DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.02.056

法较好。

关键词：毛细血管；染色方法；大鼠
中图法分类号：R446 文献标识码：B

参考文献：

[1] 杜卓民. 实用组织学技术[M]. 第2版. 北京：人民卫生出版社，1998. 132—136.
[2] Lind A, Kernell D. Myofibrillar ATPase histochemistry of rat skeletal muscles: A "two-dimensional" quantitative approach[J]. J Histochem Cytochem, 1991, 39(2): 589—597.
[3] Skorjanc D, Jaschinski F, Heine G, *et al*. Sequential increases in capillarization and mitochondrial enzymes in low-frequency-stimulated rabbit muscle[J]. Am J Physiol, 1998, 274(6 Pt1): C810—C818.
[4] 陈啸梅，周文郁，彭俊云，等. 组织化学手册[M]. 北京：人民卫生出版社，1982. 117—182.
[5] 王有伟，陈以慈. 碱性磷酸酶染色法(钙铅法)在研究人脑和心脏微血管方面的应用[J]. 解剖学杂志，1986, 9(2): 227—228.
[6] Xie Z, Gao M, Batra S, *et al*. The capillarity of left ventricular tissue of rats subjected to coronary artery occlusion[J]. Cardiovas Res, 1997, 33(2): 671—676.
[7] LaManna J C, Vendel L M, Farrell R M. Brain adaptation to chronic hypobaric hypoxia in rats[J]. J Appl Physiol, 1992, 72(6): 2 238—2 243.
[8] Hansen-Smith F M, Watson L, Joswiak G R. Postnatal changes in capillary density of rat sternomastoid muscle[J]. Am J Physiol, 1989, 257(1 Pt 2): H344—347.
[9] Hansen-Smith F M, Blackwell L H, Joswiak G R. Expression of muscle capillary alkaline phosphatase is affected by hypoxia[J]. J Appl Physiol, 1992, 73(2): 776—780.
[10] Koyama T, Xie Z, Gao M, *et al*. Adaptive changes in the capillary network in the left ventricular heart[J]. Jpn J Physiol, 1998, 48(2): 229—241.
[11] Kasper M, Schobel R, Haroske G, *et al*. Distribution of von Willebrand factor in capillary endothelial cells of rat lungs with pulmonary fibrosis[J]. Exp Toxical Pathol, 1996, 48(1): 283—288.

（编辑 薛国文）

文章编号：1000-5404(2001)02-0239-02

技术方法

体外分离培养正常成人肝细胞的方法

Study on isolation and culture of adult hepatocytes *in vitro*

马巧玉，王宇明，郝 飞，刘国栋 （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 探讨体外分离培养成人肝细胞的方法。方法 用体外二步灌流法分离正常成人肝细胞，用PRMI-1640细胞培养液维持培养1月以上。结果 成人肝细胞可在体外被分离并存活1月以上。结论 正常成人肝细胞可在体外分离培养以供各种肝病基础和临床研究。

各种肝脏疾病(特别是病毒性肝炎、原发性肝癌)在我国发病率高，无可靠治疗方法，因此，迫切需要在肝脏疾病的发病机制及治疗方面有所突破。近年来，国内外有许多关于用动物肝细胞，肿瘤细胞甚至胎儿肝细胞进行肝脏疾病研究的报道，但这些细胞与自然状态的成人肝细胞有较大差别，我们在体外分离培养正常成人肝细胞，以期寻找与自然状态最为接近的、更适宜于进行肝脏疾病的发病机制和防治研究的细胞模型。

1 材料和方法

1.1 主要材料

1.1.1 正常成人肝组织标本 取意外死亡之3例成年男性(19、24、35岁)、1例成年女性(27岁)肝脏，均无肝病史，临床生化和病理检查无异常，各种肝炎病毒标志物、AIH检测均阴性。

1.1.2 试剂 小牛血清由本校试剂中心提供，用前56 ℃×30 min灭活补体。PRMI-1640培养基购自美国GIBCO公司。胶原酶、胰蛋白酶抑制剂由美国SIGMA公司提供。分散酶购自德国宝灵曼公司。

