

大鼠肝脏细胞同步分离与培养方法的建立

潘艳¹, 王万鹏², 张启迪³, 华香¹, 房凤梅¹, 傅承宏³, 王维¹ (1.涟水县人民医院 检验科, 江苏 淮安 223400; 2.涟水县人民医院 肾脏科, 江苏 淮安 223400; 3.上海交通大学医学院附属上海市第一人民医院 消化科, 上海 200080)

摘要: 目的 建立一种同时分离大鼠肝细胞 (parenchyma cell, PC)、肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC)、肝窦内皮细胞 (liver sinusoidal endothelial cell, SEC) 与库普弗细胞 (Kupffer cell, KC) 的操作方案。方法 采用EDTA/胶原酶两步灌注法获取肝细胞悬液, 通过低速离心首先分离出PC组分, 然后通过链蛋白酶E去除非实质细胞 (nonparenchymal cell, NPC) 中的PC, 最后通Nycodenz和Percoll溶液进行梯度离心分离并纯化HSC、SEC和KC, 体外培养并观察各细胞表型和功能的变化。结果 PC、HSC、SEC和KC平均每克组织产量分别为 $(26 \pm 9.2) \times 10^6$ 、 $(1.5 \pm 0.2) \times 10^6$ 、 $(7.4 \pm 1.5) \times 10^6$ 和 $(3.1 \pm 0.9) \times 10^6$, 活力分别为 $(93.1 \pm 2.3) \%$ 、 $(90.1 \pm 3.4) \%$ 、 $(96.2 \pm 2.1) \%$ 和 $(98.2 \pm 1.7) \%$, 纯度分别为 $(98.5 \pm 1.2) \%$ 、 $(95.1 \pm 2.5) \%$ 、 $(93.6 \pm 3.6) \%$ 和 $(98.1 \pm 1.4) \%$; HSC在体外培养过程中逐渐丧失维生素A, 转化为肌成纤维样 (myofibroblast, MF) 细胞; SEC在体外培养第3天出现凋亡, 至7天凋亡达到顶峰, 随后少量存活的细胞在体外增殖, 至培养14天时形成典型的“铺路石”形态; 培养14天的SEC保留清道夫功能, 但丧失窗孔结构; KC可在体外增殖, 培养至14天仍具有吞噬功能, 表达特征性标志CD68。结论 本方法可同时分离大鼠肝脏细胞, 细胞数量、纯度和活力可满足下游实验。

关键词: 细胞分离; 肝星状细胞; 肝纤维化; 上皮-间充质转分化

Isolation and culture of single cell types from liver of rats

PAN Yan¹, WANG Wan-peng², ZHANG Qi-di³, HUA Xiang¹, FANG Feng-mei¹, FU Cheng-hong³, Wang Wei¹ (1.Department of Laboratory, Lianshui People's Hospital, Huai'an 225400, Jiangsu Province, China; 2.Department of Nephrology, Lianshui People's Hospital, Huai'an 225400, Jiangsu Province, China; 3.Department of Gastroenterology, Shanghai First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China)

Abstract: Objective To establish the protocol for the separation of hepatocyte (PC), hepatic stellate cells (HSC), sinusoidal endothelial cells (SEC), and Kupffer cells (KC) from liver of rats. **Methods** Liver single-cells suspension was obtained by EGTA/collagenase perfusion. After low speed centrifugal separation of PC, the nonparenchymal cells (NPCs) portion was added with pronase E to disrupt the PC. Subsequently, HSC, SEC and KC were purified by two steps of density gradient centrifugation using Nycodenz and Percoll plus selective attachment, and the cells phenotype and function of changes after culture were then observed. **Results** The average yield of isolated PC, HSC, SEC, and KC were $(26 \pm 9.2) \times 10^6$, $(1.5 \pm 0.2) \times 10^6$, $(7.4 \pm 1.5) \times 10^6$ and $(3.15 \pm 0.9) \times 10^6$ cells per gram of liver tissue, respectively. The average viability of isolated PC, HSC, SEC, and KC were $(93.1 \pm 2.3)\%$, $(90.1 \pm 3.4)\%$, $(96.2 \pm 2.1)\%$ and $(98.2 \pm 1.7)\%$, respectively. The average purity of isolated PC, HSC, SEC, and KC were $(98.5 \pm 1.2)\%$, $(95.1 \pm 2.5)\%$, $(93.6 \pm 3.6)\%$ and $(98.1 \pm 1.4)\%$, respectively. HSC underwent a gradual phenotypic transition to a myofibroblast-like phenotype with vitamin A losing in vitro culture. The apoptosis of SEC began at Day 3, and reached maximum level at Day 7. Then a few survived SEC started proliferation, and splitted forming a cobblestone, sheet-like appearance at Day 14. Compared with new isolated SEC, the SEC at Day 14 lost fenestrations, but retained the function of scavenger.

