

人胚胎肝上皮样细胞的体外培养

裴许芳 于志兰

(中国医学科学院肿瘤研究所)

由于大部分恶性肿瘤是来源于上皮细胞,人们对于上皮细胞体外培养的研究越来越重视,并取得了较快的进展。尤其近些年来,人体许多组织器官的上皮细胞已可较长期体外培养,并进行传代和克隆生长^[1]。

一般说来,获得体外培养用的肝脏上皮细胞的方法主要有二种。一种是用肝组织小块外植培养^[2];另一种则利用一些酶和螯合剂(如胶原酶、EGTA等)灌注消化肝组织^[3]。本文应用胶原酶等直接消化人胚胎肝组织小块的方法,获得了活率较高和较纯的肝上皮细胞。在低钙、低血清并加有多种因子的199培养液中,细胞可存活一个月以上。部分原代培养细胞一次传代后,可继续增殖,长成成片的上皮细胞。本文对一些生长因子进行了比较,初步结果表明,表皮生长因子、霍乱毒素、牛脑垂体提取液、转铁蛋白、肝细胞生长因子均对肝上皮细胞的生长及生物功能有不同程度的刺激作用。

材料和方法

一、人胚胎肝的来源

标本取自胎龄为4—5个月左右的经水囊引产的胎儿,按裴许芳等的方法^[4]处理。

二、胚肝组织小块的消化

新鲜胚肝组织切成约1mm³小块,用L-15液尽量洗去血细胞。消化液含0.2%胶原酶和1%聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP,均为Sigma产品)。组织小块和消化液的体积比是1:2,于37℃不时摇动下消化15分钟,或放4℃冰箱消化过夜。消化完全的组织小块可用滴管吹打散开。消化不完全而吹打不开者,可重复37℃消化15分钟。消化得到的细胞悬液加入少量牛血清蛋白或新生小牛血清,置4℃冰箱15分钟,多数上皮细胞沉于管底,而血细胞及组织碎片等仍多浮于悬液中,换液时被弃去。管底细胞再加

L-15液及牛血清蛋白等悬浮自沉一次,可获得较纯的上皮细胞。此外,细胞悬液也可加少量血清后低速离心3—5分钟以收集胚肝上皮细胞。用台盼蓝染色判断所得细胞的活率,用血球计数板计算细胞数。

三、胚肝上皮细胞的单层培养

先用小牛血清或胶原包被60mm直径培养皿和24孔培养板(孔径20mm),种入约10⁵细胞/cm²。培养液为无钙199培养基另加氯化钙0.6×10⁻³mol/L、新生小牛血清1.25%、胰岛素5ug/ml、氢化可的松5×10⁻⁷mol/L表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)5ng/ml、谷氨酰胺2×10⁻³mol/L、微量元素液(成份及用量见[1][4])、庆大霉素40ng/ml、HEPES15×10⁻³mol/L碳酸氢钠1.6g/L。每皿加2ml,每孔加1ml这样的培养液放CO₂孵箱中培养。于培养6小时后首次换液,以后每隔2天换液一次。在观察一些生长因子的作用时,于以上培养液中分别添加不同浓度的小牛血清或人胚血清;另外在以上不含EGF的培养液中分别添加EGF5ng/ml、霍乱毒素(cholera toxin, CT)5ng/ml、转铁蛋白(Transferrin, TF)5ng/ml、肝细胞生长因子(liver cell growth factor, LGF)20ng/ml(均Sigma产品)及牛脑垂体提取液(bovine pituitary extract, PE,由美国NCI Dr. Lechner赠送)。传代培养时用0.02%胰酶-0.01%EGTA-0.5%PVP消化细胞。

四、细胞的观察及生物功能鉴定

除定期在倒置显微镜下观察细胞的生长状况外,尚用Giemsa染色经甲醇固定的细胞以观察其形态。细胞的谷氨酰转氨酶(r-GT)染色采用Rutenburg等所介绍的方法^[5]。培养不同时间的细胞的培养液收集冻存于-20℃冰箱。应用北京原子能所生产的固相放射免疫试剂盒测定培养上清中的甲胎蛋白(AFP);应用日本岛津CL-720微量流动式分光光度计测定培养上清中的白蛋白。生长因子对细胞生长的影响,除镜下观察细胞的形态和生长状况外,还用³H-胸腺嘧啶核苷(³H-TdR)掺入值作为细胞分裂的指征。先将含³H-

蛋白测定承蒙本所临床生化室贾得强同志协助,特此致谢。

TdR(1 uCi/ml)的培养液于24孔板培养细胞20小时,用生理盐水洗涤3次(洗涤液中测不到放射性),然后用胰酶-EGTA-PVP消化液消化下全部细胞并收集在玻璃纤维滤纸上,于液体闪烁计数器中测定其放射性。

