技术方法

一种改良的 Ito细胞分离培养方法

A modified method for isolation and culture of Ito cells

程 涛* 胡大荣 聂青和 李灼亮** 余宙耀** (第三军医大学附属西南医院全军传染病专科中心) 重庆, 400038

提 要 目的: 寻找一种简便、稳定、高产、经济的 Ito细胞分离培养方法,为肝纤维化发生机制及抗肝纤维化药物的筛选提供一个可靠的细胞模型。方法: 参照国内外介绍的实验方法并加以改良,采用体外两步灌注法及非连续密度分层液分离细胞。原代培养细胞,应用光镜、电镜、免疫组化和激发荧光实验观察鉴定。结果: 细胞得率为 3.35× 10^7/只,细胞存活率为 95%,纯度为 91%以上,优于国内外的报道。结论: 本改良 Ito细胞分离培养方法简便、高产、经济、稳定,值得推广。

Ito细胞(Ito cells)是肝脏内已发现的四种间质细胞之一,大量临床及实验研究提示它在肝纤维化发生、发展过程中具有重要作用,是产生细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)的主要细胞[1],已成为肝纤维化细胞学研究的热点。Ito细胞分离培养仅有 10多年历史。国内近几年来才开展该项工作。目前该细胞的分离技术尚未完善。制约了肝纤维化发生机制的研究。因此,寻找更简便、稳定、特异的 Ito细胞分离方法是肝纤维化研究的重点课题之一。

本实验参照国内外介绍的实验方法[1~4],并加以改良,采用经济的分离介质作为非连续密度梯度分层液,建立了一种简便、经济、稳定、得率高的 Ito细胞分离培养方法。现介绍如下。

1 材料与方法

1.1 动物及主要试剂

雄性纯种 Wistar大鼠 20只,体重 400~500 g,购自第三军医大学实验动物中心,普通饲料喂养。以高分子聚蔗糖、泛影葡胺(市售)根据公式: $\rho_{1,2}=(\rho_1V_1+\rho_2V_2)/(V_1+V_2)$($\rho_1$、$V_1$ 分别代表高分子聚蔗糖的密度和体积,ρ_2、V_2 分别代表泛影葡胺的密度和体积)配三种不同密度的等渗溶液,密度分别为 1.080、1.058、1.053。主要试剂中Ⅳ型胶原酶、Pronase E、Hepes 无钙培养液干粉购于 Sigma公司, RPMI 1640为 GIBCO公司产品,各种培养板和培养瓶为 Nunclon公司产品,其它试剂购于华美生物公司。

1.2 Ito细胞性质鉴定试剂

兔抗人结蛋白(Desmin)抗体及免疫组化 ABC试剂盒分别购自上海医科大学病理解剖教研室。

1.3 细胞分离培养

参考国内外介绍的实验方法作如下改良: 大鼠经戊巴比妥(30 mg/kg)麻醉,无菌操作下打开腹腔,经门静脉肝素化(肝素 2 IU/ml),取出肝脏,前灌流液灌注 10~20 min(37℃),至肝细胞略显黄色。链霉蛋白酶溶液(0.02%)反复灌注 10~20 min(40~41℃),胶原酶溶液反复灌 10~15 min(40~41℃),至肝组织完全软化,两液合于器皿中,钝性撕碎肝组织,置三角烧瓶内 37℃下振荡消化 20 min,三层沙布过滤,无钙培养液洗 2遍(500 g, 5 min),将细胞悬液加至三层非连续密度梯度最上层(从下至上为 1.080、1.058、1.053),再在上面加一层无钙培养液, 16 000 r/min离心 30 min(20℃),轻轻吸取上层培养基与 1.053层之间的细胞,细胞经无钙培养液洗 2遍后,调成(1~5)× 10^5/ml浓度接种于含 20%小牛血清的 RPMI 1640细胞培养液的 50 ml培养瓶内。培养 28 h后换含新鲜 10%小牛血清的 RPMI 1640培养液,以后每隔 3~4 d换液 1次。

