

文章编号: 1004-7271(2006)04-0430-06

大口黑鲈肝细胞原代培养方法的建立

喻文娟, 杨先乐, 唐俊, 郑宗林, 张宁

(上海水产大学农业部动植物病原库, 上海 200090)

摘要:取材大口黑鲈肝脏组织, 培养其原代细胞, 比较研究了组织块法和酶消化法两种培养方法及不同的培养条件, 以确定其最佳培养方法和条件, 同时观察了长期培养过程中肝细胞的形态变化。结果表明, 组织块方法不适于大口黑鲈肝细胞的培养, 未见细胞从组织块中迁出。而胰蛋白酶消化法获得良好稳定的培养效果。胰蛋白酶浓度 0.25%, 消化时间 20 min, 分步收集肝细胞, 经台盼蓝检测和血球计数板计数, 平均活力 > 90%, 每克肝重可获得 3×10^6 个分离肝细胞。在细胞活力和数量两方面达到最佳平衡。在含 20% 胎牛血清、10 μg /mL 胰岛素的 M199/L15 培养基中, 于 4% CO_2 , 28 $^\circ\text{C}$ 培养箱中长期培养并传代。

关键词: 大口黑鲈, 肝细胞, 原代培养

中图分类号: S 917 文献标识码: A

Study on primary culture of hepatocytes from *Micropterus salmoides*

YU Wen-juan, YANG Xian-le, TANG Jun, ZHENG Zong-lin, ZHANG Ning

(Fishery Pathogen Collection of the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: In this study, the liver tissues from *Micropterus salmoides* were cultivated under different culture conditions with tissue culture and enzymatic dissociation methods respectively, aiming at comparing the influence of culture methods and conditions on the growth of cells and figuring out the optimal. The morphological changes of cells in long-term culture were also observed. It came to the conclusion that trypsin dissociation method was better than tissue culture. Applying the enzymatic dissociation method and controlling the trypsin acting on cells at the concentration of 0.25% for 20 min, the hepatocyte yield of 3×10^6 cells per 1 g liver weight had been achieved with initial viabilities routinely exceeding 90%. The cells were cultivated in M199/L15 basal medium supplemented with 20% foetal bovine serum and 10 μg /mL insulin at the temperature of 28 $^\circ\text{C}$, the concentration of CO_2 being 4% for long term and were sub-cultured.

Key words: *Micropterus salmoides*; hepatocyte; primary culture

肝脏是动物体内最重要的解毒器官, 是目前毒理学、药理学及生物化学等学科研究的主要对象之一。大量研究结果已证实肝组织细胞能表达绝大部分肝脏的功能, 因此, 近年来国外大多采用体外培养的肝细胞来研究药物的毒性及其代谢情况以代替活体动物的实验。一方面, 一个肝脏分离所得的肝细胞可以制成多种不同条件的肝细胞悬液或进行不同条件的细胞培养, 大大节约了动物数, 并可以同时进

收稿日期: 2005-12-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(30371109); 上海市教育委员会 E-研究院建设资助项目(E03009); 上海市重点学科建设资助项目(Y1101)

作者简介: 喻文娟(1979-), 女, 浙江长兴人, 硕士研究生, 专业方向为水产养殖动物病害研究。

通讯作者: 杨先乐, Tel: 021-65710870, E-mail: xlyang@shfu.edu.cn

行多种药物代谢的研究;另一方面,体外培养的肝细胞排除了体内其它因素的干扰,基本上保存了完整肝脏的某些特性,其细胞存活情况在整个实验过程中也易于检测。目前国外主要应用虹鳟、鲟鱼等鱼类的肝细胞研究环境污染毒理学和环境污染的监测^[1-3],而关于大口黑鲈肝细胞的培养及其应用于药物代谢特别是渔药代谢的研究还鲜见报道。本试验通过对大口黑鲈肝脏原代细胞培养,以建立稳定的鱼类药物代谢实验细胞培养模型,为鱼类药物代谢酶的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验鱼

