

# 正常人肝脏星形细胞的分离、培养及鉴定

朱永红\* 胡大荣\* 谢青\*\* 聂青和\*\*\* 刘国栋\* 谭朝霞\* 王雅丽\*\*

(\*第三军医大学西南医院全军传染病专科中心 重庆 400038

\*\*第三军医大学新桥医院病理科 \*\*\*第四军医大学唐都医院传染科)

肝脏星形细胞 (hepatic stellate cells, HSC), 又称为储脂细胞 (fat-storing cell, FSC)、Ito 细胞、窦周脂肪细胞、储存维生素 A 细胞及肝脏特异性周皮细胞等, 是肝脏的一种非实质细胞, 该细胞位于 Disse 隙内, 围绕在肝窦周围, 其主要生理功能为摄取并储存维生素 A。目前一致认为, 病理情况下, 激活的 HSC 为肝纤维化时产生各种细胞外基质 (ECM) 成分的主要细胞群<sup>[1]</sup>。此外, 激活的 HSC 在门静脉高压的形成中也可能发挥着重要作用<sup>[2]</sup>。对 HSC 的功能特点及其激活调控机制的研究已成为近年来肝纤维化发生机制及抗肝纤维化研究中的热点之一。大鼠 HSC 的分离培养研究已有 10 多年的历史, 国内近几年也已分离成功<sup>[3,4]</sup>。但自 1992 年 Friedman 等<sup>[5]</sup>成功分离培养人 HSC 以来, 国内尚未见有关人 HSC 分离培养研究的报道, 为此, 我们进行了有关人 HSC 分离培养的研究。

## 材料和方法

### 1. 标本来源

标本为非肝病死亡者之肝脏标本。将所获肝脏标本置于 DMEM 培养液中保存待用, 所有标本均于获得后 24 小时内进行 HSC 的分离培养。

### 2. 主要试剂

链霉菌蛋白酶 (活性 4U/mg) 及 IV 型胶原酶 (活性 512U/mg) 为美国 Sigma 公司产品; DNA 酶 (活性 2000U/mg) 为包头生化制药厂产品; 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 液调整其密度为 1.050 备用; 前灌流液、酶配制液及 D-Hanks 液均按文献介绍方法配制<sup>[3]</sup>; 鼠抗人结蛋白单克隆抗体、鼠抗人  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) 单克隆抗体、鼠抗人波形蛋白单克隆抗体、鼠抗人胶质纤维酸性蛋白

(GFAP) 单克隆抗体、兔抗人 VIII 因子相关抗原单克隆抗体、鼠抗人 CD68 单克隆抗体及 SP 免疫组化试剂盒均为北京中山生物技术公司产品。

### 3. HSC 的分离

按 Friedman 等<sup>[5]</sup>介绍的方法进行并稍作修改。将前灌流液、链霉菌蛋白酶溶液 (用酶配制液配成浓度为 0.15%) 及胶原酶溶液 (0.05%) 预热于 37°C 水浴。取肝脏标本置于平皿中, 以 DMEM 清洗表面残存血液, 用止血钳持双面刀片修整肝脏表面, 暴露门静脉血管。按血管直径大小选用适当塑料插管针, 以前灌液进行灌流, 直至肝组织呈灰白色, 肉眼观察流出的液体透明已无血的颜色时, 改用链霉菌蛋白酶溶液灌流, 待肝组织明显变软时, 改用胶原酶溶液灌流直至肝组织完全软化, 肝包膜下组织液化。将灌流的链霉菌蛋白酶溶液、胶原酶溶液及肝组织置于平皿中, 以镊子撕碎肝组织, 并剔除门脉结缔组织及肝包膜。用玻璃吸管吹打, 使之完全分散, 再转入三角烧瓶中, 加入 DNA 酶溶液 (终浓度为 40 $\mu$ g/ml) 后于 37°C 振荡消化 30 分钟。将细胞悬液通过三层纱布过滤入 2 根 50ml 离心管, 4°C 下 500 $\times$ g 离心 7 分钟, 吸弃上清, 每管加入 40ml DMEM 及 DNA 酶 (终浓度为 40 $\mu$ g/ml), 使细胞很好地悬浮, 再以上述条件离心, 如此共离心 3 次, 直至上清较清澈, 弃上清, 将细胞合为一管, 加 DMEM 适当悬浮后置于密度为 1.050 的细胞分离液上, 于 20°C 下 1400 $\times$ g 离心 20 分钟, 垂直位取下离心管, 仔细吸取 DMEM 与分离液交界处细胞层, 以 DMEM 洗涤 3 次, 将细胞悬浮在含 20% 小牛血清的 DMEM 内。

