文章编号:1000-5404(2006)06-0515-03

论著

原代培养大鼠肝窦内皮细胞凋亡的检测及意义

朱 瑾,陈 平,李晓武,熊 燕,董家鸿 (第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所,全军肝脏移植重点实验室,重庆 400038)

提 要: 目的 检测原代分离培养肝窦内皮细胞(sinusoidal endothelial cells, SECs)的凋亡状况。**方法** 用胶原酶灌注结合 Percoll 密度梯度离心加选择性贴壁的方法分离 SEC;用光镜形态学、Ⅷ因子和 CD14 免疫细胞化学染色及 RECA-1 单抗间接免疫荧光法及 SEM 鉴定 SEC ;采用 TEM 及 Annexin Ⅴ联合 PI 双染的方法检测 SEC 的凋亡。**结果** 分离培养的 SEC 得率为$(2.06 \pm 0.35) \times 10^7$/只大鼠,活力≥92%,纯度达 90%;光镜下细胞形态典型, Ⅷ因子染色阴性而 CD14 染色阳性, RECA-1 单抗间接免疫荧光染色阳性, SEM 下可见 SEC 表面具有典型的窗孔结构;即使在培养基中加入 ECGF, TEM 下仍可观察到 SEC 出现凋亡的典型形态特征,且随培养时间延长,凋亡率明显升高, 培养 12 h 的 SEC 凋亡率与新鲜分离的相比,差异已具有显著性($F = 53.11$, $P < 0.05$)。**结论** 体外培养的 SEC 存在明显的自发凋亡,且这种凋亡呈生长因子抵抗性。

关键词: 肝窦内皮细胞;细胞培养;凋亡
中图法分类号: R322.47;R329.2;R329.28 **文献标识码**: A

Detection and significance of apoptosis in primary cultured rat sinusoidal endothelial cells

ZHU Jin, CHEN Ping, LI Xiao-wu, XIONG Yan, DONG Jia-hong (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To measure the apoptosis of primary cultured sinusoidal endothelial cells (SECs) in rats. **Methods** SECs were isolated by collagenase perfusion combined with isopycnic centrifugation in a two-step percoll gradient and selective adherence, and identified by morphologic observation under light microscope, by immunocytochemistry for CD14 and Ⅷ-factor related antigen, by immunofluorescence staining for RECA-1 and fenestrations under SEM. Apoptosis of SECs was observed by the typical morphology and measured by FACS analysis after staining with Annexin Ⅴ and PI. **Results** The yield of the SECs after selective adherence was $(2.06 \pm 0.35) \times 10^7$/rat, and the viability and purity was 92% and 90% respectively. The isolated SECs had typical morphology, positive for CD14 and negative for Ⅷ-factor related antigen. Immunofluorescence staining revealed that SEC was positive for RECA-1 and fenestrae existed on the surface of the SEC under SEM. The typical morphologic characteristic of apoptosis could be observed in cultured SECs through TEM, and the rate of apoptosis increased obviously along with the time even in the presence of ECGF. After 12-hour culture, the rate of apoptosis was significantly different from that of the freshly isolated SECs ($F = 53.11$, $P < 0.05$). **Conclusion** Apoptosis occurred in cultured SECs spontaneously even in the presence of growth factor.

Key words: sinusoidal endothelial cells; cell culture; apoptosis

大鼠肝窦内皮细胞(sinusoidal endothelial cells, SECs)占肝脏非实质细胞的40%,位于肝窦腔与 Disse 间隙之间,是肝内物质交换的屏障。SEC 因富含窗孔结构、缺乏隔膜、内皮下缺少基底膜而与普通血管内皮细胞不同。SEC 在肝脏的生理、病理及器官移植过程中具有非常重要的作用。但由于原代分离培养的 SEC 不能在体外长期存活,限制了对其生物学功能的深入研究。本研究旨在检测体外培养大鼠 SEC 的凋亡状况,从而探寻其培养困难的原因,为 SEC 凋亡机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物及主要试剂

雄性 SD 大鼠 40 只,体质量 280 ~ 300 g,购自上海西普尔

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070746)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30070746)
作者简介:朱 瑾(1969 -),女,重庆市人,博士,助理研究员,主要从事肝移植及肝再生方面的研究。电话:(023)68765308
通讯作者:董家鸿, 电话:(023)68754168,E-mail: jhdong@hbsky.com.cn
收稿日期:2005-07-13;**修回日期**:2006-01-10

