

鸡原代肝细胞的分离及培养

牟彦双, 王丹, 王宇祥, 石慧, 李辉*

(东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 选用 18 日龄肉仔鸡作为试验动物, 应用半原位酶消化法分离鸡肝细胞。在获取鸡肝细胞过程中, 先用灌流液在原位对肝脏进行灌流, 然后取下肝脏用 IV 型胶原酶对肝脏进行灌流消化, 200 目筛网、300 g 离心 5 min 可获得大量的、纯度均一、活力较高的细胞。细胞经形态学动态观察、电镜观察内部结构及对脂类相关基因表达的检测, 证明肝细胞具有功能活性。本研究建立了鸡肝细胞原代培养方法, 为研究鸡肝细胞脂类代谢的生物学过程提供技术平台。

关键词: 鸡; 肝细胞; 分离; 培养

中图分类号: S831 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2013)04-0068-03

肝脏是动物机体的重要代谢器官, 机体正常的生长发育与物质代谢均与肝细胞的功能有关。肝细胞脂类代谢异常会导致脂肪肝, 并与糖及脂肪代谢、机体能量平衡、各类消化道疾病等有非常密切的关系。因此, 选择合适的动物模型研究肝细胞内的脂类代谢, 对于探讨上述生命和疾病过程具有重要意义。人的脂肪合成主要在肝中进行, 鸡脂肪的合成则完全在肝脏中进行, 猪和反刍动物脂肪合成主要在脂肪组织中进行, 鼠、兔的肝脏和脂肪组织中都可以进行较为活跃的脂肪合成^[1]。可以看出, 鸡的脂肪合成部位和合成方式与人的更为接近, 因而鸡的肝细胞中脂肪合成代谢的过程为研究人类机体脂肪合成提供了一个理想的模型, 同时为研究不同动物的脂肪合成模式提供了参考。目前, 国内已成功建立了大鼠、小鼠和人的肝细胞体外培养模型, 但尚未见成熟的鸡肝细胞培养体系的建立。本试验旨在建立鸡肝细胞分离和培养技术, 为鸡脂类调控和代谢机制研究提供技术平台。

1 材料与方法

1.1 动物

16~18 日龄健康肉仔鸡, 饲喂普通饲料, 自由饮水。

1.2 主要试剂配制

无钙镁灌流缓冲液 (g/L): 8.3 g NaCl, 0.5 g KCl, 2.4 g HEPES, 5.5 mL 1 mol/L NaOH, 调 pH 值至 7.4 后定容至 1 L; 胶原酶消化液: 3.9 g NaCl,

0.5 g KCl, 0.7 g CaCl₂ · 2H₂O, 2.4 g HEPES, 0.5 g 胶原酶 IV, 66 mL 1 mol/L NaOH, 调 pH 值至 7.5 后定容至 1 L; Williams'E 混合培养基: 胰岛素 0.5 μg/mL, 转铁蛋白 5 mg/L, 谷胺酰胺 3 g/L, 地塞米松 10⁻⁷ mol/L, 链霉素 100 mg/L, 青霉素-G 100 kU/L, 10% FBS 定容至 1 L Williams'E 培养基中。

1.3 肝细胞的分离

试验鸡术前 3 h 禁食, 乙醚麻醉, 肝素钠抗凝。固定体位, 酒精消毒, 打开腹腔。门静脉插管并固定, 剪断下腔静脉, 用 37 °C 水浴预热的无钙镁灌流液灌流, 灌速为 30 mL/min, 约 20 min 肝脏变成均匀肉色后, 除保留门静脉外离断肝脏血管、韧带及系膜, 将肝脏移入无菌平皿中, 再输注 100 mL 含 0.05% IV 型胶原酶的含钙消化液, 灌速为 30 mL/min, 回收平皿内的胶原酶液重复灌流消化, 至肝包膜下组织呈龟背状裂隙。取下消化成熟的肝脏, 轻轻撕去包膜, 将肝细胞置于预冷的 80 mL 无血清 Williams'E 培养基中, 制成肝细胞悬液。100 目筛网过滤后 37 °C 孵育 30 min, 100 目和 200 目滤网过滤后, 300 r/min 离心 3 min 共离心 4 次, 每次用洗涤缓冲液洗涤。把沉淀的肝细胞加入 Williams'E 培养液中制备成肝细胞悬液。

