

改良胶原酶经腹主动脉灌注消化法分离大鼠肝细胞****☆

余松林¹, 韩宝三¹, 张瑞², 杜志勇¹, 吴旭波¹, 吴薇¹, 王加祥¹, 黄芳¹, 李宏为¹, 沈柏用¹, 彭承宏¹

Separation of rat hepatocytes using modified collagenase perfusion via the abdominal aorta

Yu Song-lin¹, Han Bao-san¹, Zhang Rui², Du Zhi-yong¹, Wu Xu-bo¹, Wu Wei¹, Wang Jia-xiang¹, Huang Fang¹, Li Hong-wei¹, Shen Bo-yong¹, Peng Cheng-hong¹

Abstract

BACKGROUND: Good separation technique is the basis of harvesting hepatocytes with high viability. At present, two-step collagenase perfusion method via portal vein is extensively used in the world. However, this method has some problems, such as high dose of collagenase, complicated operation, long process and high requirement for the instrument.

OBJECTIVE: To investigate a simple effective method of separation and primary culture of rat hepatocytes.

METHODS: A total of 10 Sprague Dawley rats were obtained to harvest hepatocyte by modified perfusion method through the abdominal aorta. Hepatocyte tests were repeated ten times to observe results of each index and to compare with published literatures. SD rats served as hepatocyte donors using IV type collagenase perfusion via the abdominal aorta. Liver hepatic portal structures, the upper and inferior vena cava of the donors were closed to retain collagenase digestion to obtain hepatocytes. Following filtration through 200-mesh and 300-mesh sieves, the suspension was transferred to a centrifuge tube, and then purified hepatocytes at 1 000, 500, 300 r/min centrifugation about respectively (each 3 minutes). Trypan blue staining was utilized to measure cell viability. The purity and morphology of hepatocytes were observed under the inverted microscope.

RESULTS AND CONCLUSION: Hepatocytes obtained by collagenase digestion were pure, intact and have a very good viability. The modified collagenase perfusion through the abdominal aorta was a better method for isolation of hepatocytes.

Yu SL, Han BS, Zhang R, Du ZY, Wu XB, Wu W, Wang JX, Huang F, Li HW, Shen BY, Peng CH. Separation of rat hepatocytes using modified collagenase perfusion via the abdominal aorta. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(44): 8253-8256. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 良好的分离技术是获取高活性肝细胞的前提。目前,国内外普遍采用的是经门静脉的两步胶原酶灌注法。但该方法仍存在胶原酶用量大、操作繁琐、流程长、对设备要求较高等问题。

目的: 寻找一种简单有效的大鼠肝细胞分离培养方法。

方法: 取SD大鼠10只,按改良经腹主动脉灌注法分离培养大鼠肝细胞,重复10次分离肝细胞实验,观察各项指标结果并与已发表文献进行对比分析。以SD大鼠作肝细胞供体,采用IV型胶原酶经腹主动脉灌注,供体肝脏肝门部结构、肝上及肝下腔静脉封闭保留胶原酶消化分离获取肝细胞,经200目和300目筛滤过,滤过后的悬液转移至离心管中分别以1 000, 500, 300 r/min离心各3 min以纯化肝细胞,以锥虫蓝染色法测细胞活性,在倒置显微镜下观察肝细胞纯度及形态变化。
结果与结论: 胶原酶消化法所获取的肝细胞纯度高、形态完整、活性高。提示改良胶原酶经腹主动脉灌注消化法是一种较好的肝细胞分离方法。

关键词: 肝细胞分离; 大鼠; 原代培养; 胶原酶; 腹主动脉灌注

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.44.021

余松林, 韩宝三, 张瑞, 杜志勇, 吴旭波, 吴薇, 王加祥, 黄芳, 李宏为, 沈柏用, 彭承宏. 改良胶原酶经腹主动脉灌注消化法分离大鼠肝细胞[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(44):8253-8256. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

肝脏是人体功能最复杂的器官之一,作为构成肝脏的实质细胞,肝细胞在肝脏的基础实验及临床相关研究中有着重要的意义。体外分离培养肝细胞是人工肝、生理学、药理学、毒理学以及基因工程等研究的基础^[1-4],人们一直在寻找一种简单有效的方法获得大量有活性的肝细胞,良好的分离技术是获取高活性肝细胞的前提。目前,国内外普遍采用的是 Seglen^[5]的经门静脉两步胶原酶灌注法。但该方法仍存在胶原酶用量大、操作繁琐、流程长、对设备要求较高等问题。本实验拟采用新的经腹主动

