

一种简易的人原代肝细胞分离培养方法***☆

吴青松¹, 李治国¹, 刘广波¹, 高毅^{1,2}

A simple method for human primary hepatocytes separation

Wu Qing-song¹, Li Zhi-guo¹, Liu Guang-bo¹, Gao Yi^{1,2}

Abstract

BACKGROUND: The two-step *in situ* perfusion for liver cells isolation was high in quantity and activity, but the perfusion device was expensive, complicate in operational steps, high in technique requirement, long time to operate and easily to pollute. And the human primary liver cells are limited to use in the general laboratory and in medical applications.

OBJECTIVE: To establish the separate and culture methods for human primary hepatocytes *in vitro*.

METHODS: The liver tissue was perfused with pre-perfusate solution at 38 °C and II collagenase solution by using multi-point puncture perfusion technique, and then the human primary hepatocytes were obtained after digestion and centrifugation; Hepatocyte morphology was observed by inverted microscope and electron microscope and the function was identified.

RESULTS AND CONCLUSION: The amount of human primary hepatocytes was 5×10^5 and the viability was 90% after digested and separated by multi-point puncture perfusion. Electron microscope showed hepatocytes were cobblestone-like growth, a typical large nucleus and little cytoplasm after cultured for 24 hours. Glycogen PAS staining and albumin expression of cultured hepatocytes were positive. The multi-point puncture perfusion hepatocytes technique was simple and easy to operate, with advantages of high yield, good viability and high purity and the isolated and cultured hepatocytes have specific biological functions, so it would be applied widely in ordinary laboratory.

¹Department of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China; ²Institute of Regeneration Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Wu QS, Li ZG, Liu GB, Gao Y. A simple method for human primary hepatocytes separation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(18): 3301-3304. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 采用原位两步灌注法分离肝细胞数量多, 活性高, 但灌注装置价格昂贵, 操作环节多, 技术要求高, 所需时间长, 易污染, 限制了在一般实验室及人原代肝细胞在医学中的应用。

目的: 建立人原代肝细胞体外分离培养方法。

方法: 采用多点穿刺灌注方法将预温 38 °C 的前灌注液及 II 型胶原酶溶液依次灌入人肝脏组织中, 经消化及离心后获得人原代肝细胞; 倒置显微镜和电镜观察细胞形态特征, 并鉴定。

结果与结论: 经多点穿刺灌注法消化分离后可获得约 5×10^5 个肝细胞, 分离获得的肝细胞活率达 90%; 细胞培养 24 h 后呈铺路石样生长; 电镜示肝细胞呈典型形态特征: 细胞核大, 胞质少; 培养的肝细胞 PAS 糖原染色阳性, 白蛋白表达阳性。说明多点穿刺灌注法分离人原代肝细胞简单易行, 肝细胞产量高、活力好、纯度高, 分离培养的肝细胞具有特异性生物学功能表达, 适宜在一般条件实验室推广应用。

Wu Qing-song☆, Studying for doctorate, Chief physician, Department of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China nanhuaren@yahoo.com.cn

Corresponding author: Gao Yi, Professor, Doctoral supervisor, Department of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China gaoyi6146@163.com

Supported by: National High Technology Research and Development Program (863 Program), No.2006AA02A141*; Guangdong Science and Technology Program, No. 2007A032100005*; Guangdong Natural Science Foundation, No. 2007A032100005*

Received: 2011-12-08 Accepted: 2011-12-18

关键词: 原代肝细胞; 分离; 培养; II 型胶原酶; 灌注法
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.18.016

吴青松, 李治国, 刘广波, 高毅. 一种简易的人原代肝细胞分离培养方法[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(18): 3301-3304. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

长期以来, 国内外众多学者对原代肝细胞的分离方法及培养条件进行了大量的研究, 但要获得高活率、功能好的肝细胞, 至今仍较困难, 尤其是人原代肝细胞^[1]。现在广泛使用的是原位两步灌注法是目前国际上经典的肝细胞分离法^[2]。先从门静脉用无钙、含氧前期缓冲液, 冲出血细胞和钙离子, 再换胶原酶溶液灌注至组织软化。此法分离获得的肝细胞几乎为纯的肝实质细胞, 不仅数量多、活性高, 而且保留了肝细胞的各种功能。但使用该方法不仅灌注装置价格昂贵, 操作环节多, 技术要求高, 所需时间长, 易污染, 而且对于一般以手术切除

