

大鼠肝星状细胞分离纯化方法的改进

范建华(上海市黄浦区中心医院消化科 200002)

【摘要】 目的 研究肝损伤后细胞基质的沉积及纤维化形成机制,建立一种经济、简便、可靠的分离大鼠肝星状细胞(HSC)的方法。方法 用链霉蛋白酶和胶原酶灌注大鼠肝脏,Optiprep 密度梯度离心分离 HSC,并进行体外培养。结果 细胞得率为 5.0×10^7 /鼠,活率和纯度分别为 98%、96%。结论 该方法简便、实用、稳定、可靠,为进一步研究 HSC 与肝纤维化的关系,尤其是细胞水平及分子生物学水平的研究奠定了基础。

【关键词】 肝星状细胞; 肝纤维化; 密度梯度离心

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.02.009 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)02-0147-02

Improvement in isolation and purification of SD rat hepatic stellate cells FAN Jian-hua (Huangpu Distract Central Hospital, Shanghai 200002, China)

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism of matrix accumulation and hepatic fibrosis and to develop an economic, simple and reliable method for isolation of hepatic stellate cells(HSCs) in rats. **Methods** HSCs were isolated from liver of rat by perfusion with pronase and collagenase, and were separated from other cells by density gradient centrifugation with Optiprep. The purity of HSCs were cultured in vitro. **Results** The yield of rat HSCs was 5.0×10^7 /per rat. The cell viability was 98% and the purity of cell was 96%. **Conclusion** This method for isolating and culturing HSCs is simple, practical, stable and reliable, which settles the foundation of further research of the relationship between HSCs with hepatic fibrosis, particularly the research of cellular level and molecular biology level.

【Key words】 hepatic stellate cells; hepatic fibrosis; density gradient centrifugation

肝纤维化是肝脏纤维组织过度沉积,纤维增生和分解不平衡的结果,而肝星状细胞(HSC)的活化和增殖是肝纤维化形成的中心环节^[1-2]。在正常肝脏中,HSC 处于静止状态,主要作用是储存和代谢维生素 A,不表达 α 平滑肌肌动蛋白(α -Sma),增殖活性低,合成胶原能力低。HSC 的激活是由静止的 HSC 向肌成纤维细胞(MFB)转化的过程。激活后的 HSC 表现为纤维母细胞样表型,失去胞质内的脂滴,合成 I 型、III 型胶原增多,并分泌 TIMP-1、TIMP-2,抑制胶原的降解,释放多种细胞因子,继而导致细胞外基质的沉积、肝脏结构改建、肝纤维化发生^[3-4]。因此 HSC 成为研究肝损伤后纤维化形成的中心环节。

现阶段研究 HSC 活化的模型一般为体外分离纯化,通过体外培养活化研究 HSC 的活化机制,但是大鼠的 HSC 分离纯化是一个操作复杂的过程,往往出现分离失败或细胞得率低等结果^[5-6]。因此探讨简便、高效的分离纯化 HSC 的方法对临床研究肝纤维化的形成机制非常重要。作者在总结前人纯化方法的基础上,提出了链霉蛋白酶、胶原酶原位灌注、Optiprep 密度梯度离心的分离纯化方法,得到了高纯度、高效率的大鼠的 HSC。

1 材料与与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 体质量约 250~300 g 清洁级雄性 SD 鼠,购自复旦大学上海医学院实验动物中心。实验前禁食 24 h。

1.1.2 主要试剂 链霉蛋白酶(Roche); IV 型胶原酶(invitrogen); 脱氧核糖核酸酶(DNase I)(Takara); DMEM 高糖培养基、DMEM-F12 培养基; D-hanks(上海生物工程有限公司)胎牛血清; 胰蛋白酶(100 \times)(Gibco 生物试剂公司); Optiprep 密度梯度离心分离液(Axis-Shield PoC AS), α -Sma, Desmin 抗体购自 Abcam。

