

长爪沙鼠肝星状细胞的分离培养与鉴定

楼琦, 李巍, 石巧娟, 卢领群, 郭红刚, 杜江涛, 萨晓婴

(浙江省医学科学院实验动物中心, 浙江省实验动物与安全性研究重点实验室, 杭州 310010)

【摘要】 目的 探索长爪沙鼠稳定、经济的肝星状细胞分离和培养方法, 为深入探讨长爪沙鼠肝纤维化的细胞机制提供技术支撑。方法 取成年雄性长爪沙鼠, 用链蛋白酶、胶原酶及 DNA 酶体内门静脉灌注消化长爪沙鼠肝脏细胞, 经 Nycodenz 密度梯度离心, 分离肝星状细胞。台盼蓝拒染实验鉴定细胞活力, α -SMA, Desmin 免疫细胞化学染色鉴定细胞性质。结果 肝星状细胞得率为 $0.5 \sim 1 \times 10^7$ /肝。肝星状细胞存活率在 90% 以上。原代培养 3 d α -SMA 阳性细胞达 75% 以上, 传代培养后, α -SMA, Desmin 阳性达 100%。结论 成功建立了稳定可靠的长爪沙鼠肝星状细胞分离培养方法, 为肝脏相关疾病研究和防治药物的开发提供了技术支持。

【关键词】 长爪沙鼠; 肝星状细胞; 细胞分离; 原代培养

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0029-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.03.007

Establishment of a primary culture protocol of Mongolian gerbil hepatic stellate cells

LOU Qi, LI Wei, SHI Qiao-juan, LU Ling-qun, GUO Hong-gang, DU Jiang-tao, SA Xiao-ying
(Experimental Animal Center, Zhejiang Academy of Medical Sciences,
Zhejiang experimental animal and safety research key laboratory, Hangzhou 310013, China)

【Abstract】 Objective To investigate the method to isolate and culture hepatic stellate cells (HSCs) for studying the cellular mechanisms of hepatic fibrosis. **Methods** HSCs were isolated by nycodenz density gradient centrifugation after the hepatocytes obtained from adult male gerbils were digested with pronase, collagenase and DNase, infused via portal vein. The cell viability was determined by trypan blue exclusion test. The purity of HSCs was identified by detecting α -SMA, desmin immunohistochemical staining. **Results** The yield rate of HSCs was $0.5 \sim 1 \times 10^7$ per gerbil liver, and the cell viability was more than 90%. The percentage of α -SMA-positive cells was more than 75% after 3 days primary culture and almost 100% cells were α -SMA and desmin positive in passage culture. **Conclusion** The successful protocol of primary culture of Mongolian gerbil HSC provide a technical support for research of relevant liver diseases and drug development in the future.

【Key words】 Mongolian gerbil; Hepatic stellate cell; Cell isolation; Primary culture

肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC), 又称储脂细胞(fat-store cell, FSC)、间质细胞和 Ito 细胞, 主要分布于肝细胞与肝窦内皮细胞之间的窦周隙

内(Disse 间隙)^[1-2]。HSC 在肝纤维化的发生发展中具有核心作用, 是促进肝纤维化发展的主要因素^[3]。静息状态的 HSC 主要参与维生素 A 的代谢

[基金项目] 国家自然科学基金(31301933); 浙江省科技计划项目(2013C37012, 2013C37013, 2014C27013)。

[通讯作者] 萨晓婴, E-mail: saxiaoyin@163.com。

调节,当肝脏受到化学、物理及生物因素刺激而发生损伤后,HSC 发生增殖并被活化,合成以胶原蛋白为主的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)及各类细胞因子如 MMPs、TNF- α 等,参与受损肝组织的修复。刺激持续发生时,HSC 大量激活,引发 ECM 的合成与降解失衡,进而导致肝脏内结缔组织异常沉积,发生肝纤维化^[4]。

长爪沙鼠在单纯高脂饮食喂养下,可发生非酒精性脂肪肝系列病变。在经历了纤维化^[5-8]发展的经典模式“胶原带-桥接纤维化-假小叶”后,最终可形成肝硬化^[9],其疾病谱与人类脂肪肝极为接近^[10]。因此长爪沙鼠是肝纤维化研究方面很有价值的模型动物。HSC 已成为国内外学者研究肝纤维化的热点^[11-12],建立稳定、经济的分离和培养 HSC 方法是研究肝纤维化的基础。目前针对大、小鼠分离培养 HSC 的方法已经较为成熟^[13-15],但是国内尚无关于长爪沙鼠 HSC 的研究,而国外也尚未建立完善的培养体系。本文旨在 Friedman 等的基础上进行改良,建立适合长爪沙鼠肝星状细胞的培养体系,为从细胞和分子水平进一步研究长爪沙鼠肝纤维化形成的机制奠定坚实的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物准备

