维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)03－0303－04

原代大鼠肝细胞分离方法与冻存条件的优化

姚云清[1], 张定凤[2], 倪小毅[1], 卢　萍[1], 王　波[2], 周卫平[2], 黄爱龙[2], 任　红[2]

(1.重庆医科大学临床学院感染科,重庆　400016;2.重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆　400010)

【摘　要】目的:优化原代大鼠肝细胞(PRH)分离方法与冻存条件。方法:建立低浓度胶原酶原位循环灌流法分离肝细胞;分别采用含2%与10% DMSO的冻存液于－70℃或液氮中冻存PRH,并比较各组冻存后PRH活力。结果:1.该分离方法肝细胞产量为$1.584\pm0.525\times10^8$/100g大鼠体重,存活率达95.2±2.9%,肝细胞纯度>95%,胶原酶用量减少为4.5mg/100g大鼠体重。2.含2% DMSO冻存液于－70℃组与液氮组PRH存活率均可达90%～95%;ALB冻存14d－70℃组PRH明显高于液氮组与新鲜分离组,LDH值于冻存7d的－70℃组与液氮组明显低于新鲜分离组,其它各组间均无显著差异。结论:低浓度胶原酶原位循环灌流法为高效的PRH分离技术;含2% DMSO冻存液于－70℃可作为原代肝细胞冻存的理想条件。

【关键词】原代肝细胞;分离技术;冻存条件;优化

【中国图书分类法分类号】Q813.3　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2002－09－04

Optimization of the techniques for isolation and cryopreservation of primary rat hepatocytes

YAO Yunqing, et al

(*Department of Infectious Diseases, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To optimize the techniques for isolation and cryopreservation of primary rat hepatocytes. *Methods*: By improving traditional isolation methods and establishing an in situ recirculating collagenase perfusion through the portal vein, we want to improve the yield, viability and purity of primary rat hepatocytes and to reduce the cost of collagenase. Primary rat hepatocytes were cryopreserved at 1×10^7/ml in a suspension buffer containing 2% DMSO or 10% DMSO and were stored for 7 days, 14 days or 2 months at －70℃ or in liquid nitrogen. After rapidly thawed hepatocytes were cultured for 7 days, their viabilities were measured by trypan blue exclusion (TBE) and MTT method, and the albumin (ALB) and lactodehydrogenase (LDH) in the supernatant of hepatocytes were analyzed. *Results*: By using the new technique, the hepatocyte yields have been improved to $1.584\pm0.525\times10^8$/100g rat body weight (BW), the viability of the hepatocytes is 95.2±2.9%, and purities better than 95%. At the same time, the cost of the collagenase has been reduced to 4.5mg/100g rat BW. The efficiency of cryopreservation is: (1) The viabilities of hepatocytes preserved in buffer containing 2% DMSO or 10% DMSO were ≥90% and ≥85% respectively. (2) The viabilities of hepatocytes cryopreserved in buffer containing 2% DMSO at －70℃ or in liquid nitrogen were all 90%－95%. (3) ALB synthesis was unaffected by different cryopreservation methods. (4) LDH in the supernatants of freshly cultured hepatocytes was equivalent to that of cryopreserved hepatocytes. *Conclusion*: Isolation technique of primary rat hepatocytes has been successfully improved. Freshly isolated hepatocytes suspended in buffer containing 2% MDSO can be cryopreserved for 2 moths at －70℃. These results have showed so far that the methods of isolation and cryopreservation of primary rat hepatocytes are optimized.

【Key words】Hepatocyte; Technique/Isolation/Cryopreservation; Optimization

目前,哺乳动物原代肝细胞的分离培养技术已被广泛应用于生物医学领域,如肝细胞介导的基因治疗与生物人工肝支持系统等方面[1]。为了解决肝组织来源缺乏,降低分离获取肝细胞的时间、人力和经济成本,提高获得肝细胞的利用率以及保证实验中肝细胞供体的一致性等,原代肝细胞分离获取方法与低温贮藏(冻存)条件的优化成为亟待解决的课题。以原代大鼠肝细胞为模型,探索简捷、实用的

