

in an inverted orientation between the CaM 35S promoter and the Nos 3' termination sequence. Transgenic tomato plants were obtained by Agrobacterium-mediated transformation of cotyledons. PCR detection and Southern blot analysis confirmed the integration of antisense LeETR1 gene in tomato genome. Ethylene production peak of transgenic fruits appeared 10d after control. After 30 days in normal room, transgenic tomatoes eventually developed an orange colour but never turned red. These data suggest that LeETR1 was closely correlated with the ripening of tomato fruits.

**Key words:** Tomato fruit    LeETR1 gene    Cloning    Antisense expression vector

## 实验技术

# 原位胶原酶循环灌注法分离猪肝细胞

陈 钟<sup>\*,\*\*</sup> 丁义涛<sup>\*\*</sup>

(\*南通医学院附属医院普外科 南通 226001 \*\*南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科 南京 210008)

**摘 要** 本文建立了原位胶原酶循环灌注分离猪肝细胞方法与离体两步胶原酶灌注法进行了比较。猪门静脉和下腔静脉分别插管,先用 D-Hanks 液灌注,再采用自制的循环灌注装置进行胶原酶循环原位灌注分离猪肝细胞,分离后的肝细胞以  $5 \times 10^5$ /ml 培养,观察分离和培养 7d 的肝细胞产量、活率、蛋白质合成功能、葡萄糖合成功能和 LDH 含量。同时测定离体组的上述指标。研究表明采用原位胶原酶循环灌注法每克肝组织分离获得的肝细胞总量为  $5.1 \times 10^7$ ,肝细胞活率 98.6%,培养 7d 肝细胞活率 89.5%。肝细胞的蛋白质合成功能在培养 7d 中保持稳定;葡萄糖合成功能从 1d 时  $1.05 \pm 0.15$ nmol/cell 下降到 3d 时  $0.74 \pm 0.09$ nmol/cell;LDH 含量在 3d 较高。原位胶原酶循环灌注法分离的猪肝细胞总量、活率高于离体法;蛋白质合成功能和葡萄糖合成功能强于离体法。因此,原位胶原酶循环灌注法分离猪肝细胞方法可获得大量高活率和良好功能的猪肝细胞。

**关键词:** 肝细胞 分离 胶原酶 培养 生物人工肝

以培养肝细胞为生物成分的生物人工肝(BAL)有望成为治疗急性肝衰竭的有效手段<sup>[1-3]</sup>。随着该研究的深入,迫切需要理想的肝细胞来源与分离、培养技术。猪肝细胞因结构和功能与人肝细胞相似,是 BAL 较理想的肝细胞来源<sup>[4-6]</sup>。目前,猪肝细胞分离多采用离体两步胶原酶灌注法,肝细胞产量及活率有限<sup>[1]</sup>。本文采用自制的循环灌注装置应用原位胶原酶循环灌注方法分离猪肝细胞,取得了满意的效果,现将结果报告如下。

## 材料和方法

### 1. 材料

中国实验用小型乳猪 10 只,出生后 10-15d,体质量 2.7-4.0kg,雌雄不限,由本院实验动物中心提供;胶原酶(collagenase)IV、RPMI1640 购于 Gibco 公司,新生牛血清(NBS)购于 Hyclone 公司,头孢哌酮钠为辉瑞制药有限公司

(大连)产品,青霉素、链霉素为华北制药厂产品,CO<sub>2</sub> 培养箱为日本 IKEMOTO RK110-2。

### 2. 实验分组

将 10 只中国实验用小型乳猪平均分为两组,A 组为原位胶原酶循环灌注组(n=5),B 组为对照组,即离体两步胶原酶灌注组(n=5)。

### 3. 方法

实验猪于术前 12h 禁食。氯胺酮 20mg/kg iv 麻醉动物,固定,常规方法消毒皮肤,开腹。

A 组:分离门静脉、肝下下腔静脉,门静脉内注入肝素钠 125U,分别结扎门静脉、肝下下腔静脉远心端,近侧插管分别作为灌注流入道和流出道,阻断肝上下腔静脉。先用经 37℃ 预热的无 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> Hanks 液(D-Hanks 液)门静脉内

