

量水的瓶中，盖上带有滴管的皮塞，滴管尖端插入箱体的 CO_2 注入孔中，以注射器穿过皮塞缓缓注入 $10\% \text{H}_2\text{SO}_4$ (其量亦可通过上式算出，但实际可稍过量些，以使反应较快进行)，则不断产生的 CO_2 即源源注入箱内，而比重较轻的空气则由垂直的气压平衡管上口径平衡管向下被排出箱外。 CO_2 注入毕，拔出滴管，立即用胶布将注入孔封闭，将此装置移放恒温箱中，进行培养。由于平衡管的作用，装置放入温箱后不致因升温使封闭用 CuSO_4 液外溢；又因为平衡管细长，且开口在箱体上方，故也不易造成箱内 CO_2 的逸出。

采用 CuSO_4 溶液，而不用水作封闭液是因为 CuSO_4 有杀菌作用，有利于保持箱内的半无菌状态，同时 CO_2 难溶于 CuSO_4 溶液，有利于维持箱内 CO_2 量的恒定。我们在杂交瘤试验中，将克隆化的细胞株在此箱内连续培养一星期，结果培养液 pH 仍稳定，细胞生长良好。

也有人以烛罐装置代替 CO_2 培养箱，用于细胞的开放培养，即用微生物学技术中的厌氧培养罐或干燥罐，点燃蜡烛，以获得 5% 左右的 CO_2 气体^[2]，此法缺点是蜡烛燃烧消耗掉罐内氧气，而氧气为细胞生长所需要，虽有一些细胞在缺氧情况下可借糖酵解获取能量，但多数细胞缺氧不能或不能较好地生存^[3]，

另外此法所产生的 CO_2 量不易控制，蜡烛燃烧时还可能产生对细胞有毒性的气体，如含硫气体等。本装置采用化学法定量制取 CO_2 ，不仅免去使用 CO_2 钢瓶之繁，且制得的 CO_2 气体十分纯净， CO_2 量可较准确的控制在适当浓度。

我们采用本装置进行融合细胞与杂交瘤细胞培养十分成功。用于微孔塑料培养板的若干种细胞培养、病毒的中和试验与空斑试验等，均效果良好^[4]。

由于此简易 CO_2 培养装置具有制作简易、经济实用，使用方便及上述性能上的优点，不仅适于在一般实验室推广应用，即使对于已有 CO_2 培养箱的实验室，也可用以备不时之需(如停电， CO_2 培养箱出现故障，钢瓶中 CO_2 用尽等情况)。

参 考 文 献

- [1] 陈伯权等，1983，中华微生物免疫学杂志。
- [2] 何长民，1981，医用微生物实验技术，甘肃人民出版社，第 141 页。
- [3] 鄂 征，1988，组织培养技术，人民卫生出版社 第 29 页。
- [4] 郭进林等，1988，实验和临床病毒学杂志，2 (1): 40。

小鼠肝细胞分离培养中应注意的问题*

王 宇 明

(重庆，第三军医大学西南医院 630038)

目前，国内在鼠的肝细胞培养时多用大鼠，而小鼠使用较少，其可能原因有二：一是肝细胞分离操作在大鼠较易掌握，而在小鼠则不易掌握；二是从大鼠分离的肝细胞数量较多，而自小鼠分离的肝细胞数量较少，有时达不到实验要求。然而，使用小鼠也有其优越性。首先，小鼠体重只相当于大鼠的 $1/10$ ，

二者肝脏重量之比也大致如此，因而对小鼠进行肝细胞分离灌注时所用胶原酶远较大鼠为少，大大节约了价格昂贵的胶原酶；其次，有研究发现小鼠肝细胞的生长和增殖能力比大鼠

* 本文承蒙日本岐阜大学医学部第 1 内科研究室大西弘生讲师指导，特此致谢。

(下转插页 3)

(上接封三)

强^[1,2]。而且,我们采用简易灌注法,不需特殊设备,操作简单,采集肝细胞数完全可以满足实验要求。鉴于国内有关介绍文献较少见,本文在复习有关文献的基础上,结合作者进行有关小鼠肝细胞培养的实践体会,对小鼠肝细胞培养中的常见问题加以讨论。

