维普资讯 http://www.cqvip.com

局解手术学杂志 2004年第13卷第4期
J Regional Anat & Operative Surg, 2004, Vol.13, No.4

改良法分离大鼠肝星状细胞

赵文丽[1]，姜庆久[2]，吴春莲[1]，陶富山[3]
（1.惠州市中心人民医院病理科，广东 惠州 516001；2.佳木斯大学附属第一医院病理科，黑龙江 佳木斯 154002；
3.佳木斯大学基础医学院病理学教研室，黑龙江 佳木斯 154007）

［摘 要］ **目的** 探讨一种高效、经济、稳定的肝星状细胞的分离方法，为探索肝纤维化的发生机制提供细胞模型。**方法** 采用链霉蛋白酶、胶原酶原位灌流，以 Nycodenz 为分离介质，单层一步密度梯度离心法，分离大鼠的肝星状细胞。**结果** 肝星状细胞的获得率为 3.95×10^7/只、纯度为 97%，存活率为 98%。**结论** 本法是一种较理想的分离肝星状细胞的方法。

［关键词］肝星状细胞；细胞分离；肝纤维化
［中图分类号］R329.2；Q343.6 ［文献标识码］A ［文章编号］1672－5042(2004)04－0240－03

A modified method for the isolation and culture of rat hepatic stellate cells

ZHAO Wen-li, JIANG Qin-jiu, WU Chun-lian, TAO Fu-shan
(Department of Pathology, Huizhou Center Hospital, Huizhou 516001, China)

Abstract: **Objective** To introduce a high efficient, inexpensive, and stable method for the isolation and culture of rat hepatic stellate cells (HSCs) for the purpose of providing cell model for the studies of the mechanisms of hepatic fibrosis at the cell level. **Methods** Rat HSCs were isolated by liver perfusion in situ with pronase and collagenase followed by density gradient centrifugation with Nycodenz. **Results** The harvest rate of hepatic stellate cells was 3.95×10^7 cells per liver with purity of more than 97% and viability of more than 98%. **Conclusion** This method is an ideal one for the isolation and culture of rat HSCs.

Keywords: hepatic satellate cell; cell isolation; hepatic fibrosis

肝星状细胞（hepatic stellate cell HSC）是肝脏的一种非实质细胞，目前认为，激活的 HSC 是肝纤维化时产生各种细胞外基质（ECM）成分的主要细胞[1-2]，此外，激活的 HSC 还可能在门静脉高压的形成中发挥重要的作用[3]。自从 Knook[4] 建立起大鼠的 HSC 分离纯化方法以来，对 HSC 的功能特点及激活调控机制的研究已成为近年来肝纤维化发生机制及抗肝纤维化药物研究中的热点之一。因此，建立一种高纯度、高细胞获得率的 HSC 的分离方法就成为肝纤维化研究的关键所在。但由于 HSC 的比重与枯否氏细胞和淋巴细胞有交叉，且易与肝细胞相吸附，导致分离纯化较难。作者参考国内外文献并加以改良，摸索出稳定、高产、高纯度的分离方法，现介绍如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Wistar大鼠，雄性，体重 400～450 g，购自佳木斯大学动物实验中心。普通饲料喂养，自由进食。

1.2 主要试剂

链酶蛋白酶（Pronas E 活性为 4 000 000 pu/g）为德国 Merck 公司产品，Ⅳ型胶原酶（Type Ⅳ Collagenase 活性为 512 U/mg）、DNA 酶 Ⅰ（Dnase Ⅰ 活性为 20 000 U/mg）均为美国 Sigma 公司产品，Nycodenz 为挪威 Pharmacia 公司产品，DMEM 干粉、胰蛋白酶（Trypsin）、小牛血清为美国 Gibco 公司产品，其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 分离培养用液

