

采用 Percoll 法分离、纯化鲫肝细胞

张高峰, 郭彤, 魏华, 马珂

(上海水产大学 生命科学与技术学院 教育部水产养殖重点实验室, 上海 200090)

摘要:以IV型胶原酶消化法分离鲫 (*Carassius auratus*) 肝细胞, 然后将其分成2组, 一组不再经过进一步处理 (即对照组); 另一组再用 Percoll 液密度梯度离心纯化肝细胞 (即实验组), 然后将2组细胞接种于 DMEM/F₁₂ 培养基中培养 10 d。在倒置显微镜下观察2组肝细胞的形态并绘制细胞生长曲线; 采用台盼蓝染色法比较2组肝细胞的存活率; 通过 HE 染色法在光镜下检测肝细胞的纯度; 采用 MTT 比色法测定2组肝细胞的增殖率; 收集肝细胞培养上清液检测白蛋白、尿素以及乳酸脱氢酶的水平以检测2组肝细胞功能。结果表明, 对照组鲫肝细胞存活率为 80.6%, 纯度为 83.2%; 实验组肝细胞存活率和纯度明显高于对照组 ($P < 0.05$), 分别为 94.2% 和 95.1%。实验中发现, 从开始接种到大部分肝细胞贴壁生长, 实验组比对照组肝细胞的增殖明显加快 ($P < 0.05$)。白蛋白分泌功能、尿素合成能力及乳酸脱氢酶检测结果表明, 实验组培养上清液中白蛋白分泌量、尿素合成能力明显高于对照组 ($P < 0.05$); 而乳酸脱氢酶含量明显低于对照组 ($P < 0.05$)。结论认为, 用 Percoll 梯度液分离纯化肝细胞, 可提高肝实质细胞纯度和活力, 适合体外原代培养。[中国水产科学, 2007, 14 (2): 208–214]

关键词: 鲫; 肝细胞; 分离; 纯化; Percoll 法

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005–8737–(2007)02–0208–07

体外分离培养肝细胞是生物人工肝、毒理学、药理学、生理学以及基因工程等的研究基础。良好的分离、纯化技术是获取高活性肝细胞的前提。肝细胞的分离始于 20 世纪 60 年代中期, Fry 等^[1]用机械和酶法相结合的技术首先从大鼠肝脏中分离得到肝细胞。Seglen^[2]进一步对其进行完善而发展成为沿用至今的两步胶原酶灌注技术法。机械法分离对肝细胞损伤较大, 而且细胞活力低; 而用胶原酶消化法所获得的肝细胞存活率和数量虽有增加, 但纯度不高, 尚不能满足临床和基础研究的需要。原代肝细胞分离及培养在大、小鼠、兔、猪等陆生动物^[3–6]中进行的较多, 对于鱼类肝细胞分离, 自 Birnbaum 等^[7]开始到目前主要是借鉴哺乳动物肝细胞的分离方法, 分离得到的肝细胞普遍存在活力差、纯度低等缺点^[8]。

近年来, 中国淡水鱼养殖业中鱼病频繁暴发, 成为制约水产养殖业发展的一大瓶颈, 而积极开展鱼类细胞培养来研究病毒等的致病机理迫在眉睫。建立并完善鱼类肝细胞培养模型, 其中包括对分离方法进行改进是各项研究的基础。

Percoll 为一种新型密度梯度离心剂, 由聚乙酰

胺吡咯烷酮的硅胶颗粒组成, 其颗粒大小不一, 离心后可形成一定的密度梯度, 不同密度的细胞分布于不同密度的层内, 借此可将肝实质细胞和杂细胞及细胞碎片分离。本实验以鲫 (*Carassius auratus*) 为研究对象, 在 IV 型胶原酶消化法的基础上再采用 Percoll 液密度梯度离心, 对肝细胞进行分离纯化。旨在获得高活力、高纯度的肝细胞, 为淡水鱼类细胞生物学、生理学研究提供大量高活力、高纯度的肝实质细胞, 并可作为鱼类病毒鉴定及毒理学研究的重要细胞培养模型^[9]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 实验用鲫购于上海市淀山湖渔业管理局, 幼鱼体长 10~15 cm, 体质量为 0.25~0.30 kg。

1.1.2 主要试剂及仪器 0.1% 胶原酶 IV, D-Hank's 液, Hank's 液, 胎牛血清, DMEM/F₁₂ 培养基、胰岛素均购于 Gibco 公司。青霉素、链霉素、Percoll 原液、台盼蓝、四甲基偶氮唑盐 (简称 MTT)

收稿日期: 2006–05–30; 修订日期: 2006–09–21.

