

一种改良的小鼠肝窦内皮细胞的分离、纯化、培养及鉴定方法

刘彪^{1,2} 傅童生¹ 唐丽^{2*} 贺福初^{2*}

(¹湖南农业大学动物医学院, 长沙 410128; ²军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京蛋白质组研究中心, 蛋白质组学国家重点实验室, 北京 102206)

摘要 采用改进的胶原酶灌注方法结合 Percoll 密度梯度离心加 anti-LSEC microbeads 免疫磁珠分离纯化小鼠肝窦内皮细胞(liver sinusoidal endothelial cells, LSECs), 台盼蓝染色测定细胞活力, 光镜下观察培养细胞的形态学变化, 流式细胞仪分析其纯度, RT-PCR 方法检测其新的特征性分子 LSECtin 基因的表达。结果表明: 此方法分离的小鼠 LSECs 得率为 $(5\pm 0.2)\times 10^6$ 个/只小鼠, 台盼蓝染色活力 $\geq 95\%$, 流式细胞仪分析其纯度达到 91.92%, 光镜下观察细胞形态典型, RT-PCR 检测到新的特征分子 LSECtin 基因的表达。本研究建立了一种小鼠 LSECs 的分离、纯化、培养及鉴定方法, 为其功能和作用机制的深入研究打下了基础。

关键词 肝窦内皮细胞; 分离; LSECtin

肝脏免疫是新近提出的概念, 众多研究结果表明, 肝脏通常倾向于诱导免疫耐受而非免疫应答。其耐受一方面能使来自胃肠道的无害食物抗原不发生免疫应答, 避免对肝脏的损伤; 另一方面却能使肝脏易受外来病原微生物的攻击, 甚至造成一些慢性感染, 如乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)、丙肝病毒(hepatitis C virus, HCV)以及疟原虫的持续感染^[1]。众多有关肝脏免疫耐受机制的研究认为小鼠肝窦内皮细胞(liver sinusoidal endothelial cells, LSECs), 在肝脏免疫耐受作用中发挥着举足轻重的作用。肝脏是由实质细胞和非实质细胞组成, 其中 LSECs 占肝非实质细胞的 40%, 它是唯一的器官定居性抗原递呈细胞, 能够与流经肝脏的淋巴细胞发生直接的相互作用, 并可有效摄取抗原。LSECs 处理抗原后以主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)形式传递给 CD4⁺ T 细胞或 CD8⁺ T 细胞, 该过程通常导致 CD4⁺ T 细胞或 CD8⁺ T 细胞的耐受^[2]。此外, LSECs 还能促进肝内活化 T 细胞的凋亡从而诱导肝脏耐受。因此为了能够更深层次地研究小鼠 LSEC 的生物学特性和功能, 分离高活力、高纯度的小鼠 LSECs 显得至关重要。目前, 国外对小鼠 LSECs 的分离方法虽有报道但并不详细, 而国内此方面的研究甚少。因此, 本研究拟建立一种有效、稳定的小鼠 LSECs 原代分离、培养、纯化与鉴定方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

8~9 周雄性 Balb/c 小鼠(18~22 g)购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 试剂和仪器

VIII 型胶原酶, DNase I, 胶原, 购自美国 Sigma 公司; 内皮细胞生长因子(endothelial cells growth factor, ECGF)购自瑞士罗氏公司; Percoll 购自美国 GE Healthcare Bio-sciences AB 公司; anti-LSEC-FITC, CD146 (LSEC) MicroBeads (mouse) 购自德国 Mitenyi Biotec 公司; PE Conjugated Anti-mouse CD14 购自美国 eBioscience 公司; IgG-FITC, IgG-PE 购自北京博奥森公司; Eppendorf centrifuge 5810 离心机(德国 eppendorf 公司); Nikon TS100 倒置显微镜(日本 Nikon 公司); Thermo 371 型细胞培养箱(美国 Thermo 公司)。