脉灌注胶原酶两步消化法获取肝细胞,以求操作简便,胶原酶用量少,为需要重复获取大鼠肝细胞的实验提供了一种简单快速的分离方法。

1 材料和方法

设计: 方法改进。

时间及地点: 于2009-05/10在上海交通大学医学院附属瑞金医院动物房完成。

材料: SPF级SD雄性大鼠10只,8周龄,体质量240~260 g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司(实验动物机构许可证号:SCXK(沪)2008-0016)。实验过程中对动物处置

¹Shanghai Institute of Digestive Surgery, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Department of General Surgery, Center of Organ Transplantation, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China; ²Department of Surgical Oncology, First Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical College, Hohhot 010020, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Yu Song-lin☆, Studying for doctorate, Attending physician, Shanghai Institute of Digestive Surgery, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Department of General Surgery, Center of Organ Transplantation, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China ysl1997@sina.com

Correspondence to: Peng Cheng-hong, Chief physician, Professor, Shanghai Institute of Digestive Surgery, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Department of General Surgery, Center of Organ Transplantation, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China chhpeng@hotmail.com

Supported by: the National "Eleventh Five-Year" Hi-tech Research and Development Program - "863" Project, No. 2008AA02Z417*; the Key Project of the National Natural Science Foundation of China, No. 20434030*; the National Natural Science Foundation of China, No. 30772105*, 20074031*; the National Science Fund Project of Shanghai Science and Technology Commission, No. 07ZR14076*

Received:2010-03-22
Accepted:2010-05-01

¹上海交通大学医学院附属瑞金医院消化外科研究所, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普通外科, 器官移植中心, 上海市 200025; ²内蒙古医学院附属医院肿瘤外科, 内蒙古自治区呼和浩特市 D-Hanks 液、DMEM 高糖培养液

余松林, 男, 1976 年生, 汉族, 上海交通大学医学院附属瑞金医院消化外科研究所, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普通外科器官移植中心在读博士, 主治医师, 主要从事人工肝, 肝移植及肝胆胰疾病方面的研究。

200 目、300 目标准筛
ys11997@sina.com (HFsafe 1200)

通信作者: 彭承宏, 主任医师, 教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院消化外科研究所, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普通外科器官移植中心, 上海市 200025
chhpeng@hotmail.com

方法符合动物伦理学要求^[6]。

主要试剂及仪器:

来源	
上海第一生化药业有限公司	D-Hanks 液、Hanks 液、DMEM 高糖培养液
上海西唐生物科技有限公司	青霉素钠
杭州吉诺生物医药技术有限公司	
美国 Sigma 公司	
美国 Front(北京)有限公司	
上海博光生物科技有限公司	
Amresco 公司	
江苏万邦生化医药股份有限公司	
中国医药(集团)上海化学试剂公司	
上海精网筛滤器材有限公司	
Heal Force 发展有限公司 (香港)	
Eppendorf 公司	
上海精宏实验设备有限公司	
德国 Heraeus 公司	
Nikon 公司	
上海医药工业研究院产品	

方法:

大鼠肝实质细胞的分离: 大鼠以 1 000 U 肝素钠肌注肝素化后, 按 0.4 g/kg 戊巴比妥钠腹腔麻醉, 胸部以下以体积分数为 75% 的乙醇消毒, 迅速转入无菌操作台上固定, 腹部十字切开, 上至剑突下达阴茎上 1 cm, 3 把血管钳分别钳夹剑突及左右两侧切开的皮瓣向上及左右两侧牵开充分暴露肝脏, 按逆时针方向游离肝周韧带, 充分解剖肝下下腔静脉近肝一段及门静脉左右支汇合以下一小段, 分别在两者背后带线穿过, 把所有肠管推向右侧充分暴露腹主动脉, 在腹主动脉末段作充分游离解剖并在其后带 4[#] 线穿过, 用一小血管夹夹闭该血管, 在隔下打及腹主动脉搏动后, 蚊式钳在其表面稍作分离确认该动脉并顺分开的间隙阻断腹主动脉, 上提血管夹绷紧腹主动脉, 静脉留置针注 D-Hanks 液排气后在血管表面以 15° 角潜行穿入约 0.5 cm 后退出针芯并继续向前推入约 1.5 cm, 结扎固定留置针, 以 25 mL/min 的速度经留置针灌注 4 °C 的 D-Hanks 液 250 mL, 以除去残血并减少肝细胞间的钙离子浓度, 待肝脏体积膨大到原体积的 1.5 倍, 变白后在灌注的同时剪开肾静脉下方的下腔静脉作为流出