雄性长爪沙鼠,浙江省实验动物中心提供【SCXK(浙)2014-0001】,实验在本中心进行【SYXK(浙)2014-0008】体重 50~70 g,常规饲料喂养,正常饮水。在分离 HSCs 前 2 周每天 V itamin A 20 U/10 g 体重灌胃^[16-17]。

1.1.2 主要试剂

链霉菌蛋白酶 E (Pronase E), IV 型胶原酶 (Type IV collagenase), DNase、Nycodenz、6-联脒-2-苯基吲哚 (DAPI) 购自 Sigma 公司; DMEM 培养液购自 Invitrogen 公司; 胎牛血清为杭州四季青公司产品。Hank's 液为自配溶液。封闭用羊血清、羊抗兔 IgG、HRP 标记卵裂白霉素为中国北京中杉金桥公司生产。兔抗 Desmin、 α -SMA 一抗购自美国 Santa Cruz 公司。异硫氰酸荧光素 FITC 标记的羊抗兔 IgG、Cy3 偶联的羊抗兔 IgG 均购自美国 Chemicon 公司。

1.1.3 主要仪器

正置荧光显微镜 (Olympus BX51)、超速离心机

(BECKMAN COULTER, J-26 XPI)、普通倒置显微镜 (Nicon TS100)、CO₂ 培养箱 (Forma Scentific)、洁净工作台 (苏州苏洁净化设备有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 肝星状细胞的分离制备

肝星状细胞的分离采用改良的 Friedman 方法,长爪沙鼠术前禁食 8 h,自由饮水。用水合氯醛 (400 mg/kg) 腹腔内注射麻醉长爪沙鼠。胸腹部剃毛,皮肤消毒。仰卧位固定,大十字开腹,上至剑突,下至耻骨联合,左右至两侧腋中线。皮瓣外翻固定扩创,显露腹腔所有脏器。将小肠翻至鼠体左侧,游离肝脏,在右肾静脉上方游离肝下下腔静脉。下压肝脏剪断镰状韧带至肝上下腔静脉。游离腹主动脉,穿刺针穿刺,注入 4℃ Hank's 液 (内含肝素 25 U/mL) 20 mL,夹闭胸主动脉同时切开肝下下腔静脉与破心,尽量将肝脏内淤积的红细胞冲出。待肝脏颜色变成土黄色时,结扎肝上下腔静脉,行门静脉插管固定,取下肝脏,冲洗肝脏表面。4℃ Hank's 液 20 mL 行门静脉灌注肝脏,完成后肝脏移入 37℃ 水浴中的 250 mL 烧杯,继续循环灌注预温至 37℃ 的联合酶液 50 mL (含 0.05% 链酶蛋白酶、0.1% 胶原酶及 0.001% DNase),消化肝脏 10 min。在培养皿中去除肝包膜和 Glisson 鞘。将肝脏粉碎成糊状,放入含 0.05% 链酶蛋白酶、0.1% 胶原酶、0.001% DNaseI (V/V) 的 Hank's 中,37℃ 水浴用镊子搅拌 10~15 min,使肝组织充分消化。在消化好的肝组织中加入 50 mL 4℃ Hank's 液,用 100 目钢丝筛过滤。滤过的肝组织装入 50 mL 离心管中,加 Hank's 液至 50 mL,1815 r/min 离心 10 min。取沉淀重悬于 50 mL Hank's 液中,再次 1815 r/min 离心 10 min。取沉淀加 Hank's 液 5 mL 重悬,吸取 1 mL 置于 10 mL 玻璃离心管中,加入 1.5 mL 的 20% Nycodenz 液混匀,按此比例分装完全沉淀,每管液面覆盖 2 mL Hank's 液,2400 r/min,4℃ 离心 18 min,轻轻取出,不要摇动液面,可见在 Hank's 液下有一混浊带。用 16 号针头插入液面下此处抽吸混浊带于 10 mL 离心管。加 DMEM 培养液,1924 r/min 离心 10 min,沉淀重悬于 10 mL 左右 DMEM 培养液中,加入 10% 胎牛血清。细胞计数并且行台盼蓝拒染试验,判断活力。

