

文章编号: 1001-411X(2001)01-0066-04

鸡离体肝细胞几种分离方法的比较

江青艳, 傅伟龙, 高淑静, 吴荣辉

(华南农业大学动物科学系, 广东 广州 510642)

摘要: 对鸡肝细胞离体培养中几种分离肝细胞的方法进行了比较. 试验选用 1~56 日龄的粤黄鸡, 分别采用肝组织块培养、肝组织直接通过细胞筛过滤、2.5 g/L 胰蛋白酶消化、2.5 g/L 胰蛋白酶加 0.1 g/L EDTA 消化、不同时间的 4℃冷消化与 37℃消化、淋巴细胞分离液分离、5 g/L 氯化铵除去红细胞等试验方法, 观察了鸡离体肝细胞的分离及培养效果. 结果表明: 采用 2.5 g/L 胰蛋白酶加 0.1 g/L EDTA 消化 10 min, 用淋巴细胞分离液分离后的肝细胞培养效果最好, 肝细胞在培养液中分裂增殖, 生长良好.

关键词: 鸡; 肝细胞; 离体培养

中图分类号: S831.1

文献标识码: A

肝脏是动物机体的重要代谢器官, 机体正常的生长发育与物质代谢均与肝细胞的功能有关. 离体肝细胞培养是研究肝细胞功能的重要方法之一^[1]. 尽管哺乳类动物肝细胞培养技术的建立已有许多成功的报道^[2,3], 但鸟类的肝细胞培养少见报道. 由于鸟类与哺乳类动物在解剖与组织结构上存在较大差异, 因此, 其肝细胞的分离培养条件及离体细胞的增殖特性可能具有不同的特点. 本试验选择不同日龄的粤黄鸡, 分别采用肝组织块培养、肝组织直接通过细胞筛过滤、2.5 g/L 胰蛋白酶消化、2.5 g/L 胰蛋白酶加 0.1 g/L EDTA 消化、不同时间的 4℃冷消化与 37℃消化、淋巴细胞分离液分离、5 g/L 氯化铵除去红细胞等试验方法, 观察了鸡离体肝细胞的分离及培养效果.

1 材料与方法

1.1 试验动物

试验分别选用 1、14、30、45、56 日龄的粤黄公鸡, 由华南农业大学种鸡场提供.

1.2 肝细胞分离培养方法

将试验鸡颈部错位扑杀, $\varphi=75\%$ 酒精消毒 10 min 后移至无菌室, 在超净台内打开腹腔, 取出肝脏, 置入无血清 RPMI 1640 (GIBCO 公司产品) 培养液中, 采用以下方法分离、培养肝细胞.

(1) 肝组织块培养: 用眼科剪将肝脏剪成 3 mm^3 大小的组织块, 用无血清 RPMI 1640 培养液漂洗 3 次, 置入含 $\varphi=10\%$ 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 接种 6 孔塑料培养板 (Conine 公司生产), 在

37℃、饱和湿度、 $\varphi=5\%\text{CO}_2$ 的培养箱 (美国 Nuair) 中培养, 观察组织块周边细胞的增殖情况.

(2) 肝组织直接通过细胞筛过滤: 选用 150 目不锈钢筛网, 用注射器内芯将肝组织块轻轻压滤, 直接通过筛网, 再用无血清 RPMI 1640 培养液漂洗 3 次 (沉淀细胞采用 1 000 r/min 离心 5 min), 在倒置显微镜 (Olympus IX-70) 下观察细胞分离状况及细胞形态, 计数细胞浓度, 用 1 g/L 台盼兰计算细胞活率, 按 1×10^5 细胞/mL 接种 24 孔培养板, 观察细胞生长情况.

(3) 采用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化: 用眼科剪将肝脏剪成 2 mm^3 大小的组织块, 用无血清 RPMI 1640 培养液漂洗 3 次, 用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化. 分别采用 4℃消化 12、18、36 h; 37℃消化 10、30、60 min; 经 150 目筛网过滤后, 用无血清 RPMI 1640 培养液漂洗 3 次, 计数细胞浓度, 用 1 g/L 台盼兰计算细胞活率, 按 1×10^5 细胞/mL 接种 24 孔培养板, 观察细胞生长情况.