本文 2002 年 10 月 28 日收到,2003 年 1 月 15 日接受。

本研究受江苏省卫生厅重点项目基金(BQ200020)、南京市科委科技发展计划(20012095)资助。

\*联系人。E-mail:zchen9999@sina.com.cn

灌注 1000ml, 流速 80 - 100ml/min; 再用自制的循环灌注装置, 应用 37℃ 的 0.05% 胶原酶 IV 250ml 循环灌注, 流速 50 - 60ml/min, 至肝表面呈颗粒状, 肝组织开始崩解为止。灌注结束后, 将肝脏取下, 剪成数块, 置于含 0.05% 胶原酶 IV 50ml 的消毒广口瓶中, 37℃ 恒温箱中继续消化 15min。

B 组: 暴露门静脉并注入肝素钠 125U, 游离肝脏, 在第一肝门、肝上下腔静脉和肝下下腔静脉处上钳, 于肝门部剪下并取出肝脏, 然后进行离体两步胶原酶灌注。先用经 37℃ 预热的 D-Hanks 液门静脉内灌注 1000ml, 流速 80 - 100ml/min; 再用 37℃ 的 0.05% 胶原酶 IV 500ml 灌注, 流速 50 - 60ml/min, 至肝表面呈颗粒状, 肝组织开始崩解为止。

A、B 两组均于灌注结束后, 清洗、称重肝组织, 去除包膜和大块结缔组织, 收集肝细胞悬液, 120 目过滤, 1000rpm 反复低温 (4℃) 离心 3 次, 每次 5min, 肝细胞接种到含 10% NBS、200μg/L 头孢哌酮钠、10 万 U/L 青霉素、100mg/L 链霉素的 RPMI 1640 培养基中, 倒置镜下计数肝细胞产量, 台盼蓝拒染试验检测细胞活率。将上述肝细胞悬液以  $5 \times 10^5$  / ml 接种到预先用鼠尾胶被覆的培养瓶中, 置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱静止培养, 每 2 - 3 天换液一次。

4. 观察指标

观察分离、培养 7d 内肝细胞的形态、活率和功能。

(1) 肝细胞活率 用台盼蓝拒染试验测定, 计数每 200 个肝细胞中活细胞百分比。

(2) LDH 含量 上清中 LDH 含量用全自动生化仪测定。

(3) 蛋白质合成功能 将 37MBq/L [<sup>3</sup>H]-亮氨酸加入培养基中, 置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养 24h。肝细胞用 Hanks 液离心洗涤 2 次, 然后在细胞滤纸上用 10% 三氯醋酸裂解、无水乙醇固定, 用 Beckman-LS9800 液体闪烁仪计数 [<sup>3</sup>H]-亮氨酸的量。

(4) 葡萄糖合成功能 将培养基换成含 160g/L 果糖的 Hanks-HEPES 液, 分别于 1, 4, 8h 取上清在全自动生化仪 (MEGA Toshiba) 上测定葡萄糖的浓度。

(5) 肝细胞形态 倒置镜下观察肝细胞形态。

5. 统计学处理

结果用  $\bar{x} \pm s$  表示。用 Stata 6.0 软件进行方差分析 (ANOVA)。当  $P < 0.05$  为有显著差异。

结 果

1. 分离、培养肝细胞结果

A、B 两组平均每个肝分别获得  $4.29 \times 10^9 \pm 1.45 \times 10^9$  个和  $3.34 \times 10^9 \pm 1.26 \times 10^9$  个肝细胞, 平均每克肝组织分别获得  $5.1 \times 10^7$  个和  $4.0 \times 10^7$  个肝细胞, 分离肝细胞的平均活率分别为  $98.6\% \pm 1.7\%$  和  $90.2\% \pm 2.5\%$ 。肝细胞活率随着培养时间的延长有所下降, A、B 两组培养 7d 肝细胞活率分别为  $89.5\% \pm 2.8\%$  和  $78.2\% \pm 4.5\%$ , 两组分离的肝细胞总量、平均每克肝组织获得肝细胞数量和活率有显著差异 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。