1.2 实验方法

1.2.1 原位消化 SD 大鼠约 250~300 g 用戊巴比妥钠 600 μ L 腹腔注射麻醉,仰卧固定。75%乙醇消毒皮毛,先剪去外层

毛发,而后十字形剖腹术暴露内脏、门静脉,于近肝脏处穿细丝线和远肝处穿粗丝线,同时暴露下腔静脉,于近肝处穿粗丝线,18G 留置针行门静脉穿刺,退出针芯,结扎两处丝线固定留置管。留置管与通过蠕动泵的管子连接,用不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 D-hanks 灌注,以冲洗肝脏血液及 Ca^{2+} ,灌注速度为 60 r/min。肝脏肿胀变大,颜色由深红变黄,停止灌注,沿远离肝脏部位(穿丝线的远肝处)剪开下腔静脉,放出血液和 D-hanks 液的混合液,如上反复灌注几次直到肝脏颜色变白,换预热到 37 $^{\circ}C$ 的链霉蛋白酶灌注,待肝脏膨胀变硬后,扎紧下腔静脉处的丝线,让酶液在肝组织中停留并充分消化肝实质细胞,反复消化几次后,换 IV 型胶原酶灌注,消化肝脏胶原等结缔组织成分,方法同前,待肝脏软化后停止灌注。

1.2.2 细胞分散 快速摘下肝脏,撕除肝包膜及结缔组织,放入 50 mL 盛有胶原酶/链霉蛋白酶分散液的硅化三角烧瓶内,加入 4 μ L DNA 酶溶液,200 r/min,37 $^{\circ}C$,恒温振荡 20 min,通过机械用力及酶消化进一步分散肝脏组织细胞。

1.2.3 细胞纯化 将振荡分散后的细胞悬液通过 200 目细胞过滤筛过滤入 50 mL 聚丙烯离心管。每管加入 0.5~1.0 μ L DNA 酶溶液,4 $^{\circ}C$,500 rcf,3 min,离心洗涤 2~3 次,至上清液较清澈,保留上清液。然后 4 $^{\circ}C$,500 rcf,7 min,离心洗涤 3~4 次,弃上清液。将细胞合为一管,小心吸弃上清液,加 0.5~1.0 μ L DNA 酶溶液。以 DMEM 配制 40% Optiprep 工作液、12% Optiprep 分离液,以 40% Optiprep 工作液悬浮细胞调节 Optiprep 终浓度为 15%。在此混合液上铺加等体积 12% Optiprep 分离液,再铺加一层 DMEM,然后 4 $^{\circ}C$ 、1 450 rcf,17 min 密度梯度离心,垂直位取下离心管,仔细吸取 DMEM 与 12% Optiprep 分离液界面之间的细胞,再以 DMEM 4 $^{\circ}C$,500 rcf,7 min,洗涤离心 2 次,弃上清液,以 20% 小牛血清 DMEM-F12 全细胞培养液悬浮细胞。培养 30 min 后,镜下观察细胞,发现有部分圆饼形的细胞贴壁,此为 Kupffer 细胞。收集未贴壁的细胞铺板培养,第 2 天发现部分细胞贴壁,细胞中含有反光强

烈的圆点,此为 HSC。

1.2.4 定量 PCR Trizol (invitrogene, USA) 提取细胞总 RNA,用反转录试剂盒(Takara, Japan)合成 cDNA 作为定量 PCR 的模板,RNA 提取和反转录的步骤具体见制造公司的说明书。PCR 定量的方法为 SYBR® 相对定量法,定量试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq Kit 购自 Takara 公司,实验所用的仪器为 Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System,具体操作过程见制造公司的说明书。基因表达量的计算采用 $\Delta\Delta Ct$ 方法,内参基因为 β -actin。所需引物分别如下:colla 引物顺序如下,上游:5'-GAGACTACGGCAAGTA-3';下游:5'-CCTC-CAACGTTTATGG-3'; Acta2 引物如下,上游:AGC-CAGTCGCCATCAGGAACCT,下游:GGACGTCCCACGAT-GGATGGGA; Desmin 引物如下,上游:TCAAGGCAC-CAACGACT,下游:GGTCTGGATGGAAGTTGAT; Mmp2 引物如下,上游:ACTTCCCCGGGTGGCTGGAG,下游:CT-GAGGTCTGCTGGCTGTGCC; β -actin 引物如下,上游:CTA-CAATGAGCTGCGTGTGG,下游:AAG GAA GGC TGG AAG AGT GC。

