DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.05.002

人肝细胞、窦状间隙内皮细胞的分离、培养*

王晓军 罗向东 丁健** 罗勤 杨宗城 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所)重庆,630038

提 要 从创伤意外死亡的病人中获取肝组织,应用离体胶原酶Ⅳ灌注和消化的方法获得肝组织细胞悬液。根据差速离心将肝细胞和其它细胞进行分离,并根据枯否氏细胞和内皮细胞贴附时间的不同,分离出肝窦间隙内皮细胞,其存活率可达90%以上。肝细胞纯度可达95%。肝窦间隙内皮细胞经一周培养纯度可达90%以上。同时描述了人肝组织中肝细胞和肝窦间隙内皮细胞原代培养过程的形态特征,并对肝窦间隙内皮细胞进行了鉴定。

关键词 肝细胞;肝窦间隙内皮细胞;原代培养;细胞分离
中图法分类号 R329.2

肝脏是一个结构、功能复杂的实质性器官,由多种细胞组成,主要是肝细胞[1]。随着人们对内皮细胞研究的深入,肝间质内的内皮细胞在许多肝脏疾患中起越来越重要的作用,对其的分离、培养国外有一些报道,国内未见报道。本实验将人肝组织中肝细胞和肝窦状间隙内皮细胞的分离、培养以及形态特征介绍如下。

1 材料与方法

1.1 标本及主要试剂

人肝组织从创伤意外死亡的病人获得,共8例,每例取肝组织5 cm×6 cm。主要试剂:胶原酶Ⅳ型购于Sigma公司;Ⅷ因子相关抗原抗体购于中山生物工程公司;BRAUNULE穿刺针购于德国;各种培养瓶、板购于Nunclon公司;1640和M199培养基购于Sigma公司,其它常用试剂购于华美生物工程公司。

1.2 肝组织悬液的制备

获得的肝组织均在死亡后45 min内。将肝组织放在前灌流液(含EDTA 0.019%,pH 7.4,一定浓度的抗菌素)中带回实验室,剪去外露明显的血管和胆管组织。前灌流液(预先在37℃水浴箱中浴热)用BRAUNULE穿刺针从管腔残端灌入,约3~5次,每次20 ml,尽量冲净肝组织中残存的血细胞,见肝组织呈淡红色或淡黄色,后用0.05%的胶原酶Ⅳ型水溶液15 ml~20 ml,缓慢灌入3~4次,每次约5 min~8 min,胶原酶Ⅳ型可以重复使用,每次使用前均应在37℃水浴箱中浴热以保持酶活力。待肝组织韧性消失,压迫不易恢复,肝包膜下有时呈粒状时,放入平皿中,用眼科镊剪去除被膜及肝组织内肉眼可见的管道系统,然后连同灌注流出的胶原酶溶液放入锥形瓶中,在37℃水浴箱中振荡消化10 min[2]。用培养液终止反应制成混合肝细胞悬液。

1.3 分离培养肝细胞

取混合肝细胞悬液用200目尼龙布过滤,50× g离心3 min,留下上清液作分离肝窦状间隙的内皮细胞用。用1640培养液反复离心3次,每次50× g离心3 min,以清洗残存的胶原酶和纯化肝细胞。在显微镜下观察肝细胞形态及纯化状态;用0.4%锥兰染色判断细胞活率;血细胞计数板计数细胞浓度。以1640合成培养基(含10% AB型人血清)细胞混悬液稀释至2×10⁶/ml后分别接种在培养瓶和六孔培养板上[3]。在37℃、5% CO_2条件下先培养18 h~20 h,换液去除残存血细胞,再用同样培养基培养7 d~10 d。

1.4 肝窦间隙内皮细胞分离、培养

取分离肝细胞后的上清液,用50× g离心3 min和500× g离心5 min交替离心3~5次,去除残存的肝细胞,同时用1640培养液清洗残存的胶原酶。分出的细胞主要为肝内皮细胞和枯否氏细胞的混合悬液。用0.4%锥兰染色判断细胞活率后,接种在培养瓶中。3 h~4 h后,将含有未贴壁的细胞及培养液接种在6孔培养板上[4]。先培养20 h,换液去除残存的血细胞后,再用M199合成培养基(含10% AB型人血清)继续培养7 d~10 d。

2 结果

2.1 肝细胞、肝窦间隙内皮细胞的存活率

肝细胞和肝窦间隙内皮细胞即时存活率可达95%,培养存活率可达90%,肝细胞纯度可达95%,肝窦间隙内皮细胞经一周培养后纯度可达90%。

2.2 肝细胞的形态特征

肝细胞由球形变扁薄,体积增大,直径20μm~30μm[1],核清晰,部分呈多边形,24 h~48 h双核细胞增多。

2.3 肝窦间隙内皮细胞形态特征及鉴定

培养12 h~18 h内,肝窦间隙内皮细胞呈星状或梭形,2~5个细胞融合成群,3 d~5 d后细胞的融合群慢慢增大呈单层"卵石状",平均直径为10μm~30μm,7 d~8 d后单层完全铺开[5],Ⅷ因子相关抗原抗体免疫组化鉴定呈阳性,纯度可达90%以上,见附图。