作者介绍:姚云清(1966－　),男,副教授,博士,主要研究方向:病毒性肝炎发病机理与治疗。

基金项目:国家自然科学基金(39670340),重庆市科委基金(20021889)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

分离获取方法与冻存条件,为原代肝细胞,尤其是原代人肝细胞的经济、高效利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 Wistar 大鼠,雄性,体重 200g 以上,为重庆医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 Ⅳ型胶原酶:购自 SIGMA 公司;DNase Ⅰ:为华美公司产品;HBSS:购自 GIBCOBRL 公司;D-Hanks 液:为本研究所中心供应室配制;胶原酶消化液:HBSS +0.01-0.02% Ⅳ型胶原酶;肝细胞洗涤液:RPMI 1640 +0.005% DNase Ⅰ;肝细胞培养液:RPMI 1640 +10% FBS +双抗 +0.1U/ml 胰岛素;肝细胞冻存液Ⅰ:RPMI 1640 +30% FBS +双抗 +0.1 U/ml 胰岛素 +2% DMSO;肝细胞冻存液Ⅱ:RPMI 1640 +30% FBS +双抗 +0.1 U/ml 胰岛素 +10% DMSO。

1.1.3 主要器材 DDB-300 多通道电子蠕动泵为浙江象山石浦海天电子仪器厂生产;50ml FALCON 离心管为 BECTON DICKINSON Labware 产品。

1.2 方法

1.2.1 低浓度胶原酶原位循环灌流法分离原代大鼠肝细胞(PRH) ①取 Wistar 大鼠,用 2% 戊巴比妥钠 10mg/100g 体重、肝素 20U/100g 体重分别腹腔注射以麻醉和抗凝。②10~15min 后固定大鼠,75% 酒精消毒,紫外灯照射 15-30min。腹部再次 75% 酒精消毒后正中切开腹腔并更换器械。③显露肝门部门静脉并游离 2~3cm;显露游离肝下下腔静脉 2~3cm,各置一结扎线,暂不结扎。④穿刺针插入门静脉后立即结扎固定,尽快接通硅胶管并启动蠕动泵(无泵时,输液器亦可),同时剪断肝下下腔静脉远端。⑤用 D-Hanks 液 20~30ml/min 快速经门静脉灌注清除肝内血液,1min 内即可见肝脏颜色变浅,持续灌注 10min 至肝脏呈米黄色。同时切开胸腔结扎肝上下腔静脉。⑥插另一硅胶管入肝下下腔静脉并结扎固定,换 D-Hanks 液为胶原酶消化液(37℃ 预热)经门静脉灌入、肝下下腔静脉流出,循环灌注消化肝脏 10~20min(灌流速度为 10~20ml/min),至肝质变软,压之凹陷不易恢复。⑦停止灌注,小心剪取各肝叶置入消毒平皿内,加入适量肝细胞洗涤液(4℃ 预冷),撕碎肝脏并祛除纤维结缔组织,制成混合肝脏细胞悬液。⑧100 目筛网过滤入 50ml 离心管,500rpm 离心 1~2min。去上清,沉淀加入 RPMI 1640(4℃ 预冷)20~30ml 洗涤 3 次。⑨肝细胞沉淀加入肝细胞培养液重悬为 10ml,取适量计数并用 0.4% 台盼蓝染色判断存活率。

1.2.2 原代大鼠肝细胞的低温冻存方法及其效果的检测 ①分别采用肝细胞冻存液Ⅰ与Ⅱ重悬 PRH 为 1×10^7/ml,以 1ml/管和 10ml/管分装,置 -20℃ 2h 后冻存于 -70℃ 或液氮中。②分别于冻存 7d、14d 和 2m 时常规快速法复苏 PRH 并接种入 96 孔板培养 7d,采用台盼蓝拒染法与 MTT 法观测 PRH 活力,并检测 PRH 培养上清中白蛋白(ALB)与乳酸脱氢酶(LDH)值。