大口黑鲈,体重 400 - 500 g,购于上海市图门路农贸市场,实验室暂养 1 d。

1.1.2 试剂

D - hanks 液 0.25%胰蛋白酶(华美生物工程公司);M199、L-15、DMEM/F₁₂、WillimE₃(培养基均购自 Gibco 公司);100 IU/mL 青霉素(上海先锋药业公司,0.5 g/瓶);100 μg/mL 链霉素(上海四药有限公司,1 g/瓶);2 mmol/L 谷氨酰胺(华美生物工程公司);10 μg/mL 胰岛素(sigma 公司);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料公司);新生牛血清(郑州佰安生物工程有限公司);0.5%台盼蓝(sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 组织块法

取暂养 1 d 后的试验鱼,于 0.01%的高锰酸钾溶液中浸泡 30 min,剪断鳃弓放血,无菌手术取出肝组织,剪至 1 mm³ 大小组织块,接种于 25 mL 培养瓶。将培养瓶翻转使其瓶底朝上,注入适量培养液,置于 28 °C 4% CO₂ 培养箱中培养,放置 6 ~ 8 h 待组织小块贴附瓶底后,将培养瓶慢慢翻转平放继续培养。每两天换液一次。

1.2.2 消化法

取材操作方法同上,组织块剪至 1 mm³ 大小后加胰蛋白酶室温消化,将消化所得细胞用 100 目筛绢过滤,500 r/min 离心 5 min,弃上清液,加含 20%胎牛血清的培养基重悬沉淀,以 10⁶ cell/mL 的浓度接种于细胞培养瓶,置 28 °C 4% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.3 肝细胞活力的测定

细胞悬液与 0.5%台盼蓝染液按 1:1 体积比混合,1 min 后于血球计数板上计数,活细胞圆形透明,死细胞染成蓝色,用活细胞占计数细胞中的百分比表示细胞活力。

1.2.4 传代培养

肝细胞长满瓶底的 80%后即可传代,倒去培养液,D-hanks 液冲洗 3 次后,加适量的 0.25%的胰蛋白酶覆满瓶底作用短时间后留取少量胰酶继续作用,当细胞回缩隆起变圆后加含血清的培养基终止消化,轻轻吹打成单细胞悬液,计数、分瓶继续培养。

2 结果

2.1 不同浓度胰蛋白酶对肝细胞活力的影响

其它条件相同,比较 0.25%、0.125%、0.05%、0.025% 浓度的胰蛋白酶对细胞数量和活力的影响。试验结果发现,作用相同时间 4 个浓度梯度消化所得细胞在活力方面没有明显差别,而在所获得的细胞数量方面 0.25%胰蛋白酶组明显多于 0.125%、0.05%、0.025%胰蛋白酶组(表 1)。

表 1 不同胰蛋白酶浓度对细胞贴壁的影响

Tab.1 The effect of the trypsin levels on the seeding efficiency

编号	胰酶浓度 (%)	消化时间 (min)	生长情况(细胞贴壁数量)	
			24 h	72 h
1	0.025	20	-	-
2	0.05	20	-	-
3	0.125	20	+	+
4	0.25	20	+	++

注:判断肝细胞生长情况,肝细胞培养 24 h、72 h 显微镜下(10×20)观察,无细胞生长为(-);少数散在细胞生长为(+);多数三五成群,但不成片为(++);大量成片生长则为(+++);覆满瓶底(++++)。以下同。

2.2 不同消化时间对肝细胞活力的影响

选择最佳胰蛋白酶浓度(0.25%),比较不同的消化时间对肝细胞数量和活力的影响。10 min 消化获得的细胞数量极少,未能贴壁生长。消化时间超过 40 min 后,细胞数量多但活力极差,综合上述试验结果,采取多步收集法(20 min/次),在细胞数量和活力两方面达到最佳效果。经台盼蓝染色和血球计数板计数,平均活力 > 90%,每克肝重可获得 3×10^6 个分离的肝细胞(表 2)。

表 2 不同的消化时间对细胞贴壁的影响

Tab.2 The effect of digest time on the seeding efficiency

编号	胰酶浓度 (%)	消化时间 (min)	生长情况(细胞贴壁数量)	
			24 h	72 h
1	0.25	10	-	-
2	0.25	20	+	+
3	0.25	40	+	++
4	0.25	60	+	++