1.2.5 免疫荧光鉴定大鼠 HSC 吸尽 6 孔板内的培养液加入 1 mL 的 5% 多聚甲醛固定 10 min 或更长时间(可 4 °C 固定过夜)。去固定液,用洗涤液洗 3 次,每次 3~5 min,吸尽液体。洗涤时宜用摇床,或手动晃动数次。用封闭液封闭 60 min 后去封闭液,用稀释的特定一抗作用 60 min,为增强与一抗的结合,可以 4 °C 作用过夜。去除一抗,用洗涤液洗涤 3~5 次,每次 3~5 min。去除洗涤液,加入 1 mL 稀释好的荧光标记的二抗作用 60 min,回收荧光标记的二抗,用洗涤液洗涤 3~5 次,每次 3~5 min。然后加入 DAPI 染液 1 mL 作用 5 min,去除 DAPI 染液,用洗涤液洗涤 3~5 次,每次 3~5 min,荧光显微镜下观察,拍照。

2 结 果

2.1 新鲜 HSC 产量、纯度、活率 本研究采用门静脉-下腔静脉插管,胶原酶、链霉菌蛋白酶原位循环灌注消化肝脏,经梯度离心法分离 SD 大鼠 HSC,平均每只大鼠体质量 250~300 g,每只鼠肝约获取 5.0×10^7 个 HSC,活率、纯度平均为 98%、96%。

2.2 大鼠 HSC 的体外活化 新鲜分离的 HSC:胞质内脂滴丰富,透光度好,小圆形。原代培养的 HSCs,4 h 贴壁,扁圆形,7 d 融合、变长、分裂、增殖,向肌成纤维细胞发展,胞体仍较大、胞质内折光颗粒减少、部分细胞融合成片状,10~14 d 长成单层。传代培养的 HSCs,3 h 内贴壁、少量伸出伪足,24 h 全部伸展生长,3 d 呈肌成纤维样细胞,7 d 长成单层。传代生长 10 代以上,细胞增殖及转分化状态仍良好(图 1)。分离纯化的大鼠 HSC 培养 24 h 贴壁,细胞的形状呈扁圆形,随着培养时间的延长细胞逐渐伸长、分裂,形状像成纤维细胞,7 d 后相互融合交联,10 d 后长成一个一个克隆,消化传代后,3 h 贴壁,细胞生长状态良好(图 1)。

2.3 HSC 的性质鉴定

2.3.1 定量 PCR 结果 与培养 3 d 的 HSC 相比,培养 7 d 的 HSC 的 ACTA2、Col1a2、Desmin、MMP2 等活化相关基因的表达明显增高,说明随着培养时间的延长,HSC 由静止状态向活化状态转化(图 2)。定量 PCR 结果显示,与培养 3 d 的 HSC 相比,培养 7 d 的 HSC 的 ACTA2、Col1a2、Desmin、MMP2 等活化相关基因的表达明显增高,说明随着培养时间的延长,HSC 由静止状态向活化状态转化。