2 结 果

2.1 原代大鼠肝细胞分离方法的优化

简化了步骤,提高了成功率。首先解决了抗凝不良致肝内血液淤滞严重影响消化灌注这一问题。本方法抗凝安全、简便,效果良好。其次,采用 2% 戊巴比妥钠麻醉大鼠快速、稳定与安全。再次,改进二步酶消化法为一次性低浓度胶原酶原位循环灌流法,有利于肝细胞产量与存活率的同时提高。

减少了胶原酶用量,降低了分离成本。传统门脉灌流法胶原酶用量多为 10~20mg/100g 大鼠体重(胶原酶浓度为 0.05%~0.1%)[2-4],我们实验中,低浓度胶原酶原位循环灌流法胶原酶用量减少为 4.5mg/100g 大鼠体重。

提高了肝细胞产量与存活率。低浓度胶原酶原位循环灌流法肝细胞产量增加为 $(1.584\pm0.525)\times10^8$/100g 大鼠体重,存活率达 (95.2±2.9)%,肝细胞纯度 >95%,较传统门脉灌流法肝细胞产量与存活率均高。

2.2 原代大鼠肝细胞冻存条件的比较

肝细胞冻存液Ⅰ与Ⅱ对 PRH 保护作用相似,复苏后 PRH 存活能力无明显差异(见表 1)。

表 1 -70℃ 冻存 7d 复苏接种后 PRH 存活率观测结果

	肝细胞存活率(%)	
	肝细胞冻存液Ⅰ组	肝细胞冻存液Ⅱ组
复苏即刻	>95	>95
接种 24h	>95	>95
接种 4d	95	95
接种 7d	90	85

采用肝细胞冻存液Ⅰ,-70℃ 与液氮冻存 PRH 效果相似,复苏后 PRH 均有良好的存活能力:台盼蓝拒染法显示,冻存 7d、14d 和 2m 的 -70℃ 组与液氮组 PRH 复苏后培养 7d(或 6d)存活率仍达 90%-95%。MTT 法显示,-70℃ 组与液氮组 PRH 活力无明显差异(见表 2)。ALB 合成与释放能力,冻存 7d 和 2m 的 -70℃ 组与液氮组 PRH 相似,冻存 14d -70℃ 组 PRH 明显高于液氮组与新鲜分离组 PRH(见表 3;新鲜分离组 PRH 培养 6d 上清中 ALB 为 2±0.436g/L)。PRH 培养上清中 LDH 值,除冻

维普资讯 http://www.cqvip.com

存 7d 的 -70℃组与液氮组明显低于新鲜分离组外，其它各冻存时段组间及其与新鲜分离组间均无显著差异(见表 4;新鲜分离组 PRH 培养 6d 上清中 LDH 值为 38±12.29U/L)。

表 2 冻存 2m 的 -70℃组与液氮组 PRH 复苏后 6d 活力检测(MTT 法)结果

	A_{405}值	*P 值
-70℃组 PRH	0.039±0.006	
液氮组 PRH	0.039±0.008	$P>0.05$

注：*该 P 值为 -70℃组与液氮组比较(t - 检验)。

表 3 复苏后 PRH 培养上清中 ALB 值(g/L)

	-70℃组	液氮组
冻存 7d	2.167±0.651	1.967±0.643
冻存 14d	4.38±0.802*△	2.74±1.085*
冻存 2m	1.475±0.574	1.7±0.462

注：*该两组数值比较 $P<0.05$ (t - 检验)；
△与新鲜分离组 ALB 值比较 $P<0.05$ (t - 检验)。

表 4 复苏后 PRH 培养上清中 LDH 值(U/L)

	-70℃组	液氮组
冻存 7d	5.67±6.03*	5.00±4.00*
冻存 14d	42.58±18.25	31.40±12.56
冻存 2m	13.25±3.50	18.50±5.80