基金项目: 上海市教委发展基金项目 (05–224); 上海市重点学科建设项目 (Y1101); 上海水产大学博士启动基金 (04–172).

作者简介: 张高峰 (1979–), 男, 硕士研究生, 主要从事水生生物生殖生理及细胞生物学方面的研究. E-mail: gzhzhang@stmail.shfu.edu.cn

通讯作者: 郭彤. E-mail: sxgtong@163.com

均购于美国 Sigma 公司。尿素氮 (BUN) 检测试剂盒、白蛋白 (ALB) 检测试剂盒、乳酸脱氢酶 (LDH) 检测试剂盒均购自南京建成生物工程有限公司。

3111 型 CO₂ 培养箱 (Heraeus, 德国), BIO-RAD 550 型酶标仪 (荷兰), CK-40F200 倒置显微镜 (OLYMPUS, 日本), SW-CJ-1F 型超净工作台 (苏州净化设备厂), 1600 型分光光度计 (岛津, 日本), 光学显微镜 (OLYMPUS, 日本), 血球计数板 (中国 上海), 24 孔、96 孔细胞培养板均购自 Corning 公司 (美国)。

1.2 方法

1.2.1 鲫肝细胞的分离 参照 Seglen 报道的胶原酶两步灌注法^[2]并稍加修改。购买回的鲫暂养 5~6 d 后, 剪断鳃部脉弓, 充分放血, 鱼体表面清洗并用 75% 酒精消毒 3~5 min。在超净工作台中剪开腹腔, 取肝脏于平皿中先用含 0.1% 胶原酶 IV 的无 Ca²⁺、Mg²⁺ 离子的 Hanks 液 (D-Hank's 液) 清洗 3~4 次, 再用 Hank's 液清洗 3~4 次, 然后剪成 1 mm³ 左右的小块; 用 5 倍体积 (V/V) 的 0.1% 胶原酶 IV 37 ℃ 消化 60 min, 终止消化后, 再用 100 目滤网过滤, 用新鲜的 DMEM/F₁₂ 培养液重悬细胞, 4 ℃, 500 r/min 离心 3 min, 重复 3 次, 收集肝细胞。最后用含 15% 胎牛血清、10 mg/L 胰岛素的 DMEM/F₁₂ 培养液悬浮细胞, 计数^[10]。再用 DMEM/F₁₂ 培养液调整细胞浓度为 1 × 10⁶ 个/mL。将得到的细胞悬液分为 2 组, 一组不再经过进一步处理 (即对照组), 另一组再用 Percoll 液密度梯度离心纯化。

1.2.2 Percoll 工作液的配制 Percoll 原液 90 mL 与 10 × PBS 10 mL 混合, 制成 pH 7.4, 渗透压为 335 mOsm (1 kPa = 38.78 mOsm) 的缓冲型 Percoll 液, 即为梯度分离液 I; 取 20 mL 分离液 I 与 30 mL 1 × PBS 混合, 在 4 ℃ 5 000 r/min 离心 3 min 即可获得密度为 1.05~1.06 g/mL, 渗透压为 295~315 mOsm 的梯度分离液 II^[11-12]。

1.2.3 鲫肝细胞的纯化 用吸管取 20 mL 肝细胞悬液悬浮于 50 mL 分离液 II 上, 在 4 ℃ 条件下 5 000 r/min 离心 3 min, 弃上清液 (内含非实质细胞、细胞碎片及受损实质细胞等)。重复 2 次, 取沉淀细胞。用 1 × PBS 洗涤, 4 ℃ 条件下, 500 r/min 离心 1 min, 重复 2 次, 取沉淀细胞^[11-12]。最后将细胞悬浮在含 15% 胎牛血清、10 mg/L 胰岛素、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 DMEM/F₁₂ 培养液中, 即得到分离较纯的肝细胞, 调整细胞悬液浓度为 1 × 10⁶ 个/mL, 作为实验组。

1.2.4 肝细胞的培养 将上述对照组肝细胞和实

验组肝细胞, 以密度为 1 × 10⁶ /mL 接种于 24 孔培养板中, 置于 27 ℃、无 CO₂ 培养箱中培养。最初 6 h 换液 1 次 (去除成纤维细胞), 后改为每 48 h 换液 1 次。

