

牛肝脏细胞体外培养和传代细胞的初步鉴定

冯振月¹ 刘德福² 宋佰芬¹ 范钊玮¹ 崔玉东^{1*}

(¹黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 大庆 163319; ²黑龙江省农科院大庆分院, 大庆 163000)

摘要 该文采用灌注胶原酶消化法分离牛肝细胞, 通过DMEM培养基(含10%胎牛血清)体外连续进行原代和传代培养, 观察细胞增殖变化及细胞培养过程中的形态消涨变化情况。该文还对第12代培养细胞的染色体情况及细胞生长情况进行分析, 同时采用PAS染色法进行糖原含量鉴定。结果显示, 分离的肝细胞群体倍增时间为62.8 h, 染色体为60条, PAS染色观察发现, 培养细胞质中有大量糖原颗粒。

关键词 牛肝细胞; 形态消涨变化情况; 传代细胞; 初步鉴定

In Vitro Culture of Bovine Hepatocytes Cells and Preliminary Identification of Subculture Cells

Feng Zhenyue¹, Liu Defu², Song Baifen¹, Fan Zhaowei¹, Cui Yudong^{1*}

(¹College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;

²Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Sciences, Daqing 163000, China)

Abstract Collagenase perfusion method was used to isolate the cells from bovine hepatocytes, in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), continuous primary and subculture *in vitro* and proliferation and morphological changes during cell culture was observed. The chromosome and cell growth curve of the 12th passage of the cells were analyzed, at the same time, Glycogen was tested by periodic acid schiff (PAS). The results showed that the population doubling time for the 12th passage of the cell line was 62.8 h. There were 60 chromosomes and a large number of glycogen granules were observed in the cytoplasm PAS staining.

Keywords bovine cells; morphological characteristics; passage cells; preliminary identification

肝细胞是高度分化的细胞, 具有丰富的酶系及多种特异功能, 被广泛用于生物化学、实验性肝损伤、药代动力学、毒理学和致癌作用等的研究; 而原代培养的肝细胞是肝细胞移植、生物人工肝的最佳生物材料^[1], 同时也被广泛应用于体外模型中的肝脏毒性测试^[2]。肝细胞分离培养技术的发展已有几十年的历史, 目前以大鼠、小鼠、猴、猪、狗、兔、鸭、鱼等作为肝源的原代培养肝细胞已广泛用于科学研究各领域^[3]。在兽医实践中, 常常会遇到犊牛的肝

脏疾病, 如肝营养不良、化脓性肝炎和肝硬化, 成年牛羊一些常见疾病也多与肝脏疾病有关, 因此急需建立一个来自于正常肝脏的细胞系。对于犊牛肝细胞的分离培养, 国外有几篇相关报道, 但是肝细胞培养的时间较短。牛肝脏细胞目前国内外还没有建系的报道, 但是动物体细胞建系在技术上已经比较成熟, 很多物种的多个组织器官的体细胞均有建系报道, 而牛的许多组织的体细胞均有建系的报道, 如牛乳腺上皮细胞系^[4]、牛肾脏细胞系^[5]、牛角膜细胞系^[6]等。牛肝脏虽然没有建系的报道, 但是在其他物种如大鼠、小鼠等中均有肝脏细胞系, 因此, 建立一个来源于牛肝脏的细胞系并观察原代及传代培养过程中细胞的变化过程, 在理论上是可行的。

体外肝细胞培养是研究肝细胞功能的有效方

收稿日期: 2018-09-30 接受日期: 2018-11-13

*通讯作者。Tel: 13836962508, E-mail: 1016856109@qq.com

Received: September 30, 2018 Accepted: November 13, 2018

*Corresponding author. Tel: +86-13836962508, E-mail: 1016856109@qq.com

网络出版时间: 2018-12-28 17:09:55

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181228.1709.018.html>

法,虽然体外原代培养的肝细胞没有神经和体液的调节作用,但是肝细胞脱离了动物机体复杂的生理环境,使得实验因素简单化且易于操控,有利于进行细胞生物学和细胞病理学方面的研究,同时肝细胞的体外培养对于研究肝细胞的功能与细胞因子的作用、观察药物的代谢和致癌性以及构建生物人工肝均具有十分重要的意义^[7-8]。为获得长期存活的肝细胞,本实验对原代肝细胞进行了长期培养,观察了其形态学变化过程,并对培养到12代的肝细胞进行了初步的鉴定。