1.3 主要试剂的配制

1.3.1 麻醉剂 戊巴比妥钠用生理盐水配成 3% 的溶液。

1.3.2 灌注液 含 0.2% EGTA 的 D-Hank's 20 ml。

收稿日期: 2008-12-19 接受日期: 2009-05-15

国家自然科学基金(No.30730050, NO.30621063)、国家高技术研究发展计划(863 计划)(No.2006AA02Z165)、国家重大科学研究计划(No.2006CB910801, No.2009CB522506)资助项目

* 通讯作者。Tel: 010-68177417, 010-80727777-1242, E-mail: hefc@nic.bmi.ac.cn, tangli08@yahoo.com.cn.

1.3.3 消化液^[3] 含 0.02% 胶原酶Ⅷ、0.05% DNase I、0.5% BSA 的 Hank's 10 ml。

1.3.4 洗涤液 含 5% 的 FBS、0.05% 的 DNase I 的 HyQ 改良型 RPMI-1640。

1.3.5 90% 的 Percoll 10×PBS 与 Percoll (1:9) 混合。

1.3.6 25% 的 Percoll 1.25 ml 90% 的 Percoll 与 3.25 ml HyQ 改良型 RPMI-1640 混合。

1.3.7 50% 的 Percoll 3.3 ml 90% 的 Percoll 与 2.7 ml HyQ 改良型 RPMI-1640 混合。

1.3.8 缓冲液 含 0.5% 的 BSA, 2 mmol/L EDTA 的 HyQ 改良型 RPMI-1640。

1.3.9 胶原 先用灭菌蒸馏水配成 1 mg/ml, 再用 PBS 稀释成 200 μg/ml (10×)。

1.4 LSECs 的分离方法

灌注液和消化液用 37 °C 恒温水浴锅预热。小鼠用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后, 固定在手术板上, 打开腹腔, 暴露下腔静脉和门静脉, 从下腔静脉插管对肝脏进行灌注, 进行原位消化。取出整个肝脏, 放入盛有消化液的小皿中, 用弯钩镊子撕开肝脏外膜, 使其与消化液充分接触。把消化液转移到干净的 50 ml 离心管, 放入 37 °C 恒温水浴锅中消化 10~15 min。消化后的肝脏小心吹打后倒入 300 目细胞筛网过滤, 收集过滤液, 100 g 离心 5 min, 收集上清液。沉淀用 30 ml HyQ 改良型 RPMI-1640 重悬, 100 g 离心 5 min, 收集上清液。把收集的两次上清液 400 g 离心 10 min, 弃上清液。沉淀用 25% 的 Percoll 溶液重悬, 充分混匀后, 小心加到 50% Percoll 溶液的液面上, 形成一个明显的界面, 900 g 离心 20 min, 不带刹车。收集 25% 与 50% Percoll 之间富含 LSEC 的混浊带, 用 HyQ 改良型 RPMI-1640 做 10 倍稀释, 2 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液。

1.5 LSECs 的纯化和培养方法

取 1 ml HyQ 改良型 RPMI-1640 (5% FBS) 重悬沉淀, 把细胞悬液转移到 1.5 ml EP 管中, 细胞计数板进行细胞计数。细胞悬液 3 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 每 10⁷ 个细胞加 90 μl 缓冲液, 10 μl anti-LSEC microbeads, 旋转混合仪充分混匀, 4~8 °C 温育 15 min。3 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 沉淀用 1 ml 缓冲液洗涤, 3 000 r/min 离心 5 min, 洗涤 2 次。细胞重悬于 2 ml 缓冲液, 细胞筛 (70 μm) 过滤, 然后用免疫磁珠分离方法进行纯化, 弃流出液。取 1 ml HyQ 改良型 RPMI-1640 洗脱纯化柱, 把洗脱下来的细胞小

心加入到预先铺好胶原的六孔板, 加 15% FBS, 10 ng/ml 的 ECGF, 放入 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱, 12 h 后换液。