1.2.5 肝细胞形态观察及生长曲线绘制 将分离的肝细胞用含 15% 胎牛血清的 DMEM/F₁₂ 培养液悬浮, 经计数后接种于 24 孔培养板, 每孔接种密度为 1 × 10⁶ /mL。每隔 24 h 取出 6 孔细胞消化并用血球计数板计数, 共计数 10 d, 每隔 48 h 给未计数的细胞换液。以培养天数为横坐标, 细胞个数为纵坐标, 绘制生长曲线。在 Olympus 倒置显微镜下对用两种方法获得的原代培养的鲫肝细胞在第 1 天、第 3 天及第 7 天进行形态学观察并拍照。绘制肝细胞生长曲线^[13]。本实验一式两套培养板, 每板重复 3 孔。

1.2.6 鲫肝细胞活力和纯度的测定 采用台盼蓝染色法测定肝细胞的活力^[14]。将制备的新鲜肝细胞悬液调整密度为 1 × 10⁶ /mL, 取 9 滴细胞悬液滴入试管, 加入 1 滴 0.4% 台盼蓝染液, 混匀, 滴在计数板上。此时死细胞由于细胞膜被破坏, 细胞被染成紫蓝色, 而活细胞不被染色。1 min 内, 在显微镜下用血细胞计数板分别计数活细胞和死细胞的数量, 计算肝细胞存活率。用推片法分别将对照组和实验组细胞均匀涂在载玻片上, 用 4% 甲醛固定 15~20 min, 室温下让玻片自然晾干, HE 染色, 在光镜下分别计数肝细胞与肝非实质细胞, 计算肝细胞的纯度。

肝细胞存活率 (%) = 活细胞总数 / (活细胞总数 + 死细胞总数) × 100 %

肝细胞纯度 (%) = 肝细胞 / (肝细胞 + 非实质肝细胞) × 100 %

1.2.7 鲫肝细胞增殖能力的测定 采用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色法^[15]测定对照组和实验组肝细胞的增殖能力。将细胞 (5 × 10⁵ /孔) 培养于 96 孔组织培养板中, 每天取 16 孔, 吸出全部旧培养液, 再向每孔加 180 μL 新鲜培养液和 20 μL 5 mg/mL MTT 液, 继续培养 4 h。吸去培养液, 加入 200 μL 二甲基亚砷 (DMSO), 微型震荡器上振荡 10 min, 在 550 型自动酶标仪上波长为 490 nm 下测定吸光值。一式两套培养板, 每板重复 6 孔。

1.2.8 鲫肝细胞功能测定 在 24 孔细胞培养板中, 从培养第 1 天至第 8 天, 每天收集 6 孔细胞上清液, 连续收集 8 天, 分别采用相应试剂盒检测对照组和实验组肝细胞上清液中白蛋白、尿素及乳酸脱氢酶 (LDH) 的含量, 以 UI/L 表示。测定原理为以溴甲酚绿法测定白蛋白浓度, 以 Fearon 法测定尿素的浓度, 以丙酮酸二硝基苯胺法测定 LDH 浓度。具体方法均按说明书

的操作进行。一式两套培养板,每板重复6孔。

1.2.9 数据处理 用 SPSS(11.0) 软件进行数据处理,所有数据用 $\bar{X} \pm SD$ 表示。用 t 检验法进行实验组和对照组间的差异显著性分析。当 $P < 0.05$ 时,认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 肝细胞形态观察

在倒置显微镜下观察,可见新鲜分离的单个肝细胞呈圆形,透亮、有立体感,实验组肝细胞(图1a)比较纯,非实质细胞数量明显减少,而对照组肝细胞

中可见一定数量的非实质细胞,如细胞碎片、死细胞、血细胞、内皮细胞(图1b)。细胞培养2~3 h后开始贴壁,24 h后肝细胞变为典型上皮细胞样的多角形,胞体变平变薄,体积明显增大,细胞开始出现岛状连接。培养3 d后,实验组肝细胞紧紧贴附于培养板,岛状连接融合成片,增殖明显(图1c);而对照组肝细胞贴壁较慢,仅少数细胞间开始出现岛状连接,有非实质肝细胞生长(图1d),生长速度明显低于经 Percoll 液纯化的肝细胞。培养第7天实验组肝细胞集落生长(图1e),但对照组肝细胞开始出现细胞脱落现象(图1f)。

