

文章编号: 1000-0615(2016)04-0558-08

DOI: 10.11964/jfc.20150309796

斜带石斑鱼肝细胞分离及原代培养方法的建立

骆源, 张春晓, 王玲, 张冬玲, 霍振华, 宋凯*

(集美大学水产学院, 厦门市饲料检测与安全评价重点实验室, 福建 厦门 361021)

摘要: 本研究以斜带石斑鱼肝细胞为实验对象, 在不同培养条件下进行原代培养, 旨在探讨稳定可靠的斜带石斑鱼肝细胞分离及原代培养方法。采用组织块分离法和胰蛋白酶(含EDTA)消化法分离肝细胞, 并通过密度梯度离心法分离纯化肝细胞, 细胞悬液于DMEM/F-12、M199和L-15培养液中培养; 细胞活力及数量采用血球计数板计数, 并通过MTT法测定细胞增殖率; 同时, 测定不同时间培养上清液中乳酸脱氢酶(LDH)活性、白蛋白(ALB)和尿素氮(BUN)的含量, 以分析肝细胞生长状态。结果表明, 组织块方法不适于斜带石斑鱼肝细胞的培养, 未见细胞从组织块中迁出, 而胰蛋白酶消化法获得良好稳定的培养效果, 细胞产量达到 1.6×10^8 个/g肝重, 活细胞数达到95%; L-15培养基细胞生长明显优于DMEM/F-12和M199培养基; 启动原代培养的48~72 h阶段肝细胞生长代谢旺盛, 培养上清液中LDH活性显著降低, ALB和BUN含量显著升高。结果显示, 0.25%的胰蛋白酶常温消化法适合斜带石斑鱼肝细胞的分离, 斜带石斑鱼肝细胞原代培养的最适培养基为L-15培养基, 肝细胞在启动原代培养的48~72 h生长代谢旺盛。

关键词: 斜带石斑鱼; 肝细胞; 原代培养; 细胞增殖率; 肝细胞功能

中图分类号: Q 813.1⁺1; S 917.4

文献标志码: A

肝脏是机体新陈代谢的重要器官, 在维持机体内环境稳态过程中发挥重要作用^[1], 肝脏为适应环境变化不断调整肝细胞的结构和功能。研究表明, 肝细胞能够表达绝大部分肝脏的功能^[2]。因此, 国内外研究者多采用体外培养的肝细胞代替活体动物来研究某些物质的毒理作用或代谢途径等。原代肝细胞较好地保留和维持活体肝细胞的完整形态及代谢活性, 能够很好地反映体内的代谢状态^[1, 3]。原代肝细胞模型具有可减少实验动物数量、操作简便、可重复性高、减少体内复杂因素影响等优点^[4], 已经成为一种快速、经济、高效的筛选测试手段, 是毒理学、药理学与细胞生物化学等研究领域常用的工具^[5-6]。

鱼类肝细胞分离培养始于Birnbaum等^[7]对激素刺激金鱼(*Carassius auratus*)离体肝细胞肝糖原

分解的研究。随鱼类肝细胞分离及培养方法的成熟, 其已成为研究鱼类肝细胞功能的重要工具。目前, 国内外主要用虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[8]、斑点鲷(*Ameiurus nebulosus*)^[9]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[10]和草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[11]等肝细胞进行物质代谢等相关研究。斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)是一种高档海水养殖鱼类, 近年来养殖规模不断扩大, 对其肝脏功能及物质代谢的研究就显得尤为重要。体外肝细胞分离和原代培养是研究肝细胞功能的有效方法, 但应用在斜带石斑鱼肝脏物质代谢上的研究报道相对较少。因此, 本研究选用DMEM/F-12、M199与L-15三种培养基, 采用胰蛋白酶消化法和非酶消化法, 选用MTT法测定肝细胞增殖率以及测定培养上清液中肝细胞功能相关指标, 旨在建立稳定可靠的斜带石斑鱼肝细胞分离及原

收稿日期: 2015-03-28 修回日期: 2015-10-27

资助项目: 国家自然科学基金(31302198)

通信作者: 宋凯, E-mail:songkai@jmu.edu.cn.