2.3 不同血清组分和不同培养基对细胞增殖的影响

比较了 M199/L-15、DMEM/F12、WillimE's 三种培养基对细胞贴壁和长期培养的影响。培养基中添加 100 IU/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素、20 mmol/L 谷氨酰胺、10 μg/mL 胰岛素、20% 胎牛血清(FBS)或 20% 新生牛血清(NBS)。结果表明,20% 胎牛血清更利于细胞的贴壁。在添加 20% 胎牛血清,其它成分相同的条件下,M199/L-15 培养基较 DMEM/F12、WillimE's 更能促进细胞的生长增殖,在 168 h 后细胞已能覆满瓶底并可传代。而 DMEM/F12、WillimE's 培养的细胞在 168 h 后仍只有少量细胞贴壁,较之 72 h 时的细胞生长情况无明显差异(表 3)。

表 3 不同培养基和血清对细胞首次贴壁时间和贴壁的影响

Tab.3 The effect of medium and serum on the seeding efficiency

培养基类别	肝细胞首次出现贴壁的时间(h)		72 h 后的生长情况(细胞贴壁数量)		168 h 后的生长情况(细胞贴壁数量)	
	20% NBS	20% FBS	20% NBS	20% FBS	20% NBS	20% FBS
DMEM/F12	-	48	+	+	+	+
WillimE's	72	24	+	+	+	++
M199/L-15	72	24	+	+++	+	++++

2.4 肝细胞形态观察

倒置显微镜下观察,新鲜分离的离体肝细胞呈单个分散状态,活肝细胞呈透亮、具有立体感的圆形细胞(图版-1)。在 24 h 后有细胞贴壁,贴壁的肝细胞其形态上发生明显改变,细胞呈典型的上皮细胞样的多角形形态,胞体变平变薄,体积明显增大,紧紧粘附于培养瓶壁,48 h 后,细胞连接成丘索状,4 d

后细胞连接成片,分裂增多(图版-2,3),可见多个多核细胞,培养14 d后,细胞停止生长,出现老化迹象,胞质中出现空泡(图版-4),随着培养时间的延长,细胞渐渐脱离瓶壁,飘起直至死亡。

2.5 传代培养

大口黑鲈肝细胞培养8 d后即可传代,传代后的细胞生长缓慢,铺展极大(图版-5),难以形成单层,胞质内形成空泡(图版-6),目前传至第二代。

3 讨论

3.1 杂细胞的去除

肝脏内有大量的血管分布^[4],不可避免地有大量的血细胞,然而血细胞及细胞碎片对肝细胞的培养有一定影响,如何清除这些杂质,获得高纯度的肝细胞是肝细胞的培养获得成功的关键,由于肝细胞较血细胞等密度大,故可通过低速离心的方法除去杂质从而得到较纯化的细胞。Michela^[5]、Christina^[3]分别通过120 g、50 g离心纯化虹鳟肝细胞。Khan E A^[6]通过100 g重复离心2次分离纯化鲤鱼和鲇鱼肝细胞。本试验通过500 r/min离心5 min可将肝细胞沉淀下来,如此反复2~3次可获得较纯化的肝细胞。

3.2 分离方法

肝细胞分离方法一般采用传统的经典二步灌注法^[7,8],即通过静脉入口插管灌注肝脏从而获得单个分离的肝细胞。首先用不含Ca²⁺的螯合剂(EDTA等)螯合掉肝组织中的Ca²⁺,从而打破固定细胞的细胞桥粒样结构,然后灌注消化酶(主要为胶原酶等),充分消化肝组织后,用弯钳撕去包膜,分离至培养液中通过离心分离得到纯化肝细胞。这种方法首先在哺乳动物上获得成功,于1978年首次应用于鱼类肝细胞分离研究^[9]。但此种方法主要适用于肝脏较大的鱼类(如虹鳟^[5,10]、鳊^[11]),而有的鱼类则因其被解剖的部位结构细小,操作复杂不易成功,加之耗费大,实施起来相对困难。本试验采取胰蛋白酶消化分步收集法,获得良好的分离效果。而组织块法并未能获得单层,Ligia M S^[12]曾比较研究胰蛋白酶-EDTA消化法和组织块法培养鲁氏银板鱼(*Metynnis roosevelti*)肝细胞,消化法分离所得肝细胞在第5 d覆满培养瓶底90%,而组织块法培养的肝细胞在第21 d只铺满瓶底70%。在本实验室条件下,组织块法未见大口黑鲈肝细胞迁出,这可能与肝组织内部结构有关,从而致使细胞自主迁出困难,而消化法打破了组织内部细胞之间的连接,从而得到大量分离的肝细胞,贴壁后更易增殖长满单层。

