臟組織的 70%，而肝臟的非實質細胞則包括：血竇內皮細胞、kupffer 細胞、陷窩細胞 (pit cell) 及肝臟星狀細胞 (Hepatic stellate cell)，占肝容積的 5%，占所有細胞數的 30%。其中肝臟星狀細胞占肝臟固有細胞總數的 15%，占非實質細胞的 30% 左右。它們存在於 disse 腔中，呈梭形或多邊形，胞漿內有多個富含維生素 A 的脂滴，其細長的突起向外延伸環繞在血竇內皮細胞外面。在正常肝臟中，星狀細胞 (處於靜止狀態) 不表達 α 平滑肌肌動蛋白 (α sma)，增殖活性低，合成膠原能力低，其主要功能是貯存視黃醛類 (體內 40%-70% 的視黃醛類都存在於其中)。非實質細胞對於調節肝臟代謝及免疫的相關功能，至關重要。

在南加大肝炎中心的非實質細胞中心 (Non-parenchymal Core)，初代細胞分離的技術是利用體內原位循環灌流的方式，將肝臟中的血液帶出之後，再灌入鏈黴蛋白酶及膠原酶將肝組織進行消化，取得細胞後再利用梯度分離的方式，分離各類細胞。

為取得不同種類的細胞，在選擇老鼠上也會有不同的考量，對於肝實質細胞，老鼠的年齡並不影響細胞的取得，但在非實質細胞，如要取得 kupffer cell 以 B6 小鼠為例，小鼠需達 8 周齡。對於星狀細胞 (HSCs)，則至少是 10 到 12 周，體重至少是 27 克以上。至於大鼠，體重需至少達 450g 以上。星狀細胞之所以需要周齡大的小鼠，是因為周齡大的小鼠其星狀細胞含有較多的維他命 A 脂滴。利用其低密度的特性，容易與其他的細胞分開，分離到較多的細胞。

插管是決定體內原位循環灌流及肝組織消化的成敗，而在插管後以絲線固定可防止針管移動和滑脫，同時防止灌注液的流失和停止灌注時腸系膜上靜脈及脾靜脈的血液回流，是在體灌注順利完成的關鍵。大鼠及小鼠灌流之位置在非實質細胞中心是採用不同的位置，大鼠灌流的位置在門靜脈，小鼠則在下腔靜脈 (如圖 7.)。插管時須留意靜脈留置針是否排盡空氣，且在灌注過程中不能有任何的氣體進入到肝臟中，以防止血管空氣栓塞導致灌注不全，影響組織消化及細胞的分離，這一點是

非常重要的。因此，灌流的系統設計在插管成功後，對於能否成功取得細胞，有極大的影響。在灌流管的設計上，必需有緩衝系統，因為當更換消化液和灌流液時會有氣體產生，緩衝系統的設計可使產生的氣體做一個暫存，不至於直接進入血管及肝臟，氣體的進入會造成很大的破壞，無法取得健康的細胞，所以在灌流的過程中，操作者也必須一直關注這一點。另外由於大鼠及小鼠的灌注量不同也需設計不同的灌注系統，小鼠的系統如圖 8；大鼠的系統則如圖 9。利用幫浦及管路系統（如圖 10。）做灌流循環雖須注意每次的清潔避免汙染，但對於消化溫度則便於利用水浴槽來控制，溫度控制對於組織消化及細胞取得是另外一個重點。例如為取得星狀細胞水浴的溫度適宜在攝氏 47 度左右，而肝細胞(hepatocyte)則須在攝氏 37 度有相當顯著的不同及影響。

非實質細胞中心 (Non-parenchymal Core) 在肝臟的消化上有一個很聰明且節省的技巧，就是消化液的回流使用。在小鼠上，是利用 50ml 離心管承接的方式（如圖 11），將流出的消化液進行回收，並再次注入灌流系統。回流的消化液不僅是有節省的好處，在消化程度的控制上便不會侷限在原先消化液配置的量，而是可以利用回流的消化液去增加消化的時間，便於應付灌流中的不確定因素，以及不同小鼠的個體差異。意即利用消化時間來控制消化的程度，而不是一開始消化液所配置的量，在使用上更具彈性，更容易因應當下的狀況做立即的調整。在大鼠方面，則是利用肝門靜脈灌流，下腔靜脈插管回流的方式，因為大鼠肝臟面積較大無法使用離心管來接消化液。在插管灌流時，另外有一個很重要的因素是時間，從插管完成到利用絲線將留滯針固定，並開始灌流及剪斷腎臟下方之下腔靜脈血管最好能在 30 秒之內完成。灌流開始即剪斷血管始灌流液流出，灌流及剪血管兩者應同步，千萬不可使灌流液充滿肝臟並膨脹肝臟，會造成細胞的傷害。

在取下充分消化的肝臟後，再加入 DNA 酶可有效減少細胞懸液中的絮狀物，絮狀物會網羅大量的細胞，一點點的絮狀物就可以網羅 10^6 以上的細胞，會明顯使得取得的細胞數量減少。所以 DNA 酶的活性需保持穩定，或是當活性下降時使用的量要增加。

取得細胞懸液後，先利用慢速離心，死亡破損的肝實質細胞會在下層的 pallet，上層細胞懸液則是非實質細胞。將細胞懸液利用梯度液及超高速離心可分離 kupffer 細胞和星狀細胞。不過原則上 kupffer 細胞和星狀細胞消化的條件不盡相同，星狀細胞需要較高的消化程度，換言之星狀細胞若得的多，相對的 Kupffer 細胞就得的少，因為兩者取得的條件不同，魚與熊掌不可兼得。在梯度液的製備上，非實質細胞中心 (Non-parenchymal Core) 有其獨到的配方，是利用 OptiPrep 梯度液與

