

犊牛肝细胞的分离与原代培养

张 才 王利民¹ 刘国文 苏 蔚 黄建龙 谢光洪 王 哲*

(吉林大学畜牧兽医学院动物营养代谢病与中毒研究室, 长春 130062;

¹ 四川农业大学动物科学与技术学院, 雅安 625014)

摘要 以初生犊牛作肝细胞供者, 采用稍加改良的两步胶原酶灌注法和一步灌注结合组织块消化法分离获取肝细胞, 并进行原代培养; 以台盼蓝染色法测细胞活力, 在倒置显微镜下观察肝细胞形态变化, 采用 Beckman 全自动生化分析仪检测较好培养体系不同时间培养上清液中白蛋白、乳酸脱氢酶(LDH)、尿素的含量。结果显示, 相比较于一步灌注结合组织块消化法, 胶原酶消化法所获取的肝细胞形态完整、贴壁良好、活性高、功能强; LDH 漏出量、白蛋白分泌及尿素合成等指标在 1 周内呈现规律性变化, 第 3 和第 4 天时 LDH 漏出量最低, 白蛋白分泌及尿素合成功能正常, 表明所分离的肝细胞在培养第 3~4 天功能最佳。

关键词 犊牛; 肝细胞; 分离; 原代培养

原代培养的肝细胞不受体内神经内分泌系统的复杂影响, 且能保持许多肝脏特异性功能, 并维持对一些激素的反应性, 能较好反映体内代谢情况, 因此, 原代培养的肝细胞是研究动物物质代谢及其调节机制的理想模型。

肝细胞的体外能否培养成功, 分离技术至关重要。采用何种方法获取产率高、活性好、功能强的肝细胞, 是建立肝细胞体外培养方法的前提条件。目前国内主要采取剪切结合胶原酶消化分离犊牛肝细胞的方法, 尚无应用胶原酶灌注消化分离肝细胞的报道。本研究应用两种肝细胞分离方法获得犊牛肝细胞, 并进行原代培养, 观察其细胞形态, 然后选择较好方法分离的肝细胞对其活性及功能的变化, 为研究奶牛肝脏糖异生和脂蛋白转运的调控机制打下了基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

1 日龄健康荷斯坦犊牛(45~50 kg), 购自长春示范奶牛场。

1.2 试剂和仪器

hepatoZYME-SFM 培养基、1640 培养基、新生牛血清、IV 型胶原酶购自 Gibco 公司; 地塞米松、牛胰岛素购自 Sigma 公司; 其他试剂均为国产分析纯。高速大容量冷冻离心机(Hitach 公司); CO₂ 培养箱(Sanyo 公司); 倒置显微镜(Olympus 公司)。

1.3 主要试剂的配制

1640 基础培养液: 按说明书取一袋干粉倒入 900 ml 三蒸水(水温 15~20 °C)中, 用三蒸水润洗包装袋 2 次, 加入 2.2 g NaHCO₃、2.383 g HEPES (10 mol/L) 和 1.169 g NaCl (20 mmol/L), 磁力轻轻搅动直至完全溶解, 用 1 mol/L HCl 或 1 mol/L NaOH 调 pH 为 7.2 左右, 定容至 1 L。

灌流液 A: 140 mmol/L NaCl, 6.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L HEPES, 2.5 mmol/L 葡萄糖, 0.5 mmol/L EDTA, pH 7.4。

配制方法: 取 8.1816 g NaCl, 0.4995 g KCl, 2.3831 g HEPES, 0.4500 g 葡萄糖, 0.1861 g EDTA, 溶于 1 L 三蒸水中, 调 pH 为 7.2。

灌流液 B: 140 mmol/L NaCl, 6.7 mmol/L KCl, 30 mmol/L HEPES, 2.5 mmol/L 葡萄糖, 5 mmol/L CaCl₂, pH 7.4。