1 材料与方法

1.1 实验材料

用于获得原代细胞的牛肝脏来自黑龙江大庆市郊某新生小牛牛血清制备厂,小牛为1日龄。

1.2 实验试剂

DMEM培养基和胎牛血清购自Hyclone公司;细胞培养器皿购自Nunc公司;II型胶原酶购自Invitrogen公司;牛胰岛素和地塞米松购自Sigma公司。

1.3 实验方法

1.3.1 取肝脏及运送回实验室 无菌采取牛肝脏尾状突约40 g,向尾状突切面上的静脉管插上导管,连上100 mL玻璃注射器,用4 °C冲洗液A(33 mmol/L HEPES, 127.8 mmol/L NaCl, 3.15 mmol/L KCl, 0.7 mmol/L Na₂HPO₄·12H₂O, 0.6 mmol/L EGTA)冲洗,直到冲洗流出的液体无血细胞为止。将其放入2~4 °C灭菌生理盐水(含青霉素、链霉素、两性霉素B)中保存并运送回实验室。

1.3.2 胶原酶液循环灌注法消化牛肝脏 向牛肝脏切面上的静脉管插上导管,连接100 mL玻璃注射器,用37~38 °C冲洗液B(33 mmol/L HEPES, 127.8 mmol/L NaCl, 3.15 mmol/L KCl, 0.7 mmol/L Na₂HPO₄·12H₂O)冲洗,让肝脏升温,有利于胶原酶灌注消化。将肝脏转移到无菌烧杯,浸泡在37~38 °C水浴中,用150 mL、0.05% II型胶原酶灌注消化液(冲洗液B+II型胶原酶)借助玻璃注射器循环灌注消化20~25 min,流速为50 mL/min,持续15 min,然后以同样速率灌注37 °C预热的灌注液B,持续3 min。待流出的液体变清后,进行第二步消化灌注,即以20 mL/min速率灌入37 °C预热的灌注液C,灌注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,使灌注液缓慢流出,待尾状突变软,且流出的灌注液变混浊,第二步灌注大约需要15 min,灌注后肝脏被消化^[7]。

1.3.3 肝细胞的分离及培养 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 μm)、200目(75 μm)及500目(30 μm)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20%新生牛血清、10⁻⁶ mol/L牛胰岛素、10⁻⁶ mol/L地塞米松及双抗的基础培养液)重悬,反复吹打,使细胞分散均匀,接种于6孔细胞培养板,每个孔接种2 mL细胞悬液。接种后,将孔板置于37 °C、5% CO₂细胞培养箱培养,4 h后取出细胞板,吸弃旧培养基,用Hank's液轻轻洗细胞2次,给细胞换新的培养基(含20% FBS,其他成分同上),每孔4 mL,培养19 h后,更换培养基。

1.3.4 肝细胞的传代培养 当细胞铺满瓶底约80%后,在无菌条件下用0.25%胰蛋白酶消化至部分细胞脱壁后终止消化(1 min),细胞重悬后将一半转入新瓶,分别补加20%血清,置于37 °C培养箱中静置培养。起初在15~20天可传代一次,后来传代间隔时间逐渐缩短,细胞生长逐渐趋于稳定,一般传代后4~7天就可再次传代,此时加入血清的浓度降至10%。

1.3.5 生长情况分析 取12代的对数生长期肝细胞,用0.25%胰蛋白酶溶液消化后加新鲜培养基吹打制成单细胞悬液,经计数后调节浓度至2.25×10⁵个/mL,接种于24孔培养板上(1.2 mL/孔),于37 °C培养箱中静置培养。每隔24 h随机收获2孔细胞,计数并计算出细胞浓度,取其平均值。绘出以时间为横坐标,以每mL细胞数量的对数为纵坐标的细胞生长曲线。按Hayflick法(Hayflick L.1973)计算出细胞的群体倍增时间。

1.3.6 染色体分析 取第12代细胞采用常规方法^[9]制作染色体标本。对200群背景干净、染色体分散较好的早中期分裂相和中期分裂相进行了染色体计数和拍照,并对早中期染色体进行了核型分析。