2.3.2 分离纯化后的 HSC 进行 Desmin 和 α -Sma 免疫荧光检

测 分离 1 d 贴壁的 HSC 检测到 Desmin 表达,而没有检测到 α -Sma 表达。随着培养天数的增加, α -Sma 表达量逐渐增强(图 3)。

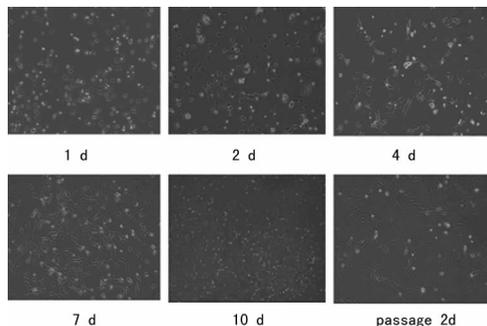


图 1 大鼠 HSC 体外活化过程

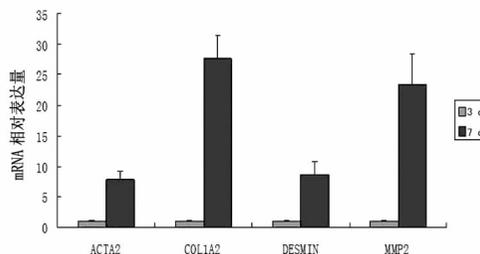


图 2 大鼠 HSC 活化的基因表达鉴定

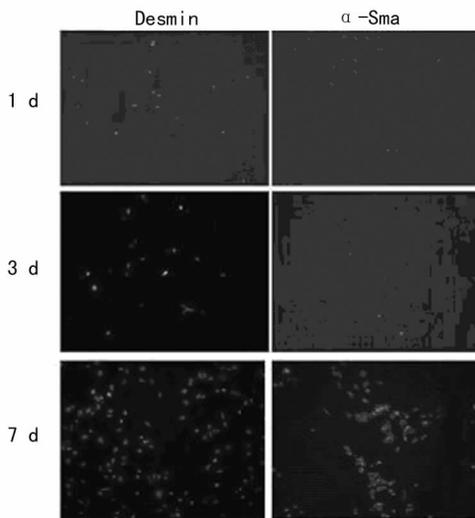


图 3 免疫荧光鉴定大鼠 HSC 体外活化

3 讨 论

大鼠 HSC 分离纯化自 Knook 等^[7]开始至今已有多重分离方法,其基本原理均是采用链霉菌蛋白酶灌注去除肝实质细胞,胶原蛋白酶 IV 灌注去除肝脏胶原纤维缔结组织;灌注方法分为原位灌注和体外灌注。原位灌注因为可以使灌注的酶液更好地接触肝细胞,更好地保持细胞的活力,是使用比较多的分离方法,但是原位灌注也有比较浪费酶液、结扎血管过多、操作困难、容易导致实验失败等缺点。针对原位灌注的这些缺点,本研究进行了有效的改进,提高了分离纯化的成功率,获得了比较高的细胞分离数量,纯度和比较高的细胞活力。具体改进方法总结为:(1)留置管插管后采用三点固定的方法,这样在高速灌注液流过后,留置管不容易脱落,下腔静脉近肝端结扎口随需要而关闭打开,即保证灌注液有充分的压力到达肝叶边缘,保证整个肝脏的充分灌注,充分冲刷出肝(下转第 150 页)

3 讨 论

PreS1Ag 是 PreS1 基因编码的外壳表面抗原蛋白成分之一,与 HBV 的组装、分泌和入侵肝细胞密切相关^[3],PreS1Ag 的持续存在提示病毒复制和病毒颗粒存在。近年来,它已成为一种新的 HBV 检测标志物。HBeAg 曾被认为是反映病毒复制的灵敏指标^[4],但有研究证实,HBV 感染宿主后,为逃避免疫应答而发生前 C 区与 C 区基因的突变,使 HBeAg 分泌减少^[5]。因此,HBeAg 阴性并不意味着 HBV 被清除或复制水平的降低^[6]。

本检测中 HBeAg 阴性组 PreS1Ag 和 HBV DNA 阳性率分别为 54.7% 和 55.7%,HBeAg 阳性组中 PreS1Ag 和 HBV DNA 阳性率分别为 87.20% 和 91.0%,说明 PreS1Ag 比 HBeAg 能更准确、灵敏地反映 HBV 的感染及复制,且与金标准 HBV DNA 有更高的符合率,与相关报道一致^[7]。

综上所述,本试验再次证实了 HBeAg 阴性患者仍可能存在病毒复制,而 PreS1Ag 检测可能比 HBeAg 更有意义。PCR 检测 HBV DNA 虽然灵敏度、特异度均高,但对实验条件要求较高、费用偏贵,许多基层医疗单位未能开展。PreS1Ag 可通过双抗体夹心法测定,对实验条件相对低且费用更低,因此 PreS1Ag 是反映 HBV 复制且检测简便、理想的血清学指标,尤其在病毒发生变异后,HBeAg 阴转仍存在病毒复制可能时有特别的价值,对指导抗病毒治疗具有重要的临床意义。在一些未开展 HBV DNA 检测的医院,可作为 PCR 检测 HBV DNA,诊断 HBV 是否复制等的替代方法。

参考文献

[1] 蔡木发,吴显劲,李静,300 例 HBV 前 S1 抗原与 HBV 标

志物及 HBV DNA 检测结果分析[J]. 检验医学与临床, 2011,8(10):1177-1178.