道, 使肝内灌注压力下降, 然后用 37 °C 水浴预热的溶于 Hanks 液浓度为 0.5 g/L 的 IV 型胶原酶溶液约 8 mL 灌注, 先推 2.0~3.0 mL 以排出肝脏内 D-Hanks 液, 当发现留出道由红变白时, 说明 D-Hanks 液被排尽, 迅速用一蚊式钳带线从肝上下腔静脉后壁穿过结扎之, 随后结扎肝下下腔静脉封闭流出道, 在一定压力下继续灌注剩余的的胶原酶溶液, 当肝脏膨胀表面被膜下出现细小裂纹时为灌注达到最佳效果, 此时迅速结扎门静脉。上提肝上下腔静脉结扎线在其上方切断, 顺势由上向下切下肝脏, 然后在结扎线远端切断肝下下腔静脉和门静脉, 置 20 mL 37 °C Hanks 液中水浴维持温度恒定充分消化 10 min, 向 Hanks 中加入含胎牛血清的 DMEM 培养液 5 mL 以终止将接触到的酶, 取下消化成熟的肝, 撕开肝包膜, 抖动使肝细胞散出, 用吸管将肝细胞悬液移至 200 目和 300 目筛滤过, 滤过后的悬液转移至离心管中分别以 1 000, 500, 300 r/min 离心各 3 min, 沉淀收集沉淀于含体积分数为 10% 的新生牛血清、12 U/L 胰岛素、100 U/L 青霉素钠盐及 100 mg/L 硫酸链霉素的 DMEM 培养液中, 用吸管轻轻吹打均匀。

根据锥虫蓝拒染试验原理, 取 0.2 mL 肝细胞悬液与等量 4 g/L 锥虫蓝溶液混匀, 显微镜下计数肝细胞数量、活力及纯度。

细胞纯度计算方法以肝实质细胞占分离总细胞数量的百分比计算。

大鼠肝细胞原代培养: 将肝细胞浓度调整为 10×10⁸ L⁻¹, 然后将其接种于方形培养瓶, 放入 37 °C, 体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中进行培养。

主要观察指标: 观察细胞纯度和存活率, 获得的细胞总数, IV 型胶原酶用量, 大鼠肝细胞的形态学结果及实验操作时间。

设计、实施、评估者: 设计、实施、评估均为本文作者, 均经过正规培训, 采用盲法评估。

2 结果

2.1 细胞的纯度和存活率 显微镜检表明, 肝实质细胞的纯度接近 100%, 平均为 (98.00±1.24)%, 见图 1, 表 1; 锥虫蓝拒染试验测出细胞的平均存活率为 (96.12±1.79)%, 见图 2, 表 1。

表 1 分离大鼠肝细胞的实验指标结果
Table 1 Experimental results of isolating rat hepatocytes

Experimental time (times)	Purity (%)	Survival rate (%)	Total number of cells ($\times 10^8$)	Collagenase dosage (mL)	Time (min)
1	99	94.12	1.67	8.00	60
2	96	96.07	1.82	6.00	57
3	97	93.25	1.73	7.20	59
4	98	94.86	2.34	7.00	46
5	99	95.13	1.96	6.80	47
6	99	97.11	1.05	7.40	51
7	98	97.38	3.25	6.70	48
8	96	96.17	2.57	6.60	55
9	99	98.99	2.48	7.30	58
10	99	98.03	2.63	7.70	49
Average value	98	96.12	2.15	7.07	53



Figure 1 Cell purity ($\times 100$)
图 1 细胞纯度($\times 100$)



Figure 2 Cell viability ($\times 100$)
图 2 细胞活力($\times 100$)