1.3.7 采用糖原染色法鉴定肝细胞 糖原染色(PAS)法鉴定肝实质细胞:将培养皿中培养12代的细胞培养24 h后吸弃培养液,PBS清洗2~3次,以70%的

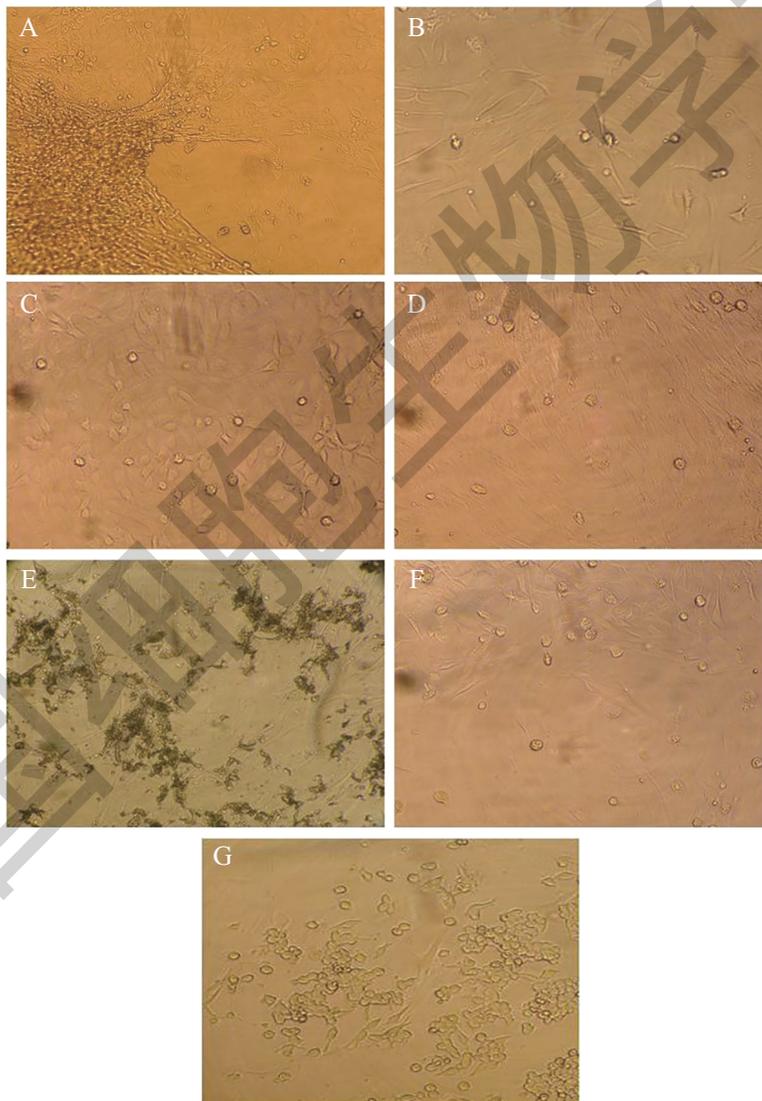
酒精固定10 min, 蒸馏水洗2~3次, 加入高碘酸溶液反应10 min, 蒸馏水洗2~3次, 每次1 min, 继以Shiff液中避光、37 °C染色30 min, 蒸馏水洗2~3次, 每次1 min, 显微镜下观察阳性部位呈现紫红色, 待自然干燥后光学显微镜下观察。

2 结果

2.1 牛肝脏组织的原代培养

在对新生犊牛肝脏组织进行原代培养的1年多时间里, 持续观察和记录了原代和传代细胞培养过程细胞形态学特征和细胞消涨变化情况。原代培

养阶段, 培养第1天肝细胞开始贴壁, 接种的组织块3天左右可以看到肝脏组织中有细胞逸出(图1A), 此时培养的细胞形态多样, 有呈多角形的细胞, 细胞较大(图1B); 也有的细胞是成纤维型或上皮型(图1C和图1D), 经4~5天, 细胞数目不断增加, 贴壁细胞相互接触连接成片, 随着培养时间的延长, 比较薄的细胞及上皮型细胞颗粒化、发黑、收缩、衰退, 最后从细胞瓶壁脱落浮起(图1E), 而那些与成纤维型细胞竞争生长的少量的近圆形细胞增殖速度加快(图1F), 之后圆形细胞数量明显增加(图1G)。3个月后观察到圆形细胞有丝分裂现象(图2), 细胞培养过程中细