代培养方法,探讨斜带石斑鱼肝细胞在原代培养过程中最佳功能状态,为斜带石斑鱼肝细胞功能、肝细胞物质代谢等方面的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康斜带石斑鱼,体质量约50 g,集美大学海水养殖实验场提供。

1.2 主要试剂

0.25%胰蛋白酶、M199、L-15、DMEM/F-12培养基、D-Hanks液、PBS、青霉素(10 000 IU/mL)、链霉素(10 000 $\mu\text{g/mL}$)、两性霉素B、胰岛素、胎牛血清,均购于Gibco公司,美国;台盼蓝、二甲基亚砷(DMSO),均购于上海捷瑞生物工程有限公司;MTT细胞增殖率测定试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)测试盒、尿素氮(BUN)测试盒、白蛋白(ALB)测试盒,均购于南京建成生物工程研究所。

1.3 肝细胞原代培养方法

非酶消化法 斜带石斑鱼在含有1000 IU/mL青霉素和1000 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的海水中暂养24 h后,用75%乙醇体表消毒,剪断鳃弓放血,通过无菌手术取出肝脏组织并浸泡于预冷D-Hanks液(含400 IU/mL青霉素、400 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素和25 $\mu\text{g/mL}$ 两性霉素B),反复用预冷D-Hanks液漂洗组织块3次,然后用锋利的刀片将组织块切成约1 mm^3 左右的碎块,再用预冷D-Hanks液充分漂洗,吸去D-Hanks液,将组织块接种于25 cm^2 培养瓶中,培养瓶倒置,于25 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱中干贴24 h,小心翻转培养瓶,加入4 mL新鲜原代生长培养液(含20% FBS,10 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素,200 IU/mL青霉素、200 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素),每2~3天换液1次。

胰蛋白酶消化法 胰蛋白酶消化法分离肝细胞在Segner等^[12]、Lai等^[13]和Qin等^[14]方法的基础上进行改良。取材操作方法同非酶消化法,待组织块切碎至约1 mm^3 大小后加入0.25%胰蛋白酶室温消化30 min,加入5 mL新鲜生长培养基终止胰蛋白酶消化,消化后的细胞悬液用100目灭菌滤网过滤,100 $\times\text{g}$ 离心2 min,50 $\times\text{g}$ 离心5 min,

重复2次,弃去上清液,用原代培养生长液重悬,调整密度后接种于25 cm^2 培养瓶中,置于25 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱中启动原代培养。

1.4 肝细胞活力测定

细胞悬液与0.5%台盼蓝染液按1:1体积比混合,1~2 min后于血球计数板上计数,活细胞呈透明卵圆形,死细胞被染成蓝色,用活细胞占计数细胞中的百分比表示细胞活力(%)。

1.5 斜带石斑鱼肝细胞最佳培养基的确定

检测3种不同的培养基维持细胞生长的能力:DMEM/F-12、M199和L-15培养基。每种培养基中均补充20%的胎牛血清、200 IU/mL青霉素、200 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素、25 $\mu\text{g/mL}$ 两性霉素B以及10 $\mu\text{g/mL}$ 的胰岛素。分别将大约 1.5×10^5 个细胞接种到3种培养基中,于25 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱中培养120 h,于培养后24、48、72、96及120 h用血球计数板进行细胞计数,绘制细胞在不同培养基条件下的生长曲线。

1.6 肝细胞增殖率鉴定

采用MTT四唑蓝比色法测定肝细胞的增殖能力^[15]。采用96孔细胞培养板,每孔接种细胞悬液100 μL ,接种浓度在 2×10^5 个/mL,取10个平行孔,每隔24 h换液100 μL ,加入50 μL 1 \times MTT溶液,继续培养4 h;小心吸出上清液,每孔加入150 μL DMSO,轻轻吹打至结晶完全溶解,于570 nm波长下测定吸光值。详细测定方法参照南京建成生物工程研究所MTT细胞增殖检测试剂盒说明书。

1.7 斜带石斑鱼肝细胞功能测定

收集24、48、72、96和120 h细胞培养基上清液,每个时间点取6个平行,用于测定LDH活性以及ALB和BUN水平。ALB测定采用溴甲酚绿比色法^[16],BUN采用脲酶法^[17],LDH测定采用丙酮酸二硝基苯胺法^[18],测定方法参照南京建成生物工程研究所研制的试剂盒说明书。

1.8 数据处理

实验数据用平均值 \pm 标准误(mean \pm SE)表示。采用SPSS 19.0软件进行数据统计和分析,先对数据进行方差齐性检验,如满足方差齐性条件则对数据进行单因素方差分析(One-Way