### 4. HSC 的培养

调整细胞浓度为 2 $\times$ 10<sup>5</sup> 个/ml, 接种于塑料培养瓶及培养板中, 在 37°C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 24 小时后更换为含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液, 以后每 2—3 天换液 1 次。当细胞铺满瓶底时, 以 0.25% 胰蛋白酶进行消化传代, 以 2 $\times$ 10<sup>5</sup> 个/ml 的浓度接种。在原代及传代培养时, 于培养板孔中加入清洗干净的盖玻片, 制备细胞铺展片。

### 5. HSC 的活力及纯度鉴定

以常规台盼蓝拒染法鉴定细胞的存活。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。将新鲜分离的细胞悬液制片,于荧光显微镜下观察蓝绿色自发荧光,激发波长为 328nm,同时进行结蛋白、波形蛋白、GFAP、 $\alpha$ -SMA、 $\text{V}\beta$  因子相关抗原及 CD68 免疫细胞化学染色鉴定,计数阳性细胞的百分率。对初分离的及原代培养 2—3 天的细胞常规包埋后于透射电镜下观察。此外,将原代培养第 3 天、第 7 天及传 1 代后第 3 天的细胞铺展片取出,用 4% 多聚甲醛固定后,重复上述免疫细胞化学染色并计数阳性细胞百分率。

## 结 果

### 1. HSC 的收获量及纯度

通常每 10 克肝组织 HSC 的收获量约为  $1 \times 10^7$  个,经 0.4% 台盼蓝染色,细胞存活率在 95% 以上。将初分离的细胞行透射电镜观察,HSC 纯度达 85% 以上 ( $85.7 \pm 2.35/100$  个细胞),混杂细胞主要为内皮细胞、Kupffer 细胞及少量的淋巴细胞。新鲜分离的 HSC 在波长为 328nm 的紫外光激发下呈现蓝绿色荧光,但极易淬灭。将分离的 HSC 接种于塑料培养板中,经两次换液后纯度达 90% 以上,传 1 代后 HSC 的纯度接近 100%。

### 2. HSC 的形态学观察

初分离得到的 HSC 在相差显微镜下为折光性很强的圆球,远小于肝细胞。透射电镜下观察,胞浆中含明显脂滴,胞核边缘呈锯齿状(图版图 1),据此特点能很容易地将其与其他杂细胞相区别。接种后 24 小时,细胞即贴壁,呈扁圆形,少量细胞开始伸展。48 小时后大部分细胞伸展,一部分细胞出现多角伪足,呈现星状外形,胞浆中脂滴明显,围绕在细胞核周围(图版图 2),培养至第 5—7 天时,细胞伸展更加明显,体积明显增大,胞浆中脂滴减少(图版图 3)。培养至 7—10 天时,细胞铺满长成单层,胞浆中脂滴不明显,此时细胞呈现典型的成纤维细胞形态(图版图 4)。传代后 2 小时,细胞即贴壁,少量已伸展,24 小时后细胞均伸展生长,约 1 周左右又可铺满,并能持续传代达 10 代以上。

### 3. HSC 的免疫细胞化学鉴定

初分离的 HSC 其结蛋白、GFAP 及  $\alpha$ -SMA 染色均阴性,波形蛋白染色阳性率达 97% 以上, $\text{V}\beta$  因子相关抗原及 CD68 染色阳性细胞均小于 5%。培养 7—10 天及传 1 代后, $\text{V}\beta$  因子相关抗原、CD68、结蛋白及 GFAP 持续阴性,波形蛋白持续阳性(图版图 5), $\alpha$ -SMA 表达均呈现阳性(图版图 6)。

## 讨 论

我们采用体外灌流及一步梯度离心法,建立了正常人 HSC 的分离培养方法,所分离得到的 HSC 纯度及收获量均较高,其形态学及培养特点与文献报道一致<sup>[5]</sup>。该项工作为进一步开展 ECM 表达调控、HSC 激活的分子机理及抗肝纤维化药物研究打下了良好基础。

分离纯化 HSC 的方法很多,但基本原理都是利用 HSC 富含脂滴、密度低这一特点。目前大多采用一步密度梯度离心法获得 HSC,常用的密度梯度离心介质有 Stractan、Percoll、Metrizamide 及 Nycodenz 等<sup>[6]</sup>,虽然这些介质都具有较好的分离效果,但价格均较昂贵。本实验采用 D-Hanks 液校正密度为 1.077 的淋巴细胞分离液,使其密度为 1.050,行单层一步梯度离心,经过多次重复试验,取得了理想的分离效果。

