DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.03.013

文章编号:1000-5404(2000)03-0235-04

论著

体外培养诱导人肝脏星形细胞表型激活及其鉴定

朱永红[1],胡大荣[2],聂青和[3],刘国栋[1] ([1]第三军医大学附属西南医院感染病科、全军传染病专科中心,重庆 400038;[2]北京军区总医院全军肝病研究所,北京 100700;[3]第四军医大学唐都医院感染病科,西安 710038)

提 要 目的:观察常规培养条件下正常人肝脏星形细胞(HSCs)表型激活并对其进行鉴定。方法:由正常人肝脏中分离HSCs,在未包被的玻璃及塑料培养支持物上,以常规的含小牛血清的DMEM培养,相差显微镜下观察培养过程中细胞形态改变,荧光显微镜下观察维生素A自发荧光,免疫细胞化学染色观察α-SMA、Ⅰ型胶原、FN及PCNA改变。结果:正常人HSCs未包被的玻璃及塑料培养支持物上培养时,其表型由刚分离时及原代培养初期的静息型转变为原代培养后期及传代后的激活型。激活的人HSCs呈现典型的成纤维细胞样形态,胞质中无明显脂滴,维生素A自发荧光明显减弱或消失,同时明显表达α-SMA、Ⅰ型胶原、FN及PCNA。结论:体外常规培养可诱导人HSCs激活,激活的人HSCs具有典型的形态及功能特点。

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

In vitro culture-induced activation of human hepatic satellite cells and characterization of activated phenotype

ZHU Yong-hong, HU Da-rong, NIE Qin-he, LIU Guo-Dong (Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract **Objective**: To induce activation of normal human hepatic satellite cells (HSCs) by *in vitro* culture and characterize the activated phenotype. **Methods**: HSCs were isolated from normal human liver and cultured on uncoated plastic and glass materials in DMEM containing bovine serum. HSCs were observed with phase-contrast and fluroscence microscopy at various intervals in primary and secondary cultures. α-smooth muscle actin (α-SMA), type I collagen, fibronectin (FN) and PCNA expression in the cells were detected with immunohistochemistry. **Results**: Freshly isolated HSCs during early days of primary culture maintained a quiescent phenotype. During late days of primary culture or after subculture, HSCs assumed an activated phenotype. Activated HSCs were characterized by a typical fibroblast-like morphology under the phase-contrast microscope, a decrease or loss in fat droplets and vitamin A autofluroscence, and increase or obvious positive immunohistochemical staining for α-SMA, type I collagen, FN and PCNA. **Conclusion**: Routine *in vitro* culture on uncoated plastic or glass in DMEM containing bovine serum could induce phenotype activation of normal human HSCs and this activation was associated with characteristic morphological and functional changes.

Key words human hepatic satellite cell; culture; phenotype; characterization

肝脏星形细胞(Hepatic satellite cells, HSCs)的体外培养研究对于阐明肝纤维化发生机制及体外筛选抗肝纤维化药物均具有十分重要的意义[1]。自1992年Friedman等[2]分离培养人HSCs成功以来,国内尚未见这方面的研究报道。我们在成功分离培养人HSCs的基础上[3],体外培养诱导人HSCs表型激活并对其进行了鉴定,为进一步开展人HSCs表型激活调控机制的研究打下了良好基础。

1 材料与方法

1.1 肝脏标本来源

来源于非肝病死亡之成人肝脏。将所获肝脏标本置于

作者简介:朱永红(1966.2),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的研究,发表论文10篇。电话:(023)68752315

