

# 长时间灌流式器官培养方法\*

陈细华 陈松林 邓文涛 贺路

(中国水产科学研究院长江水产研究所 湖北省荆州市 434000)

**摘要** 用灌流方式优化器官标本的生存环境。灌流通道的对外进出口端分别以小孔径疏水型空气过滤器和双重无菌气体隔离区作为防菌屏障,配以恒流泵的驱动作用,保证了在长时间的实验期间内不仅能有效地防止污染,而且灌流速度具有足够范围内的可调性和持续恒定性。用这种方法使草鱼脑垂体在长达 82 天的连续灌流中保持着较为稳定的生长激素分泌水平,证实了草鱼脑垂体的生长激素分泌水平与培养液中  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$  离子浓度(一定范围内)成正相关。

**关键词** 长时间 灌流 器官培养 草鱼脑垂体

器官培养比细胞培养更能揭示组织细胞原有的形态结构和功能,因而在许多研究领域中起着不可替代的作用。器官培养的方法从较原始的培养皿法到新近发展起来的摇摆式方法,已有许多种<sup>[1]</sup>,但都需要经常人为地更换培养液仍不能保持器官标本生存环境的稳定;操作麻烦或缺乏有效的防污染措施;用于代谢动态研究也不理想;有的还受宿主因素干扰致使分析结果复杂。为了克服上述缺点,章静波等<sup>[2]</sup>设计了一种能自动更换培养液的灌流式器官培养方法。但我们在工作中发现这种培养装置仍存在明显的局限性;只能进行低流速的灌流,而且随着灌流时间的延长流速越来越慢直至断流,因而既不便于作长时间的连续灌流,也不适

用于代谢动态定量分析。为此,对上述灌流装置进行了一系列的改进,用于草鱼脑垂体器官长时间离体分泌生长激素的研究及相关工作,效果很好。

## 1 方法与装置

改进后的灌流培养装置见图 1 所示。由一个倾斜的 10ml 玻璃注射器外套作培养容器,在其下端底部注入约 1ml 加热的无菌 1% 琼脂溶

\* 淡水鱼类种质资源与生物技术实验室开放基金(94-04)

及中国水产科学研究院科研基金(96-01)资助;

第一作者介绍:陈细华,男,35岁,助研,硕士;

收稿日期:1997-10-08,修回日期:1998-01-12

液(用平衡盐溶液配制),自然凝固成半固体后即可作为器官标本支持物,一般可置4~6个大小约 $2\text{mm}^3$ 的标本。新鲜培养液自一个储液瓶(倒置或正立)通过一由针头、乳胶管连成的通道源源不断地滴入注射器外套浸润标本及其支持物(浸润液容量为1ml左右,能自动维持恒定),成为待收集的样品液(其中含有分泌物等代谢产物),从注射器外套的出液端流入一中段膨大的输液管。输液管呈自然下垂方向,其中段膨大部中因无样品液填充而自然形成一个无菌气体隔离区。输液管的下端与一恒流泵(上海产)的驱动管相连,由恒流泵调节控制样品液的排出速度即灌流速度。恒流泵驱动管的出液端再套接一根中段膨大的输液管作为样品液的最终出口(即样品收集口),于是在培养容器与样品液最终出口之间构成了两道(双重)对液体流动没有任何阻碍的防污染屏障。这种中段膨大的输液管取自市售一次性医用输液器,使用时只需在无菌室中按所要求的长度切割下来即可,而且输液管与注射器外套出液嘴之间以及与恒流泵驱动管之间具有严密的套接性,装配起来十分方便。在灌流装置的进气端,外界空气通过一疏水型空气过滤器(孔径 $0.2\mu\text{m}$ ,美