配制方法: 取 8.1816 g NaCl, 0.4995 g KCl, 6.8493 g HEPES, 0.4500 g 葡萄糖, 0.5550 g CaCl₂, 溶于 1 L 三蒸水中, 调 pH 为 7.2。

灌流液 C: 在灌流液 B 中添加 50 g/L IV 型胶原酶, 使含 0.2 g/L 胶原酶。

贴壁培养基: 1640 基础培养液含 10% 新生牛血清、10⁻⁶ mol/L 胰岛素、10⁻⁶ mol/L 地塞米松、10 μg/ml Vit C 及双抗的基础培养液。

Schiff 氏试剂: 1 g 碱性品红加入 200 ml 蒸馏水,

收稿日期: 2007-04-27 接受日期: 2007-07-23

国家自然科学基金资助项目(No.30230260)

* 通讯作者。Tel: 0431-86986003, E-mail: wangzhe500518@sohu.com

搅拌加热沸腾, 待冷却至 50 °C 过滤, 加入 20 ml 1 mol/L 盐酸至 25 °C 时加入偏重亚硫酸钠。置于暗处, 两天后溶液变桔黄色或草黄色, 然后加入少量活性炭并震荡、过滤, 此时溶液应无色。保存冰箱备用。溶液如显浅红色或草黄色, 染色效果较差。

Gendre 氏固定液: 苦味酸饱和于 85 ml 95% 酒精, 10 ml 40% 甲醛, 5 ml 冰醋酸, 混合备用。

1.4 肝细胞分离方法

1.4.1 改良的两步灌流法分离肝细胞 静脉注射肝素钠(1 500 IU/kg), 颈静脉注射硫戊巴比妥钠(2 g)麻醉, 打开腹腔, 将肝脏向一侧牵引, 暴露出肝脏脏面, 用手术刀取出犊牛肝脏尾状突(caudate process)装进灭菌的烧杯中, 然后处死犊牛。迅速将取下的尾状突移至超净工作台中, 用 37 °C 预热的灌流液 A 将尾状突表面的血渍冲洗干净, 露出尾状突断面上的血管。选粗细适中的血管插管(5 号头皮针去掉针头)。第一步进行消化前灌流, 即灌注 37 °C 预热的灌流液 A, 流速为 50 ml/min, 持续 15 min, 然后以同样速率灌注 37 °C 预热的灌流液 B, 持续 3 min; 待流出的液体变清后, 进行第二步消化灌流, 即以 20 ml/min 速率灌入 37 °C 预热的灌流液 C, 灌流前除一条用于插管的血管外, 其他粗血管用缝合线轻轻接扎, 使灌流液缓慢流出, 15 min 后肝脏逐渐消化。将尾状突移入一无菌平皿中, 加入 50 ml 预冷的含 0.2% BSA 的基础培养液, 剔除血管、脂肪和结缔组织, 剪去肝脏周边消化不完全的部分, 用镊子撕掉肝脏包膜, 剪碎肝组织, 分别过 100 目(150 μ m)、200 目(75 μ m)及 500 目(30 μ m)细胞筛, 所得肝细胞悬液用基础培养液清洗 2 次(4 °C 下 50 g 离心 2 min), 用贴壁培养液(含 10% 新生牛血清、 10^{-6} mol/L 胰岛素、 10^{-6} mol/L 地塞米松及双抗的基础培养液)重悬、台盼蓝拒染法检测细胞活率、血细胞计数板计数。

1.4.2 一步灌流结合组织块消化法分离肝细胞 按(1)介绍的方法完成消化前灌流, 剔除血管、脂肪和结缔组织, 剪取红细胞冲洗的较干净的肝组织, 剪成 1~2 mm³ 大小组织块, 放入预先盛有 30 ml 37 °C 预热的含 1 g/L IV 胶原酶消化液(灌流液 B 中缓慢滴加 60 g/L CaCl₂ 溶液, 然后加入 20 g/L IV 胶原酶, 使含 0.6 g/L CaCl₂ 和 1 g/L 胶原酶)的培养瓶中, 37 °C 水浴振荡消化 10~15 min, 每隔 5 min 取出轻轻吹打, 镜检细胞分离情况。