倒置镜下可见新分离的活肝细胞呈透亮, 具有立体感的圆形细胞 (图 1), 培养 24h 后, 70% - 80% 肝细胞贴壁, 贴壁细胞在第 1 - 3d 呈圆形, 单核, 在第 4 - 10d 开始呈多角形, 单核, 细胞大小、形态略有不同。培养的肝细胞可传代, 并可培养 3 月, 但其功能下降。

2. LDH 含量

LDH 含量培养初期随着时间的延长而增加, 3d 后逐渐下降 ( $P < 0.05$ ); A、B 两组之间无显著差异 (表 1)。

3. 蛋白质和葡萄糖合成功能

肝细胞内 [<sup>3</sup>H]-亮氨酸量在 7d 的培养中保持稳定并略有增高; 葡萄糖合成功能 3d 后逐渐下降 ( $P < 0.05$ )。A 组肝细胞蛋白质合成功能和葡萄糖合成功能较 B 组为强 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。

表 1 分离、培养肝细胞活率、LDH 含量及蛋白质、葡萄糖合成功能变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

组 别	培养天数	检 测 指 标			
		肝细胞活率 (%)	LDH 含量 (fkat/cell)	[ <sup>3</sup> H]-亮氨酸量 (μBq/cell)	葡萄糖合成 (nmol/cell)
A(n=5)	0	98.6 ± 1.7*	0.0 ± 0.0 <sup>◇</sup>	39.2 ± 4.2* <sup>+</sup>	1.04 ± 0.16* <sup>+</sup>
	1	96.6 ± 3.0*	44.5 ± 28.4 <sup>△</sup>	39.5 ± 5.1*	1.05 ± 0.14* <sup>+</sup>
	3	91.2 ± 3.2	51.0 ± 24.2 <sup>△</sup>	38.3 ± 6.3*	0.75 ± 0.10*
	5	90.3 ± 2.1*	25.3 ± 20.4	42.4 ± 5.3*	0.65 ± 0.10*
	7	89.5 ± 2.8*	23.1 ± 25.7	45.2 ± 4.3*	0.48 ± 0.08*
B(n=5)	0	90.2 ± 2.5	0.0 ± 0.0 <sup>◇</sup>	30.2 ± 3.8	0.82 ± 0.13 <sup>+</sup>
	1	90.0 ± 3.2	45.3 ± 28.3 <sup>△</sup>	31.6 ± 4.9	0.80 ± 0.15 <sup>+</sup>
	3	88.3 ± 1.8	56.3 ± 25.2 <sup>△</sup>	32.1 ± 4.6	0.46 ± 0.09
	5	84.6 ± 2.7	29.5 ± 26.3	32.5 ± 5.3	0.32 ± 0.08
	7	78.2 ± 4.5	24.6 ± 27.9	33.2 ± 4.9	0.29 ± 0.10

注: \* 与 B 组同天比较,  $P < 0.05$ ; <sup>◇</sup> 与其他各天比较,  $P < 0.05$ 。  
<sup>△</sup> 与 0、5、7 天比较,  $P < 0.05$ ; <sup>+</sup> 与 3、5、7 天比较,  $P < 0.05$ 。

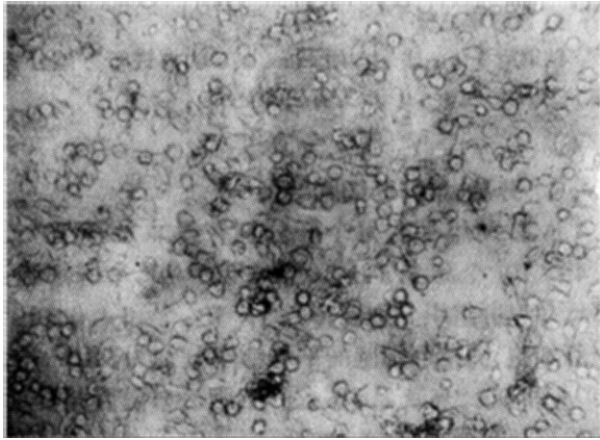


图1 倒置镜下原位胶原酶循环灌注法分离的肝细胞

## 讨 论

构建 BAL 需要大量结构和功能良好的肝细胞,除肝细胞株可通过体外增殖而获得外,原代肝细胞必须从肝脏分离。理论上讲,人肝细胞最为理想,但由于供肝的短缺,限制了其在 BAL 治疗上的应用。猪肝细胞在形态学和生物功能等方面相比其他动物供肝与人肝细胞更具相似性,是 BAL 合适的异种肝细胞来源。已有成功应用猪肝细胞构建生物人工肝支持系统治疗暴发性肝衰竭模型动物和急性肝衰竭患者的报告<sup>[1,3]</sup>。为此制备大量高活性的猪肝细胞成了发展 BAL 的关键技术之一。