注：'该组数值与新鲜分离组比较 $P<0.05$ (t - 检验)。

3 讨 论

目前，哺乳动物原代肝细胞的分离培养技术已被广泛应用于生物医学领域，在基础理论研究中，如肝脏细胞的生长、基因表达调控及细胞间相互关系，肝细胞与肝炎病毒相互作用，肝毒性和肝脏细胞凋亡等研究中应用普遍而且十分重要；在临床医学研究中，已被采用于肝细胞介导的基因治疗与生物人工肝等方面[1]。而大鼠模型以其容易获取、技术相对简捷等条件备受青睐，所以有关大鼠原代肝细胞的分离培养方法很多。经过长期实践探索，采用胶原酶经门静脉灌流消化法被公认为效果优于其他方法。该方法又被分为体内法(原位灌注法)和体外法两大类，目的都是为了尽可能地提高肝细胞的产量与活性，均需要解决下述技术难点：(1)肝脏灌注不良：常常为肝内凝血或/和气体栓塞引起。(2)肝脏消化不良：多为灌注不良或/和胶原酶浓度与消化时间不当所致。(3)肝细胞产量与存活率低下：除上述原因外，分离所用缓冲液与离心洗涤条件也很重要。(4)细菌、真菌等微生物的污染也是常见的困扰因素[3]。

我们在传统的门静脉灌流消化法基础上，改进某些关键技术细节而比较完善地克服了上述困难，主要体现在下面几点：(1)简捷、安全、有效的麻醉与抗凝方法为肝脏的良好灌注作了充分准备。根据实践探索，乙醚吸入麻醉深度与时间较难掌握，而采用 2%戊巴比妥钠麻醉大鼠容易控制、效果良好。大鼠的肝素化抗凝亦是重要环节之一。刚开始采用常用的经肝下下腔静脉注射肝素抗凝方法，每次均发现注射部位涌血迅速导致肝内凝血，门静脉插管成功前肝内血液已广泛淤滞、肝脏颜色变暗。D-Hanks 液灌注时肝内阻力较大，即使延长灌注时间大部分肝脏仍为暗红色。胶原酶消化效果很差，结果肝细胞产量与活力都很低。(2)快速、稳定、充分的灌注为肝脏的良好消化奠定了基础。(3)适当浓度胶原酶的原位循环灌流消化不仅提高并保证了肝细胞的产量与存活率，而且因减少了胶原酶的用量而降低了分离培养的成本。文献多采用消化酶(如胶原酶Ⅰ、Ⅳ，胰蛋白酶等)非循环灌流法，酶浓度较大，多为 0.1%左右或更高；酶用量大，常>20mg/100g 大鼠体重。部分文献报告采用二步酶消化法，实验中也曾采用Ⅳ型胶原酶二步消化法分离肝细胞，但是并不能提高其产量与存活率。(4)适当的肝细胞洗涤液和离心洗涤条件一方面保证了细胞产量、存活率，另一方面，降低了肝细胞集聚提高了单个肝细胞产率以及肝细胞纯度。(5)我们所建立的低浓度胶原酶原位循环灌流法为一较好的封闭体系，在一定程度上能减少细菌等微生物的污染。总之，根据实践，该改进后的肝细胞分离技术为一较为完善的方法。当然，如果将单一肝细胞的分离与多种肝脏细胞同时分离结合起来，就更为高效、经济和实用。

原代肝细胞经冻存后可以较长期保存，并被应用于肝脏病学、药理学和毒理学的研究[5]。如何保证冻存后原代肝细胞生物学性状与新鲜分离肝细胞的高度一致，这是大家共同面对的一个难题。各国专家一致认为，成功冻存原代肝细胞取决于缓慢冷冻、快速复苏，冷冻保护剂的适当浓度与缓慢加入，以及冻存温度的适当选择等方面[6]。有作者报告，采用双层凝胶夹心法接种原代肝细胞培养 3d 后，直接经速度控制冷冻法贮藏于 -80℃细胞库 3h 或 14d，肝细胞存活率达 75%±10%，两时间段无差