(4) 采用 2.5 g/L 胰蛋白酶加 0.1 g/L EDTA 消化: 试验步骤同 (3) 所述, 消化液采用 2.5 g/L 胰蛋白酶加 0.1 g/L EDTA 按 1:1 混合消化.

(5) 采用淋巴细胞分离液分离肝细胞: 在 (4) 消化的基础上, 采用淋巴细胞分离液分离肝细胞. 分离液与细胞悬液的比例为 1:2, 2 000 r/min 离心 30 min, 抽取分离液与细胞悬液的界面, 用无血清 RPMI 1640 培养液漂洗 3 次, 计数细胞浓度, 用 1 g/L 台盼兰计算细胞活率, 按 1×10^5 细胞/mL 接种 24 孔培养板, 观察细胞生长情况.

收稿日期: 2000-11-17

作者简介: 江青艳 (1966-), 男, 副教授, 博士.

基金项目: 国家 863-2 资助项目 (863-2-2-7.17)

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

(6) 采用 5 g/L 氯化铵除去红细胞: 在(4) 消化的基础上, 采用 5 g/L 氯化铵处理细胞悬液中的红细胞, 作用时间分别为 15、30、60 min, 离心沉淀细胞, 用无血清 RPMI 1640 培养液漂洗 3 次, 计数细胞浓度, 用 1 g/L 台盼兰计算细胞活率, 按 1×10^5 细胞/mL 接种 24 孔培养板, 观察细胞生长情况。

2 结果与分析

2.1 不同日龄粤黄鸡的肝细胞分离效果

试验结果表明, 鸡的日龄对肝细胞的分离效果有较大影响。由于 14 日龄的粤黄公鸡肝细胞的脂肪变性, 细胞分离物中含有大量的脂肪, 严重影响分离效果, 镜下可见大量的脂肪滴, 无完整的肝细胞形态。30、45、56 日龄的粤黄鸡肝细胞脂肪变性不明显, 适于分离肝细胞。

2.2 肝组织块培养

本试验观察到, 肝组织块在培养液中不易贴壁, 许多组织块在培养液中只是自然沉降, 无生长晕出现。尽管试验中采用了 3 mm^3 大小的组织块、不同高度的培养液, 仍未获得贴壁、生长的肝组织块, 因此未能从肝组织块培养中获得离体肝细胞。

2.3 肝组织直接通过细胞筛过滤

将肝组织直接通过细胞筛过滤后, 显微镜下可见肝细胞形态不完整, 细胞碎片多, 接种后未观察到细胞生长。

2.4 采用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化

试验中观察到, 采用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化肝组织块, 37°C 消化 10 min 后可在镜下见到少量分散的肝细胞, 分离效果不佳; 延长消化时间至 30 和 60 min 后, 单个肝细胞的数量增多, 但细胞死亡率明显升高(活率分别为 45%、34%), 接种后未观察到细胞增殖。采用 4°C 消化 12、18、36 h, 单个肝细胞的数量随消化时间的延长而增加, 但细胞活率低, 接种后未观察到细胞增殖。

2.5 采用 2.5 g/L 胰蛋白酶加 0.1 g/L EDTA 消化

试验结果表明, 采用 2.5 g/L 胰蛋白酶加 0.1 g/L EDTA 消化肝组织块, 37°C 消化 10 min 后, 镜下可见大量呈单个状态的肝细胞, 细胞活率为 92%, 分离效果较好(图 1)。细胞接种后生长良好, 12 h 后细胞已贴壁, 48 h 后培养的肝细胞开始分裂增殖, 培养 5 d 后, 原代细胞周围出现许多新生细胞。细胞增殖力旺盛(图 2), 培养 7 d 后, 肝细胞在培养板上连成片状, 出现组织样形态(图 3)。