ANOVA), 若组间存在显著性差异, 则再采用Duncan氏法进行多重比较检验组间差异显著性, 以 $P<0.05$ 表示差异性显著。

2 结果

2.1 分离与纯化方法对斜带石斑鱼肝细胞数量和活力的影响

采用非酶消化培养法启动斜带石斑鱼肝细胞原代培养时, 培养24 h后, 倒置显微镜观察, 组织块边缘没有细胞迁出; 48 h时组织块边缘模糊, 没有呈现细胞迁出状况(图1-b); 直到培养120 h均没有明显的细胞迁出(图1-e)。用0.25%胰蛋白酶常温消化法可以获得大量单细胞, 细胞产量达到 1.6×10^8 个/g肝重, 经台盼蓝染色, 活细胞数 $\geq 95\%$, 新鲜分离的肝细胞呈卵圆形, 培养24 h后, 开始贴壁形状呈扁平状, 体积开始变大; 培养48 h后, 细胞贴壁数量增加, 部分细胞边缘出现伪足, 使肝细胞贴壁更牢固(图1-b); 培养72 h后, 贴壁的细胞大面积汇合成片, 此时的细胞形态呈上皮样细胞和成纤维样细胞, 并以后者为主(图1-c)。

2.2 不同培养基对斜带石斑鱼肝细胞原代培养的影响

为筛选斜带石斑鱼肝细胞体外培养的最佳条件, 比较分析了DMEM/F-12、M199和L-15三种培养基在25 °C时对原代培养肝细胞贴壁和生长的影响。肝细胞在L-15培养基的整个过程中数量都显著高于同时期的其他2种培养基($P<0.05$); 在培养的第192 h肝细胞长满细胞培养瓶底; DMEM/F-12、M199培养基在培养的0~72 h, 细胞几乎不生长, 培养96 h后, 细胞生长速率显著低于L-15培养基($P<0.05$)(图2)。

2.3 MTT法测定不同培养时间斜带石斑鱼肝细胞增殖率的变化

570 nm处吸光度总体上呈现先升高后降低并趋于稳定的趋势, 24~72 h吸光度显著增加($P<0.05$), 在72 h达到峰值后显著下降($P<0.05$), 96~120 h阶段吸光度趋于稳定($P>0.05$)(图3)。

2.4 不同培养时间斜带石斑鱼肝细胞培养上清液中LDH活性、ALB含量和BUN含量的变化

斜带石斑鱼肝细胞培养上清液中LDH活性随着培养时间的延长, 呈现先降低后升高的趋

势, 在72 h活性最低, 显著低于其他各时间点乳酸脱氢酶的活性($P<0.05$), 在24和48 h显著高于96和120 h乳酸脱氢酶活性($P<0.05$)(图4)。肝细胞培养上清液中ALB含量呈现先升高后降低的趋势, 并在72 h达到峰值, 且显著高于其他各时间点($P<0.05$)(图5)。BUN与ALB呈现相似的变化趋势, 即先升高后降低, 在72 h达到最大值, 且显著高于其他各时间点($P<0.05$), 在96和120 h尿素氮含量保持稳定, 均无显著性差异($P>0.05$)(图6)。

3 讨论

3.1 斜带石斑鱼肝细胞分离、培养及纯化

自Wolf等^[19]建立虹鳟生殖腺细胞系RTG-2之后, 鱼类细胞培养研究进展十分迅速; 同时鱼类肝细胞培养技术也得到快速发展, 主要集中在淡水鱼类和溯河洄游性鱼类, 但斜带石斑鱼等海水鱼类肝细胞培养的研究相对较少。本研究分别采用组织块法和胰蛋白酶消化法进行分离、培养肝细胞, 结果表明采用含EDTA的0.25%胰蛋白酶常温消化法分离斜带石斑鱼肝细胞, 产量、活力和纯度均较高, 培养24 h后肝细胞贴壁生长良好; 而组织块法, 肝细胞短期内不能够有效地迁出, 不利于肝细胞的分离培养, 这可能是因为采用组织块培养时主要依靠细胞自身的迁出能力, 肝脏的组织结构特点限制了肝细胞的迁出, 而胰蛋白酶消化法可以打破细胞之间的连接物质, EDTA可以螯合细胞间质中的 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} , 从而破坏细胞间的连接, 有利于细胞分散, 易于细胞吸收养分, 排出代谢产物, 促进其贴壁生长。清除杂质获得高纯度的肝细胞是肝细胞原代培养成功的关键, 研究表明胰蛋白酶消化分离的肝细胞悬液中含有多种类型的细胞, 包括肝细胞、胆管细胞、巨噬细胞等, 同时肝脏内部分布有大量的血管^[20], 细胞悬液中不可避免地混有一些血细胞, 同时还存在细胞碎片等杂质, 这些杂细胞和杂质的存在对肝细胞的贴壁及生长均有一定的影响。显微镜下观察肝细胞的体积比血细胞和细胞碎片大, 采用密度梯度离心的方法可以有效地去除杂质, 本实验通过低转速离心, 获得了纯度较高的肝细胞, 这与Ferraris等^[21]和Råbergh等^[22]分别通过120×g、50×g离心纯化虹鳟肝细胞, Khan等^[23]