而获得的人肝组织并不适用, 所以限制了该方法在一般实验室以及人原代肝细胞在医学领域中的应用。本实验采用多点穿刺灌注法分离人原代肝细胞, 方法简单易行, 且肝细胞产量高、活力好、纯度高, 培养的肝细胞具有特异性生物学功能表达, 适宜在一般条件实验室推广应用。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外观察实验。

时间及地点: 于 2011-07/08 在南方医科大学再生医学研究所完成。

材料:

人正常肝脏组织: 来源于肝切除手术患者

¹ 南方医科大学珠江医院肝胆外科, 广东省广州市 510282; ² 南方医科大学再生医学研究所, 广东省广州市 510282

吴青松☆, 男, 1971年生, 湖南省常宁市人, 汉族, 南方医科大学在读博士, 主任医师, 主要从事肝胆外科临床、生物人工肝细胞材料研究。
nanhuaren@
yahoo.com.cn

通讯作者: 高毅, 教授, 博士生导师, 南方医科大学珠江医院肝胆二科, 广东省广州市 510282
gaoyi6146@
163.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225
(2012)18-03301-04

收稿日期: 2011-12-08
修回日期: 2011-12-18
(20111116002/GW·C)

(大小约为3 cm×2 cm×1 cm, 质量约8 g); 获取该标本前已经获得了患者的知情同意以及南方医科大学珠江医院伦理委员会的许可。

主要试剂与仪器: Williams' Medium E (Invitrogen, USA); DMEM高糖(Gibco, USA); 红细胞裂解液(sigma, USA); 主要成分: 8.3 g/L 氯化铵, Tris-HCl, pH值7.5±0.2; collagenase Type II (Invitrogen, USA); 胎牛血清(Hyclone); 青链霉素(杭州吉诺); 电镜(Op ton EM 10C, 德国); ALB一抗(R.D公司, 鼠抗人); 生物素化二抗工作液(二抗试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司); 辣根酶标记链霉素卵白素工作液(二抗试剂盒)。

实验方法:

人原代肝细胞的分离和培养: 将获取的人肝组织迅速投入装有肝组织保存液 DMEM (高糖)+1%双抗(100 U/mL青霉素、100 mg/L链霉素)的无菌离心管中, 放入冰盒(温度0~4 °C)带回实验室; 将装有肝组织块的离心管取出, 乙醇布涂擦外表消毒后, 放入超净台; 无菌镊取出组织块, 放入培养皿中, 用4 °C的D-Hank's液清洗肝组织表面血块, 并用眼科剪将其余结缔组织剪除; 将装有肝组织(约剩8 g)的培养皿放于50 °C热水袋上, 用5 mL针头注射器多点穿刺灌注预热的38 °C前灌流液, 使肝组织块由暗红色逐渐变为灰白色且流出的前灌流液变清亮, 灌注时压力、流速要恒定, 不能有气泡, 此过程15 min; 灌注完毕, 将肝组织取出放入另一无菌的培养皿中, 更换5 mL针头注射器, 吸取5 mL 38 °C预温的II型胶原酶溶液多点穿刺灌注, 直至组织块变疏松、失去弹性, 表面呈龟背状裂隙, II型胶原酶溶液可循环使用; 同时, 为保持胶原酶溶液的温度, 将培养皿置于50 °C热水袋之上, 此过程需15 min; 灌注完毕, 将肝组织(约6.5 g)取出, 用无菌眼科剪刀和眼科镊钝性分离肝组织, 并去除残存的包膜和纤维结缔组织, 分离完毕, 放入15 mL离心管中, 用吸管吹打数次后, 继续在II型胶原酶溶液中37 °C振荡消化15 min; 消化完毕, 用粗口吸管将消化物吹打为细胞悬液, 在冰浴条件下, 先用150目不锈钢滤网过滤, 收集过滤后的肝细胞悬液, 再用200目滤网过滤, 将滤液移至离心管中; 第1次离心50 g, 离心5 min, 去上清, 底层沉淀加入红细胞裂解液吹打, 室温静置3 min后, 加入适量DMEM液, 吹打混匀; 第2次离心10 g, 3 min, 去上清, 加入适量DMEM液, 吹打混匀; 第3次离心10 g, 离心3 min,