1.6 LSECs 的得率和活力检测

细胞计数板进行细胞计数, 计算每只小鼠分离纯化的 LSECs 的得率, 0.4% 台盼蓝染色检测新分离的 LSECs 的活力。

1.7 细胞形态学观察

分别在 0 h、12 h、48 h 通过倒置显微镜观察培养的 LSECs 的大小及形态学改变, 并拍显微照片。

1.8 LSECs 的流式细胞纯度检测

新分离的细胞, 用 1 ml HyQ 改良型 RPMI-1640 在 EP 管中洗一遍, 3 000 g 离心 5 min, 沉淀用 100 μl 缓冲液重悬, anti-LSEC-FITC 抗体 (1:10), anti-CD14-PE 抗体 (1:10), 用同型 IgG-FITC (1:200), IgG-PE (1:200) 抗体做对照, 4 °C 黑暗环境中染色 20 min。细胞用 1 ml 缓冲液洗涤, 3 000 g 离心 5 min, 洗涤 2~3 次, 500 μl 缓冲液重悬细胞, 流式细胞仪检测。

1.9 LSECs 特征性分子 LSECtin 表达的检测

直接在培养板中加入 Trizol 裂解细胞, 每 10 cm² 加 1 ml Trizol, 按照 TRIZOL Reagent 试剂说明提取 LSECs 总 RNA。以 RNA 为模板, 用 RT-PCR 试剂盒扩增 LSECtin 基因, 上游引物: CC CAAGCTTATT-AGTAGCAACTGCTCCT; 下游引物: CGGGGTACCA-TGAACACTGGTGAATAC, RT-PCR 反应参数为 45 °C 45 min; 94 °C 2 min; 94 °C 1 min, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min; 35 个循环; 72 °C 10 min。小鼠 LSECtin 基因全长为 882 bp。内参 GAPDH 的上游引物: TGAACGGG-AAGCTCACTGG; 下游引物: GAGCTTCACAAA-GTTGTTCATTGAG。目的片段为长度为 259 bp。

2 结果

2.1 改进后的小鼠肝脏灌注方法

传统的肝脏灌注方法一般采用门静脉插管, 恒流泵灌注。由于小鼠门静脉非常细, 给插管带来一定的困难, 而采用下腔静脉插管则简单, 方便得多。改进后用一次性注射器后面接一个一次性使用静脉输液针 (24G) (图 1A~图 1C), 能很好地做到无菌操作, 而且能方便地控制速度, 简单经济。灌注后的肝脏应该成淡黄白色 (图 1D), 而不能残留有红细胞, 否则影响肝脏消化, 和细胞的活性以及得率。

2.2 小鼠 LSECs 得率和活力

经多次实验 (n=5) 一只 8~9 周雄性 Balb/c 小鼠能



Fig.1 The improved method of mouse liver perfusion

A: open the abdominal cavity; B: inferior vena cava intubation; C: perfusion; D: the liver after perfusion.

