

研究简报

鲢、鲤和鲫肝细胞原代培养

李效宇^{1,2} 刘永定¹ 宋立荣¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 河南师范大学生命科学院, 新乡 453002)

PRIMARY HEPATOCYTE CULTURE OF *HYPOTHALMICHTHYS MOLITRIX*, *CYPRINUS CARPIO* AND *CARASSIUS AURATUS*

LI Xiaoyu^{1,2}, LIU Yongding¹ and SONG Lirong¹

(1. Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;

2. Department of Biology, Henan Normal University, Xinxiang 453002)

关键词: 肝细胞培养; 鲢; 鲤; 鲫

Key words: Hepatocytes culture; *Hypothalmichthys molitrix*; *Cyprinus carpio*; *Carassius auratus*

中图分类号: S965.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2001)04-0420-02

微囊藻毒素(Microcystins)是一类淡水水体中危害很严重的生物毒素(Biotoxin),由微囊藻毒素所引发的环境问题及其对人类健康的危害正日益受到科学家的关注^[1]。已知微囊藻毒素作用的靶器官为肝脏,以往的研究多集中在微囊藻毒素对动物肝脏组织的损伤,如口服或腹腔注射毒素,引起肝组织结构破坏、肝出血甚至肝坏死,但用整体实验动物或器官研究微囊藻毒素毒理学较难深入,因此建立毒理学实验模型十分重要。肝脏作为动物体内最重要的解毒器官,是研究微囊藻毒素毒理学的主要对象。一般毒理学实验都采用肝脏原代培养细胞,因为原代培养细胞生理生化及遗传特性稳定,适于研究外界毒物的毒性、毒理及肝细胞对毒物的应答和解毒机理。本实验通过对鲢(*Hypothalmichthys molitrix* Carter et Valencienenes)、鲤(*Cyprinus carpio* Linnaeus)和鲫(*Carassius auratus* Linnaeus)肝脏原代细胞培养,以建立稳定的毒理学实验模型,为微囊藻毒素毒理学研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 实验用鲢、鲤和鲫由本所关桥养殖基地提供,2龄成鱼,体重1kg(鲫鱼为0.4kg)。

1.2 细胞培养 实验鱼暂养3d后,剪断鳃部脉弓,放血50min,鱼体表面清洗、消毒后,超净工作台内解剖取肝脏,D-Hanks液清洗,然后将其切成1~2mm³小块;D-Hanks液清洗后,用2倍(v/v)的0.25%胰蛋白酶液消化50min,温度25—28℃;100目滤网过滤,800r/min离心5min收集肝细胞,Hanks

收稿日期: 2000-04-06; 修订日期: 2000-04-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 39730380; 中国科学院重点项目 KZ952-S1-120

作者简介: 李效宇(1965—),男,河南省新蔡县人,主要从事藻类学研究。感谢张义兵、夏民博士在实验中所给予的帮助

液清洗 2 次, 培养基再悬浮, 计数细胞密度, 使其达到 $0.5 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。肝细胞在多孔培养板或培养瓶中培养, 采用 DMEM 或 199 培养基, 并补加 10% 的胎牛血清, $100 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 四环素, 培养温度 25℃, 密闭培养, 不补充 CO₂。

1.3 肝细胞活力测定 采用台盼蓝排斥方法测定细胞活力。

1.4 肝细胞形态及细胞核观察 用倒置显微镜定时观察肝细胞形态和生长状况并采用 Hoechst 33258 荧光染料(终浓度 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)染色以观察肝细胞核形态。

2 结果和讨论

2.1 三种鱼肝细胞原代培养和活力测定结果

用两种培养基(DMEM 和 199)均能获得生长良好的三种鱼肝细胞。显微镜观察可见: 肝细胞正常(图 1, 1), 细胞核完整、无固缩或碎裂现象(图 1, 2); 培养中还观察到一定数量的双核细胞(图 1, 3), 肝细胞能进行生长和细胞分裂并形成细胞团(图 1, 4)。

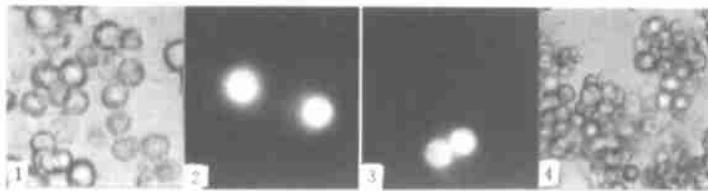


图 1 鲤肝细胞培养的显微观察

Fig. 1 Microscopic observation of hepatocyte culture (*C. carpio*)

1, 4 肝细胞形态和生长状况($300\times$); 2, 3 荧光染色所显示的肝细胞核($600\times$); 2, 3 Fluorescence Microscope observation at 350nm

所制备的肝细胞活力高(90%左右), 随着培养时间的延长, 肝细胞活力下降, 但可以满足毒理学实验的要求, 以鲤最理想。从活力统计结果看, 鲤肝细胞活力明显高于鲢和鲫, 这可能是种类不同的原因。

2.2 高活力原代肝细胞的获得方法

根据本实验结果, 获得高活力鱼肝细胞应注意以下方面: 首先实验用鱼应健康无病, 实验前未受到外界毒物刺激; 其次, 要注意消化液、消化温度和时间, 一般采用 0.25% 的胰蛋白酶液, 和肝组织的比例为 1:2 左右; 同时要注意新配制的酶液活力高、消化能力强; 消化温度不宜过高, 可采用温和消化, 温度为 25℃, 不要超过 28℃; 消化时间 40—60min。

2.3 杂细胞去除方法

在肝细胞培养中, 常混杂未去除干净的血细胞和脂肪细胞, 因此要尽可能除去杂细胞。在肝细胞的获取过程中应尽量将鱼体内血液排除, 同时解剖取肝脏后要清洗干净, 并采用低速离心方法去除混杂细胞。

参考文献:

- [1] 李效宇, 宋立荣, 刘永定. 微囊藻毒素的产生、检测和毒理学研究[J]. 水生生物学报, 1999, 23(5): 517—523

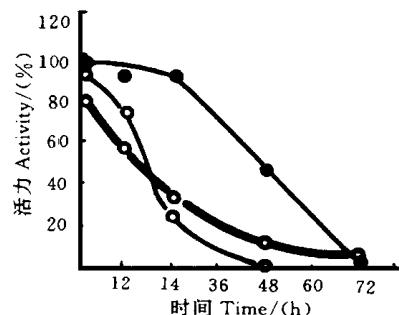


图 2 三种鱼肝细胞活力

Fig. 2 Viabilities of hepatocytes from three kinds of fishes

●— 鲤 *C. carpio* —■— 鲢 *H. molitrix*
—○— 鲫 *C. auratus*