去上清, 加入适量DMEM液, 吹打混匀; 第4次离心10 g, 离心3 min, 去上清, 加含Williams' Medium E完全培养基5 mL, 吹散, 取细胞悬液进行计数; 调整悬浮在Williams' Medium E完全培养基中的肝细胞浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 接种于铺有I型鼠尾胶原的培养瓶中, 于37 °C, 体积分数5%CO₂恒温培养箱中培养, 2 h贴壁后, 换液除去死亡及未贴壁细胞, 继续培养。

肝细胞产量及细胞活率测定: 锥虫蓝拒染实验细胞活率计算, 取一滴细胞悬液滴于载玻片上, 锥虫蓝拒染, 显微镜下观察, 计数200个细胞, 细胞活率=(活细胞数/200)×100%。用细胞计数板进行计数, 从5 mL细胞悬液中取一滴悬液, 滴于细胞计数板中, 倒置显微镜下观察, 计数, 计数板中4大格细胞数均数为2, 根据公式: 细胞浓度=(4大格细胞数总和/4)×10⁴, 再乘以原液体积, 即为细胞数量。

吖啶橙/碘化丙啶染色: 吖啶橙能透过细胞膜完整的细胞, 嵌入细胞核DNA中, 使之发出明亮的绿光; 碘化丙啶不能透过完整的细胞膜, 但在凋亡中晚期和死亡的细胞, 碘化丙啶可以透过细胞膜而将细胞核染红; 染色步骤: 将培养瓶中细胞培养液倒去, 加入40 g/L多聚甲醛固定细胞20 min, 避光条件下加入质量浓度为100 mg/L的吖啶橙和碘化丙啶各70 μL, 避光37 °C孵育15 min, 荧光显微镜下观察, 此方法用于判断细胞活力及死活。

电镜观察: 待细胞生长成单层后, 倾去培养液刮取单层细胞加入0.25%戊二醛固定后按常规方法制片, 电镜观察细胞结构。

过碘酸-雪夫反应PAS染色鉴定肝细胞活力: 利用强氧化剂使多糖产生游离的醛基, 醛基和SCHIFF试剂结合, 形成紫红色的化合物, 多糖部位就会呈现紫红色阳性反应, 此染色法用于初步鉴定肝细胞^[3]。

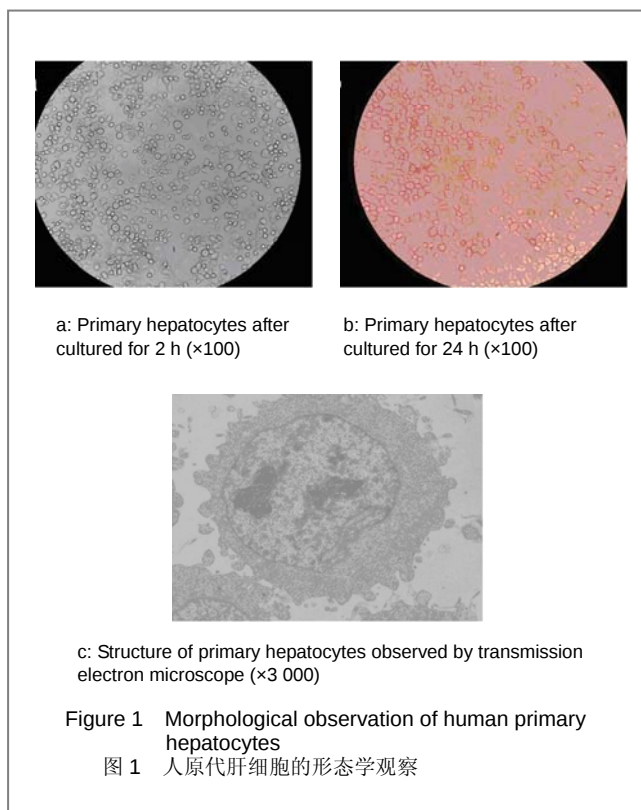
白蛋白免疫细胞化学染色法鉴定肝细胞: 利用抗原抗体反应特异性的鉴定肝细胞, 由于白蛋白只在肝细胞中产生, 白蛋白的抗原抗体反应可以特异性的鉴定肝细胞。

