

猕猴肝细胞的分离及培养*

卢力心 伦照荣 梁东升

(中山大学生物系寄生虫学研究室)

摘要 用浓度为 50 毫克/100 毫升的胶原酶液,在体外无菌的条件下灌注分离猕猴肝组织块,所分离到的肝细胞活性率达 88—91%。用含 10% 胎牛血清,0.2% 牛血清白蛋白,1 毫升/100 毫升牛胰岛素的基础培养基(MEM),在 37°C 含 5% CO₂ 的培养箱中培养。细胞在塑料培养皿中贴壁伸展良好,培养一个月后,仍见有大量贴壁的肝细胞,它可满足弓形体的生长发育。

Howard 等^[3] 首先使用胶原酶分离大鼠肝细胞获得令人满意的效果。随后,许多学者对此法不断进行改进,并用此法分离到的结构完整且具活性的肝细胞进行了大量生化、生理及超微结构等的研究,纠正了以往用死的或受损的肝细胞所得到的实验结论 (Seglen 等)^[8]。

因此,在体外研究肝细胞的生理、生化等,首先须获得有代谢活性且能在体外生存一段时间的正常肝细胞。然而,由于正常肝细胞在体外不增殖,故培养的肝细胞在体外的存活时间会依

* 本文承江静波教授审阅,特此致谢。

不同的动物种类,所选用的培养基及其他附加因素等而有较大的差异。一般情况下,正常大鼠的肝细胞在体外维持一至两周便逐渐退化,最后死亡。但人肝细胞在体外有培养到30天以上的报道(Doby等)^[1]。近年,Miyazaki等^[2]和Guguen-Guillouzo等^[2]分别介绍了用胶原酶灌注法分离及培养有代谢活性的人肝细胞的新方法。Mazier等^[4-5]成功地使人间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)和恶性疟原虫(*P. falciparum*)的子孢子在用此法分离和培养的正常人肝细胞中完成整个红外期的发育。我们实验用胶原酶灌注法分离的猕猴肝细胞亦能支持食蟹猴疟原虫(*P. cynomolgi*)的子孢子在体外发育到成熟的裂殖体(Millet等)^[6]。鉴于目前国内仍未见有用胶原酶灌注法分离和培养灵长类肝细胞的报道,本文着重介绍利用胶原酶分离猕猴肝细胞及其培养的基本方法,希望对有关人员的工作有所帮助。

材 料 和 方 法

(一)缓冲液、胶原酶液及培养液的配制

1. T. H. 缓冲液:氯化钠 8.0 克,氯化钾 0.2 克,磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 0.1 克,HEPES [N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙烷磺酸; N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic Acid (HEPES), Sigma] 2.38 克,人血清白蛋白 (Sigma) 1.0 克,三蒸水 1,000 毫升, pH7.5 \pm 0.02, 0.22 微米 (μm) 滤膜过滤除菌。
2. 胶原酶液:胶原酶 (collagenase, Sigma) 50 毫克 (mg),氯化钙 ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 110 毫克, T. H. 缓冲液 100 毫升, 0.22 微米滤膜过滤除菌。
3. 基础培养基 (MEM) 培养液: MEM (mininum essential medium Eagle, GIBCO) 培养基 10.3 克,碳酸氢钠 2.2 克,牛血清白蛋白 (Sigma) 2.0 克,牛胰岛素 (Sigma) 10.0 毫克,三蒸水 1,000 毫升, pH7.2, 0.22 微米 (μm) 滤膜过滤除菌。使用时每 90 毫升无菌的 MEM

培养液加 1 万单位青霉素、1 万单位链霉素、10 毫升胎牛血清 (Sigma) 和 100 微升 (μl) 氢化可的松 (肝细胞培养 24 小时后加入)。本实验所用的化学试剂均为分析纯。

(二) 肝活组织块的获得 挑选健康、无寄生虫,体重在 1 公斤左右的幼小猕猴 (*Macaca mulatta*),用盐酸氯胺酮注射液 (Ketalar) 麻醉。麻醉后在无菌的条件下切取肝块并马上进行分离。肝块的大小视实验所需而定。