肝细胞分离的方法主要有机械法、螯合法和酶消化法。机械法是利用机械剪切及强力吹打等物理方法将肝细胞与肝内结缔组织及 Glisson 鞘等相分离,其优点是操作简单、成本低和所分离的细胞膜上的蛋白质成分性质不易发生改变。但由于肝脏组织胶原丰富,细胞间通过桥粒和纤维结缔组织等多种连接方式紧密连接,结构致密,所以机械法获取的肝细胞产量低,细胞活性也差,现在很少用机械法获取肝细胞。

$\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  等在细胞间桥粒连接中起重要作用,螯合法采用 EDTA、EGTA 及柠檬酸盐等螯合剂与  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  等结合后,可使细胞间的桥粒断开,有利于细胞分离。但单独使用螯合剂分离细胞的效果较差,对细胞损伤较大,产量低,现在很少单独使用,常与酶消化法结合使用,可以提高细胞的获取率。

多种蛋白水解酶可被用来分离肝细胞,其中最常用的是胶原酶,用胶原酶分离法可获得较高的细胞产量和活性细胞,并且其细胞膜上的蛋白质成分

能得到较完整保存。1967 年 Howard 等率先采用胶原酶消化法,1969 年 Berry 等首先将之应用于肝原位灌注,建立了胶原酶及透明质酸酶灌注肝的方法,大大提高了肝细胞产量及活率,为酶灌注法奠定了基础。随后,Ingebretsen 等单用胶原酶灌注肝也获得了同样的效果。1976 年 Seglen 将 EDTA 灌注法与胶原酶灌注法相结合,建立了原位两步灌注分离法分离大鼠肝细胞,即先用含 EDTA 的无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  的 Hanks 液灌注,以解离细胞间连接,再用胶原酶灌注,从而分离出完整无损的肝细胞。该方法对细胞膜的损伤小且细胞分离彻底,所以肝细胞获取率、活率都较其他方法高。文献报告肝细胞产量可达 75% - 85%,游离肝细胞活率可达 90% 以上。酶虽对肝细胞膜表面受体具有潜在损伤作用,但通过短期培养可得以恢复<sup>[7]</sup>。

胶原酶消化法分离肝细胞已成为获取肝细胞的主要分离方法。尽管原位胶原酶灌注法分离大鼠肝细胞的方法已经建立了 20 多年,但迄今为止,仍然没有一种标准、有效的大动物肝细胞分离方法。因为对大动物(如猪)的肝脏,原位法不仅有较高的技术要求,而且肝细胞分离的效果尚不满意。因此,目前猪肝细胞的分离多采用离体胶原酶灌注法。

从实质脏器分离出其中的功能性细胞,有很多过程会造成细胞的损伤。这其中存在热缺血损伤、酶的过度消化、缺血-再灌注损伤、低温复温损伤等。肝原位灌注法热缺血时间为零,避免了热缺血损伤。在消化过程中,酶的种类、浓度、用量、温度和作用时间非常重要。一般认为,胶原酶只消化细胞间质,而对细胞无明显损伤,所以分离、培养肝细胞效果最好,而胰蛋白酶既消化细胞间质又消化细胞本身,所以分离、培养肝细胞的效果相对较差。本研究去除胰蛋白酶,而单用胶原酶,减少了胰蛋白酶对分离细胞的影响。大动物的肝脏体积和其胶原的含量均较鼠类大,因此酶的用量和作用时间均要延长,而胶原酶价格昂贵。因此,我们在技术上进行了一些改进,自行设计了一种循环灌注系统,利用少量胶原酶循环灌注法取代原来的用大量胶原酶灌注的方法。本研究对照组未采用循环灌注系统,分离所用的胶原酶量明显大于循环灌注法。胶原酶的浓度一般采用 0.05%,浓度过高虽可提高消化效果,但也增加了对细胞的不利影响。胶原酶灌注时保持在 37℃,可更好地发挥酶的作用,温度偏低影响酶的活性,反之则影响肝细胞的活性。另外,我们发现胶原酶最好现用现配。胶原酶的消化时间也要控制。文献报告胶