主要观察指标: 人原代肝细胞的形态特征及鉴定结果。

2 结果

2.1 肝细胞的形态学观察 倒置显微镜观察分离后的原代肝细胞一般接种2 h就可以贴壁生长, 细胞呈圆形或类圆形, 见图1a; 24 h后

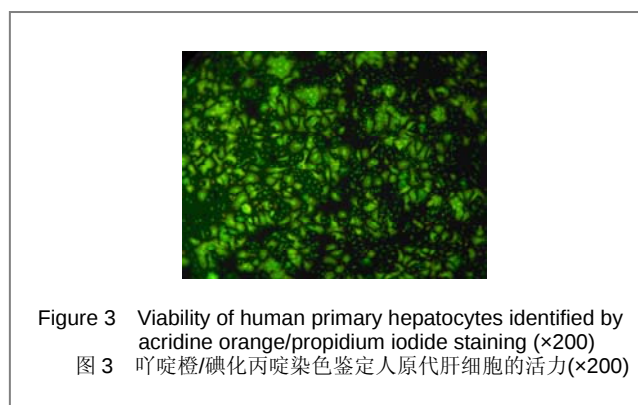
细胞完全伸展, 呈铺路石样, 光镜下可见肝细胞呈六边形、三角形或不规则型, 排列整齐, 细胞界限清晰, 胞浆丰富透亮。细胞核有单核、双核, 呈圆形或椭圆形, 核仁清晰可见, 见图1b。电镜观察可见原代肝细胞呈典型的细胞核大, 胞质少, 细胞表面有突起, 见图1c。



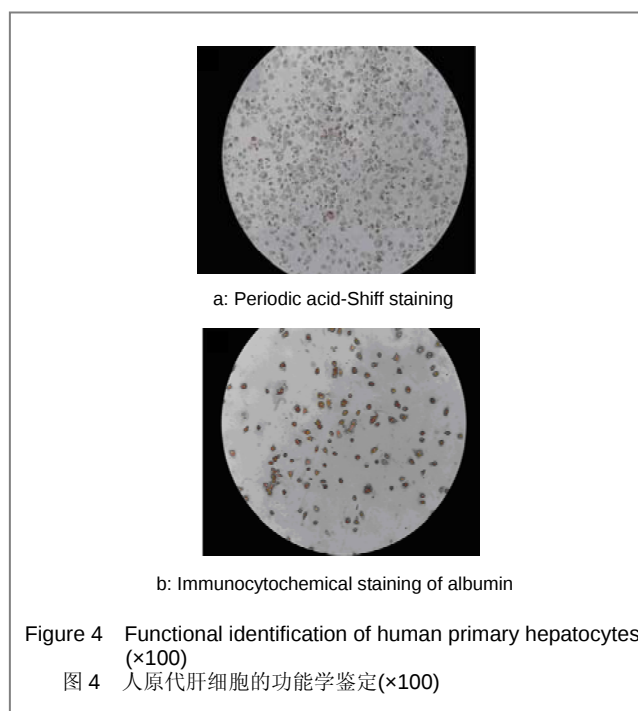
2.2 肝细胞的产量及细胞活率 实验中平均大小为 $3\text{ cm} \times 2\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ 的组织块, 除去电刀切割引起的损伤, 经细胞计数板计数可获得约 5×10^5 个肝细胞, 刚分离的肝细胞锥虫蓝拒染实验计数200个细胞, 其中活细胞数为180个, 即细胞活率为90%, 见图2。



