DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.06.010
第23卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 6
2001年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2001

文章编号:1000-5404(2001)06-0647-03

论著

体外培养树鼩肝细胞的初步观察

闵 峰[1],郝 飞[1],刘 冰[2],刘国栋[1],宋志强[1],黄纪明[1],王宇明[1] ([1]第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所,重庆 400038;[2]解放军第520医院传染科,绵阳 621000)

提 要:目的 探讨体外培养的树鼩肝细胞形态结构与生物合成功能。方法 采用体外两步灌流法分离肝细胞,以L15培养基予以培养,光电镜下动态观察细胞形态结构,同时检测不同时相点培养上清中蛋白及甲胎蛋白含量。结果 采用简易体外两步灌流法分离的肝细胞,经台盼蓝拒染试验证实肝细胞的存活率为90%,体外培养的肝细胞在第3~10天具有良好的增殖分化功能,维持此形态和功能至培养第18天。结论 体外培养的树鼩肝细胞具有良好的形态结构和生物合成能力,能够满足肝炎病毒体外研究培养的需要。

关键词:树鼩;肝细胞;细胞培养
中图法分类号:R322.47;R329.28 文献标识码:A

Preliminary study on the cultivation of *Tupaia* hepatocytes *in vitro*

MIN Feng, HAO Fei, LIU Bin, LIU Guo-dong, SONG Zhi-qiang, HUANG Ji-ming, WANG Yu-ming (Institute of Infections Diseases of PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the morphology and function of cultured adult *Tupaia* hepatocytes *in vitro*. Methods Adult *Tupaia* hepatocytes were isolated by two-stage perfusion method and cultured in L15 medium. Morphology of hepatocytes were observed dynamically by light-microscope and electron-microscope and the protein and alpha feto-protein of supernatant were determined at various phase during culture. Results The viability of hepatocytes using the perfusion method was approximately 90% (trypan blue test) and kept good function of proliferation and differentiatin on 3~10 days and could be cultured for 18 days with normal morphogical appearance and function of biosythsis. Conclusion The cultured adult *Tupaia* hepatocytes can maintain their morphology and function of biosythsis and may be used as a tool for hepatitis virus infection *in vitro*.

Key words: *Tupaia*; hepatocytes; cell culture

树鼩(*Tupaia*)属食虫目,但分类地位有争议,认为处于灵长目与食虫目中间地位,可作为多种疾病的动物模型。盛产于我国西南地区,有来源广泛,价廉易得,便于饲养等特点[1]。有研究报道树鼩能被乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒等感染,并在其肝脏中复制,认为树鼩可作为这些病毒的动物感染模型[2~5],但有关于树鼩肝细胞体外感染的细胞模型国内外报道甚少。因此,我们采用简易体外两步灌流法对树鼩肝细胞进行分离,并用L15培养基予以培养,探讨成年树鼩肝细胞在体外的培养状况,并对其形态和功能进行观察,旨在为建立肝炎病毒体外细胞感染模型奠定一定的实验基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料

1.1.1 动物和主要试剂 树鼩:成年树鼩购自中国科学院昆明动物研究所,5~8月龄,体重110~140 g,雌雄不限,双只关养,喂予综合饲料包括鸡蛋、牛奶、水果、蚕蛹及小鼠颗粒饲料等,饮用自来水。细胞分离和培养试剂:Ⅳ型胶原酶、L15培养基、为美国Sigma公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞分离和培养 采用体外两步灌流法分离树鼩肝细胞[6,7]。简要过程如下:取5~7月龄成年树鼩,用3%戊巴比妥钠0.4~0.5 ml腹腔注射麻醉,常规消毒后打开腹腔,分别自门静脉及下腔静脉注射1.25%肝素钠2~3 ml后,用37 ℃前灌流液对肝脏进行灌注,至大部分肝叶呈灰白色,再以4 ml/min灌注37 ℃ 0.05%的Ⅳ胶原酶,待肝组织完全软化或肝包膜下组织液化后用镊子钝性撕碎。37 ℃震荡消化15 min,三层纱布过滤,40× *g* 离心5 min后漂洗,反复3次,收集肝细胞。吸取90 μl肝细胞悬液,加入0.4%台盼蓝拒染溶液10 μl混匀,相差显微镜观察鉴定刚分离的肝细胞存活率。然后用含10%小牛血清的L15完全培养基稀释,按细胞密度3× 10^5/ml接种于25 ml培养瓶,置入37 ℃ 5% CO_2 培养箱中培养。