1.2 实验方法

1.2.1 正常成人肝细胞分离 采用体外二步灌流法分离正常成人肝细胞[1,2]。取肝脏100 g，将肝组织置于培养皿中，用37 ℃含Ca^{2+}、Ma^{2+}前灌流液自残存血管中反复灌注，至大部分肝脏呈现灰白色，用37 ℃、0.05%的胶原酶(含0.1%分散酶)反复注入残存血管，剪碎肝组织，37 ℃震荡，消化30 min，3层无菌沙布过滤，450 r/min×4 min离心，弃上清，反复3次，最后用含10%小牛血清RPMI-1640培养液(完全培养液)按细胞密度1×10^6/ml稀释后按5 ml/瓶，10 ml/瓶分别接种至25 ml，50 ml培养瓶，置于37 ℃、5% CO_2培养箱孵育。

1.2.2 正常成人肝细胞培养 24 h后换液，弃去含漂浮细胞的培养液，按上述比例，加入RPMI-1640完全培养液，此后每2~3 d更换完全培养液1次，维持培养1月以上。于培养第10、20、30天分别计数肝细胞数，台盼蓝染色确定肝细胞存活率。

2 结果

2.1 细胞分离

由于肝组织为非全小叶标本，前灌液和胶原酶灌注仅可到达部分肝组织，分离效果稍差，分离后用台盼蓝染色，肝细胞存

基金项目：国家自然科学基金资助项目(39770682)
作者简介：马巧玉(1963—)，女，浙江省义乌市人，硕士，主治医师，讲师，主要从事HCV核心区多肽对CTL抑制作用方面的研究，发表论文6篇。电话：(023)68752679
收稿日期：2000-04-15；修回日期：2000-08-21

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

活率约 80%～90%。

2.2 肝细胞培养

分离细胞 24 h 后，约 70%～80%肝细胞贴壁，贴壁细胞在第 1～3 天呈圆形，单核，见图 1A，在第 4～8 天开始渐呈多角形，单核，细胞大小、形态略有不同（培养 12 d 的肝细胞见图 1B），维持此形态约 1 月。肝细胞培养至 32～36 d，细胞逐渐变圆、脱落。4 例肝细胞培养除 1 例在第 28 天时，因霉菌污染放弃外，余 3 例均维持培养 1 月以上，重复性好。第 10 天肝细胞计数为（6.79±0.21）× 10^5/ml，台盼蓝染色肝细胞存活率＞90%。第 20 天肝细胞计数为（5.56±0.24）× 10^5/ml，台盼蓝染色肝细胞存活率＞90%。第 30 天肝细胞计数为（4.47±0.32）× 10^5/ml，台盼蓝染色肝细胞存活率约 60%。

