

• 基础实验研究论著 •

小鼠肝星状细胞的分离纯化新方法的建立与应用*

李亚琳[△]

(渭南师范学院化学与生命科学学院, 陕西渭南 714000)

摘要:目的 介绍一种简便、经济、高产的小鼠肝星状细胞(HSC)分离方法,为肝纤维化的研究提供细胞模型。方法 参照国内外方法并加以改良,采用酶灌注预消化及随后的震荡充分消化,合并 Medimachine 系统制成单细胞悬液。用人淋巴细胞分离液直接铺梯度,采用单层梯度离心法一步分离 HSC。结果 两只小鼠 HSC 得率可达 1×10^6 个,台盼蓝染色显示细胞活率达 92%。初分离的 HSC 在 328 nm 激发光下自发蓝绿色荧光,油红染色及结蛋白免疫细胞化学染色鉴定纯度达 90%。结论 建立了一种实用的小鼠 HSC 分离方法,可用于肝纤维化和原代 HSC 的生物学行为研究。该方法简便、实用、高产,不需特殊设备,便于推广应用。

关键词: 枯否细胞; 细胞分离; 肝硬化; 肝星状细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.09.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)09-1028-02

Construction and application of a new method for isolation and purification of mouse hepatic stellate cells*

Li Yalin[△]

(College of Chemistry and Life Science, Weinan Teacher University, Weinan, Shanxi 714000, China)

Abstract: Objective To develop a simple, economic and efficient method for isolation of mouse hepatic stellate cells(HSC) and to construct cell model for research on hepatic fibrosis. **Methods** Single cell suspension was prepared by predigestion, using enzyme perfusion, adequate digestion by vibrating and utilization of medimachine system. HSC were isolated by monolayer gradient centrifugation with lymphocytic cell separating medium directly. **Results** The harvested cell number was about 1×10^6 for each two mice, with cell motility rate of 92%, determined by trypan blue exclusion staining. Originally isolated HSC issued blue fluorescent under exciting light of 328 nm. Oil red staining and Desmin immune fluorescent chemical showed the purity of HSC was 90%. **Conclusion**

A method for the isolation of mouse HSC, could be used for the research of hepatic fibrosis and biological characteristics of primary HSC, was successfully constructed, which was simple, efficient and easy to operate and apply.

Key words: kupffer cells; cell separation; liver cirrhosis; hepatic stellate cell

肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)活化是肝纤维化发生、发展的主要原因,其活化产生的细胞因子导致肝脏细胞外基质(ECM)降解和胶原纤维增加是形成肝纤维化的主要原因^[1-2]。因此,研究其活化机制及其抑制成为预防及治疗肝纤维化甚至肝癌的主要突破口,HSC 原代分离培养和体外研究因而也显得越来越重要^[3]。本文介绍一种简单的小鼠 HSC 原代分离及纯化培养方法。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 SPF 级雄性昆明小白鼠 6 只(体质量 25~30 g)由第四军医大学实验动物中心提供,均予普通饲料喂养,自由进食。

1.2 主要试剂 Pronase E(Merck 公司)、Collagenase II (Sigma 公司)、淋巴细胞分离液(中国医学科学院生物工程医学研究所)、DMEM 培养液干粉(GIBCO 公司)、小牛血清(四季青生物工程材料有限公司)、鼠结蛋白单克隆抗体(DAKO 公司)、油红 O(上海生科生物科技有限公司)、D-Hanks(本室自配)以及 DAPI、Alexa Fluor 594 标记的羊抗鼠二抗(Molecular Probes, Invitrogen)等。