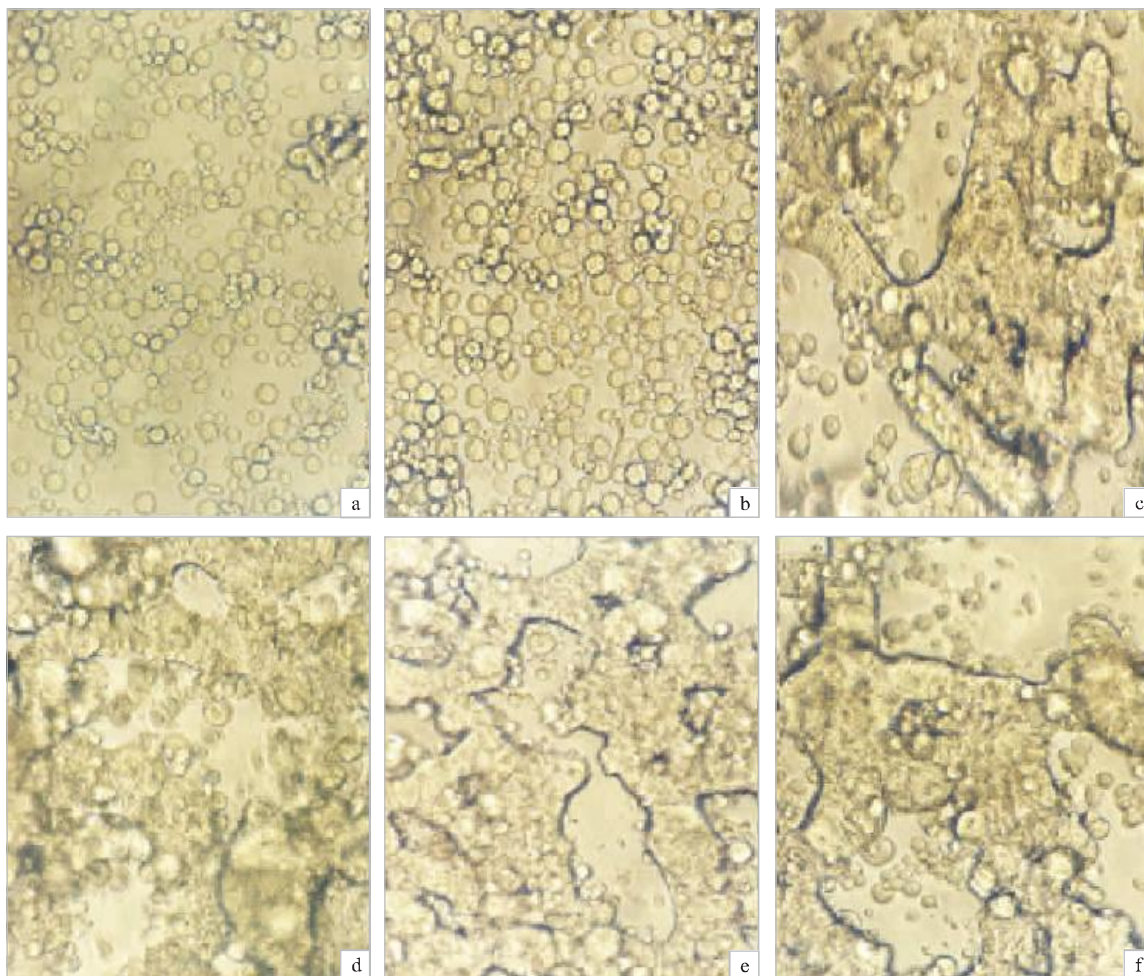


图1 在倒置显微镜下观察到的鲫鱼肝细胞形态

a: 刚分离的实验组肝细胞($\times 200$); b: 刚分离对照组肝细胞($\times 200$); c: 实验组生长3 d的肝细胞($\times 200$); d: 对照组生长3 d的肝细胞($\times 200$); e: 实验组生长7 d的肝细胞($\times 200$); f: 对照组生长7 d的肝细胞($\times 200$)。

Fig.1 Configuration of *Carassius auratus* hepatocytes under inverted microscope

a: Configuration of freshly isolated hepatocytes with percoll purified($\times 200$); b: Configuration of freshly isolated hepatocytes without percoll purified($\times 200$); c: Configuration of hepatocytes on the third day with Percoll purified($\times 200$); d: Configuration of hepatocytes on the third day without Percoll purified($\times 200$); e: Configuration of hepatocytes on the seventh day with Percoll purified($\times 200$); f: Configuration of hepatocytes on the seventh day without Percoll purified($\times 200$).