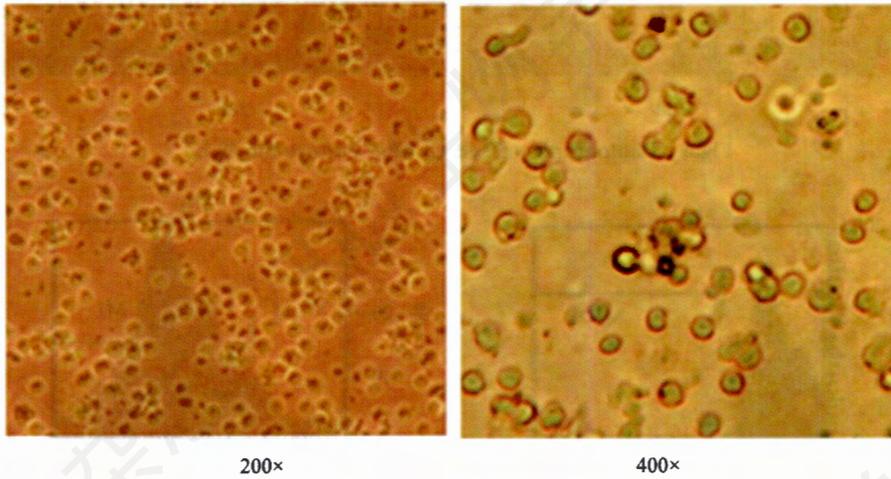


Fig.2 Photographs of LSECs after the separation and purification

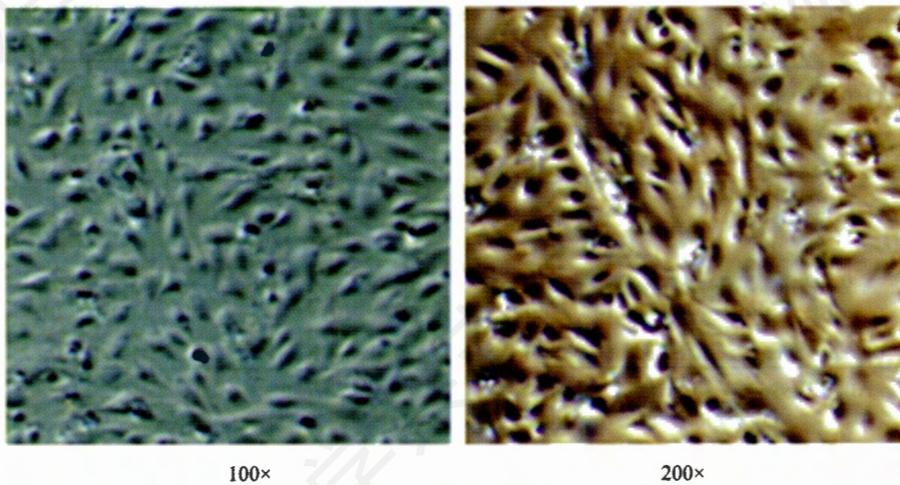


Fig.3 Photographs of LSECs after culture for 12 h

分离纯化得到 $(5\pm 0.2)\times 10^6$ 个LSECs,用台盼蓝染色活力 $\geq 95\%$,新分离出来的小鼠LSECs呈小圆形,透亮,大小均匀(图2)。

2.3 小鼠 LSECs 培养后的形态学变化

2 h 后细胞开始贴壁,12 h 已出现梭形的典型形态(图3),48 h 后形成鹅卵石样排列,密度稀的部位出现网状结构,这是它的典型排布(图4),时间延长,细

胞核突出位于中央,体外培养能持续一周左右,然后细胞逐渐凋亡。

2.4 小鼠 LSECs 流式细胞仪纯度鉴定

LSECs 的鉴定以往采用VIII因子和 CD14。VIII因子相关抗原也称 Von Willebrand factor (vWF),是由血管内皮细胞和巨核细胞合成的一种大分子糖蛋白。LSECs 是否表达 vWF 曾有不同的研究报道,近