灌注液和培养液的选择和配制 灌注液包括无 Ca^{2+} 无 Mg^{2+} Hanks液和胶原酶液。由于前者组成可不一致,且均在胶原酶液前进行灌注,故建议按日语文献,称之为“前灌注缓冲液”^[3]。该液中不含 Ca^{2+} 的目的在于去除细胞间隙的 Ca^{2+} 依赖性连接因子,以利于细胞分离^[4]。然而,胶原酶液则必须含 Ca^{2+} ,这是因为胶原酶须在 Ca^{2+} 存在时方能发挥其酶活性。一般认为 Ca^{2+} 浓度为5 mM时胶原酶活性最佳^[5]。亦有报道不加 Ca^{2+} 而获得良好效果^[6],据认为可能与胶原酶制剂已含有 Ca^{2+} 有关,而加 Ca^{2+} 则是有益无害的^[7]。培养液种类较多,目前国内各家选择不一。Tanaka等^[8]对DME、Ham F 12、L 15、MEM及WE等5种培养液进行有关血浆蛋白质合成、尿素合成及对细胞维持作用的分析。结果表明,在血浆蛋白质合成及尿素合成方面以WE培养液最优,细胞维持作用则以L 15最佳。从近年来国外文献看,以WE培养液使用最多。在液体配制时,一般不宜用负压滤过除菌,而应用正压滤过除菌。据认为负压滤过可因二氧化碳自液体中逸出而致液体pH值增高,同时含蛋白质液体可产生多量泡沫,而正压滤过则无此变化^[9,10]。我们发现即使正压滤过,液体pH值也可有轻度变化,故应在液体少量滤过后测pH值,调整滤过前液体pH值。虽然各种液体中均含有能稳定pH值的Hepes,但是我们发现随着液体配制时间延长,pH值可发生变化。一般是灌注液pH值下降,而培养液pH值增高。处理办法是:1.每次配制液量不宜太多,保存期限控制在1个月以内;2.尽可能将液体装满瓶子,减少空间,以减少pH值变化;3.如pH值变化过大,或经调整后再次明显降低,应将液体弃去不用。

门脉的穿刺 小鼠的门脉较细小,穿刺时极易刺破,多量血液流出,导致肝缺血,影响分离后肝细胞的存活率。同时出血后血管变得更为细小,使再次穿刺更为困难。因此,应力求一次穿刺成功。我们体会,门脉穿刺的难易与麻醉程度关系较大,麻醉浅时门脉血管变得细小,加上此时呼吸动作大,门脉也随之活动,从而增加了穿刺的难度;反之,麻醉偏深时

门脉充盈较佳,且因呼吸较平稳,门脉位置也相对稳定。从穿刺角度看,以麻醉略深为好。然而,由于深度麻醉易致呼吸变慢,血压降低,甚至死亡,故麻醉不宜过深。以小鼠心跳、呼吸平稳,切开腹部皮肤时无躁动,开腹后见门脉充盈者为佳。在大鼠常用缝合线固定穿刺针和门脉,而在小鼠引线、结扎、固定等操作中稍有不慎即可致门脉穿破,故以不用为宜。可从门脉远端进针,穿刺针进入门脉后,继续向前进4—5mm,然后拔出针芯,如见回血流至针管中,证明已进门脉,即可接前灌注缓冲液,同时小心用胶布将输液管固定在操作板上,或始终用手固定深度及方向。此外,应注意穿刺针不宜进入过深,否则在进入门脉分支后常导致部分肝叶得不到灌注。

灌注 灌注的好坏将直接影响肝细胞的采集量及存活率。常用的方法有振荡法和灌注法两种。振荡法所取肝细胞量较少,加上小鼠肝脏本身就小,难以满足实验要求;灌注法需灌注装置,也因小鼠过小,操作不易掌握。我们设计了一种简易灌注法,该法操作简便,不需要灌注泵,采集肝细胞量大。方法要点是:留置针穿入门脉后,采用静脉输液法,输入经37℃预温的前灌注缓冲液,至肝脏稍膨大、色略变白时剪断肝下静脉,于血液流出、肝脏开始回缩时用消毒塑料滴管反面头部或经硅化的细玻璃试管头部压迫切口处,并间歇性放开,肝脏也随之膨大与回缩。前灌注缓冲液滴完后,继以胶原酶液续滴,仍保持间歇性压迫与开放。当肝包膜与肝组织出现裂隙时,标志着胶原酶作用充分,可将肝脏完整切下,置平皿中以尖嘴镊分离肝细胞膜,可见肝组织呈糊状,加入预温胶原酶液,以60—80 μm的尼龙网或三层纱布过滤后离心。本法与灌注法一样,灌注流速的控制较为重要。流速不足可致细胞缺氧,而流速过快、压力过大可致肝细胞存活率降低^[7]。本法通过对已剪开的肝下静脉进行堵放动作来控制流速,只需注意肝脏的膨大与回缩不过度即可,总量20—25 ml胶原酶液约在4—5 min内灌注完毕。