2.2 鲫鱼肝细胞的生长曲线

分别对对照组和实验组原代鲫鱼肝细胞的生长进行了检测,结果见图2。从图2可以看出,实验组肝细胞在第3天生长速度明显加快,细胞数量明显增加。第4天细胞生长达高峰,细胞数量达 2.88×10^6 个/mL,细胞数量长时间维持在这一水平,直到第9天

后细胞数量开始下降,进入衰亡期。而对照组细胞生长较为缓慢,第5天细胞生长才达高峰,细胞数量也只有 2.36×10^6 个/mL,且随时间的延长细胞数量很快减少。可见,实验组得到的细胞数量远远高于对照组 ($P < 0.05$),且生长速率也比同期的对照组细胞快。

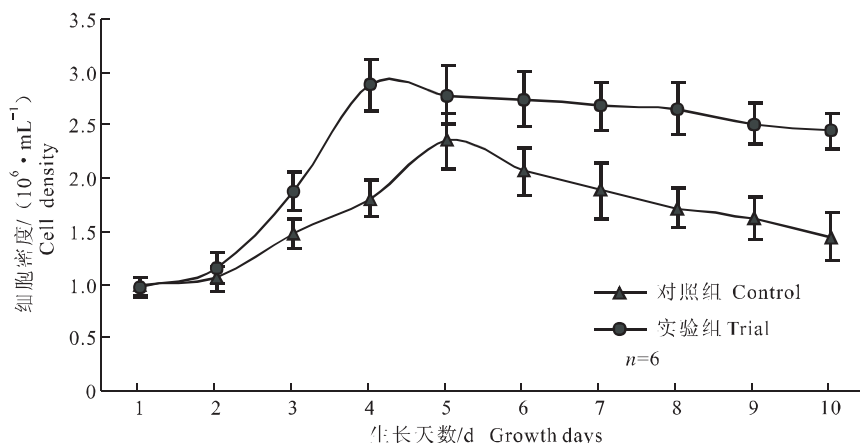


图2 不同分离方法得到的鲫鱼肝细胞的生长曲线图

Fig.2 Growth curve of *Carassius auratus* hepatocytes separated by different isolation methods

2.3 不同分离方法对鲫鱼肝细胞存活率和纯度的影响

光镜下可见新鲜分离的肝细胞呈单个分布,形状为圆形、椭圆形或多边形,细胞轮廓清晰,细胞膜完整。HE染色后可见胞浆呈淡红色,细胞核呈蓝色,清晰可见,也可见部分双核肝细胞。非肝细胞不具有上述特性,由此可计算出肝实质细胞的纯度。

不同分离方法对鲫鱼肝细胞存活率和纯度的影响见表1。从表1可以看出,实验组肝细胞存活率达94.2%,显著高于对照组的80.6% ($P < 0.05$);肝细胞的纯度为95.1%,也显著高于对照组的83.2% ($P < 0.05$)。可见,经Percoll法分离得到的肝细胞存活率和纯度均优于胶原酶法。

表1 不同分离方法对鲫鱼肝细胞存活率和纯度的影响

Tab.1 Effects of different isolation methods on viability and purity of *Carassius auratus* hepatocytes

$n = 6; \bar{X} \pm SD; \%$

指标 Parameter	对照组 Control	实验组 Trial
存活率/% Viability	80.6 ± 6.8	94.2 ± 2.2 *
纯度/% Purity	83.2 ± 4.8	95.1 ± 3.6 *

注: *表示与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: * means significant difference compared with control ($P < 0.05$).

2.4 不同分离方法对鲫鱼肝细胞增殖的影响

不同分离方法对鲫鱼肝细胞增殖的影响见表2。从表2可看出,实验组肝细胞培养1d后,OD值增加到0.201;培养3d后OD值达最高,为0.373,5d后肝细胞增殖率逐渐缓慢降低。而对照组肝细胞培养1d后OD值为0.176;培养4d后增殖数量达最

高,仅为0.310;6d后细胞数量明显降低。在整个检测期内,对照组的肝细胞增殖速度很缓慢,而实验组肝细胞增殖速度很快,差异均为显著 ($P < 0.05$)。说明经Percoll液密度梯度离心得到的肝细胞数量明显增多。

表2 不同分离方法对鲫肝细胞增殖的影响

Tab.2 Effects of different isolation methods on proliferation of hepatocytes in number $n=6; \bar{X} \pm SD$

组别 Treatment	时间 /d Time							
	1	2	3	4	5	6	7	8
对照组 Control	0.176 ± 0.006	0.185 ± 0.006	0.232 ± 0.013	0.310 ± 0.027	0.302 ± 0.026	0.282 ± 0.029	0.246 ± 0.015	0.234 ± 0.013
实验组 Trial	0.201 ± 0.017*	0.223 ± 0.008*	0.373 ± 0.016*	0.370 ± 0.005*	0.364 ± 0.013*	0.354 ± 0.0241*	0.352 ± 0.012*	0.351 ± 0.013*

注: * 表示与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$).