1.3 主要仪器 超净工作台、振荡混匀器、Medimachine 系统

(丹麦 Dako)、电子天平、低温垂直立式离心机、倒置显微镜、荧光显微镜、恒温水浴振荡器、水浴锅等。

1.4 主要用液 D-Hanks 液:KCl 0.4 g/L, KH_2PO_4 0.06 g/L, NaCl 8.0 g/L, NaHCO_3 0.35 g/L, Na_2HPO_4 0.053 g/L。预灌注液:EDTA 0.2 g/L,含 2.4 g/L Hepes 的 D-Hanks 液 200 mL,肝素钠 400 IU, pH 7.4。酶灌注液:链霉蛋白酶 E 1.3 g/L, I 型胶原酶 0.25 g/L, CaCl_2 0.22 g/L,含 2.4 g/L Hepes 的 D-Hanks 液 100 mL, pH 7.3。振荡消化液:I 型胶原酶 0.25 g/L,链霉蛋白酶 E 0.2 g/L, DNase 0.02 g/L, CaCl_2 0.22 g/L,含 2.4 g/L Hepes 的 D-Hanks 液 100 mL, pH 7.3。DMEM 细胞洗涤液:含 DNase 10 mg/L, 20% 小牛血清的 DMEM 细胞培养液。所有用液均需过滤除菌,并且 37 °C 预热后使用。

1.5 实验方法

1.5.1 细胞的分离

1.5.1.1 麻醉与消毒 用 2% 戊巴比妥钠按 40 mg/kg 腹腔注射小鼠。麻醉后常规固定,置小鼠于超净台内,75%酒精消毒腹部,紫外线照射 20~30 min。

1.5.1.2 灌注 “十”字切口打开腹腔,推肠管于腹腔左侧,暴露心脏和下腔静脉。用 18 号套管针连接输液瓶,从左心室进

* 基金项目: 陕西省教育厅资助项目(009JK427); 肿瘤生物学国家重点实验室(第四军医大学)开放基金资助项目(CBSKL200906); 渭南师范学院基金资助项目(10YKZ054)。 [△] 通讯作者, Tel: 0913-2136930; E-mail: lyal1222@gmail.com。

针注入预灌注液,下腔静脉放血。按 10 mL/min 流速进行肝脏灌注;冲洗肝脏血液直至肝脏变为土黄色。然后再换成酶灌注液灌注 15~20 min,至肝脏呈烂泥状。酶灌注液可回收,用于震荡消化。

1.5.1.3 剪碎组织并振荡消化 轻柔并迅速取下肝脏放于无菌平皿中加生理盐水冲洗,剔除肝包膜及结缔组织。尽可能快速剪碎肝组织并加入振荡消化液,于 37 °C 振荡消化 20 min (200 r/min,离心半径 13.5 cm),所得细胞悬液经 200 目钢网过滤,滤网上粗大的组织用 Medimachine 系统研磨制成细胞悬液(可加入适量 D-Hanks 液),连同滤液一起收集于两个 50 mL 离心管中。

1.5.1.4 去肝细胞 将所得细胞悬液 1 500 r/min(离心半径 13.5 cm)离心 5 min,弃上清液。沉淀用 D-Hanks 液重悬,然后 50×g 离心 2 min,沉淀肝细胞,取上清液进行梯度分离。

1.5.1.5 分离细胞 直接用淋巴细胞分离液铺梯度,上层加充分消化的单细胞悬液。淋巴细胞分离液用量为细胞悬液的两倍。1 400×g 离心 20 min(25 °C),平抛离心分离细胞。小心吸出中间层少量白色液体即为 HSC。

1.5.1.6 接种 用 DMEM,1 500 r/min(离心半径 13.5 cm)离心 5 min,洗涤细胞两次,然后以 1×10⁶ 个细胞接种于 50 mL 塑料培养瓶内,37 °C、5%CO₂ 培养箱培养。24 h 内静置培养,72 h 后换含 10%新鲜小牛血清的 DMEM 培养液,以后每 3 天换培养液 1 次。

1.5.2 分离细胞的检验

1.5.2.1 台盼蓝计数 将适量洗涤好的细胞悬液用台盼兰染色后置显微镜下观察计数,计算细胞得率和成活率。

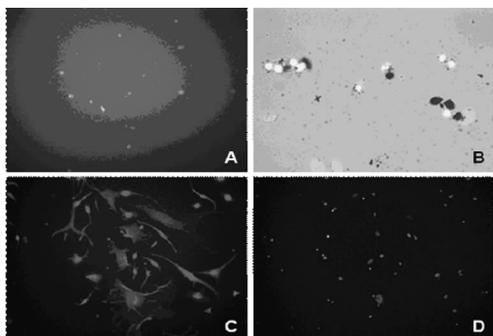
1.5.2.2 自发荧光检验 取少量洗涤的细胞悬液滴于载玻片上,直接置荧光显微镜下观察 HSC 自发荧光。