1.2.2 细胞培养

将细胞以 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ mL 的密度接种到 50 mL 细胞培养液中,在 37℃、体积分数为 5%

CO₂、95% 潮湿空气的 CO₂ 恒温培养箱里培养。培养 1 d 后首次换液, 以后视情况每 2 ~ 3 d 换液一次。做免疫细胞化学检测时, 可将细胞接种于内有玻片的 6 孔板中。当细胞融合度达到 80% ~ 90% 左右可进行传代。传代时按常规使用 0.125% 胰酶消化。

1.2.3 细胞鉴定

细胞活力测定: 吸取 180 μL 细胞悬液置于载玻片上, 加入 20 μL 0.4% 的台盼蓝溶液, 混匀并在显微镜下观察细胞。未被台盼蓝染色者为活细胞。光镜下观察细胞形态, 细胞计数, 计算细胞得率及存活率。

细胞性质鉴定: (1) 荧光显微镜下观察, 当激发波长为 325 nm 时出现的自发荧光细胞即为分离的肝星状细胞, 用 DAPI 复染。(2) 细胞爬片用油红 O 直接染色 45 min, 双蒸水漂洗后用苏木素染细胞核, 2 min 后用双蒸水清洗, 镜下观察。(3) 细胞爬片经固定, PBS 清洗, 羊血清封闭, 用兔抗 α-SMA 一抗, 联合羊抗兔 IgG (二抗) 及 HRP 标记卵裂白霉素 (三抗), 进行 DAB 法免疫细胞化学染色。另有细胞爬片经固定、PBS 清洗、羊血清封闭, 用兔抗 Desmin (α-SMA) 一抗, Cy3 (FITC) 荧光标记二抗孵育后, DAPI 染色后, 荧光显微镜下观察分析^[19]。

2 结果

2.1 HSC 的存活率与收率

采用 Nycodenz 密度梯度离心法分离长爪沙鼠 HSC, 长爪沙鼠平均体重为 60 g, 每只鼠肝的细胞收率约为 $(0.5 \sim 1) \times 10^7$ 个。根据台盼蓝拒染试验, 细胞活力为 (98.6)%。

2.2 HSC 的形态观察

在普通光学倒置显微镜下观察, 新鲜分离的 HSC 由于富含脂滴, 具有很强的折光性, 呈现透亮、立体感较强的小圆球状 (图 1)。细胞在 325 nm 波长紫外光的激发下自发绿色荧光 (图 6)。细胞在接种后 30 ~ 60 min 出现贴壁, 培养 24 h 后 85% 细胞贴壁 (图 2), 72 h 贴壁细胞呈现出梭形, 多边形 (图 3), 普通光镜下观察油红染色结果表明, 红色脂滴主要分布于胞浆内 (图 4)。5 ~ 7 d 后, 细胞继续伸展, 绝大多数细胞呈星形, 部分细胞出现片状融合 (图 5); 10 ~ 11 d 左右融合达到 80% ~ 90%, 细胞铺满瓶底可以传代。传代后 1 d 细胞表现为活化表型。

2.3 HSC 鉴定



图 1 长爪沙鼠 HSCs 原代培养 2h 贴壁, 含折光颗粒的 HSC (×10)

Fig. 1 Gerbils hepatic stellate cells in primary culture, adherence happened in 2 hours, including the refractive index particles HSC (×10)

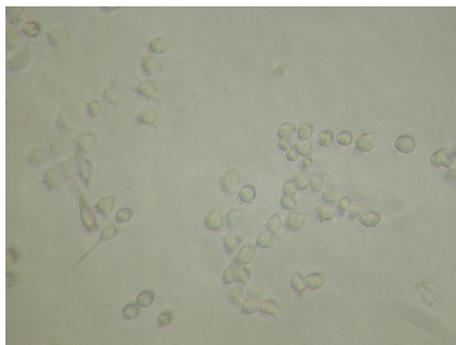


图 2 长爪沙鼠 HSCs 原代培养 24h 生长状况 (×20)

Fig. 2 Gerbils hepatic stellate cells' growth status in primary culture for in 24 hours (×20)