原酶热消化 15min 对肝细胞活率的影响最小,热消化 30min 对肝细胞活率略有影响,热消化 60min 大部分肝细胞受损,培养难以存活。本研究胶原酶灌注时间为 15-30min,在灌注结束后,用胶原酶继续消化 15min,结果表明细胞分离效果更为满意。

此外,在前灌注时应用 D-Hanks 液,因为无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  缓冲液会增加分离肝细胞的产量。但是如果无  $\text{Ca}^{2+}$  溶液灌注时间超过 1h,肝细胞将出现不可逆的损害;另外,因为胶原酶是一种需要  $\text{Ca}^{2+}$  活化的酶,胶原酶灌注时需包含一定浓度的  $\text{Ca}^{2+}$ ,因此,胶原酶应用含  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  的 Hanks 液配制。肝细胞纯化时应采用低温(0-4℃)离心。

每克肝组织含  $1 \times 10^8$  肝细胞。应用本方法可获得大量的猪肝细胞,每克肝组织获得  $5.1 \times 10^7$  个肝细胞,肝细胞获取率达 52%,活率在 98.6%,较离体灌注法为高<sup>[8]</sup>,提示本研究所用的肝细胞分离方法是可行的。

分离的猪肝细胞在一定培养条件下培养,能较好地维持其形态结构、活率和代谢能力。本研究结果表明,经原位胶原酶循环灌注法分离的肝细胞蛋白质合成功能和葡萄糖合成功能均较对照组为强;培养一周内其蛋白质合成功能随着培养时间的延长逐渐升高;葡萄糖合成功能 3d 后逐渐下降。分析与

原位胶原酶循环灌注法分离、培养的肝细胞活率较高有关。LDH 是反映肝细胞损害的一项指标,本实验表明培养 3d 后 LDH 含量逐渐下降,表明新制备的肝细胞悬液由于受分离过程中胶原酶和其他因素的影响,肝细胞膜受到不同程度破坏,而经培养后肝细胞膜重新恢复完整<sup>[7]</sup>。

因此,我们采用的原位胶原酶循环灌注法既减少了胰蛋白酶对分离肝细胞的影响,又保证了分离的肝细胞的产量、活率和功能,从而为猪肝细胞用于 BAL 提供了条件。

### 参 考 文 献

- [1] Xue YL, et al., 1999, *World J Gastroenterol.*, **5**: 308 - 311.
- [2] Funatsu K, et al., 2001, *Artif Organs.*, **25**: 194 - 200.
- [3] Khalili TM, et al., 2001, *Artif Organs.*, **25**: 566 - 570.
- [4] Vilei MT, et al., 2001, *Int J Artif Organs.*, **24**: 392 - 396.
- [5] Yanagi K, et al., 2001, *Artif Organs.*, **25**: 1 - 6.
- [6] Gao Y, et al., 2001, *World J Gastroenterol.*, **6**: 365 - 370.
- [7] Kardassis D, et al., 1999, *Transplant Proc.*, **31**: 668 - 669.
- [8] Gerlach JC, et al., 2001, *Int J Artif Organs.*, **24**: 793 - 798.