KC could proliferate in vitro which had the ability of phagocytosis, and could express CD 68 (marker of KC) at Day 14 culture. **Conclusions** The simultaneous method for isolation was able to obtain the high yield, viable and purified liver cells from liver of rats, which is useful for the further research of liver physiology and pathology.

Key words: Cell separation; Hepatic stellate cell; Liver fibrosis; Epithelial-mesenchymal transition

肝脏是人体最大的消化腺，由实质细胞（parenchyma cell, PC）即肝细胞（hepatocytes）和多种不同种类的非实质细胞（nonparenchymal cell, NPC）组成。PC约占肝脏细胞总数的60%，NPC约占总数的40%^[1]。NPCs1主要由肝窦内皮细胞（liver sinusoidal endothelial cell, SEC）、库普弗细胞（Kupffer cell, KC）和肝星状细胞（hepatic stellate cell, HSC）构成，分别占19%、15%和6%^[1,2]。

虽然单独分离大鼠肝脏细胞的报道较多，但同时分离肝脏多种细胞的文献却较少。目前同时分离PC和NPC主要依据EGTA/胶原酶两步法的组织灌注获得总细胞悬液，随后通过低速离心总细胞悬液先初步分离出PC^[3,4]。PC占肝脏细胞总数的60%，低速离心很难完全去除PC，而NPC与PC结合又会对进一步分离产生影响^[5]。因此，本研究中对胶原酶和链蛋白酶的使用进行了一些改变。在低速离心初步分离前只使用胶原酶，以免损伤PC；而在富含NPC的悬液中加入链蛋白酶破坏PC，减少对NPC分离的影响。本文用此法同时分离PC、HSC、SEC和KC，并对分离和培养后的一些特性进行鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 本研究的实验动物为Sprague-Dawley (SD) 大鼠，雄性，SPF级，体质量为400~500 g，由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供。主要试剂包括美国GE HealthCare公司的Percoll细胞分离液，挪威axis-shield公司的Nycodenz，美国Abcam公司的抗体细胞角蛋白18（cytokeratin-18, CK-18）、神经胶质纤维酸性蛋白（glial fibrillary acidic protein, GFAP）、平滑肌肌动蛋白（ α -smooth muscle actin, α -SMA）和CD 68，美国Santa Cruz公司的抗体CD 31，美国Sigma公司的荧光标记聚苯乙烯微珠，各PCR引物及氯化

钠等化学试剂由上海生工公司合成和购买，RNA抽提试剂盒、逆转录试剂盒及PCR试剂盒购于大连宝生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 配制分离灌注液 大鼠肝脏灌注液的成分见表1。

1.2.2 细胞的分离与纯化

1.2.2.1 大鼠单细胞悬液的获取 选择体质量400 g以上的SD大鼠，腹腔注射麻醉。门静脉插管后灌注预热的EDTA液10分钟（15 ml/min），后换成0.5 mg/ml胶原酶溶液以15 ml/min灌注。剪下肝脏并剔除肝包膜及结缔组织，撕碎后用0.5 mg/ml胶原酶与20 μ g/ml DNA酶 I 于37 $^{\circ}$ C振荡消化30分钟。无菌网过滤后收集细胞悬液。

1.2.2.2 PC的纯化与培养 收集细胞悬液并补GBSS/B液至40 ml，50 \times g，4 $^{\circ}$ C离心2分钟。收集上清后再次补液并离心，重复3次，期间保留所有上清及沉淀。沉淀用48% Percoll溶液重悬，50 \times g、4 $^{\circ}$ C离心10分钟，弃上清，GBSS/B重悬再次离心，弃上清，加入培养液，重悬后种植于I型胶原包被的培养板中。

1.2.2.3 HSC的纯化与培养 收集上述步骤中的上清液，4 $^{\circ}$ C、500 \times g离心7分钟，沉淀以含0.5 mg/ml的链蛋白酶E和20 μ g/ml DNA酶 I 的GBSS/B液重悬并孵育30分钟以破坏肝细胞。再次离心后沉淀用30 ml含17.6% Nycodenz的GBSS/B稀释，并加入15 ml含8.2 % Nycodenz的GBSS/B液。最后小心加入5 ml GBSS/B液。4 $^{\circ}$ C、1500 \times g离心15分钟，可见8.2 % Nycodenz层与GBSS/B溶液层之间有一浑浊带，小心吸取该带细胞，以GBSS/B重悬，4 $^{\circ}$ C、500 \times g离心7分钟，所得沉淀以HSC培养液重悬、接种。