BSKG 液兩者互相調和，並透過比重計的配製比重 1.03、1.04 及 1.08 之梯度液。由重至輕（比重 1.08~1.03）依次加入梯度液於高速離心管，須慢慢加入不可攪亂分層（如圖 12.），最後在加入細胞懸液於最上層（如圖 13.），之後小心置入超高速離心機進行梯度分離。一般正常非疾病模式小鼠星狀細胞較輕，在超高速離心後位於 1.03 的分層；kupffer cell 則位於 1.04 之分層，如圖 14。分離後可以見到兩種細胞顏色上的不同，肉眼上即可分辨。星狀細胞的顏色淡，kupffer cell 顏色深如圖 15。實際上有時 kupffer 細胞和星狀細胞比重上有所重疊，會降低分離的純度。因此，必須在顯微鏡下確認不同梯度液中的細胞型態，是否是想要的細胞，如果不是的話，需進一步確認每一層的細胞，必要時再次進行梯度分離及超高速離心。不過通常 kupffer cell 會跑到較輕的一層意味細胞本身可能有損傷，只要 kupffer cell 在星狀細胞層 kupffer cell 的比率不高（即星狀細胞存度 85%以上），通常在培養後 kupffer cell 不會貼壁，以培養液沖洗後可以移除之。

細胞分離的結果，在使用小鼠及 pronase 450mg 的情況下，可得肝星狀細胞 HSC 得率為 $(3\sim 5)\times 10^7$ 個，HSC 存活率在 95%以上，純度在 90%以上，体外培養 14 d 后活化的 HSC 純度几乎達 100%。新分離的肝星狀細胞含有豐富的脂滴，細胞透光度增加。由於脂滴內含維生素 A，可利用自發螢光鑒定：螢光顯微鏡下觀察，在 328nm 波長的紫外光激發下，能發出藍綠色的自發螢光，但在數秒內迅速減退（如圖 16.）。新分離未貼壁的活肝星狀細胞胞漿中含較多脂滴，呈透亮、折光性很強的球形、圓形細胞，遠小於肝細胞。細胞核位於細胞正中，細胞邊界輪廓清晰。培養 24h 可見細胞貼壁，呈扁圓形，部分細胞開始伸展。48h 後已呈現出星狀外形的典型表現（如圖 17.）。7d 後細胞逐漸開始融合、變長、分裂、增殖，形態向纖維樣細胞發展，但胞體仍較大，細胞漿內折光顆粒減少，部分細胞融合成片狀。另外，Kupffer cell 的得率則為 $(3\sim 5)\times 10^7$ ，細胞的存活率和純度和星狀細胞的結果類似。新鮮分離的 kupffer cell 呈圓形，細胞核大，細胞質少，折光性較強，遠小於肝細胞，接種 1 h 後少部分細胞已貼壁（如圖 18.）；培養 24 h 後，多數細胞已伸展；培養 48 h 後，絕大多數細胞已貼壁，且充分伸展，可見星形或不規則形（如圖 19.）。

細胞的培養則用含 10%胎牛血清的 DMEM/ Low glucose 完全培養基稀釋細胞懸液。以 $1\times 10^5\sim 1\times 10^6\text{ ml}^{-1}$ 的密度接種到 50ml 塑膠培養瓶中，在 37°C、體積分數為 5%CO₂、95%潮濕空氣的 CO₂ 恆溫培養箱裏培養。培養瓶內細胞 24h 後首次換新鮮 DMEM/ Low glucose 培養液，以後每 3d 換液 1 次，培養液仍使用含 10%胎牛血清的 DMEM/

Low glucose 培養基。

透過在非實質中心的實習，可以歸納影響初代細胞得率影響因素主要有以下幾點：(1) 插管灌注良好與否是影響細胞得率的關鍵；(2) 應掌握好合適的灌注壓，充分的灌流使肝組織內的血細胞、肝內免疫活性細胞以及其他雜質沖洗得較為乾淨，減少了上述雜質的存在對肝星狀細胞的純度、活率及體外培養所產生的不良影響。因此，灌流幫浦及其使用的灌流管管徑的選擇需要注意，另外插管所使用的靜脈留置針的粗細也很重要(3) 肝臟原位酶消化是否適度，是影響細胞得率及活力的關鍵因素。如消化不充分，肝細胞大量存在，則會影響星狀細胞的純度。因此，須保證門靜脈插管良好，消化酶通過門脈系統均勻地作用於肝組織，可提高酶的使用率。消化不完全時，難以獲得完全的單細胞懸液，含有細胞的組織被濾網濾除或離心時丟失，細胞不純會進一步影響細胞的貼壁。(4) 在灌流前於門靜脈注入一定量 Heparin，以及灌流液中加入的 EGTA，可有效使的血液抗凝並血管擴張，可使的灌流更加完全及均勻，而得到良好的消化效果。(5) 用鏈黴蛋白酶消化後，細胞懸液中很快出現絮狀物。絮狀物中會網路較多細胞，影響離心過程中細胞的分離。加用 DNA 酶能有效防止絮狀物的形成，提高細胞得率；(6) 密度梯度離心分離 HSCs 時，盡可能少吸取細胞層界下液體，否則會夾雜 Kupffer 細胞，影響星狀細胞的純度。除以上各點外，尚有許多因素均可影響肝星狀細胞的分離效果，如肝星狀細胞分離過程的無菌程度、門靜脈或下腔靜脈插管是否順當、肝臟本身的品質、離心的速度以及環境溫度等，這些都應予以注意。

在本次為期 48 天之實習後，USC 的肝炎中心頒發一份動物模式建立及非實質肝細胞分離之受訓證明(圖 20.)。

四、建議事項

胃內灌注的動物模式如前面所提儀器及耗材的費用相當可觀，因為要進行胃內埋管使用的材質成本較高，且一隻動物便需要一台幫浦，儀器的費用也因此提高，另外還必須由人工的方式去維持埋管的可用性，人力成本也需考量。空間方面，如果要建立胃內灌注的動物模式，須有獨立一間的動物房，才能方便管理及監控，且籠具需使用裸鼠籠，相關用品需另外添購，才能符合使用需求。

由於在實驗的初期，需進行大量的手術，每一隻進行手術的時間至少需要約 40 至 50 分鐘，並且初期建立會有一定的損失量。意即施術者一天能進行手術的量很有限，且初期不熟悉時術後又有一定的死亡率。故達成同一批次建立生物體分布試驗所需的量會有困難，可行的辦法就是分批次來進行，但是幫浦的數量依然需要 20 至 40 台。

就造影的部分來考量的話，酒精性脂肪肝的動物模式，無法在餵食酒精的實驗過程中進行造影之後還能存活，原因是小鼠長期攝取酒精，一旦停止給予會有 withdraw syndrome，小鼠會死亡可能無法完成造影或無法進行重複的造影。因此可以造影的時間可能是實驗終止時。不過經過四周的酒精攝取，長期慢性酒精中毒的小鼠，很有可能經不起麻醉而在造影過程中即死亡。換言之，投入的多，但是可能得到的數據很有可能並不足以分析並得到可靠的結論。

