

成年大鼠体外培养肝细胞方法的研究

陈 静 马东明 陆 竹 张红霞

(天津中医学院 300193)

指导: 范英昌

中图分类号: R329.2+5 文献标识码: A 文章编号: 1005-1180(2001)02-0023-02

肝细胞培养作为观察药物是否对肝有损害作用的体外实验工具,多年来一直被广泛采用,它比整体运动用药量少,易排除体内多种因素的影响。原代培养大鼠肝细胞是一种较好的体外研究方法,以它完整的实验体系而便于作专项机理研究。我们通过多次实验探索,现察比较后选择最佳方法来获得高活率、高产率及良好生长代谢活力的肝细胞。

1 材料与方法

1.1 动物: wistar 大鼠, 雄性, 体重 100~150 g, 饥饿 24 h。

1.2 试剂

1.2.1 肝灌注用药

D- Hanks 溶液。

胶原酶溶液: 10 mg IV 型胶原酶 (sigma 分装) 溶 333 mL 含 10% 胎牛血清 (EBS) 的 DMEM - F12 培养液中, 4℃ 冰箱保存, 次日滤菌, 新鲜使用。

1.2.2 培养用药

DMEM - F12 培养液 (购自 Gibco 公司): 用 100 mL 3 蒸水溶解滤菌使用。

胎牛血清: 购自天津市血液研究所。

1.3 灌注方法

3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 固定大鼠, 胸腹消毒。切开腹腔, 进行门静脉和下腔静脉插管, 结扎上腔静脉。首先用 D- Hanks 液经门静脉灌注至肝脏呈苍白色后, 用 0.03% 的胶原酶 150 mL 灌注约 10 min, 取下肝脏, 揭去被膜。

1.4 大鼠游离肝细胞的制备

将取下的肝脏剪碎, 0.03% 胶原酶消化 20 min, D- Hanks 终止消化, 过 100 目筛网滤去碎组织, 加 DMEM - F12 培养液, 37℃ 恒温振荡 15 min, 冰水浴 10 min, 混合液以 200 目筛网过滤, 离心 2000 rpm/min 共 5 min, 以 D- Hanks 液反复洗 3 次, 沉淀用 200 mL 含 20% FBS 的 DMEM - F12 培养液制备成游离肝细胞悬液。台盼蓝染色法测定细胞活率。

1.5 游离肝细胞培养

在 25 cm² 无菌培养瓶中加入 6~6.5 mL 细胞悬液, (约 10⁶~10⁷ 个细胞/mL 培养液) 接种, 37℃ CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 倒去液体, 换入新培养液培养。

2 结果

2.1 制备新鲜游离肝细胞的形态、活率

用上述方法制备的大鼠新鲜游离肝细胞呈单个分散状态。在倒置显微镜观察下肝细胞呈透亮, 具有立体感的圆形细胞, 体重为 120 g 左右的大鼠每只肝脏可获得活率为 80%~90% 的肝细胞。

2.2 培养过程肝细胞的形态学特征

新鲜肝细胞接种 2 h 开始贴壁, 经 24 h 培养约有 60% 活细胞贴壁, 贴壁的细胞形态有明显变化, 在倒置显微镜下可见细胞拉平变薄, 体积增大, 部分细胞呈多边形展开, 有些细胞开始呈岛状连接。培养 48 h 后, 可见有明显细胞增殖现象, 如双核肝细胞明显增多……。

2.3 肝细胞活性的测定

用分离的新鲜或培养的肝细胞做台盼蓝排斥实验, 结果显示约 80% 细胞的胞浆及核均排斥染色, 整个细胞透明无色, 其余损伤或死亡的细胞胞浆或核被台盼蓝染成浅或深蓝色。

3 讨论

肝脏作为机体不可缺少的重要代谢器官, 一直倍受关注。但体内研究易受众多因素影响, 肝细胞培养作为一种体外研究的手段, 越来越多地被应用。

近 20 年来报道体外培养大鼠肝细胞的方法较多, 这些方法大体分为两大类: 1) 是非酶法。2) 是酶处理法, 如果胶原酶、玻璃酸酶、胰蛋白酶和溶菌酶等消化溶解细胞^[1]。运用非酶法易损伤肝细胞, 细胞产率极低。Berry 和 Firend 首次建立在生理条件下用胶原酶及透明质酸酶灌注肝的方法, 大大提高了肝细胞产量及活力, 为酶灌注法奠定了基础^[2]。随后, Ingebretsen WR 等单用胶原酶灌肝也获得同样的效果^[3]。我们所采用的经门静脉灌注法能将肝组织内的红细胞尽可能冲洗干净, 消化液可分布至每个肝细胞周围, 均匀并且同步消化, 所以分离效果好, 获得肝细胞多且活性高,