结 果

15例4—5月左右胎龄的新鲜胚肝组织小块经用上述胶原酶直接消化方法,均获得细胞得活率均在85%以上,分散也较好的肝细胞悬液。尤其以4℃消化过夜的效果更好。接种4小时后半数以上的细胞贴壁,3天左右培养皿或孔中即出现3—5个细胞一群的新生细胞集落,并向周围生长。主要可见二种形态的肝上皮样细胞,大多数为胞浆颗粒较多、体积较小的上皮样细胞;少数为胞浆透明、体积较大的上皮样细胞,二者的细胞核和核仁均明显(图1)。另外,培养皿或孔中也可见到一些成纤维细胞和血细胞。

肝上皮样细胞分别在无血清、1.25%,3%、5%及10%小牛血清或人胚血清培养液中培养,短期内均生长良好,差别不明显。但时间一长,显然在血清浓度较高(5%以上)的

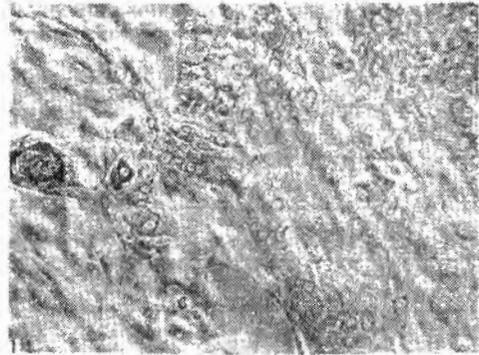


图1 在1.25%人胚血清中培养21天的人胚肝上皮样细胞

可见两种形态及大小不同的上皮样细胞及少量成纤维细胞(相差×10)

培养液中的细胞具有较强的生长能力,亦较易成功地传代。不过成纤维样细胞的增殖也随之旺盛,并且会逐渐占优势。而无血清及低血清(3%以下)培养液则不利于成纤维细胞的生长,此时肝上皮样细胞虽然生长密度和速度不如在高浓度血清中,但可以维持较纯的上皮细胞培养。从胎儿腹腔血液所获的血清对细胞的生长具有明显的抑制作用,而取自胎儿心脏血液的

表1 各种生长因子对培养二周的人胚肝细胞³H-TdR掺入值的影响(cpm)

编号	分组	对照	+ EGF	+ CT	+ PE	+ TF	+ LGF
1		1417	3611	3764	911	2355	3987
2		2171	3280	1773	1736	3135	812
3		1558	7377	3323	2026	1943	4525
4		1501	4739	1904	2368	1886	
5		1576	4975	3944	1106	2310	4364
6		2056	3525	2483	2144	2776	1075
7		1713	7646	3384	1535	2095	3809
8		2189	5346	2792	2001	1892	
	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	1773 ± 113	5062 ± 602	2921 ± 293	1728 ± 183	2299 ± 162	3095 ± 689
	与对照比较 t值		5.427	3.698	0.212	2.694	2.369
	P值		<0.001	<0.01	>0.5	<0.05	<0.01

表 2 人胚肝上皮样细胞的培养液中的白蛋白测定结果(g/100 ml)

培养天数 分组	未加因子前	3	5	7	9	11	13
不加因子	0.047	0.039	0.047	0.103	0.051	0.063	0.067
+ EGF	0.055	0.330	0.298	0.362	0.302	0.275	0.290
+ CT	0.063	0.326	0.279	0.279	0.290	0.275	0.306
+ PE	0.055	0.302	0.275	0.294	0.286	0.330	0.279
+ TF	0.063	0.211	0.227	0.255	0.191	0.211	0.251
+ LGF	0.039	0.227	0.207	0.195	0.187	0.223	0.195

* 各因子于培养 1 天换液时加入。表中均为 2 份样品的平均值。不含培养物的培养液的白蛋白含量为 0.016 g/100 ml。

表 3 人胚肝上皮样细胞的培养液中 AFP 测定结果*(cpm)

培养天数 分组	3	5	7	9	11	13
未加因子	1073	1090	415	289	260	192
+ EGF	1286	987	686	350	296	191
+ CT	1148	1032	659	431	352	215
+ PE	1473	1181	710	432	190	191
+ TF	1082	1042	617	457	308	257
+ LGF	1686	1615	1022	542	352	228

样品每份取 200 μ l 与经抗 AFP 抗体的珠作用, 再加 125 I-抗 AFP 抗体 200 μ l 作用后, 取珠用 Beckman LS 9000 测其 CPM 值。未加抗 AFP 抗体的培养液的本底值为 156。

血清则显然优于小牛血清。

短期培养生长良好的肝上皮样细胞大多数 r-GT 阳性; 培养时间较长, 不再增殖而呈维持状态的上皮样细胞, 则为 r-GT 阴性。生长良好、密集或成团的细胞, 在传代培养后, 仍可长成成片的上皮样细胞, 并可维持较长的体外生存时间。

