

建立一种改良方法分离大鼠肝星状细胞

李玉莲, 宋正己, 范红, 彭伟, 陈艳敏, 万苹
(昆明医科大学附属昆华医院消化内科, 云南昆明 650032)

[摘要] **目的** 建立一种经济、稳定可靠的 HSC 分离方法, 为体外研究提供细胞模型. **方法** Hanks 液在体灌注大鼠肝脏, 离体后用 IV 胶原酶、链蛋白酶、DNaseI 消化肝脏, 12% Nycodenz 连续梯度液分离大鼠 HSC, 计数细胞得率, 0.2% 台盼蓝染色计算细胞活率. 自发荧光、Desmin、 α -SMA 免疫荧光染色对 HSC 进行鉴定和纯度分析. **结果** 分离 HSC 得率 $(3.7 \pm 0.6) \times 10^7$ 只大鼠, 细胞活率 $>90\%$, 分离第 1 天自发荧光和第 3 天 desmin 染色阳性细胞 $>90\%$. HSC 随着体外培养形态明显改变, 分离培养 7 d 后 α -SMA 阳性细胞 $>90\%$, 培养 14 d 或传代后 $>95\%$. **结论** 肝脏离体后消化能达到在体消化同样的效果, 应用 Nycodenz 密度分离介质可获得满意的 HSC 得率和纯度.

[关键词] 分离; 大鼠; 肝星状细胞

[中图分类号] R575.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706(2012)06-0018-04

Establishment of a New Procedure for Isolating Rat Hepatic Stellate Cells

LI Yu-lian, SONG Zheng-ji, FAN Hong, PENG Wei, CHEN Yan-min, WAN Ping
(Dept. of Gastroenterology, The Affiliated Kun'Hua Hospital of Kunming Medical University,
Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To build an efficient procedure for isolating rat hepatic stellate cells. **Methods** Primary hepatic stellate cells (HSC) were isolated from normal Sprague-Dawley (SD) rats by infusion and combined digestion of pronase E and collagenase IV ex situ. Hepatic stellate cells were purified by density centrifugation with 12% Nycodenz. Autofluorescences, desmin and smooth muscle actin (α -SMA) immunofluorescence staining identified and assayed purity of HSC. HSC were activated by culture on uncoated plastic tissue culture dish and culture in a higher glucose Dulbecco's modified eagles medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum under 37°C contained 5% CO₂ 95% air incubator. **Results** The harvest rate of hepatic stellate cells was about $(3.7 \pm 0.6) \times 10^7$ per rat, and the viability was more than 90%. Hepatic stellate cells could be activated by culture for more than 7 days. **Conclusion** This reformed method is more efficient to isolate hepatic stellate cell and by culture the hepatic stellate cells can be activated.

[Key words] Isolation; Rat; Hepatic stellate cells

肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 是肝血窦周围细胞, 有静止和活化两种细胞表型, 活化 HSC 在肝纤维化的发生和发展中起核心作用^[1]. 分离和培养 HSC 是在细胞水平研究肝纤维化的重要手段, 实验旨在建立一种简便、经济、可靠的

HSC 分离方法.

1 材料与方法

1.1 主要材料

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30960454); 云南省科技计划应用基础计划项目 (2009ZC169M)

[作者简介] 李玉莲 (1985~), 女, 云南楚雄市人, 在读硕士研究生, 主要从事消化内科疾病临床研究工作.

[通讯作者] 范红. E-mail: ynfanhong@163.com

IV 胶原酶 (Sigma 美国), 链酶蛋白酶 (Roach 美国), DNase I (Roach 美国), Nycodenz (Sigma), 小鼠抗 Desmin (Newmarker, 美国), 小鼠抗 α -SMA (Newmarker, 美国), FITC 标记的兔抗小鼠荧光二抗 (Jackson, 美国).

1.2 主要器械和仪器

CO₂ 培养箱 (德国贺利氏公司), 倒置显微镜 (日本 OLMPUS 公司), 荧光显微镜 (德国 Zeiss 公司), 低温离心机 (日本 HITACHI 公司).

1.3 实验动物

雄性 SD 大鼠, SPF 级, 体重 (450 ± 50) g, 昆明医科大学实验动物中心提供, 正常喂饲.

