

- 4 Plass C, Oakes C, Blum W, *et al.* Epigenetics in acute myeloid leukemia. 2008, 35(4): 378 – 387
- 5 Valencia A, Roman – Gomez J, Cervera, *et al.* Wnt signaling pathway is epigenetically regulated by methylation of Wnt antagonists in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2009, 23: 1658 – 1666
- 6 寿倍明, 陈宝安, 刘德龙. 去甲基化在白血病上的研究进展. *中国实验血液学杂志*, 2008, 16(5): 1247 – 1250
- 7 Yamamoto H. Regulation of Wnt signaling pathway and its relationship with tumorigenesis. *Seikagaku*, 2008, 80(12): 1079 – 1093
- 8 杜彦艳, 刘鑫, 单保恩. Wnt/ β – catenin 信号转导通路 with 肿瘤关系的研究进展. *肿瘤*, 2009, 29(8): 803 – 806
- 9 Kikuchi A. Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. *Cancer Sci*, 2003, 94: 225 – 229
- 10 徐成波, 沈建箴, 沈松菲, 等. 恶性血液病细胞系分泌型卷曲相关蛋白基因启动子 CpG 岛甲基化状态的检测及意义. *中国实验血液学杂志*, 2009, 17(6): 1487 – 1491
- 11 Suzuki H, Watkins D N, Jair KW, *et al.* Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet*, 2004, 36: 417 – 422
- 12 Zou H, Molina JR, Harrington JJ, *et al.* Aberrant methylation of secreted frizzled – related protein genes in esophagea adenocarcinoma and Barrett's esophagus. *Int J Cancer*, 2005, 116(4): 584 – 591
- 13 Lee AY, He B, You L, *et al.* Expression of the secreted frizzled – related protein gene family is downregulated in human mesothelioma. *Oncogene*, 2004, 23: 6672 – 6676
- 14 Castro M, Grau L, Puerta P, *et al.* Multiplexed methylation profiles of tumor suppressor genes and clinical outcome in lung cancer. *J Transl Medm*, 2010, 17: 8;86
- 15 Nojima M, Suzuki H, Toyota M, *et al.* Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. *Oncogene*, 2007, 26: 4699 – 4713
- 16 Nomoto S, Kinoshita T, Kato K, *et al.* Hypermethylation of multiple genes as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer*, 2007, 97(9): 1260 – 1265
- 17 Urakami S, Shiina H, Enokida H, *et al.* Wnt antagonist family genes as biomarkers for diagnosis, staging, and prognosis of renal cell carcinoma using tumor and serum DNA. *Clin. Cancer Res*, 2006, 12(23): 6989 – 6997
- 18 Jürgen Veecky, Cordelia Geisler, Erik Noetzel, *et al.* Epigenetic inactivation of the secreted frizzled – related protein – 5 (SFRP5) gene in human breast cancer is associated with unfavorable prognosis. *Carcinogenesis*, 2008, 29(5): 991 – 998
- 19 Su HY, Lai HC, Lin YW, *et al.* Epigenetic silencing of SFRP5 is related to malignant phenotype and chemoresistance of ovarian cancer through Wnt signaling pathway. *Int J Cancer*, 2010, 127(3): 555 – 567
- 20 王馥丽, 靳国梁, 郭炜, 等. 贲门腺癌中分泌型卷曲相关蛋白 4、5 基因启动子区甲基化状态研究. *癌症 畸变 突变*, 2010, 22(1): 14 – 18
- 21 Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, *et al.* Proposals for the classification of the acute leukaemias. French – American – British (FAB) co – operative group. *Br J Haematol*, 1976, 33(4): 451 – 458
- 22 陈燕, 李新刚. 表观遗传修饰与白血病. *中国实验血液学研究*, 2006, 14(4): 635 – 638 (收稿: 2010 – 12 – 05)