1.4 Ito细胞鉴定

1.4.1 活力鉴定及生长特征 常规台盼蓝染色进行细胞活力鉴定。在倒置显微镜观察 Ito细胞生长情况、形态特征。

1.4.2 激发荧光试验 将新鲜分离的 Ito细胞悬液点涂片,干燥后,在荧光显微镜下观察。

1.4.3 免疫组化 用兔抗人结蛋白抗体, ABC染色法作免疫组化, DAB显色。胞浆呈棕色阳性着色为 Ito细胞。

1.4.4 Ito细胞透射电镜观察 将原代培养的 Ito细胞,经 2%戊二醛固定,制成超薄切片,置于透射电镜下观察。

2 结果

Ito细胞得率为 3.35× 10^7/只。台盼兰活性试验显示活细胞占 95%。初分离的 Ito细胞在 328 nm波长紫外线下具蓝绿色荧光,但极易猝灭。Desmin免疫组化染色示 91%的细胞阳性。新分离的 Ito细胞未贴壁,呈圆形,小于肝细胞但大于红细胞,胞浆内含典型折光颗粒。培养 28 h后多数细胞贴壁,细胞呈多种形态。培养 7 d后细胞贴壁仍良好,呈星状外形和多角伪足的典型形态。原代培养 10 d后,细胞呈梭形,形态向成纤维细

* 程 涛,男, 36岁,主治医师,硕士,现在空军广州医院传染病中心 广州, 510602
** 空军广州医院传染病中心 广州, 510602

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

胞样发展。胞浆内折光颗粒减少甚至丧失。13 d后细胞和细胞之间呈局灶性生长。透射电镜下可见 Ito细胞胞浆内的脂滴占据整个胞浆的大部分。脂滴呈圆形,其数量不一、大小不等、分布不均,并将细胞核推向一极,细胞核形态不规则。

3　讨论

Ito细胞又称贮脂细胞(Fat-storing cell),1876年 Von Kupffer首次报道,至本世纪 40年代末人们仍认为它是由肝脏网状内皮系统中枯否氏细胞的脂肪变性而来。50年代因 Ito等对该细胞的详尽描述而得名,并提出它是一独立细胞群[1]。其生理功能为贮存维生素 A,支持血窦内皮细胞及合成 ECM。肝纤维化时,被激活而大量合成分泌 ECM,在肝纤维化的发生、发展过程中起重要作用。

Knook等于 80年代率先采用离心淘析技术,以甲泛影酰胺碘葡酰胺(Metrizamide)作为分离介质,Ito细胞得率为(3.1± 0.52)× 10^6/g肝组织,纯度为 72.1%± 4.6%,并经过光镜、电镜、自发荧光及免疫组化等方法鉴定[2]。1987年 Friedman等采用上述技术,用 Stractan作为分离介质,使细胞纯度上升为 90%,但分离过程繁琐,不易推广。国内高春芳等[3]采用高速离心法在 2 000 r/min 30 min条件下,以聚蔗糖、泛影葡胺配制成分离介质,也获得了与 Friedman等相似的效果。本文在上述等人介绍的方法基础上,结合王宇明等[4]报道的体外两步灌流法,加以改良,获得更为满意的分离效果。改良后的方法具有以下优点:① 勿需使用价格较贵的淘析式离心机;② 避免了 Friedman等采用 Stractan等材料需繁琐复杂的预处理过程;③ 用经济、易得的聚蔗糖和泛影葡胺取代了价格昂贵的 Metrizamide分离介质;④ 肝组织灌注过程采用体外两步法,简化了分离步骤,操作时间缩短,细胞得率及存活率有进一步的提高。

Ito细胞较难分离及纯化的主要原因在于其比重与枯否氏细胞、小的内皮细胞、淋巴细胞等有交叉,且易与肝细胞相吸附。肝脏体外两步酶消化法的建立和密度分层液技术的应用,较好地解决了上述问题。实验中我们体会到细胞分离成败的关键在于:① 精确配制密度为 1.080、1.058、1.053三层分离液介质,并注意避光、pH的调节及无菌处理;② 链霉蛋白酶消化要充分,否则会混杂大量肝细胞而影响细胞纯度;消化过度则又损伤细胞,影响活力。消化过程受酶的活性、灌流液温度及时间等因素影响。室温在 20~ 30℃时,灌流时间为 15 min,灌流液温度为 40℃,链酶蛋白酶用量 120~ 130 mg/100 ml;室温在 20℃以下酶用量则 140~ 150 mg/100 ml,可收到较好的分离效果;③ 掌握适度的离心速度,超过 16 000 r/min的速度易破坏 Ito细胞;而低于 16 000 r/min时,影响细胞的纯度;④ 体外二步灌流的优点在于暴露充分,易观察,冲洗淤血部位易而酶消化充分。