另外在人力的方面，酒精性脂肪肝動物模式，需每天進行埋管的沖洗及 wiring、Diet 及酒精的更換、一天三次包括夜班的動物觀察等等，如需建立此一動物模式，至少需三至四名的人力，且其中兩人必須是全職負責，人力的使用度上相當高。如果因應人力成本的降低可以考慮埋管技術的其他應用，如利用於其他飲食或藥物的攝取，但是似乎又造成使用埋管技術的必要性明顯不足。因為飲食的部分可利用固態的飼料去給予，許多實驗用的特殊飼料都已有商品化的產品且是固態的，可採任食的方式，不須手術埋管。藥物的部分也可採灌喂單一劑量給予的方式，也可不需經手術埋管。

就我學習此模式的體會是，這是一個專一應用於必須給予動物持續的液態物質(像酒精)的一種技術。此一動物模式的確是一個技術性很高

的動物模式，為因應酒精性脂肪肝的動物實驗卻有其必要性。但是還需考量此一模式及技術的相關優缺點及必要性，配合經費使用上的考量，來建立此動物模式。

肝星狀細胞 (hepatic stellate cells, HSCs) 是肝臟的一種非實質細胞。肝損傷所致 HSCs 的啟動、增殖與轉化是肝纖維化過程的中心環節，而肝纖維化是可逆的創傷修復反應。是所有肝臟疾病末所以 HSCs 成為研究肝損傷後纖維化形成的中心環節。肝纖維化是肝星形細胞 (hepatic stellate cells, HSC) 在組織炎症壞死區域向肌成纖維細胞 (myofibroblasts, MFB) 轉型的啟動過程。活化後的 HSC 不但產生大量細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 成分，而且抑制 ECM 的降解，促進肝竇毛細血管化 (sinusoid capillarization)。體外培養的 HSC 為肝纖維化的研究提供了良好的細胞模型。但是由於目前沒有市售的細胞系，因此建立一種高純度、高效率的 HSCs 的分離方法就成為肝纖維化研究的關鍵所在。因此，我們可利用在非實質肝細胞中心所習得之相關經驗，先建立正常小鼠的肝非實質細胞的分離技術，並更進一步利用本所已建立之 TAA 肝纖維化小鼠動物模式進行初代星狀細胞的分離試驗。若能成功分離出較正常星狀細胞（處於靜止狀態）更為活化之星狀細胞，且細胞的活性、純度及數量都能達到相當的水準，則能為肝纖維化研究提供很好得材料，成為機制探討或藥物篩選等的應用基礎。

在正常肝臟中 HSC 與其它非實質細胞浮力差異是密度梯度分離的基礎。HSC 之所以難以分離，主要是因為其比重範圍與 kupffer 細胞有交叉，且易與肝細胞相吸附。體重 500g 以上的老年大鼠肝臟中 HSC 含有較多的維生素 A 脂質，依據其低密度的性質，在 HSC 分離和純化中可以獲得更多細胞數量，因此動物應該選擇老的大鼠。由於 HSC 的損傷和活化可使胞質中脂滴丟失，增加細胞密度，從而使 HSC 的分離和純化的條件改變。因此，肝纖維化模型動物所需更多的消化，另外再梯度離心的分層當中，肝纖維化模型所取得的細胞比重較正常的細胞重，此時應適當的增加梯度的分層，如比重 1.05 的分層，或藉由分離之經驗去了解細胞纖維化後的比重，因為不同纖維化程度的小鼠模式，細胞分離的條件、細胞的比重也會不同。透過細胞分離的經驗及經驗累積使各個條件適合應用於纖維化鼠 HSC 的分離和培養。