## IN SITU RECIRCULATING COLLAGENASE PERFUSION METHOD FOR ISOLATION OF PIG HEPATOCYTES

CHEN Zhong\*<sup>\*\*\*</sup> DING Yi Tao<sup>\*\*</sup>

(\* Department of General Surgery, Affiliated Hospital, Nantong Medical School, Nantong 226001

(\*\* Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Drum Tower Hospital, Medical School, Nanjing University, Nanjing 210008)

**ABSTRACT** In this study, we established in situ recirculating collagenase perfusion method for isolation of pig hepatocytes and compared it(Group A)with extracorporeal two-step collagenase perfusion method(Group B). Portal vein and inferior vena cava in pigs were cannulated. Pig hepatocytes were isolated by in situ D-Hanks solution and recirculating collagenase perfusion method using domestic circulating perfusion apparatus, and cultured at  $5 \times 10^5/\text{ml}$  in serum-contained medium. Yield, viability, protein and glucose syntheses, and LDH activity were evaluated during 7d of culture. These indices were all determined in the Group B. The results showed that yield of isolated hepatocytes was  $5.1 \times 10^7/\text{g}$  liver tissue in group A. Cell viability was 98.6% on day 0 and 89.5% on day 7. Protein synthesis of hepatocytes was stable over the course of 7 d. Glucose synthesis of hepatocytes declined from  $1.05 \pm 0.15 \text{ nmol/cell}$  on 1d to  $0.74 \pm 0.09 \text{ nmol/cell}$  on day 3. The yield and viability were higher and protein synthesis and glucose synthesis of the hepatocytes in Group A were much effective than in Group B. Therefore, large quantities of hepatocytes with high viability and better function could be acquired by in situ recirculating collagenase perfusion method for isolation of pig hepatocytes.

**Key words:** Hepatocyte Isolation Collagenase Culture Bioartificial liver

# 细胞生物学杂志

25 卷第 2 期 2003 年 4 月

## 目 录

### 专论与综述

- 肥大细胞活化及生存 ..... 康丽娜等(65)
- gp130 介导的信号转导通路在哺乳动物着床中的作用 ..... 刁红录等(69)
- 泛素-蛋白水解酶复合体通路在卵母细胞减数分裂和受精中的作用 ..... 霍立军等(73)
- 微管动力学相关蛋白的研究 ..... 李爱群 周建伟(78)
- NKT 细胞亚群 ..... 张 勇 王福庆(81)
- B 淋巴细胞刺激因子 ..... 孙 剑(85)
- B7 分子家族及其配体 ..... 陶 箭(87)
- 赤霉素信号转导研究进展 ..... 袁高峰 汪俏梅(90)

### 研究工作

- 特异性下调 GRP94 对人大肠癌细胞生物学特性的影响 ..... 陈 瑶等(94)
- 成体骨髓源多能间充质干细胞体内分化皮肤干细胞和皮肤组织 ..... 邓为民等(98)
- 两种 A 类氨基酸转运蛋白部分功能差异的研究 ..... 明 洪等(104)
- 犬 2 型腺病毒 E1 转化细胞系的特性研究 ..... 邱 薇等(108)
- CNTF 对 NMDA 引起大鼠海马神经元 NOS 活性改变的影响 ..... 刘 芳等(113)
- 绵羊卵泡成分对卵母细胞体外减数分裂调控的研究 ..... 布 赫 旭日干(116)
- LeETR1 反义基因对番茄的遗传转化 ..... 杨虎清等(120)

### 实验技术

- 原位胶原酶循环灌注法分离猪肝细胞 ..... 陈 钟 丁义涛(124)

\* \* \* \* \*

## 胶 原 酶 (工 具 酶)

上海医药工业研究院研制的注射用胶原酶冻干粉剂于 1993 年被批准为国家一类新药(治疗腰椎间盘突出症),获国家科技进步三等奖及原国家医药管理局科技进步二等奖。扩大应用于前列腺增生症已完成临床试验(国家五类新药),用于清创去疤的胶原酶软膏也已申报国家四类新药临床批文。

除医药用途外,胶原酶作为工具酶还应用于细胞分离、细胞移植等各种研究中,受到大专院校、医疗及研究单位的欢迎,销售遍及全国各地。酶活高于 300U/mg,使用效果完全可与国外进口试剂规格产品媲美,而且价格低廉,供货及时。有特殊要求可以洽商。

联系地址:上海市北京西路 1320 号综合科研楼 608 室 邮编:200040 电话:(021)62479134

(021)62479808-454,482,499 传真:(021)62479134 联系人:张蓓蕾 崔守岩

E-mail: saiyi88@hotmail.com