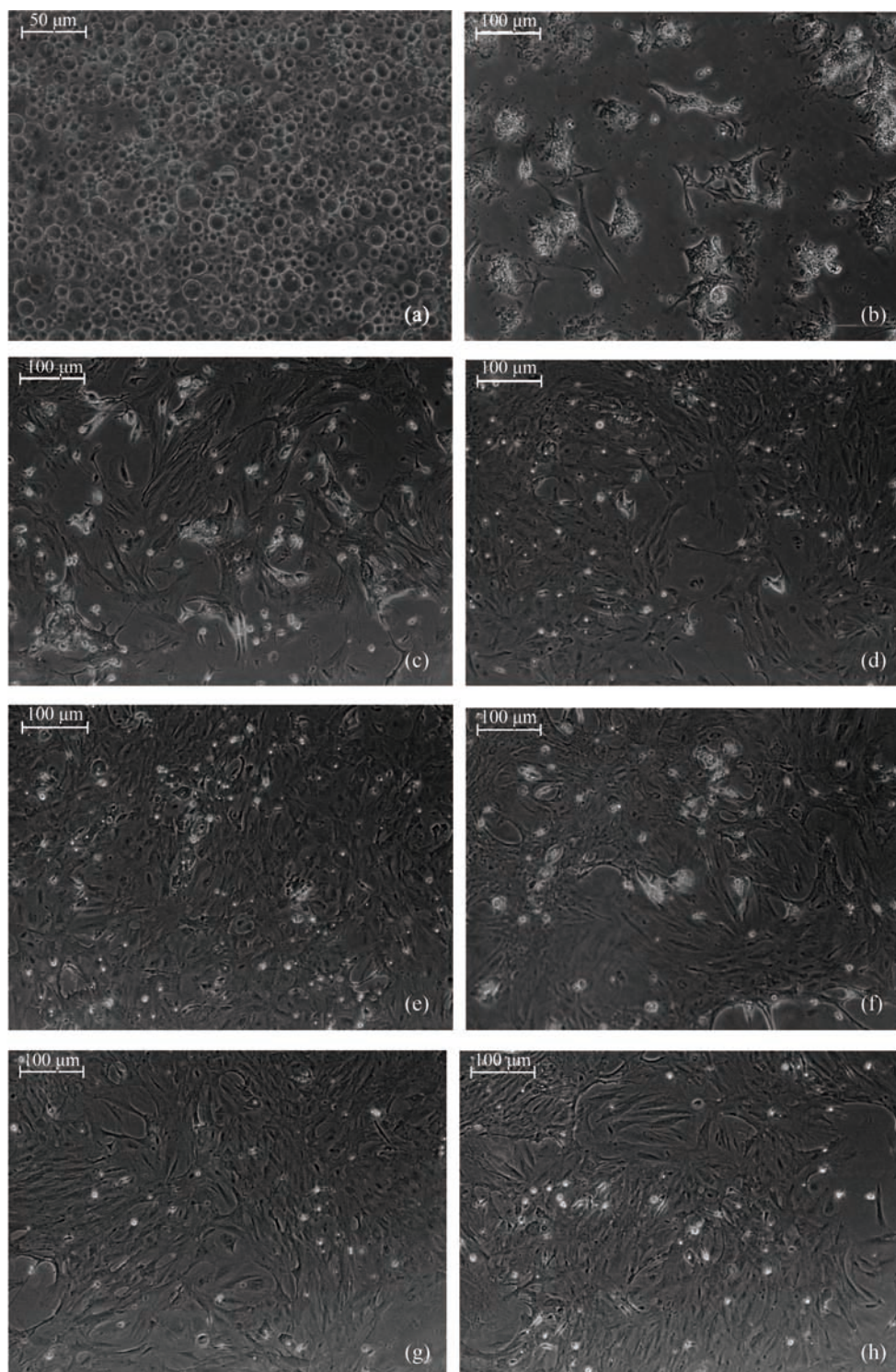


图 1 倒置荧光显微镜下观察的斜带石斑鱼肝细胞形态

(a) 刚分离出来的肝细胞($\times 50$); (b) 生长48 h的肝细胞($\times 100$); (c) 生长72 h的肝细胞($\times 100$); (d) 生长96 h的肝细胞($\times 100$); (e) 生长120 h的肝细胞($\times 100$); (f) 生长144 h的肝细胞($\times 100$); (g) 生长168 h的肝细胞($\times 100$); (h) 生长192 h的肝细胞($\times 100$)

Fig. 1 Morphology of *E. coioides* hepatocytes under inverted fluorescence microscope