消化结束后, 立即加入 30 ml 预冷的含 0.2% BSA 的基础培养液, 轻柔吹打, 分别过 100 目(150 μ m)、

200 目(75 μ m)及 500 目(30 μ m)细胞筛, 所得肝细胞悬液用基础培养液清洗 2 次(4 °C 下 50 g 离心 2 min), 用贴壁培养液重悬、台盼蓝拒染法检测细胞活率、血细胞计数板计数。

1.5 肝细胞的培养

细胞计数后, 用贴壁培养液将细胞悬液密度调整为 5×10^5 个/ml, 在平皿中接种 4 ml, 在 37 °C、5% CO₂ 和饱和湿度的条件下培养。4 h 后, 用生长培养液(含 5% 新生牛血清及双抗的基础培养液)全量换液, 以后每 24 h 更换无血清培养液 hepatoZYME-SFM, 倒置显微镜下观察肝细胞形态及生长情况并拍照。

1.6 细胞形态学观察

倒置生物显微镜对培养中的肝细胞进行动态观察并拍照。待细胞完全贴壁后, 将细胞进行 P.A.S 染色确定培养细胞的纯度。具体方法为: 吸去培养液, 加入 2 ml 的 Gendre 氏固定液固定 10 min, 蒸馏水洗, 0.5% 过碘酸(HIO₄) 70% 酒精溶液(过碘酸再结晶应重新配制使用)处理 10 min, 蒸馏水洗, 70% 酒精洗。Schiff 氏液 30 min (Schiff 氏液从冰箱取出升至室温使用), 流水冲洗 10 min。糖原呈红色。

1.7 细胞功能检测

选择两种方法中, 较好的方法培养的细胞, 收集培养液用 Beckman 全自动生化分析仪测定肝细胞培养时各上清液中白蛋白及尿素含量。

1.8 统计学处理

利用 SPSS 10.0 软件对数据处理进行单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 作为显著性界限, 处理所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 犊牛肝细胞不同分离方法的比较

本实验采用在 Seglen 法基础上略加改进的两步灌流法。平均细胞活率达到 90% 以上。采用一步灌流结合组织块消化法获得的肝细胞分散程度较低。单个细胞胞膜有一定损伤, 细胞活率只有 60% 左右。

倒置显微镜下可见两步灌流法分离的肝细胞呈分散状态, 呈圆球形(图 1), 接种 4 h 后肝细胞贴壁、伸展, 细胞由球形变为三角形或多边形, 胞体开始变平, 细胞核隐约可见(图 2), 活力差的细胞悬浮于培养液中, 换液时可以去除; 24 h 后绝大多数肝细胞贴壁, 呈扁平状、体积明显增大, 连接成岛屿状(图 3); 48 h 后肝细胞贴壁牢固, 伸展为上皮样, 连接成片, 细胞

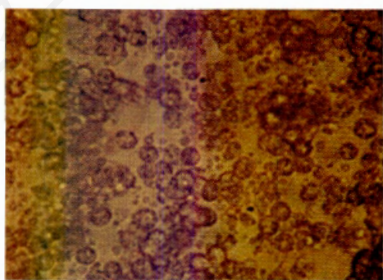


图1 改良的两步灌流法分离的肝细胞(200×)

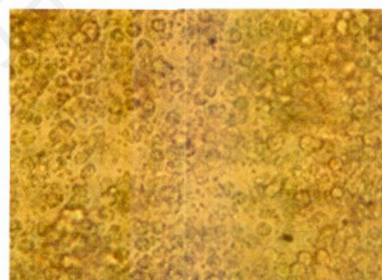


图6 一步灌流结合组织块消化法分离的肝细胞(200×)