1.5.2.3 脂滴检测 将培养 2 d 的细胞先用异丙醇漂洗 30 s,然后用油红 O 工作液染色 15 min,60%乙醇分化,显微镜下观察控制分化时间至脂肪组织呈鲜红色,间质无色时为止。水洗后再用 DAPI 复染细胞核,最后甘油封片进行观察。

1.5.2.4 结蛋白检验 将培养 5 d 的 HSC 用抗结蛋白一抗和 Alexa Fluor 594 标记的羊抗鼠二抗进行常规免疫荧光染色,检测结蛋白在胞浆中的表达。

2 结 果

2.1 细胞的得率和成活率 台盼兰染色显示细胞活率达 92%,两只小鼠 HSC 得率可达 1×10⁶ 个。



A:刚分离的 HSC 发出蓝色荧光;B:分离 2 d 的细胞油红染色,胞浆内脂滴染成红色;C、D:分离 5 d 的细胞结蛋白抗体检测以及细胞核 DAPI 染色。

图 1 刚分离的细胞直接涂片于荧光显微镜下观察(×400)

2.2 细胞生长情况 刚分离的 HSC 呈圆球形,1 d 后绝大多数细胞贴壁,呈圆形或椭圆形;3 d 后细胞开始伸展,细胞体积增大,伸出伪足呈星形,并开始扩增;7 d 后细胞继续伸展并增殖,绝大多数细胞呈星形,并且达到 50% 聚集。

2.3 细胞的检验 将刚分离的细胞直接涂片于荧光显微镜下观察可见 HSC 发出蓝色荧光(图 1A)。培养 2 d 的细胞用油红 O 直接染色可见细胞质中红色脂滴(图 1B)。用抗结蛋白抗体检测可见胞浆中大量结蛋白被染成红色(图 1C)。

3 讨 论

HSC 属于肝脏非实质细胞,在肝脏中含量少。由于 HSC 富含脂滴,平均密度在所有肝脏细胞中最低,一般采用密度梯度离心分离该细胞。由于 HSC 与枯否细胞的密度有交叉,分离过程繁琐,试剂昂贵,要分离到大量高纯度的 HSC 并不容易。作者经过几次摸索找到一种经济、简便的快速分离小鼠 HSC 的可行方法。

本研究分离过程的关键是肝脏消化和密度梯度离心。目前密度梯度介质常用 Nycodenz^[4]、Stractan、optiprep^[5]、Percoll^[6] 等。价格比较昂贵,本研究采用廉价的淋巴细胞分离液作为梯度介质^[7],大大降低了分离成本。由于小鼠 HSC 密度为 1.047~1.061 g/mL,而枯否细胞密度为 1.083~1.095 g/mL^[8]。本实验直接用 1.077 g/mL 的人淋巴细胞分离液铺梯度,操作简便,又能保证 HSC 细胞的纯度。

本研究主要用两种消化酶。链蛋白酶主要用来消化肝细胞,消化不充分时肝细胞与 HSC 黏附在一起;胶原酶用来消化基质成分,减少细胞膜表面成分及细胞功能改变,上述两种酶消化不充分均直接影响 HSC 的得率和纯度。但消化过度则会损伤细胞而影响细胞存活。本实验采用先用酶灌注进行预消化,左心室进针,下腔静脉放血,利于操作和消化液的回收,而且预消化后的肝组织很容易剪碎;然后再进行震荡消化,粗大组织用机械方法分离成单细胞,提高了细胞的得率。

