

文章编号: 1001-411X(2001)03-0090-01

用原位灌流法分离大鼠肝细胞

劳全林, 江青艳, 高淑静, 张守全, 朱晓彤, 傅伟龙

(华南农业大学动物科学系, 广东 广州 510642)

A Method of *in situ* Perfusion for Isolating Hepatocytes of the Rat

LAO Quan-lin, JIANG Qing-yan, GAO Shu-jing, ZHANG Shou-quan, ZHU Xiao-tong, FU Wei-long

(Dept. of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

关键词: 大鼠; 肝细胞; 原位灌流

Key words: rat; hepatocytes; *in situ* perfusion

中图分类号: S831.1

文献标识码: A

肝细胞的分离技术是开展离体肝细胞培养及研究的前提, 细胞的分离效果直接影响离体细胞的成活率、细胞纯度以及细胞分裂增殖的能力。以往多采用机械分离法和肝组织酶解分离法分离哺乳动物肝细胞^[1,2], 但这 2 种方法均存在细胞破损较严重、肝细胞中混杂大量红细胞等缺点, 对肝细胞的成活率及细胞纯度产生较大影响。本试验采用肝脏原位灌流法分离大鼠肝细胞, 获得了较为理想的分离效果。

1 材料与方法

试验动物采用 30 日龄 SD 大鼠, 购自中山医科大学实验动物中心。培养基为 RPMI 1640(GIBCO 公司), 胶原酶为 Sigma 产品, 小牛血清为上海奥伯公司产品。

用注射针头刺入大鼠枕骨大孔破坏其大脑, 经酒精浸泡消毒后(除头部外)置超净工作台, 在铺有酒精纱布的泡沫板上固定其四肢, 打开腹腔并剪去胸骨, 观察心脏搏动, 收缩强而有力者留用。将肠道向右拨开, 找出门静脉与后腔静脉的腹段并穿线结扎, 用注射器针头插入后腔静脉的胸段并穿线固定。先用注射器注入 1~3 mL 灭菌肝素钠, 再注入 37℃ 的无钙镁 PBS。待肝脏微微膨胀, 则剪断门静脉, 使灌流液流出, 连续灌流 5 min 左右, 保持注射器流量为 10 mL/min, 此时肝脏渐渐变为淡黄色, 然后再灌流 0.5 g/L 胶原酶, 保持其流速为 5 mL/min, 连续灌流 10 min。待肝脏颜色逐渐变白并失去弹性时, 剪下肝脏, 放入装有无血清 RPMI 1640 培养液的平皿内, 用镊子撕拉破坏其被膜, 使肝细胞释放出来, 用 150 目细胞筛过滤, 500 r/min 离心 2 min, 再用无血清的 RPMI 1640 培养液漂洗 3 次, 轻微吹打并重复 3 次, 用培养液重悬肝细胞。在倒置显微镜(Olympus IX-70)下观察细胞分离状况及细胞形态, 用 1g/L 台盼蓝拒染实验法来检测细胞活率。

将细胞按 4×10^5 个/mL 的密度接种在 24 孔培养板(Corning 公司生产)上, 置入饱和湿度、37℃、含 $\varphi=5\%$ CO₂ 的培养箱(美国 Nuair)中培养, 观察细胞的培养状况。

2 结果与讨论

试验结果表明, 采用温度为 37℃、pH 7.4、0.5 g/L 胶原酶为灌流液, 流速为 10 mL/min 的灌流条件, 可获得高密度的

大鼠肝细胞, 细胞分离效果良好。本次试验细胞密度达到 4.2×10^6 个/mL, 细胞悬液量为 10 mL, 细胞成活率为 92%。接种 24 h 后, 大部分肝细胞已贴壁, 细胞伸展变形, 长出伪足(图 1); 培养 72 h 后, 细胞在培养板铺展成片状(图 2)。

