

Optiprep 梯度离心法提取大鼠肝星状细胞的研究

戴春蕾 陈少隆 陈黎黎 张伟伟 林 镬 陈永平

摘 要 **目的** 探索 SD 大鼠肝星状细胞(HSCs)的提取方法,观察其生物学特性,为进一步研究它在肝纤维化和免疫应答中的可能机制奠定基础。**方法** 依次采用前灌注液、0.15mg/ml 的链霉蛋白酶 E 和 0.5mg/ml 的 IV 型胶原酶在体原位灌注消化肝脏。肝脏离体剪碎后,在 0.3mg/ml 链霉蛋白酶 E、0.3mg/ml IV 型胶原酶、0.02mg/ml DNA 酶 I 液中 37℃ 振荡消化 20min,低速离心(30g,5min)去除残余肝实质细胞,Optiprep 密度梯度离心法获得纯化的 HSCs。台盼蓝排斥试验评估 HSCs 细胞存活率;328nm 紫外光激发 HSCs 自发蓝绿色荧光结合光镜鉴定细胞纯度; α -SMA 免疫细胞化学方法鉴定 HSCs;通过光镜观察 HSCs 的形态学变化。**结果** 本方法,每只大鼠肝脏 HSCs 产量约 8.2×10^6 个,HSCs 存活率在 90% 以上;原代培养 24h 后,纯度在 85% 以上;传 1 代后,纯度达 95% 以上。**结论** 本方法简单、经济、实用,可获得较多的大鼠 HSCs。

关键词 肝星状细胞 大鼠 提取 培养

Study on Extraction of the Hepatic Stellate Cells in Rats by Optiprep Gradient Centrifugation Method. Dai Chunlei, Chen Shaolong, Chen Lili, Zhang Weiwei, Lin Zhuo, Chen Yongping. Institution of Hepatology, Wenzhou Medical College/The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To establish a practical scheme for the extraction of the hepatic stellate cells (HSCs) from Sprague Dawley rat, and observe their biological phenotypes, which could lay the foundation for the further study of the possible mechanism of it in liver fibrosis and immune response. **Methods** The liver was digested by in situ perfusion of former perfusion solution, 0.15mg/ml pronase E and 0.5mg/ml collagenase IV in turn. The liver was continued to be cut into pieces and digest using 0.3mg/ml pronase E, 0.3mg/ml collagenase IV and 0.02mg/ml DNase I solution with constant temperature oscillator for 20 min in vitro. After low speed centrifugation being used to remove residual hepatocytes, cells were treated with density gradient centrifugation by Optiprep to obtain the purified rat HSCs. Trypan blue exclusion test was used to estimate cell viability. The cell purity was identified by HSCs autofluorescence and light microscopy. The HSCs were identified by immunocytochemical staining of α -SMA. HSCs morphological changes were observed by light microscopy. **Results** This protocol yielded a preparation of approx 8.2×10^6 cells from a single rat liver, with viability over 90%. The purity quotient of HSCs was more than 85% after 24 h of primary culture and close to 95% after the first cell passage. **Conclusion** This method for isolating HSCs is simple, economic and practical, which obtained more rat HSCs.

Key words Hepatic stellate cells; Rat; Extraction; Culture

肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)是肝脏内的一种星状、非实质细胞,位于肝窦内皮细胞与肝细胞之间的 Disse 间隙内。目前认为,在各种导致肝脏损伤的因素作用下,HSCs 被激活,转化为肌成纤维样细胞,发生表型改变,产生细胞外基质及多种细胞因子,最终导致肝纤维化^[1]。有文献报道,激活的 HSCs 的收缩能调节门脉高压中的血管张力^[2]。最近研究表明,HSCs 是强有力的抗原递呈细胞,能激活 NKT 细胞和 T 淋巴细胞,以及能诱导产生对细菌感染的保护性免疫^[3]。因此,研究原代 HSCs 的生物学

特性显得很有意义。本研究采用在体原位肝脏灌注结合 Optiprep 密度梯度离心技术成功分离出大鼠原代 HSCs,现报道如下。

材料与方法

1. 材料来源与仪器设备:(1)实验动物:雄性 SD 大鼠,体重 500 ± 100 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号为 SCXK(沪)2007-0005,常规喂养,自由进食水。(2)主要试剂及仪器:链霉蛋白酶 E(Pronase E)、IV 型胶原酶(Collagenase IV)、DNA 酶 I(DNase I)均购自美国 Sigma 公司,D-Hanks、Hanks 液购自上海索莱宝生物科技有限公司。Optiprep 密度梯度液购自挪威 Axis-shield 公司。高糖 DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司。小鼠抗大鼠 α -SMA 单克隆抗体(1:100)购自 Sigma 公司,小鼠二步法试剂盒、DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥公司。倒置相差显微镜购自重庆光电仪器有限公司,Axiovert 200 倒置荧光显微镜购