1.4 肝细胞活率测定

将肝细胞悬液与 0.4% 台盼蓝溶液以 9:1 比例混匀, 使台盼蓝的终浓度为 0.04%。染色 3 min 后, 取 10 μL 的细胞滴加到计数板上进行细胞计数。镜下观察, 死细胞被染成明显的蓝色, 而活细胞呈无色透明状。统计细胞活力: 细胞活率 (%) = 活细胞总数 / (活细胞总数 + 死细胞总数) × 100%。

1.5 肝细胞的培养

选取细胞活率在 90% 以上的肝细胞, 将其密度调至每毫升 5 × 10⁶ 个接种于培养板内, 加入 Williams'E 混合培养基, 37 °C, 5% CO₂ 孵箱进行培养。

收稿日期: 2012-07-28

基金项目: 国家自然科学基金资助 (31101033); 黑龙江省教育厅基金 (11551039); 东北农业大学博士启动基金 (2009RC56)。

作者简介: 牟彦双 (1980-), 男, 助理研究员, 博士, 主要从事动物转基因研究, E-mail: muiyanshuang@163.com。

* 通信作者: 李辉, 教授, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: lihui@neau.edu.cn。

4 h 后

换液 1 次，此后每 24 h 换液 1 次。每 24 h 在倒置相差显微镜下观察细胞生长状况。

1.6 透射电镜观察

取细胞接种后，培养 24 h 的肝细胞用培养液洗 3 次，500 r/min 离心 5 min，2.5% 戊二醛 4℃ 固定过夜，2% 锇酸固定 1 h，再以 30% ~ 100% 乙醇梯度脱水各 10 min，常规包埋、修块、半薄及超薄切片，超薄切片用醋酸双氧铀及柠檬酸铅电子染色，透射电镜下观察肝细胞的内部结构。

1.7 肝细胞总 RNA 提取及 RT-PCR 扩增

采用 Trizol 试剂 (Invitrogen) 提取贴壁生长 1 至 7 d 的肝细胞总 RNA，具体方法详见说明书。根据鸡的 ApoB 基因、L-FABP 基因、C/EBPa 基因、18S rRNA 基因 mRNA 序列设计引物，由上海生工生物工程公司合成。反转录按照 Promage 公司反转录试剂盒的说明操作。

具体引物序列如下：

基因名称	引物序列	GenBank 参考序列
ApoB	5'-GACTTGGTTACACGCCTCA-3'	DQ630943
	5'-TAACTTGCCTGTTATGCTC-3'	
L-FABP	5'-TCACTGGAAGTACGAGC-3'	AY563636
	5'-GCATGCAGGCTCTAGATT-3'	
C/EBPa	5'-GTGCTTCATGGAGCAAGCCAA-3'	NM001031459
	5'-TGTGATGGAGTCTCGTTCT-3'	
18S rRNA	5'-TAGATAACCTCGAGCCGATCGCA-3'	NM205518
	5'-GACTTGCCCTCCAATGGATCCTC-3'	