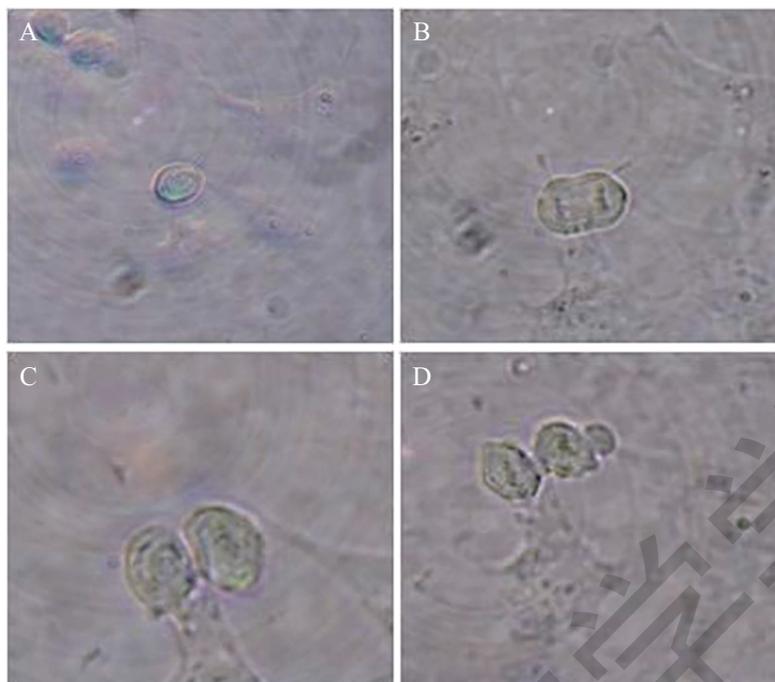


A: 牛肝细胞逸出; B: 多角形细胞; C: 上皮样细胞; D: 成纤维细胞; E: 发黑脱落的细胞; F: 圆形细胞的增殖; G: 牛肝脏细胞形态。放大倍数为100×。

A: escaped bovine liver cells; B: polygonal cell; C: epithelial cells like; D: fibroblast; E: black and exfoliated cells; F: round cell proliferation; G: cell morphology of bovine. The magnification of the picture is 100×.

图1 牛肝脏组织进行原代培养和传代细胞培养过程细胞形态学特征和细胞消涨变化情况

Fig.1 Morphological characteristics and cell changes of bovine hepatocytes during primary culture and subculture



A: 前期; B: 中期; C: 后期; D: 末期。放大倍数为400×。

A: prophase; B: metaphase; C: anaphase; D: telophase. The magnification of the picture is 400×.

图2 体外培养过程中连续观察和记录了牛肝脏细胞有丝分裂的过程

Fig.2 The process of mitosis of bovine liver cells was observed and recorded continuously during *in vitro* culture

