DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.049
第24卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 2
2002年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2002

文章编号:1000-5404(2002)02-0223-02

技术方法

大鼠肝脏枯否细胞分离、培养与鉴定

Isolation, culture and identification of Kupffer cells from rat liver

冯俊明,史景泉,刘友生,辛 榕,章 蓉 (第三军医大学附属西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究大鼠肝Kupffer细胞(KC)分离、培养和鉴定。方法 用Ⅳ型胶原酶离体灌注、差速离心分离大鼠KC,再经贴壁培养,并应用免疫组织化学、吞噬功能实验、电镜等方法进行鉴定。结果 此法能成功地获得较高纯度的KC,KC的获得率为每只大鼠(7~10)×10^6,贴壁后细胞呈典型的星形或多角形,免疫组织化学染色显示lysozyme阳性,胞浆内见吞噬的latex beads颗粒,电镜观察显示细胞表面伪足及微绒毛发达,胞浆内含有大量的溶酶体及吞噬的latex beads颗粒。结论 该方法简单易行,细胞纯度较高,可进一步用于KC的其它方面的研究。

枯否细胞(Kupffer, KC)是体内最大的固定型巨噬细胞群,由于其所处位置的特殊性,它在抗肠源性内毒素的免疫防御中起重要作用[1]。因此,KC的激活及其功能性反应对局部肝组织及全身的损伤有十分重要的意义。本研究应用胶原酶Ⅳ型离体灌注、差速离心法成功分离大鼠KC细胞,并用免疫组织化学、吞噬功能实验和电镜等方法进行了鉴定。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性Wistar大鼠,体重(400±20)g,由本校实验动物中心提供。普通饲料喂养,实验前禁食18 h。

1.2 实验试剂

Latex beads颗粒(直径0.885 μm)和胶原酶Ⅳ型购自Sigma公司,DMEM为GIBCO公司产品。兔抗人desmin、lysozyme、factor-Ⅷ相关抗原购自华美生物工程公司(DAKO公司产品),S-P免疫组化试剂购自福州迈新公司。

1.3 方法

1.3.1 KC的分离 按Doolittle和Ricter等[2]方法并加以改进。①常规3%的戊巴比妥钠腹腔麻醉、开腹后,经门静脉注入肝素(125 U/ml)5 ml。②取下肝脏,以无Ca^{2+}、Mg^{2+}而含EDTA的灌注液沿肝脏断面血管灌注,同时剪断下腔静脉放血,直至肝脏变白后,以0.05%的Ⅳ型胶原酶按同样方法灌注,37 ℃消化15~20 min,待肝脏变软后小心剥离肝包膜并制成细胞悬液。150目网筛过滤。③将以上滤液用50× g(500 r/min)×2 min离心4次(每次用50 ml Hanks液洗细胞),取前3次上清。④将以上清液以500× g(1 500 r/min)×3 min离心,弃沉淀。⑤加20 ml洗液,混匀后50× g×2 min离心2次。⑥重复④和⑤。⑦500× g×3 min离心2次,弃上清。⑧加适量含20%新生小牛血清的DMEM,台盼蓝染色判断细胞产率和存活率。

1.3.2 KC的培养 细胞按3.5×10^6/ml接种于培养瓶内,培养基为DMEM,其中含20%小牛血清、15 mmol/L HEPES、0.05 U/ml胰岛素、15 mmol/ml L-谷氨酰胺、100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素。置5%CO_2、95%空气培养箱中37 ℃培养,4 h后换液,以后每24~48 h换液1次。

1.3.3 KC的鉴定

1.3.3.1 荧光显微镜观察 首次换液后的KC,置328 nm波长下观察细胞自发荧光的情况。

1.3.3.2 免疫组织化学染色 一抗为兔抗人desmin、lysozyme、factor Ⅷ相关抗原;细胞为原代培养2 d的KC,95%乙醇固定20 min,常规S-P法染色,DAB显色。每次实验均设阴性对照,以0.01 mol/L PBS代替一抗(结果为阴性)。

1.3.3.3 吞噬功能实验 培养于6孔板内的KC加入40 μl的latex beads颗粒,2 h后用含10%小牛血清的BSS冲洗,相差显微镜下观察。

1.3.3.4 透射电镜观察 将加入latex beads颗粒的KC用3%戊二醛固定24 h后按常规方法进行透射电镜观察。

2 结果

2.1 分离KC的数量

本实验分离所得的肝非实质细胞以培养基稀释后用0.4%的台盼蓝染色计数,每个大鼠可得到(7~10)×10^6个细胞,且细胞的存活率可达到95%以上。

2.2 光镜观察

新分离的KC在倒置显微镜下呈圆球形,折光性强,直径约20 μm,悬浮于培养基中;4 h后见大部分已贴壁,呈扁圆形,极少量细胞已开始伸突,24 h见大量细胞伸展生长,48 h时细胞已完全展开,细胞体积明显增大,外形不规则,细胞呈现典型的星形或多角形,边界不清楚,胞浆透明,有时可见吞噬颗粒;胞核呈肾形。

2.3 荧光显微镜观察

在328 nm处未见明显的细胞自发荧光现象。

2.4 免疫组化染色

S-P免疫组化染色显示,原代培养2 d的KC细胞的lysozyme阳性率在90%左右,而desmin、factor-Ⅷ相关抗原未见明

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770759)
作者简介:冯俊明(1968-),男,四川省名山县人,博士研究生,讲师,主要从事创伤病理方面的研究。电话:(023)68754000-73105
收稿日期:2001-02-24;修回日期:2001-04-15