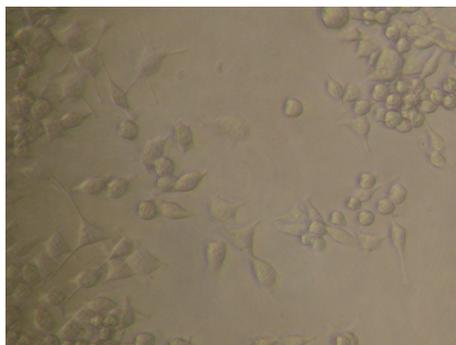


图 3 长爪沙鼠 HSCs 原代培养 3 d 呈局灶性生长 (×20)

Fig. 3 Gerbils hepatic stellate cells' focal growth status in primary culture for in 3 days (×20)

免疫细胞化学检测显示, 贴壁 24 h 的 α-平滑肌动蛋白 (α-SMA) 呈阴性, 原代培养 3 d 后, α-SMA 阳性率为 75% (图 7)。肝星状细胞消化传代后, 细胞表现为活化状态, 免疫荧光检测显示 Desmin (图 8) 和 α-SMA (图 9) 阳性染色达到 100%, 胞浆呈颗粒状或弥漫着色。

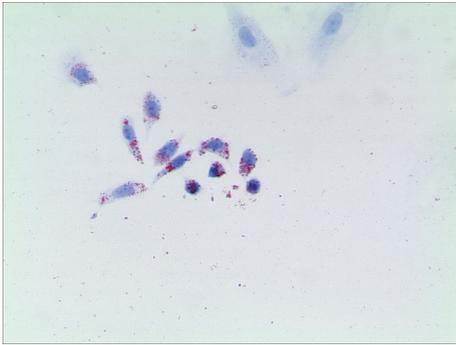


图 4 长爪沙鼠 HSCs 培养至第 3 天行油红 O 染色(×20)

Fig. 4 Gerbils hepatic stellate cells in primary culture for in 3 days, oil red O staining(×20)

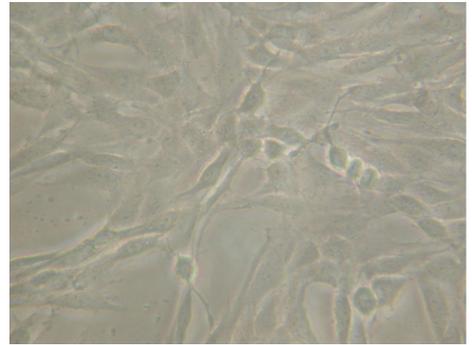


图 5 长爪沙鼠 HSCs 原代培养 7 d 呈纤维细胞样形态(×20)

Fig. 5 Gerbils hepatic stellate cells in primary culture for in 7 days, fibroblast morphology(×20)

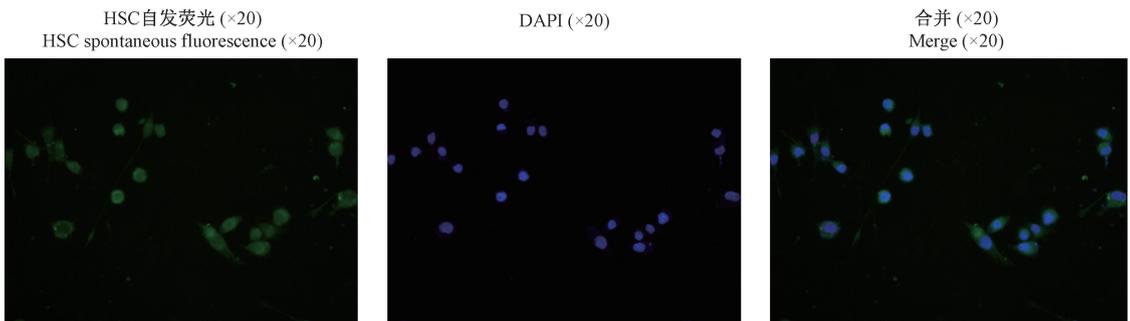


图 6 HSC 自发荧光(×20)

Fig. 6 HSC spontaneous fluorescence(×20)