* 国家自然科学基金资助项目,No.39290700-03
** 传染病中心 重庆,630038
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



附图 培养一周的人肝窦间隙内皮细胞Ⅷ因子相关抗原抗体免疫染色呈阳性

Fig Reaction of the hepatic sinuoidal endothelial cell Ⅷ factor immunohistochemical method

3 讨论

目前对肝细胞的分离和培养,国内外报道很多,大多集中在动物的原代培养中,方法稳定,易获得[2,6]。随着人们对内皮细胞认识的逐渐加深,已知其在肝脏血流的调节、创伤后多脏器功能损害、肝组织炎性损害、肝炎后肝硬化的形成以及肝瘤的转移等方面具有越来越重要作用,是组织中参与对其它细胞粘附的重要细胞。对其分离及培养特征国外有些报道[7,8],且主要是对大鼠的肝内皮细胞培养。对人肝血窦间隙内皮细胞报道甚少,且方法复杂,用 Nycodenz或 Percall分离液进行梯度离心,对分离剂的稀释和铺层以及离心转速要求高,一般离心机很难达到,所需试剂及设备价格昂贵,而且对细胞的活力也有影响。本实验采用的方法有以下优点:① 进行离体灌注,在外伤致死的病人中可以施行,易于开展;② 前灌流液和酶缓冲液加入细胞需要的营养成分及一定浓度的抗菌素,可以增加细胞活力,减少细胞污染的机会;③ 对离心机无特别要求,普通离心机即可;④ 不需要昂贵的细胞分离剂,而且可以减少离心过程对细胞活力的影响。要特别注意由于预先无法进行抗凝处理,有时肝细胞灌洗不太好,其中红细胞较多,所以用前灌流液时要尽量冲净残存的血细胞;密切观察在接种后 12 h~ 20 h对肝窦间隙内皮细胞大部贴壁后进行换液,轻轻漂洗。可减少红细胞的数量。

本实验方法简便易行,而且是从意外致死的病人中获取肝组织,消除了动物和人之间的种族差异,对肝脏疾患的模型建立更接近临床,所以是一种具有较好实用价值的方法。

参考文献

1 孙宏训.肝细胞的超微结构.见:肝脏病学.第 2版.南京:江苏科学技术出版社,1993:29~ 30

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

3 洪文清,盛和章.成年大鼠肝细胞的分离及培养.军事医学科学院院刊,1993;17(1):57

4 安 静,杨宗城.胎儿脐静脉内皮细胞培养.第三军医大学学报,1990;12(2):102

5 Braet F, De Zanger R, Sasaoki T *et al*. Assessment of a method of lsalation, purification, and cultivation of rat liver sinusoidal endothelial cells methods in laborotory investigation. Lab Invest, 1994; 170(6): 944

6 汪 谦,夏惠生,姜汉英.大鼠肝细胞、Kupffer和 Ito细胞的分离和培养.中华实验外科杂志,1994;11(2):72

7 Brou Wer ADLA, Praaning-van D P. Isolation and culture of sinusoidal liver cells in sinusaidal liver. Elsevier Biomedical press: Amsterdam, 1982 509~ 571

8 Davison P M, Charles M, Swan N *et al*. Isolation and growth of endothelial cell from the microvessels of the newborn humn foreskin in cell culfure. J Invest Permatal, 1980; 75 316

(收稿:1995-12-10;修回:1996-09-05)

(编辑 张大春)

Isolation and culture of human hepatocytes and hepatic sinosoidal endothelial cells*

Wang Xiaojun, Luo Xiangdong, Ding Jian, Luo Qin, Yang Zongcheng (Research Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract A simple less expensive and rapid method to isolate and culture human hepatocytes and hepatic sinusoidal endothelial cells was introduced. Human liver tissue, collected from persons who died in accidents, was digested with calcium containing 0.05% collagenaseⅣ at 37℃. After digestion, the cell suspension was differentially centrifuged to isolate the hepatocytes out. Then the hepatic sinusoidal endothelial cells were isolated from the Kupffer cells with differential adhesive time. More than 90% of the 2 types of cells isolated remained viable. The purity was 95% for the hepatocytes and 90% for the hepatic sinusoidal endothelial cells. The morphological features and the biological functions of the 2 types of cells were discussed.

Key words hepatocyte; hepatic sinusoidal endothelial cells; isolation; culture

* This project was supported by the National Natural Science Fundation of China, No. 39290700-03

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