刚分离的 HSC 胞浆中含有大量的脂滴,并且因含有大量的维生素 A 而自发荧光。HSC 具有肌细胞的特点,细胞质中含有结蛋白,并稳定地存在于原代和传代的 HSC 中^[9-10],所有这些特点为 HSC 的鉴定提供了依据。

HSC 活化后是 ECM 生成的最重要的细胞。活化的 HSC 增殖并生成大量 I 型胶原,还合成分泌 ECM、金属蛋白酶及其抑制物^[11],尤其是 IV 型胶原酶、TIMP-1 等,引起 ECM 的增生沉积,并诱发肝窦毛细血管化及小叶内纤维化^[12-13]。体外培养细胞在塑料培养皿中可自发性活化,与体内肝损伤后的活化过程相似,因此可以作为体外肝纤维化模型,用于探讨肝纤维化的形成机制、细胞间的相互关系及抗肝纤维化药物的筛选。

本方法分离、培养 HSC 不需要特殊设备和昂贵的试剂,单层密度梯度一步法分离 HSC,细胞得率和活率均较高,适于推广应用。

参考文献:

[1] Moreira RK. Hepatic stellate cells and liver fibrosis[J]. Arch Pathol Lab Med, 2007, 131: 1728-1734.
 [2] Wu J, Zern MA. Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis[J]. J Gastroenterol, 2000, 35(9): 665-672.
 [3] Ya-Lin Li, Jiao Wu, Ding Wei, et al. Newcastle (下转第 1032 页)

端倒数第 2 个碱基来提高特异性。为减少第 1 轮残留引物对第 2 轮荧光 PCR 的影响,减少第 1 轮 PCR 产物的电泳峰,采用虾碱酶和外切酶对第 1 轮 PCR 产物进行纯化。本研究尝试纯化后发现,第 1 轮 PCR 产物峰的高度降低,第 2 轮 PCR 效率提高。

本研究结果显示,由于 5178 位点的第 1 轮和第 2 轮产物都很短,其扩增效率特别高,在引物量非常少的时候仍能检测到,所以影响其他位点两轮 PCR 的效率。因为在多重 PCR 中小片断产物对大片断产物的竞争是很强的^[8]。因此,本研究尝试将片断大小类似的位点同时实验,最后一起跑胶,发现大大提高了原来多重 PCR 中低效率位点的信号。所以建议在多重荧光错配引物 PCR 分型的引物设计中第 1 轮 PCR 的产物长度尽量相近,而第 2 轮产物也不要相差太大,长度以 120~300 bp 较好。

在第 1 轮多重 PCR 中尝试了普通 Taq 酶和热启动的 Taq 酶(PCR 程序使用 touchdown),发现使用热启动酶和 touchdown 程序大大提高了第 1 轮多重 PCR 成功率。第 2 轮荧光 PCR 尝试采用普通 Taq 酶、koddash 酶和热启动酶分别进行 5 位点的分型,热启动酶很难成功分型所有位点,koddash 酶虽然扩增效率高,但非特异性太强,表明对于一般的多重荧光引物 PCR 分型,使用扩增效率和特异性都居中的普通 Taq 酶效果更好。在 5 位点分型方法中采用了 2.0、1.6、1.2 mM 3 种 Mg²⁺ 浓度,其中 1.2 mM 浓度时很多位点无信号,2.0 mM 与 1.6 mM 比较,在峰形和特异性上比 1.6 mM 略显优势。

多重荧光错配引物 PCR 进行 SNPs 检测适合小样本位点数适中的科研和临床项目。实验中多位点分型仅用一条荧光引物,降低了摸索条件时更换错配引物提高特异性的成本,同时使用其他荧光标记公用荧光引物,可以使每次电泳的位点数成倍增长,降低成本。但通过实验摸索发现,要得到高特异性的多重分型结果,需要进行比较细致的条件摸索。另外由于该方法采用两轮 PCR,有很高的灵敏度,非常适合对微量 DNA 样本进行分型分析如利用该方法可以实现对临床中多种病原微生物的同时检测^[9]、微生物耐药性监测^[10]、微生物的分型等。这些潜在的应用前景为多重荧光引物错配 PCR 提供了进