维普资讯 http://www.cqvip.com

异[5]。大多文献报告,采用含 10% DMSO 的冻存液悬浮肝细胞分装后液氮保存方法,肝细胞存活率可达 80%～90%左右,细胞的形态完整性、白蛋白合成能力以及多种酶活性均保存完好[7～9]。但上述方法均存在不同程度的缺点,如冻存步骤复杂、冻存条件要求较高、肝细胞悬液冻存体积小、冻存时间较短以及冻存后肝细胞存活率较低等。为了妥善地解决上述问题,以原代大鼠肝细胞为模型进行探索,有下面几点收获:(1)含 2% DMSO 与 10% DMSO 冻存液保护作用相同;(2)含 2% DMSO 冻存液悬浮肝细胞冻存于 -70℃ 与液氮效果均良好;(3)冻存于 -70℃ 与液氮 1w 至 2m 肝细胞均保存了良好的生物学性状;(4)于 -70℃ 冰库,1ml - 10ml 体积肝细胞悬液均保持了较高的肝细胞存活率。通过对比研究而探索到了一个简化的原代肝细胞冻存方法,即采用含 2% DMSO 冻存液悬浮肝细胞于 -70℃ 冰库保存,期限可达 2m 甚至更长,尤其是冻存体积可以较大,能为体外生物人工肝支持系统或临床肝细胞移植技术[10]提供方便。因此,该方法不仅为原代肝细胞,尤其是原代人肝细胞的经济、高效利用奠定了基础,而且将会为原代肝细胞分离培养技术在生物医学领域基础理论研究和临床医学研究中的实际应用起到积极的推动作用。

参 考 文 献

[1] Liddle C, Goodwin BJ and Tapner M. Culture and transfection of mammalian primary hepatocytes and hepatocyte - derived cell lines[J]. J Gastroenterol Hepatol, 1998; 13: 855 - 862.

[2] Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells[J]. Methods in Cell Biol, 1976; 13: 29 - 35.

[3] Alpini G, Phillips JO, Vroman B, et al. Recent Advances in the Isolation of Liver Cells[J]. Hepatol, 1994; 20: 494 - 506.

[4] Samarasinghe DA and Farrell GC. The Central Role of Sinusoidal Endothelial Cells in Hepatic Hypoxia - Reoxygenation Injury in the Rat[J]. Hepatol, 1996; 24: 1230 - 1242.

[5] Koebe HG, Muhling B, Deglmann CJ, et al. Cryopreserved porcine hepatocyte cultures[J]. Chem Biol Interact, 1999; 121: 99 - 115.

[6] Li AP, Gorycki PD, Hengstler JG, et al. Present status of the application of cryopreserved hepatocytes in the evaluation of xenobiotics: consensus of an international expert panel[J]. Chem Biol Interact, 1999; 121: 117 - 123.

[7] Swales NJ, Utesch D. Metabolic activity of fresh and cryopreserved dog hepatocyte suspensions[J]. Xenobiotica, 1998; 28: 937 - 948.

[8] Hengstler JG, Utesch D, Steinberg P, et al. Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction[J]. Drug Metab Rev, 2000; 32: 81 - 118.

[9] Hewitt NJ, Fischer T, Zuehlke U, et al. Metabolic activity of fresh and cryopreserved cynomolgus monkey (Macaca fascicularis) hepatocytes[J]. Xenobiotica, 2000; 30: 665 - 681.

[10] Strom SC, Chowdhury JR, Fox IJ. Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease[J]. Semin Liver Dis, 1999; 19: 39 - 48.

(上接第 269 页)

[3] Shiba T, Inoguchi T, Sportsman JR et al. Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat to retinal circulation [J]. Am J physiol, 1993; 54(5): E785 - E793.

[4] Kowluru RA, Jirousek MR, Stramm L et al. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or experimental galactosemia V Relationship between protein kinase C and ATP_{ase} [J]. Diabetes, 1998; 47(9): 464 - 469.

[5] Nishzuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phosphorlipids and activation of protein kinase C[J]. Science, 1992; 258(3): 607 - 613.

[6] Haller H. Baur E, Quass P et al. Hign glucose concentration and protein kinase C isoforms in vascular smooth muscle [J]. Kidney Internat, 1995; 47(9): 1057 - 1067.

[7] Deacon EM, Pongrac J, Griffiths et al. Isoenzymes of protein kinase C differential involvment in apoptosis and pathogenesis[J]. J Clin Mol Pathol 1997; 50(6): 124 - 131.

[8] Yamanchi T, Igarshi M, Brownlee M, et al. Activation of diacylglycerol and protein kinase C in aortic smooth muscles by oxidants and advanced glycation production products [J]. Diabetes, 1998; A372: 1435.