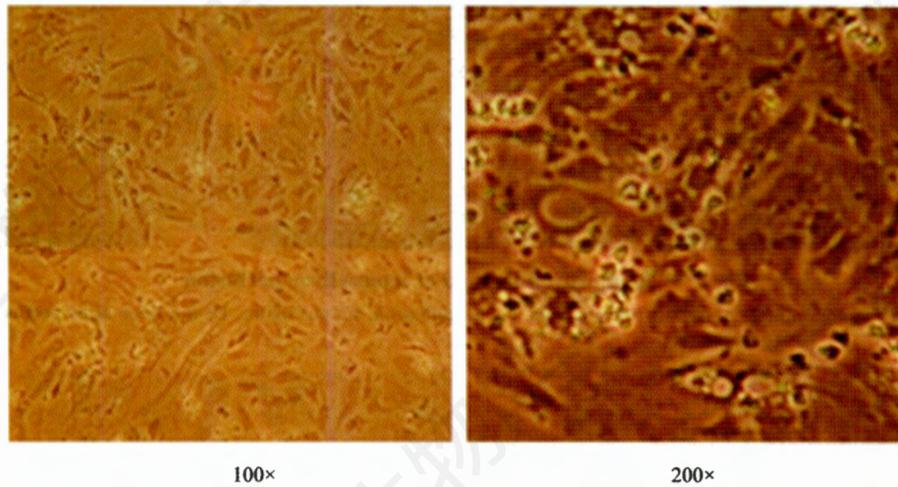


Fig.4 Photographs of LSECs after culture for 48 h

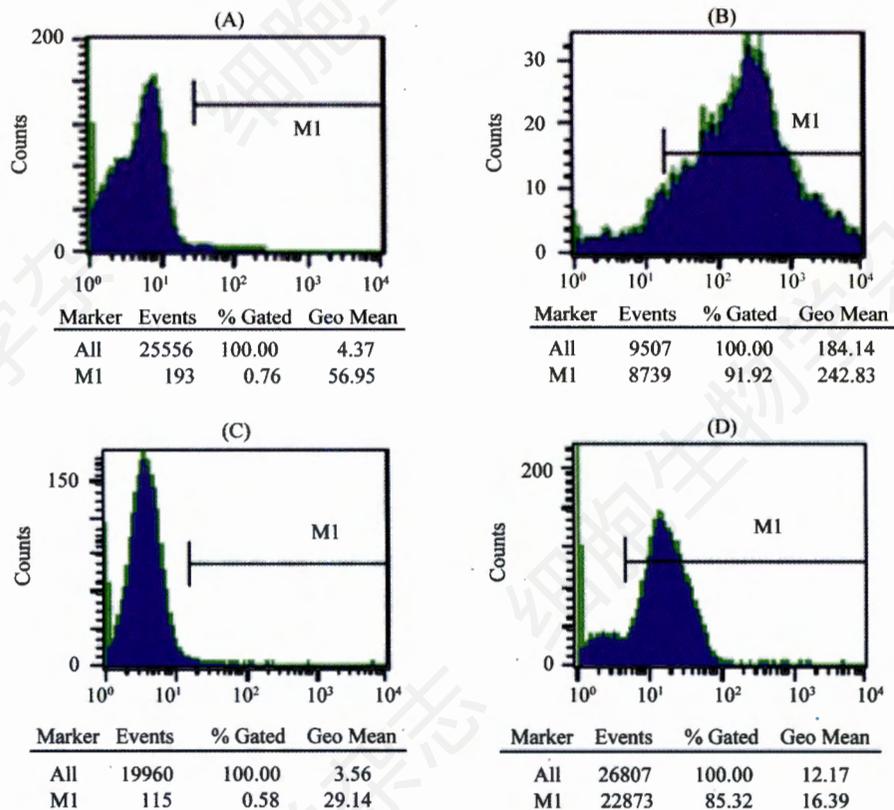


Fig.5 Flow cytometry analysis of purified LSECs

A: IgG-PE (0.76%); B: anti-CD14-PE (91.92%); C: IgG-FITC (0.58%); D: anti-LSEC-FITC (85.32%).

年来的一些研究表明新分离的LSECs中有5%左右的细胞呈vWF免疫荧光阳性,培养2~4天后的细胞vWF免疫荧光反应显著增强,因此不能将vWF的表达与否作为判断LSECs的标志。LSECs表达其他内皮细胞不表达的某些受体如IgG的Fc受体、CD13、CD14等以及一些粘附分子如ICAM-1、CD4、 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha 1\beta 1$,这与它存在的微环境是息息相关。CD14常作为LSECs的分子标记,CD14是脂多糖结合蛋白受体。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性杆菌膜上的复合物,可刺激内皮细胞分泌细胞因子,诱导机体产生非特异性免疫。LSECs上的CD14在处理血循环中的LPS-LPS结合蛋白复合物中起着重要作用。本研究用anti-CD14-PE标记新分离纯化的LSECs,其阳性细胞率达到91.92%(图5A~图5B)。此外本研究还结合anti-LSEC-FITC抗体对分离纯化LSECs进行表面染色,anti-LSEC-FITC抗体能较特异性地与小鼠LSECs结合^[4],流式细胞仪分析,其纯度为85.32%(图5C~图5D)。