2.3 肝细胞活力的鉴定 肝细胞培养24 h后, 吖啶橙/碘化丙啶染色见细胞形态较前进一步增大, 细胞活力高(绿色), 细胞呈多边形生长, 见图3: 红色代表死亡细胞, 绿色代表活细胞; 图片中未见到红色细胞。



2.4 肝细胞特异性功能的表达 PAS染色鉴定肝细胞: 细胞爬片行 PAS糖原染色后, 细胞胞质中可见密集紫红色糖原颗粒, 见图4a。免疫细胞化学染色检测白蛋白表达鉴定肝细胞, 见图4b, 可见肝细胞质中有棕红色颗粒, 呈阳性表达。



3 讨论

人原代肝细胞是肝细胞移植、生物人工肝的最佳生物材料, 如何获得高活力、数量多的肝细胞, 分离技术是关键的第一步。分离肝细胞的方法有机械分离法、胶原酶分离法、胰蛋白酶消化法、含螯合剂的无钙离子溶液灌注法、酸性磷酸盐灌注法等, 早期主要是非酶法分离肝细胞, 包括机械法(如匀浆法)及螯合法。但是机械法对肝细胞损伤大, 分离下来的肝细胞活率低; 螯合法是用可结合 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的螯合剂(如枸橼酸盐或EDTA)分离肝细胞, 但螯合剂单独使用效果不好, 常需与酶法结合使用^[4]。后期逐渐改为酶消化法分离肝细胞, 包括

胶原酶消化法、胰蛋白酶消化法等。两步胶原酶灌注为肝细胞原代分离的经典方法^[2], 即首先用不含 Ca^{2+} 的离子螯合剂(EDTA等)移走肝组织中的 Ca^{2+} , 从而破坏肝细胞的细胞桥粒样结构; 再用胶原酶进行蛋白分解消化, 最终使纤维组织网被消化, 细胞间连接被解除, 再经反复离心分离, 即得到肝细胞悬液, 其肝细胞存活率达到90%。本方法所获取的肝组织来源于外科手术切除的肝边缘部位, 肝组织体积小, 质量约8 g, 肝断面无完整的门静脉属支供灌注操作, 实验无法使用经典的两步灌注法进行肝细胞的分离。

人原代肝细胞分离培养方法较多^[5], 而肝组织的来源主要有3种, 包括外科手术切除的肝组织^[6]、脑死亡供体和肝移植供肝^[7]。通常大家会选择第一种肝组织, 因为外科手术获得的肝组织标本是一种方便、经济的来源并能够被广泛应用于科研中获取肝细胞。本课题组起先也使用从较大的肝脏组织行剖面血管插管, 再通过胶原酶消化^[6], 但是最终所获得的有活力肝细胞百分率较低, 究其原因主要是外科手术获得的肝组织一方面无法满足实验所需的半肝或肝叶的要求, 所获得正常肝组织往往较小, 甚至无法在剖面中找到用于灌注的管道系统, 给原代肝细胞的分离造成了极大的困难; 另一方面在较大肝组织进行灌注时发现有一部分肝组织无法灌注, 原因是肝部分切除的标本管道系统已经破坏, 所以在插管灌注后, 灌注液无法到达肝组织的每一个部分, 这样灌注完成后肝组织表现为不完全消化状态, 所获得的肝细胞也就表现为活率降低。因此, 本文选择采用多点穿刺的方法对肝组织进行了灌注, 该方法一方面不受肝组织大小的限制, 另一方面也便于操作, 可以使所获得的肝组织每一部分进行充分灌注; 采用这种创新的方法可以获得高产量、高活力的肝细胞; 不仅如此, 作者还进一步在动物肝切除标本上进行验证, 事实证明该方法稳定性好, 因此将此方法命名为多点穿刺灌注法。

国内外学者对人原代肝细胞的分离提供很多方法, 杭化莲等^[8]在Dorko等^[9]报道在两步胶原酶灌注技术的基础上, 对灌注方法进行了改进, 命名为“离体两步胶原酶灌注法”; 但是该方法的前提条件是所使用的肝组织标本必需为半肝或肝叶, 而对肝组织较小的标本即无能为力。同样地其他一些学者所报到的分离人原代肝细胞的方法也要求具备较大的肝组织, 具备灌注所需的管道系统, 否则也无法实施分离^[10]。