Note: * means significant difference ($P < 0.05$) compared with control.

2.5 不同分离方法对肝细胞尿素合成及白蛋白分泌功能的影响

白蛋白和尿素检测结果见图3、图4。与对照组相比,实验组肝细胞白蛋白分泌量和尿素合成量在整个培养期内均明显高于对照组 ($P < 0.05$)。实验

组肝细胞白蛋白的分泌量及尿素合成量分别在培养到第3天和第4天达峰值,随后又逐渐缓慢下降,最后达某一稳定的数值。但对照组肝细胞白蛋白的分泌及尿素合成的量却随时间延长迅速降低。

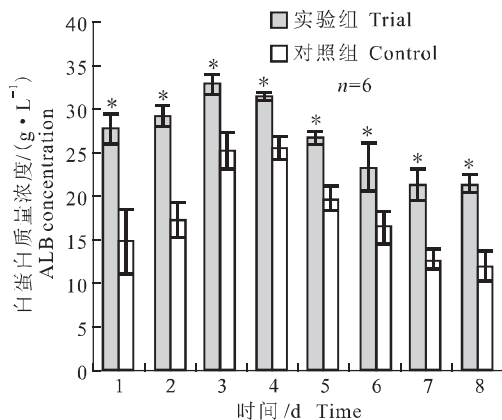


图3 对照组及实验组鲫肝细胞在8d培养期间上清中白蛋白的质量浓度

注: * 表示与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$).

Fig.3 ALB concentration in the supernatant of purified and unpurified hepatocytes during 8 days culture

Note: * donates significant difference compared with control ($P < 0.05$).

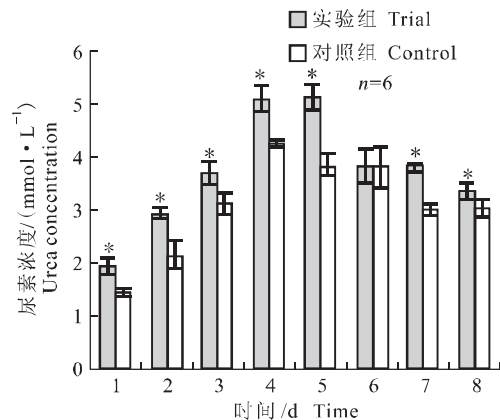


图4 对照组及实验组鲫肝细胞在8d培养期间上清中尿素的浓度

注: * 表示与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$).

Fig.4 Urea concentration in the supernatant of purified and unpurified hepatocytes during 8 days culture

Note: * donates significant difference compared with control ($P < 0.05$).

2.6 不同分离方法对鲫肝细胞LDH浓度的影响

鲫肝细胞LDH的检测结果如图5所示。在培养上清液中前3d测得2组肝细胞LDH的浓度均很高,尤其是对照组远远高于实验组 ($P < 0.05$);3天后迅速下降并保持较低的水平;而实验组LDH释放量明显低于对照组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

目前,鱼类肝细胞分离与培养主要应用在基础生物学和环境毒理学等方面^[9]。尽管肝细胞体外培养已开展了多年,但是由于肝细胞是一种很难培养的细胞,其分离和培养的条件要求很高,因此培养难度依然很大。经典的Seglen两步胶原酶灌注法分离肝细胞,主要应用于哺乳动物^[16]和门静脉较发

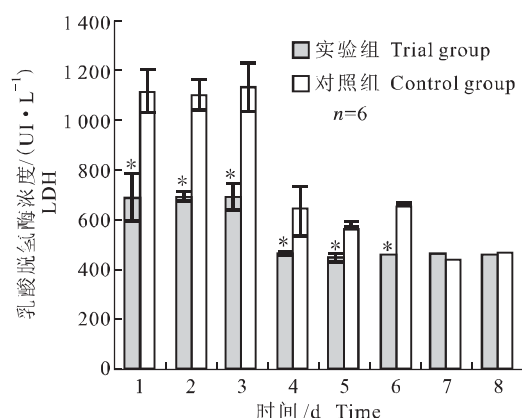


图5 对照组及实验组鲫肝细胞在8 d培养期间上清液中LDH的浓度

注: *表示与对照组相比差异显著($P < 0.05$)。

Fig.5 LDH concentration in the supernatant of purified and unpurified hepatocytes during 8 days culture

Note: * donates significant differences compared with control ($P < 0.05$).