有关 Ito细胞的鉴定迄今尚无特异指标,主要根据细胞形成,生长规律、激发荧光及免疫组化等指标综合鉴定。本文分离获得细胞在倒置显微镜下观察,第 1天细胞贴壁少,呈圆形,28 h后,多数细胞贴壁,细胞可呈圆形、椭圆形、多边型、纺锤型等多种形态。培养 1 d后,细胞可呈星形、多角伪足的典型形态,以后逐渐向成纤维样细胞发展,胞浆内的脂滴减少,体积变小,直至消失,上述发现与文献报道形态特征一致。新分离的细胞因富含维生素 A脂滴,在 328 nm波长紫外光激发下,呈现短暂的蓝绿色自发荧光,该荧光极易猝灭,加上操作过程中不可避免的光暴露影响,只能见到部分细胞自发荧光,随着培养时间延长而脂滴减少逐渐丧失其产生自发荧光指标。单凭观察自发荧光,虽鉴定快,但特异性不强。透射电镜下可见细胞胞浆中含有大小不一,数量不等的脂滴,但并非 Ito细胞所具有的特点。

结蛋白(Desmin)是一种中间丝蛋白,除广泛存在于大血管的平滑肌细胞外,在肝脏主要存在于实质或间质细胞,Ito细胞因此具有相对特异性,是目前鉴定 Ito细胞较为可靠的指标。本文分离获得的细胞,采用免疫组化证实,91%的细胞呈结蛋白染色阳性。近有作者报道门脉区的 Ito细胞结蛋白反应强而近中央静脉的 Ito细胞结蛋白反应弱,或呈阴性,揭示单凭结蛋白的染色鉴定 Ito细胞势必影响其得率及纯度的判断[5]。由此可见,Ito细胞的特异鉴定方法仍有待进一步摸索探讨。Ito细胞培养可为肝纤维化发生机制及抗肝纤维化的药物的筛选提供可靠的细胞模型。最近有人报道[6],Ito细胞具有收缩性,能调节肝窦血流,对 Ito细胞的收缩性进行调节有可能成为降低门静脉高压一种手段,更显示了 Ito细胞分离和培养的重要性。因此,寻找更简便、特异的 Ito细胞鉴定方法是肝纤维化研究的重要课题之一。

关键词　Ito细胞(贮脂细胞);细胞培养;肝纤维化;大鼠
中图法分类号　R329.2

参考文献

1　Friedman S L, Rochey D C, McCuire R F, *et al*. Isolated hepatic lipocytes and Kupffer cells from human liver: morphological and functional characteristics in primary culture. Hepatology, 1992, 15(2): 234

2　Knook D L, Seffelaar A M, Leeuw A M, *et al*. TSCs of the rat liver their isolation and purification. Exp Cell Res, 1982, 139: 486

3　高春芳,孔宪涛,范列英,等.大鼠肝贮脂细胞及 Kupffer细

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

胞的分离培养和鉴定.新消化病学杂志, 1995, 3(1): 8
4 王宇明,陈国致,董家鸿,等.分离肝细胞的一种体外灌流法.中华消化杂志, 1994, 14(2): 175
5 Ballardini G, Faccani A, Fanani M, *et al*. Appearance of sinusoidal inclusion-containing endothelial cell in liver disease. Hepatology, 1994, 19: 440
6 朱永红,聂青和,胡大荣.储脂细胞与肝脏循环.国外医学:流行病学传染病分册, 1998, 25(1): 17

(收稿: 1998-07-11;修回: 1999-03-27)
(编辑 冷怀明)

烧伤后小鼠小肠潘氏结 RNA的快速制备

Fast preparation of RNA from Peyer's patches of small intestine in burned mice

刘贤华* 胡川闽 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所)重庆, 400038
白晓东 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所)重庆, 400038