进一步延长消化时间至 30 和 60 min 后, 单个肝细胞的数量有所增多, 但细胞死亡率明显升高, 接种后细胞大量死亡, 只有零星的细胞生长, 未观察到细胞增殖; 采用 4°C 消化 12、18、36 h; 单个肝细胞的数量随消化时间的延长而增加(图 4), 但细胞活率低, 接种后亦未观察到细胞增殖。

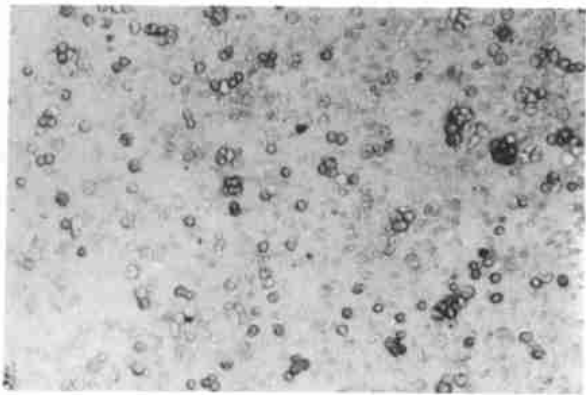


图 1 鸡肝组织块在 37°C 用胰酶与 EDTA 混合消化 10 min 150 $\times$
Fig. 1 Digestion of chicken liver tissue with trypsin and EDTA at 37°C for 10 min

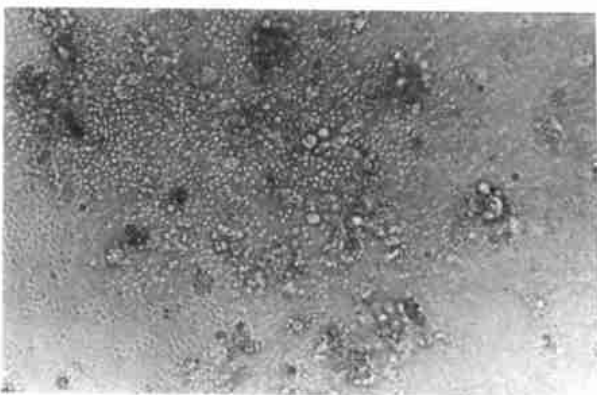


图 2 鸡肝细胞培养第 5 d 200 $\times$
Fig. 2 5 days after inoculation

2.6 离体肝细胞的分离纯化

由于肝脏是体内主要的储血器官, 肝脏的血细胞含量极为丰富, 在肝细胞的分离过程中, 如何除去红细胞是纯化肝细胞的关键。以往采用 5 g/L 氯化

铵破坏红细胞, 但在本试验中效果不佳。尽管试验中曾将氯化铵的质量浓度提高到 10 g/L, 仍有大量红细胞形态完整, 表明 5 或 10 g/L 的氯化铵不能破坏鸡的红细胞。

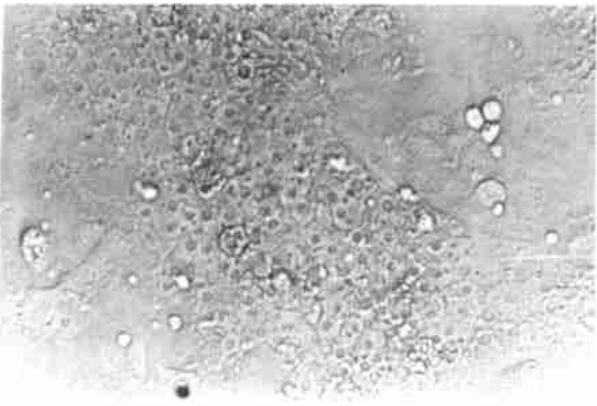


图 3 鸡肝细胞培养第 7 d 300×
Fig. 3 7 days after inoculation

淋巴细胞分离液主要用于分离血液或淋巴组织的淋巴细胞. 由于红细胞的密度比淋巴细胞大, 经 2 000 r/min 离心 30 min 后, 红细胞沉于管底, 而淋巴细胞浮在分离液界面, 由此可以纯化淋巴细胞. 肝细胞的密度与淋巴细胞相近. 本试验采用淋巴细胞分离液分离肝细胞与红细胞, 经 2 000 r/min 离心 30 min 后, 红细胞绝大部分沉淀至底部, 抽取分离液界面的细胞在镜下观察, 发现有大量肝细胞, 将此细胞悬液经洗涤、接种后, 细胞生长良好, 48 h 后细胞开始增殖, 表明采用淋巴细胞分离液分离肝细胞, 可以达到除去红细胞的目的, 而且, 该分离液对肝细胞的活率、细胞生长及分裂增殖均无不良影响.