①EGTA 液：NaCl 8 000 mg，KCl 400 mg，$NaH_2PO_4\cdot2H_2O$ 88.17 mg，Na_2HPO_4 120.45 mg，HEPES 2 380 mg，$NaHCO_3$ 350 mg，EGTA 190 mg，Glucose 900 mg，加超纯水至终体积 1 000 ml。②酶配制液：NaCl 8 000 mg，KCl 400 mg，$NaH_2PO_4\cdot2H_2O$ 88.17 mg，Na_2HPO_4 120.45 mg，HEPES 2 380 mg，$NaHCO_3$ 350 mg，$CaCl_2\cdot2H_2O$ 560 mg，加超纯水至终体积 1 000 ml。③GBSS-A 液：KCl 370 mg，$MgCl_2\cdot6H_2O$ 210 mg，$MgSO_4\cdot7H_2O$ 70 mg，$Na_2HPO_4\cdot12H_2O$ 150 mg，KH_2PO_4 30 mg，Glucose·H_2O 1 090 mg，Glucose 991 mg，$NaHCO_3$ 227 mg，$CaCl_2\cdot2H_2O$ 225 mg，加超纯水至终体积 1 000 ml。④GBSS-B 液：NaCl 8 000 mg，KCl 370 mg，$MgCl_2\cdot6H_2O$ 210 mg，$MgSO_4\cdot7H_2O$ 70 mg，$Na_2HPO_4\cdot12H_2O$ 150 mg，KH_2PO_4 30 mg，Glucose·H_2O 1 090 mg，Glucose 991 mg，$NaHCO_3$ 227 mg，$CaCl_2\cdot2H_2O$ 225 mg，青霉素 G 105 U，链霉素 100 mg，

［作者简介］赵文丽（1970－）女，黑龙江省伊春市人，主治医师，硕士，从事肝纤维化发生机制及防治的细胞生物学方面的研究。电话：(0752)2288244，13824229305

［收稿日期］2004－03－20 ［修回日期］2004－04－26

维普资讯 http://www.cqvip.com

加超纯水至终体积1 000 ml。⑤ 0.1%链酶蛋白酶溶液(灌注用)链酶蛋白酶100 mg，酶配制液100 ml。⑥0.032%Ⅳ型胶原酶溶液(灌注用)：Ⅳ型胶原酶80 mg，酶配制液250 ml。⑦链酶蛋白酶、胶原酶溶液(分散用)：链酶蛋白酶70 mg，Ⅳ型胶原蛋白酶40 mg，分别加入酶配制液20 ml将其溶解，然后将两液合并，加入DNA酶溶液1 ml(2 mg/100ml)，再加入酶配制液59 ml。⑧DNA酶溶液：DNA酶2 mg；酶配制液100 ml。⑨Nycodenz溶液：Nycodenz 7.75 mg，GBSS-A液27 ml。⑩DMEM培养液：DMEM干粉3.7 g，小牛血清100 ml，卡那霉素100 mg，青霉素70 mg，10 mmol/L HEPES，加超纯水至终体积1 000 ml。⑪0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA消化液：胰蛋白酶500 mg，EDTA 40 mg，D-Hanks液200 ml，(pH≈7.5)。以上溶液均需抽滤灭菌并调整pH=7.35。

1.4 分离方法

大鼠经10%戊巴比妥钠1 ml/100 mg腹腔麻醉后置于超净工作台上，75%酒精消毒皮肤，U型剖腹术暴露内脏。找到门静脉，将套管针插入门静脉进并予以固定，退出针芯，开启恒流泵，流量为10 ml/ min。待ECTA液流出管道后，迅速剪断前腔静脉放血，ECTA液灌注5 min后，换成0.1%链酶蛋白酶溶液，灌注7 min后，再换成0.032% Ⅳ型胶原酶溶液，灌注约20 min后，肝脏呈现明显的黄色，包膜下肝脏组织几乎液化。快速剪下肝脏，剔除肝包膜及门脉结缔组织。将肝组织撕碎放入盛有链酶蛋白酶、胶原酶溶液(分散用)的磨口瓶中，电热恒温振荡器上进行振荡消化，37 ℃，30 min。振荡后，将细胞悬液滤过直径为150 μm的钢网，滤液4 ℃下2 000 r/min离心7.5 min。弃上清，0.2 ml DNA酶溶液振荡约2 min。补充GBSS-B液加入这2根离心管，4℃下2 000 r/min再离心7.5 min。弃上清，加入0.2 ml DNA酶溶液振荡约2 min。将两管细胞悬液合并，补充GBSS-B液使细胞悬液总体积达到67.5 ml后，倒入一个烧杯中，将Nycodenz液(7.75 g/27 ml)加入烧杯中，搅拌振荡充分混匀，此时细胞悬液总体积为94.5 ml。取8根15 ml的离心管，将细胞悬液平均分配。然后使离心管保持直立，向每根离心管仔细地贴壁加入一层GBSS-B液1 ml，4 ℃下3 000 r/min离心20 min。垂直取出离心管，仔细吸取GBSS-B液与细胞悬液之间的细胞，放入离心管内，用GBSS-B液加满离心管，4 ℃下2 000 r/min离心7.5 min，弃上清后用5 ml DMEM培养液悬浮细胞，取一滴细胞悬液于记数板上进行记数。