(a) appearance of freshly isolated hepatocytes ($\times 50$); (b) morphology of hepatocytes cultured for 48 h ($\times 100$); (c) morphology of hepatocytes cultured for 72 h ($\times 100$); (d) morphology of hepatocytes cultured for 96 h ($\times 100$); (e) morphology of hepatocytes cultured for 120 h ($\times 100$); (f) morphology of hepatocytes cultured for 144 h ($\times 200$); (g) morphology of hepatocytes cultured for 168 h ($\times 100$); (h) morphology of hepatocytes cultured for 192 h ($\times 100$)

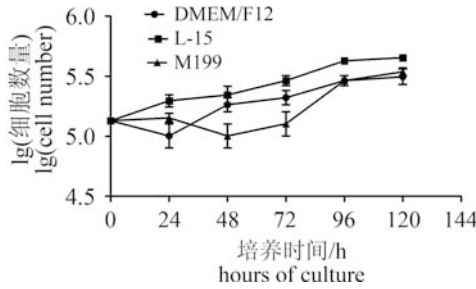


图2 斜带石斑鱼原代肝细胞在不同培养基中的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of primary culture hepatocytes from *E. coioides* in different media

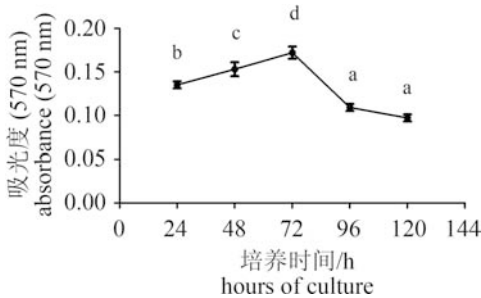


图3 MTT法测定斜带石斑鱼肝细胞A值

图中标有不同字母的数值之间差异显著(P<0.05), 下同

Fig. 3 Results from assessment of the A values of primary culture hepatocytes from *E. coioides* by use of the MTT assay

Values with different letter superscripts mean significant differences(P<0.05), the same below

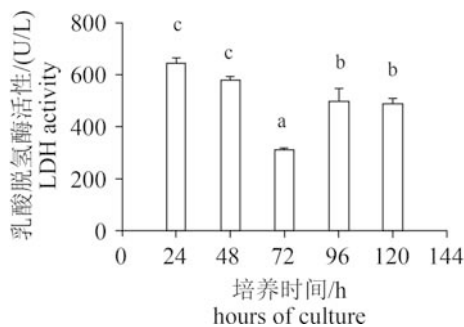


图4 斜带石斑鱼肝细胞原代在120 h培养期间上清液中LDH浓度的变化

Fig. 4 LDH activity in the supernatant of hepatocytes during 120 hours of culture

通过100×g重复离心2次分离纯化鲤和鲇(*Silurus asotus*)肝细胞, 得到较好的分离纯化效果的结果一致。

3.2 不同培养基对肝细胞生长的影响

本研究中分析了3种不同培养基(DMEM/F-

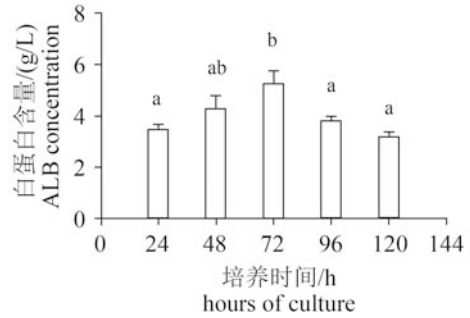


图5 斜带石斑鱼肝细胞在120 h培养期间上清液中ALB含量的变化

Fig. 5 ALB concentration in the supernatant of hepatocytes during 120 hours of culture

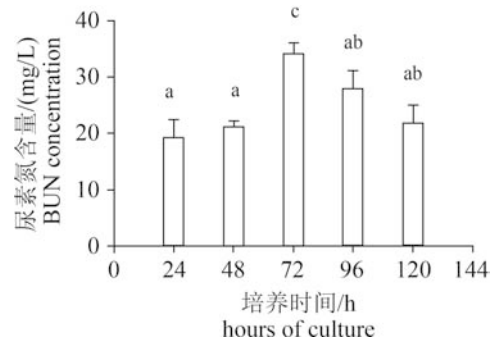


图6 斜带石斑鱼肝细胞在120 h培养期间上清液中BUN含量的变化

Fig. 6 BUN concentration in the supernatant of hepatocytes during 120 hours of culture