1.4 细胞分离方法

大鼠用氯胺酮 100 mg/kg 腹腔注射麻醉, 腹部备皮 75% 酒精消毒 3 次, 倒“U”型剪开腹壁充分暴露肝脏和门静脉, 18 G 套管针门静脉穿刺并保留置管. 先后用 20 mL 注射器抽吸无消化酶含 125 U/mL 肝素的 37 °C D-Hanks 液和无肝素的 37 °C Hanks 液, 经门静脉在体灌洗肝脏, 同时剪断下腔静脉放血, 肝脏灌洗至流出液无血迹, 肝脏变灰白, 保留置管下迅速游离肝脏. 离体后的肝脏在超净工作台先用含 0.05% IV 胶原酶、0.1% 链蛋白酶 E (W/V) 的 37 °C Hanks 液 25 mL 从门静脉和肝静脉处用注射器反复灌注消化至肝脏软化. 去除肝脏包膜和纤维组织, 加入含 0.05% IV 胶原酶、0.02% 链蛋白酶 E、0.05% DNase I (W/V) 的 37 °C Hanks 液 25 mL 磁力搅拌 30 min, 消化后的肝组织液过 200 目筛网得到粗细胞液, 加入 4 °C DMEM 终止消化, 500 r/min 5 min 低速离心去除沉淀肝细胞及细胞碎片. 上清液用 4 °C 12% Nycodenz (W/V) 连续梯度液 4 °C 3 200 r/min 17 min 分离不同比重的细胞, 小心吸取界面最上层的 HSC, 4 °C DMEM 1 500 r/min 5 min 洗涤细胞. 细胞用含 20% 胎牛血清的 DMEM 重悬. 血细胞计数板分别计算细胞得率和 0.2% 台盼蓝拒染率. 倒置显微镜观察细胞、荧光显微镜观察自发荧光, 分离后 HSC 接种于细胞爬片, 用含 10% 胎儿牛血清高糖 DMEM 培养基, 37 °C 含 5% CO₂ 95% 潮湿空气培养箱中培养. 培养 3 d 和 7 d 后分别进行 Desmin、 α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 免疫荧光染色, 进行 HSC 鉴定和纯度分析.

2 结果

每只大鼠肝脏消化的消化酶用量为 50 mL, 较在体循环灌注明显减少 50% 以上. 细胞分离过程

时间缩短, 平均约 (3.0 ± 0.5) h. 细胞梯度离心后 HSC 分离界面清晰 (见图 1), 每只大鼠 HSC 得率 (3.7 ± 0.6) × 10⁷; 分离后的细胞活率 > 90% (见图 2), 自发荧光细胞数 > 90% (见图 3); HSC 分离后培养活力高, 分离后细胞培养 3 d Desmin 染色阳性细胞 > 95% (见图 4); 分离培养 7 d 后 α -SMA 阳性细胞 > 90% (见图 5), 培养 14 d 或传代后 > 98% 阳性.

