DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.03.038
第24卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 3
2002年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2002

文章编号:1000-5404(2002)03-0323-03

论著

一种改进的分离纯化人肝脏星形细胞的方法

朱永红[1],胡大荣[2],刘国栋[3],谭朝霞[3] (第三军医大学:[1]医学检验系临床微生物学及免疫学教研室;[2]附属西南医院全军感染病研究所;重庆,400038;[3]北京军区总医院全军肝病研究所,北京,100700)

提 要:目的 改进传统的分离纯化人肝脏星形细胞(HSCs)的方法。方法 在传统的分离人HSCs方法的基础上,省略链霉蛋白酶消化,仅用Ⅳ型胶原酶消化,采用低速离心去除肝脏实质细胞,将获得的肝脏非实质细胞进行两次换液及传1代培养,观察培养过程中细胞形态及蛋白标志物的改变。结果 经传1代培养24 h后,所分离得到的人HSCs纯度接近100%。结论 所改进的分离人HSCs的方法具有操作简便,收获细胞纯度高的特点。

关键词:肝脏星形细胞;细胞分离;细胞培养
中图法分类号:R322.47;R329.2 文献标识码:A

A modified method for isolation and purification of human hepatic stellate cells

ZHU Yong-hong, HU Da-rong, LIU Guo-dong, TAN Zhao-xia (Department of Clinical Microbiology and Immunology, Faculty of Laboratory Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To improve the method for isolation and purification of human hepatic stellate cells (HSCs). **Methods** A commonly used method for isolation of human HSCs was modified. The new method only involved type Ⅳ collagenase perfusion of the liver in which hepatic cells were removed by low-speed centrifugation and the hepatic nonparenchymal cells were plated and the culture medium was changed twice within 24 h. The cells were subcultured in primary culture in 7—10 d. The morphology and protein marker of the cells were observed at different intervals in the cultures with phase-contrast microscopy and immunocytochemical staining. **Results** The purity of the isolated HSCs was almost 100% in 24 h after first subculture. **Conclusion** The modified method for the isolation of human HSCs is simple and effective.

Key words: hepatic stellate cells; cell isolation; cell purification

肝脏星形细胞(Hepatic stellate cells, HSCs)是肝脏的一种非实质细胞,对HSCs的分离培养研究为近年来肝脏细胞学及肝纤维化发生机制研究中的热点之一[1,2]。其中对人HSCs的体外培养研究在HSCs激活调控机制及抗肝纤维化药物筛选中具有更加重要的意义。国外分离人HSCs已有近10年的历史[3],国内于近2年开展人HSCs的分离培养研究[4],但这些分离方法均操作繁琐,细胞收获量低,给进一步的培养研究带来了很大困难。以下介绍一种经改进的分离正常人HSCs的方法,为开展有关人HSCs的培养研究打下良好的基础。

1 材料和方法

1.1 标本来源

来源于非肝病死亡之成人肝脏(死亡时间在12 h内),无菌操作切取肝右叶边缘组织约10 g,置于DMEM培养液中保存待用,肝脏标本在获取后4 h内进行HSCs的分离培养。

1.2 主要试剂

Ⅳ型胶原酶(活性512 U/mg)为美国Sigma公司产品;DMEM为Gibco公司产品;胰蛋白酶(1∶250)为进口试剂分装;小牛血清为本中心制备;前灌流液、酶配制液及D-Hanks液按文献介绍方法配制。鼠抗人结蛋白单克隆抗体、鼠抗人波形蛋白单克隆抗体、鼠抗人胶质纤维酸性蛋白(GFAP)单克隆抗体、鼠抗人Ⅰ型前胶原单克隆抗体、鼠抗人α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)单克隆抗体、鼠抗人Ⅷ因子相关抗原单克隆抗体、鼠抗人CD68单克隆抗体及S-P免疫组化试剂盒均为北京中山生物技术公司产品。