五、附圖、附表及附錄

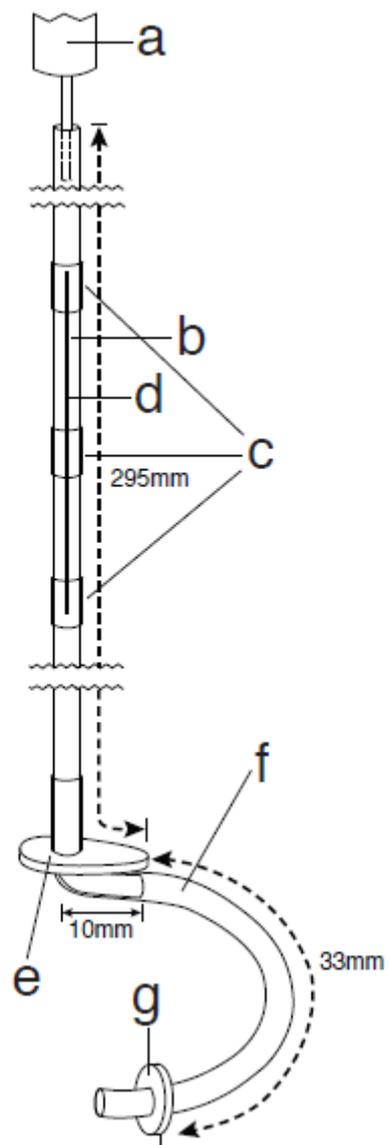


圖 1. catheter 之結構

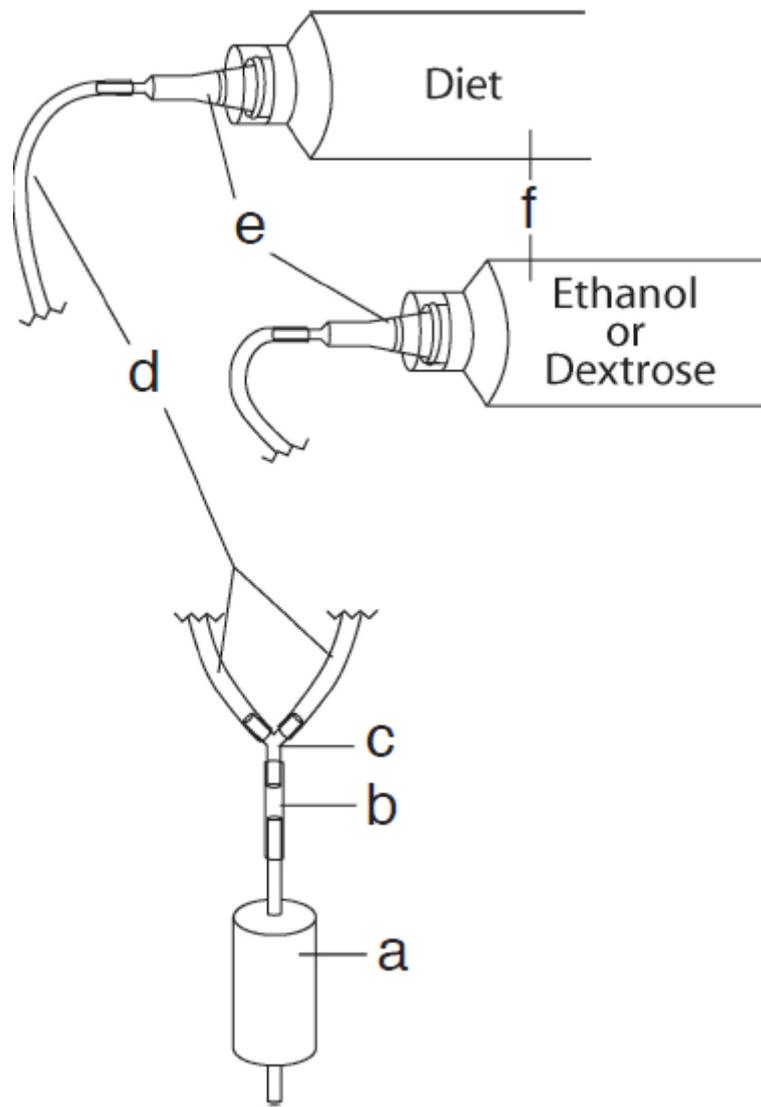


圖 2. 連接裝置



圖 3. 實體裝置圖



圖 4. 攪拌器



圖 5. 氣泡吸除



圖 6.血中酒精濃度檢測

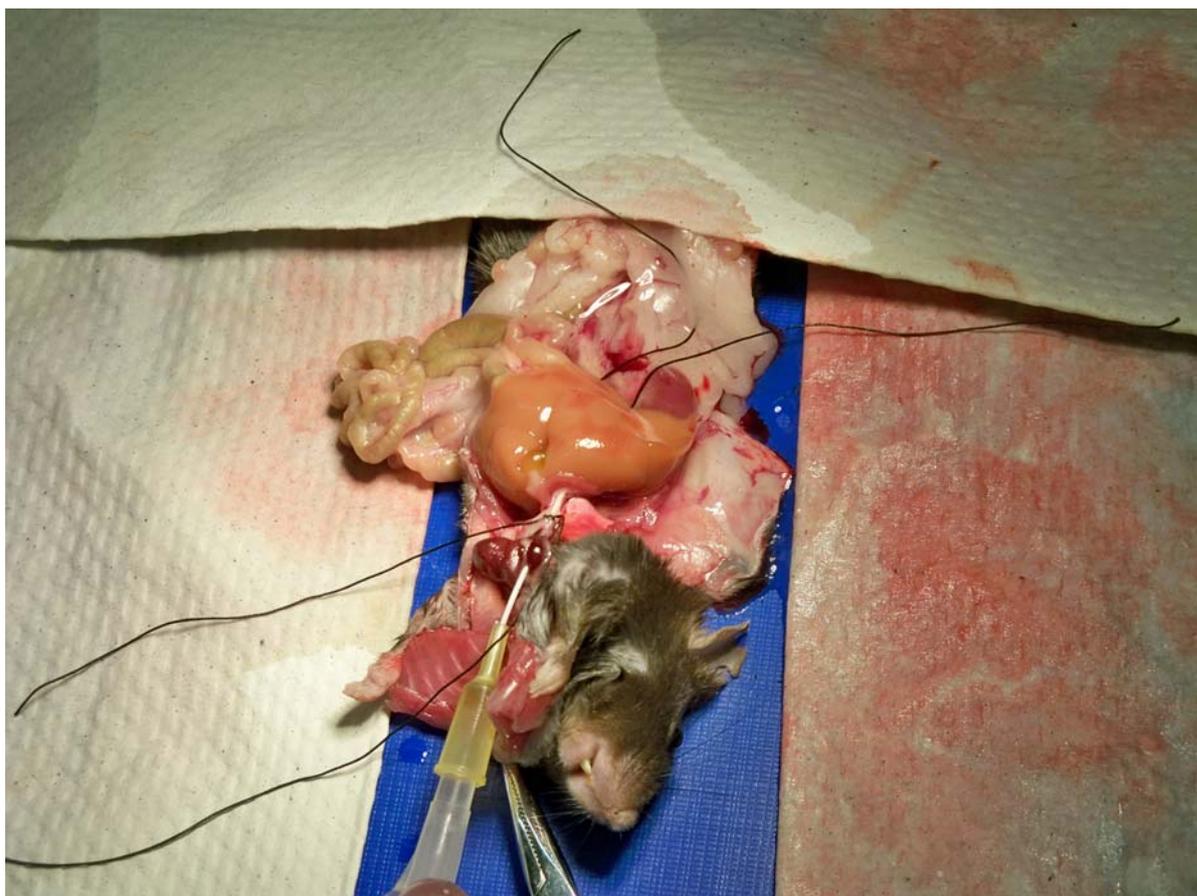


圖 7. 小鼠插管灌流



圖 8. 小鼠灌流導管系統

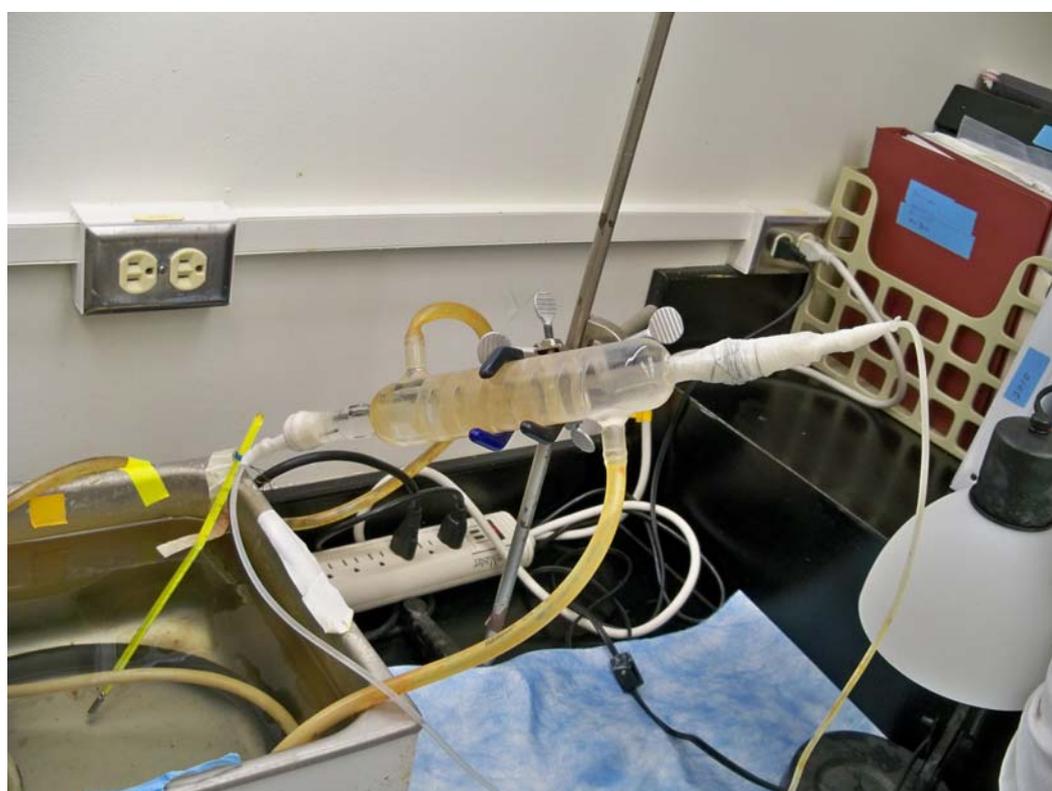


圖 9. 大鼠灌流導管系統



圖 10. 幫浦及水浴系統

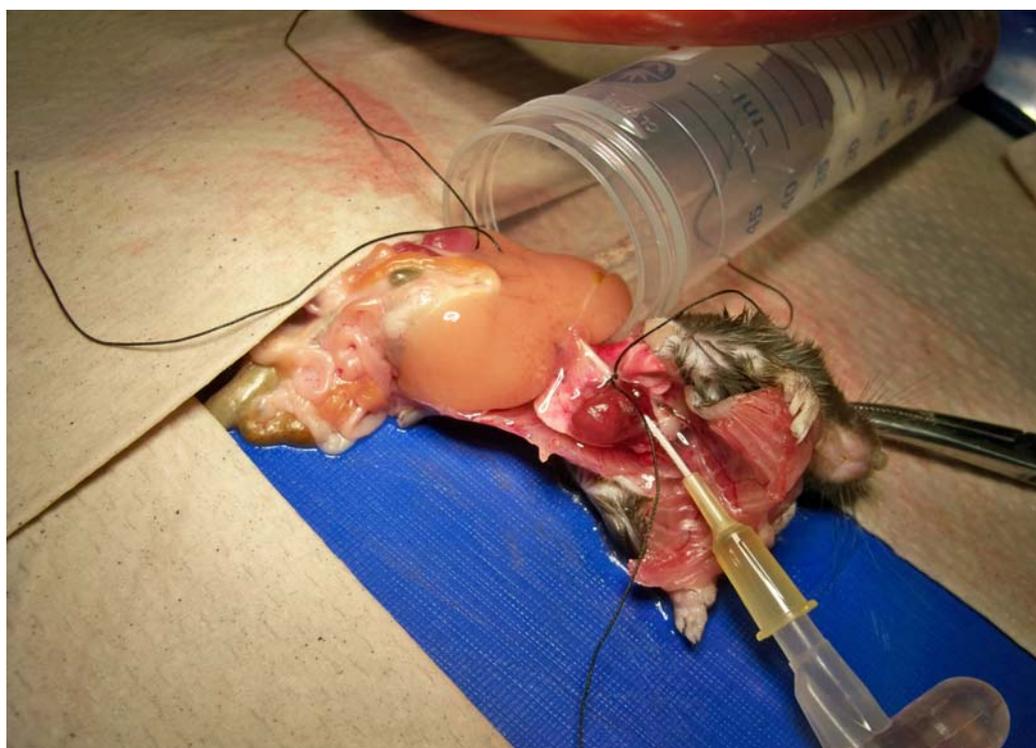


圖 11. 灌流液接管回收



圖 12. 依比重緩慢加入分層液

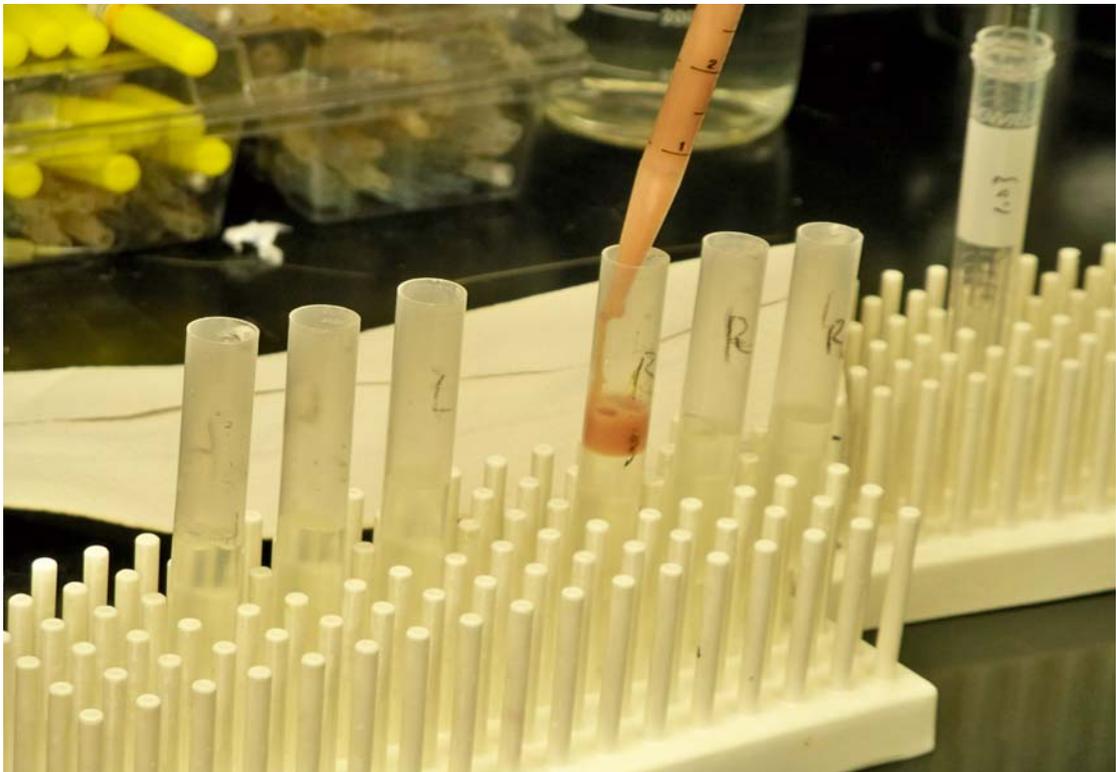


圖 13. 最上層加入細胞懸液

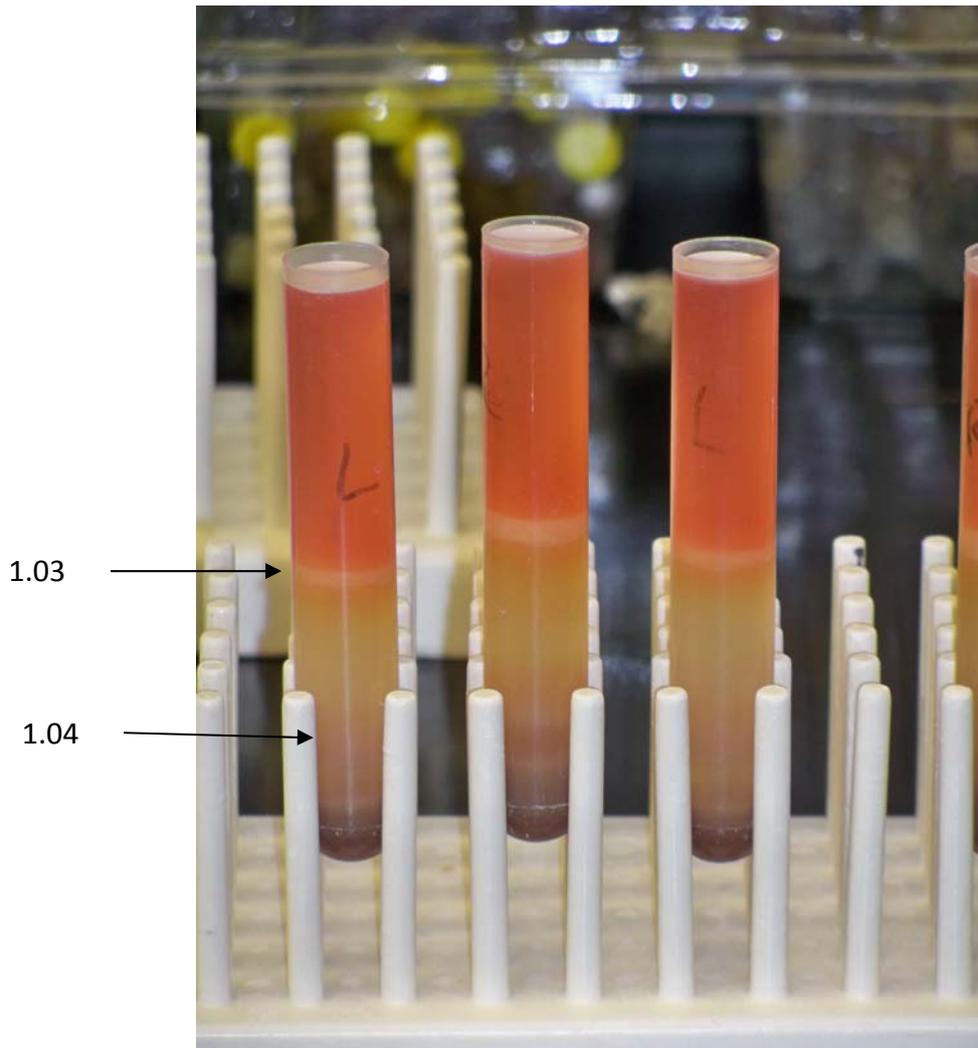


