维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)01-0048-02

原位循环灌流法分离大鼠肝星状细胞

罗 云[1]，戴立里[1]，沈鼎明[1]，姚云清[2]，张大志[2]，王 波[2]
（1. 重庆医科大学第二临床学院消化内科；2. 重庆医科大学病毒性肝炎研究所 重庆 400010）

【摘 要】目的：为深入探讨肝纤维化的细胞机制，探索经济、稳定的肝星状细胞分离和培养方法。方法：采用胶原酶原位循环灌流法分离大鼠肝星状细胞，18%Nycodenz密度梯度离心纯化星状细胞。结果：星状细胞的得率为$1\times10^7-3\times10^7$/肝、纯度为90%，存活率为96%。结论：原位循环灌流法是有效的大鼠肝星状细胞的分离和培养方法。

【关键词】肝星状细胞；细胞分离；原位循环灌流
【中国图书分类法分类号】R575.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-04-29

The isolation and culture of rat hepatic stellate cells with collagenase in situ liver recirculating perfusion

LUO Yun, et al
(Department of Gastroenterology, Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】 *Objective*: To investigate the method of isolation and culture of hepatic stellate cells for studying the cellular mechanisms of hepatic fibrosis. *Methods*: The isolation of normal rat hepatic stellate cells was established with collagenase in situ liver recirculating perfusion.Hepatic stellate cells were purified by using density gradient centrifugation with 18% Nycodenz. *Results*:The amount of hepatic stellate cells obtained were $1\times10^7-3\times10^7$ cells per liver with a purity of more than 90% and the viability of more than 96%. *Conclusion:* The result showed that the methods of the isolation and culture of rat hepatic setllate cells were economical and steady.

【Key words】Hepatic stellate cell; Cell isolation; In situ liver recirculating perfusion

肝星状细胞的激活是肝纤维化过程中的中心环节[1]，肝星状细胞正成为国内外学者研究肝纤维化的热点，建立稳定和经济的分离和培养肝星状细胞的方法是研究肝纤维化的基础。Knook[2]于1982年首先建立以酶消化为基础的分离法，并采用Metrizamide密度离心法纯化大鼠肝星状细胞。国内在这方面的工作起步较晚，1993年才见有关大鼠肝星状细胞分离和培养方法的文献报道[3]。由于该细胞的分离有一定的难度，研究者往往为细胞的产量、纯度等问题所困扰。作者参考国内外文献[2-6]，摸索出稳定和经济的分离方法，现介绍如下。

1 材料和方法

1.1 动物

雄性Wistar大鼠，体重350－450g。重庆医科大学动物中心供应。

1.2 主要试剂

IV型胶原酶、链霉蛋白酶E（pronase E）、Nycodenz均为美国Sigma公司产品；DNA酶I（DNase I），DMEM干粉，胎牛血清为美为Gibco公司产品；各种培养板和瓶为Nunclon公司产品。抗desmin抗体为美国Zymed公司产品，SABC试剂盒购自武汉博士德公司。其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 分离方法

大鼠用2%戊巴比妥钠（60mg/kg体重）腹腔麻醉后，固定于超净工作台，将肠管推向腹腔左侧，暴露门静脉及前腔静脉、并各预置缝线1根。门静脉穿刺留置针，退出针芯，结扎缝线。将输液器与留置管相连，开启电子蠕动泵，灌流D-Hank's液，流速为15ml/min左右、迅速剪断前腔静脉放血。同时剖开胸腔，暴露并结扎后腔静脉。灌流约10min后，肝脏颜色变苍白，前腔静脉插入硅胶管，并用缝线扎紧。改用含0.05%IV型胶原酶和0.1% pronase E的Hank's液50ml，于37℃循环灌流，流速为10－12ml/min，灌流约15min后肝组织软化、迅速取下肝脏，置于平皿中、剔除结缔组织和肝包膜。将细胞悬液转入盛有含0.05%IV型胶原酶、0.02%pronase E及0.005%DNase I的Hank's液20ml的玻璃瓶内，37℃震荡消化15－20min、过200目细网后，收集滤液于50ml聚丙烯离心管中，500转/min离心5min，取上清再

作者介绍：罗 云（1964- ），男、主治医师，博士。
主要研究方向：中药抗肝纤维化机理研究。
基金项目：由重庆市卫生局科研基金资助（99-4012）

维普资讯 http://www.cqvip.com

1500转/min离心10min，取沉淀加2倍体积18% Nycodenz、上覆DMEM 3ml。2600转/min离心20min，仔细吸取界面细胞层，放入离心管内，加入DMEM，1500转/min离心10min，离心2次后、去上清液、将细胞悬浮在含20%胎牛血清的DMEM内。