3 讨论

肝细胞的离体培养技术是生理学、生物化学、毒理学、药理学及病理学研究的重要方法之一. 常见的用于分离肝细胞的方法包括机械分离法与酶分离法 2 种^[4], 前者是利用物理方法将肝组织剪成细小的组织块, 通过组织块培养而获得传代肝细胞, 或者将组织块直接通过细胞筛过滤而分离肝细胞, 其优点是操作简单、成本低、所分离的细胞膜上的蛋白成份及性质不发生改变, 但缺点是细胞产量较低. 酶分离法是采用蛋白分解酶(如胰蛋白酶、胶原酶等)将肝细胞从组织中分离出来. 采用酶分离法可望获得高得率的肝细胞, 但对细胞膜上的蛋白成份有一定程度的损害, 从而影响到细胞膜的功能及细胞活率.

目前, 大鼠、小鼠、兔、猪、牛等哺乳动物及人的肝细胞培养技术均已建立, 本试验参照上述在哺乳动物已成功采用的方法分离鸡的肝细胞, 发现其分

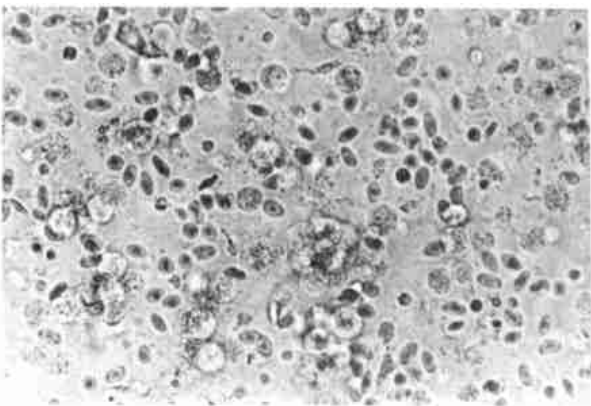


图 4 鸡肝组织块在 4℃ 用胰酶与 EDTA 混合消化 12 h 400×
Fig. 4 Digestion of chicken liver tissue with trypsin and EDTA at 4℃ for 12 hour

离效果并不理想. 采用机械分离法时发现, 鸡的肝组织块在培养板上连续 7 d 仍无贴壁现象, 无法从组织块得到传代的肝细胞; 采用肝组织块直接通过细胞筛过滤时, 滤液中的肝细胞机械损伤严重, 细胞逐渐破裂死亡, 因此机械分离法不适于鸡的肝细胞分离.

在离体培养试验中, 为了提高细胞的成活率, 一般选择细胞生长较为旺盛的新生动物作为取材对象, 对哺乳动物多选择胎儿或幼龄动物^[5,6]. 但在本试验中我们观察到, 1 日龄与 14 日龄的粤黄鸡肝脏的脂肪含量高, 肉眼可见肝脏呈暗黄色, 将肝组织置入培养液后, 上层可见一层油性漂浮物, 严重影响肝细胞的分离效果. 与哺乳动物肝细胞不同的是, 由于幼鸡的卵黄囊吸收后进入肝脏, 因此, 幼鸡的肝细胞内含脂肪小滴较多. 本试验结果表明, 14 日龄以内的粤黄鸡不宜用于肝细胞培养的取材.

在肝组织中除含有肝实质细胞外, 还含有间质细胞(如 Kupffer 细胞、Ito 细胞)以及胆管上皮细胞等, 但以肝实质细胞为主. 汪谦等报道^[7], 采用酶法分离大鼠肝细胞时, 肝实质细胞占 90%. 由于 Ito 细胞具有贮存脂肪的特点, 也称为肝脏贮脂细胞(Fat-storing cell). 幼鸡的 Ito 细胞是否也影响到肝细胞的分离尚有待证实.