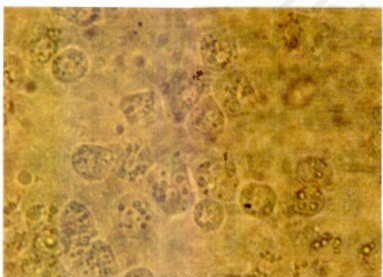


图2 改良的两步灌流法分离 4 h 的肝细胞 (200×)

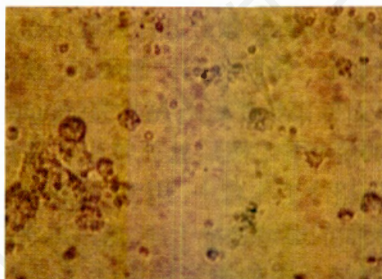


图7 一步灌流结合组织块消化法分离 4 h 的肝细胞(200×)



图3 改良的两步灌流法分离 24 h 的肝细胞(200×)

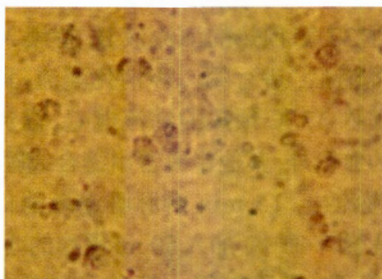


图8 一步灌流结合组织块消化法分离 24 h 的肝细胞(200×)



图4 改良的两步灌流法分离 48 h 的肝细胞 (200×)

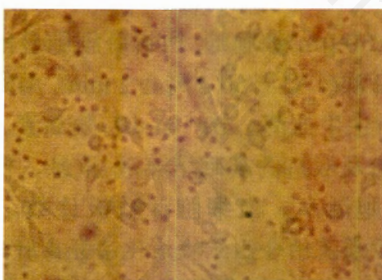


图9 一步灌流结合组织块消化法分离 48 h 的肝细胞(200×)

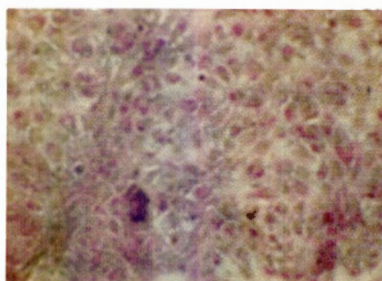


图5 改良的两步灌流法的肝细胞糖原染色(200×)

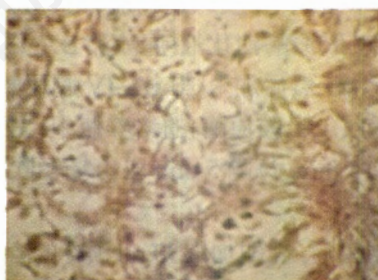


图10 一步灌流结合组织块消化法分离的肝细胞糖原染色(200×)

表1 犍牛肝细胞肝功能指标检测结果

培养天数	n	白蛋白(g/L)	尿素(mmol/L)	LDH (U/L)
1	6	0.228 ± 0.032 ^a	0.100 ± 0.013 ^a	8 128.86 ± 660.83 ^a
2	6	0.330 ± 0.081 ^{ab}	0.118 ± 0.014 ^a	6 698.03 ± 162.11 ^b
3	6	0.498 ± 0.035 ^b	0.210 ± 0.026 ^b	3 714.19 ± 261.53 ^c
4	6	0.606 ± 0.016 ^c	0.217 ± 0.022 ^b	3 753.40 ± 327.95 ^c
5	6	0.593 ± 0.037 ^c	0.199 ± 0.035 ^b	4 601.74 ± 339.44 ^d
6	6	0.566 ± 0.021 ^c	0.183 ± 0.026 ^b	5 239.22 ± 263.06 ^e
7	6	0.592 ± 0.019 ^c	0.217 ± 0.022 ^b	7 925.89 ± 97.28 ^f