1.4 鉴定方法

活细胞鉴定，用0.4%台盼蓝染色计算产量及存活率；性质鉴定用小鼠抗desmin抗体，SABC法做免疫组化染色。

1.5 培养方法

细胞以$1 \times 10^5 - 5 \times 10^5/cm^2$接种在50ml塑料培养瓶中（Nunclon产品），在5%CO_2、95%空气的CO_2培养箱里培养，48h首次换液后，改用含10%胎牛血清的DMEM培养液，以后每2－4天更换一次培养液。

1.6 传代方法

原代培养星状细胞长满单层后，吸去培养基，0.25%胰蛋白酶于37℃消化10－15min，吸去胰蛋白酶，加入3ml DMEM，吹打培养瓶壁，收集细胞悬液，1500转/min离心10min，离心2次后，加入DMEM重悬，以$1 \times 10^5/cm^2$浓度接种。

2 结 果

2.1 细胞得率

每只大鼠肝星状细胞的获得率为$1 \times 10^7 - 3 \times 10^7$个，经台盼蓝染色，细胞存活率在96%以上。

2.2 细胞的形态观察

在倒置显微镜下见刚分离的星状细胞呈圆形，胞浆有较多脂滴，接种24h后，部分细胞贴壁，呈扁园形。48h后部分细胞贴壁并伸展，随着培养时间延长，细胞逐渐呈星状，并由星状向梭形变化。经10－14天培养，细胞长成单层。传代1－2h内，细胞大多贴壁，24h后全部伸展生长（图1），约7天又可长成单层，传代后，细胞继续生长，可维持传代4代以上。传代细胞透射电镜观察，细胞核大，内质网发达。



图1 传代培养第3天的星状细胞（10×20）

2.3 星状细胞的性质鉴定

原代培养第10天的desmin阳性细胞在90%以上，传代培养细胞的desmin阳性率达100%（图2）



图2 传代培养星状细胞desmin免疫细胞化学染色（SABC，10×20）

3 讨 论

原位循环灌流法分离大鼠肝星状细胞的得率、纯度及活力均能达到实验要求。不同的作者分离一次星状细胞所需酶的用量有差异，本文需用胶原酶35mg，pronase E 54mg；徐列明等人[5]需用胶原酶60mg，pronase E145－170mg；陈原稼等人[3]需用胶原酶60mg，pronase E 88mg。因此，本法的优点在于分离所用酶消耗量较其它方法少，是一种经济的分离方法。其技术关键在于循环体系的建立，这要求成功地门静脉穿刺插管及前腔静脉的插管，否则，就不能建立循环体系。

肝星状细胞的得率受下列因素的影响：(1)肝脏酶灌流前血液冲洗是否干净，如瘀血部位体积较大，未瘀血部位必然被酶过度消化，就会影响星状细胞的得率和存活，可通过注射肝素和一次性成功进行门静脉穿刺插管来解决。(2)胶原酶和链霉蛋白酶的消化，如消化不充分，肝细胞大量存在，影响星状细胞的纯度。适度酶消化受酶活性、灌流温度及时间等影响。由于上述两种酶的活力均需要Ca^{2+}，因此，配制酶消化液时，必须用Hanks液；灌流时间在15min左右，灌流时间过短，星状细胞得率减少，灌流时间过长，星状细胞活力要受影响。(3) DNase I，由于破坏的肝细胞释放大量DNA，致使细胞悬液粘度大量增加，因此，必须使用DNase I，以破坏DNA，减少细胞悬液的粘度。否则，星状细胞得率会下降。(4)Nycodenz，密度梯度离心是纯化星状细胞的重要步骤。本方法采用Nycodenz为密度梯度离心介质，必须用无Nacl的GBSS配制，操作时应严格保持各种溶液浓度和添加量的准确性，收

（下转第52页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

多，其中多药耐药（MDR1）基因过度表达是引起肿瘤耐药的最主要原因。我室在检测儿童实体恶性肿瘤MDR1基因表达中，MDR1mRNA阳性率为84.2%，P-gp阳性率为80%，两者符合率达86.7%[4]。MDR1基因在骨髓造血细胞中表达量极低[5]，导致其对化疗非常敏感，易受化疗药物攻击，导致全血细胞下降，这是化疗最严重的毒副作用。骨髓造血细胞MDR1基因低表达妨碍了化疗药物剂量的增大，影响化疗疗效。把MDR1基因转入骨髓造血细胞则可以提高骨髓造血细胞对化疗药物的耐受性。