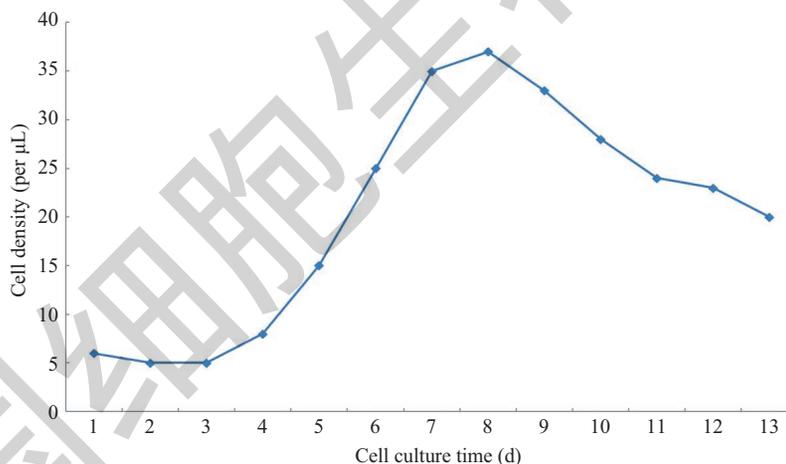


图3 牛肝细胞生长曲线

Fig.3 Growth curves of bovine liver cells

胞核清晰可见, 多为单核和双核, 有时也可见到多核。

2.2 肝脏细胞传代培养

随着传代次数的增加, 细胞的均一性增强, 刚开始培养时15~20天铺满整个瓶底, 此时对其进行传代。按1:2的比例传代, 培养一段时间之后, 5~7天传代1次, 刚传代的细胞形态不均一(图1G)。一个培养瓶中可见两种不同形态的细胞竞争生长, 随着传代次数的增加, 在第9代以后, 随着培养时间的不断延长, 细胞逐渐呈圆形, 细胞生长基本趋于稳定, 细胞

形态比较均匀, 传代细胞基本上能稳定生长繁殖, 传至第12代对细胞进行分析。

2.3 细胞特征

细胞形态以近圆形为主, 细胞密度较低时两端有较小的突起(图1G)。细胞的生长曲线成“S”形(图3), 细胞在接种后48 h进入生长延缓阶段, 这是由于传代时胰酶损伤及机械吹打作用对细胞造成一定的伤害及细胞对新环境的适应引起的。48~168 h是细胞的对数生长期; 168~288 h, 细胞处于衰退期。Hayflick法计算出该细胞的群体倍增时间为62.8 h。



图4 牛肝脏细胞染色体数目和形态(1 000×)

Fig.4 Number and morphology of bovine liver cells (1 000×)

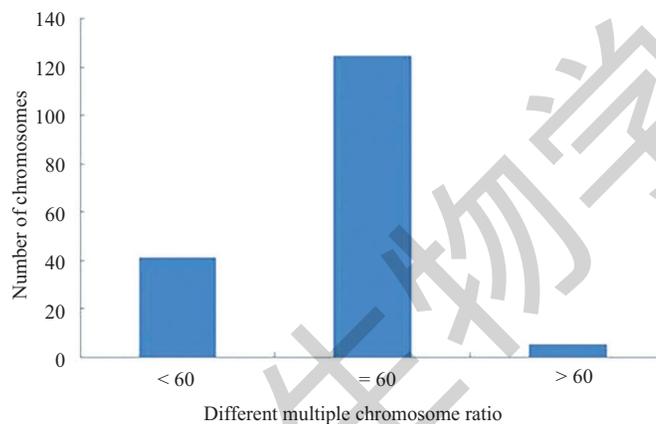


图5 体外培养牛肝脏细胞染色体数目分析

Fig.5 Analysis of chromosome number of bovine liver cells cultured *in vitro*

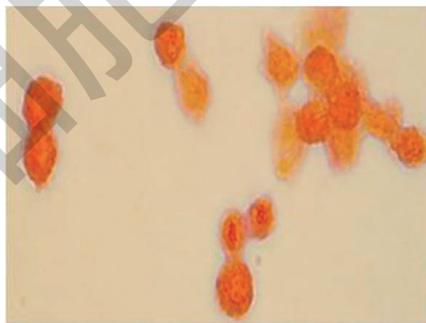


图6 采用PAS染色法对体外培养牛肝脏细胞的分析(400×)

Fig.6 Analysis of *in vitro* cultured bovine liver cells by PAS staining (400×)

对细胞系的早中期染色体进行核型分析发现, 细胞染色体数目为60($2n=60$)的分裂相比例为76.28%, 属二倍体细胞系(图4)。染色体数目为40~60条, 不足二倍体。大于60条的染色体数目比例小, 占2.56%(图5)。对体外培养至第十二代的进行PAS染色, 结果见图6。

3 讨论

肝细胞的分离及体外培养技术始于上世纪40

年代, 最早是采用机械分离法, 适用于小型动物的肝脏及肝组织块的分离, 虽然操作简单, 不需要复杂的仪器和昂贵的胶原酶, 但是细胞产量低, 活率低。19世纪70年代, Selegen采用胶原酶原位两步灌流法分离获得原代肝细胞^[10-11]。首先, 用大量无钙缓冲液经门静脉灌注以利于红细胞和钙离子随灌流液冲出, 继用含有钙离子的IV型胶原酶溶液充分消化肝组织, 从而获得大量活率高、形态好的单个肝细胞,