国 Gelman 公司产品)源源不断地进入储液瓶中,对培养液起着充氧和稳定 pH 值的作用。

注射器外套以一定的倾斜度固定于一自制的不锈钢框架上,储液瓶及空气过滤器以适当的高度吊在其上,一般使储液瓶中的液面高于或略低于注射器外套进液针头即可,但在动态定量分析实验中,需定期(例如每24小时)调整一次储液瓶的高度,使其液面变动控制在较小的范围内,因为过高或过低的液面对由恒流泵控制的流速仍然会产生一定的影响。按实验设计的要求,一个框架可平行安置1至数套灌流装置。将框架和恒流泵同时移入 $\text{CO}_2$ 培养箱或普通培养箱(恒流泵也可置于培养箱之外)中即可开始灌流培养。每隔若干天或设定的时间移入无菌室中向储液瓶中补充培养液或更换不同的培养液。灌流过程中样品液则很方便地从样品液收集口收集。

在本研究中,样品液中草鱼生长激素水平(浓度)的测定按我们<sup>[3]</sup>建立的方法(对草鱼等鲤科鱼类的生长激素具有高度专一性)进行。

## 2 结果

运用上述装置和方法,用 M199 培养液(含5%小牛血清,均为 GIBCO 公司产品,三蒸水配制,不含抗菌素)对草鱼脑垂体完整器官(预先用含青、链霉素的平衡盐溶液清洗)进行了长时间连续灌流培养(每个培养容器中盛3个脑垂体,灌流速度为 $2 \pm 0.3\text{ml/h}$ ,培养温度 $25^\circ\text{C}$ , $\text{CO}_2$ 含量5%),结果在长达82天的时间内,没有发生污染,脑垂体保持着较为稳定的生长激素分泌水平:在所测得的每隔5~8天收集一次(每次收集20分钟)的样品液中草鱼生长激素的浓度一直维持在 $1.3 \pm 0.2\mu\text{g/ml}$ 的水平上,(相当于从每个脑垂体中平均获得了约1.7mg的生长激素);而用 Earle's 平衡盐溶液进行的同步对照灌流所获得的数据只有 $0.015 \pm 0.0025\mu\text{g/ml}$ (相当于前者的1/87),而且自第70天起生长激素分泌水平又降到了原来的50%左右。此外,用 Hank's 的平衡盐溶液(含0.1%牛血清白蛋白)对草鱼脑垂体进行为期7

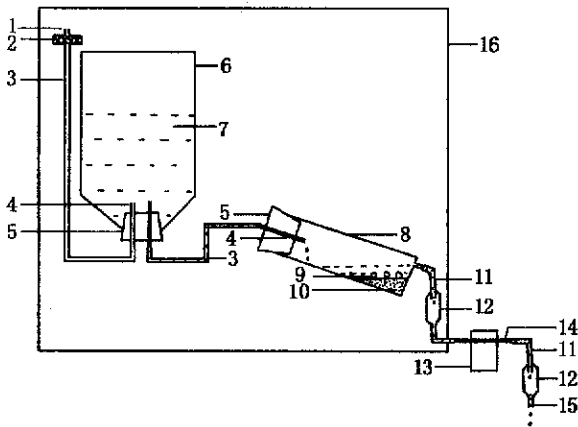


图1 长时间灌流式器官培养装置图

- 1 进气口; 2  $0.2\mu\text{m}$  疏水型空气过滤器; 3 乳胶管; 4 针头; 5 3号胶塞; 6 储液瓶; 7 培养液; 8 10ml注射器外套; 9 器官标本; 10 琼脂; 11 输液管; 12 输液管的膨大部; 13 恒流泵; 14 驱动管; 15 样品液收集口; 16  $\text{CO}_2$  培养箱

天的恒速(3.5ml/h)灌流实验,证实了脑垂体生长激素分泌水平与培养液中  $\text{Ca}^{2+}$  离子浓度(0.5~4m mol/L)和  $\text{K}^{+}$  离子浓度(1.25~10mmol/L)成正相关。