1.2.2 形态学观察和功能检测 用Olympus倒置相差显微镜观察培养细胞的贴壁、伸展、增殖及生长状况;取培养细胞用0.25%胰蛋白酶37 ℃消化5 min,40× *g* 离心5 min,弃去上清,用PBS冲洗,反复离心2次,然后将细胞团块以3%戊二醛溶液固定后,醋酸铅染色,Epon812包埋,制成超薄切片,置于透射电镜下观察其超微结构;取不同时相的培养上清检测其蛋白含量,指标包括总蛋白(双缩脲法)、白蛋白(溴甲酚绿法)和甲胎

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670672)
作者简介:闵 峰(1970-),男,安徽省无为县人,硕士,医师,主要从事病毒性肝炎体外感染细胞模型建立方面的研究,现在解放军第174医院传染科,厦门市 361003。电话:(0592)8890632
收稿日期:2000-04-21;修回日期:2000-12-02

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

蛋白(火箭放射自显影法),均由本院检验科协助完成。

2 结果

2.1 倒置相差显微镜观察

采用简易体外两步灌流法,从体重115~130 g树鼩的肝脏中共分离获得(2.65~2.76)×10^8个肝细胞。台盼蓝拒染试验证实分离肝细胞的存活率为90%,接种24 h后镜下连续计数,肝细胞纯度达95%以上。刚分离的树鼩肝细胞大小较均匀呈圆球形,部分细胞呈星状分布,部分细胞相互粘连聚集,呈葡萄状,粘连细胞数多寡不一。接种于胶原被覆培养瓶或培养板中1~3 h部分细胞贴壁,并开始伸展,24 h后细胞体积明显增大,大多仍呈圆球形,同时可见双核细胞,见图1A,培养48 h后双核细胞显著增多,细胞增殖明显活跃,肝细胞进一步伸展由圆形转变呈不规则多边或多角形以及长条形,细胞间隙逐渐缩小;经7~14 d的培养,肝细胞相互接触,布满视野,见图1B,肝细胞维持此状态至18 d。此后培养液中漂浮细胞逐渐增多,细胞轮廓欠清晰,培养液中可见黑色颗粒状物质,至培养第21天,细胞轮廓不清晰,大部分细胞开始崩解与板壁和瓶壁脱离,遂即终止培养。

2.2 透射电镜观察

培养肝细胞形态结构清晰,细胞膜边界清晰,结构完整,细胞膜表面有较多微纤毛突起,胞浆内线粒体丰富,内质网、高尔基体清晰,核膜完整,核仁清晰,核质均匀,常染色质多见,未见异染色质和异形核,见图2。

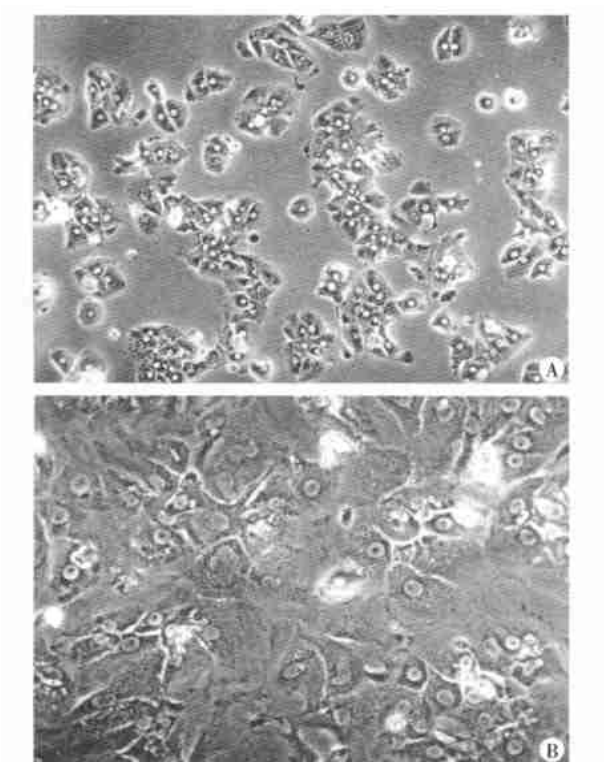


图1 树鼩肝细胞形态结构 (×200)