2.5 小鼠LSECs特征分子LSECTin基因的鉴定

LSECTin是我们实验室在国际上率先克隆并研究的新功能基因,前期研究表明:LSECTin是一种新型C型凝集素分子,为II型跨膜糖蛋白;特异表达在肝脏和淋巴结;肝组织免疫组化实验显示LSECTin特异表达在肝脏的窦内皮细胞^[5]。本文用RT-PCR方法也鉴定到LSECTin基因在分离纯化出来的小鼠LSECs上高表达(图6),由于LSECTin在LSECs表达的特异性,LSECTin可能作为小鼠LSECs一种新的鉴定标志。

3 讨论

LSECs包围在肝细胞四周,其表面有许多窗孔而

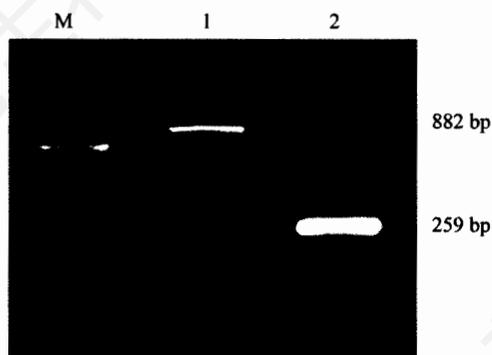


Fig.6 Identify LSECTin in LSECs by RT-PCR
M: marker; 1: LSECTin; 2: GAPDH.

缺乏基膜,使它有充分的机会与过往的抗原和淋巴细胞接触。LSECs具有独特的表型,其能够组成性表达与淋巴细胞相互作用必须的表面标记分子,便于与淋巴细胞的相互粘附;同时也表达某些识别受体使它们成为清道夫细胞,并且拥有强大的清道夫功能;LSECs还组成性表达共刺激分子(CD80, CD86, CD40)和MHC I, MHC II,能内吞抗原并递呈给T细胞。LSECs与其它抗原递呈细胞不同的是它不需要经过迁移,成熟过程就能行使抗原摄入,处理和递呈功能,因而能快速将信息传递给T细胞,同时能够诱导免疫耐受^[6]。随着人们对小鼠LSECs认识的逐渐加深,LSECs参与肝脏免疫耐受的角色逐渐受到众多学者的关注,其有可能在肝脏的病毒感染,肿瘤免疫以及器官移植等方面发挥重要的作用^[7,8],而获得高纯度和活力的小鼠LSECs是深入研究其生物学特性及功能的重要基础。

本研究采用改进的胶原酶灌注,Percoll密度梯度离心,以及anti-LSEC microbeads免疫磁珠分离纯化肝窦内皮细胞,该方法简单,稳定,且能保持细胞的活性,其得率和纯度都比较高,改良的方法与传统的方法比较有如下优点:(1)小鼠的门静脉比较细,给肝脏灌注造成了困难,本研究采用50 ml一次性注射器从小鼠下腔静脉进行灌注,既能冲洗干净红细胞,又能便于无菌操作,很好地保持细胞的得率及活性。(2)传统的方法采用差速离心^[9],或者选择性贴壁进行纯化,使分离的细胞容易混入kuppfer细胞,而使其纯度降低。本研究采用到的anti-LSEC microbeads是德国Mitenyi Biotec公司为分离小鼠LSECs专门研制的一种免疫磁珠,它能较特异性地与小鼠LSECs结合,分离出来的细胞活性好、纯度高且不丧失功能。(3)肝窦内皮细胞对培养条件要求严格^[4],本方法能很好地保持小鼠LSECs的活性,培养前,预先对培养板铺胶原,培养时在培养基中加10 ng/ml的ECGF,培养的小鼠LSECs生长良好,形态和排列非常典型,能在体外培养一周左右。更为重要的是,在我们的前期研究中,肝组织免疫组化实验显示LSECTin特异表达在肝脏的窦内皮细胞,而我们通过RT-PCR鉴定到所分离的LSECs上LSECTin基因的高表达。由于LSECTin表达的特异性,LSECTin很可能作为小鼠LSECs一种新的鉴定标志,结合其他方法用于LSECs的鉴定。总之,我们建立了一种新的小鼠LSECs的分离,纯化及鉴定方法,为其功能和作用机制的深入研究打下了重要的基础。

