

一种稳定和高产的肝贮脂细胞分离法

徐列明* 刘成* 刘平* 刘成海**

李风华* 顾宏图* 成令忠***

(*: 上海市中医药研究院肝病研究中心; 200032

** : 上海中医药大学

***: 上海医科大学组胚教研室)

肝脏贮脂细胞 (Fat-storing Cells, Ito Cells, Lipocytes) 是肝纤维化形成中细胞外基质的主要合成细胞^[1]。贮脂细胞的分离和培养大约已有近 10 年的历史, 而在我国, 近两年始有报道。由于该细胞的分离有一定的难度, 研究者往往为细胞的得率、纯度和存活率等问题所困扰。笔者参照国外文献^[2-4], 经过四年的努力, 分离了数 10 次大鼠肝贮脂细胞, 摸索出稳定、高产的分离方法, 细胞得率由 1×10^7 个左右/肝脏, 提高到 $3-4 \times 10^7$ 个/肝脏, 达到国外文献介绍的水平。

材 料 和 方 法

一、材料

1. 实验动物

Wistar 大鼠, ♂, 体重 400—450 g, 购自中国科学院上海实验动物中心。普通饲料喂养, 自由进食。

2. 主要试剂

(1) 链霉蛋白酶 (Pronase E) 德国 Merck 公司产品, 活性为 4,000, 000 PU/g。

(2) IV 型胶原酶 (Type IV Collagenase) 美国 Sigma 公司产品, 活性为 512 U/mg。

(3) DNA 酶 I (DNase I) 美国 Sigma 公司产品, 活性为 20,000 U/mg。

(4) 无钙培养液 (Eagle's MEM w/o Ca^{2+}) 干粉 美国 Sigma 公司产品。

(5) 199 培养液干粉 美国 GIBCO 公司产品。

(6) Metrizamide 美国 Sigma 公司产品。

(7) 胰蛋白酶 (Trypsin) 美国进口, 上海试剂采购供应站分装厂分装。

(8) 小牛血清 上海第二医科大学科技中心产品。

3. 分离和培养用溶液:

(1) 前灌流液 NaCl 8 g, KCl 0.4 g, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.078 g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.151 g, Hepes 2.38 g, 酚红 0.006 g, EGTA 0.19 g, $NaHCO_3$ 0.35 g, 葡萄糖 0.9 g, 青霉素 G 钾 0.125 g, 硫酸链霉素 0.1 g, 加超纯水至终体积 1000 ml, pH \approx 7.3。

(2) 酶配制液 NaCl 8 g, KCl 0.4 g, $CaCl_2$ 0.56 g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.151 g, Hepes 2.38 g, 酚红 0.006 g, $NaHCO_3$ 0.35 g, 青霉素 G 钾 0.125 g, 硫酸链霉素 0.1 g, 加超纯水至终体积 1000 ml, pH \approx 7.3。

(3) GBSS 液 KCl 0.3 g, $CaCl_2$ 0.17 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.21 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.07 g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.3 g, KH_2PO_4 0.03 g, $NaHCO_3$ 1.0 g, 葡萄糖 1.0 g, 加超纯水至终体积 1000 ml, pH \approx 7.0。

(4) D-Hanks 液 NaCl 8 g, KCl 0.4 g, $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ 0.06 g, KH_2PO_4 0.06 g, $NaHCO_3$ 0.35 g, 酚红 0.02 g, 加超纯水至终体积 1000 ml, pH \approx 7.4。

(5) 链霉蛋白酶(灌注用)溶液 链霉蛋白酶 130—150 mg, 酶配制液 100 ml, pH \approx 7.3。

(6) 链霉蛋白酶、胶原酶(分散用)溶液 链霉蛋白酶 15—20 mg, IV 型胶原酶 25 mg, 酶配制液 50 ml, pH \approx 7.3。

本文为国家自然科学基金资助项目。

本文曾得到美国旧金山综合医院 Liver Center Laboratory 副教授 Scott L. Friedmam 博士和纽约退伍军人医院 Alcohol Research and Treatment Center 主任 Charise S. Lieber 教授及博士后赵景波先生技术上的帮助, 谨谢!

(7) 胶原酶溶液 胶原酶 35 mg, 酶配制液 225 ml, pH \approx 7.3。

(8) DNA 酶溶液 DNA 酶 0.5—1 mg, 酶配制液 25 ml, pH \approx 7.3。

(9) 33% Metrizamid; Metrizamid 33 g, GBSS 100 ml, 4 $^{\circ}$ C 保存。

(10) 无钙培养液 无钙培养液干粉 11.5 g, Hepes 2.38 g, NaHCO₃ 2 g, 青霉素 G 钾 0.125 g, 硫酸链霉素 0.1 g, 加超纯水至终体积 1000 ml, pH \approx 7.3。