2.2 获得的细胞总数 平均每只大鼠肝组织可获得 $(2.15 \pm 0.62) \times 10^8$ 个肝细胞, 见表 1。

2.3 IV型胶原酶的用量 本实验每次只需要用 (7.07 ± 0.57) mL 0.5g/L 的胶原酶液, 见表 1。

2.4 大鼠肝细胞的形态学观察 取培养前肝细胞悬液和 DMEM 培养不同时间的肝细胞标本, 在光学倒置显微镜下拍照, 观察细胞的形态学变化, 见图 3~6。

由图 3~6 可见, 刚分离的大鼠肝细胞呈单个圆球形; 培养 2 h 后, 肝细胞部分贴壁, 细胞稍变形呈轻度扁平状; 24 h 后, 细胞贴壁充分, 伸展良好, 部分连接成片; 48 h 后肝细胞聚集明显, 部分形成条索状。

2.5 实验操作时间 按照本文的方法, 实验证明从开腹到肝细胞放入培养瓶, 能控制在 1 h 以内 [(53.00 ± 5.37) min] 完成, 见表 1。

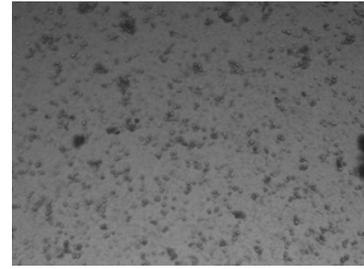


Figure 3 Newly isolated rat hepatocytes ($\times 40$)
图 3 刚分离的大鼠肝细胞($\times 40$)

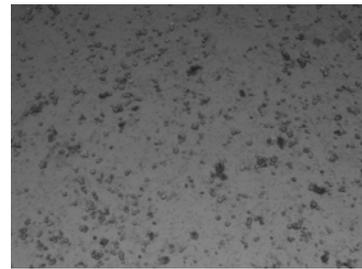


Figure 4 Cultured rat hepatocytes at 2 h ($\times 40$)
图 4 培养 2 h 的大鼠肝细胞($\times 40$)

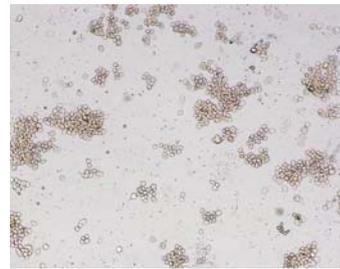


Figure 5 Cultured rat hepatocytes at 24 h ($\times 40$)
图 5 培养 24 h 的大鼠肝细胞($\times 40$)

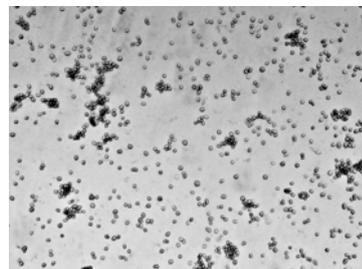


Figure 6 Cultured rat hepatocytes at 48 h ($\times 40$)
图 6 培养 48 h 的大鼠肝细胞($\times 40$)

3 讨论

高活率单肝细胞悬液的制备在肝细胞移植、生物人工肝、细胞生物学及肝病等研究中有广泛应用价值。早在 20 世纪 40 年代, 从肝实质分离肝细胞就已经开始; 1950 年代, 人们多用机械方法直接从肝组织分离肝细

胞, 但常无法获得单肝细胞且活率不高; 1970 年代, Seglen^[5]将肝脏灌注的程序改为两步, 先用大量无钙缓冲液经门静脉灌注以利细胞解离, 继用含钙的胶原酶溶液使后者充分发挥消化作用, 获得较高活率、数量较多的单肝细胞, 使得肝细胞生物学研究有了很大发展。之后出现了各种改良两步灌注法的分离方法, 其中林文等^[7]经腹主动脉灌注分离肝细胞法, 以及李晓斌等^[8]经门静脉灌注 D-Hanks 液后再灌注胶原酶保留在肝脏的改良消化法都报道取得了成功。但其缺点是操作复杂、繁琐、流程长、容易污染及胶原酶用量大等不足。

因此在前人的基础上作者进行了大幅改进, 主要在于: ①术前肝周韧带的游离及对肝下下腔静脉和门静脉的处理为后面封闭肝脏出口作好了准备, 减少了冷缺血时间并减轻了后续手术难度。②经腹主动脉灌注后迅速结扎肝上下腔静脉, 适时结扎肝下下腔静脉, 最后结扎门静脉封闭流出道为此方法的最大创新点。此前皆停留在经门静脉或腹主动脉灌注, 各出口开放或接外接循环装置上, 而经门静脉灌注后封闭出口的办法, 不但手术风险大、灌注不彻底而且术始就影响了入肝血流。③上提肝上下腔静脉结扎线头, 由上向下切下肝脏减少了周围组织的掺内保证了细胞纯度并降低了手术难度节省了手术时间。④置 37 °C Hanks 液中充分消化 10 min, 这样充分发挥了酶的高效性, 节约了酶液和外接设备。