2 结果

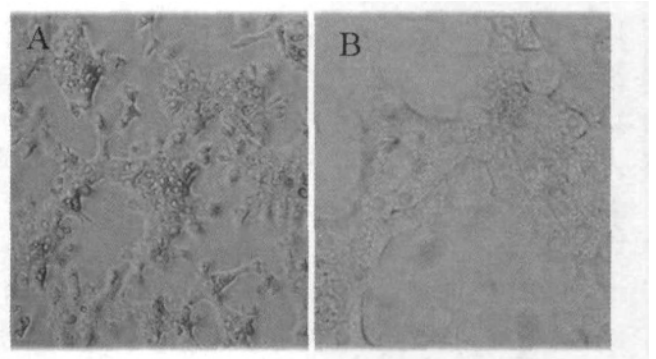
2.1 肝细胞的分离纯化

可获得大量活率较高的肝细胞。本试验成功采用了改良的 Seglen 二步胶原酶灌注法分离肝细胞，平

均每只鸡肝获取 $(1.21 \pm 0.45) \times 10^8$ 个肝细胞，平均细胞活力 (93.6 ± 2.8) 。

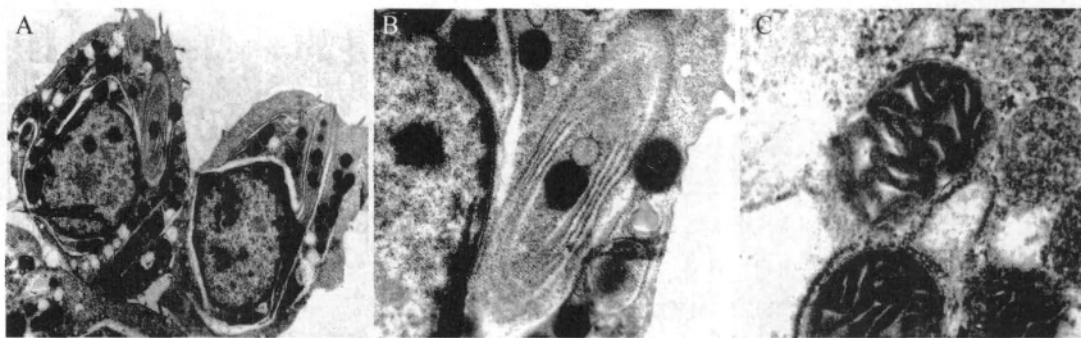
2.2 肝细胞的形态学观察

倒置显微镜下观察，新分离的离体肝细胞为透亮圆形，呈单个分散状态。细胞培养 2 h 后开始出现贴壁、伸展现象，培养 24 h 后大约 90% 的肝细胞完全贴壁，贴壁的肝细胞呈典型的上皮细胞样的多角形，胞体变平变薄，体积明显增大，可见许多双核细胞，细胞间开始出现岛状连接 (图 1)。少数活力差的细胞悬浮于培养液中，换液时可以去除。培养 2 d 后，贴壁生长的肝细胞的形态改变更加明显，肝细胞拉平、伸展，紧紧黏附于培养瓶底壁，相互融合，连接成片、岛状。培养 4 d 后，在老的肝细胞周围出现少数透明的、体积较小的上皮样的细胞。培养 6 d，老化的肝细胞逐渐增多，肝细胞颜色变深，颗粒粗糙，部分已脱壁。至 14 d 培养瓶内老的肝细胞大部分脱落死亡。培养 24 h 的肝细胞在透射电镜下可见大量的内质网、车轮状线粒体，核糖体，玫瑰花形糖原颗粒，细胞连接及胆小管 (图 2)。



A. 成集落样生长的肝细胞 (100 ×); B. 肝细胞形态轮廓 (1000 ×)

图 1 分离培养 24 h 的肝细胞



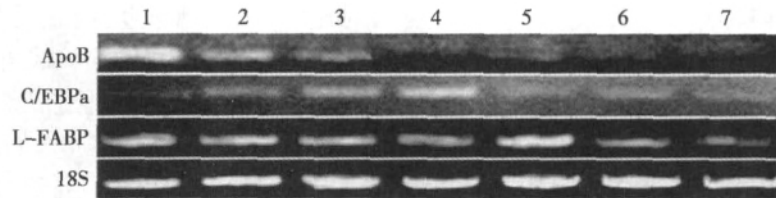
A. 肝细胞 (5000 ×); B. 内质网 (15000 ×); C. 线粒体 (40000 ×)

图 2 分离培养 24 h 的肝细胞透射电镜观察

2.3 肝细胞脂类代谢基因检测

分别提取体外培养 1 至 7 d 的肝细胞总 RNA，采用 RT-PCR 方法检测肝细胞特异表达的基因及肝细胞脂类代谢过程中表达的相关基因。结果表明：肝细胞特异表达基因 L-FABP 在 1 至 7 d 均有表达。在调控肝功能中发挥重要作用的基因 C/EBPa 在体外培养的 1 至 4 d 表达量逐渐升高，随后表达量逐渐减低。同