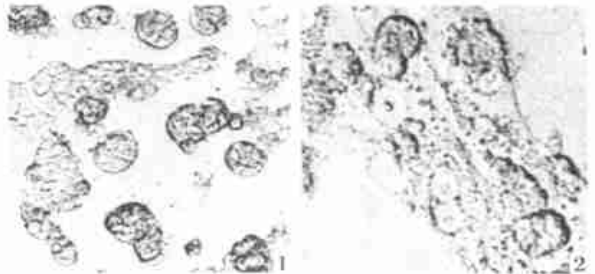


图 1 大鼠肝细胞接种后 24 h, 肝细胞贴壁, 变形

Fig. 1 24 h after inoculation of rat hepatocytes

图 2 大鼠肝细胞接种后 72h, 肝细胞铺展呈片状

Fig. 2 The hepatocytes spreading on substrate 72 h after inoculation

肝脏作为动物体内重要的代谢器官, 其血液循环非常丰富, 肝脏的血液供应除来自肝动脉外, 还接受来自门静脉的大量血液; 肝组织中还含有许多血窦, 具备较强的贮血能力^[3]。上述特点使肝组织内含大量的血细胞, 给肝细胞的分离纯化带来严重影响。以往采用组织块培养法、机械分离法、组织块消化法等分离肝细胞均面临这一难题, 尽管采用淋巴细胞分离液可以提高肝细胞的纯度, 但同时也导致所获得的肝细胞数量减少^[4]; 此外, 在上述方法中由于肝组织被剪切, 导致部分肝细胞损伤, 细胞成活率降低。国外学者 Seglen 于 80 年代采用肝脏灌流法分离大鼠肝细胞^[5], 但其采用门静脉插管进行灌流, 胶原酶的耗费大(一般需要 500 mL), 因胶原酶价格昂贵, 这种方法对许多实验室难以接受。本试验改门静脉插管为后腔静脉插管, 并采用门静脉先结扎后剪断的方法, 不仅有效地驱除了肝组织中的血细胞, 同时, 由于灌流液逆静脉流动而使灌流液在肝脏停留时间延长, 从而大大节省了胶原酶的用量, 从 3 次重复试验来看, 每次试验的胶原酶用量平均为 8 mL。

本试验采用的 PBS 灌流液 pH 值为 7.4, 胶原酶 pH 值为

(下转第 93 页)

收稿日期: 2001-04-29

作者简介: 劳全林(1967-), 硕士研究生。通讯作者: 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)

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

文章编号: 1001—411X (2001) 03—0093—01

棕榈科植物桄榔学名的订正^{*}

王勇进, 廖启焘

(深圳市仙湖植物园, 广东 深圳 518004; 厦门园林植物园, 福建 厦门 361003)

Revision on the Scientific Name of the Palm—Plant “Guanglang”

WANG Yong-jin, LIAO Qi-liao

(Shenzhen Fairy Lake Botanical Garden, Shenzhen 518004, China; Xiamen Botanical Garden, Xiamen 361003, China)

关键词: 订正; 棕榈科; 桄榔

Key words: Revision; Palmae; *Arenga westerhoutii*

中图分类号: 948—52 文献标识码: A

桄榔(南方草木状)

Arenga westerhoutii Griff. in Calc. Journ. Nat. Hist. 5: 474. 1845

Arenga pinnata sensu non (Wumb.) Merr.; 中国植物志 13 (1): 110 Pl. 25(1~6), 1991; 海南植物志 4: 167, Pl. 1068, 1977; 广东植物志 2: 452, 1991.

分布: 海南、广西及云南南部至东南部, 生于海拔 600 m 以下的山地密林或疏林中。中南半岛及东南亚亦有分布。

Hainan(海南): Yaxian(崖县), F. C. How (侯宽昭) 70690; Ledong(乐东), Lau (刘心祈) 27153; Wanning(万宁), Xinglong (兴隆), Y. J. Wang et Q. L. Liao (王勇进、廖启焘) SX—007. Guangxi(广西): Longjin(龙津), Qingshan(青山), 陈少卿 13228; 田林, 红水河植考队 89—211. Yunnan(云南): 王启无 86212; Hekou(河口), Y. J. Wang et J. F. Chen(王勇进、陈景芳) SX2001—41.