同一列字母不同者表示差异显著($P < 0.05$)。

排列紧密,细胞间界限清晰,形成胆小管样结构(图4)。肝糖元染色细胞胞质中呈现出红色反应(图5),形态均一,证明培养的细胞为肝实质细胞。这种状态可以维持10天左右。10天后肝细胞质明显颗粒化,有空泡形成,细胞边缘不清,部分肝细胞核消失,细胞间隙拉大,肝细胞逐渐脱壁。一步灌流结合组织块消化法获得的肝细胞初分离时团块较多,细胞碎块多,细胞活力差(图6);接种4 h换液时多数的细胞无法贴壁(图7);24 h后贴壁肝细胞,呈扁平状、体积增大(图8)。48 h后培养孔中出现其他的杂细胞(图9),肝糖元染色部分细胞胞质中呈现出红色反应,但也有很多细胞未着色(图10)。

2.2 功能测定

检测两步灌流法分离细胞各培养上清液中白蛋白、尿素及乳酸脱氢酶(LDH)含量变化,结果表明,白蛋白分泌及尿素合成随着培养时间的延长逐渐升高,至第4天时到达峰值,随后保持相对稳定;LDH漏出量在第一天最高,而后至第3、4天下降达到最低,而后又逐渐升高。

3 讨论

3.1 肝细胞的分离

肝细胞在体外能否培养成功,分离技术至关重要。起初,多采用机械和化学方法制备肝细胞,对细胞损伤严重。直至1967年Howard等^[1]引入胶原酶作为消化分离肝脏的酶,其后Berry等^[2]使用胶原酶在生理条件下灌注肝脏分离肝细胞,解决了低产量和代谢功能丧失的问题。Seglen^[3]在使用胶原酶前用螯合剂,改进了实验方法,使分离肝细胞的二步灌流法被广泛接受。其基本方法是:先以无钙含EGTA或EDTA的缓冲液灌流,再以含钙和胶原酶的缓冲液循环灌注肝脏使肝组织分散,肝细胞解离。经过过滤除去脉管组织和未充分消化的肝组织碎块,反复地洗涤离心除去非实质细胞和细胞碎片,即可制得产

率及活率较高的肝细胞。因钙离子在细胞黏附中有一定作用,第一步需用金属离子螯合剂除去钙离子。在钙离子存在的条件下,可增强胶原酶活性,因此在第二步灌流液中需再加入钙离子。早先的灌流都是在小动物上,随后发展到比较大的动物^[4~6]。本试验对两步法进行稍加改动,胶原酶消化前用含有钙离子的缓冲液冲洗,去除了残留EDTA的干扰,有利于激活胶原酶的活性。同时,要想获得满意的分离效果,培养条件要求的比较严格。各种缓冲液pH值、用量及应用时间是非常重要的。灌流时采用的胶原酶IV型的浓度为0.02%~0.05%,缓冲液pH值一般在7.2~7.6之间,灌流时间一般不超过1h。本试验中采用了胶原酶IV型的浓度为0.02%,缓冲液pH值7.4,灌流15 min,即可获得大量高纯度、高活率、游离的肝实质细胞。此外,插管应迅速,灌注时间应充分,肝脏不能有空气栓塞或梗塞,离心速度不宜超过50 g。应用一步灌流结合组织块消化法分离肝细胞,细胞活性差,贴壁细胞少,培养一定时间后出现杂细胞,细胞纯度下降。这可能是由于组织块消化法,酶的浓度相对较高,且只能对组织块表面的细胞,先消化下来的细胞在高浓度的胶原酶的作用下损伤较大,而后消化下来的因为接触时间不足多成团块。培养中由于其他类型细胞的增殖降低了细胞的纯度。因此,要获得理想的肝细胞,灌流消化法要优于组织块消化法。