[2] 贾继东. 乙型肝炎 e 抗原阴性慢性乙型肝炎的治疗[J]. 中华肝脏病杂志,2005,13(7):539.

[3] Hu WG, Wei J, Yang XX, et al. Expression of overlapping PreS1 fragment recombinant proteins for the determination of immunogenic domains in HBsAg PreS1 region[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2004, 36(6):397-404.

[4] 郭卉,董瑶佳,刘晓峰,等. 乙肝血清学标志物与 HBV-DNA 含量关系的分析[J]. 实验与检验医学, 2010, 28(4):417-418.

[5] FunK ML, Rosenberg DM, Lok AS. World-wide epidemiology of HbeAg-negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variants [J]. Viral Hepat, 2002,9(1):52-61.

[6] 陈恺杰. 乙型肝炎病毒外膜大蛋白的检测及其临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(7):658-660.

[7] 韩昌洪,陈瑶. HBV PreS1 蛋白及 HBV DNA 含量检测在诊断乙型肝炎病毒复制中的临床意义[J]. 海南医学院学报, 2009, 15(9):1052-1054.

(收稿日期:2011-08-03)

(上接第 148 页)

脏内的血液和影响酶消化的 Ca²⁺,又可以在灌注酶液后扎紧结扎口,使酶液充分灌注到肝脏的每个部分,充分消化肝实质细胞和胶原,有利于后续细胞的分散。(2)细胞铺板后 30 min,收集未贴壁的细胞重新铺板,有效去除 Kupffer 细胞的影响,因为 Kupffer 细胞和 HSC 的沉降系数相似,因此分离纯化的 HSC 中往往含有 Kupffer 细胞,影响细胞的纯度^[8],这一直是困扰研究者的一个难题。本研究根据 Kupffer 细胞比较容易贴壁的特点,一般铺板 30 min 可以贴壁,而此时大部分 HSC 没有贴壁,因此,此时用一步去除大部分 Kupffer 的干扰,增加了 HSC 的纯度。(3)选用液体的 Optiprep 梯度分离液。传统的分离液为固体 Nycodenz,配置过程需滤过除菌,操作复杂;而 Optiprep 为无菌液体,使用时仅需按要求稀释,操作简便,更加容易精确控制浓度。(4)吸取密度梯度分离后的细胞时,尽量少地吸取细胞层下面介质中的细胞,可以防止 Kupffer 细胞和其他非实质细胞的影响。

总之,本研究摸索出的这一套 HSC 分离培养及鉴定方法,经多次实验证实,在保证 HSC 纯度的同时,提高了产量和活率,为进一步研究 HSC 在肝损伤后细胞基质的沉积及纤维化的形成奠定了基础。

参考文献

[1] 尤金·R·希夫,迈尔·F·索雷尔,威利斯·C·马德里. 希夫肝脏病学[M]. 黄志强,译. 9 版. 北京:化学工业出版社医学图书出版中心,2006:367-374.

[2] Friedman SL. Hepatic stellate cell: peotean, multifunctional and enigmatic cells of the liver[J]. Physiol Rev, 2008, 88(3):125-172.

[3] Wu J, Zern MA. Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis[J]. J Gastroenterol, 2000, 35(9):665-672.

[4] Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, et al. Molecular mechanism of the reversibility of hepatic fibrosis: with special reference to the role of matrix metalloproteinases[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2000, 15(Suppl):D26-D32.

[5] Winau F, Quack C, Darmoise A, et al. Starring stellate cells in liver immunology[J]. Curr Opin Immunol, 2008, 20(20):68-74.

[6] Chen CH, Kuo LM, Chang Y, et al. In vivo immune modulatory activity of hepatic stellate cells in mice[J]. Hepatology, 2006, 44(5):1171-1181.

[7] Knook DL, Seffelaar AM, Delleuwa M. Fat-storing cells of the rat liver: their isolation and purification[J]. Exp Cell Res, 1982, 139(2):468-471.

[8] 张志奇,邱江锋,赵刚,等. 大鼠肝星状细胞和库普弗细胞的分离培养及鉴定[J]. 中华消化外科杂志, 2009, 8(2):149-150.

(收稿日期:2011-07-14)