1.3 方法

1.3.1 HSCs的分离 将前灌流液、胶原酶溶液(0.05%)预热于37 ℃水浴,取肝脏标本置于玻璃平皿中,以D-Hanks液清洗表面残存血液,用止血钳持双面刀片修整肝脏表面,暴露门静脉血管,按血管直径大小选用适当塑料插管针,以前灌流液进行灌流,直至肝组织呈灰白色,肉眼观察流出的液体透明已无明显血的颜色时,改用胶原酶溶液灌流,直至肝组织完全软化。将灌流的胶原酶及肝组织置于平皿中,以镊子撕碎肝组织,并剔除门脉结缔组织及肝包膜,用玻璃吸管吹打,使肝组织完全分散,再转入三角烧瓶中,于37 ℃振荡消化10 min,将细胞悬液通过三层纱布过滤入2只50 ml离心管,4 ℃下500× g离心5 min,吸弃上清,每管加入DMEM充分悬浮细胞后,50× g离心90 s,取上清,如此50× g离心洗涤3次,合并3次离心之上清,500× g离心收集细胞,用DMEM悬浮后再次50× g离心90 s,取上清收集细胞,将细胞悬浮在含10%小牛血清的DMEM内,调整细胞浓度为1×10^{6}个/ml后接种于玻璃培养瓶或含盖玻片的培养板中,12 h后第1次换液,24 h后第2次换液,以后每2~3 d换液1次,待细胞铺满时,以0.25%胰蛋白酶消化3~5 min,收集消化细胞,以DMEM充分悬浮细胞,50× g离心2 min,收集上清中的细胞,以2×10^{5}个/ml接种传代。

1.3.2 HSCs的鉴定 倒置显微镜下观察细胞生长变化情

作者简介:朱永红(1966—),男,湖北省荆门市人,博士,讲师,主要从事肝纤维化发生机制方面及基因工程药物的研究,发表论文14篇。电话:(023)68752315。

收稿日期:2001-02-09;修回日期:2001-05-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

况。制备原代及传代培养细胞的细胞爬片(盖片培养法),用4%多聚甲醛固定后进行结蛋白、波形蛋白、GFAP、Ⅰ型前胶原、α-SMA、Ⅷ因子相关抗原及 CD68 免疫细胞化学染色,染色采用 S-P 法,DAB 显色,显微镜下计数阳性细胞百分率。

2 结果

2.1 形态学观察

刚分离的细胞所含肝细胞极少,因肝细胞体积远大于肝脏非实质细胞,镜下很容易分辨。细胞接种 12 h,细胞大多贴壁,少量开始伸展,24 h 后细胞大多伸展,部分细胞中可见明显脂滴,见图 1。培养至 7~10 d 时,细胞铺满长成单层,大多呈现出典型的成纤维细胞样形态。细胞传代后 4 h 即贴壁,24 h 后细胞均伸展,具有典型的丝状突起,见图 2。

2.2 免疫细胞化学鉴定

原代培养 24 h 的细胞结蛋白、GFAP 染色均为阴性,波形蛋白染色阳性细胞达 98%以上,Ⅰ型前胶原及α-SMA 染色均为阴性。原代培养第 7~10 d 时,结蛋白及 GFAP 染色持续阴性,波形蛋白染色持续阳性,Ⅰ型前胶原及α-SMA 染色阳性率为 96.7±1.5/100 个细胞。传 1 代后 24 h,结蛋白及 GFAP 染色仍然阴性,Ⅷ因子相关抗原及 CD68 染色亦阴性,波形蛋白、α-SMA 及Ⅰ型前胶原染色阳性,阳性细胞率为 99.7±0.6/100 个细胞,见图 3~5。经 3~5 次传代后,细胞形态及染色特性与传 1 代细胞无明显差别。