收稿日期:1999-09-16;修回日期:1999-12-21

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

DMEM 培养液中保存待用，于 2 h 内进行 HSCs 的分离培养。所取肝脏标本均经组织学 HE 染色证实肝组织结构正常。

1.2 主要试剂

链霉蛋白酶(活性 4 U/mg)、Ⅳ型胶原酶(活性 512 U/mg)及 DNA 酶Ⅰ(活性 20000 U/mg)均为美国 Sigma 公司产品；DMEM 为 Gibco 公司产品；胰蛋白酶(活性 1∶250)为进口试剂分装；小牛血清为第三军医大学分子生物学教研室产品；淋巴细胞分离液为上海试剂二厂产品，用 D-Hanks 液调整密度为 1.050 备用；前灌流液、酶配制液及 D-Hanks 液均按文献方法配制。鼠抗人Ⅰ型胶原单克隆抗体、鼠抗人纤维连接蛋白(FN)单克隆抗体及鼠抗人增殖细胞核抗原(PCNA)单克隆抗体均为北京中山生物技术公司产品；鼠抗人 α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)单克隆抗体及 SP 免疫组化试剂盒为福建迈新生物技术开发公司产品。

1.3 HSCs 的分离及培养

HSCs 的分离、培养及鉴定参照文献[3]的方法。刚分离的 HSCs 纯度 85%以上，活力 96%以上，24 h 内经 2 次换液后纯度达 95%以上。将细胞悬浮在含 20%小牛血清的 DMEM 内，调整细胞浓度为 2×10^5 个/ml，接种于塑料培养瓶及含盖玻片的塑料培养板中，在 37℃、5%CO_2 培养箱中培养，12 h 后进行第 1 次换液，24 h 后更换为含 10%小牛血清的 DMEM 培养液，以后每 2~3 d 换液 1 次，当细胞铺满瓶底时，用 0.25%胰蛋白酶消化传代，以 2×10^5 个/ml 浓度接种。在原代及传代培养时，均于培养板孔中加入干净的盖玻片，常规制备原代培养第 1 天、第 5 天、第 10 天、传 1 代第 3 天及传 5 代第 3 天的细胞铺展开。

1.4 培养细胞形态学观察

在细胞培养不同时间，于倒置显微镜下动态观察细胞生长变化情况。

1.5 维生素 A 自发荧光观察

将不同培养时间的细胞铺展片置于荧光显微镜下观察维生素 A 自发荧光，紫外线激发波长为 328 nm。

1.6 免疫细胞化学染色

将刚分离的细胞悬液涂片及不同培养时间的细胞铺展片用 4%多聚甲醛固定 10 min 后，进行 α-SMA、Ⅰ型胶原、FN 及 PCNA 免疫细胞化学染色，采用 SP 法，DAB 显色，并以 PBS 替代一抗设置阴性对照。

2 结果

2.1 形态学观察

刚分离得到的 HSCs 在相差显微镜下为折光性很强的圆球，远小于肝细胞，接种后 12 h，细胞即贴壁，少量细胞开始伸展，48 h 后大部分细胞伸展，一部分细胞出现多角突起，呈现星状外形，胞质中脂滴明显。培养至第 10 天时，细胞接近铺满，胞质中脂滴不明显，面积明显增大，细胞呈典型的成纤维细胞样形态。传代后细胞保持典型的成纤维细胞样形态不变。

2.2 激发荧光试验

原代培养 48 h 的 HSCs 在波长为 328 nm 的紫外光激发下，呈现蓝绿色自发荧光，但极易淬灭，经过培养后，其自发荧光逐渐减弱，传代后荧光几乎消失。

2.3 α-SMA 免疫细胞化学染色

刚分离的及原代培养第 1 天的人 HSCs 其 α-SMA 免疫细胞化学染色均为阴性，原代培养第 5 天时，有部分细胞 α-SMA 表达阳性，原代培养第 10 天时，α-SMA 染色阳性细胞接近 100%，见图 1。传代后 α-SMA 染色均为阳性，染色特点与原代培养第 10 天时相似。



图 1 原代培养 **10 d** 的正常人 **HSCs** 的 α-**SMA** 免疫细胞化学染色 (S-P× 250)

Fig 1 Immunocytochemical staining of α-SMA in normal human HSCs in primary culture for 10 days (S-P× 250)