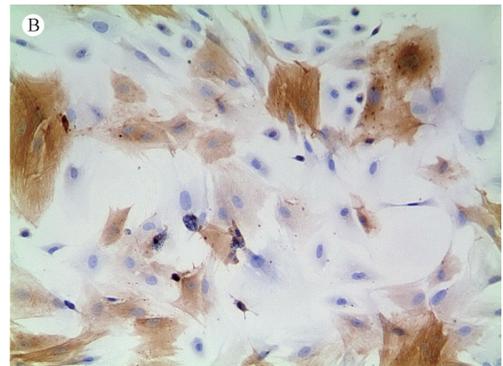
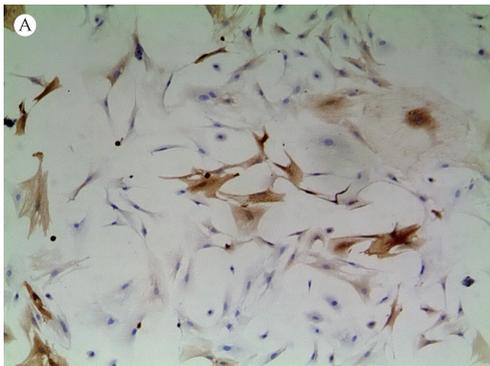


图 7 长爪沙鼠 HSCs 培养至第 3 天行 α-SMA 免疫细胞化学染色(A×20, B×40)

Fig. 7 Gerbils hepatic stellate cells in primary culture for in 5 days, positive staining with labeled antibody against α-SMA, A(A×20, B×40)

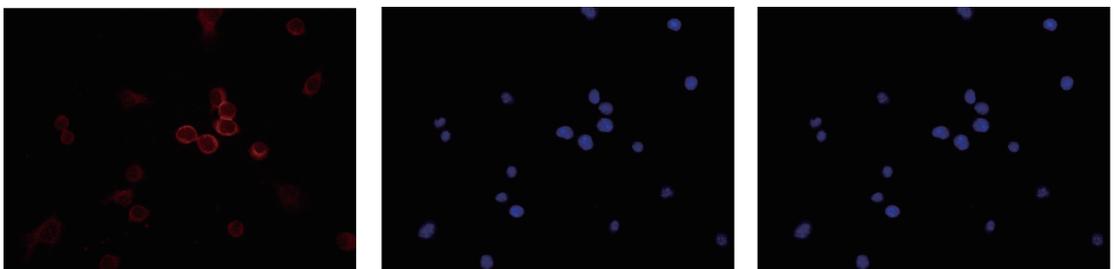


图 8 Desmin 免疫荧光染色(传代后 24h)

Fig. 8 Desmin immunofluorescence stain

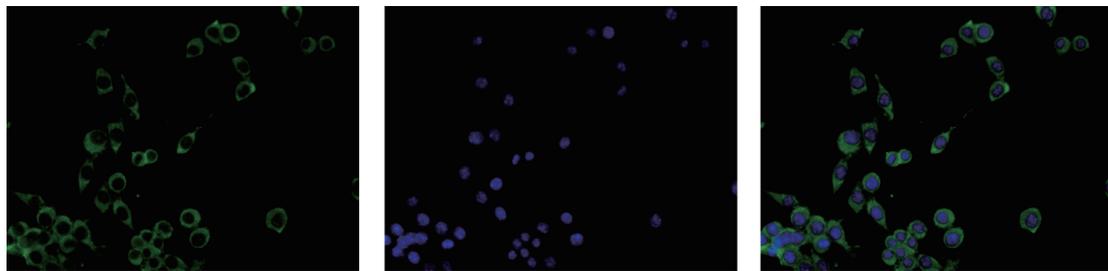


图9 α -SMA 免疫荧光染色 (传代后 24h)

Fig.9 α -SMA immunofluorescence stain

3 讨论

HSC 是肝内的一种非实质细胞,激活的 HSC 是合成、分泌 ECM 的主要来源,在肝纤维化的病程进展中处于重要地位。如前所述,长爪沙鼠脂质代谢模式与人类相仿,对高脂饮食敏感,相对于大、小鼠,容易形成肝纤维化,被认为是肝纤维化模型研究的理想动物。因此长爪沙鼠 HSC 的分离培养将为肝纤维化的发病机制研究及其逆转治疗奠定基础。