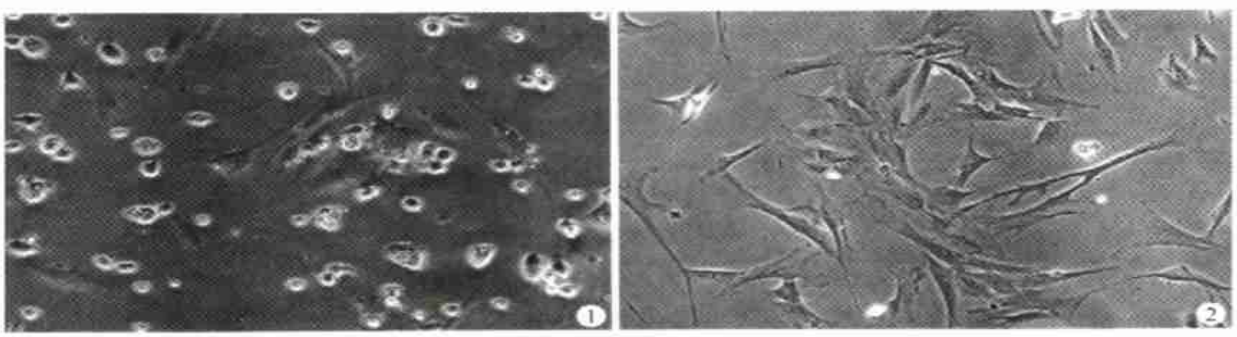


图 1 倒置显微镜观察原代培养 24 h 的细胞,部分细胞中可见较为明显的脂滴 (×200)

Fig 1 Phase-contrast micrograph of human HSCs at 24 h after primary culture, showing obvious fat droplets in cytoplasm (×200)

图 2 倒置显微镜观察传 1 代培养 24 h 的细胞,细胞均明显伸展,具有明显的丝状突起 (×40)

Fig 2 Phase-contrast micrograph of human HSCs at 24 h after first subculture, showing obvious spread and fibrillar processes (×40)

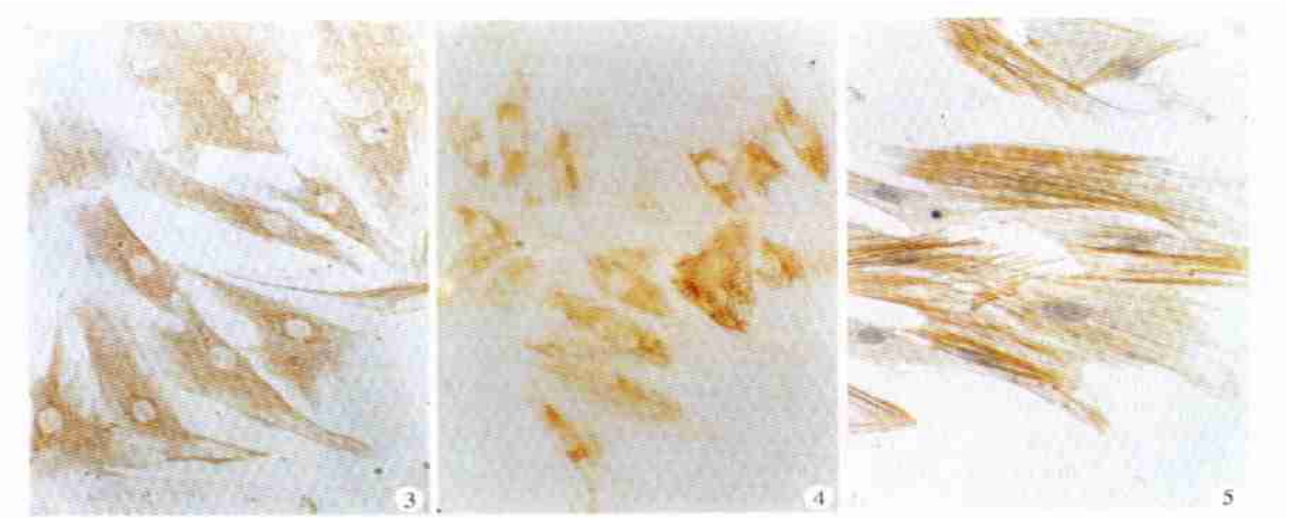


图 3 传 1 代培养 24 h 的细胞波形蛋白免疫细胞化学染色阳性 (S-P×250,DAB 显色,未复染)