提 要 目的:本实验拟建立一种更经济、实用、简便又快速的 RNA制备方法。方法:利用改进后的方法及试剂盒提取烧伤后小鼠小肠潘氏结组织中的 RNA,紫外分光光度计测定 D_λ 值、电泳、然后进行 RT-PCR 结果:① 紫外分光光度计测定所提 RNA D_{260}/D_{280}比值均在 2.0左右。每 1 g小鼠小肠潘氏结组织 RNA的平均产量为 300~ 500μg ② RNA甲醛变性琼脂糖凝胶电泳显示所提总 RNA完整性好。③ RT-PCR获得成功。结论:此快速制备 RNA的方法纯度和产量都较高,而且经济、简便又快速,我们已常规应用到其它组织细胞 RNA的制备中,值得应用与推广。

RNA的提取是分子生物学研究中的基本技术,有关固体组织 RNA的提取已有不少方法,但它们各有优缺点。本文所介绍的是经作者反复实践,现已常规应用的一种改良后的 RNA制备方法。它主要有 4个优点:① 操作简单,流程短,速度快;② 所收获的 RNA产量和纯度都较高,可满足做 RT-PCR和 Northern杂交;③ 所配试剂可较长时间保存,随时可进行 RNA提取;④ 不需使用特殊试剂,很大程度上节约了经费。

1 材料与方法

1.1 试剂及配制

① 变性液 (4 mol/L异硫氰酸胍+ 0.025 mol/L柠檬酸三钠+ 0.017 mol/L Sarkosyl);② 2 mol/L醋酸钠;③ 水饱和酚;④ 49∶1的氯仿∶异戊醇;⑤ 异丙醇;⑥ 75%乙醇 (用 0.1% DEPC水配制);⑦ 1%β-巯基乙醇;⑧ 0.01 mol/L PBS;⑨ 10× MOPS(0.2 mol/L MOPS+ 0.05 mol/L NaAc+ 0.01 mol/L EDTA);⑩ RNA载样缓冲液 (0.1% DEPC水配制, 0.05 mol/L EDTA+ 0.25%溴酚蓝+ 0.25%二甲苯青 FF+ 50%甘油);⑪ 1 mg/ml溴化乙锭。

1.2 操作步骤及方法

1.2.1 无菌条件下打开小鼠腹腔,取出小肠潘氏结。0.01 mol/L PBS清洗 2次。

1.2.2 匀浆器内加入 350μl变性液,将潘氏结放入匀浆器中匀浆,尽量使其分散成单个细胞。

1.2.3 将浆液倒入 1.5 ml Eppendorf管中,补足变性液至 500μl,再加β-巯基乙醇 1.6μl,充分混匀。

1.2.4 加水平衡酚 500μl,充分混匀。

1.2.5 加 2 mol/L醋酸钠 50μl,充分混匀,加氯仿∶异戊醇 100μl,充分混匀, 4°C冰浴 5 min。

1.2.6 4°C 13 000 r/min离心 10 min,吸上层水相,加氯仿∶异戊醇 500μl,弹匀, 4°C 13 000 r/min离心 5 min。

1.2.7 吸上层水相,加异丙醇 500μl, -20°C放置 20 min, 4°C 13 000 r/min离心 10 min。

1.2.8 弃上清,加 70%乙醇洗 1次, 13 000 r/min离心 10 min。

1.2.9 弃乙醇,控干水分。

1.2.10 加 0.1% DEPC水 30μl溶解 RNA,取 5μl,加双蒸水至 500μl,紫外分光光度计测定 D_λ 值及含量。

1.2.11 按文献 [1]的方法灌制 RNA甲醛变性琼脂糖凝胶,凝固 1 h备用。

1.2.12 取 RNA溶液 5μl(约 15~ 20μg)加 10× MOPS 1μl,甲醛 3.5μl,甲酰胺 10μl, 68°C变性 5 min转至冰浴,加 2μl溴化乙锭溶液 (1 mg/ml), 2μl载样缓冲液,混匀后加样至甲醛凝胶中,在装有 1× MOPS缓冲液的电泳槽内, 3~ 4 V/cm电泳约 2 h,透射紫外光下观察 RNA的完整性。

1.2.13 取 RNA 1μl(约 2μg)进行逆转录后做 PCR 1.5%琼脂糖凝胶电泳。

2 结果

经紫外分光光度计测定,其 D_{260}/D_{280}在 2.0± 0.1左右, RNA浓度为 2μg/ml,每 1 g小鼠小肠潘氏结组织 RNA的平

* 刘贤华,女, 27岁,实验师

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