高活力原代小鼠肝细胞的分离与纯化

王 燕 周露婷 章卫平 谢志芳

摘 要 目的 建立一种稳定的能获得高活力和高纯度原代小鼠肝细胞的分离和纯化方法。**方法** 对传统的两步原位胶原酶灌注法进行 4 个方面的优化, 主要包括选择逆向灌注、将持续灌注法改为间断灌注后夹闭门静脉法、严格控制胶原酶消化时间和将分离的肝细胞悬液进行低速 Percoll 单密度离心纯化。分离后的肝细胞进行体外培养。肝细胞活力和得率用台盼蓝染色法检测。**结果** 新鲜分离的小鼠原代肝细胞活力能稳定达到 $87\% \pm 3\%$, 平均活细胞总数为 8×10^5 每克小鼠体重, 绝大部分细胞在体外培养 2h 后贴壁生长。**结论** 优化后的肝细胞分离方法更为稳定、有效, 分离到的肝细胞具有高活力的优点。

关键词 小鼠肝细胞 分离 灌注 原代培养

Isolation of Primary Mouse Hepatocytes with High Viability. Wang Yan, Zhou Luting, Zhang Weiping, Xie Zhifang. College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract Objective To develop a consistent method for the isolation of primary mouse hepatocytes with high – viability. **Methods**

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30772478, 31025013)

作者单位: 200433 上海, 第二军医大学基础部病理生理学教研室 (王燕、周露婷、章卫平); 第二军医大学基础部细胞生物学教研室 (谢志芳)

通讯作者: 谢志芳, 电子信箱: xiezf@smmu.edu.cn

The conventional two – step collagenase perfusion technique was modified in the following 4 steps, including retrograde perfusion, intermittent perfution followed by occlusion of portal vein, optimization of enzymatic digestion, and purification using a low – speed, iso – density percoll centrifugation. Following isolation, the cells were maintained in a culture medium. The cell viability and yield were determined by trypan blue exclusion. **Results** The isolations using this method resulted in an average yield of 8×10^5 viable cells / gram body weight and the cell viability of $87\% \pm 3\%$. Most viable hepatocytes attached to plates within 2h. **Conclusion** The improved method is more consistent and efficient for isolating primary mouse hepatocytes with high – viability.

Key words Mouse hepatocytes; Isolation; Perfusion; Primary culture

肝脏是体内重要的物质代谢和解毒器官,肝细胞参与调控糖、脂肪和蛋白质的代谢、多种化合物的生物转化和解毒并具有合成和分泌血浆蛋白和胆汁的多种功能。体外分离和培养的肝细胞已被广泛应用于毒理学、病毒学、药理学以及其他相关领域的研究^[1, 2]。大鼠肝细胞的分离方法相对成熟,然而,随着大量转基因小鼠以及基因敲除小鼠的出现,迫切需要建立一种有效的分离小鼠肝细胞的方法^[3, 4]。目前的小鼠肝细胞分离方法基本参照大鼠的肝细胞分离法,最常用的是胶原酶门静脉两步灌流法^[5]。我们在实验中发现,应用该分离方法所获得的细胞活力非常不稳定,有的时候可高达 80%,有的时候则低于 60%。而在研究基因敲除小鼠模型时,需要同时分离同窝正常对照和基因敲除小鼠肝细胞,若每次分离到的肝细胞活力差异太大会给后续的实验结果带来严重干扰。为此,我们对常规的胶原酶两步灌流法进行一系列优化和改进,通过改变灌流方向、灌注方式、严格控制消化时间以及离心纯化等方法,成功建立了一种稳定的能获得高活力原代小鼠肝细胞的分离和纯化方法。

材料与方法

1. 动物:C57BL/6 小鼠从美国 Jackson 实验室引进,饲养在 SPF(specific pathogen free)级动物房内。取 3 ~ 4 个月龄小鼠,雌雄不限,体重 20 ~ 30g。