必凯实验动物有限公司。主要试剂中 collagenaseⅣ、GBSS、Latex Beads 购自美国 Sigma 公司，胶原 S、DNase Ⅰ、内皮细胞生长因子(ECGF，Cat. No. 1033476)、Annexin-Ⅴ-Fluos 试剂盒购自美国罗氏公司，DMEM 为 GIBCO 产品，Percoll 购自美国 Pharmacia 公司，CD14 多抗(美国 Santa cruz)由重庆医科大学龚建平教授惠赠，大鼠内皮细胞单抗 RECA-1 购自美国 SANBIO 公司。

1.2 主要仪器

BeckmanCS-15R 高速冷冻离心机，Olympus 倒置相差显微镜及照相系统。莱卡 DMIRB 倒置荧光显微镜，Amray1000B 扫描电镜，TECNAI10 透射电镜，FACSort 流式细胞仪。

1.3 SEC 的原代分离培养

SEC 的原代分离培养参照 Braet 的方法[1]并加以改进。肝脏用 0.5% 的Ⅳ型胶原酶原位结合离体灌注，经差速离心收集非实质细胞，经 Percoll 密度梯度离心(900 × *g*，20 min)，小心收集 50% 与 25% Percoll 界面层的富含 SEC 的混浊带，经离心洗涤(900 × *g*，10 min)，用 10 ml DMEM 条件培养基(5% FBS，ECGF 10 ng/ml)悬浮沉淀细胞，调整细胞浓度为(1.2 ~ 1.5) × 10^6/ml，加入 24 孔板，每孔 1 ml，经 37 ℃，5% CO_2 条件下孵育 20 min，待枯否细胞选择性贴壁后，收集未贴壁细胞悬液，作计数，0.4% 台盼蓝染色判断细胞活力，将此悬液加入 24 孔板(孔底置有胶原包被的小盖玻片)，CO_2 孵箱孵育 5 h 后换液。此后每 2 d 换液 1 次。

1.4 培养 SEC 的鉴定

倒置显微镜下观察 SEC 的大小及形态学改变，培养 48 h 后用 Latex Beads 胶乳颗粒吞噬实验和过氧化酶染色鉴定枯否细胞，结蛋白染色鉴定储脂细胞，Ⅷ因子和 CD14 多抗免疫细胞化学染色及 RECA-1 单抗免疫荧光法鉴定 SEC(以 PBS 取代一抗作阴性对照)。此外，于培养 48 h 后，取出贴有 SEC 的小盖片，PBS 轻洗 2 次，2.5% 戊二醛固定、CO_2 临界点干燥，离子溅射，Amray1000B 型扫描电镜(SEM)观察 SEC 的窗孔结构。

1.5 透射电镜(TEM)观察凋亡 SEC 的形态学特征

细胞刮轻刮下培养 24 h 的 SEC，PBS 洗涤，2.5% 戊二醛固定，常规制样法进行 TEM 观察。

1.6 SEC 凋亡的检测

用细胞刮轻刮下培养不同时间的 SEC，按罗氏凋亡检测试剂盒说明制备样品。即 PBS 离心洗涤(200 × *g*，5 min)，去上清，沉淀悬于 100 μl 反应缓冲液中，混匀，再依次加入 2 μl Annexin Ⅴ-Fluos 标记试剂和 2 μl PI，15 ~ 25 ℃孵育 10 min，用流式细胞仪检测凋亡细胞，每一时相点重复检测 5 次。

1.7 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 Percoll 密度梯度离心后的分层

Percoll 密度梯度离心后形成 4 个可见带，加样层与 25% Percoll 之间的混浊带为细胞碎片带，25% 与 50% Percoll 之间的混浊带为富含 SEC 带，枯否细胞布满整个 50% Percoll 层，底部沉淀为红细胞，未定类细胞及白色结晶状物。

2.2 SEC 细胞得率、活力及形态学变化

经多次实验，梯度离心后 SEC 得率为(2.79 ± 0.63) × 10^7/只大鼠，经选择性贴壁后得率为(2.06 ± 0.35) × 10^7/只大鼠，经台盼蓝染色细胞活力为 92% ~ 95%。大部分细胞光镜下为小圆形，大小均一，2 h 后开始贴壁，出现三角形或不规则形，5 h后已有典型形态细胞出现，8 h 后细胞成团，形成单层卵石样结构，密度较稀的部位出现树枝状或网状相连，此为 SEC 的特征排列，随着时间延长，SEC 形态逐渐变典型，呈梭形，细胞边缘清楚，细胞核突起位于中央。