国内外关于大、小鼠 HSC 分离培养的方法报道很多,但有关长爪沙鼠 HSC 的分离培养体系的建立尚属首次。我们参照 Friendman^[18]的方法,并经过改良,反复试验,最终形成一套适用于长爪沙鼠的经济、合理、方便的 HSC 提取方法,有关经验总结如下:(1)长爪沙鼠的选择与预处理:本课题组所保存的封闭群有部分沙鼠具有自发性肥胖症状,即 3 月龄后,体态明显偏胖,体重较同龄鼠明显偏高,故本实验中选择 60 g 左右的长爪沙鼠,性别不限,并预先用维生素 A 灌胃处理,确保肝星状细胞具有一定的浮力,以便在密度梯度离心时,能较好地与其他细胞分离。(2)灌注方法的改良:我们在原位灌注方法的基础上^[19-20],进行了改良,采用肝脏体外循环灌注的方法,具体如下:用 4℃ 的预灌注液腹主动脉灌注,灌注液可以通过门静脉与肝动脉进入肝脏,肝内血细胞冲洗得相对较为干净,低温灌注可以减少肝热缺血对肝脏的损伤。取下肝脏后,行门静脉插管固定再行灌注与肝表面清洗,尽可能的减少血细胞对消化酶活性产生不良影响。在整个灌注过程中亦应避免气泡进入肝内血管导致的灌注不充分。(3)酶消化中的注意事项:肝脏消化是否适度,是影响细胞得率及活力的关键因素。本法采用离体酶消化法。该方法主要有以下 3 个优点:a. 肝脏局部容易实现温度控制,肝脏在 37℃ 水浴中进

行灌注,使肝脏与肝内酶消化液保持在 37℃,可以保证酶的活性,可以减少消化时间。b. 可避免原位酶消化法中由于肝脏侧枝循环丰富导致的酶用量增加,成本增高。c. 在保证门静脉插管良好同时,适当的阻断肝下下腔静脉,让酶消化液在肝内形成高压,消化酶通过门脉系统均匀地作用于肝组织,可提高酶的使用率。在本方法中所用的各消化酶的配比为:胶原酶:DNA 酶:链蛋白酶 = 0.1% : 0.001% : 0.05%,胶原酶主要用于消化肝脏内胶原,DNA 酶可降解肝实质细胞破裂后释放的 DNA,减少细胞间的粘连,而链蛋白酶主要用于去除肝细胞,提高 HSC 的浓度。消化酶务必在临用前配置,并且浓度准确。(4)分离介质的选择与添加:由于 HSC 富含脂滴,细胞密度在所有肝细胞中最低,故可采用密度梯度离心的方法分离 HSC,因此,分离介质的选择在 HSC 的分离纯化中亦是十分重要。常用的分离介质有 Metrizamide, Percoll, Nycodenz^[21-22]。我们通过预实验发现 Metrizamide, Percoll 较难形成明显的条带,且需要高速离心,而 Nycodenz 分层稳定,配置简单,因此我们采用 Nycodenz 作为分离介质,其常用浓度为 18%,但该浓度离心后 HSC 细胞层不集中,而用 20% 的浓度较为理想,重复性好,故在本实验中采用 20% Nycodenz 作为分离介质。Nycodenz 的添加方法有 2 种^[23-25],第一种是悬浮法,即将 Nycodenz 置于管底,轻轻覆盖上相应体积的细胞悬液,形成不能混匀的两个液层,第二种是混匀法,即将细胞悬液与 Nycodenz 混匀,再在上面覆盖少量的细胞培养液,或 Hank's,本课题组经比较选择了混匀法,该法密度梯度离心后,细胞数量多,条带较为集中。(5)其他:消化好的肝组织粘稠度很高,不易过滤,影响 HSC 的收率和活力,因此过滤时,我们加入 4℃ Hank's 液,不仅降低细胞悬液的粘稠度,同时也可以降低链蛋白酶活性,减少对 HSC 的毒性作用,促使 HSC 的收率、纯度和活力大