2. 小鼠原代肝细胞分离:溶液配置:溶液 I^[5]:含有 0.005% KCl,5mmol/L 葡萄糖,0.2mmol/L EDTA,15mmol/L HEPES 的 PBS(磷酸盐缓冲液),pH 7.4,用前预温至 42℃。每只小鼠需大约 50ml。溶液 II^[5]:在无 EDTA 的溶液 I 中加入 1mmol CaCl₂,pH 7.4。胶原酶溶液:在溶液 II 中加入 50U/ml 胶原酶 I(Worthington),新鲜配置,过滤除菌,预温至 42℃。每只小鼠需大约 25ml。分离方法:小鼠称体重,腹腔注射 4% 水合氯醛(8μl/g),麻醉后用 75% 乙醇消毒,在超净台内打开腹腔暴露肝脏和下腔静脉。吸取 50ml 预温(42℃)的溶液 I,将其安置在静脉输液泵上并与静脉输液管和静脉留置针(22G × 25mm)连接,排气后从下腔静脉穿刺插管并使针尖超过肾静脉入口,开始快速输注(速度为 5ml/min)后立即剪开门静脉,肝脏会在数秒钟之后变白。然后打开胸腔,用血管夹夹闭

胸腔内的下腔静脉,使得所有液体经由腹腔内的下腔静脉逆流至肝脏然后从门静脉流出,此后可以采用间断快速输注,即快速输注(11ml/min)使肝脏膨大,然后停止输注 5 ~ 10s,等待肝脏内的液体流出(肝脏塌陷)后再开始快速输注,溶液 I 输注的总时间为 5min。然后换上预温(42℃)的溶液 II(含胶原酶),同样采用间断快速输注,2min 后用血管夹夹闭门静脉,让肝脏膨胀至 1 ~ 1.5 倍时立即停止输注。若肝脏慢慢塌软,则应再次开始输注使其再次膨胀。胶原酶灌注时间根据小鼠体重严格控制(表 1),过短或过长都无法得到高活力的细胞。灌注结束后去除胆囊,切下肝脏,将其迅速转移至装有 25ml DMEM/10% 胎牛血清(4℃)的培养皿内,后续步骤均在冰上进行。用无菌镊子轻轻划破肝脏包膜,夹住肝蒂轻轻晃动,肝细胞就会像泥沙一样散落下来,避免过多的机械分离。最后用 100 目细胞筛过滤,得到肝细胞悬液。

表 1 根据小鼠体重选择胶原酶消化的最佳时间

体重(g)	胶原酶消化时间
18 ~ 20	5'
23	5'30"
25	5'45"
30	6'10"

3. 小鼠原代肝细胞纯化:所有离心均在 4℃ 进行。先将肝细胞悬液置于 50ml 离心管内,低速离心(50g,2min)。去上清后将肝细胞沉淀用 7ml 1 × DMEM 重悬并将其转移至 15ml 离心管中,加入 7ml 等渗的 Percoll 液(Phamacia,9 份 Percoll 原液加 1 份 10 × DMEM 配置而成),Percoll 最终浓度为 50%,比重为 1.067g/ml^[6]。离心(50g,10min),离心后离心管内物质被分成上中下 3 层,上下两层为细胞,中层为 Percoll 液。取上层和下层细胞分别做台盼蓝染色计算细胞活力和得率。弃去上层和中层后,将下层细胞用 14ml 1 × DMEM 重悬后离心(50g × 2min)。去上清,最后将肝细胞沉淀用 3ml 培养基重悬。

4. 小鼠原代肝细胞培养:培养基配方^[5]:Williams E 培养基(Invitrogen),添加 2mmol/L L – 谷氨酰胺、6.25μg/ml 转铁蛋白(Sigma)、1μmol/L 胰岛素(Sigma)、0.1μmol/L 地塞米松(Sigma)、15mmol/L HEPES、10% 胎牛血清(Hyclone)、1% 青链霉素(5000U/ml 青霉素,5000μmol/L 链霉素)和 50μg/ml 庆大霉素。将纯化后的肝细胞接种在 35mm 培养皿内(6 × 10⁵/35mm dish;培养基用前不预温),于 5% CO₂、37℃ 条件下

培养, 2h 后观察细胞贴壁情况, 用 PBS 洗两遍, 以进一步去除悬浮的死细胞, 然后重新加入培养基培养 48h。

5. 细胞活力测定: 取离心后沉淀制成细胞悬液, 加入等体积的 0.4% 台盼蓝染色 2min 后计数活细胞数和细胞总数。
细胞活力 = 活细胞数 / 细胞总数 $\times 100\%$