3 讨论

肝脏中静止 HSC 主要储存维生素 A, 参与 ECM 代谢, 支持血窦内皮细胞和调节血窦血流^[2]. 肝组

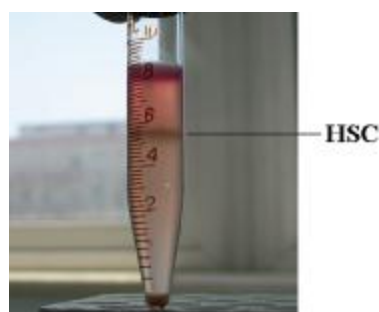


图 1 细胞分离界面

Fig. 1 Cell separation interface

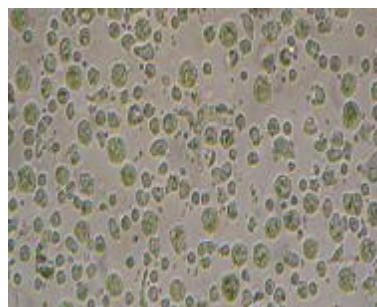


图 2 含折光颗粒的 HSC

Fig. 2 HSC containing the refractive index particles

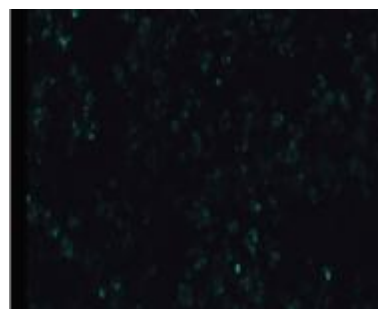


图 3 HSC 自发荧光

Fig. 3 HSC spontaneous fluorescence

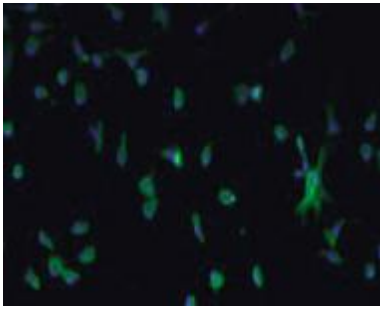


图 4 Desmin 免疫荧光染色

Fig. 4 Desmin immunofluorescence staining

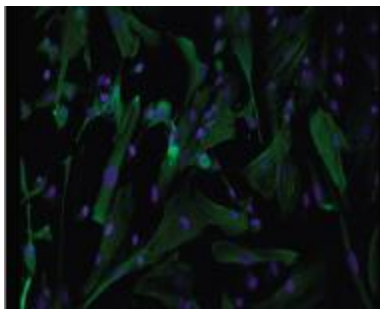
图 5 α -SMA 免疫荧光染色

Fig. 5 Alpha SMA immunofluorescence staining

织慢性损伤后, 静止 HSC 向活化表型转变, 维生素 A 脂滴丢失, ECM 合成增加, 并表达 α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA), 细胞增殖、移动、收缩性等生物行为明显改变^[3,4]。活化 HSC 数量增多和 ECM 积聚是肝纤维化组织重建的特征^[5]。分离出 HSC, 能更专一研究其结构和功能^[6]。HSC 分离主要过程有: 肝脏灌注消化, 消化酶离散细胞, 密度梯度液离心悬浮不同比重的细胞^[7-9]。目前 HSC 的分离方法较多, 其中在体循环灌注消化对置管要求高、肝脏软化后游离时容易受到污染, 此外门静脉置管恒流泵灌注前的管路要求严格消毒, 对环境要求也较高, 每次分离所需的消化酶量要求多 (>100 mL/只)。和笔者参考手术切除肝组织经断面血管灌注进行 HSC 分离的经验, 采用无酶液在体灌洗, 含酶液离体消化的方式。肝脏在体先用无酶肝素液进行充分灌洗以防止肝内微血栓形成, 随后用无酶不含肝素液灌洗消除肝素对细胞的毒性, 灌洗后游离尚未软化的肝脏, 离体后消化酶可以经门静脉和肝静脉反复灌注进行肝脏消化, 这个过程可在细胞培养室中的超净台进行, 减少了污染机会。实验中笔者同时采用三种消化酶, IV 胶原酶破坏细胞与细胞外基质的黏着, 链酶蛋白酶破坏肝实质细胞, DNase I 减少实质细胞破坏后产生的 DNA 对 HSC 的黏着, 较好离散细胞和形成理想的分离界面。离

体消化酶的用量明显减少 (50 mL/只), 过程中链酶蛋白酶可依次降低浓度而减少其对 HSC 的不利影响, 提高了细胞的活率和得率。HSC 储存的维生素 A 在胞浆中形成脂滴使细胞比重相对最轻, 平均在 1.053 ± 0.007 , 可采用比重等密度沉降进行分离^[7]。常用的密度分离介质中 Nycodenz 配制简单、稳定、分离界面清晰、价格适中最为常用。实验中选用了 12% Nycodenz 连续密度梯度液分离 HSC, 同一肝脏中 HSC 的大小和脂滴含量有差异, 因此 HSC 和库普弗细胞、窦内皮细胞比重分布上有重叠, HSC 平均的比重是 1.053, 库普弗细胞是 1.060, 血窦内皮细胞是 1.080。在分离中体会到细胞的得率和纯度呈反比, 12% Nycodenz 的比重为 1.056 分离细胞更好地兼顾了细胞纯度和得率。实验中也发现分离细胞的活率和活力与分离消化过程密切相关。肝脏全面冲洗, 适宜的酶浓度和消化温度, 中止酶消化后保持 4℃, 尽量缩短分离过程能明显提高活率和活力。与传统肝脏在体灌注消化比较, 改良的在体灌洗离体消化方法, 实验准备和设施要求简便, 分离成功率高, 肝脏在体暴露的时间短, 消化过程在超净台完成, 污染机会小。分离中还可降低链蛋白酶浓度以减轻对细胞的毒性和同时加入 DNase I 也能降低细胞间的黏附促进细胞离散, 从而保证了分离后 HSC 较高的活率、得率和活力。