3.2 肝细胞的培养

在肝细胞培养中,选用合适的培养条件及培养基同样也重要。目前Williams' E、DMEM是较为常见的用于肝细胞培养的培养基。不同类型的培养液其成分和功能有较大的差别,对肝细胞的培养有明显的影响,为了促进肝细胞的生长、分化及维持其生物学功能,研究人员常常在基础培养基中添加合适的外源性生长因子和激素,如血清、胰岛素、胰高血糖素等^[7,8]。而本实验中采用的是商品化的无血清培养

基 heptoZYME-SFM, 无须在其中添加血清, 分离出的犊牛肝细胞就能够存活 10 天左右。商品化的培养基的优点就在于前后的品质保持较高的同质性, 不添加血清则排除了一些非确定因素的干扰, 保证了试验的重复性和可靠性。

3.3 肝细胞的功能测定

肝细胞是一种分化程度很高的细胞, 一旦失去体内生存的环境, 则很快失去分化再生的能力, 一些生化功能也很快丧失。为了找到分离的肝细胞活性最佳时期, 我们对肝细胞培养过程中的代谢情况进行了检测。从实验结果看, 培养的肝细胞在第 4 天白蛋白及尿素浓度达高峰, 此时合成分泌白蛋白、代谢氨的功能较强; 第 3 天 LDH 漏出量较低, LDH 为肝细胞损害的敏感指标, 这说明胶原酶消化所致的肝细胞

损伤可能需要 3 天时间才能完全恢复。可见通过胶原酶消化分离的犊牛肝细胞在第 3、4 天时各项功能最佳, 可作为体外研究肝细胞代谢功能的最佳时间。

感谢华南农业大学营养生理教研室张永亮教授、陈黎龙博士对本实验给予的热心帮助和细心指导。

参考文献(References)

- [1] Howard RB *et al.* *J Cell Biol*, 1967, **35**: 675
- [2] Berry MN *et al.* *J Cell Biol*, 1969, **43**: 506
- [3] Seglen PO. *Methods Cell Biol*, 1976, **13**:292
- [4] Donkin SS *et al.* *J Anim Sci*, 1993, **71**: 2218
- [5] Aiello R J *et al.* *Comp Biochem Physiol*, 1987, **88B**: 193
- [6] Aiello RJ *et al.* *J Dairy Sci*, 1987, **70**: 2504
- [7] Fraslin JM *et al.* *In Vitro Cell Dev Biol*, 1992, **28A**: 615
- [8] Douaire M *et al.* *J Cell Sci*, 1993, **104**: 713

The Isolation and Primary Culture of Calf Hepatocytes

Cai Zhang, Li-Ming Wang¹, Guo-Wen Liu, Wei Su, Jian-Long Huang, Guang-Hong Xie, Zhe Wang*

(Lab of Animal Nutritional and Metabolic Diseases & Toxicopathy, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China; ¹College of Animal Science & Technology, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China)

Abstract Calf hepatocytes were isolated by modified two steps collagenase perfusion and one step perfusion combined with tissue blocks collagenase digestion respectively, and cultured in heptoZYME-SFM. The viability of cultured hepatocytes was assessed by trypan blue exclusion. The morphologic change of cultured hepatocytes was observed, and the concentrations of albumin, urea and lactate dehydrogenase (LDH) in the supernatant collected from different cultural period of better isolated system were examined. The results were as follows: hepatocytes obtained by modified two steps collagenase perfusion were intact and had a prosperous viability and an active function. The fluctuated changes of LDH leakage, albumin synthesis and urea level were displayed in one week, and the lesser LDH leakage and higher concentrations of albumin and urea were observed on the third day. It is concluded that the collagenase digestion method is feasible for isolation of hepatocytes. Calf hepatocytes have an optimal function on the third days of the primary culture.

Key words calf; hepatocyte; isolation; primary culture

Received: April 27, 2007 Accepted: July 23, 2007

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (No.30230260)

*Corresponding author . Tel: 86-431-86986003, E-mail: wangzhe500518@sohu.com