易培养成功。

大鼠体外肝细胞的培养首先要考虑的是如何获得高活率的大量游离肝实质细胞。为达到这一目地,必然要选用合适的分离条件,消化酶是非常重要的问题。一般认为,胶原酶只消化细胞间质而对细胞无明显损伤,所以分离培养肝细胞效果最好^[4]。我们实验结果证明,在近似生理条件下,在体和离体消化时,IV型胶原酶最佳浓度为0.03%,作用10min为宜。若其浓度过高,难以控制准确的作用时间;过低,也会因作和时间过长,增加细胞死亡率。最适胶原酶浓度为0.03%。

此外,在肝细胞培养中,适用合适的培养条件及培养液同样也是重要的。肝细胞培养的生长条件要求严格,一般要求成分有丰富的营养物,丰富介质的应用,对于肝细胞的贴壁率及保持其多边形态是有准备的^[5]。通过比较应用,选用DMEM-F12培养液使肝细胞的贴壁及形态优于199或1640一类的基础培养液。

确定准确可行的肝细胞体外分离培养方法是获得较好的体外实验模型的重要手段,对肝细胞的药理或毒理研究具有重要意义。

参考文献

- 1 张全志,于洋,姜诞宁,等 大鼠游离肝细胞悬液的制备及应用 第二军医大学学报,1986;7(3):199
- 2 Berry MN and Firend DS High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cell J cell Biol 1969;43:506
- 3 Ingbretsen WR, et al A rapid method for isolation of large quantities of rat liver parenchymal cells with high anabolic rats Biochem Biophys Res Commun, 1972;47:403
- 4 唐志敏,杨玲,金文银,等 原代培养大鼠肝细胞分离方法比较研究 中西医结合肝病杂志,1999;9(4):19
- 5 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

(收稿日期:2000-12-05)

犊鼻穴灌流异搏定对针刺大鼠足三里穴镇痛效应的影响

李桂兰 郭义 王秀云 徐汤萍
(天津中医学院 300193)

中图分类号:R245.9⁺9 文献标识码:A 文章编号:1005-1180(2001)02-0024-02

我们以前实验发现,当在内关穴及心包经其它穴位注射Ca²⁺通道阻断剂,或在足三里及胃经上穴位注射Ca²⁺通道阻断剂,均可使针刺效应丧失。提示我们,在针效的产生过程中,Ca²⁺参与经络活动与Ca²⁺通道有关。由于穴位注射的方法不能连续给药,很难保证整个针刺过程中都能阻断Ca²⁺通道,因此,我们又使用蠕动灌流的方法,连续给药,观察当灌流胃经犊鼻穴时,对针刺足三里效应有何影响,现将实验结果报告如下。

1 犊鼻穴灌流异搏定对针刺足三里穴效应的影响

1.1 材料与方法 健康Wistar大鼠,雌雄不限,体重200~250g。将大鼠放在特制的布袋中,将三通管中终端带有塑料小囊的一端经口腔送至胃中,一端连接注射器注入空气,一端连接水银检压计。当注入空气时塑料小囊膨胀引起胃扩张,胃扩张引起大鼠胃胀痛,当其不能耐受时则挣扎嘶叫,以此时水银检压计的读数作

为痛阈。用此法重复两次挑选出确有镇痛效应的大鼠(即针刺时大鼠痛阈提高值在20mmHg以上者为针刺镇痛效果显著者)。实验时将挑选的大鼠每分钟测痛阈1次,以连测3次的平均值为基础痛阈。随后在犊鼻穴刺入特制的灌流探头(外径约为0.5mm),连接微量蠕动灌流泵(MASTER FLEX美国产),从一端灌入浓度为10mM的异搏定溶液,从另一端流出,灌流速度为0.23ml/分,连续灌流30分钟。从灌流开始即针刺“足三里”穴,施以平补平泻手法,至15分钟时留针至30分钟。其间每5分钟测痛阈1次,以基础痛阈与针层痛阈变化的百分数的均数进行统计学处理,t检验。

1.2 实验结果 用灌流法在犊鼻穴灌流异搏定溶液,针刺足三里穴的镇痛效应消失,与基础痛阈相比,针后痛阈变化无统计学差异(P>0.05)。