目前尚无一个方便而可靠的鉴定 HSC 的指标,透射电镜下可非常容易地将 HSC 与其他细胞区别开,但需特殊仪器且需专人操作。维生素 A 自发荧光具有较好的特异性,且操作简便,可作为鉴定 HSC 较理想的指标。但由于该荧光极易淬灭,加上操作过程中不可避免的光暴露影响,只能见到部分细胞呈现蓝绿色自发荧光,加上培养过程中,随着培养时间的延长,胞浆中脂滴减少而逐渐丧失产生自发荧光的特性,因此,在实际操作中,不宜单独据此对肝脏星形细胞的纯度作出鉴定。结蛋白被认为是鉴定大鼠 HSC 的可靠指标,但我们多次试验发现,人 HSC 结蛋白免疫细胞化学染色均阴性,这可能与所采用抗体为抗人结蛋白单克隆抗体有关。Friedman 等<sup>[5]</sup>采用抗人结蛋白多克隆抗

体进行检测,则能检测到结蛋白的表达,但该蛋白的表达并不出现在每个 HSC 中,具有激活依赖性,表现为一些明显富含维生素 A 的细胞,结蛋白染色为阴性,而当 HSC 被激活后结蛋白染色变为阳性。因此,结蛋白不宜作为鉴定人 HSC 纯度的指标。GFAP 被认为是鉴定大鼠 HSC 的又一指标<sup>[7]</sup>,但人 HSC 的 GFAP 染色阴性。波形蛋白虽然在人 HSC 中表达持续阳性,且阳性率很高,但由于肝窦内皮细胞及 Kupffer 细胞亦表达该蛋白<sup>[8]</sup>,因此也不宜作为鉴定人 HSC 的指标。目前主要依据细胞形态、生长特点、维生素 A 自发荧光及免疫细胞化学染色等进行综合鉴定。寻找方便且可靠的指标对初分离的人 HSC 进行鉴定仍将是今后需要解决的问题。

培养激活为 HSC 的一个重要特征,对原代培养 7—10 天及传代的人 HSC 进行  $\alpha$ -SMA 免疫细胞化学染色,结果均为阳性。 $\alpha$ -SMA 可作为鉴定激活的 HSC 的一个可靠而特异的指标,此时,HSC 呈现特征性的成纤维细胞形态。

## 摘 要

参考 Friedman 等分离人肝脏星形细胞(HSC)的方法,采用校正密度的淋巴细胞分离

液进行一步梯度离心,成功地分离得到了正常人 HSC。HSC 的收获量约为  $1 \times 10^7$  个/10 克肝脏组织,存活率在 95% 以上,纯度达 85% 以上。传代后纯度接近 100%。对人 HSC 的标志物进行检测发现,结蛋白不宜作为鉴定初分离的及原代培养初期人 HSC 纯度的指标,而  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白可作为鉴定激活的人 HSC 的可靠指标。

关键词: 肝脏星形细胞 细胞分离 细胞培养 鉴定

## 参 考 文 献

- [1] 朱永红等,1998,实用肝病杂志,3:189—191.
- [2] 朱永红,1998,国外医学流行病学传染病学分册,25:17—20.
- [3] 徐列明等,1995,细胞生物学杂志,17:143—145.
- [4] 高春芳等,1995,新消化病学杂志,3:8—10.
- [5] Friedman SL., et al., 1992, *Hepatology*, 15: 234—243.
- [6] Alpini G., et al., 1994, *Hepatology*, 20: 494—514.
- [7] Niki T., et al., 1996, *Hepatology*, 23: 1538—1545.
- [8] Tsutsumi M., et al., 1987, *Hepatology*, 7: 277—284.

# ISOLATION, CULTURE AND IDENTIFICATION OF HEPATIC STELLATE CELLS FROM NORMAL HUMAN LIVER

ZHU Yong Hong\* HU Da Rong\* XIE Qing\*\*

NIE Qing He\*\*\* LIU Guo Dong\* TANG Zhao Xia\* WANG Ya Li\*\*

(\* Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; \*\* Department of Pathology, Xingqiao Hospital, Chongqing 400037; \*\*\* Department of Infectious Diseases, Tangdu Hospital, Xian 710038)

## ABSTRACT

According to the method described by Friedman et al., a modified procedure for isolation and culture of human hepatic stellate cells(HSC) was established with centrifugation on a single-layer density cushion of Ficoll-Hypaque( $\rho = 1.050$ ). The yield of HSC using this method was about  $1 \times 10^7$  per 10 grams of liver. Viability of the cells was more than 95% and purity was more than 85%. After the first passage, the purity of HSC was nearly 100%. It was found that desmin staining could not be used as a marker for identification of human HSC and  $\alpha$ -smooth muscle actin staining could be used as an ideal marker for identification of activated human HSC.

Key words: Hepatic stellate cells Cell isolation Cell culture Identification