(11) 199 细胞培养液 199 培养液干粉 9.9 g (1 袋), NaHCO₃ 0.8 g, 10 mM Hepes, 加超纯水至终体积 1000 ml。用时加 20% 或 10% 小牛血清, 青霉素 G 钾 100 u/ml, 硫酸链霉素 0.1 mg/ml, 两性霉素 0.25 mg%, L-谷氨酰胺 0.295 mg%, pH \approx 7.3。

(12) 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EGTA 消化液 胰蛋白酶 500 mg, EDTA 40 mg, D-Hanks 液 200 ml, pH \approx 7.5。

以上溶液均过滤灭菌。

二、方法

1. 分离方法

将前灌流液、链霉蛋白酶溶液和胶原酶溶液等预热于 37 $^{\circ}$ C 水浴, 灌注时改入 43 $^{\circ}$ C 水浴。内径 3 mm 的硅胶管经 6% H₂O₂ 消毒、无菌蒸馏水彻底清洗后, 一端通过恒流泵与前灌流液瓶相连接, 另一端通过一个气泡管准备与穿刺针相连接。大鼠乙醚麻醉后被置于超净工作台上, 仰卧固定在灌注盘里, 加乙醚面罩。75% 酒精消毒皮毛, U 型剖胸术暴露内脏, 在门静脉近肝门处围结扎线。门静脉进穿刺留置针(C 型, 直径 0.8 mm, 日本テルモ株式会社生产), 退出针芯, 扎紧留置管。开启恒流泵, 流量为 10 ml/分钟, 待前灌流液流出管道后, 将输液管和留置管相接, 迅速剪断前腔静脉放血, 肝脏变为淡褐色。约灌注 8 分钟后, 开始灌注链霉蛋白酶溶液。同时, U 型剖胸术暴露心脏, 在后腔静脉横膈上方处围结扎线, 剪开右心房, 将剪去针头的一次性静脉针管由右心房逆行进入后腔静脉横膈上方, 扎紧结扎线, 前腔静脉放血处上方用止血钳夹紧, 使液体从静脉针管流出。链霉蛋白酶溶液灌注完毕后, 改灌胶原酶溶液。约 2 分钟后将一根一次性输液管一端与位于后腔静脉的静脉针管连接, 另一端插入胶原酶溶液瓶, 使流出液回流进胶原酶溶液瓶。循环灌注约 20 分钟, 待包膜下肝脏组织几乎液化后, 快速切下肝脏, 剪碎放入含有链霉蛋白酶、胶原

酶溶液的硅化三角烧瓶内, 加 4 ml DNA 酶溶液, 加酶配制液至 100 ml。烧瓶放入恒温水浴振荡器分散肝脏, 200 转/分钟, 37 $^{\circ}$ C, 30 分钟。振荡后将细胞悬液通过二层纱布过滤入 2-3 根 50 ml 聚丙烯离心管, 25 $^{\circ}$ C 下 500 g 离心 7 分钟。然后吸弃上清液至细胞团块上约 1 cm 处, 每管加入 40 ml 无钙培养液、1 ml DNA 酶, 使细胞很好悬浮, 再以上述条件离心。如此共离心 3-4 次, 直至上清液较清澈。将细胞合为一管, 加无钙培养液至 10 ml, 加 30% Metrizamide 5 ml 混合悬浮细胞(终浓度约为 11%), 保持离心管直立, 小心地在混合液上面加一层无钙培养液。将离心管以 3,200 转/分钟, 25 $^{\circ}$ C 下离心 20 分钟。垂直位取下离心管, 仔细吸取无钙培养液与细胞悬液界面之间的细胞, 放入离心管内, 加无钙培养液温和悬浮, 500 g 25 $^{\circ}$ C 下离心 7 分钟, 离心两次后, 倒去上清液, 将细胞悬浮在 20% 小牛血清 199 细胞培养液内。

2. 鉴定方法

(1) 活细胞鉴定 吸取 90 μ l 细胞悬液, 加入 0.4% 台盼蓝溶液 10 μ l, 混匀后光镜下未着色者为活细胞。

(2) 性质鉴定 用兔抗人结蛋白(Desmin)抗体(购自上海医科大学病理解剖教研室), PAP 法作免疫组化显色, 胞浆阳染者为贮脂细胞^[5]。

3. 培养方法

细胞以 1×10^6 个/ml 的浓度接种在直径 100 mm 塑料培养皿里, 在 5% CO₂、95% 潮湿空气的 CO₂ 培养箱里培养, 48 小时后培养液更换为 10% 小牛血清 199 培养液, 以后每 3-5 天更换一次培养液。

4. 传代方法

原代细胞长成单层后, 吸去培养液, 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EGTA 消化液 37 $^{\circ}$ C 下消化 3-5 分钟, 吹打细胞离壁, 收集消化液, 500 g 25 $^{\circ}$ C 下离心 7 分钟, 弃上清液后, 再用 199 培养液离心洗涤一次, 细胞团块用 10% 小牛血清 199 培养液悬浮, 以 $0.1-0.2 \times 10^6$ 个/ml 的浓度接种。