2.4 Ⅰ型胶原及 FN 免疫细胞化学染色

原代培养 24 h 的 HSCs 铺展片Ⅰ型胶原染色阴性，FN 染色很弱，培养第 10 天时，Ⅰ型胶原及 FN 染色均为明显阳性，见图 2、3。传代后其染色特点与原代培养第 10 天时差别不明显。



图 2 原代培养 **10 d** 的正常人 **HSCs** 的Ⅰ型胶原免疫细胞化学染色 (S-P× 250)

Fig 2 Immunocytochemical staining of type Ⅰ collagen in normal human HSCs in primary culture for 10 days (S-P× 250)

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

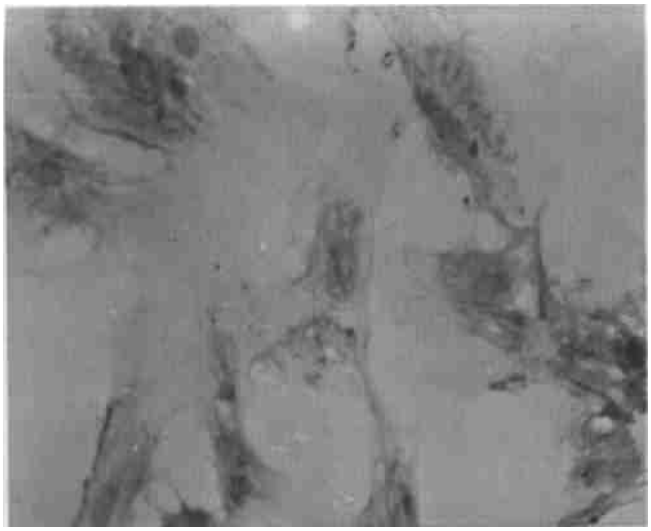


图 3　原代培养 10 d的正常人 HSCs的 FN免疫细胞化学染色　(S-P× 250)

Fig 3　Immunocytochemical staining of FN in normal human HSCs in primary culture for 10 days　(S-P× 250)

2.5　PCNA 免疫细胞化学染色

刚分离的 HSCs未见明显的 PCNA 核表达, 原代培养 24 h后即可见较明显的 PCNA 核表达, 原代培养第 10 天时可见明显的 PCNA 核表达。传代细胞的 PCNA 染色与原代培养第 10 天时无明显区别。

3　讨论

目前, 采用体外培养方法对 HSCs 的生物学特点、激活机制、凋亡特性及针对 HSCs 激活的抗肝纤维化药物研究已成为肝纤维化发生机制及抗肝纤维化药物研究中的热点[4]。在进行 HSCs 的体外培养研究时, 常常需要对 HSCs 的表型状态, 尤其是培养过程中 HSCs表型的变化进行鉴定, 以此来确定各种不同因素对 HSCs 表型变化的影响, 以及观察各种信号转导通路在HSCs表型变化中所起的作用。在体外培养过程中, 由于生长环境的改变, HSCs 的表型由刚分离时的静息型转变为培养后期的激活型或分泌型, 这种表型的转变类似于肝纤维化形成过程中 HSCs 表型的变化。因此, 体外培养的HSCs 可以作为研究 HSCs 表型分化调控机制、筛选抗肝纤维化药物及研究药物作用机制的理想细胞模型[5]。HSCs 被激活后, 其形态和功能发生明显改变, 此时细胞对各种外界因素的反应性也发生改变, 因此, 在评价某一因素对 HSCs 的作用时, 也需对 HSCs 的表型状态作出准确鉴定[1]。

诱导HSCs 表型激活的因素很多[6]。研究发现, 在含 10%小牛血清的培养液中, HSCs 的表型自发地由刚分离时及原代培养早期的静息型转变为培养后期及传代后的激活型。HSCs 的这种自发激活, 可能系培养液血清中所含的多种生长因子或细胞因子综合作用的结果, 也可能与其整个生长环境的改变有关。由于在肝纤维化形成过程中 HSCs的体内激活系多种因素共同作用的结果, 这种常规培养条件下 HSCs 的激活可能比单一因素(如单一细胞因子)诱导的激活更接近体内HSCs 的激活过程。