达的鱼类^[17]如鲑科鱼类等,但纯度仍不能满足临床要求。

本实验在 Seglen 两步胶原酶灌注法基础上对肝细胞的分离方法做了进一步改进。即在胶原酶消化处理后,进一步采用 Percoll 液密度梯度离心的方法分离纯化肝细胞。研究表明,经过 Percoll 梯度离心后可使肝细胞的存活率达 94.2%,纯度达 95.1%;而不经 Percoll 液进一步纯化处理(对照组)得到的肝细胞的存活率仅为 80.6%,纯度仅为 83.2%。从开始接种到大部分肝细胞贴壁生长,实验组比对照组肝细胞的增殖速率明显加快,这是因为所配 Percoll 梯度液的密度为 1.05~1.06 g/mL,而富含活力的肝实质细胞的密度在 1.05~1.06 g/mL,肝非实质细胞、肝细胞碎片及受损肝细胞的密度均在 1.04 g/mL 以下^[12,18]。所以,通过 Percoll 梯度液纯化分离的肝细胞,可进一步提高肝实质细胞的活力与纯度,使增殖速率明显加快,细胞数量增多。

鉴于原代培养的硬骨鱼肝细胞在体外培养 5 d 内各种生理活性和体内一致^[8-9],本实验检测了 8 d 内白蛋白分泌和尿素合成这两个重要的有代表性的肝细胞功能的指标^[19]。研究表明,在整个培养期内,实验组肝细胞分泌白蛋白和尿素合成能力均显著高于对照组($P < 0.05$)。前 4 天白蛋白和尿素合

成能力较高,但 4 d 后,随时间延长白蛋白和尿素合成能力又减弱并稳定在一定的数值上。这可能与细胞长满板底后,由于接触抑制原理^[20]抑制了肝细胞的有丝分裂,因而使其功能维持在一定的状态。

因此 LDH 漏出量是评价肝细胞受损的敏感指标^[21]。由实验结果可知,实验组肝细胞 LDH 漏出量明显低于对照组。这是由于对照组肝细胞纯度低,含有较多杂细胞、受损细胞和细胞碎片,阻碍了肝实质细胞之间的连接和聚集,又由于大量受损细胞死亡时所产生的乳酸脱氢酶和内毒素等有害物质破坏了肝细胞生长微环境,从而使细胞膜通透性增大,导致 LDH 漏出量增加。

4 结论

通过 Percoll 梯度液纯化 IV 型胶原酶消化法分离的肝细胞,可显著提高肝实质细胞的存活率、活力与纯度,且肝细胞白蛋白的分泌功能、尿素合成能力均显著增加;而乳酸脱氢酶含量显著低于对照组,效果明显优于胶原酶 IV 消化法。从而为环境毒理学、药理学、生理学的研究提供了模式细胞。

参考文献:

- [1] Fry J. Preparation of mammalian hepatocytes [J]. Meth Enzymol, 1981, 77: 130-139.
- [2] Seglen P O. Preparation of isolated rat liver cells [J]. Meth Cell Biol Res, 1976, 13: 29-38.
- [3] 那广水,于洪儒,王洪新,等.一种小鼠原代肝细胞培养方法[J].锦州医学院报,1997,15(3):136-140.
- [4] 张明森,李素芝,高原家兔肝细胞体外培养气相条件初探[J].第三军医大学学报,2004,26(3):1791-1792.
- [5] 滕光菊,白雪帆,徐哲,等.大鼠原代肝细胞的形态和功能[J].第四军医大学学报,2003,24(11):127-131.
- [6] Koebe H G, Muhling B I, Deghmann C J, et al. Cryopreserved porcine hepatocyte cultures [J]. Chemico-Biological Interactions, 2004, 121: 99-115.
- [7] Birnbaum M J, Schultz J, Fain J N. Hormone stimulated glycogenesis in isolated goldfish hepatocytes [J]. Am J Physiol, 1976, 231: 191-197.
- [8] Segner H. Isolation and primary culture of teleost hepatocytes [J]. Comp Biochem Physiol, 1998, 120: 71-81.
- [9] Pesonen M, Tommy B. Fish Primary hepatocyte culture: an important model for xenobiotic metabolism and toxicity studies [J]. Aquatic Toxicol, 1997, (37): 253-267.
- [10] Sanderson I R, He Y. Nucleotide uptake and metabolism by intestinal epithelial cells [J]. J Nutr, 1994, 124: S131.
- [11] 徐勇,涂植光,康格非.简化 Percoll 密度梯度离心法快速纯化