1.2.2.4 SEC的纯化与培养 小心吸取8.2%与17.6% Nycodenz界面层中细胞，GBSS/B重悬并定容至

表1 大鼠肝脏灌注液成分（mg/L）

项目	NaCl	KCl	Na ₂ HPO ₄	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	KH ₂ PO ₄	HEPES	NaHCO ₃	EGTA	葡萄糖	CaCl ₂ ·2H ₂ O	MgCl ₂ ·6H ₂ O	MgSO ₄ ·7H ₂ O
EGTA液	8000	400	120.45	88.17	-	2380	350	190	900	-	-	-
胶原酶液	8000	400	120.45	88.17	-	2380	350	-	-	560	-	-
GBSS/B	8000	370	59.6	-	30	-	227	-	991	225	210	70

注：“-”表示不添加此项

12 ml。在15 ml离心管中,先后加入4.5 ml 50% Percoll、6 ml 25% Percoll及3 ml细胞悬液。1500 × g离心15分钟后可见6个层面,由上到下依次为GBSS/B、细胞碎片、25% Percoll、SEC、50% Percoll及红细胞等沉淀。小心吸取SEC层,重悬并离心后以无血清RPMI-1640培养液重悬并植入培养皿,在培养箱中孵育30分钟,诱导混杂的KC贴壁,收集悬浮液,再次离心并重悬后植于胶原包被的培养皿中。

1.2.2.5 KC的培养与纯化 上述50% Percoll层富含KC,吸取此层,加入GBSS/B, 4 °C 500 × g离心7分钟,弃上清,加入KC培养液,调细胞计数后种植于培养皿中。

1.2.3 检测指标 应用Countess自动细胞计数仪计算细胞的产量与活力。糖原染色、油红O染色、扫描电镜检测、蛋白免疫印迹(Western blot, WB)、免疫荧光检测和逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase polymerase chain teaction, RT-PCR)均按相关文献步骤及产品说明书操作^[3,6],引物序列见表2。HSC又称Ito细胞、维生素A储存细胞,维生素A可自发蓝绿色荧光,是评价HSC特性的重要指标^[7],可在328 nm波长下通过荧光显微镜观察HSC。

细胞摄取能力的检测:①摄取荧光标记的乙酰化低密度脂蛋白(Dil-Ac-LDL)是LSECs的特性。为鉴定LSECs的摄取能力,将新分离与培养7天的PC、14天的LSECs种植于包被鼠尾I型胶原的13 mm圆形无菌载玻片上,PBS清洗3次,4%多聚甲醛固定20分钟,DAPI染色3分钟,荧光抗淬灭剂封片,激光共聚焦下拍照^[7],于10 μg/ml Dil-Ac-LDL的培养基中培养4小时。②吞噬聚苯乙烯微珠: KCs具有吞噬外来异物的功能^[8]。激发波长为470 nm荧光标记的聚苯乙烯微珠(L1030, Sigma公司)与培养基1:250混合孵育

细胞60分钟,PBS清洗3次,4%多聚甲醛固定,DAPI染色3分钟,荧光抗淬灭剂封片,激光共聚焦成像。

2 结果

2.1 PC的分离、培养和鉴定 每克组织PC产量为 $(26 \pm 9.2) \times 10^6$,活力为 $(93.1 \pm 2.3) \%$ (表3)。新分离的PC多为圆形或卵圆形(图1A、B),至7天时逐渐失去上皮细胞形态并向成纤维细胞样转变(图1C、D);糖原染色示PC胞浆中含有大量的红色颗粒(图1E~H),在培养7天时,虽然已经出现成纤维细胞样形态,但仍可见胞内大量糖原颗粒(图1G、H),同时免疫荧光示CK-18表达仍为阳性(图1I~J);凝胶电泳(图2A)及WB(图2B)显示PC标志蛋白CK-18显著表达,而HSC标志蛋白GFAP和KC标志蛋白CD68基本无表达;流式分析CK-18阳性率为 $(98.5 \pm 1.2) \%$ (图2C)。