大提高。

总之,本课题组经多次实验摸索出这一套长爪沙鼠肝星状细胞分离培养方法,本方法不需要昂贵的试剂和特殊的仪器设备,单层密度梯度离心一步法即可分离纯化 HSC,且细胞收率亦较高,适于推广应用,为进一步研究肝星状细胞在肝损伤后细胞基质的沉积及纤维化的形成机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] Senoo H, Yoshikawa K, Morii M, *et al.* Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative—past, present and future[J]. *Cell Biol Int*, 2010,34(12):1247-1272.
- [2] Zurlinden J. The tangled roots of medication errors [J]. *Nurs Spectr (Wash D C)*, 1997,7(2): 14.
- [3] Tang Y. Curcumin targets multiple pathways to halt hepatic stellate cell activation; updated mechanisms in vitro and in vivo [J]. *Dig Dis Sci*, 2015, 60(6): 1554-1564.
- [4] Nishikawa H., Osaki Y. Liver Cirrhosis: Evaluation, Nutritional Status, and Prognosis [J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: p. 872152.
- [5] 李巍,石巧娟,郭红刚,等. 动态分析沙鼠非酒精性脂肪肝病形成及生化影响[J]. *中国比较医学杂志*,2011,21(8):44-48.
- [6] 李巍,石巧娟,郭红刚,等. 三种啮齿类动物非酒精性脂肪肝病形成及机制探讨[J]. *中国实验动物学报*,2012,20(1):76-80.
- [7] 楼琦,石巧娟,郭红刚,等. 非酒精性脂肪大鼠脂质代谢及病理变化的动态观察[J]. *中国比较医学杂志*,2012,22(3):5-11.
- [8] Ying HZ, Liu YH, Yu B, *et al.* Dietary quercetin ameliorates nonalcoholic steatohepatitis induced by a high-fat diet in gerbils [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013,52: 53-60.
- [9] 俞建顺,严茂祥,王德军,等. 高脂饮食对长爪沙鼠生化及主要脏器组织病理学的影响[J]. *中国比较医学杂志*,2015,25(4):38-43,47.
- [10] 钟民涛,黄敏,王钜,等. 长爪沙鼠脂代谢的研究进展[J]. *实验动物科学与管理*,2006,23(1):42-46.
- [11] Delire BP,Starkel, Leclercq I, Animal Models for Fibrotic Liver Diseases: What We Have, What We Need, and What Is under Development[J]. *J Clin Transl Hepatol*, 2015,3(1): 53-66.
- [12] Lepreux S, A. Desmouliere. Human liver myofibroblasts during development and diseases with a focus on portal (myo)fibroblasts [J]. *Front Physiol*, 2015, 6: 173.
- [13] He J, Gong J, Ding Q, *et al.* Suppressive effect of SATB1 on hepatic stellate cell activation and liver fibrosis in rats[J]. *FEBS Lett*, 2015,589(12): 1359-1368.
- [14] Wang Q, Dai X, Yang W, *et al.* Caffeine protects against alcohol-induced liver fibrosis by dampening the cAMP/PKA/CREB pathway in rat hepatic stellate cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015,25(2):340-352.
- [15] Mederacke I. Dapito DH, Affò S, *et al.* High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers[J]. *Nat Protoc*, 2015,10(2): 305-315.
- [16] Riccalton-Banks L, Bhandari R, Fry J, *et al.* A simple method for the simultaneous isolation of stellate cells and hepatocytes from rat liver tissue[J]. *Mol Cell Biochem*, 2003, 248(1-2): 97-102.
- [17] Riccalton-Banks L, Liew C, Bhandari R, *et al.* Long-term culture of functional liver tissue; three-dimensional coculture of primary hepatocytes and stellate cells[J]. *Tissue Eng*, 2003, 9(3): 401-410.
- [18] Rockey DC Boyles JK, Gabbiani G, *et al.* Rat hepatic lipocytes express smooth muscle actin upon activation in vivo and in culture [J]. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 1992,24(2): 193-203.
- [19] Knook D L,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.
- [20] Tacke F, Weiskirchen R. Update on hepatic stellate cells; pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012, 6(1): 67-80.
- [21] Herrmann J, Gressner AM, Weiskirchen R. Immortal hepatic stellate cell lines: useful tools to study hepatic stellate cell biology and function[J]? *J Cell Mol Med*, 2007. 11(4): 704-722.
- [22] Bartneck M, Warzecha KT, Tag CG, *et al.* Isolation and time lapse microscopy of highly pure hepatic stellate cells[J]. *Anal Cell Pathol (Amst)*, 2015;2015: 417023.
- [23] Maschmeyer P, Flach M, Winau F. Seven steps to stellate cells [J]. *J Vis Exp*, 2011(51).
- [24] Weiskirchen R, Gressner AM. Isolation and culture of hepatic stellate cells Methods[J]. *Mol Med*, 2005,117: 99-113.

[修回日期]2015-12-30