12、M199和L-15)对斜带石斑鱼肝细胞原代培养的影响, 实验结果表明肝细胞在含有20%胎牛血清的L-15培养基中生长速率明显优于DMEM/F-12和M199培养基。许多研究者在启动海水鱼各种组织细胞原代培养及细胞系建立的最适培养基均为L-15培养基, 包括遮目鱼(*Chanos chanos*)心脏组织^[1], 青石斑鱼(*E. awoara*)肾脏、肝脏组织^[13], 赤点石斑鱼(*E. akaara*)脾脏和鳔组织^[6], 斜带石斑鱼眼睛和脾脏组织^[14, 24], 尖吻鲈(*Lates calcarifer*)肌肉和鳔组织^[25]等鱼类组织细胞培养最适培养基均选用L-15培养基, 与本研究得出的结论一致; 然而, Wei等^[26]所建立的褐点石斑鱼(*E. fuscoguttatus*)鳍、心脏和鳔组织细胞系的最适培养基则均为DMEM/F-12; 还有一些鱼类的组织细胞培养则选用M199培养基, 如草鱼^[4]、鲤^[10]等, 这说明不同生长环境的鱼类各组织细胞培养的最适培养基不同。研究表明培养基对肝细胞体外培养性能具有显著的影响^[27], 培养基中氨

基酸的水平对肝细胞功能也有很大的影响,这可能与氨基酸既可作为细胞蛋白质合成的前体和能量物质,又可作为细胞蛋白降解的抑制剂,同时,还可以调节原代培养肝细胞有丝分裂原的敏感性有关^[28]。本研究结果显示L-15培养基更适合斜带石斑鱼肝细胞贴壁生长,这可能是因为肝细胞是代谢的重要靶细胞,生长代谢较旺盛,对营养的需求量比较高,而L-15中氨基酸的含量要高于DMEM/F12和M199培养基,高含量的氨基酸能够促进肝细胞蛋白质合成,同时又可以抑制肝细胞蛋白质的降解,增强肝细胞有丝分裂原的敏感性,更有利于肝细胞的代谢生长。

3.3 不同培养时间对肝细胞功能的影响

本研究检测了培养120 h内肝细胞培养基上清液中的LDH、BUN和ALB这3种具有代表性的肝功能指标。LDH存在于肝细胞内,当肝细胞受损细胞膜通透性增大时,LDH从细胞内漏出到细胞外环境中,因此通过检测培养基上清液中LDH活力可了解肝细胞受损程度^[29-30]。本实验通过测定培养上清液中LDH活性来判断肝细胞损伤情况,实验中24和48 h LDH活性较高,之后开始降低,在72 h达到最低值,这与张高峰等^[31]培养鲫肝细胞、秦洁等^[4]培养草鱼肝细胞的结果相似。分析原因可能为,使用胰蛋白酶消化分离肝细胞过程中,肝细胞受到一定程度的损伤,培养的24~48 h,大部分细胞开始贴壁生长,但仍有一些细胞未贴壁而悬浮于培养液中并慢慢开始死亡,细胞膜通透性增加,细胞内的LDH释放到培养基中,导致培养基中LDH活性增高;培养72 h,培养基上清液中LDH活性最低,说明此时肝细胞膜的完整性好,细胞状态好。正常肝细胞摄取氨基酸经代谢后将含氮部分转为尿素及其他含氮物质,若肝细胞受到损伤,则造成合成和分泌不足,若细胞生长代谢旺盛则生成较多的尿素氮;因此,尿素氮可以作为判定细胞存活的一个指标。肝脏是合成白蛋白的唯一场所,通过检测培养上清液中白蛋白含量可以判断肝细胞合成分泌功能是否正常,可作为肝细胞损伤的早期指标^[32]。24~72 h阶段可见大量肝实质细胞,表明此时细胞生长旺盛,BUN和ALB的合成能力较高,且在72 h达到峰值;随后开始下降并稳定。分析其原因,可能为培养的

第24 h由于肝细胞经过前期消化、转移,部分细胞失活,细胞功能未完全恢复;到第72 h细胞大部分贴壁,开始分裂增殖,生物合成功能明显提高;第96 h后单层培养的增殖空间受限,细胞发生密度抑制,生物功能及活性开始下降,导致BUN和ALB的合成量明显下降。这与采用MTT检测细胞增殖能力,得出斜带石斑鱼肝细胞在培养24~72 h阶段细胞增殖率显著增加,72 h后细胞增殖率开始显著下降的结果相吻合。

综上所述,0.25%的胰蛋白酶常温消化法适合斜带石斑鱼肝细胞的分离;斜带石斑鱼肝细胞原代培养的最适培养基为L-15培养基;肝细胞在启动原代培养的48~72 h生长代谢旺盛。

参考文献:

- [1] Segner H. Isolation and primary culture of teleost hepatocytes [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 1998, 120(1): 71-81.
- [2] 喻文娟,杨先乐,唐俊,等.大口黑鲈肝细胞原代培养方法的建立[J].*上海水产大学学报*,2006,15(4):430-435.
Yu W J, Yang X L, Tang J, et al. Study on primary culture of hepatocytes from *Micropterus salmoides* [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2006, 15(4): 430-435 (in Chinese).
- [3] Pesonen M, Andersson T B. Fish primary hepatocyte culture: an important model for xenobiotic metabolism and toxicity studies [J]. *Aquatic Toxicology*, 1997, 37(2-3): 253-267.
- [4] 秦洁,叶元土,冷向军,等.草鱼肝细胞的分离与原代培养[J].*中国实验动物学报*,2012,20(3):33-39.
Qin J, Ye Y T, Leng X J, et al. Isolation and primary culture of hepatocytes from *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2012, 20(3): 33-39 (in Chinese).
- [5] Hestermann E V, Stegeman J J, Hahn M E. Serum withdrawal leads to reduced aryl hydrocarbon receptor expression and loss of cytochrome P4501A inducibility in PLHC-1 cells [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2002, 63(8): 1405-1414.
- [6] Huang X H, Huang Y H, Sun J J, et al. Characterization of two grouper *Epinephelus akaara* cell lines: application to studies of Singapore grouper iridovirus

- (SGIV) propagation and virus-host interaction [J]. *Aquaculture*, 2009, 292(3-4): 172-179.
- [7] Birnbaum M J, Schultz J, Fain J N. Hormone-stimulated glycogenolysis in isolated goldfish hepatocytes [J]. *American Journal of Physiology*, 1976, 231(1): 191-197.
- [8] Klaunig J E, Ruch R J, Goldblatt P J. Trout hepatocyte culture: isolation and primary culture [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 1985, 21(4): 221-228.
- [9] Moon T W, Busby E R, Cooper G A, *et al.* Fish hepatocyte glycogen phosphorylase-a sensitive indicator for hormonal modulation [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1999, 21(1): 15-24.
- [10] Fan Y H, He C H, Liu G F, *et al.* Optimization of the isolation and cultivation of *Cyprinus carpio* primary hepatocytes [J]. *Cytotechnology*, 2008, 58(2): 85-92.
- [11] Wan X Q, Ma T W, Wu W Z, *et al.* EROD activities in a primary cell culture of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) hepatocytes exposed to polychlorinated aromatic hydrocarbonas [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2004, 58(1): 84-89.
- [12] Segner H, Böhm R, Kloas W. Binding and bioactivity of insulin in primary cultures of carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1993, 11(1-6): 411-420.
- [13] Lai Y S, Murali S, Ju H Y, *et al.* Two iridovirus-susceptible cell lines established from kidney and liver of grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel), and partial characterization of grouper iridovirus [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2000, 23(6): 379-388.
- [14] Qin Q W, Wu T H, Jia T L, *et al.* Development and characterization of a new tropical marine fish cell line from grouper, *Epinephelus coioides* susceptible to iridovirus and nodavirus [J]. *Journal of Virological Methods*, 2006, 131(1): 58-64.
- [15] Stockert J C, Blázquez-Castro A, Cañete M, *et al.* MTT assay for cell viability: intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets [J]. *Acta Histochemica*, 2012, 114(8): 785-796.
- [16] Uldall A. Analyte and matrix problems in the calibration and quality assessment of the bromocresol green method for albumin in serum [J]. *Journal of Clinical Chemistry & Clinical Biochemistry Zeitschrift Für Klinische Chemie Und Klinische Biochemie*, 1984, 22(22): 305-307.
- [17] Horak E, Jr S F. Measurements of serum urea nitrogen by conductivimetric urease assay [J]. *Annals of Clinical Laboratory Science*, 1972, 2(6): 425-431.
- [18] Mckenzie D, Henderson A R. Pryuvate as substrate in the determination of serum lactate dehydrogenase isoenzyme activity [J]. *Clinical Chemistry*, 1974, 20(11): 1462-1465.
- [19] Wolf K, Quimby M C. Established eurythermic line of fish cells *in vitro* [J]. *Science*, 1962, 135(3508): 1065-1066.
- [20] Fent K. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples [J]. *Toxicology in Vitro*, 2001, 15(4-5): 477-488.
- [21] Ferraris M, Radice S, Catalani P, *et al.* Early oxidative damage in primary cultured trout hepatocytes: a time course study [J]. *Aquatic Toxicology*, 2002, 59(3-4): 283-296.
- [22] Råbergh C M I, Lipsky M M. Toxicity of chloroform and carbon tetrachloride in primary cultures of rainbow trout hepatocytes [J]. *Aquatic Toxicology*, 1997, 37(2-3): 169-182.
- [23] Khan E A, Dasmahapatra A K, Ghosh R. Evaluation of EDTA and fish skin extract in primary culture of fish liver cells [J]. *Methods in Cell Science*, 1997, 19(3): 153-159.
- [24] Parameswaran V, Ahmed V P I, Shukla R, *et al.* Development and characterization of two new cell lines from milkfish (*Chanos chanos*) and grouper (*Epinephelus coioides*) for virus isolation [J]. *Marine Biotechnology*, 2007, 9(2): 281-291.
- [25] Lai Y S, Chiou P P, Chen W J, *et al.* Characterization of apoptosis induced by grouper iridovirus in two newly established cell lines from barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch) [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2008, 31(11): 825-834.
- [26] Wei Y B, Fan T J, Jiang G J, *et al.* Establishment of a novel fin cell line from brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* (Forsskål), and evaluation of its viral susceptibility [J]. *Aquaculture Research*, 2009, 40(13): 1523-1531.