本方法的优点在于: ①用普通医用静脉留置针及输液皮条作为灌注器材, 具有取材容易、调节方便、流量均匀等优点。②使用少量的胶原酶消化, 使其充分长时间同肝间质接触, 发挥了酶的效力, 起到了类似循环灌注的效果, 提高并保证了肝细胞的产量与存活率, 节约了酶的用量。③作者在分离肝细胞时先用 0~4 °C D-Hanks 液灌注后用 37 °C 胶原酶消化, 在保证了胶原酶充分消化分离肝细胞的同时最大限度的缩短了肝细胞冷缺血时间, 降低了分离时对细胞的损伤。④流程短, 污染机会减少。细胞纯化时采用 300 目小孔径滤网有效的过滤了杂质, 梯度、短时离心, 进一步纯化了细胞并节省了时间。⑤经腹主动脉灌注可以利用动静脉两套系统对肝脏进行灌注, 灌注充分, 较彻底地排出了残血, 提高了肝细胞的纯度, 也有利于酶液同肝脏的充分接触。

通过多次实验作者认为, 本方法分离的肝细胞不仅在数量、纯度、活力、形态观察等方面优于其他方法, 而且还有上述优点, 可以保证一般实验研究的顺利进

行。

4 参考文献

- [1] Hayes MA, Pickering DB. Comparative cytopathology of primary rat hepatocyte cultures exposed to aflatoxin B1, acetaminophen, and other hepatotoxins. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1985;80(2): 345-356.
- [2] Stewart DJ, Inaba T. N-demethylation of aminopyrine in vivo and in the isolated hepatocyte of the rat. *Biochem Pharmacol.* 1979; 28(4):461-464.
- [3] Bock KW, van Ackeren G, Lorch F, et al. Metabolism of naphthalene to naphthalene dihydrodiol glucuronide in isolated hepatocytes and in liver microsomes. *Biochem Pharmacol.* 1976; 25(21):2351-2356.
- [4] von Bahr C, Vadi H, Grundin R, et al. Spectral studies on the rapid uptake and subsequent binding of drugs to cytochrome P-450 in isolated rat liver cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1974;59(1): 334-339.
- [5] Seglen PO. Preparation of isolated rat live cells. *Methods Cell Biol.* 1976;13:29-83.
- [6] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. *Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals.* 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [7] Lin W, Zhang JP, Hu ZL, et al. *Zhongguo Yaoli Xuebao.* 1997;18 (1): 85. 林文, 张俊平, 胡振林, 等. Ro31-8220对脂多糖诱导的肝细胞毒性及大鼠库普弗细胞释放肿瘤坏死因子的影响[J]. 中国药理学报, 1997, 18 (1): 85.
- [8] Li XB, Zhao J, Su QH, et al. *Zhongguo Yixue Yanjiu yu Linchuang.* 2005;3(4): 22-23. 李晓斌, 赵军, 苏清华, 等. 一种简单的大鼠肝细胞分离方法[J]. 中国医学研究与临床, 2005, 3(4): 22-23.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 国家“十一五”高新技术研究发展计划“863”项目资助(2008AA02Z417), 国家自然科学基金重点项目资助(20434030), 国家自然科学基金项目资助(30772105, 20074031), 上海市科委自然科学基金项目资助(07ZR14076)。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点: 课题设计的创新主要在于方法创新, 旨在寻找一种全新的分离大鼠肝细胞的方法, 因分离肝细胞是各项实验的基础工作, 因此受到相关基金的资助。

课题评估的“金标准”: 课题的主要结果指标评价国内外文献未见公认的“金标准”。

设计或课题的偏倚与不足: 课题在细胞功能评价方面分子水平的指标观察不多。

提供临床借鉴的价值: 课题在于分离大鼠肝细胞方法的创新, 在肝细胞移植以及人工肝方面有较好的应用前景, 临床运用可行性强, 部分肝移植临床工作者在取供体肝脏时可借鉴实验中的经腹主动脉灌注肝脏技术, 该方法要点主要在于腹主动脉上下两个阻断点位置要选择正确, 上点在隔下, 下点要在腹主动脉末端, 穿刺血管时不要刺破血管。