DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.06.036
第25卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 6
2003年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2003

文章编号:1000-5404(2003)06-0549-02

技术方法

体外灌流装置分离肝细胞的初步探索

An extracorporeal perfusion apparatus for isolating of hepatocytes

郭海涛,王英杰,刘 俊,刘国栋,文红伟,王宇明 (第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探索和建立一种消化分离肝细胞的体外简易灌流装置及方法。方法 采用蠕动泵、特制水浴恒温箱、硅胶管、不锈钢网、塑料留置注射软管针头等组装成简易灌流装置,对成年家兔、新生中国实验小型猪和人胎肝进行体外两步灌流,综合评价分离肝细胞的效果。结果 灌流装置两步法消化分离肝细胞的活力为84%~98%,细胞获得量为(3.5~9.2)×10^6/g,普通条件接种培养后细胞贴壁、生长均良好。结论 自制体外灌流装置消化分离肝细胞简便、快捷、可靠,尤其适宜于较大动物肝细胞的大量分离。

近年来,由于细胞生物学、组织工程等技术的不断提高,使培养肝细胞型生物人工肝和肝细胞移植得以迅速发展,同时带动了肝细胞基因治疗、肝细胞分泌产物的提取及生产等应用研究的发展。随着有关研究的不断深入,大量高效分离肝细胞成为重要的条件之一[1]。为满足生物人工肝等研究的要求,我们建立了一种组合式简易灌流装置及方法,对兔、猪、人胎肝进行体外两步灌流,消化分离肝细胞取得较好的效果。

1 材料与方法

1.1 实验肝脏及来源

实验肝脏选用成年日本大耳白兔(3只)、新生中国实验小型猪(6只)及人胎肝(6个)。成年兔体重2.5~2.8 kg,新生(6~14 d)小型猪体重1.1~2.3 kg,两种动物均由本校实验动物中心提供。人胎肝来自引产死胎,人胎龄5~6个月,胎死时间1~3 h。

1.2 灌流装置

灌流装置由蠕动泵、特制小型恒温水浴箱、硅胶液体传输管、塑料留置软管针、不锈钢网和烧杯等共同组成。使用时将实验肝脏放在不锈钢网上,并置烧杯上,烧杯内分装前灌流液和胶原酶液,共置于水浴池中,水温控制在38~39 ℃。硅胶管通过蠕动泵分别与灌流液体和灌流软管相连,灌流时烧杯内的液体在蠕动泵的驱动下,沿导管、灌流针及血管进入肝脏,消化作用后又溢出肝脏,流入杯中,形成循环恒温灌注方式。酌情更换灌流液体和终止灌流。

1.3 肝细胞的消化分离

无菌条件开腹暴露门静脉并注入肝素钠100~150 U。游离肝脏,于肝门处剪下取出,置体外灌流装置不锈钢网上进行整体肝两步循环灌流。前灌流液为含EDTA、无Ca^{2+}及Mg^{2+}的Hanks液,共500 ml,其中300 ml灌流后丢弃,另200 ml循环灌流,灌速控制在80~100 ml/min,时间约10~15 min。第二步灌流液为0.05%胶原酶液,循环灌速为50~70 ml/min,时间约10 min。灌流结束后,用剪刀划破肝包膜,剔除大块纤维结缔组织,收集细胞悬液,再置37 ℃条件下消化10~15 min。用RPMI 1640培养液终止消化,两层纱布过滤2次,50× g反复离心3~4次获取肝细胞。

1.4 观察方法

使用血细胞计数板计数肝细胞获得量,0.4%台盼蓝拒染试验判断细胞活力。按1×10^5/ml接种于塑料培养瓶,使用倒置相差显微镜观察细胞纯度、贴壁生长情况和增殖生长能力,生化分析仪检测培养上清乳酸脱氢酶(LDH)含量。