作者单位:325000 温州医学院附属第一医院感染内科/温州医学院肝病研究所

通讯作者:陈永平,电子信箱:ypchen106@yahoo.com.cn

自德国 Carl Zesis 公司,高速离心机购自美国 Beckman 公司,恒温振荡箱购自上海一恒仪器有限公司。(3)分离培养液的配制:前灌注液:含 0.5mmol/L EGTA,20mmol/L Hepes,0.2ml 肝素钠的 D-Hanks 液 100ml。Pronase E 灌注液:称取 Pronase E 15mg 溶于 100ml Hanks 液,加入 20mmol/L Hepes。Collagenase IV 灌注液:称取 Collagenase IV 50mg 溶于 100ml Hanks 液,加入 20mmol/L Hepes。振荡消化液:Pronase E 15mg、Collagenase IV 15mg 和 DNase I 1mg 溶于 50ml Hanks 液。这 4 种溶液均过滤除菌,37℃ 预热。终止消化液:DMEM 培养液 12ml,胎牛血清 3ml,4℃ 预冷。离心稀释液:高糖 DMEM 培养基添加 0.25% FBS,20mmol/L Hepes。HSCs 培养液:高糖 DMEM 中添加 10% FBS,20mmol/L Hepes。上述各溶液中均添加 100μg streptomycin 和 100U/L penicillin。密度梯度离心液:用高糖 DMEM 培养基配制 15% Optiprep 和 11.5% Optiprep。

2. 实验步骤:(1)原位消化:大鼠经 7% 水合氯醛 0.5ml/100g 麻醉、固定、常规消毒后,取十字切口剖腹。暴露肝上下腔静脉、肝下腔静脉、门静脉主干并分别铺线,结扎门静脉侧支。在门静脉近端剪一小口,置入一次性静脉输液皮管并固定,用 50ml 注射器推注前灌注液;同时结扎肝上下腔静脉。灌注前灌注液并等肝脏胀至两倍大小时,剪开肝下腔静脉。当肝表面颜色变为黄白时,依次换用 Pronase E 灌注液灌注 10~12min(流速 15~20ml/min)、Collagenase IV 灌注液灌注 8~10min(流速 10~12.5ml/min)。待肝组织完全软化几乎成液体时停止消化(图 1)。(2)振荡消化及纯化:快速游离下整个肝脏,用 Hanks 冲洗 3 次,放入到盛有振荡消化液的无菌培养皿中,剔除肝包膜和结缔组织,剪碎肝脏。放入 1 只 50ml 离心管中,于恒温振荡箱中,200r/min,37℃ 振荡消化 20min。结束后,加入终止消化液和 D-hanks 液充分分散细胞。然后经 100 目、200 目筛网各过滤 1 次,移入 3 只 50ml 离心管中,550r/min 离心 6min(4℃)。取沉淀,加入 D-hanks 液补至 50ml,30r/min 离心 5min(4℃)。取上清,550r/min 离心 6min(4℃)。(3)梯度离心:取沉淀,用 15% Optiprep 5mL 重悬细胞(终浓度为 12%),并依次缓慢上覆 11.5% Optiprep 5ml 和 D-hanks 液 2ml,1400r/min 密度梯度离心 20min(4℃)。轻轻取出离心管,小心吸取 11.5% Optiprep 与 D-hanks 之间的细胞层,依次用 D-hanks 液、离心稀释液,以 550r/min,8min(4℃)清洗 1 次。(4)细胞培养:用上述 HSCs 培养液重悬细胞,以 1×10^6 /ml 细胞密度接种于 25cm² 培养瓶内,于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养,24h 后首次换液。此后每 2 天换液 1 次。待细胞长满培养瓶底后,以 0.25% 胰蛋白酶-0.01% EDTA 液消化 2~3min 传代。