一步研究和优化的必要性。

参考文献:

[1] Taylor G. Laboratory methods for the detection of mutations and polymorphisms in DNA[M]. Boca Raton: CRC Press, 1997: 45-51.
 [2] Martino A, Mancuso T, Rossi AM. Application of high-resolution melting to large-scale, high-throughput SNP genotyping: A comparison with the TaqMan method[J]. J Biomol Screen, 2010, 15(6): 623-629.
 [3] Sibley LD, LeBlanc AJ, Pfefferkom ER, et al. Generation of a restriction fragment length polymorphism linkage map for toxoplasma gondii[J]. Genetics, 1992, 132(4): 1003-1015.
 [4] Billadeau D, Blackstadt M, Greipp P, et al. Analysis of B-lymphoid malignancies using allele-specific polymerase chain reaction: a technique for sequential quantitation of residual disease[J]. Blood, 1991, 78: 302-3029.
 [5] 黄代新, 杨庆恩, 赵贵森. 片段长度差异等位基因特异性 PCR——一种改良的 SNP 分型新方法[J]. 法医学杂志, 2005, 21(1): 11-14.
 [6] Wen B, Li H, Gao S, et al. Genetic structure of Hmong-Mien speaking populations in East Asia as revealed by mtDNA lineages[J]. Mol Biol Evol, 2005, 22(3): 725-734.
 [7] 王瑞恒, 刘利民, 赵金玲, 等. 基于等位基因特异性 PCR 原理建立的 SNP 分型新方法[J]. 法医学杂志, 2008, 24(3): 189-193.
 [8] 曾凡胜, 陆学东. 多重 PCR 技术在呼吸系统感染疾病诊断中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(2): 147-148.
 [9] Fan W, Hamilton T, Webster-Sesay S, et al. Multiplex real-time SYBR Green I PCR assay for detection of tetracycline efflux genes of Gram-negative bacteria[J]. Mol Cell Probes, 2007, 21(4): 245-256.
 [10] 姚杰, 吕晴, 贾建安, 等. 运用多重 PCR 技术检测 CTX-M 型耐药基因的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(8): 806-808.

(收稿日期: 2012-01-08)

(上接第 1029 页)

disease virus represses the activation of human hepatic stellate cells and reverses the development of hepatic fibrosis in mice[J]. Liver inter, 2009, 29(4): 593-602.

[4] 王豫萍, 程明亮, 吴亚云, 等. 蓝莓对大鼠肝星状细胞增殖、活化的影响及机制探讨[J]. 中华医学杂志, 2010, 90(35): 2504-2508.
 [5] 俞富祥, 苏龙丰, 季世强, 等. 改良小鼠肝星状细胞的分离、培养及性质鉴定[J]. 肝胆胰外科杂志, 2010, 22(6): 457-459.
 [6] 许小兵, 李敏利, 郭婧云, 等. Percoll 密度梯度离心分离大鼠肝星状细胞[J]. 医学研究生学报, 2009, 22(6): 668-669, 672.
 [7] 吕晓霞, 许伟华, 孙向阳. 一种简便经济的肝星状细胞分离方法[J]. 山西医科大学学报, 2002, 33(5): 464-465.
 [8] Liu W, Hou Y, Chen H, et al. Sample preparation method for isolation of single-cell types from mouse liver for proteomic studies[J]. Proteomics, 2011, 11(17): 3556-3564.

[9] Geerts A. History, Heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells[J]. Sem Liv Dis, 2001, 21: 311-335.
 [10] Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver[J]. Physiol Rev, 2008, 88: 125-172.
 [11] 徐玉兵, 高春芳, 张蜀豫, 等. 肝细胞性肝癌合并不同模式乙型肝炎血清标志物的临床分析[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(6): 552-553, 556.
 [12] Xu L, Hui AY, Albanis E, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis[J]. Gut, 2005, 54: 142-151.
 [13] 吴正林, 吴意, 叶军, 等. 血清中肝纤维化指标测定在肝病中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(1): 31-32.

(收稿日期: 2011-11-01)