使得肝细胞的生物学研究取得了很大发展。但该方法存在着酶的用量大、条件复杂、细胞纯度低、存活时间短、增殖及传代困难等问题^[12]。因此,国内各个实验室在分离肝细胞时多采用改良的Seglen方法,对原代肝细胞进行体外分离培养^[7]。

细胞的取材是原代细胞培养成功的首要条件,取材不当会直接影响细胞的体外培养^[13]。2017年,Elgendy等^[2]参考Giantin等^[14]的方法取材时在屠宰场就地取肝脏尾叶后,放入预冷的缓冲液中,而本实验选择用于制备小牛血清的新生小牛作为牛肝脏供体。新生小牛采血后,无菌采取小牛肝脏尾状突,将肝脏置于2~4 °C灭菌生理盐水中保存运送,让肝细胞的各种代谢活动减少或暂停下来,细胞处于一种休眠状态,减少因缺血给肝细胞带来的损伤,而生理盐水相对于Elgendy等^[2]使用的缓冲液成分简单,不利于肝脏细胞的长期保存,因此,我们取材时将整个肝脏取出后运输到实验室采用Selegen胶原酶原位两步灌注法分离获得原代肝细胞,以减少肝脏细胞损伤。

目前肝细胞体外培养技术发展迅速,应用广泛,不仅是研究药物代谢的有效手段,亦是细胞生物学和分子生物学的必需技术。但因受肝细胞体外增殖及活力所限,目前还没有建立一个来源于牛的肝脏细胞系。本实验对肝细胞进行了较长时间的传代培养,并对培养的细胞进行了生长曲线分析、染色体核型分析及糖原分析,初步鉴定所培养的细胞为肝脏细胞。细胞传代培养至第15代后可以进行冻存和复苏,但是复苏的细胞在体外增殖及活力都较差,离细胞建系还有相当距离。因此,虽然理论上动物的任何一种组织器官都可以进行离体培养并建立相应的细胞系,但目前尚未见肝细胞建系成功的报道,主要是因为肝细胞建系主要面临两大难题。(1)细胞增殖能力。尽管正常肝细胞在体内具有相当强的增殖潜力,但在肝功能正常的肝脏中几乎不发生增殖。要长期保持体外培养的肝细胞的增殖能力,则需要在培养基中加入能刺激肝细胞增殖的药剂,例如,添加肝细胞生长因子、表皮生长因子、胰岛素、烟酰胺等。(2)细胞存活力。肝细胞离体后,存活力逐渐降低,也是细胞培养的难点,也有相关研究通过添加抗坏血酸延长肝细胞的存活期和添加氢化可的松提高肝细胞的贴壁能力^[15-16]。因此,进一步深入研究更加有效的肝细胞

体外培养技术迫在眉睫,这对于研究肝脏疾病的发病机制及其临床应用都有十分重要的意义。

参考文献 (References)