一般认为, HSCs 激活的两个最主要标志是: ①细胞中出现 α-SMA 的表达; ②胞质中维生素 A 脂滴减少或消失[1]。此外, HSCs 在激活后还呈现非常显著的形态学及功能改变, 如典型的成纤维细胞样形态特征、合成各种 ECM 成分(尤其是Ⅰ型胶原)的能力及增殖能力明显增强等[4]。我们对正常人 HSCs 的表型变化进行检测发现, 在原代培养早期, α-SMA 表达阴性, 胞质中含有较多的脂滴且呈现较强的维生素 A 自发荧光, 此时细胞表达Ⅰ型胶原及 FN 很少或阴性; 随着培养时间的延长, HSCs 表达 α-SMA 增多, 胞质中脂滴及维生素 A 自发荧光逐渐减少, 其表达Ⅰ型胶在及 FN 逐渐增多, 同时细胞逐渐呈现出成纤维细胞样形态特征。到原代培养第 10 天时, 细胞呈现典型的成纤维细胞样形态, 胞质中维生素 A 自发荧光明显减弱, α-SMA、Ⅰ型胶原及 FN 表达明显阳性, 提示 HSCs 此时已被激活。对传 1 代及传 5 代的 HSCs 进行检测发现, 其形态及功能特点与原代培养第 10 天时无明显差别, 提示HSCs 在传代后持续处于激活状态。因此, 刚分离的及原代培养初期的正常人 HSCs 可视为静息的 HSCs, 原代培养第 10 天以后及传代的人HSCs 可视为激活的HSCs。

PCNA 是反映细胞增殖潜力的一种核抗原, 它对细胞由 G1 期向 S 期过渡起着重要的调节作用。处于增殖状态的细胞和肿瘤细胞, PCNA 的表达明显增强, 其在细胞中表达的多少(或强弱)可反映该细胞增殖能力的大小。对原代培养初期及后期的人 HSCs 进行 PCNA 免疫细胞化学染色, 发现原代培养初期的人 HSCs 即呈现较明显的 PCNA 表达, 原代培养后期及传代的人 HSCs 其 PCNA 表达明显增强, 提示原代培养后期及传代后 HSCs 的增殖能力增强, 这也是 HSCs 激活后所呈现的重要生物学特性之一。体外培养的人 HSCs 能连续传代达 10 代以上, 也说明人 HSCs 也具有很强的增殖能力。但随着传代次数的增加, HSCs 的增殖能力逐渐减弱, 出现这一现象的原因尚不清楚。

参考文献

[1]　Bachem M G, Meyer D, Schafer W, *et al*. The response of rat liver perisinusoidal lipocytes to polypeptide growth regu-

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

lator changes with their transdifferentiation into myofibroblast-like cells in culture[J]. J Hepatol, 1993, 18(1): 40—52.
[2] 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.
[3] 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.
[4] Olaso E, Friedman S L. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis[J]. J Hepatol, 1998, 29(5): 836—847.
[5] Kawada N, Kuroki T, Kobayashi K, *et al*. Inhibition of myofibroblast transformation of cultured rat hepatic satellite cells by methylxanthines and dibutyryl cAMP[J]. Dig Dis Sci, 1996, 41(5): 1022—1029.
[6] Gressner A M, Bachem M G. Molecular mechanisms of liver fibrogenesis: A homage to the role of activated fat-storing cells[J]. Digestion, 1995, 56(5): 335—346.