- [27] Ryan C M, Carter E A, Jenkins R L, *et al.* Isolation and long-term culture of human hepatocytes [J]. *Surgery*, 1993, 113(1): 48-54.
- [28] Hasegawa K, Miyata Y, Carr B I. Glutamic acid potentiates hepatocyte response to mitogens in primary culture [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 1994, 158(2): 365-373.
- [29] Cheng Y B, Wang Y J, Zhang S C, *et al.* Response of porcine hepatocytes in primary culture to plasma from severe viral hepatitis patients [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2005, 11(48): 7585-7590.
- [30] 吴显实, 卫程武, 黄克和. 原代牛肝细胞分离和培养方法的建立[J]. *中国兽医学报*, 2009, 29(2): 203-206.
- Wu X S, Wei C W, Huang K H. Development of the technique for isolation and primary culture of bovine hepatocytes [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2009, 29(2): 203-206 (in Chinese).
- [31] 张高峰, 郭彤, 魏华, 等. 采用Percoll法分离、纯化鲫鱼细胞[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(2): 208-214.
- Zhang G F, Guo T, Wei H, *et al.* Isolation and purification of *Carassius auratus* hepatocytes by the method of Percoll [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(2): 208-214 (in Chinese).
- [32] 李进涛, 郑红, 李文贵, 等. 滇西亚种树鼩部分肝功能生化指标的测定及其分析[J]. *云南农业大学学报*, 2014, 29(1): 126-130.
- Li J T, Zheng H, Li W G, *et al.* Determination and analysis of partial liver function biochemical indexes in *Tupaia belangeri chinensis* [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2014, 29(1): 126-130 (in Chinese).

Study on the isolation and primary culture of hepatocytes from liver of grouper (*Epinephelus coioides*)

LUO Yuan, ZHANG Chunxiao, WANG Ling, ZHANG Dongling, HUO Zhenhua, SONG Kai*
(Xiamen Key Laboratory for Feed Quality Testing and Safety Evaluation, Fisheries College,
Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: In order to explore the stable and reliable methods for isolation and primary culture of hepatocytes from *Epinephelus coioides*, we selected the hepatocytes of *E. coioides* and then cultivated them under different conditions. *E. coioides* hepatocytes were isolated by tissue separation and trypsin (0.25% with EDTA) digestion. The hepatocytes could be separated and purified by density gradient centrifugation. The harvested hepatocytes were then suspended in DMEM/F-12, M199, or L-15 (cultured with 5% CO₂). The yield was determined by a hemocytometer. The viability was assessed by Trypan blue exclusion test. Proliferation of hepatocytes was tested by MTT assay. Function of hepatocytes was examined according to the levels of lactic acid dehydrogenase (LDH), albumin (ALB), and urea nitrogen (BUN) of supernatant at different time, respectively. Trypsin digestion method was better than tissue culture. Using 0.25% warm trypsin digestion, the cell yield was 1.6×10⁸ cells per g(liver weight) and the viability was more than 95%. The cells growth were better cultured in L-15 medium than in DMEM/F-12 and M199 media. The liver function index showed that lactic acid dehydrogenase (LDH) significantly decreased, urea nitrogen (BUN) and albumin (ALB) significantly increased during 48–72 h with a strong proliferation. This study indicates that the best method of isolation was pancreatin digestion and the best medium was L-15. During 48 to 72 h in culture, the growth and metabolism of hepatocytes were thriving.

Key words: *Epinephelus coioides*; hepatocytes; primary culture; cell viability; hepatocyte functions

Corresponding author: SONG Kai. E-mail: songkai@jmu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31302198)