Fig 3 Immunocytochemical staining of vimentin in human HSCs after first subculture for 24 h (S-P×250, DAB staining)

图 4 传 1 代培养 24 h 的细胞Ⅰ型前胶原免疫细胞化学染色阳性 (S-P×250,DAB 显色,未复染)

Fig 4 Immunocytochemical staining of type Ⅰ procollage in human HSCs after first subculture for 24 h (S-P×250, DAB staining)

图 5 传 1 代培养 24 h 的细胞 α-SMA 免疫细胞化学染色阳性 (S-P×250,DAB 显色,苏木素复染)

Fig 5 Immunocytochemical staining of α-SMA in human HSCs after first subculture for 24 h (S-P×250, DAB staining)

3 讨论

近年来,采用体外培养的方法,对 HSCs 的生物学特点、激活调控机理及凋亡特性等的研究正逐渐成为肝脏细胞学研究尤其是肝纤维化研究领域的重要热点[1,2]。由于 HSCs 在肝脏细胞中所占的比例很低(约为肝脏非实质细胞总数的 5%~10%)[5],分离纯化困难,给 HSCs 的体外培养研究带来很大困难,尤其是在进行人 HSCs 的体外培养研究时,还面临肝脏标本来源困难的问题,因此建立一种简便有效的分离纯化人 HSCs 的方法具有十分重要的意义。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

传统的分离 HSCs 的方法分二步进行，首先由肝脏中分离获得非实质细胞，一般采用链霉蛋白酶合并胶原酶消化法，然后采用密度梯度离心由非实质细胞中获得 HSCs[3,5]。这种方法虽然能获得较高纯度的 HSCs，但却具有一些明显的缺点：①HSCs 的收获量不大；②操作步骤繁琐，费时长；③不能同时分离获得肝细胞。我们在实验中省略链霉蛋白酶消化，单用 Ⅳ 型胶原酶消化，使肝脏细胞充分分散，再采用低速离心（50×*g*）去除未受损的肝实质细胞，将获得的非实质细胞直接接种在玻璃附着底物上，24 h 内经两次换液，去除悬浮的未贴壁细胞，7～10 d 时，细胞铺满长成单层，大多呈现较典型的成纤维细胞样形态，α-SMA 及 Ⅰ 型前胶原表达阳性细胞达 96％以上。对原代培养后期的细胞进行传代，接种后 4 h 即贴壁，对传 1 代培养 24 h 的细胞进行免疫细胞化学染色，波形蛋白、α-SMA 及 Ⅰ 型前胶原染色阳性细胞均接近 100％，而其 Ⅷ因子相关抗原及 CD68 染色阴性，提示传代细胞为 HSCs 而不是肝窦内皮细胞及 Kupffer 细胞。采用该分离法，由于省去了密度梯度离心，不会造成 HSCs 的丢失。刚分离接种的细胞为肝脏非实质细胞的混合，其中还含有非常少量的肝细胞，由于肝窦内皮细胞在玻璃上很难贴壁，经过换液能被去除，而经胰蛋白酶消化传代后能去除绝大部分 Kupffer 细胞，再加上 HSCs 增殖后其数量明显增加，因此传 1 代后 HSCs 的纯度几乎能达到 100％，我们的观察证实了这一点。由于刚分离的细胞为各种非实质细胞的混合，而且其中混杂有少量的红细胞，经过培养后，HSCs 出现明显增殖，数量成倍增加，因此不易估计 HSCs 的收获量。根据酶灌流及细胞分散效果，由每 10 克肝组织收获的细胞可原代接种 75 cm^2 培养瓶 10～20 瓶，传代后细胞数量增加 2～3 倍，能满足多种实验要求。