1.5 鉴定方法

①吸取90 μl细胞悬液，加入0.4%台盼蓝溶液10 μl，混匀后光镜下观察未着色为活细胞。②新分离的细胞悬液点涂片，置荧光显微镜下观察，HSC胞浆中的脂滴在荧光显微镜328 nm波长的紫外光激发下，呈现典型的自发荧光，将蓝绿色荧光细胞进行记数。③制备细胞爬片，用兔抗人结蛋白(Desmin)抗体，PAP法作免疫组织化学染色，胞浆阳性者为肝星状细胞。用小鼠抗α-SMA抗体，ABC法免疫组织化学染色，活化的细胞呈阳性反应。

1.6 培养方法

将细胞按1×10^6/ml的浓度接种在一次性塑料培养瓶内，在通有5% CO_2、95%潮湿空气的CO_2培养箱内培养，48 h细胞贴壁后更换培养液，以后每3～5 d换一次培养液。

1.7 传代方法

原代细胞长满单层后，吸出培养瓶内的旧培养液。向瓶内加入0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA消化液少许，以能覆盖满瓶底为限。在室温下，把培养瓶放置在倒置显微镜下观察，当发现细胞质回缩，细胞间隙增大后，立刻终止消化。吸出消化液，向瓶内加入5～10 ml Hanks液轻轻转动培养瓶，把残余消化液冲掉。用吸管吸取培养液轻轻反复吹打瓶壁细胞，使之从瓶壁脱离形成细胞悬液，记数板记数后调整细胞数$(0.1\sim0.2)\times10^6$/ml，把细胞悬液分装在数个培养瓶中，置CO_2培养箱中培养。

2 结果

2.1 肝星状细胞获得率、存活率和纯度

本实验的肝星状细胞获得率为3.95×10^7/只。以0.4%台盼蓝染色，细胞存活率为98%。Desmin免疫组织化学染色显示97%的阳性细胞。

2.2 肝星状细胞的荧光显微镜观察

初分离的肝星状细胞在波长为328 nm的紫外光激发下，呈现典型的蓝绿色自发荧光，但时间短暂，数秒内消失。

2.3 肝星状细胞的光镜形态

初分离的肝星状细胞呈圆形，体积明显小于肝细胞，胞浆内含典型的折光颗粒，为细胞内脂滴。将分离的肝星状细胞接种培养，约24 h后，细胞贴壁，呈扁圆形，胞浆内脂滴明显，少量细胞已开始伸展。48 h后，细胞变扁，直径增加3～5倍，大部分细胞伸展生长，一部分细胞出现多角伪足，呈现星状多形的典型形态。培养3～4 d后，细胞进一步伸展，直径进一步增大，核/浆比例变小，细胞突起宽而扁。随着培养时间的延长，胞浆中脂滴逐渐减少，细胞由星形向梭形转变，类似成纤维细胞。

2.4 肝星状细胞的免疫组织化学染色

Desmin免疫组织化学染色，新分离的肝星状细胞胞浆呈现弥漫或细丝状棕色，阳性率达97%，α-SMA阴性。接种后第七天及传代细胞，几乎100%为Desmin阳性细胞，α-SMA也呈阳性。

3 讨论

HSC的分离纯化主要分二步进行：第一步从肝组织中获得肝脏非实质细胞，一般采用链霉蛋白酶和胶原酶合并消化法，链霉蛋白酶能选择性地破坏肝细胞，减少肝细胞对HSC的粘附，从而提高HSC的产量；第二步从肝脏非实质细胞中分离出HSC，一般采用密度梯度离心进行分离，由于HSC富含脂滴，其平均密度在所有肝脏细胞中最低，因此，采用合适的分离技术和分离介质也就成为分离纯化HSC的关键。

维普资讯 http://www.cqvip.com

随着各种离心液的应用及设备的更新，星状细胞的获得率和纯度呈逐渐上升的趋势。Knook 等采用离心淘析技术，以 Metrizamide 为分离介质，首次成功地分离大鼠的肝星状细胞。当时 HSC 获得率为(3.1±0.52)×10^6/g 肝组织，纯度为(72.1±4.6)%[4]。Friedman 等采用上述技术，以 Stractan 为分离介质，使细胞纯度上升为 90%，但分离过程烦琐，不易推广[5]。