1.5 统计学方法

数据以$\bar{x}\pm s$表示,组间比较采用t检验。

2 结果

2.1 肝细胞分离效果

采用简易体外灌流装置两步法消化分离兔、猪、人胎肝细胞的活力与肝细胞获得量见表1。从表中可见,3种不同肝脏分离效果以小型实验猪肝细胞分离较好,人胎肝细胞次之,成年家兔肝细胞分离效果相对较差($P<0.05$)。

表1 消化分离肝细胞结果($\bar{x}\pm s$)

	成年兔(n=3)	小型乳猪(n=6)	人胎肝(n=6)
活力(%)	90.3 ±4.5	94.2 ±3.5	94.1 ±2.3
细胞量(×10^6/g)	3.83±0.40	7.97±1.01*	5.45±1.16
纯度(%)	97.1 ±0.6	97.5 ±1.1	97.2 ±1.0

*:$P<0.05$与成年兔组比较

2.2 分离肝细胞的培养

3种不同来源肝细胞分离后均可在塑料培养瓶内贴壁,在常规37 ℃、5%CO_2、95%O_2条件下培养生长,贴壁情况、增殖能力、培养时间等综合评价显示,人胎肝细胞的培养情况最佳,小型实验乳猪和成年家兔肝细胞稍差,见图1~3。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970214,30027001);全国优秀博士基金资助项目(199947)
作者简介:郭海涛(1976-),男,江苏省阜宁市人,硕士研究生,医师,主要从事人工肝相关基础课题方面的研究。电话:(023)68754475-8062
通信作者:王英杰,电话:(023)68754475-8062
收稿日期:2002-09-07;修回日期:2002-12-13

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

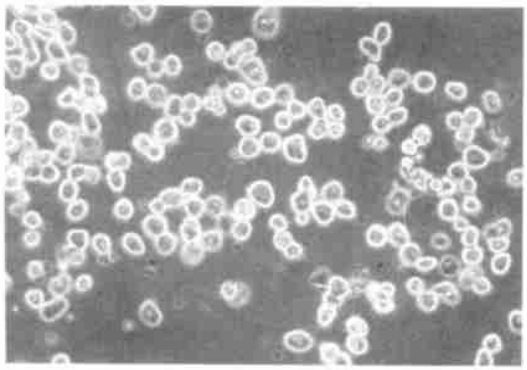


图 **1** 刚分离的家兔肝细胞 (× 100)

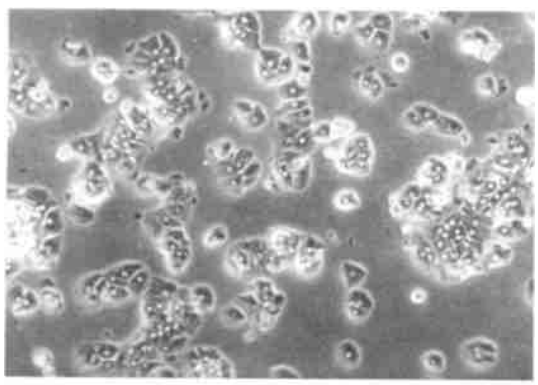


图 **2** 分离培养 **20 h** 的猪肝细胞 (× 100)

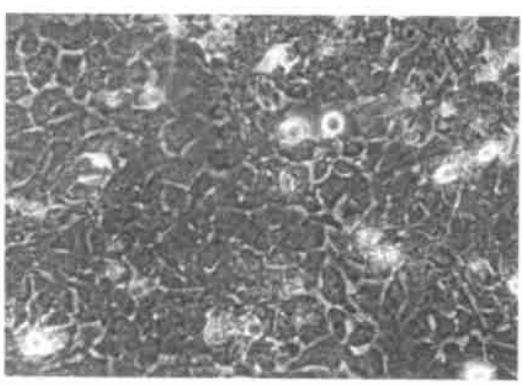


图 **3** 分离培养 **1** 周的人胎肝细胞 (× 200)