圖 14. 超高速離心後細胞分層



圖 15. 左邊兩管為星狀細胞, 右邊兩管為 kupffer cell

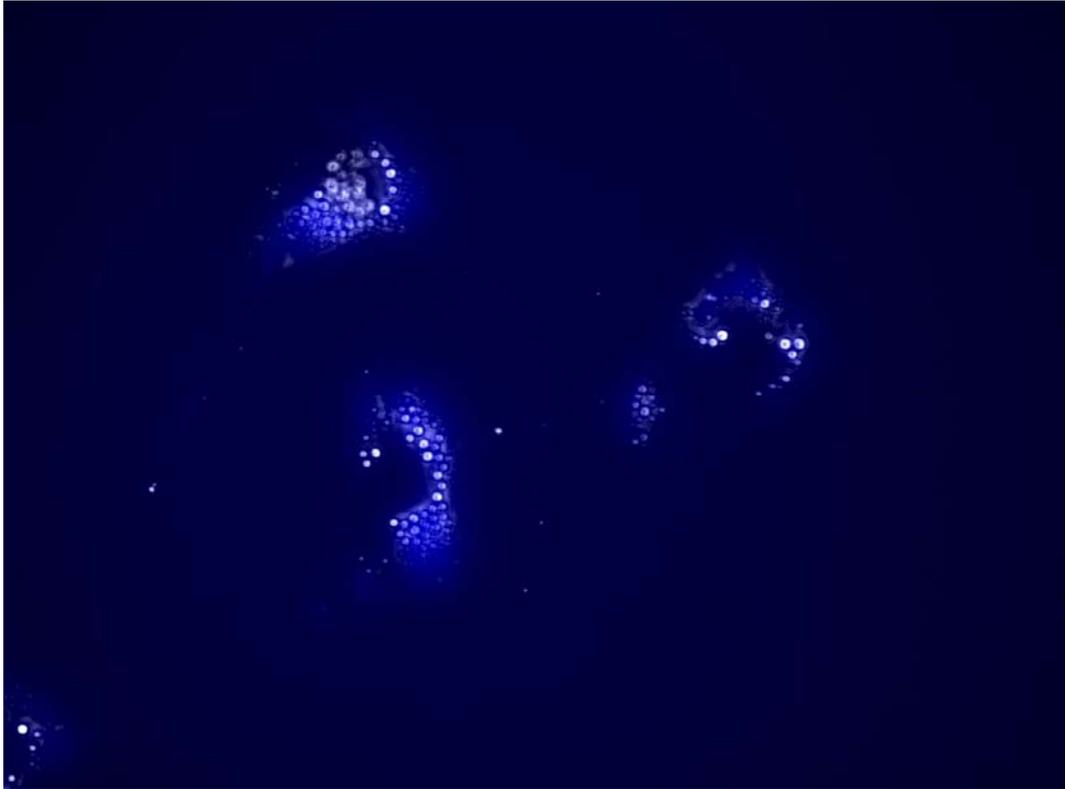


圖 16. 星狀細胞之脂滴及自發螢光

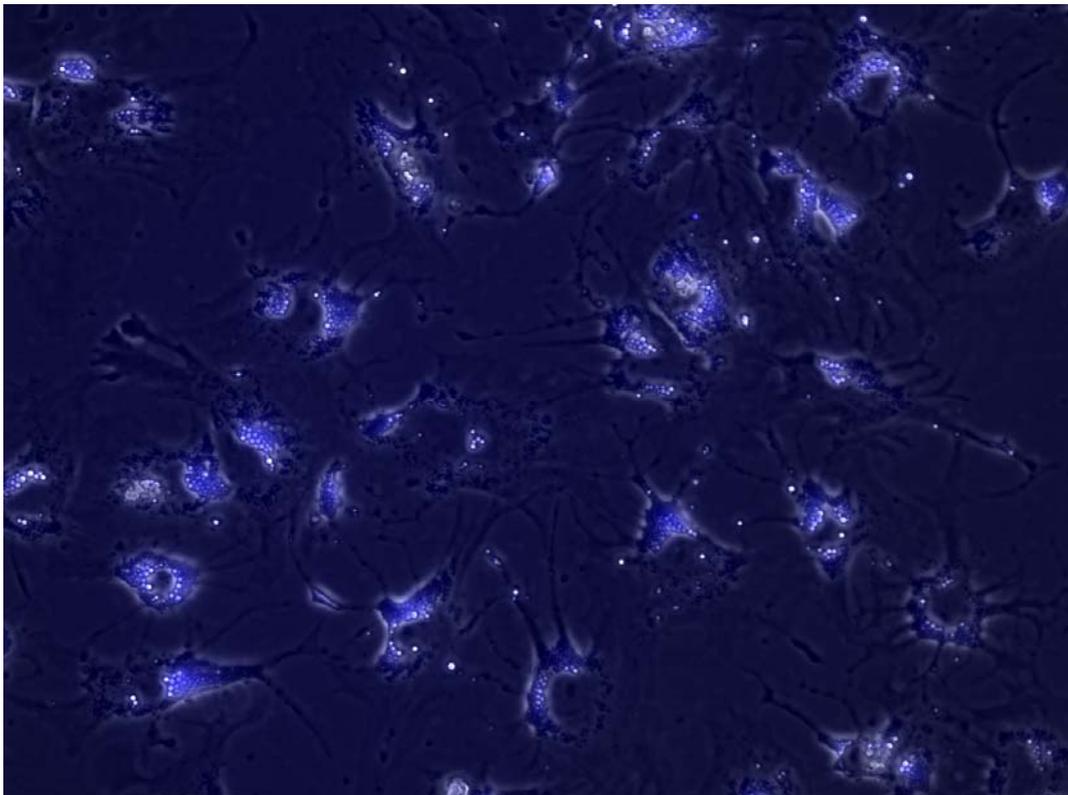


圖 17. 星狀細胞典型型態

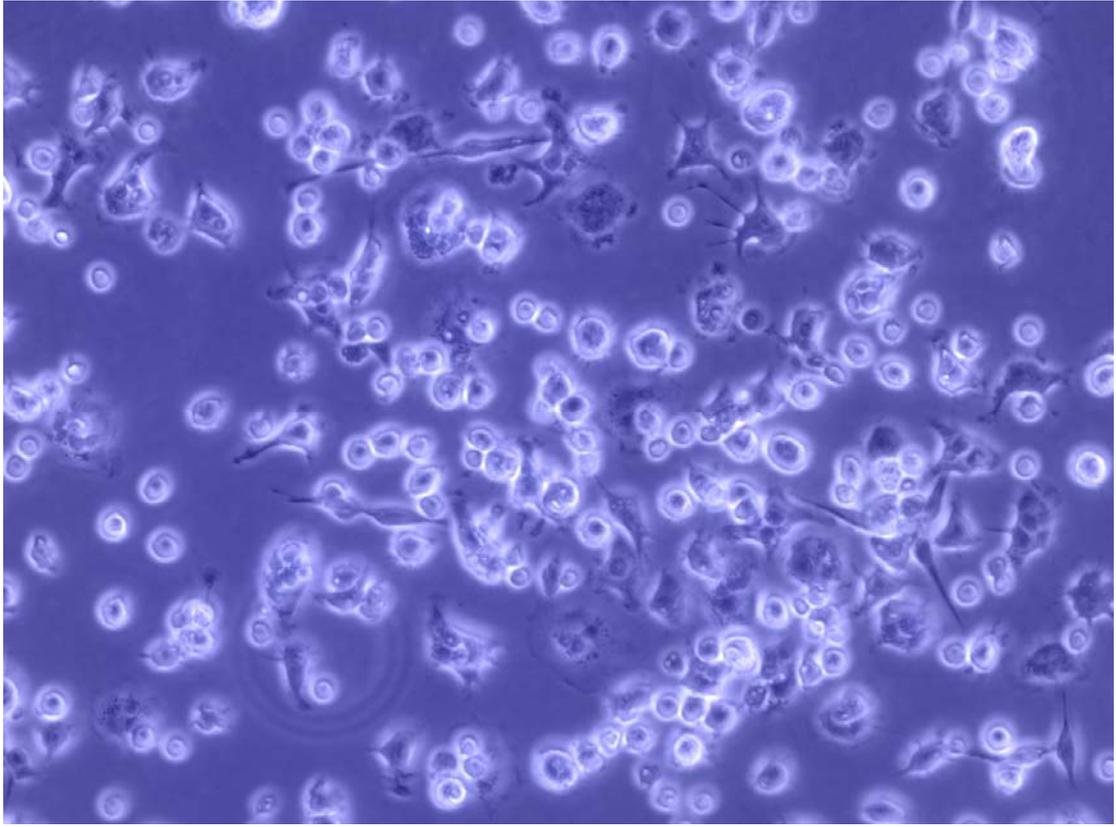


圖 18. 剛貼壁之 kupffer cell

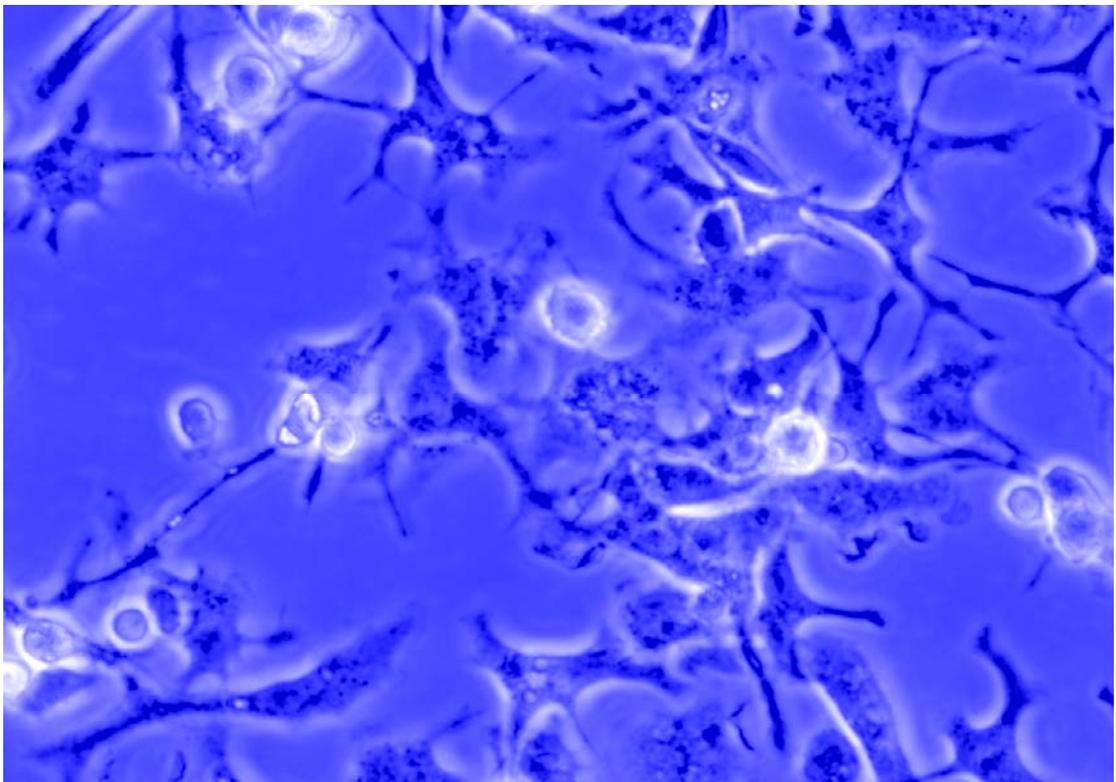


圖 19. 活化之 kupffer cell



圖 20. 訓練證明

表 1. High Fat Diet 成分

		For 6L		
		Low Fat (8%)	Medium Fat (25%)	High Fat (35%)
A				
Millipore water		3000ml	3000ml	3000ml
Lactalbumin hydrolysate		552g	552g	552g