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

显阳性。

2.5 吞噬功能实验

相差显微镜下见KC细胞胞浆内有大量吞噬的latex beads颗粒，见图1。

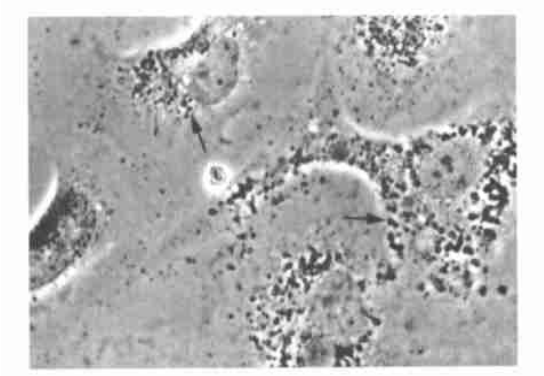


图1 培养48 h的KCs，相差显微镜下见KC胞浆内有大量吞噬的latex beads颗粒（↑）（×400）

2.6 透射电镜观察

见KC表面有发达的微绒毛和伪足，胞浆内含有大量的溶酶体和吞噬的latex beads颗粒的吞噬溶酶体。

3 讨论

KC是体内最大的固定型巨噬细胞群，它在多种因素所致的肝损伤（包括肝移植）及其继发病变中起着至关重要的作用。研究表明，KC通过自身或与肝细胞、贮脂细胞（Ito细胞）的相互作用，释放细胞因子（如TNF、白介素）、NO等，参与急、慢性肝损伤和肝纤维化的调控。因此，建立稳定、简便、经济、可靠的KC的方法，对于研究各种因素所致的肝急、慢性损伤的发生、发展及调控具有重要的现实意义。

本研究参照Doolittle等[2]的方法，并对灌注方法进行了改良。原方法采用在体灌注法，而本实验采用离体灌注法成功地建立了分离大鼠肝KC的方法。该法具有以下优点：①可以较彻底地将肝窦中的红细胞等冲洗干净，从而较好地避免了培养细胞因红细胞溶解而造成的细胞生长不良现象。作者此前也曾用在体灌注法，由于花费时间较长，常常会引起红细胞溶解，而其溶解产物对KC的活性及生长均有一定的影响。②明显节约胶原酶的用量：采用在体循环灌注法每次所需酶量较多（每只大鼠约需酶50～150 ml），造成明显的浪费。而本法每次每只大鼠只需酶20～30 ml即可，通过反复灌注，消化效果极佳，剔除肝包膜后即可制成混合肝细胞悬液，可以说是一种十分经济有效的方法。③缩短实验时间。在体循环灌注法所需时间约为4～5 h，而本法只需2～3 h，大大缩短了实验时间，使KC活力受损的程度大大降低；同时也减少了因实验操作时间长而引起的污染。④应用胶原酶体内静脉灌注及Pronase E消化（破坏肝细胞）法获得KC是目前国内外普遍应用的方法[3]，其中Pronase E的主要作用是消化破坏肝细胞，以便得到更为纯净的肝非实质细胞。但有实验证实Pronase E在破坏肝细胞的同时也会破坏KC表面的抗原CD14[4]，而CD14又是低浓度LPS激活巨噬细胞的一种关键受体。因此此法所得的KC不能完全反映其功能，所以本实验只用Ⅳ型胶原酶进行灌注消化，这也是与原方法不同的地方。

本实验中KC的获得率大约为每只大鼠（7～10）×10^6个细胞。影响细胞得率的主要有以下因素：①大鼠体重及肝/体比，一般选用体重（400±20）g、营养状况良好的健康大鼠较为适宜。②肝脏消化是否是影响细胞获得率及活力的关键因素。一般采用0.05%的胶原酶灌注较为理想，反复灌注2～3次后即可消化良好。对于体重较大或肝/体比偏大的大鼠，可适当增加灌注次数以延长酶作用时间。胶原酶以Ⅳ型较为理想。③灌注时的压力大小也是影响KC得率的因素之一。压力太小，不足以冲洗干净红细胞，太大则有可能冲掉肝窦内的KC。一般以20～30 ml/min的速率冲洗较为合适。

本实验中KC通过以下方法进行鉴定：①荧光显微镜观察：首次换液后的KC置328 nm波长下观察，未见到明显的细胞自发荧光现象，说明其中所含的贮脂细胞量极少。②免疫组化染色：对肝实质细胞中KC特异的lysozyme进行免疫组化染色，其阳性率达90%以上；而针对贮脂细胞和内皮细胞的desmin、factor-Ⅷ相关抗原的免疫组化染色基本均呈现阴性。说明分离所得KC的纯度较高。③吞噬功能实验及透射电镜观察：以培养细胞是否吞噬latex beads颗粒鉴定其是否为KC，实验结果进一步证实了以上结论。通过以上几种方法的鉴定，明显反应出本方法所得的KC纯度较高（90%以上），完全适用于进一步的实验研究。

总之，本实验在注重分离效果的同时还顾及了实验的成本问题，分离所得的KC能用于其进一步的实验研究。

关键词：Kupffer细胞；分离；鉴定
中图法分类号：R322.47；R329.24 文献标识码：B

参考文献：

[1] Sawada N. Active proliferation of mouse epatocytes in primary culture under defined conditions as compared to rat epatocytes[J]. J Cancer Res, 1998, 79: 983.

[2] Doolittle R L, Ricter G W. Isolation ang culture of Kupffer cells and epatocytes from Single rat livers[J]. Lab Invest, 1981, 45(6): 558.

[3] 王宇明. 分离小鼠肝细胞的一种简易灌流法[J]. 中国应用生理学杂志, 1993, 9(1): 65－67.

[4] Ikejima K, Enomoto N, Seabra V, *et al*. Pronase destroys te lipoplyaccaride receptor CD14 on kupffer cells[J]. Am J Pysiol, 1999, 276(3 pt 1): G591－598.

（编辑 陈聪连）

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