

- [3] 周华明和赵丽萍, 1990, 解剖学报(印刷中)  
 [4] 周明华等, 1990, 细胞生物学杂志, 12(3): 140—143。  
 [5] 周明华等, 1990, 中国科学(待发表)。

- [6] Huebner F. R. 和 Bietz J. A., 1984, *Cereal Chem.*, 61: 544.  
 [7] Kurkawa M 和 Macleod M. C., 1985, *Anal Biochem.*, 144: 47.

## 大鼠肝细胞的分离技术

黄俊勇 冷欣夫

(北京中国科学院动物研究所)

离体的大鼠原代肝细胞, 作为可溶性酶与组织之间、整体动物与离体肝脏之间的一种中介的实验模型, 越来越多地被应用于生化毒理学、药理学和环境毒理学等学科领域<sup>[1-6]</sup>。

早先人们用机械方法, 随后 Jacob 等<sup>[7]</sup>, Rappaport 等<sup>[8]</sup>用  $\text{Ca}^{2+}$  离子或  $\text{K}^{+}$  离子的螯合剂灌注肝脏的方法来分离肝细胞, 但成活率都不高。Howard 等<sup>[9]</sup>在灌注技术中引进了胶原酶和透明质酸酶作为肝脏结缔组织的消化酶后, 分离的肝细胞成活率有了较大的提高。这一方法 Berry 和 Friend<sup>[10]</sup>作了改进, 采用循环灌注技术, Wagle 等<sup>[11]</sup>则进一步将实验简化为只用胶原酶并改用无  $\text{Ca}^{2+}$  离子的缓冲液系统, Seglen<sup>[12]</sup>在此基础上缩短灌注时间, 进一步提高了分离的细胞成活率。Fry 等<sup>[13]</sup>将剪碎的肝脏直接用消化酶处理来分离肝细胞, 但这种方法细胞产率和成活率都较低, 一般只适用于活组织检查等不需灌注的试验。Nakatsugawa 等<sup>[14]</sup>, 冷欣夫等<sup>[15]</sup>在分离肝细胞中用含胶原酶的 Hanks' 溶液灌注大鼠肝脏, 也得到较为满意的结果。

我们在前人的技术基础上, 进一步改进和完善了采用含胶原酶的无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  离子的 Hanks' 溶液灌注大鼠肝脏分离肝细胞的方法, 分离得到的肝细胞成活率达96%左右, 且细胞产率较高。现将试验情况分述如下:

### 材料

本试验所用的主要试剂中胶原酶 (Type II)、牛

血清蛋白(BSA)为 Sigama 公司产品, Waymouth MB 752/1 培养基为美国 GIBCO 公司产品, 其他试剂均为国产分析纯。本试验中所用 Hanks' 溶液均为无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  离子溶液, 由混合气体(95% $\text{O}_2$ , 5% $\text{CO}_2$ )饱和后, 调 pH 至 7.2—7.4, 并经无菌过滤器过滤。肝细胞分离过程中, 向缓冲液中通气, 一律指在溶液的液面上方维持通气。

试验中用的器皿、用具可因不同的试验要求进行不同程度的消毒灭菌。本文试验中的器皿、用具是用 75% 酒精消毒灭菌。

雄性大鼠 (Sprague-Dawley 品系) 150—200 g, 由本所饲养场提供。

### 方法

一、动物的麻醉及解剖 将大鼠置于密闭的容器内, 用乙醚麻醉。其程度一般等大鼠四肢瘫软, 由轻度的急促呼吸刚进入深呼吸即可, 约需 2 分钟, 但因鼠的个体差异和乙醚用量而有些差异。然后将大鼠固定在蜡盘上, 整个腹部用 75% 酒精消毒后, 沿腹中线用骨剪打开腹腔至胸膈膜的胸骨突起处, 小心避免损伤肝脏和隔膜。两侧腹部皮肤从尾部向胸部各剪一“V”形, 分开固定于前肢近傍。使腹腔完全暴露。将内脏翻移至鼠体的左侧, 暴露肝门静脉和后腔静脉。将肝门静脉离肝脏入口处 1—1.5 cm 处以及后腔静脉近肾静脉分支部位与周围组织分离开, 各穿一根棉纱线备用。并经由后腔静脉注射 0.06% 肝素钠生理盐水溶液 0.5—0.6 ml, 注射点尽量靠后。