参考文献(References)

- [1] Crispe IN. Hepatic T cells and liver tolerance, *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(1): 51-62
- [2] Limmer A, Ohl J, Wingender G, *et al.* Cross-presentation of oral antigens by liver sinusoidal endothelial cells leads to CD8 T cell tolerance, *Eur J Immunol*, 2005, 35(10): 2970-2981
- [3] Katz SC, Pillarisetty VG, Bleier JI, *et al.* Liver sinusoidal endothelial cells are insufficient to activate T cells, *J Immunol*, 2004, 173(1): 230-235
- [4] Schildberg FA, Hegenbarth SI, Schumak B, *et al.* Liver sinusoidal endothelial cells veto CD8 T cell activation by antigen-presenting dendritic cells, *Eur J Immunol*, 2008, 38(4): 957-967
- [5] Liu W, Tang L, Zhang G, *et al.* Characterization of a novel C-type lectin-like gene, LSECTin: demonstration of carbohydrate binding and expression in sinusoidal endothelial cells of liver and lymph node, *J Biol Chem*, 2004, 279(18): 18748-18758
- [6] Knolle PA, Gerken G. Local control of the immune response in the liver, *Immunol Rev*, 2000, 174: 21-34
- [7] Ge X, Nowak G, Ericzon BG, *et al.* Liver sinusoidal endothelial cell function in rejected and spontaneously accepted rat liver allografts, *Transpl Int*, 2008, 21(1): 49-56
- [8] Jacques A, Bleau C, Martin JP, *et al.* Intrahepatic endothelial and Kupffer cells involved in immunosuppressive cytokines and natural killer (NK)/NK T cell disorders in viral acute hepatitis, *Clin Exp Immunol*, 2008, 152(2): 298-310
- [9] Knolle PA, Schmitt E, Jin S, *et al.* Induction of cytokine production in naive CD4⁺ T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells, *Gastroenterology*, 1999, 116(6): 1428-1440

An Improved Method for Isolation, Cultivation and Identification of Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Mouse

Biao Liu^{1,2}, Tong-Sheng Fu¹, Li Tang^{2*}, Fu-Chu He^{2*}

(¹Hunan Agricultural University Veterinary faculty, Changsha 410128, China; ²State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 102206, China)

Abstract Mouse liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) were isolated by improving the collagenase perfusion, percoll gradient isopycnic centrifugation, and purified using anti-LSEC microbeads. The viability of cells was assessed by trypan blue staining. The changes on morphology were observed under light microscope. Cells were stained with anti-LSEC-FITC antibody and analyzed by flow cytometry. The expression of LSECTin in LSECs was detected using RT-PCR. The yield of LSECs was $(5 \pm 0.2) \times 10^6$ cells/mice, vitality is greater than 95%, and the purity is more than 91.92%. The isolated LSECs have typical morphology. The expression of LSECTin could be detected in LSECs. In conclusion, we set up an effective, stable method for the isolation and cultivation, purification and identification of mouse LSECs, which is very important for studying their functions deeply.

Key words live sinusoidal endothelial cell; isolation; LSECTin

Received: December 19, 2008 Accepted: May 15, 2009

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30730050, No.30621063), the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No.2006AA02Z165) and the National Key Scientific Program (No.2006CB910801, No.2009CB522506)

*Corresponding author. Tel: 86-10-68177417, 86-10-80727777-1242, E-mail: hefc@nic.bmi.ac.cn, tangli08@yahoo.com.cn