EGF、CT、TF、LGF 及 PE 等生长因子均对胚肝上皮样细胞的生长或生物功能有一定的刺激作用。 3 H-TdR 掺入显示细胞的 DNA 合成增加, 尤其以 EGF 的刺激效应比较明显和稳定; PE 虽无明显刺激作用, 但亦未见抑制作用(表 1); 而各种生长因子对胚肝上皮细胞合

成白蛋白的刺激效应均比未加因子的对照组明显(表 2)。但从培养上清液中测定 AFP 的结果, 无明显差异。各组均随培养时间的延长而含量很快下降, 虽然下降的快慢稍有不同(表 3)。因为白蛋白和 AFP 均为肝上皮细胞的特异性产物, 从而证明所培养的细胞为具有一定生物功能的肝上皮细胞。

讨 论

本实验室曾利用外植块—细胞培养方法获得较纯的生长良好的人胚肝上皮细胞⁽⁴⁾。鉴于由培养的外植块长出上皮细胞所需要的时间较长(约 10 天左右), 各块组织长出上皮细胞的数

量也不尽相同,所以我们又采用了用胶原酶直接消化组织小块的方法。应用该方法不仅可以很快获得实验所需的大量较纯的胚肝上皮样细胞,并且由于细胞的接种数量易于掌握,便于对各种实验因素进行分组比较。从15例人胚肝上皮样细胞成功培养的经验看来,标本新鲜及营养条件适宜对于上皮细胞的生长很重要。由于L-15液不含碳酸氢钠缓冲系统,而以碱性氨基酸及磷酸盐等保持pH值的恒定,又含有多种营养成分⁽⁶⁾,所以在组织的存放、剪切及洗涤等操作过程中应用L-15液对保存细胞活力很有助益。另外,在消化液中添加PVP对细胞也具有保护作用⁽⁷⁾。在培养液中增加适当的生长刺激因子可促进胚肝上皮细胞的生长,低血清或无血清培养则利于控制成纤维细胞的生长。本文所报道的实验结果,为探索人胚细胞体外培养方法方面提供了可借鉴的途径。同时人胚肝上皮细胞的较长时间体外培养的成功,也可为研究肝细胞的细胞生物学以及癌变等问题提供了一个新的实验模型。

摘 要

用胶原酶直接消化人胚肝组织小块,可以简便、快速地获得大量活率较高和较纯的肝上皮样细胞。在低钙、低血清浓度加有多种因素

的培养液中,胚肝上皮样细胞可以体外培养一月以上。原代培养的胚肝上皮样细胞一次传代后,仍可保持一定的生长能力。表皮生长因子、霍乱毒素、转铁蛋白及肝细胞生长因子等均对培养的胚肝上皮样细胞具有一定的生长刺激作用。

本文还用r-GT染色、AFP和白蛋白测定,以及³H-TdR掺入等指标观察了培养过程中胚肝上皮样细胞的生长、增殖和生物学功能。

人胚肝上皮样细胞的较长期体外培养,可望成为研究肝细胞生长、分化及癌变的一个有用的实验模型。

参 考 文 献

- [1] J. F. Lechner et al., 1981, *Cancer Res.* 41: 2294—2304.
- [2] W. D. Hillis and F. B. Bang 1962, *Exp. Cell Research* 26: 9—36.
- [3] G. M. Williams et al., 1971, *Exp. Cell Research* 69: 106—112.
- [4] 裴许芳等, 1985, *中华病理学杂志* 14 (3): 169—171.
- [5] A. M. Rutenburg et al., 1969, *J. Histochemistry and Cytochemistry* 17: 517—526.
- [6] A. Leibovitz, 1963, *A. J. Hygiene* 78: 173—180.
- [7] A. Leibovitz, 1986, *Cancer Genetics and Cytogenetics* 19: 11—19.

低密度脂蛋白的酶标和免疫酶标的定位研究*

楼定安 钱 浩

(浙江医科大学病理解剖学教研室)

Brown和Goldstein(1974)提出细胞表面存在着特异性的高亲和力的低密度脂蛋白(low density lipoprotein, 简称LDL)受体^[1,2]。一般研究者多用放射性配体(¹²⁵I-LDL)结合法来研究LDL受体的功能,也曾有人用荧光素、铁蛋白标记或冰冻蚀刻等方法进行了形态学的研究^[3-5]。考虑到酶标技术比较稳定而易行,又

无放射性污染,既可作为形态观察,也可用分光光度计作定量测定等优越性,故本实验室采

* 本文摘要见“中国细胞生物学学会1983年会议”《论文摘要汇编》, p.84-85。

“Abstracts of the Papers Presented at the Third International Congress on Cell Biology” August 26-31, 1984, Tokyo, Japan, p. 321.