2.2 HSC的分离、培养和鉴定 每克肝组织HSC产量为 $(1.5 \pm 0.2) \times 10^6$,活力为 $(90.1 \pm 3.4) \%$ (表3)。初分离的HSC呈圆形,体积小,胞内含折光性较强的脂滴(图3A、B),至培养14天时,HSC胞体逐渐变长(图3C、D);初培养的HSC在328 nm激发光下可见蓝色自发荧光(图3E、F),培养至14天时自发荧光转阴(图3G、H);初培养的HSC高表达标志蛋白GFAP(图3I、J),培养至14天时高表达成纤维细胞特征性标志 α -SMA(图3K、L);初培养的HSC胞浆内含红色脂滴(图3M、N),培养至14天时胞内脂滴减少(图3O、P)。凝胶电泳和WB显示新鲜分离的HSC表达GFAP,而CK-18和CD68基本无表达(图2A、B);流式细胞检测示细胞GFAP表达率可达 $(95.1 \pm 2.5) \%$ (图2C)。

2.3 SEC的分离、培养和鉴定 每克组织SEC产量为 $(7.4 \pm 1.5) \times 10^6$,活力为 $(96.2 \pm 2.1) \%$ (表3)。

表2 RT-PCR 引物序列

引物名称	序列	长度 (bp)
CK-18 (NM_053976.1)	正向引物: 5'-CTGGTCTCAGCAGATTGAAGAG-3'	163
	反向引物: 5'-GAGGTTGTTCTCCAAGTTGATGT-3'	
GFAP (NM_017009.2)	正向引物: 5'-CGTCTCAGTTGTGAAGGTCTATT-3'	96
	反向引物: 5'-CAGAAGGATGGTGTGGACTC-3'	
CD68 (NM_001031638.1)	正向引物: 5'-CCTTGCTGGTACTGCTTGTAG-3'	97
	反向引物: 5'-GTTGTAGGTGTCTCCGTGAAG-3'	

表3 分离所得细胞的数量、活力及纯度 ($\bar{x} \pm s$)

细胞类型	数量 ($\times 10^6$ /1 g肝组织)	活力 (%)	纯度 (%)
PC	26.0 ± 9.2	93.1 ± 2.3	98.5 ± 1.2
HSC	1.5 ± 0.2	90.1 ± 3.4	95.1 ± 2.5
SEC	7.4 ± 1.5	96.2 ± 2.1	93.6 ± 3.6
KC	3.1 ± 0.9	98.2 ± 1.7	98.1 ± 1.4

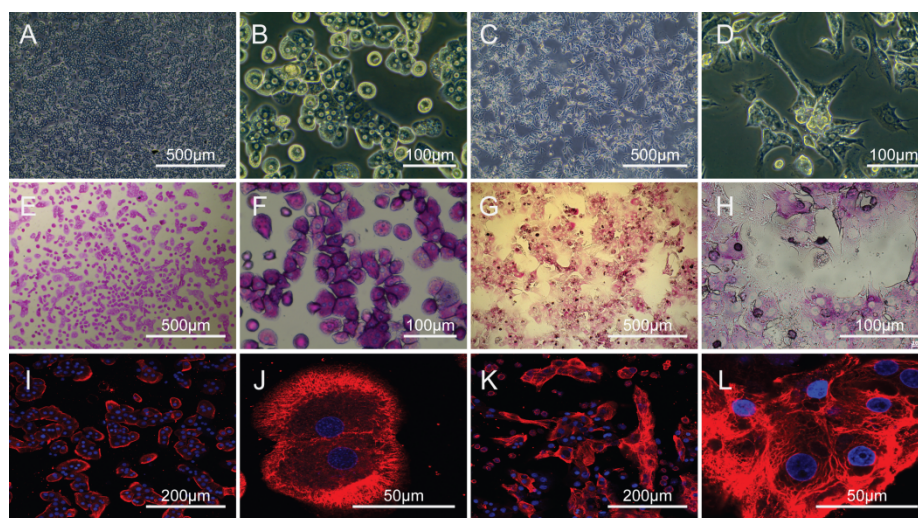


图1 PC 的鉴定

注：A ~ D 为 PC 培养 4 小时 (A、B) 和 7 天 (C、D) 的形态；E ~ H 为糖原染色观察 PC 培养 4 小时 (E、F) 及 7 天 (G、H) 时胞内糖原颗粒 (红色) 变化，蓝色为苏木精核染色；I ~ L 为激光共聚焦显微镜检测 PC 培养 4 小时 (I、J) 和 7 天 K、L 时 CK-18 (红色) 的表达情况，蓝色为 DAPI 核染色