时，脂肪合成中的重要基因 ApoB 基因在 1 至 3 d 时表达量逐渐降低，培养 4 d 后只能检测到微量表达。说明随着培养时间的延长，肝细胞极低密度脂蛋白 (VLDL) 合成功能逐渐下降直至丧失这部分功能。选用鸡 18S rRNA 作为内参基因，标定其他基因的相对表达量 (图 3)。



1. 第 1 天; 2. 第 2 天; 3. 第 3 天; 4. 第 4 天; 5. 第 5 天; 6. 第 6 天; 7. 第 7 天

图 3 脂类代谢相关基因的表达检测

3 讨论

原代肝细胞分离培养技术在生物学领域和医学领域中已被广泛的应用。在离体培养试验中，为了提高细胞的成活率，一般选择细胞生长较为旺盛的新生动物为取材对象，但由于 1 至 14 日龄幼鸡肝脏中会因为吸收卵黄囊而充满脂类，这会对肝脏的分离效果产生影响，因此我们选择 18 至 20 日龄的幼鸡作为取材对象^[2-3]。

对肝脏进行消化分离时，首先用无 Ca^{2+} 缓冲液灌注，目的是去除肝脏中的 Ca^{2+} ，打破细胞间桥粒紧密连接。接着用含 Ca^{2+} 离子的 IV 型胶原酶缓冲液灌注消化组织。适当浓度胶原酶的原位循环灌注消化不仅保证了肝细胞的产量与存活率，而且减少了胶原酶的用量，降低了分离培养的成本^[4]。

刚收集的肝细胞同其他细胞碎片及杂细胞混在一起，纯化肝细胞可以通过不锈钢筛网过滤及低速离心纯化肝细胞。采用 300 g 离心 3 min 可以将绝大多数肝细胞同其他细胞碎片及杂细胞分离。根据肝细胞接种后大约 1 h 肝细胞就开始贴壁的特点，接种 4 h 后换液可进一步除去死细胞和其他的细胞。

肝细胞在体内时代谢旺盛，进行体外培养时，由于缺少体内的微环境，肝细胞会很快退化衰老^[5]。本研究在培养基中，除血清外，还添加了胰岛素、转铁蛋白等因子，能够改善肝细胞生长条件，维持肝细胞的代谢能力。本试验中，体外培养的鸡肝细胞在相

差显微镜及透射电镜下观察，均符合肝细胞代谢旺盛的结构特点。对分离的肝细胞脂质代谢相关基因的表达进行检测，在培养的前 3 d 中脂质代谢的重要基因，如 ApoB 等均表达，说明这段时间内肝细胞的脂类代谢功能依然正常。在本研究中肝细胞在接种 4 h 后已经处于贴壁生长状态，这种生长状态可以维持至第 3 天，之后肝细胞开始退化衰老，细胞内开始出现空泡。因此，对肝细胞进行功能研究最好在培养 3 d 内进行。

总之，本研究采用半原位酶消化法分离消化鸡的肝细胞，可获得大量的高活性的肝细胞，并保持其脂质代谢的功能，可以在肝细胞对脂质代谢进行研究。

参考文献:

- [1] 薛庆善. 体外培养的原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社. 2001: 31.
- [2] Hou D X, Kunitake T, Kusuda J, et al. Primary culture of chicken hepatocytes as an in vitro model for determining the influence of dioxin [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2001, 65: 218-221.
- [3] Keisuke S, Yasunari K, Tatsuki F, et al. Ascorbic acid supplementation to primary culture of chicken hepatocytes with non-serum medium [J]. Int J Biochem Cell B, 2000, 32: 967-973.
- [4] 彭齐荣, 袁爱力, 赖卓胜, 等. 肝细胞的大量制备技术 [J]. 中华肝病杂志, 1999, 7(4): 246.
- [5] 陈黎龙, 江青艳, 朱晓彤, 等. 成年鸡肝细胞的分离与原代培养 [J]. 江西农业大学学报, 2008, 3: 385-389.