3.3 细胞贴壁时间

试验发现,大口黑鲈原代肝细胞首次贴壁时间出现在接种24 h前后。这与其它几种恒温脊椎动物的肝细胞贴壁时间有极显著的差异,实验表明鼠^[13]、猪^[14]、鸡^[15]肝细胞在接种4 h左右后除去未贴壁的细胞,换上新鲜的培养基。而本实验培养的大口黑鲈原代肝细胞在24 h左右出现零星贴壁,在这之后继续有大量的肝细胞贴壁,一般接种培养48 h内不更换培养基,静止培养以促使其更好地贴壁。斑鲷^[16]、虹鳟^[5]的原代肝细胞培养过夜让其贴壁。和本试验的大口黑鲈贴壁时间差异不大。这可能与肝脏供体对环境的适应与否有关。

3.4 培养条件

3.4.1 培养基的PH值和渗透压

培养基的PH值和渗透压对培养硬骨鱼和其它水生变温动物尤为重要,因为相比于哺乳动物其体液成分更为复杂^[16]。哺乳动物细胞培养液渗透压接近于300 mOsm/kg,正常人的血浆渗透压280~310 mOsm/kg^[17],相当于其血液的渗透压,而斑鲷和其它淡水硬骨鱼类的渗透压较之偏低。斑点叉尾鲷肝细胞培养液渗透压260 mOsm/kg^[16],黄尾平口石首鱼渗透压变化的范围为295~355 mOsm/kg^[18],本试验用哺乳动物的培养基培养大口黑鲈肝细胞获得良好的培养效果,说明大口黑鲈肝细胞在渗透压280~310 mOsm/kg范围内适合生长。

鱼类血液中的重碳酸盐和CO₂分压与哺乳动物相比都较低,而且气体在液体中的溶解度随着温度

的降低而上升^[19],所以适用于哺乳动物细胞培养的 5% CO₂ 浓度并不适合鱼类肝细胞的培养。同时还应和培养基中的缓冲系统相关,和培养基中添加的碳酸氢钠的量以及有无其它缓冲因素(如 HEPES)有关,本试验 CO₂ 的浓度在 4% 左右获得良好的培养效果。

3.4.2 培养基中的营养成分

M199、L-15、DMEM/F12、WillimE's 这几种培养基都可用来培养肝细胞,但根据试验表明 M199/L-15 组合培养基较另外两组更适合大口黑鲈肝细胞的增殖,可能与其中的具体成分有关。L-15 培养基中含有比 DMEM 多 3 倍的氨基酸,而高浓度的氨基酸可以刺激蛋白质的合成,同时降低蛋白质的降解^[20]。