2.3 SEC 的鉴定

经鉴定培养的 SEC 中枯否细胞占 6% 左右，储脂细胞占 4% 左右。大部分细胞 CD14 染色阳性而Ⅷ因子染色为阴性，阳性染色位于细胞质。经 RECA-1 单抗间接免疫荧光法鉴定，90% 的细胞荧光染色阳性。扫描电镜观察到培养 48 h 的 SEC 表面具有大量呈筛状排列的窗孔结构，直径为 150 ~ 300 nm。见图 1。因此培养 48 h 的 SEC 纯度可达 90% 左右。

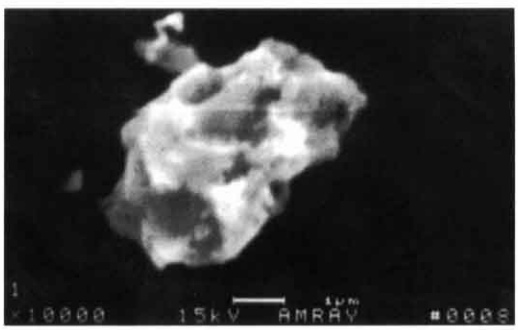


图1 扫描电镜下，培养 48 h 的 SEC 表面出现大量窗孔结构，直径为 150 ~ 300 nm (Bar = 1 μm)

2.4 TEM 观察 SEC 的凋亡

电镜下显示 SEC 呈扁平状或卵圆形，细胞质内细胞器较少，空泡较多，偶见吞饮小泡及电子致密物。核染色质浓缩，聚集于核膜下或细胞中央，核中出现透明区，此为凋亡的早期形态学改变。如图 2。

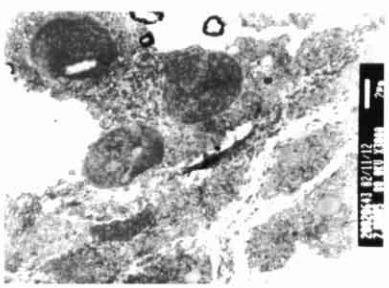
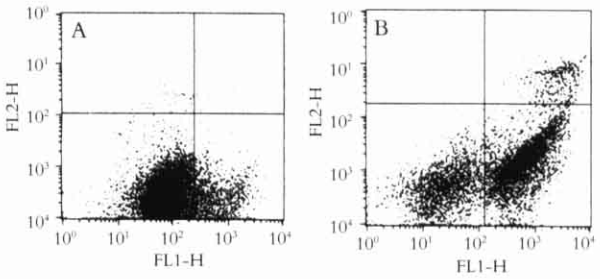


图2 TEM 下，培养 24 h 的 SEC 出现凋亡的形态学特征 (Bar = 2 μm)

2.5 SEC 的凋亡检测

新鲜分离的 SEC 凋亡率为(7.36 ± 1.40)%，随着培养时间的延长，凋亡率明显升高，4 h 和 12 h 的凋亡率分别为(12.63 ± 4.39)% 和(35.35 ± 8.65)%。24 h 凋亡率达高峰，峰值为(83.37 ± 8.27)%，48 h 略有降低，以后又逐渐升高。培养 12 h 的 SEC 凋亡率与新鲜分离的相比，差异已具有显著性($F = 53.11$，$P < 0.05$)(图 3)。



A：培养4 h的SEC；B：培养72 h的SEC

图3　流式细胞仪 Annexin V 联合 PI 双染检测 SEC 凋亡

3　讨论

SEC因表面具有大量窗孔结构而不同于普通血管内皮细胞，作者用SEM观察到培养SEC表面具有大量呈筛状排列的窗孔结构，直径为150～300 nm，占SEC表面积的6%～8%，与国外报道一致[2]。此外，该研究所获得SEC的得率、活力和纯度均较高，为SEC生物学特性研究奠定了基础[3]。

作者研究发现原代分离培养的SEC不能在体外长期存活，即使改善培养条件如涂加胶原促进贴壁，培养基中加入胎牛血清及内皮细胞生长因子等，也未见明显效果。通常培养24 h后就有大量细胞开始从培养板底脱落，漂浮，这与国外报道[1]一致。Takahashi等[4]研究发现，原代培养的SEC即使在VEGF存在的条件下，分裂2～3代后也开始死亡，这与细胞正常的衰老死亡不同。正常的衰老死亡应当发生于细胞分裂50～60代之后。而这种生长因子抵抗的内皮细胞死亡与体内某种条件下血管重建的过程很相似，因此其研究具有重要的意义。国外有研究表明，培养8 h的SEC细胞质出现空泡状改变；Takahashi等[4]也发现在VEGF存在的条件下，培养4～7 d的SEC出现细胞体积变小，细胞质收缩，核染色质浓缩等改变，这与凋亡的形态学特征一致。提示SEC可能发生了凋亡。为探寻SEC体外培养困难的原因，作者采用TEM观察了培养SEC的形态学特征，并用敏感而特异的Annexin V联合PI双染的方法检测了SEC的凋亡状况，结果发现体外培养的SEC确实存在明显的自发凋亡，且这种凋亡呈生长因子抵抗性。