结 果

1. 细胞的得率和纯度

通常每只成年大鼠肝脏的贮脂细胞得率为 $3-4 \times 10^7$ 个。以 0.4% 台盼蓝染色, 细胞存活率在 98% 以上。免疫组化显示, 原代培养的结合蛋白阳性细胞在 90-95% 之间, 传代培

养后阳染细胞在 98% 以上。

2. 细胞形态

初分离得到的贮脂细胞在相差显微镜下为折光很强的圆球，远小于肝细胞，但大于枯否氏细胞和红细胞。约 24 小时后，细胞贴壁，呈扁圆形，胞浆内脂滴明显，少量细胞已开始伸展。48 小时后大部分细胞伸展生长，一部分细胞已呈现多角伪足、星状外形的典型形态(图版图 1)。经过 10—14 天的原代培养，细胞长成单层。传代后接种 1 小时，细胞均已贴壁，少量已经伸出伪足。1 天后全部细胞都伸展生长(图版图 2)，胞浆中脂滴减少。约 7 天又可长成单层。

讨 论

肝贮脂细胞的生理功能为贮存脂肪(Vit.A)、支持窦内皮细胞及合成细胞外基质。肝纤维化时，经枯否氏细胞激活后，其大量合成分泌细胞外基质，扮演了重要的角色^[6]，因此，有关贮脂细胞的研究，已成为肝纤维化研究的焦点之一。

贮脂细胞之所以难以分离，主要是因为其比重范围与枯否氏细胞有交叉，且易与肝细胞相吸附。肝脏的酶消化和密度梯度分离技术的发展，较好地解决了这些问题。根据文献报道和笔者的经验，分离成败的关键在于链霉蛋白酶的消化。消化不充分，肝细胞大量存在，影响贮脂细胞的得率和纯度；消化过度则损伤贮脂细胞，影响细胞的成活。适度消化受到酶活性、灌流温度和时间等影响，需通过多次摸索才能确定链霉蛋白酶的适当用量。如目前我们所用的链霉蛋白酶，灌流时间为 10 分钟，灌流液温度为 43℃，当室温在 28—30℃时，酶用量为 130 mg，当室温在 20℃以下时，酶用量需增至 150 mg。掌握标准是密度离心前的细胞团块中所剩肝细胞应很少；密度离心后，细胞中夹杂的肝细胞应极少。此外，肝脏灌流前血液冲洗得干净与否也很关键。如淤血部位体积较大，未淤血部位必然被酶过量消化；肝脏

淤血组织经振荡后，部分肝细胞解离进入细胞悬液，这均影响贮脂细胞的得率和成活。

目前尚无一个鉴定贮脂细胞“一锤定音”的指标。结蛋白是平滑肌细胞内特有的一种中间丝，贮脂细胞具有肌成纤维细胞的某些特征，因而也含有结蛋白^[7]。最近和气健二郎发现，近门脉的贮脂细胞富含脂滴，结蛋白反应强；近中央静脉的贮脂细胞则结蛋白反应极弱且不含维生素 A 脂滴^[8]。Ballardini 等也发现中央静脉周围的贮脂细胞结蛋白阴性^[9]。因此以是否含有结蛋白或脂滴作为鉴别标准仍存在假阴性问题。用检测 α -肌动蛋白(α -actin)鉴别贮脂细胞的阳性率也不高。观察 Vit.A 自发荧光，虽鉴定快速，但结果更不可靠。因此贮脂细胞的鉴定往往需要几方面的综合检测。在应用免疫组化 PAP 法时，应尽可能地消除内源性过氧化物酶，以防枯否氏细胞显色。如密度离心后收集贮脂细胞时过多吸取界面下的细胞，会夹杂一些枯否氏细胞，但传代后可清除。如要获得高纯度的原代贮脂细胞，只需在密度梯度离心时在 11% Metrizamide 上加一层 8% Metrizamide，只收集 8% Metrizamide 和无钙培养液之间的细胞，纯度可大大提高，但得率下降到 1×10^7 个左右。一般认为，研究相对静止的贮脂细胞，需要原代培养细胞；研究活化的贮脂细胞，则需传代培养细胞^[1]。

贮脂细胞分得后生长不良，也是研究者经常会碰到的问题。除了酶消化太过损伤细胞外，细胞接种浓度和数量也很重要。浓度以 $0.5-1 \times 10^6$ 个/ml 为宜，接种量：24 孔板每孔 0.5 ml，6 孔板每孔 1.5 ml，直径 60 mm 的培养皿每个 3 ml，直径 100 mm 的培养皿每个 8 ml。浓度太低或数量太少，都会削弱细胞的自分泌和旁分泌的刺激作用，必然使细胞难以生长。

最后值得一提的是，笔者所用的分离介质 Metrizamide 可靠，但价格昂贵。文献介绍的 Stractan 或 LAREX，价格虽便宜，然而配制复杂。改用 Nycordenz(美国 Sigma 公司产品)，

(下转 126 页)