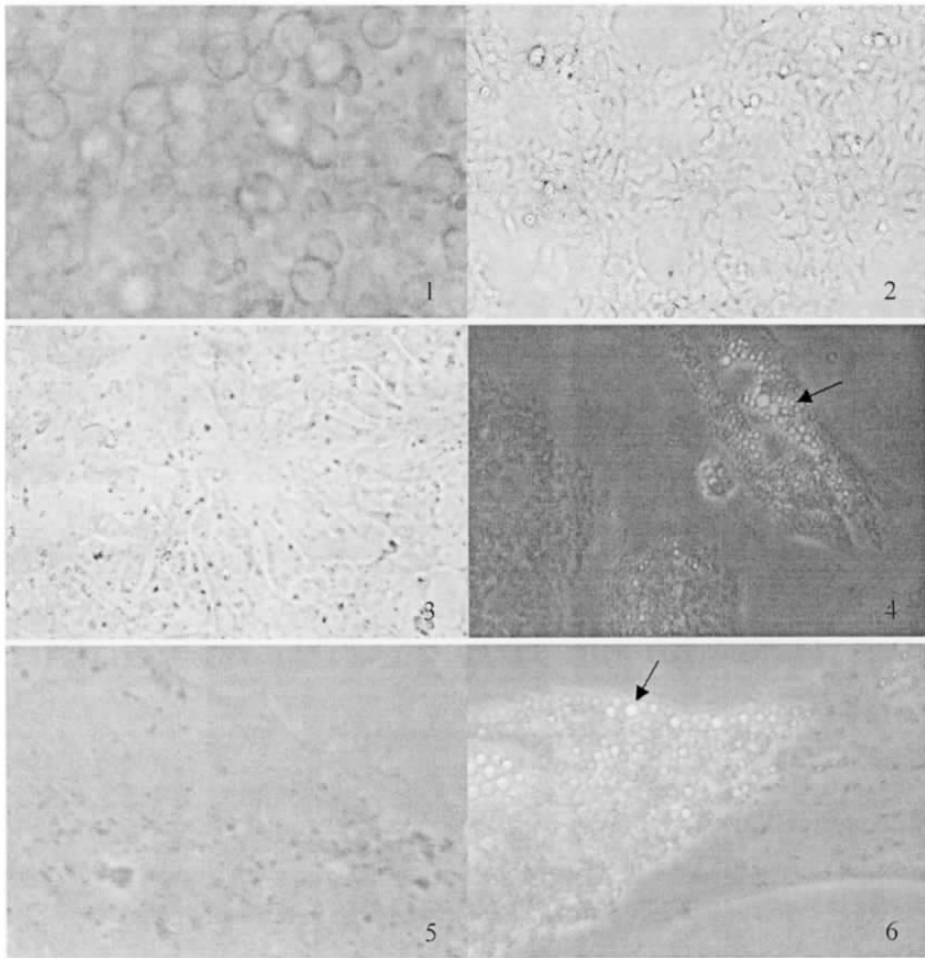
在水产动物的细胞培养中牛、鱼、虾血清或胚胎、组织抽提液是常常使用的添加物^[6, 21, 22]。而激素、生长因子的添加在原代的细胞培养过程中也起着重要的作用。在大口黑鲈肝细胞原代培养中只使用了牛血清和胰岛素作为培养基的添加物,取得了较满意的效果。但对于血清的等级,有一定的要求。不同的血清等级其在营养方面的差异显著,20% 的 FBS 较之 20% 的 NBS 更适于大口黑鲈肝细胞培养(表 3)。本实验同时还检测了胰岛素对于大口黑鲈肝细胞的生长作用。胰岛素促进细胞摄取葡萄糖和氨基酸,对于有丝分裂和 DNA 的合成发挥积极的作用^[23],本试验在添加胰岛素 10 μg/mL 后,能明显地改善细胞的贴壁和分裂情况,对于肝细胞培养不可或缺。

参考文献:

- [1] Fent K. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology : assessment of cytotoxicity , cytochrome P450A1 induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples[J]. Toxicology In Vitro ,2001 ,15(4):477 - 488 .
- [2] Pesonen M , Teivainen P. Biochemical responses of fish sac fry and a primary cell culture of fish hepatocytes exposed to polychlorinated naphthalenes[J]. Environment Contamination Toxicology ,2000 ,38 :53 - 58 .
- [3] Christina M I , Michael M L. Toxicity of chloroform and carbon tetrachloride in primary cultures of rainbow trout hepatocytes[J]. Aquatic Toxicology ,1997 ,37 :169 - 182 .
- [4] 孟庆闻. 鱼类比较解剖学[M].北京 :科学出版社 ,1987. 71 - 72 .
- [5] Michela F , Sonia R , Paolo C , et al . Early oxidative damage in primary cultured trout hepatocytes : a time course study[J]. Aquatic Toxicology , 2002 (59) 283 - 296 .
- [6] Khan E A , Dasmahapatra A K , Rama G. Evaluation of EDTA and fish skin extract in primary culture of fish liver cells[J]. Methods in Cell Science ,1997 (19): 153 - 159 .
- [7] Seglen P O. Preparation of isolated rat liver cells[J]. Methods in Cell Biology ,1976 ,35(1) 29 - 33 .
- [8] Berry M N , Friend D S. High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells[J]. J Cell Biol ,1969 ,43(3) 506 - 520 .
- [9] Walton M J , Cowey C B. Gluconeogenesis by isolated hepatocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. Comp Biochem Physiol ,1978 ,62B : 75 - 79 .
- [10] Braunbeck T , Storch V. Senescence of hepatocytes isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in primary culture[J]. Protoplasma ,1992 , 170 :138 - 159 .
- [11] Hayashi S , Ooshiro Z. Primary culture of freshly isolated liver cell of the ee[J]. Bull Jpn Soc Sci Fish ,1985 ,51 :765 - 771 .
- [12] Ligia M S , Maria I C , Rosária R. Primary culture of hepatic cells from *Metynnis roosevelti* (Pisces , Teleostei , Characidae) [J]. Razilian Journal of Veterinary Research and Animal Science ,2000 ,37(5) :143 - 156 .
- [13] Richert L , Binda D , Hamilton G , et al . Evaluation of the effect of culture configuration on morphology , survival time , antioxidant status and metabolic capacities of cultures rat hepatocytes[J]. Toxicology in Vitro ,2002 ,16 :89 - 99 .
- [14] Leonard J N , Bsc H J , Ian M. Examination of cytochrome P450 content of primary porcine hepatocyte cultures with various media formulations for use in bioartificial liver devices[J]. J Artif Organs ,2002 ,5 :37 - 43 .
- [15] Yamanka N , Kitani H , Mikami O , et al . Serum-free culture of adult chicken hepatocytes morphological and biochemical characterization[J]. Research in Veterinary Science ,1997 ,62 :233 - 237 .
- [16] William L , Seddon C , Ladd P. Non-enzymatic isolation and culture of channel catfish hepatocytes[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A ,1999 ,9 - 15 .
- [17] 薛庆善. 体外培养的原理和技术[M].北京 :科学出版社 ,2001. 28 - 29 .
- [18] Mohamed F , Barbara J R , Susanne S D. Development of continuous liver cell cultures from marine teleost , spot croaker (*Leiostomus xanthurus* , Pisces Sciaenidae) [J]. Aquaculture ,1995 ,132 :59 - 72 .
- [19] Schmidt N K. Respiration in water . Animal Physiology : adaptation and environmen[M]. Cambridge London : Cambridge University Press ,1983 .

5-97.

- [20] 张莉萍, 康格非. 原代肝细胞培养的研究现状 [J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2004, 25(3): 193 - 196.
- [21] Song-Lin Chen, Zhen-Xia Sha, Han-Qing Ye. Establishment of a pluripotent embryonic cell line from sea perch (*Lateolabrax japonicus*) embryos [J]. Aquaculture, 2003, 218: 141 - 151.
- [22] Kocal T, Quinn B A, Smith J R, et al. Use of trout serum to prepare primary attached monolayer cultures of hepatocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 1987, 24(4): 304 - 308.
- [23] Chen J D, Yew F H, LI C G. Thermal adaptation and heat shock response of tilapia ovary cell [J]. Journal Cell Physiology, 1988, 134(2): 99 - 109.



图版 大口黑鲈肝细胞各个不同时期形态观察

Plate Morphological changes of *Micropterus salmoides* hepatocytes in different culture periods

1. 新鲜分离的单个大口黑鲈肝细胞, $\times 400$; 2. 96 h 后细胞贴壁形态 $\times 200$; 3. 96 h 后细胞贴壁形态 $\times 400$; 4. 14 d 后细胞形态, $\times 400$ (箭头所指为空泡); 5. 传 1 代后的肝细胞形态 $\times 400$; 6. 传代后细胞老化现象, $\times 400$ (箭头所指为空洞)