二、静脉插管和灌注 将静脉插管沿去除了结缔组织膜的肝门静脉管处插入, 使针头前端稍离肝门静脉入肝分支部。用事先准备好的棉纱线扎好, 以防漏血和针管滑出。用经无菌过滤, 37℃ 恒温和混合气体 (95% $\text{O}_2$ , 5% $\text{CO}_2$ ) 饱和的 pH 7.2—7.4 无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$

的 Hanks' 溶液进行肝脏灌注。同时剪开后腔静脉尾段放血。灌注流速从慢至快，最后达到 30—40 ml/min，洗去肝内积血。约 3—5 分钟后，肝脏表面应光滑湿润、略显均一的微黄色。灌注前一定要将溶液导管中的气泡赶净。以免气泡堵塞肝脏微血管，影响进一步的灌注。

如有气泡进入肝脏，轻者肝脏表面出现许多小白斑点，重者出现一块块的血斑。有时某一肝小叶整个呈暗红色，这都导致局部血液滞留肝内，排血不净，这种情况，将影响下一步的胶原酶的作用，肝细胞分散不彻底，形成许多组织块和细胞团。影响细胞的存活率和产率。如遇这种情况应重新更换动物。

用骨剪打开胸腔，在前腔静脉管处系一根棉纱线，尽快从右心房室处插管至前腔静脉处，然后扎紧棉线，以防针管滑脱。如果插管位置适当应有灌注液从导管中溢出。随之将后腔静脉处的棉线扎紧，迫使灌注液改由前腔静脉插管处流出。

这时将灌注液改换成 100 ml，含 0.03% 胶原酶的无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  离子 Hanks 溶液，并由前腔静脉导管回收，循环使用。从胶原酶进入肝脏起，约 7—10 分钟，肝脏表面的结缔组织膜出现小液泡，其下的肝组织出现裂隙，用眼科镊轻压，柔软无弹性，陷窝不易复原。这时立即停止灌注。

三、肝细胞的分离 用眼科镊提起近肝处的后腔静脉管，小心地将整个肝脏与肝系膜剪开分离下来。立即置于经消毒的小烧杯中，用眼科小剪刀剪碎。加进 100 ml 含 2% 牛血清蛋白的无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  离子 Hanks' 溶液，在 37℃ 恒温水浴中，轻微搅拌 10 分钟，在液面上端保持通气 (95%  $\text{O}_2$ ，5%  $\text{CO}_2$ )。

上述组织细胞液经 60 目、80 目、100 目的尼龙网三级过滤，收集滤液，并置于冷水浴 (约 10—15℃) 中沉降，约 7 分钟，小心地吸去上层清液。再加入 100 ml 无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  离子的 Hanks' 溶液，轻轻地混悬后，第二次沉降，7 分钟，再吸去上层清液。沉降下来的细胞中加入 50 ml Waymouth 溶液，于 37℃ 恒温水浴套中进行原代培养，并在液面上方保持通气，同时不断地、温和地搅拌。

四、细胞计数和成活率 细胞计数可根据具体的条件来进行，本文中细胞计数是用英国库特电子公司的细胞计数仪完成的。取二个测定杯分别加入 20 ml Waymouth 溶液 (经无菌过滤)，然后在其中一个杯中加 40  $\mu\text{l}$  Waymouth 液作为对照，另一杯中则加 40  $\mu\text{l}$  上述细胞悬液，分别于计数仪中测定，并按下式换算

成实际细胞数：

$$\text{细胞悬浮液中细胞数/ml} = (\text{含细胞杯测定值} - \text{对照杯测定值}) \times 10^3$$

测定细胞成活率用台盼蓝拒染法<sup>[16]</sup>，记录死活细胞数，算出活细胞占总细胞数的百分比。

根据所测细胞数，用 Waymouth 溶液调整溶液中所需的细胞含量，一般使细胞悬浮液的浓度高出实验用浓度 2—3 倍为宜。因为细胞浓度太高时，易引起肝细胞的重聚，影响肝细胞的存活。

表 1 细胞产率及存活率的比较

引用文献号	总细胞产率 ( $10^6$ Cell/g 肝重)*	存活率 (%)
[9]	7	77
[8]	72	/
[14]	/	85—95
[2]	180—240	85±10
本试验**	166±21.7	96.5±0.32

\* 为肝湿重；\*\* 由四次以上试验数据统计所得。

表 1 中比较了本试验与不同文献报道的细胞产率及存活率，我们得到了 96% 左右的肝细胞存活率，并且细胞产率也较高。在 37℃ 恒温的 Waymouth 溶液中，液面上方维持通入混合气体，并用磁力搅拌器轻微搅拌的条件下，如表 2 中所示，肝细胞悬浮液中的细胞活力可维持 8 小时以上。这样分离的大鼠原代肝细胞可用于培养，进行各种研究，也可直接用于药物动力学研究，如药物代谢，药物与酶系的相互作用等)。