A:培养第2天;B:培养第12天

Fig 1 Morphology of cultured hepatocytes of *Tupaia* (×200)

A: Cultured for 2 d; B: Cultured for 12 d



图2 树鼩肝细胞(培养第8天) (TEM×4 000)

Fig 2 Morphology of cultured hepatocytes of *Tupaia* (Cultured for 8 d) (TEM×4 000)

2.3 肝细胞功能

接种后第1天培养的肝细胞合成白蛋白量为6.8 $mg\cdot ml^{-1}\cdot 24\ h^{-1}$,以后逐渐增加,第7天达峰值为12.8 $mg\cdot ml^{-1}\cdot 24\ h^{-1}$,并维持至第10天,以后逐渐减少至终止培养,总蛋白合成量与白蛋白大致相仿;培养肝细胞甲胎蛋白的合成于第1天即处于较高水平为3.45 $\mu g\cdot ml^{-1}\cdot 24\ h^{-1}$,第3天达峰值为6.23 $\mu g\cdot ml^{-1}\cdot 24\ h^{-1}$,以后逐渐减少,第17天以后检测不出。

2.4 细胞生长曲线

在细胞接种后第1天,细胞生长曲线较平坦,细胞数量由第2天2.8×10^5/ml,第6天增加到3.62×10^5/ml,随后数量增加不明显,至第9天细胞数量3.72×10^5/ml,维持1周,至第17天后细胞生长曲线呈下降趋势。

3 讨论

目前,树鼩这一与人类相接近的低等灵长类动物用于肝病研究越来越引起人们的关注,但迄今国内外有关树鼩肝细胞分离培养的研究报道甚少。为此,我们利用体外两步灌流法,对树鼩肝细胞进行分离培养,结果显示,简易体外两步灌流法同样适合于树鼩肝细胞分离,肝细胞获得率与存活率均较高。

为了解体外培养分离的肝细胞生长情况,我们对培养肝细胞形态结构和功能进行动态观察,普通光镜下显示培养细胞为贴壁细胞,接种12 h后细胞开始伸展增殖,细胞由圆球形转变成不规则多边形,培养3~5 d细胞体积明显增大,细胞核大呈圆形,在细胞分裂增殖期,双核细胞多见;电镜下显示胞浆内含有丰富的细胞器,如线粒体、内质网、高尔基体等,糖原颗粒丰富。同时我们还对培养细胞上清液中蛋白含量进行检测,为了排除培养液对其影响,在培养条件不变的情况下,每24 h更换培养液并收集标本进行检测,动态观察上清液蛋白含量的变化,结果发现白蛋白及总蛋白的合成能力可保持较高水平达2周;甲胎蛋白在第1天就处于较高水平,第3天达峰值,第7天后逐渐下

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

降,提示细胞增殖活跃期在第 3 ~7 天,甲胎蛋白是反映肝细胞增殖良好指标之一,在细胞增殖分化期甲胎蛋白合成量多,而在细胞分化成熟期合成量少,这一特点与人的肝细胞相一致。上述结果提示体外培养的肝细胞具有良好增殖分化功能,培养时间长达 3 周左右,能够满足肝炎病毒体外研究的需要,也为我们研究肝炎病毒体外细胞感染模型提供了良好的实验依据。探讨肝炎病毒复制机制、筛选抗肝炎病毒新药以及疫苗的研制奠定基础。

参考文献:

[1] 郝光荣. 常用动物种类介绍[A]. 见: 魏　泓 主编. 医学实验动物学[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1998. 216—218.
[2] 王海平, 周永兴, 姚志强, 等. 成年 Tupaia 实验感染丙型肝炎病毒的初步研究[J]. 第四军医大学学报, 1997, 18(4): 375—376.
[3] 李奇芬, 丁明权, 王　洪, 等. Tupaia 感染丁型肝炎病毒的实验研究[J]. 中华医学杂志, 1995, 75(5): 611—613.
[4] Xie Z C, Riezu-Bo J I, Lasartet J, *et al*. Transmission of hepatitis C virus infection to Tree Shrews[J]. Viroloy, 1998, 244(1): 513—520.
[5] Walter E, Kiederost B, Niederost B, *et al*. Hepatitis B virus infection of *Tupaia* hepatocytes *in vitro*[J]. Hepatology, 1996, 24(1): 1—5.
[6] 王宇明, 陈国政, 董家鸿, 等. 分离肝细胞的一种体外灌流法[J]. 中华消化杂志, 1994, 14(2): 175—178.
[7] 王英杰, 王宇明, 李梦东. 培养人胎肝细胞的形态与功能研究[J]. 新消化病杂志, 1997, 5(5): 291—292.