组织块的消化是获得高活率的单个细胞的关键. 胰蛋白酶是组织培养中的常用消化酶, 其工作浓度一般为 2.5 g/L, 在 37℃ 消化时, 消化时间多在 10~60 min 之间, 4℃ 消化时一般为 12~36 h, 但本试验中观察到, 采用上述条件消化鸡的肝组织, 肝细胞分离效果不佳, 悬液中的细胞数量仅达到 1×10^4 细胞/mL, 进一步延长消化时间则导致细胞活率降低, 接种培

养后细胞不增殖. EDTA 是一种常见的螯合剂, 能够与细胞间质中的 Ca^{++} 结合, 从而降低 Ca^{++} 对胰蛋白酶活性的抑制作用^[8], 因而有利于细胞的分离. 但 EDTA 具有一定的细胞毒性, 浓度过高或作用时间过长均严重影响细胞活率. 本试验采用 2.5 g/L 胰蛋白酶加 0.1 g/L EDTA, 37℃消化 10 min 后, 细胞分离效果好, 细胞活率高, 接种培养后 12 h 细胞已贴壁, 48 h 后开始分裂增殖, 并逐渐长成片状, 可以用于对鸡离体肝细胞的形态及功能的研究. 综合本试验的研究结果可以看出, 鸡的肝细胞分离条件与哺乳动物肝细胞具有较大的差异, 其原因可能与这两类动物的组织结构特点不同有关.

参考文献:

[1] 刘华屏, 丛 铮. 胶原和二甲亚砜对原代培养大鼠肝细胞存活和功能状态的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1991, 5(3): 195—197.

[2] SAVADA N. Active proliferation of mouse hepatocytes in primary culture under defined conditions as compared to rat hepatocytes[J]. Jpn J Cancer Res, 1998, 79: 983—987.

[3] ISOM H C, SECOTT T, GEOGOFF L, et al. Maintenance of differentiated rat hepatocytes in primary culture[J]. Proc Natl Acad Sci, 1995, 82: 3 252—3 258.

[4] 洪文清, 盛和章. 成年大鼠肝细胞的分离及培养[J]. 军事医学科学院院刊, 1993, 17(1): 57—60.

[5] 刘 平, 刘乃明, 徐列明, 等. 丹参酸乙对大鼠肝细胞增殖及胶原生成的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 1996, 4(4): 235—236.

[6] 刘树人, 李灼亮, 彭齐荣, 等. 混合生物人工肝细胞成份的初步研究——乳猪肝细胞的分离培养[J]. 胃肠病学与肝病杂志, 1999, 8(1): 20—22.

[7] 汪 谦, 夏穗生, 姜汉英, 等. 大鼠肝细胞、Kupffer 和 Ito 细胞的分离与培养[J]. 中华实验外科杂志, 1994, 11(2): 72—73.

[8] 陈瑞铭. 动物组织培养技术及其应用[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 79—82.

Comparison of Several Methods for Isolating Chicken Hepatocytes

JIANG Qing-yan, FU Wei-long, GAO Shu-jing, WU Rong-hui
(Dept. of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Comparison was made among several methods for isolating chicken hepatocytes. Yuehuang chicken of 1 ~ 56 days old were sacrificed and hepatocytes cultivated from bits of liver tissue, dispersed cell prepared by passing through a cell sieve, digestion with 2.5 g/L pepsin, and digestion with 2.5 g/L pepsin plus 0.1 g/L EDTA. The digestion temperature was 37℃ and 4℃. In order to get rid of erythrocytes inside the medium, the reagent for isolating lymphocytes and 5 g/L ammonium chloride were used. The results showed that high density and viability of chicken hepatocytes could be obtained after digestion with 2.5 g/L pepsin plus 0.1 g/L EDTA at 37℃ for 10 minutes.

Key words: chicken; hepatocyte; *in vitro* culture

【责任编辑 柴 焰】