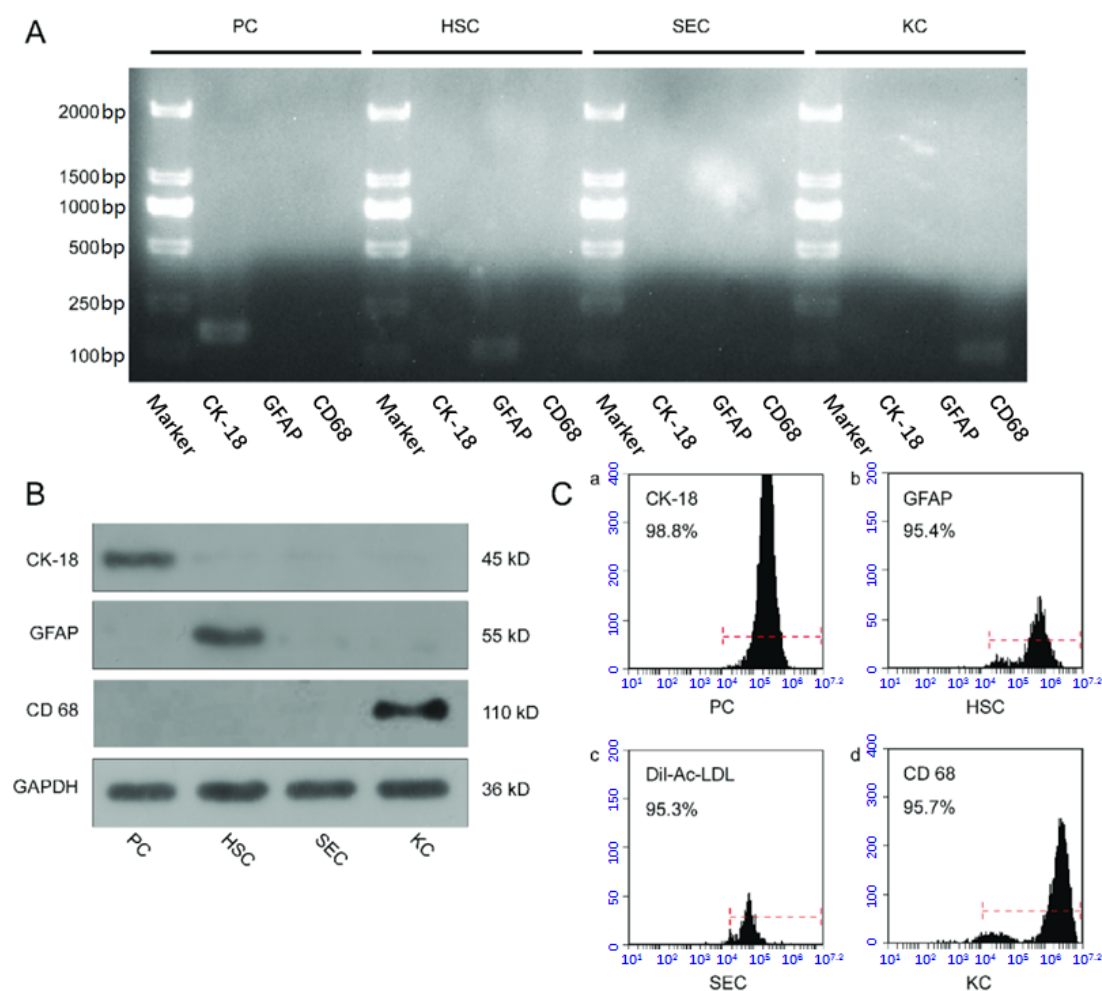


图2 PC、HSC、SEC 和 KC 分子标志

注：A 为 RT-PCR 鉴定 PC、HSC、SEC 和 KC 标志；B 为蛋白免疫印迹鉴定 PC、HSC、SEC 和 KC 标志；C 为流式细胞术鉴定 PC、HSC、SEC 和 KC

SEC在4小时左右完全贴壁,形态较小(图4A、B),培养至3天出现凋亡,至7天凋亡达到最大(图4C、D),随后少量存活的SEC在体外增殖,至14天时形成典型的铺路石形态(图4E、F)。扫描电子显微镜示培养4小时的SEC可见窗孔结构(图4G),而至14天时窗孔结构消失(图3H)。共聚焦显微镜示培养4小时(图4I、J)和培养14天(图4K、L)的SEC均具有特征性摄取Ac-LDL的能力。培养4小时的SEC无内皮细胞标志蛋白CD 31的表达(图4M、N),但在14天(图4O、P)时可见CD31高表达;流式细胞检测示约 $(96.6 \pm 3.6)\%$ 的细胞具有摄取DiI-Ac-LDL的能力(图2C)。