总之, 多点穿刺灌注法分离人原代肝细胞, 可获得较高的细胞活率, 且细胞碎片和其他非实质细胞污染极少。该方法可广泛应用于人原代肝细胞的分离, 其操作方法简便易行, 且肝细胞产量高、活力好、纯度高, 适宜在一般条件实验室推广应用。

4 参考文献

- [1] Richert L,Alexandre E,Lloyd T,et al.Tissue collection, transport and isolation procedures required to optimize human hepatocyte isolation from waste liver surgical resections. A multilaboratory study.Liver Int.2004; 24:371-378.
- [2] Seglen PO.Preparation of isolated rat liver cells.Methods Cell Biol 1976;13:29-83.
- [3] Chen N,Qin X,Zhu L.Weichangbingxue he Ganbingxue Zazhi. 2011; 20(6):568-570.
陈宁,覃霞,朱樑.大鼠原代肝细胞分离与培养[J].胃肠病学和肝病杂志,2011, 20(6):568-570.
- [4] Kawahara T,Toso C,Douglas DN,et al.Factors affecting hepatocyte isolation, engraftment, and replication in an in vivomodel.Liver Transpl.2010;16(8): 974-982.
- [5] Mou HH,Hu KH.Shijie Huaren Xiaohua Zazhi.2009;17(21): 2164-2170.
牟卉卉,胡康洪. 原代肝细胞分离培养技术现状及展望[J].世界华人消化杂志,2009, 17(21): 2164-2170.
- [6] Richert L,Alexandre E,Lloyd T,et al.Tissue collection, transport and isolation procedures required to optimize human hepatocyte isolation from waste liver surgical resections.A multilaboratory study. Liver Int.2004;24: 371-378.
- [7] Baccarani U,Sanna A,Cariani A,et al.Isolation of human hepatocytes from livers rejected for liver transplantation on a national basis: results of a 2-year experience.Liver Transpl.2003; 9: 506-512.
- [8] Hang HL,Zhang L,Bian JM,et al. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi. 2011; 19(19): 2016-021.
杭化莲,张磊,施晓雷,等. 成人原代肝细胞的分离、培养及冻存啊[J].世界华人消化杂志,2011,19(19): 2016-2021.
- [9] Dorko K,Freeswick PD,Bartoli F,et al.A new technique for isolating and culturing human hepatocytes from whole or split livers not used for transplantation.Cell Transplant.1994; 3: 387-395.
- [10] Hang H,Shi X,Gu G,et al.A simple isolation and cryopreservation method for adult human hepatocytes.Int J Artif Organs.2009; 32(10):720-727.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2006AA02A141); 广东省科技计划项目(2007A032100005); 广东省自然科学基金项目(07300180)。

作者贡献: 吴青松参与实验设计并实施实验; 李治国实验评估和资料收集; 刘广波撰写实验论文; 高毅设计实验并审核, 并对文章负责。

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经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中涉及的人体标本的采集经患者知情同意, 并由南方医科大学珠江医院伦理委员会批准。

本文创新性: 以“原代肝细胞(Primary hepatocytes), 分离(Separate), 培养(Culture), 胶原酶(Collagenase), 灌注法(Perfusion)”为关键词检索中国期刊全文数据库、中国博士学位论文全文数据库、中国优秀硕士学位论文全文数据库、PubMed 数据库等 1979/2011 文献, 获得人原代肝细胞分离相关文献 7 篇。国内在动物原代肝细胞分离方面研究较多, 大多采用经典原位两步灌注法; 在人肝细胞分离方面经查询获得 1 篇“成人原代肝细胞的分离、培养及冻存”的文献, 但其在分离方法上与本研究有较大差别。实验首次运用多点穿刺的方法分离人原代肝细胞, 所获得的原代肝细胞均具有较好活力和功能, 符合科研需求。