3. 鉴定方法:(1)HSCs 存活率:台盼蓝排斥试验:把 0.4% 台盼蓝 10μl 加入到吸取的 90μl 细胞悬液中,混匀后滴加到载玻片上,静置 3min 后,镜下观察,被染成淡蓝色者为死细胞,而未着色者为活细胞,HSCs 存活率(%) = 未着色细胞数/(未着色细胞总数 + 着色细胞总数) × 100%。(2)新分离的 HSCs 产量的测定:倒置相差显微镜下,采用血细胞计数板



图 1 胶原酶原位灌注完后肝脏组织形态

法测定细胞产量,HSCs 总数 = (4 大格 HSCs 总数/4) × 10⁴ × 悬液 ml 数,反复测定 2 次,取其平均值。(3)HSCs 的鉴定:在倒置荧光显微镜下,328 nm 紫外光激发细胞自发蓝绿色荧光的即为新分离或早期分离的 HSCs。在倒置相差显微镜下观察 HSCs 的形态学和生长状态变化。传 1 代后,待细胞爬片后行 α-SMA 免疫细胞化学染色鉴定。通过 α-SMA 阳性细胞数计算 HSCs 纯度,细胞纯度(%) = α-SMA 阳性细胞/细胞总数 × 100%。

结 果

HSCs 的鉴定结果:(1)细胞产量与存活率:10 只 SD 大鼠,体质量 520.10 ± 39.58g,HSCs 产量约为 8.2 × 10⁶ 个/只,用台盼蓝染色鉴定,细胞存活率均 > 90%。(2)形态学观察:在倒置相差显微镜下,刚分离未贴壁的 HSCs 呈圆形,胞质含折光颗粒,体积明显小于肝细胞;在倒置荧光显微镜下呈现蓝绿色荧光,纯度达 85% 以上。4~6h 后部分细胞贴壁,呈椭圆形,少量细胞开始伸出伪足。培养 24h 后,大部分细胞贴壁,开始伸展生长(图 2A),90% 以上的细胞在倒置荧光显微镜下可观察到极易淬灭的蓝绿色荧光。培养至 4~5 天,细胞呈典型的星形或多边形或纺锤形,内含大量脂滴(图 2B 和 C)。培养 7 天后,HSCs 已充分展开,体积明显增大,胞质内颗粒显著减少,细胞渐渐融合,呈集落生长(图 2D)。培养至 11~14 天,细胞由集落生长转为单层生长,铺满培养瓶底,细胞呈典型的肌成纤维细胞样形态,胞质内脂滴消失(图 2E)。(3)α-SMA 免疫细胞化学染色:新分离的肝星状细胞 α-SMA 染色阴性;传 1 代后(P1),α-SMA 阳性细胞数 > 95%(图 3)。

讨 论

目前国内外不同学者关于大鼠 HSCs 提取的方法报道较多^[4-6],但多采用原位灌注肝脏和密度梯度离心相结合的方法。因此,建立简单、经济、便捷的 HSCs 提取技术,对研究其在肝纤维化和免疫应答中的可能机制具有重要意义。我们经过多次实践成功提取出 HSCs,并总结出影响 HSCs 提取的主要因素,如下述:

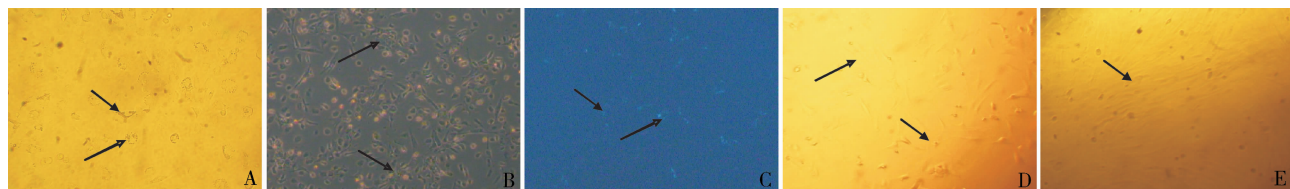
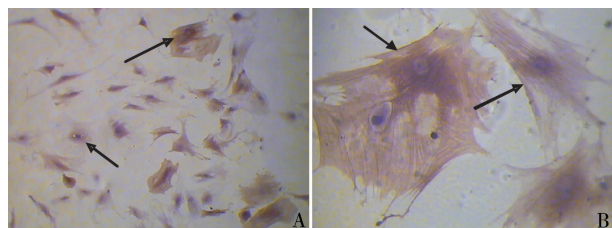