细胞凋亡也叫程序性细胞死亡，是生物体内广泛存在的一种由细胞特定基因控制的、以细胞DNA降解为特征、无明显细胞溶解的细胞自杀过程。细胞凋亡的检测方法主要有电镜形态学，琼脂糖凝胶电泳，Tunnel法，流式细胞仪检测等。其中，TEM虽是区分凋亡和坏死最可靠的方法，但由于凋亡进程非常迅速，观察到典型形态学改变的几率较低。因此常用的方法还是Tunnel法和流式细胞仪法。Annexin V联合PI双染的方法由于可区分凋亡和坏死，其检测早期凋亡较Tunnel法更为灵敏，结果更为可靠，是目前最为理想的方法。而采用双染的方法检测培养SEC的凋亡，目前国内外均少见报道。

该研究结果表明，SEC体外培养困难的原因主要是由于存在明显的自发性凋亡，提示针对凋亡的干预因素可能会延长SEC的体外存活时间。各种外源性或内源性因素均可诱导体外培养细胞凋亡[4-7]，如细胞表面受体的激活，生长因子的缺乏，辐射，低温，氧化应激，激素刺激以及细胞周期阻滞剂的使用等。但SEC凋亡的原因和机制目前并不清楚。国外研究表明，VEGF具有抑制SEC凋亡的作用，但即使VEGF存在的条件下，SEC的体外存活时间也不超过7 d[8]。Endo等[9]发现激活素A可以部分抑制SEC的凋亡，而激活素A与VEGF协同作用时其抗SEC凋亡的效果更佳。此外，已有的研究表明，在多种细胞中，PI3/Akt激酶通路是抗凋亡的重要信号转导通路之一[10]，而VEGF激活PI3激酶的能力很弱，因此选择能够高效激活PI3激酶通路的物质进行干预处理可能是对抗体外培养SEC凋亡的有效途径。

参考文献：

[1] BRAET F, DE-ZANGER R, SASAQKI T, *et al*. Assessment of a method of isolation, purification, and cultivation of rat liver sinusoidal endothelial cells[J]. Lab Invest, 1994, 70(6): 944－952.

[2] ARIAS I M, BOYER J L, CHISARI F V, *et al*. The liver: Biology and Pathology[M]. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 437－438.

[3] 朱　瑾，陈　平，熊　燕，等. 大鼠肝窦内皮细胞分离、培养及生物学特性的初步研究[J]. 消化外科，2004，3(5)：350－354.

[4] TAKAHASHI T, SHIBUYA M. The overexpression of PKCdelta is involved in vascular endothelial growth factor-resistant apoptosis in cultured primary sinusoidal endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 280(1): 415－420.

[5] GAO W, BENTLEY R C, MADDEN J F, *et al*. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation[J]. Hepatology, 1998, 27(6): 1652－1660.

[6] DOEPPNER T R, GRUNE T, DE-GROOT H, *et al*. Cold-induced apoptosis of rat liver endothelial cells: involvement of the proteasome[J]. Transplantation, 2003, 75(12): 1946－1953.

[7] KERKWEG U, JACOB M, DE-GROOT H, *et al*. Cold-induced apoptosis of rat liver endothelial cells: contribution of mitochondrial alterations[J]. Transplantation, 2003, 76(3): 501－508.

[8] MORIGA T, ARII S, TAKEDA Y, *et al*. Protection by vascular endothelial growth factor against sinusoidal endothelial damage and apoptosis induced by cold preservation[J]. Transplantation, 2000, 69(1): 141－147.

[9] ENDO D, KOGURE K, HASEGAWA Y, *et al*. Activin A augments vascular endothelial growth factor activity in promoting branching tubulogenesis in hepatic sinusoidal endothelial cells[J]. J Hepatol, 2004, 40(3): 399－404.

[10] YAO R, COOPER G M. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor[J]. Science, 1995, 267(5206): 2003－2006.

（编辑　薛国文）