2.4 KC的分离、培养和鉴定 每克组织KC产量为 $(3.1 \pm 0.9) \times 10^6$,活力为 $(98.2 \pm 1.7)\%$ (表3)。KC在4小时左右贴壁,类似不规整圆形(图5A、B),14天时胞体向外伸出触角(图5C、D)。激光共聚焦显示,在4小时及14天时KC均具有吞噬聚苯乙烯微珠的能力(图5E~H)并可表达其特征性标志CD 68(图5I~L)。凝胶电泳和WB显示分离的KC细胞表达CD68,而CK-18和GFAP基本无表达(图2A、B)。流式分析结果显示CD68阳性率为 $(98.1 \pm 1.4)\%$ (图2C)。

3 讨论

当前通过密度梯度离心仍是分离HSC的主要方

法,密度梯度可在 $1.067 \sim 1.053 \text{ g/ml}$ 间选择,通常低密度 1.053 g/ml (8.2%)可提高所得HSC的纯度。因HSC细胞内含有大量脂滴,故密度较低,营养和年龄等会影响HSC脂滴的水平。研究显示老龄或富含维生素A营食动物的HSC含脂滴较多^[9],因此本研究选择 $400 \sim 450 \text{ g}$ 的老龄大鼠。HSC又称Ito细胞或维生素A储存细胞,可自发蓝绿色荧光,是评价HSC特性的重要指标^[7]。本研究结果显示,刚培养出来的HSC内含有大量维生素A,对于鉴别HSC具有重要意义。但随着体外培养时间的增加,HSC内维生素A逐渐减少,表明HSC由储存维生素A的细胞静止态逐渐转化为增殖态^[7]。本研究结果显示平均每克肝组织可分离HSC约 $(1.5 \pm 0.2) \times 10^6$,经换算,接近理想状态的 $4 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ /大鼠^[10];其活力与纯度与Pfeiffer等^[3]和Liu等^[4]研究结果相似。

SEC是唯一的定居性抗原呈递细胞,可与流经肝脏的淋巴细胞产生直接相互作用,并具有摄取抗原和脂质的功能^[11,12]。目前分离SEC仍缺乏可靠的方法^[13]。磁珠分选大鼠SEC缺乏特异性的抗体:首先,CD 105分离SEC受到质疑,因为HSC和成纤维细胞也表达CD 105^[14];其次,内皮标志物CD 31常用于人SEC的磁珠分选^[3,15],并不适合大鼠。DeLeve等研究显示CD 31分选的SEC缺乏窗孔结构^[16]。SEC特异性抗体(SE-1)可分离高纯度的大鼠SEC^[17],但