改良的在体灌洗离体消化 12% Nycodenz 连续梯度的 HSC 分离方法易掌握、经济、过程稳定, 能达到在体消化分离同样的效果, 这为开展专一研究不同表型 HSC 和抗肝纤维化治疗的细胞学实验创造了条件。

[参考文献]

- [1] MOREIRA R K. Hepatic stellate cells and liver fibrosis [J]. Arch Pathol Lab Med, 2007, 131: 1 728 - 1 734.
- [2] EWISSE AND D, LKNOOK EDITORS. Kupffer cells and other liver sinusoidal cells. Elsevier/North-Holl, 2nd edition 1979 printed in the Netherlands [J]. Med Chir Did, 1977, 6(7): 409 - 418.
- [3] HENDRIKS H F, VERHOOFFSTAD W A, BROUWER A, et al. Perisinusoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver [J]. Exp Cell Res, 1985, 160: 138 - 149.
- [4] BRENNER D A, WATERBOER T, CHOI S K, et al. New aspects of hepatic fibrosis [J]. J Hepatol, 2000, 32: 32 - 38.

(下转第 24 页)

- 生出版社,2005:6-7.
- [2] HERZOG C R, DEVEREUX T R, PITTMAN B, et al. Carcinogenic induction directs the selection of allelic losses in mouse lung tumorigenesis [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(22):6 424-6 429.
- [3] GARBOW J R, WANG M, WANG Y, et al. Quantitative monitoring of adenocarcinoma development in rodent by magnetic resonance imaging [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(5):1 363-1 367.
- [4] 于小玲, 刘凤, 王宝娃, 等. 乌拉坦静脉注射所致的溶血现象及其对血液流变性的影响[J]. *微循环学杂志*, 1997, 7(3):22-23.
- [5] 齐晓娟, 彭如心, 杨秀珍, 等. 维生素C和地塞米松增加兔红细胞渗透抵抗性[J]. *中国微循环*, 1999, 3(3):142-143.
- [6] 杨黎黎. 乌拉坦麻醉动物的病理生理学作用[J]. *微循环学杂志*, 2011, 21(1):59-61.
- [7] 叶应妩主编. 全国临床检验操作规程[M]. 第3版. 南京:东南大学出版社, 2006:10.
- [8] LEONART M S, NASCIMENTO A J, NONOYAMA K, et al. Enzymes And membrane proteins of ADSOL-preserved blood cells[J]. *Sao Paulo Med J*, 2000, 118(2):41-45.
- [9] ASLAN R, SEKEROGU M R, TARAKOGLU M, et al. Investigation of malondialdehyde formation and antioxidant enzyme activity in stored blood [J]. *Haematologia*, 1997, 28(4):233-237.
- [10] KNIGHT J A, SEARLES V A, CLAYTON F C. The effect of desferri Oxamine on stored erythrocytes: lipid peroxidation, deformability, and morphology[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 1996, 26(4):283-290.
- (2012-02-22 收稿)

(上接第 20 页)

- [5] FRIEDMAN S L. The cellular basis of hepatic fibrosis: mechanisms and treatment strategies [J]. *N Engl J Med*, 1993, 323:1 828-1 835.
- [6] FRIEDMAN S L. Cellular sources of collagen and regulation of collagen production in liver [J]. *Semin Liver Dis*, 1990, 10:20-29.
- [7] FRIEDMAN S L, ROLL F J. Isolation and culture of hepatic lipocytes, Kupffer cells, and sinusoidal endothelial cells by density gradient centrifugation with Stractan[J]. *Anal Biochem*, 1987, 161:207-218.
- [8] BLOMHOFF R, BERG T. Isolation and cultivation of rat liver stellate cells[J]. *Meth Enzymol*, 1990, 190:58-71.
- [9] GEERTS A, NIKI T, HELLEMANS K, et al. Purification of rat hepatic stellate cells by side scatter-activated cell sorting[J]. *Hepatology*, 1998, 27:590-559.
- (2012-03-08 收稿)