结 果

用改良的两步灌注法分离肝细胞, 经第一次低速离心后, 在倒置相差显微镜下可见到大量单个游离细胞, 还有少量小细胞团。经台盼蓝染色后, 死细胞被染成蓝色, 很容易与透明、立体感很强的活细胞相鉴别。细胞计数结果显示细胞活力能稳定地达到 $78\% \pm 4\%$, 平均活细胞总数为 8×10^5 每克体重 (图 1A)。

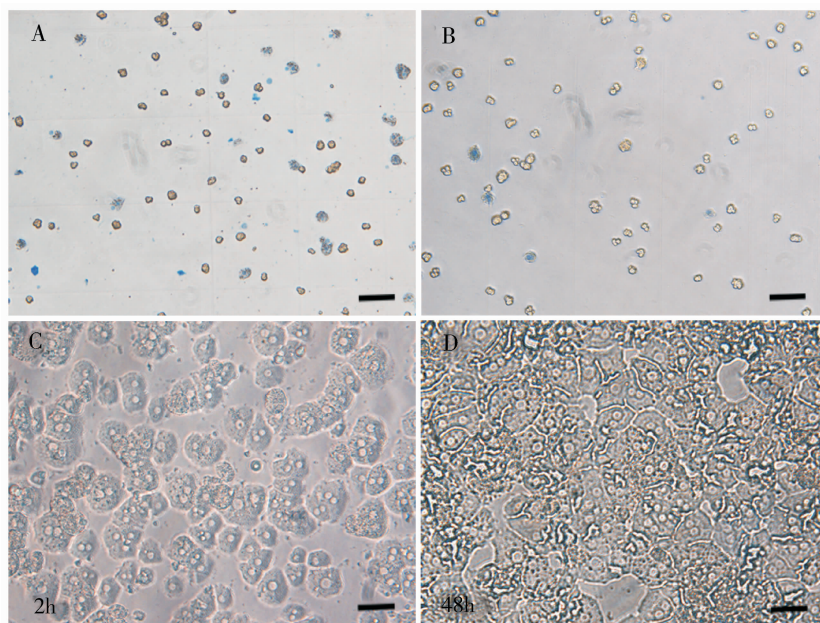


图 1 小鼠原代肝细胞的形态学观察

Percoll 纯化前 (A) 和纯化后 (B) 细胞的台盼蓝染色结果; 原代肝细胞培养 2 h (C) 和 48 h 后的形态。

标尺: $100\mu\text{m}$ (A 和 B); $200\mu\text{m}$ (C 和 D)

讨 论

本实验通过选择逆向灌注、间断灌注后夹闭、根据小鼠体重严格限制消化时间以及离心纯化等方法, 有效地提高了小鼠肝细胞分离方法的稳定性, 获得了高活力的原代小鼠肝细胞。逆向灌注的主要优点是下腔静脉比门静脉粗, 穿刺成功率高, 而且与正向灌注 (从门静脉插管, 液体流经肝脏后由下腔静脉流出) 相比, 肝细胞得率要高^[7]。传统的两步灌注法采用持续灌注法, 我们在实验中发现, 在胶原酶浓度、灌注温度等条件不变的情况下, 导致持续灌注法稳定性差的主要原因是难以找到最适灌注速度和压力^[5]。若灌注速度和压力不够, 胶原酶无法充满整个肝脏导

致消化不全; 反之, 流速太快、压力太大则会增加对肝细胞的机械性损伤, 以上这两种情况均会导致分离的肝细胞活力的低下。而最适灌注速度和压力会因小鼠大小不同而改变, 如: 体重较轻 ($< 23\text{g}$) 的小鼠的肝脏相应较小, 所需的灌注速度和压力较低, 而体重较大的小鼠需要更高的灌注速度和压力。另外, 灌注压力还受流出静脉开口的口径大小影响。因此, 为了提高分离方法的稳定性, 我们采取间断快速输注法, 使肝脏适度膨胀后立即停止输注, 这样肝脏无论大小, 都能保证胶原酶溶液充满整个肝组织, 确保了消化效果, 使得分离方法的稳定性提高。在此基础上, 在溶液 II 输注后阶段将门静脉夹闭则可节约至