B				
Millipore water		780ml	1000ml	1200ml
Dextrose (D-glucose)		759.6g	382g	115.6g
Citric Acid		12g	12g	12g
<u>Mineral</u>	<u>Stock solution</u>			
1). Potassium phosphate	17.325%(w/v)	144ml	144ml	144ml
2). Calcium chloride	43.39%(w/v)	72ml	72ml	72ml
3). Sodium chloride	19.535%(w/v)	48ml	48ml	48ml
4). Magnesium sulfate	8.888%(w/v)	24ml	24ml	24ml
5). Manganese sulfate	0.605%(w/v)	24ml	24ml	24ml
6). Potassium iodide	0.0215%(w/v)	24ml	24ml	24ml
7). Ammonium molybdate	0.0125%(w/v)	24ml	24ml	24ml
8). Cupric sulfate	1.22%(w/v)	24ml	24ml	24ml
9). Ferric ammonium citrate	3.115%(w/v)	24ml	24ml	24ml
10). Zinc chloride	0.255%(w/v)	24ml	24ml	24ml
Trace mineral mix		2.871g	2.871g	2.871g
Vitamin Mix (AIN-76)		26.5g	26.5g	26.5g
Choline Chloride		5.3g	5.3g	5.3g
Corn Oil		82.8g	260.4g	386.4g
Xanthan Gum		8.0g		17.0g

表 2. 酒精及葡萄糖溶液餵食計畫

Ethanol Dose	95% Ethanol concentration	Dextrose concentration	Days/weeks
(g/kg/day)	(% v/v)	(% w/v)	
22.7	7.02	9.4	Day 1 and 2
24.3	7.49	10.1	Day 3 and 4
26	8.02	10.8	Day 5 and 6
27.5	8.48	11.5	Day 7 and 8
29.2	9.01	12.2	Day 9~ 14
30.9	9.54	12.9	Day 15~ 21
33	10.18	14.8	Day 22 ~28
35	10.8	15.7	Day 29~

表 3. 1-4 周相關指標之變化

Weeks	Liver Weight/Body Weight		ALT(U/L)		BAL (mg/dL)	
	Alcohol	Control	Alcohol	Control	Alcohol	Control
1	0.079 ± 0.004	0.049 ± 0.002	160.1 ± 52.7	12.0 ± 4.4	N.D	N.D
2	N.D	N.D	192.3 ± 118.8	N.D	360.3 ± 58.8	N.D
3	N.D	N.D	276.5 ± 112.6	11.4 ± 11.8	N.D	N.D
4	0.102 ± 0.005	0.043 ± 0.001	260.1 ± 39.0	25.4 ± 5.3	309.8 ± 25.5	N.D