国内外研究显示，小鼠骨髓细胞的MDR1基因转染率波动在7%～45%之间[6-8]，各学者所用转染方式及转染条件并不完全相同，主要分为与包装细胞共培养法及病毒上清转染法。本实验采用含MDR1基因的逆转录病毒上清转染法转染小鼠骨髓造血细胞，避免了包装细胞与转染细胞的混杂，提高了转染的安全性，PCR证实转染外源MDR1基因可整合入造血细胞基因组中，免疫组化法检测MDR1基因最高转染率达33%，较接近国外相同实验转染效率，高于国内相同实验，且转染的MDR1基因表达产物可行使正常功能，说明本实验所采用的病毒上清转染法适用于小鼠骨髓造血细胞转染。1998年，Bunting[9]采用造血细胞与细胞因子体外共培养12天后回输体内后，引起粒细胞增生紊乱，所以我们认为体外转染时间不应过长。本实验结果显示转染4日组小鼠骨髓造血细胞转染率高于2日组小鼠骨髓细胞转染率，转染效率达到应用水平，测定两组转染细胞死亡率无明显差别，说明逆转录病毒上清转染法结合半量换液有利于提高MDR1基因转染效率，转染4日组小鼠造血细胞更适合体内回输。本实验为进一步行MDR1基因疗法动物体内实验奠定了实验基础。

参 考 文 献

[1] Chaudhary PM, Roninson IB:Expression and activity of P-glycoprotein ,a multidrug efflux pump,in human hematopoietic stem cells[J].Cell,1991;66:85-94

[2] Flynn SD, Murren JR, Kirby WM, et al. P-glycoprotein expression and multidrug resistance in adrenocortical carcinoma [J].surgery, 1992;112(2):981-986.

[3] 刘炳仁，杨纯正，栾凤君，等. 用逆转录-多聚酶链反应检测白血病患者多药耐药基因的表达[J]. 中华血液学杂志，1995;16(2):65-68

[4] 王 珊，金先庆，杨纯正，等. 儿童实体恶性肿瘤多药耐药基因的表达[J]. 中华小儿外科杂志，1997;18(5):259-261

[5] Baccarani M, Damiani D, Michelutti A et al. Expression of multidrug resistance gene(MDR1) in normal hematopoietic cells [J]. Blood, 1993;81(12):3480-3481

[6] Sorrentino BP, Brandt SJ, Bodine D, et al. Selection of drug-resistant bone marrow cells in vivo after retroviral transfer of human MDR1[J].Science, 1992;257(3):99-103

[7] Kittler ELW, Peters SO, Crittenden RB, et al. Cytokine-facilitated transduction leads to low level engraftment in nonablated hosts[J]. Blood, 1997;90(2):865-872

[8] Licht T, Aksentijevich I, Gottesman MM, et al. Efficient expression of functional human MDR1 gene in murine bone marrow after retroviral transduction of purified hematopoietic stem cells[J].Blood, 1995;86(1):111-121

[9] Bunting KD, Galipeau J, Topham D, et al. Transduction of murine bone marrow cells with an MDR1 vector enables ex vivo stem cell expansion, but these expanded grafts cause a myeloproliferative syndrome in transplanted mice[J]. 1998;92 (7):2269-2279.

(上接第49页)

集界面细胞时，尽可能少吸取界下液体，否则，会夹杂Kupffer细胞。(5)无菌操作，由于整个分离时间较长，容易受细菌污染。因此、整个操作过程中，应严格按照无菌操作原则进行。

参 考 文 献

[1] Gressner AM. Mediator of hepatic fibrogenesis[J]. Hepatogastroenterology, 1996;43:92-103.

[2] Knook DL, Seffelaar AM, Deleeuw AM. Fat storing cells of the liver. Their isolation and purification[J]. Exp Cell Res, 1982; 139:468-471.

[3] 陈原稼，王宝恩，马雪梅，等. 大鼠贮脂细胞的分离及培养[J]. 肝脏病杂志，1993;1(1):17-20.

[4] Friedman SL, Rockey DC, Mcguire RF, et al. Isolation of Lipocytes and Kupffer cells from normal humun liver: Morphological and functional characteristics in primary culture[J]. Hepatology, 1992;15:234-243.

[5] 徐列明，刘 成，刘 平，等. 一种稳定和高产的肝贮脂细胞分离法[J]. 细胞生物学杂志，1995;17(3):143-145.

[6] 汪 谦，夏穗生，姜汉英，等. 大鼠肝细胞、Kupffer和Ito细胞的分离与培养[J]. 中华实验外科杂志，1994; 11(2):72-73.