梯度离心 在成功的门脉穿刺及灌注之后,即可进行梯度离心以分离肝细胞和/或肝非实质细胞。最好在离心开始后对肝细胞存活率作出较为正确的初步估计,如不成功,可及时中止。我们体会,在最初的50×g及500×g交替离心后,可从以下三方面对肝细胞存活率作一初步判断:1.肝细胞部分(50×g离心后沉淀部分)及肝非实质细胞(50×g离心后上浮,并在500×g离心后沉淀部分)的体积之比约在5:1以上

者,肝细胞存活率较高,而比例约在3:1以下者则存活率较低,这一现象是由于死亡的肝细胞膨大上浮,混入 $50 \times g$ 离心中悬浮的肝非实质细胞部分所致; 2.离心中肝细胞反复出现聚集,用培养液不易吹散,提示肝细胞存活率低,这可能系肝细胞死亡后,膜负电荷降低,易致肝细胞聚集; 3.离心沉淀的肝细胞如呈灰褐色,说明肝细胞存活率高,如呈灰白色,则说明肝细胞存活率低。此外,离心速度的准确与否,对肝细胞和肝非实质细胞的采集及纯度影响很大,部分国产离心机转速不准,特别在 $50 \times g$ 时不易调准,导致实验结果不佳,故应注意选择适当离心机。

细胞接种及培养 细胞接种后应注意的是须将培养液左右轻轻摇动,以使细胞分布均匀,但不可作环形摇动,否则将由于旋涡运动而致肝细胞向中部集中,大量重叠的肝细胞出现坏死剥落而致中心部空缺^[11]。为避免培养液中小牛血清(通常含10%)及激素(通常含胰岛素及地塞米松各 10^{-7}mol/L)对实验结果的影响,目前多主张用无血清培养,激素量限制在胰岛素和地塞米松各 10^{-9}mol/L ,此激素量相当于体内生理量^[3]。应当注意的是,如无血清培养超过2天,肝细胞可发生坏死脱落,故其应用应限于2天内。培养皿中培养液的加入量也有一定要求。维持肝细胞功能的最低氧分压为 5.3 kPa (40 mmHg),要达到这一条件培养皿中培养液高度应为 0.34 mm ,然而为了维持pH值及营养,通常采用高度为 2 mm 。以 22 mm 直径的培养皿为例,培养液加入量应为 1 ml ^[12]。在培养过程中,由于温度、高二氧化碳分压及细胞代谢的影响,培养液pH值可稍降低,呈红黄色,此为正常现象。但如果pH值明显降低,培养液呈黄色,应注意细菌污染的可能。

总之,小鼠肝细胞分离和培养的操作程序

及方法与大鼠大致相似。前者的主要难点在于其肝细胞分离操作要求一定技巧。只有反复练习,熟练掌握其方法要领,同时注意解决各种常见问题,才能保证肝细胞分离和培养的成功。

参 考 文 献

- [1] Sawada N., et al., 1988, *Jpn J Cancer Res.*, 79 (9): 983.
- [2] Maslansky C. J. and Williams G. M., 1983, Isolation, characterization and use of hepatocytes., 87-92. New York Elsevier Biomedical.
- [3] 小平輝朋と中村敏一. 実験医学, 1988; 6 (11): 1105.
- [4] Modajanova E. A. and Malenkov A. G., 1973, *Exp Cell Res.*, 76: 305.
- [5] Seglen P. O., 1973, *Exp Cell Res*, 76: 25.
- [6] 黄俊勇和冷欣夫, 1991, 细胞物杂志, 13 (1): 43.
- [7] Pogson C. I., et al., 1983, Isolation, characterization and use of hepatocytes., 21-30. New York Elsevier Biomedical.
- [8] Tanaka K., et al., 1978, *J Biochem.*, 84: 937.
- [9] Paul J., 1975, *Cell and tissue culture*, 133-154. Edinburgh Churchill Livingstone.
- [10] Freshney R. I., 1987, *Culture of animal cells.*, 85-105. New York Alan R. Liss, Inc.
- [11] 中村敏一, 1989, 初代培養肝細胞実験法, 33-40. 東京学会出版センター。
- [12] 中村敏一, 1989, 初代培養肝細胞実験法, 50-53. 東京学会出版センター。

欢迎订阅《生物化学与生物物理进展》

邮发代号: 2-816 双月刊 82页 单价: 4.00元 主办单位: 中国科学院生物物理研究所
编辑部地址: 北京市朝阳区大屯路15号 电话: 2020077-504或-513 邮政编码: 100101

报道内容: 生物化学、分子生物学、生物物理学及神经科学等最新进展综述、研究论文, 研究快报与简报, 新技术与新方法介绍, 以及经验交流和科技消息等。