体外培养后激活（Activation）是 HSCs 的一大特点，经过更换培养液及传代，HSCs 的纯度在提高的同时，其表型亦由刚分离时的静息型转变为培养后期及传代后的激活型。激活的 HSCs 呈现典型的成纤维细胞样形态，表达 Ⅰ 型前胶原及 α-SMA 明显增强。一般认为，α-SMA 表达阳性被认为是 HSCs 激活的重要标志[6]，由于肝窦内皮细胞及 Kupffer 细胞 α-SMA 表达阴性，α-SMA 也被认为是鉴定 HSCs 纯度的一个指标。结蛋白及 GFAP 被认为是鉴定大鼠 HSCs 纯度的标志，但我们未观察到人 HSCs 表达结蛋白及 GFAP，这与我们以前观察的结果相似[4]。

参考文献：

[1] Olaso E, Friedman S L. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis[J]. J Hepatol, 1998, 29(5): 836－847.
[2] Burt A D. Pathobiology of hepatic stellate cells[J]. J Gastroenterol, 1999, 34(3): 299－304.
[3] Friedman S L, Rockey D C, McGuire R F, *et al*. Isolated hepatic lipocytes and Kupffer cells from normal human liver: morphological and functional characteristics in primary culture[J]. Hepatology, 1992, 15(2): 234－243.
[4] 朱永红，胡大荣，谢 青，等. 正常人肝脏星形细胞的分离、培养及鉴定[J]. 细胞生物学杂志，1999, 21(3): 插页.
[5] Alpini G, Phillips J O, Uroman B, *et al*. Recent advances in the isolation of liver cells[J]. Hepatology, 1994, 20(2): 494－508.
[6] Bachem M G, Meyer D, Schafer W, *et al*. The response of rat liver perisinusoidal lipocytes to polypeptide growth regulator changes with their transdifferentiation into myofibroblast-like cells in culture[J]. J Hepatol 1993, 18(1): 40－52.

（编辑 郭建秀）

文章编号：1000-5404(2002)03-0235-01

个案与短篇

侧卧位病人硬膜外改全麻应用喉罩 2 例报道

Application of laryngeal mask in 2 side-lying patients from epidural to general anesthesia

张 铭，李勇帅，崔 剑 （第三军医大学附属西南医院麻醉科，重庆 400038）

喉罩以其操作简便，置入时无需扭曲气道及显露声门，勿需喉镜及肌肉松弛，消除气管插管对喉头及气管的机械性刺激，不影响气道的正常排痰功能等优点而在临床应用日益增多，可广泛应用于各种短小手术及气管插管困难病人[1]。我科先后在 2 例侧卧位病人硬膜外改全麻中应用喉罩，结果令人满意，现报道如下。

例 1：患者男性，43 岁，因患输尿管结石拟在硬膜外麻醉下行输尿管切开取石。经 T_{11-12} 硬膜外穿刺成功，置管顺利，注入 1.75％碳酸利多卡因 5 ml，出现麻醉平面后给予 2％盐酸利多卡因 10 ml，麻醉平面控制在 T_8-L_2。调整体位为左侧卧位，切皮时无体动反应及疼痛感，肌肉松弛欠佳，牵拉反射明显，改用 0.3％丁卡因 8 ml 后仍无明显改善。在不改变体位条件下，给以 2％硫 贲妥钠 10 ml＋氟-芬全量后顺利置入 4 ＃喉罩，调整位置至无明显漏气。术中辅以万可松、芬太尼、氧化亚氮，手术顺利，麻醉平稳，术后清醒后拔管，无喉部不适感。

（下转 327 页）

作者简介：张 铭（1964－），男，重庆市人，主治医师，讲师，主要从事血液保护之血液稀释方面的研究。电话：（023）65389581
收稿日期：2001-04-05；修回日期：2001-08-24

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net