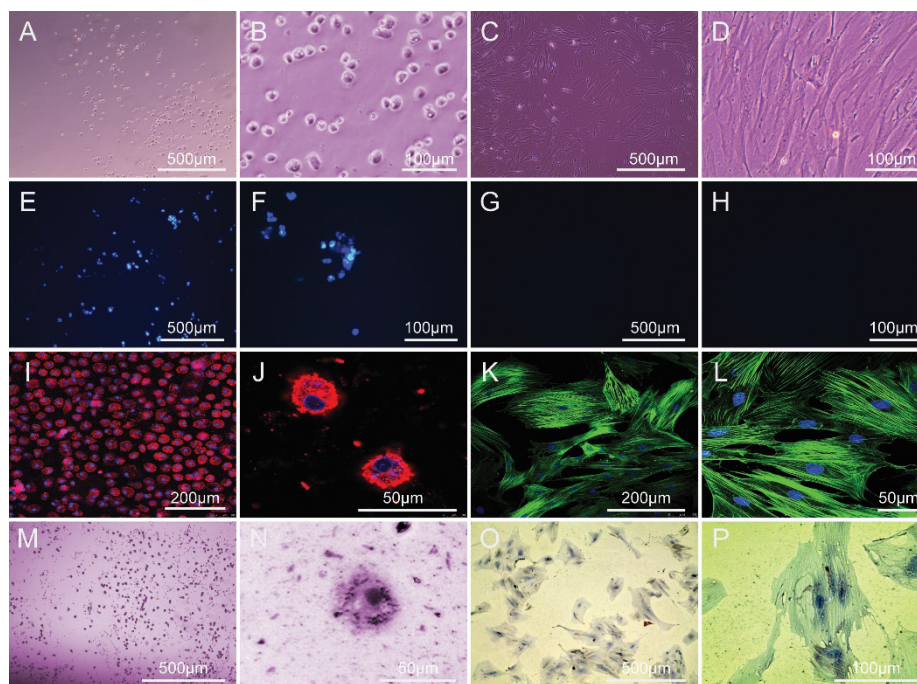


图3 HSC的鉴定

注: A~D为HSC培养24小时(A、B)和14天(C、D)的形态学观察; E~H为HSC培养24小时(E、F)和14天(G、H)胞内维生素A荧光; I、J为共聚焦显微镜观察培养24小时HSC内GFAP表达; K、L为共聚焦显微镜观察培养14天HSC内 α -SMA的表达; M~P为油红染色观察PC培养24小时(M、N)及14天(O、P)时胞内脂粒的变化

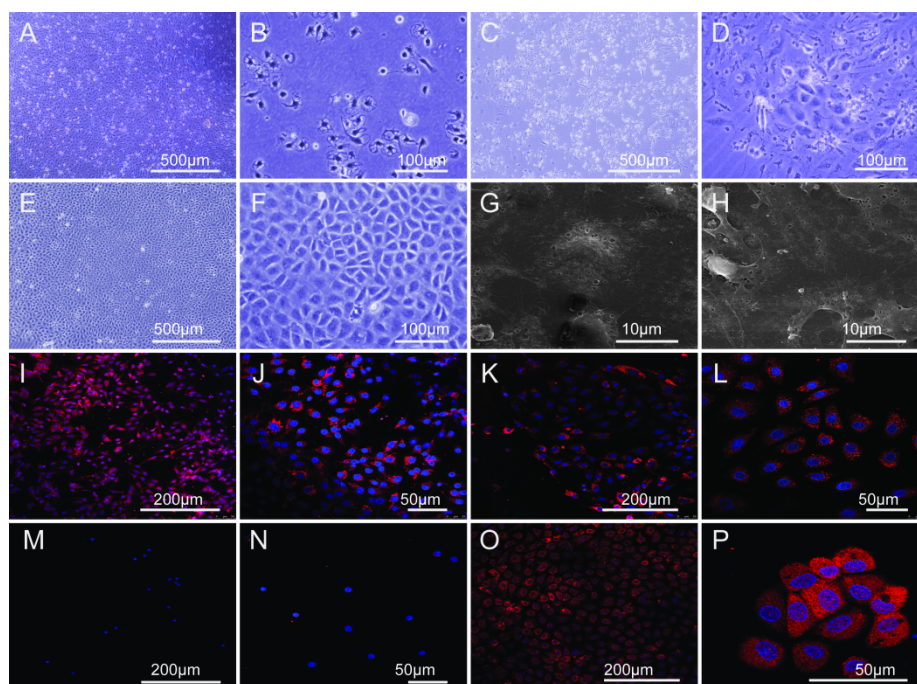


图4 SEC的鉴定

注：A～F为HSC培养4小时（A、B）、7天（C、D）及14天（E、F）的形态学观察；G、H为扫描电镜观察4小时（G）及14天（H）时的细胞窗孔结构；I～L为共聚焦显微镜检测4小时（I、J）和14天（K、L）时细胞对Dil-Ac-LDL（红色）的摄取能力；M～P为共聚焦显微镜检测4小时（M、N）和14天（O、P）时CD31蛋白的表达（红色）