(三) 肝细胞的分离及培养 用蠕动泵 (Bibb Block Scientific, USA) 将 37°C (灌注肝块时,此温度务必保证,否则会影响分离效果) 无菌的 T. H. 缓冲液,通过带针头的胶管,在培养皿中反复灌注冲洗肝块 (灌注速度控制在 30—40 毫升/分),特别是肝块内的血细胞要尽量冲洗干净,至肝块成灰白色为止,立即改用 37°C 无菌的胶原酶液反复灌注经 T. H. 缓冲液冲洗干净的肝块 (速度控制在 10 毫升/分),约 10—15 分钟,肝块肿大变软,说明消化时间已到。将消化好的肝块小心移到另一装有 T. H. 缓冲液的培养皿中,用吸管反复吸打,使松散的细胞游离在缓冲液中。吸去不能消化的部分及残体,然后将细胞悬液置 80g 中离心两分钟,将上悬液去掉,沉积细胞用 T. H. 缓冲液重新悬浮后再用上述离心速度离心洗涤,如此三次至上清液澄清为止。最后用少量已加胎牛血清和双抗的 MEM 培养液将细胞悬浮,用血球计数板计数后按实验要求接种在直径 35 毫米 (或别的规格) 的塑料培养皿 (NUNC, 丹麦) 中 (在玻璃培养皿中,正常肝细胞较难贴壁,故不宜使用玻璃培养皿或瓶)。接种后,放置 37°C、含 5% CO_2 的二氧化碳培养箱中培养。3—4 小时后,将原培养液吸去,加入 1 毫升新鲜的培养液,以后每日更换培养液 1 次。必

须注意,细胞培养到 24 小时后要使用有氢化可的松的 MEM 培养液至实验结束。

结果和讨论

以往用机械作用或胰蛋白酶等消化法分离到的哺乳类肝细胞,因其代谢活性通常受到破坏而不易在体外培养且细胞回收率不高,故不利于在体外对肝细胞进行各种研究。

用胶原酶分离到的肝细胞,除部分因机械作用或别的因素受损外,绝大部分细胞都能保持完整的结构及代谢活性,台盼蓝染色活细胞一般达 90—95%^[7-9],这是用其他方法难以达到的效果。扫描电镜对分离后的单个肝细胞观察表明,肝细胞最显著的特点是其表面布满微绒毛^[8-9],这可能是正常的肝细胞易于贴壁在塑料的培养皿而不易于贴壁在玻璃培养皿或瓶之关键。我们实验室多次用本文介绍的胶原酶灌注法分离猕猴肝细胞,其活细胞数一般在 88—91% 之间。在二氧化碳培养箱中培养到第 25

仍有代谢活性。培养至 1 个月的猕猴肝细胞仍保持正常的形态(图 1-B),与 Doby 等报道在体外培养人肝细胞达 1 目之久有相似的结果。利用胶原酶分离到结构完整、具代谢活性的灵长类肝细胞,对深入研究灵长类肝细胞之生理、生化和在体外繁殖所必须的因素,以及研究感染肝细胞的寄生原虫在离体培养中的发育等,都有重要的价值。

参 考 文 献

- [1] Doby J. M. and R. Barker 1976 Essais d'obtention *in vitro* des formes pre-erythrocytaires de *Plasmodium vivax* en cultures de cellules hépatiques humaines inoculées par sporozoites. *Comptes rendus de Seances de la Société de Biologie*. 170: 661—665.
- [2] Guguen-Guillouze, C. et al. 1983 Human adult hepatocytes: isolation and maintenance at high level of specific functions in a co-culture system. In: *Isolations, Characterisation and use of hepatocytes*. Elsevier Sciences Publishing Co., Amsterdam 105—110.
- [3] Howard, R. B. 1967 The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver. *J. Cell Biol.* 35: 675—684.
- [4] Mazier, D. et al. 1984 Complete development of hepatic stages of *Plasmodium falciparum in vitro*. *Science*, 227: 440—442.
- [5] Mazier D. et al. 1985 Cultivation of the liver forms of *Plasmodium vivax* in human hepatocytes. *Nature* 307: 367—369.
- [6] Millet, P. et al. 1987 Obtention *in vitro* de schizontes de *Plasmodium cynomolgi bastianellii* dans des hépatocytes de *Macaca rhesus*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 62: 5—7.
- [7] Miyazaki, K. et al. 1981 Isolation and primary culture of adult human hepatocytes. *Cell Tissue Research*, 218: 13—21.
- [8] Seglen P. O. 1976 Preparation of isolated rat liver cells. In "Methods in Cell Biology", Academic Press 13: 29—83.
- [9] Zahltan, R. N. et al. 1974 The influence of ammonium and calcium ions on gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes and their response to glucagon and epinephrine. *Arch. Biochem. Biophys.* 161: 528—535.

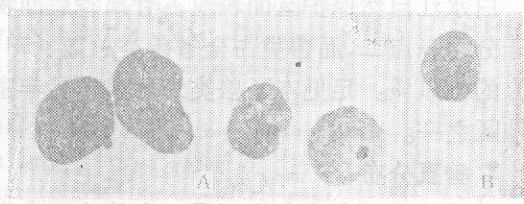


图 1 A. 在体外培养 25 天的猕猴肝细胞; B. 在体外培养 30 天的猕猴肝细胞

天,细胞仍紧紧贴在塑料培养皿上(图 1-A)。将刚地弓形体 (*Toxoplasma gondii*) 接种到上述细胞,弓形体在肝细胞内可正常繁殖(结果另文报道),表明肝细胞内的环境仍能满足弓形体的发育所需,亦表明培养到第 25 天的肝细胞