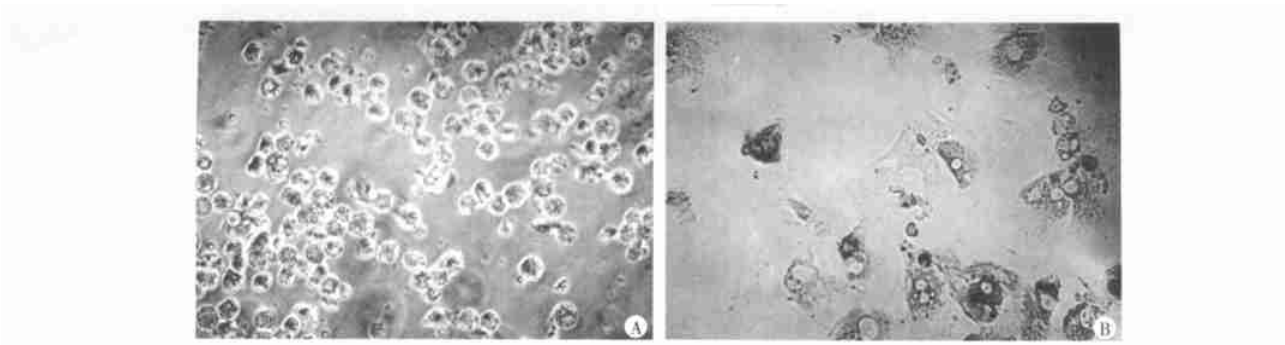


图 1 培养肝细胞 （×100） A：2 d；B：12 d

3 讨论

目前，在肝脏疾病特别是病毒性肝炎的研究中，用动物肝细胞、肿瘤细胞、人胎儿肝细胞等作为细胞模型的最为常见，但这些细胞模型与自然感染状态下的成人肝细胞是否有类似的方式、途径及生物学特性均无定论。因此，我们分离培养了正常成人肝细胞，以期在最接近自然感染的情况下研究肝脏疾病的发病机制、病理改变及临床治疗。

目前分离肝细胞多采用体外二步灌流法。因为我们所取肝组织为非全小叶标本，灌注时有部分肝组织不能到达，加之成人肝组织分离肝细胞效率有限[3]，因此分离效率较低。加入分散酶后可提高分离效率。此外，在最初 24 h，有部分细胞不贴壁，需弃去。因此，要求每毫升细胞浓度高于其它细胞培养。正常成人肝细胞体外培养时间约 1 月，为延长肝细胞存活时间，有人提出采取胶原凝胶夹层培养和多细胞球状体方式培养[3,4]，可提高肝细胞生存效率及延长其存活时间。

乙型病毒性肝炎、丙型病毒性肝炎的发病机理和临床治疗研究一直无突破性进展，这与缺乏适宜的细胞模型有关。体外培养的正常成人肝细胞可改善乙、丙型肝炎病毒感染细胞的有效性，且在体外支持上述肝炎病毒复制[2,5,6]。因此，可用人肝细胞进行下述研究：肝炎病毒怎样吸附于肝细胞，肝细胞上病毒抗原表达及与免疫反应的关系，病毒变异、肝细胞感染后病理、功能改变等，人肝细胞还可用于抗病毒药物及疫苗效果判定。

近年来，国外有人将兔肝细胞移植到切除 90%肝脏、严重肝功能障碍的兔肝或脾上，证实形态完好的移植肝细胞可存活 15 个月，并能起良好的代偿作用[2]。目前在治疗各种严重肝病时，肝移植已成为必不可少的方法之一，但供肝严重缺乏，如能将人肝细胞分离后移植在腹膜、脾脏或胰腺上，并发挥其生物作用，在肝病治疗史上将是一个突破性进展。

体外分离培养正常成人肝细胞的细胞模型虽然有重复性好、价格低廉、操作简便与自然感染状态接近，利于开展肝脏病各项研究的优点，但肝细胞来源有一定困难，细胞培养时间不够长，不能传代等均为此细胞模型的缺点，需要进一步研究解决。

关键词：肝细胞；分离；培养
中图法分类号：R322.47 文献标识码：B

参考文献：

[1] 王宇明，陈国致，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.

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

[3] Kono Y，Yang S，Letarte M，*et al*. Establishment of a human hepatocyte line derived from primary clatter in a collagen gel sandwich culture system [J]. Exp Cell Res，1995，221(2)：478－485.

[4] Li A P，Susan M，Colbun N，*et al*. A simplified method for the culturing of primary adult rat and human hepatocytes as muliticellular spheroids[J]. *In Vitro* Cell Dev Biol，1992，28A(9-10)：673－677.

[5] Shimizu Y K，Purcell R H，Yoshikura H. Correlation between the infectivity of hepatitis C virus *in vivo* and its infectivity *in vitro*[J]. Proc Natl Acad Sci USA，1993，90(13)：6 037－6 041.

[6] Ito T，Mukaigawa J，Zuo J，*et al*. Culture of hepatitis C virus in primary hepatocyte culture from patients with chronic hepatitis C results in release of high titre infectious virus[J]. J Gen Virol，1996，77(Pt 5)：1 042－1 054.

（编辑 郭建秀）

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