在《中国植物志》^[1]、《海南植物志》^[2]和《广东植物志》^[3]等以往的文献中, 都将分布于我国海南、广西南部、云南南部和东南部的 *Arenga* 属植物桄榔(南榔)定为 *Arenga pinnata* (Wumb.) Merr. 笔者对采自海南、广西、云南的桄榔标本和野生植株进行了认真的比较, 发现该种羽片较窄, 均匀地呈 2 列排列在一个平面上, 叶形较整齐; 雄蕊在 100 枚以上; 果实长圆形, *d* 为 3~4 cm, 成熟时褐色至黑色; 种子卵状三棱形, *l* 可达 3 cm 左右。经查阅原始文献^[4]和相关资料^[5~7], 发现以上特征与 *Arenga pinnata* (Wumb.) Merr. 不符, 而与上述文献记载的分布于泰国、马来西亚等东南亚地区和中南半岛的 *Arenga westerhoutii* Griff. 一致, 因此笔者认为, 该种使用 *Arenga*

pinnata (Wumb.) Merr. 是被误定的, 应使用其正确的名称, 即 *Arenga westerhoutii* Griff. 而真正的 *Arenga pinnata* (Wumb.) Merr. 则是在东南亚地区广为栽培, 在我国福建、广东、海南等地也有栽培的常用于制糖的砂糖椰子, 其羽片较宽, 多少成束, 呈 4~5 列排列, 叶形较乱; 雄蕊 50~60 枚; 果实近圆形; *d* 为 4~5 cm, 略大于长度; 成熟时黄色; 种子多呈三棱形, *l* 在 1.0~1.5 cm 《中国植物志》中使用的砂糖椰子的学名 *Arenga saccharifera* Labill. 早已作 *Arenga pinnata* (Wumb.) Merr. 的异名处理。

致谢: 本文承华南农业大学李秉滔教授审阅, 谨此致谢!

参考文献:

[1] 裴盛基, 陈三阳, 童绍全, 等. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1991, 13(1): 110, Pl. 25(1—6).

[2] 广东省植物研究所. 海南植物志[M]. 广州: 广东科技出版社, 1977. IV: 167, Pl. 1 068.

[3] 陈封怀. 广东植物志[M]. 广州: 广东科技出版社, 1991. 452.

[4] MERRILL. An Interpretation of Rumphius' Herbarium Amboinense[M], Manila: Manila Press, 1917. 119.

[5] GRIFFITH W. Palms of British East India[J]. Calc Journ Nat Hist 1845, 5: 474.

[6] HODLE D R. The Palms and Cycads of Thailand[M]. Kansas: Allen Press 1998. 16, Pl. 6(A—C).

[7] WHIMORE T C. Palms of Malay[M]. London: Oxford University Press 1973. 38, Fig 14 15.

收稿日期: 2001—04—30 作者简介: 王勇进(1962—), 男, 硕士。

(上接第 90 页)

7. 6. 灌流液的温度为 37℃, 灌流速度控制在 2~5 mL/min. 使肝细胞在短时间内得以从肝组织中游离出来, 并且细胞活力达到 92%。从接种后肝细胞的生长与增殖情况来看, 本试验采用的肝脏原位灌流法可以作为一种比较理想的肝细胞分离法。

参考文献:

[1] 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.

[2] 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.

[3] 傅伟龙, 江青艳, 高萍, 等. 动物生理学[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2001. 84.

[4] 江青艳, 傅伟龙, 高淑静, 等. 鸡离体肝细胞几种分离方法的比较[J]. 华南农业大学学报, 2001, 22(1): 66—69.

[5] SEGLEN P O. Preparation of rat liver cells[J]. Experimental Cell Research, 1973. 76: 25—30.

【责任编辑 柴 焰】