- 肝实质细胞[J]. 重庆医科大学学报, 1999, 24(2): 178-179.
- [12] Mommsen T P. Metabolic and enzymatic heterogeneity in the liver of the ureogenic teleost *Opsanus beta* [J]. J Exp Biol, 1991, 156: 407-418.
- [13] 薛庆善. 体外培养的原理与技术 [M]. 科学出版社, 2003: 339.
- [14] Wadstrom T. Adherence traits and mechanisms of microbial adhesion in the gut [J]. Bailliers Clinical Tropical Medicine and Communicable Disease, 1988, 3: 417-433.
- [15] 杨景山. 医学细胞化学与细胞生物学技术 [M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1990: 118-121.
- [16] 徐哲, 白雪帆, 滕光菊, 等. 大鼠肝细胞分离、原代培养及生物学特性研究[J]. 医学研究生学报, 2003, 16(5): 342-344.
- [17] Dunn J C Y, Tompkins R G, Hamada E. Use of primary culture of salmon hepatocytes for the study of hormonal regulation of insulin-like growth factor expression in vitro [J]. Zool Sci, 1993, 10: 473-480.
- [18] Blair J B, Ostrander G K, Miller M R, et al. Isolation and characterization of biliary epithelial cells from rainbow trout liver [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1995, 31(10): 780-789.
- [19] T Xu, S Li, Y Yu. Preparation and culture of hepatocyte on gelatin microcarriers [J]. J Biomed Mater Res, 2003, 65A: 307-311.
- [20] Hoftman A L, Rosen H R, Ljubonova J U, et al. Hepatic regeneration: current concepts and clinical implication [J]. Semin Liver Dis, 1994, 14(2): 190-198.
- [21] William L, Seddon C L P. Non-enzymatic isolation and culture of channel catfish hepatocytes [J]. Comp Biochem Physiol, 1999, 123: 9-15.

Isolation and purification of *Carassius auratus* hepatocytes by the method of Percoll

ZHANG Gao-feng, GUO Tong, WEI Hua, MA Ke

(Key Laboratory of Aquaculture, the Ministry of Education, College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: A prerequisite study on teleost hepatocytes is a reliable method for hepatocytes isolation from blood and other non-parenchyma cells to obtain highly purified cell populations that are functionally active. Since current techniques of hepatocytes isolation fall short of these requirements, we have developed a new and more effective technique for isolation of *Carassius auratus* hepatocytes by using of Percoll (Polyvinylpyrrolidone coated silica particles) density gradient isolation methods. To evaluate the method of obtaining vigorous and purified hepatocytes, firstly hepatocytes were harvested by collagenase IV, then divided into two treatments: collagenase IV treatment group as a control, and Percoll grade centrifugation treatment hepatocytes after collagenase IV as a test group. The cellular morphologies were examined by inversion microscope and protracted growth curve. Viability of cells was determined using standard trypan blue exclusion, and purity of cells was examined using HE dye; proliferation of hepatocytes was tested by MTT assay. Function of hepatocytes was examined using albumin (ALB), urea and lactic acid dehydrogenase (LDH) test kits, respectively. The results showed that viability of *Carassius auratus* hepatocytes was 80.6% and purity was 83.2% using collagenase IV. After Percoll grade centrifugation purification, the viability and purity increased ($P < 0.05$) compared with control, which were 94.2% and 95.1%, respectively. And non-parenchyma cells were hardly seen under phase contract microscope. The time from inoculation to attachment was shortened in purified hepatocytes and proliferation increased ($P < 0.05$) compared with control. ALB and urea examined results showed that ALB and urea levels in the supernatant of the cultures increased ($P < 0.05$) compared with control. LDH concentration of purified hepatocytes decreased ($P < 0.05$) compared with control. The conclusion is that the viability, purity and function of hepatocytes can be enhanced by Percoll grade centrifugation. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(2): 208-214]

Key words: *Carassius auratus*; hepatocytes; isolation; purified; Percoll

Corresponding author: GUO Tong. E-mail: sxgtong@163.com