2.3 分离肝细胞的 LDH 释放量

接种培养 4 h, 家兔、乳猪、人胎肝细胞培养上清中 LDH 的释放量(U/L)分别为 34.7±5.8、15.2±4.6、29.2±7.1, 24 h 分别升高至 64.7±17.3、18.7±5.8、52.6±21.4, 48 h 培养上清 LDH 的释放量未进一步上升。

3 讨论

肝细胞分离最早采用机械分离法, 其最大的优点是不会像酶消化法那样对细胞膜蛋白造成改变, 但产量很低, 所分离的肝细胞活力差。现多采用原位两步灌流法[2], 此方法已成为肝细胞和肝脏相关基础与临床实验研究的重要工具[3]。

本研究所用的肝细胞消化制备同样采用此方法, 所不同的是肝细胞消化分离过程的无菌要求严格, 需要分离获取的肝细胞数量更大、活性更高。故与普通消化分离肝细胞相比, 生物人工肝的研究与应用需要尽可能达到大量、快捷、高效、高质量地分离肝细胞。本研究借鉴外科肝叶切除后进行体外灌流分离肝细胞的成功经验[4,5], 将较大动物肝脏和人胎肝游离后, 用灌流装置进行整体肝两步灌流分离肝细胞。通过严格掌握灌流液温度、pH 值、灌流速度及时间, 充分剔除肝纤维结缔组织, 精心控制振荡消化时的肝细胞悬液浓度、消化时间, 采用"二次"过滤法等, 消化分离肝细胞的产量较多、活性好、纯度高, 接种培养后增殖生长旺盛, 满足了生物人工肝的研究的要求。

本研究所建灌流装置及方法具有如下优点: ①装置简单, 无复杂设备, 各部分易组合; ②操作方便, 单人可完成操作; ③对较大动物肝脏的循环式整体肝连续灌流, 不仅节约了试剂, 而且消化分离肝细胞快捷、可靠。如选用肝静脉(而非门静脉)作为灌流血管并用缝线将导管与肝静脉结扎, 可减少灌流液的外漏, 确保肝组织的充分灌注和广泛消化, 能获取更多的肝细胞。

肝细胞的分离效果受诸多因素的影响, 在分离技术方法相同的情况下, 分离肝细胞的数量和质量主要受肝组织种类、供体年龄、肝组织获取时间等影响。本研究中, 新生小型实验猪肝细胞的分离效果较好, 人胎肝细胞因受死胎时间较长、肝内血液凝固致灌流不良影响次之。成年家兔肝细胞分离效果较差的原因可能与其年龄相对较大、肝组织内纤维结缔组织相对较多有关, 提示新生猪肝细胞和人胎肝细胞是生物人工肝研究理想的细胞材料。

关键词: 肝细胞; 分离; 灌流装置
中图法分类号: R-331; R322.47 文献标识码: B

参考文献:

[1] Morsiani E, Rozga J, Scott H G, *et al*. Automated liver cell processing facilitates large scale isolation and purification of porcine hepatocytes[J]. ASAIO J, 1995, 41(2): 155—161.

[2] Seglen P O. Preparation of isolated rat liver cells[J]. Methed Cell Biol, 1976, 13(1): 29—83.

[3] Moshage H, Yap S H. Primary cultures of human hepatocytes: a unique system for studies in toxicology, virology, parasitology and liver pathophysiology in man[J]. J Hepatol, 1992, 15(3): 404—413.

[4] Ismail T, Howl J, Wheatley M, *et al*. Growth of normal human hepatocytes in primary culture: Effect of hormones and growth factors on DNA synthesis[J]. Hepatology, 1991, 14(6): 1076—1082.

[5] Dorko K, Freeswick P D, Bartoli F, *et al*. A new technique for isolating and culturing human hepatocytes from whole or split livers not used for transplantation[J]. Cell Transplant, 1994, 3(4): 387—395.

(编辑 王 红)

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