图2 HSCs 形态学观察

A. 48h (×250); B. 4 天 (×100); C. 4 天自发免疫荧光 (×100); D. 7 天呈集落生长 (×250); E. 11 天呈成纤维样细胞形态 (×250)

图3 P14 天行 α -SMA 免疫细胞化学染色

A. ×100; B. ×400

1. 大鼠的体重:一般选择体重大于 350g 的大鼠;本研究选用 400g 以上且小于 600g, 营养条件较好的大鼠。

2. 原位灌注及灌流速度:门静脉插管注意要快、准,避免凝血,切忌插管过深,一方面避免穿破肝脏,另一方面能确保每个肝叶的良好灌注;从插管成功到原位灌注的时间控制在 20 ~ 30min 内。前灌流时速度应较酶灌注时要快,且前灌注液中添加 EGTA,有利于快速冲洗出肝脏内的血液和 Ca^{2+} 等;酶灌注的速度稍慢,有利于酶液和肝脏的充分接触,利于消化;我们采用注射器手工静脉推注利于掌控灌流压力及灌流速度。在整个灌流过程中,避免空气进去形成栓塞,导致肝脏灌注不充分。局部循环不良处,可用棉签轻轻触摸改善循环。另外,尽可能结扎肝脏周边的侧支循环,以减少灌注时酶液的丢失。

3. 单细胞悬液的制备:HSCs 易与肝脏中其他细胞间发生黏附,导致细胞产量降低,因此在低速离心前,单细胞悬液的制备,对于 HSCs 的纯化非常重要。消化过程中,肝实质细胞的破坏会释放大量的 DNA,增加细胞间的黏附。本研究使用 DNase I 体外消化 20min,尽可能消除释放的 DNA,减少细胞黏附。在梯度离心前,额外添加 D-Hanks 液,补满离心管至 50ml,重悬细胞 2 ~ 3min,利于形成单细胞悬液。另外,采用的离心稀释液,有利于细胞代谢及减少细胞的损伤与黏附现象。

4. 酶及酶浓度的选择:采用肝脏在体原位 Pronase E 和 Collagenase IV 连续非循环灌注,结合体外振

荡消化的方法,胶原酶浓度较文献上报道的 1mg/ml 低,减少了酶的用量,又易于控制消化的程度。Pronase E 能选择性消化肝实质细胞,浓度较低,对 HSCs 不会有太大的损伤,再用 37℃ 振荡消化 20min 加低速离心法去除残余的肝实质细胞的方法,提高了 HSCs 的纯度及产量。

5. 梯度离心介质的选择:目前较常用的梯度离心介质包括 Percoll、Nycodenz 和 Optiprep。本研究采用 Optiprep,为无菌液体,操作简便,仅需按说明书稀释即可使用,更易于精确控制浓度并提高细胞纯度与产量。

6. 减少杂细胞的干扰:取下肝组织时,应尽可能剔除肝包膜和结缔组织,减少了成纤维细胞和内皮细胞的混杂。同时采用 15%、11.5% Optiprep 和 D-Hanks 3 层介质,以保证能形成明显的细胞条带。在梯度离心前,需将离心机设置成慢刹车状态,避免快速制动后层面发生混杂;在梯度离心后,须缓慢垂直吸取界面细胞层,尽量少吸取界面下的 Kuffer 细胞。

HSCs 提取成功的关键,在于整个操作步骤的熟练和操作时间的缩短。本研究合理改进了提取的细节,降低了酶的用量,灌注更加充分、均匀,且方法简单、经济、实用,细胞产量及成活率较高。

参考文献

- 1 Friedman SL. Liver fibrosis - from bench to bedside [J]. J Hepatol, 2003, 38 (Suppl 1): S38 - 53
- 2 Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, et al. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension [J]. Gut, 2002, 50 (4): 571 - 581
- 3 Winau F, Hegasy G, Weiskirchen R, et al. Ito cells are liver - resident antigen - presenting cells for activating T cell responses [J]. Immunity, 2007, 26: 117 - 129
- 4 Weiskirchen R, Gressner AM. Isolation and culture of hepatic stellate cells [J]. Method Mol Med, 2005, 117: 99 - 113
- 5 丁芹,顾琳,杨绍基,等. SD 大鼠肝脏星状细胞分离培养及方法的改进 [J]. 实用医学杂志 2007, 23 (18): 2830 - 2832
- 6 张强,陈曦,苏畅,等. 小鼠肝星状细胞的分离、培养及鉴定方法 [J]. J Surg Concepts Pract, 2009, 14 (1): 46 - 48

(收稿日期:2012 - 05 - 19)

(修回日期:2012 - 06 - 28)