编辑 冯崇英

经验与短篇

文章编号: 1000-5404(2000)03-0238-01

蜂螫伤致急性肾衰 9 例报告

Report of 9 cases of acute renal failure due to multiple bee stings

李良志 (重庆市三峡中心医院肾内科, 重庆 404000)

我科 1998 年 6～11 月共收治 9 例群蜂螫伤所致的急性肾衰患者, 经及时血液透析和对症治疗, 取得较好的效果。现报道如下。

1 临床资料

1.1 临床表现

患者, 男 5 例, 女 4 例, 年龄 11～68 岁。8 例因少尿、无尿 2～3 d 入院, 患者均有呕吐、纳差、水肿, 其中 2 例有思睡, 3 例有血红蛋白尿; 2 例血压高, 8 例皮肤被螫伤部位为 20～40 处, 肝肾区叩痛; Hb 62～92 g/L, CO_2—CP 12～15 mmol/L, BuN 24～40.5 mmol/L, Cr 620～920 μmol/L, 6 例肝损害明显, ALT> 200 U/L, 另 2 例分别为 86、112 U/L。这 8 例患者在住院早期 Hb 进行性下降, 以溶血者明显, 但网织红细胞(Ret)< 3%, 骨髓检查示增生不良。第 9 例患者为 68 岁, 因多处严重螫伤, 表现有血红蛋白尿, 意识障碍, 入院后 2 h 死亡。

1.2 治疗与结果

8 例患者及时行血液透析治疗, 3 次/周, 4 h/次, 多尿期后延长透析间期; 6 例患者同时用地塞米松 10～30 mg/d, 用 3～5 d; 5 例患者同时输鲜血 200～400 ml 不等。患者少尿期持续时间 9～27 d, 其中 14 岁以下儿童 4 例少尿期为 9～11 d, 1 例 56 岁患者少尿期达 27 d; 每个患者血透次数为 5～15 次不等。8 例患者均痊愈。

2 讨论

蜂螫伤以蜂毒致病, 少许蜂螫伤一般只引起局部皮肤反应, 但群蜂多处螫伤可迅即出现全身中毒反应、急性肾衰、急性溶血, 严重变态反应致死[1,2]。本组病例均有急性肾衰、肝损害, 4 例急性溶血, 虽然文献报道蜂螫伤所致溶血很少见, 但本组发生率高, 这与患者的年龄和被螫伤的程度有关。蜂毒对儿童和老人的损害明显, 这与儿童发育不健全和老人组织器官功能减退有关; 另一方面儿童的恢复明显比成人和老人快, 这与儿童的组织再生能力旺盛是相符的, 而老人的恢复明显延后。本组患者 Hb 进行性下降, Ret 不高, 骨髓增生不良, 这可能与毒素对骨髓的抑制和机体内环境失衡、水钠潴留等因素有关。

严重蜂螫伤可引起严重变态反应, 宜及早用糖皮质激素。急性溶血加重贫血致组织进一步缺氧, 并引起肾小管阻塞, 加重肾损害, 对溶血者更应及时用足量糖皮质激素, 对严重贫血者输新鲜血。蜂螫所致的急性肾衰往往合并多系统损害, 应及早充分透析, 以减轻组织损伤和减少并发症的发生, 促进肾功能恢复, 缩短临床过程, 提高治愈率。连续性肾脏替代治疗可避免间歇性血透引起的血流动力学改变对肾脏的影响, 在维持脑灌注, 控制高分解代谢等方面更具有优越性, 对低血压者也具有安全有效的作用, 在有条件的医院应首选连续性肾脏替代治疗。

关键词 蜂; 蜇伤; 急性肾功能衰竭
中图法分类号 R646.06 文献标识码 B

参考文献

[1] 徐麦玲. 动物毒中毒[A]. 见: 陈灏珠主编. 实用内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 697—701.
[2] Ramanathan M, Lam H S. Acute renal failure due to multiple bee stings-case reports[J]. Med J Malay Sia, 1990, 45(4): 344—345.

(编辑 谢义霞)

作者简介: 李良志(1963.6), 男, 重庆市开县人, 学士, 主治医师, 主要从事肾脏病方面的研究。电话: (023)58230865

收稿日期: 1999-07-15; 修回日期: 2000-02-23

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