表 2 细胞悬浮液中的肝细胞活力

T(hr.)	0	6	8	10
存活率 (%)	95.1	89.9	87.2	39.6

表中数据为三组试验的平均值。

## 摘 要

本文介绍一种采用含胶原酶的无钙、镁离子缓冲液系统灌注大鼠肝脏来分离大鼠肝细胞的方法，分离得到的肝细胞成活率达 96% 左右，且细胞产率较高。细胞在 37℃ 恒温的 Waymouth 溶液中、pH 7.2—7.4、保持通气 (95%  $\text{O}_2$ ，5%  $\text{CO}_2$ )，不断轻微搅拌的条件下，活力可维持 8 小时以上。

## 参 考 文 献

- [1] Hayes M. A. and D. B. Pickering, 1985, *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*, 80:345.
- [2] Hayes M. A., et al., 1984, *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*, 76:118.
- [3] Kurihara N., et al., 1984, *Pesti. Biochem. and Physiol.*, 21:63.
- [4] Stewart D. J. and T. Inaba, 1979, *Biochem. Pharmacol.*, 28:461.
- [5] Bock K. W., et al., 1976, *Biochem. Pharmacol.*, 25:2351.
- [6] Von Bahr C., et al., 1974, *Biochem. and Biophys. Res. Communi.*, 59(1):334.
- [7] Jacob S. T. and P. M. Bharava, 1962, *Exp. Cell Res.*, 27:453.
- [8] Rappaport C. and G. B. Howze, 1966, *Proc. Soc. Exp. Biol., Med.*, 121:1010.
- [9] Howard R. B. and A. K. Christensen et al., 1967, *J. Cell Biol.*, 35:675.
- [10] Berry M. N. and D. S. Friend, 1969, *J. Cell Biol.*, 43:506.
- [11] Wagle R. and W. R. Ingebretsen Jr., 1961, *Methods in Enzymology*, Vol.: 35: 579.
- [12] Seglen P. O., 1973, *Exp. Cell Res.*, 82: 391.
- [13] Fry J. R. and G. A. Jones et al., 1976, *Anal. Biochem.*, 71:741.
- [14] Nakatsugawa T. and L. B. William, et et., 1980, *Pesti. Biochem. and Physiol.*, 14:13.
- [15] 冷欣夫, 乔传令, 1986, 科学通报, 31(19):1505.
- [16] Jeejeebhoy K. N., et al., 1975, *Biochem. J.*, 164:141.

## 新技术介绍

## 原位缺口移位技术检测药物对细胞DNA的断裂损伤\*

章静波 郝昌虎\*

(中国医学科学院基础医学研究所细胞生物学室)

原位缺口移位技术, 又称为原位缺口翻译(In situ nick translation)是近几年建立起来的一种分子细胞生物学新方法。据作者所知, 国内尚未见有报道。现将其原理、技术操作程序及应用, 并结合我们的工作作一实用性地简要介绍, 以利国内尽早开展与运用起来。

## 一、原 理

缺口移位反应最早是 Kelly 等<sup>[1]</sup>建立的, 原用来研究 DNA 体外复制的分子生物学方法。其后有人用来研究染色体<sup>[2-4]</sup>、培养细胞与组织切片的 DNA 转录效力<sup>[5,6]</sup>。其基本原理是大肠杆菌 DNA 聚合酶 I (Escherichia coli DNA polymerase I) 可从一条 DNA 链缺口 (nick) 的

5' 端切除核苷酸, 同时从缺口的 3' 端连接核苷酸, 并依次顺序进行, 其结果切口沿 DNA 平移。因此, 新合成的数量可反映出 DNA 链的断裂, 即 DNA 受损的程度<sup>[7,8]</sup>。至于原位缺口移位技术, 乃是将缺口移位技术与同位素放射自显术结合起来, 从而可在细胞核或染色体上反映出 DNA 受损的程度。因此, 一方面具有实感性, 便于观察记录。另一方面也可作半定量 (计数银颗粒) 或定量 (收集细胞作液

\* 本文有关研究得到国家教委及加拿大不列颠哥伦比亚肿瘤研究中心 (British Columbia Cancer Research Centre) S.S. Tsang 博士科研基金资助, 部分工作在该实验室完成, 谨此致谢。

\* 河南豫中制药厂。