### 3 讨论

从上述草鱼脑垂体器官灌流培养的研究结果看,在人工合成的富含各种营养成分的培养基(M199液)中,脑垂体在至少82天的时间内保持着旺盛不衰的激素分泌能力;而在简单的盐溶液中,脑垂体对激素的分泌能力很弱并且维持一段时间后进一步走向消退。这些结果表明,经改进后的灌流装置和方法能为脑垂体在相当长的时间内充分发挥其生理潜能提供较为适宜的体外条件,包括不依赖于抗菌素的无菌环境、连续恒速更新并具有相对稳定pH值和高溶氧的培养液等。此外,用Hank's盐溶液研究 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 离子对脑垂体完整器官分泌生长激素的影响,所获得的结果与其他学者在其他鱼类的脑垂体碎片短期培养研究中所获得的结果较为相似。

在先期进行的培养皿法器官培养中,曾试图通过频繁地人为更换培养液(每隔数小时)辅以振荡的办法,为草鱼脑垂体提供充足的溶氧等条件,虽然获得了一些初步的实验结果,但因产生微生物污染或操作麻烦等原因,培养时间始终未能突破15天,一般都在几天内就中止。后来,采用章静波等<sup>[2]</sup>报道的灌流装置,但发现这种灌流装置只能进行低流速的灌流,而且即使在这基础上配备恒流泵的驱动,仍然无法实现流速的恒定,随着灌流时间的延长流速越来越慢直至完全断流,对于粘度较高的培养液(如含小牛血清的培养液),这种难通透性表现得尤为突出,这是因为在这种灌流装置的对外进气端和出液端都装有普通微型滤器以防自外而入的污染。而普通微型滤器对气体的通透性很小,在受潮或一旦被液体(如培养液)浸湿的情况下,即便是大孔径(0.45 $\mu\text{m}$ )的微型滤器也完全丧失对气体的通透性。小孔径(0.2 $\mu\text{m}$ )的微型滤器,对粘度较高的培养液的

通透性极小,需要对培养液施以较大的压力,而且任何微型滤器还存在一个“最大通过总量”问题。如果在灌流装置的进气端改用棉塞等物取代微型滤器,出液端改用大孔径微型滤器取代小孔径微型滤器,其结果虽然能增大通透性,但微生物侵入的可能性也随之增大,这一矛盾虽然可以通过向培养液中添加抗菌素的办法得以缓解,但众所周知这种办法并不能从根本上解决污染的问题,反而不利于器官标本的长时间生存。

经改进后的灌流装置很好地解决了所有上述问题,这是由于在它的对外进(气)出(液)口端分别采用了小孔径疏水型空气过滤器(而不是普通微型滤器)和双重无菌空气隔离区(而没有任何微型滤器)作为防菌屏障,既有效地杜绝了污染,又保证了即使在潮湿的培养箱环境和富含大分子物质的培养液条件下灌流通道的畅通无阻,配合恒流泵的调控作用(以及灌流通道各段之间的紧密衔接性),使灌流速度具有足够范围内的可调性和持续的恒定性,因而不仅适合于器官标本短时间离体培养,而且很适合于器官标本长时间离体培养、代谢产物的连续收集及代谢动态研究。此外,这套实验装置和方法简单易行,灌流开始后无需更换任何部件,无需向培养液中添加抗菌素,并且器官标本中可能存在的少量内源性微生物污染能及时随样品液排出而不是淤积在灌流通道中。所有这些优点决定着这种实验装置和方法必将得到广泛的应用。用这种实验装置和方法,在草鱼脑垂体器官离体分泌生长激素研究方面已获得了初步满意的结果,相关的其他研究工作正在进行中。

**致谢** 本工作得到何介华等同志的大力支持。

### 参 考 文 献

- 1 Ian Freshney. Animal Cell Culture: a practical approach IRL Press Limited, 1987. 149~181
- 2 章静波等. 细胞生物学实用方法与技术. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1995. 39~51
- 3 陈松林, 陈细华, 邓文涛, 贺路, 杨 峰. 草鱼生长激素非竞争式酶联免疫吸附测定法的建立及鉴定(英文). 动物学报, 1996, 42(4): 386~393