(编辑　潘式文)

文章编号: 1000-5404(2001)06-0649-01

个案与短篇

布依族 Messmann 角膜营养不良一家系

Report of a family tree of messmann corena malnutrition in Buyi nationality

马云霞, 张　红　　(贵阳市第一人民医院眼科, 贵阳 550002)

家庭性 Messmann 角膜营养不良, 是一种较为少见的常染色体显性遗传性角膜疾病。国内曾有报告, 但布依族家系尚未见报告, 我的所见布依族 Messmann 角膜营养不良家系 4 代, 7 例, 现报告如下。

1　临床资料

家族系图, 见图 1。

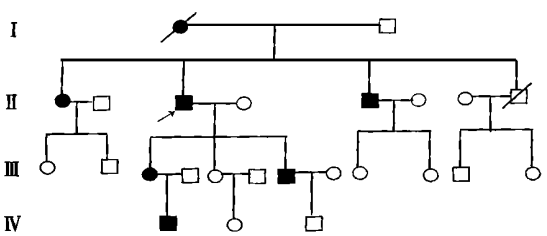


图 1　布依族 **Messmann** 角膜营养不良家系图

●: 女性患者; ○: 女性正常人; □: 男性正常人; ■: 男性患者; ⊘: 已死亡女性患者; ⊡: 已死亡男性正常人

临床病例: 先证者, 罗××, 男, 65 岁, 因双眼间歇性畏光流泪, 异物感伴视力下降 10 余年, 于 1999 年 10 月就诊。检查: 双眼视力均为 0.1, 矫正视力 0.15, 双眼裂隙灯显微镜下见角膜上皮粗糙, 上皮层内有对称密集灰白色点状混浊, 以脸裂部明显, 形成小斑块状云翳, 裂隙灯后照法可见少许小囊泡, 角膜基质层透明, KP(—), 眼内检查正常。全身常规体检无异常。

次证者, 罗××(先证之女), 女, 36 岁, 有近视史 20 余年, 度数不断加深, 常更换镜片。双眼阅读时间长或休息差时有畏光, 疼痛。视力右眼 0.2, 矫正 0.6。左眼 0.25, 矫正 0.6。裂隙灯显微镜下见: 双眼上皮层灰色小点状混浊及散在小泡, 基质层透明, KP(—), 内眼正常。

再证者, 罗×(先证之子), 男, 30 岁, 双眼 5 年前患"角膜炎"而退役。视力逐渐下降, 常因劳累、饮酒后双眼畏光不适, 点"润舒眼药水"可改善症状。视力右 0.5, 矫正视力 1.0, 左 0.4, 矫正视力 0.8。裂隙灯显微镜下见角膜中央散在灰白色小点状及囊泡样病变, 点状混浊与囊泡间上皮透明。内眼无异常。

再证者, 卢×(先证之外孙), 男, 13 岁, 自幼视力差, 看电视及做作业时间久后双眼疼痛, 畏光流泪。视力双眼 0.4, 矫正视力均为 1.2。裂隙灯显微镜下可见脸裂部角膜上皮内散在点状白色混浊, 角膜基质透明, KP(—), 内眼正常。

家族史: 追问患者家族史, 先证者母亲及姐姐弟弟均有畏光流泪, 视力差病史。其母亲去世前是双目失明。姐、弟在家乡务农, 视力均差。患者的身体健康, 否认其它病史, 据先证本人所诉家人症状及否认近亲婚配史。故分析均患有此症。

2　讨论

Messmann 角膜营养不良, 又名青年遗传性上皮性角膜营养

(下转 651 页)

作者简介: 马云霞(1957—), 女, 回族, 陕西省岐山县人, 主治医师, 主要从事眼外伤及眼病遗传学方面的研究。电话: (0851)5977306

收稿日期: 2000-11-25; 修回日期: 2001-01-05

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