国内这方面工作起步较晚。高春芳等[6]采用高速离心法，以聚蔗糖、泛影葡胺配制成分离介质，也获得了与 Friedman 等相似的效果。徐列明等[7]采用原位循环灌流法，以 11% Metrizamide 为介质单层一步密度梯度分离肝星状细胞，取得了较好的效果。本文所述的方法是在上述等人介绍的方法的基础上加以改良，从而设计出一套简便、经济、高效、稳定的 HSC 的分离方法。与前述方法相比，其优点在于：①无须使用价格昂贵的淘析式离心机；②以 Nycodenz 为分离介质，其价格便宜，容易制备，对细胞没有任何毒副作用，并可获得高产细胞的效果；③低速离心分离细胞，避免高速离心引起的细胞破坏。④采用非循环灌流的方法，避免混杂其他细胞，提高了细胞的纯度；⑤采用单层一步密度梯度离心法，简化了操作步骤。总之，本文建立了改良的大鼠 HSC 分离培养方法，既简便易行又经济，在保证纯度的同时，提高了产量和存活率，值得推广和应用。

[参考文献]

[1] Gressner AM, Bachem MG. Molecular mechanisms of liver fibrogenesis-a homage to the role of activated fat-storing cells[J]. Digestion, 1995, 56(5): 335 - 346.

[2] Friedman SL. Molecular mechanisms of hepatic fibrosis and principles of therapy[J]. J Gastroenterol, 1997, 32(3): 424 - 430.

[3] Bissell DM. Hepatic fibrosis as wound repair: a progress report [J]. J Gastroenterol, 1998, 33(2): 295 - 302.

[4] Knook DL, Seffelaar AM, de-Leeuw AM. Fat-storing cells of the rat liver. Their isolation and purification[J]. Exp Cell Res, 1982, 139(2): 468 - 471.

[5] Friedman SL, Roll FJ. Isolation and culture of hepatic lipocytes, Kupffer cells, and sinusoidal endothelial cells by density gradient centrifugation with Stractan[J]. Anal Biochem, 1987, 161(1): 207 - 218.

[6] 高春芳，孔宪涛，范列英. 大鼠肝贮脂细胞、Kupffer 细胞的分离、培养和鉴定[J]. 中华消化杂志，1995, 15(3): 142 - 145.

[7] 徐列明，刘 成，刘 平. 扁桃甙对大鼠肝贮脂细胞增殖和产生胶原的影响[J]. 新消化病学杂志，1997, 5(2): 84 - 85.

(编辑：邱全光)

·个案与短篇·

冠心病介入治疗的围手术期护理

曹 滢，郭 晖

(哈尔滨医科大学附属第一临床医院心血管内科，黑龙江 哈尔滨 150001)

[关键词] 冠心病；围手术期；护理

[中图分类号] R541.4；R248.1 [文献标识码] B [文章编号] 1672 - 5042(2004)04 - 0242 - 02

冠心病介入治疗在发达国家已成为一种常规的治疗方法，随着我国介入治疗技术的发展和提高，已被越来越多的冠心病人了解和接受。冠心病介入治疗术有效地降低该病复发率、致残率、死亡率，提高冠心病人生存率和生命质量。介入治疗可以治愈过去需要开胸或药物无法控制的冠心病，病人痛苦小、安全性高，治疗效果迅速而显著。

1 手术方法

手术在装有造影 DSA 室进行，在局麻下将特殊导管经患者股动脉穿刺后插至冠状动脉开口，选择性地将造影剂注入冠状动脉，在 X 线透视下记录显影过程，判断冠脉有无病变。确诊存在冠状动脉严重狭窄后，根据情况进行 PTCA 治疗，所谓 PTCA 是指“经皮腔内冠状动脉成形术”，是经股动脉将前端带有球囊的导管送到冠状动脉病变部位，加压充盈球囊将狭窄病变扩张从而改善心肌供血，缓解症状。狭窄病变由气囊扩张后，40%病变会发生再狭窄，有些病人会发生急性冠脉闭塞而导致急性心梗发作或死亡。所以在扩张血管完毕后，需再用冠脉内支架将病变处永久撑开。植入支架术减少斑块撕裂后塌陷冠脉急性闭塞，增加手术安全性，减少再狭窄。

(下转 245 页)

[收稿日期] 2004 - 03 - 03 [修回日期] 2004 - 04 - 20