- 徐雅玲, 黄巨恩, 刘华刚. 体外原代肝细胞分离培养方法的比较. 广西医科大学学报(Xu Yaling, Huang Juen, Liu Huagang. Comparison of isolation and culture methods of primary hepatocytes *in vitro*. Journal of Guangxi Medical University) 2011; 28(1): 158-60.
- Elgendy R, Giantin M, Dacasto M. Transcriptomic characterization of bovine primary cultured hepatocytes; a cross-comparison with a bovine liver and the Madin-Darby bovine kidney cells. Res Vet Sci 2017; 113: 40-9.
- 刘丽, 季辉, 彭麟, 阮祥春, 吉利伟, 江善祥, 等. 鸡肝原代细胞药物代谢模型的建立与优化. 南京农业大学学报(Liu Li, Ji Hui, Peng Lin, Ruan Xiangchun, Ji Liwei, Jiang Shanxiang, et al. The establish mentand optimization of the drug metabolic model of adult chicken primary hepatocytes. Journal of Nanjing Agriculture University) 2015; 38(1): 127-33.
- 李瑞国, 苗朝华, 安晓荣, 陈永福. 牛乳腺上皮细胞体外分离、培养和鉴定的研究. 中国农业科技(Li Ruiguo, Miao Chaohua, An Xiaorong, Chen Yongfu. Studies of *in vitro* isolation culture and identification of bovine mammary gland epithelial cells. Journal of Agricultural Science and Technology) 2010; 12(4): 68-72.
- 令世鑫, 徐水林, 马伟. 兰州黑白花奶牛肾组织细胞系的建立, 甘肃畜牧兽医(Ling Shixin, Xu Shuilin, Ma Wei. Establishment of kidney cell line in Lanzhou black and white flower cow. Gansu Animal Husbandry and Veterinary) 2016; 46(5): 86-9.
- Robinson J, Gospodarowicz D. Glycosaminoglycans synthesized by cultured bovine corneal endothelial cells. J Cell Physiol 1983; 117(3): 368-76.
- 吴显实, 卫程武, 黄克和. 原代牛肝细胞分离和培养方法的建立. 中国兽医学报(Wu Xianshi, Wei Chengwu, Huang Kehe. Development of the technique for isolation and primary culture of bovine hepatocytes) 2009; 29(2): 203-6.
- 庄鹏, 李志莹, 范紫香, 江元森, 姚集鲁. 改良原代大鼠肝细胞的体外分离培养和功能研究. 热带医学杂志(Zhuang Peng, Li Zhiying, Fang Zixiang, Jiang Yuansen, Yao Jilu. Research on the function and morphometrics of cultured primary rat hepatocytes. Journal of Tropical Medicine) 2008; 8(10): 1024-8.
- Sahara K, Kawamura N, Iizuka T. Analysis of sex chromosome pairings in tetraploid females of the silkworm by using the sex-linked recessive gene. J Seric Sci Jpn 1990; 59: 196-201.
- 张高峰, 郭彤, 魏华, 马珂. 采用Percoll法分离、纯化鲫肝细胞. 中国水产科学(Zhang Gaofeng, Guo Tong, Wei Hua, Ma Ke. Isolation and purification of carassius auratus hepatocytes by the method of Percoll. Journal of Fishery Sciences of China) 2007; 14(2): 208-15.
- 刘学忠, 李慧敏, 王富民, 顾建红, 刘宗平. 大鼠肝细胞分离和原代培养的简易方法. 江苏农业学报(Liu Xuezhong, Li Huimin, Wang Fumin, Gu Jianhong, Liu Zhongping. A simplified method for separation and primary culture of rat hepatocyte. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences) 2009; 25(1): 222-4.
- Morsiani E, Pazzi P, Puviani AC, Brogini M, Valieri L, Gorini

- P, *et al.* Early experiences with a porcine hepatocyte-based bioartificial liver in acute hepatic failure patients. *Int J Artif Organs* 2002; 25(3): 192-202.
- 13 张才, 王利民, 刘国文, 苏蔚, 黄建龙, 谢光洪, 等. 犊牛肝细胞的分离与原代培养. *细胞生物学杂志*(Zhang Cai, Wang Limin, Liu Guoliang, Su Wei, Huang Jianlong, Xie Guanghong, *et al.* The isolation and primary culture of calf hepatocytes. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2007; 29: 880-4.
- 14 Giantin M, Gallina G, Pegolo S, Lopparelli RM, Sandron C, Zancanella V. Primary hepatocytes as an useful bioassay to characterize metabolism and bioactivity of illicit steroids in cattle. *Toxicol In vitro* 2012; 26(7): 1224-32.
- 15 张莉萍, 康格非. 原代肝细胞培养的研究现状. *国外医学临床生物化学与检验学分册*(Zhang Liping, Kang Gefei. Research status of primary hepatocyte culture. *Sect Clin Biochem & Lab Med Foreign Med Sci*) 2004; 25(3): 193-4.
- 16 梁岳, 马广智, 方展强. 剑尾鱼肝细胞原代培养. *中国比较医学杂志*[Liang Yue, Ma Guangzhi, Fang Zhanqiang. Primary culture of Swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) hepatocytes. *Chinese Journal of Comparative Medicine*] 2006; 16(3): 185-8.

中国细胞生物学学报