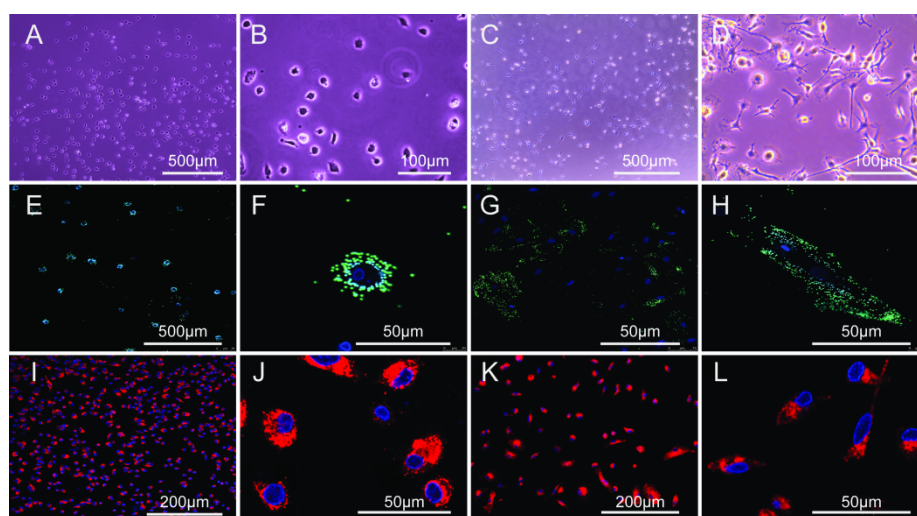


图5 KC的鉴定

注：A～D为KC在4小时（A、B）及14天（C、D）的形态学观察；E～H为共聚焦显微镜检测4小时（E、F）及14天（G、H）KC吞噬微粒的能力；I～L为免疫荧光检测KC培养4小时（I、J）和14天（K、L）时CD68的表达情况

目前并未流通。本研究选用经典的梯度离心加选择性贴壁，分离的SEC平均量、活力、纯度与Pfeiffer等^[3]同时分离肝脏细胞的研究相比，活力相似，而细胞数量和纯度显著高于后者，当然这可能与不同物种间的内在差异有关。同时，本研究显示虽然SEC可以增殖和传代，但培养14天与新分离的SEC已有差异：新分离的含有窗孔结构，不表达CD 31（传统的内皮细胞标记），而培养14天的SEC窗孔

结构消失且表达CD 31，但仍保留清道夫功能即内吞脂质（Ac-LDL）功能。

KCs是肝实质细胞，具有吞噬及分泌炎症因子等多种生物学功能^[8,18]。KC贴壁速度快，常在30分钟内完成，因此需先初步离心出富含KC的50% percoll层，贴壁30分钟，PBS清洗未贴壁细胞后换液。本研究中KC的数量、活力和纯度分别为 $(3.1 \pm 0.9) \times 10^6$ 、 $(98.2 \pm 1.7) \%$ 和 $(98.1 \pm 1.4) \%$ ，细

胞量及纯度可满足下游实验。最近报道的原代混合肝细胞培养分离的方法经随后的分离传代可获得较高数量和纯度的KC^[6,19], 这简化了KC细胞的分离, 但不适合同时分离多种肝脏细胞。KC可来源于肝脏局部KC的增殖和循环的骨髓起源的单核细胞的募集^[20,21]。本研究显示KC可在体外增殖, 培养14天的KC亦表达CD 68, 具有吞噬功能, 间接提示KC可能至少部分来源于肝脏局部KC的增殖。

本方法的最大优点在于可以同时分离肝脏4种细胞, 且培养的细胞在体外可单层长期培养。同时, 进一步评估SEC在体外培养过程中的变化及如何阻止这一改变仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, et al. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME[J]. Arch Toxicol, 2013, 87(8):1315-530.
- [2] Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease[J]. Adv Anat Embryol Cell Biol, 2001, 161:III-XIII, 1-151.
- [3] Pfeiffer E, Kegel V, Zeilinger K, et al. Featured article: isolation, characterization, and cultivation of human hepatocytes and non-parenchymal liver cells[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2015, 240(5):645-656.
- [4] 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.
- [5] 王珊, 柏青, 王方萍, 等. 原代小鼠肝细胞培养方法的比较[J]. 癌变·畸变·突变, 2016, 28(2):125-130.
- [6] Li PZ, Li JZ, Li M, et al. An efficient method to isolate and culture mouse Kupffer cells[J]. Immunol Lett, 2014, 158(1-2):52-56.
- [7] 是长峰, 郭栋, 瞿晓渊, 等. 肝星形细胞具有干细胞样特性[J]. 解剖学杂志, 2012, 35(2):242-244.
- [8] Luo W, Xu Q, Wang Q, et al. Effect of modulation of PPAR-gamma activity on Kupffer cells M1/M2 polarization in the development of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Sci Rep, 2017, 7:44612.
- [9] Chang W, Yang M, Song L, et al. Isolation and culture of hepatic stellate cells from mouse liver[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2014, 46(4):291-298.
- [10] 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.
- [11] 杜艳芹, 孙潺, 黄顺梅, 等. 肝窦内皮细胞调节肝内适应性免疫耐受[J]. 中华肝脏病杂志, 2017, 25(4):309-312.
- [12] Hasebe T, Tanaka H, Sawada K, et al. Bone morphogenetic protein-binding endothelial regulator of liver sinusoidal endothelial cells induces iron overload in a fatty liver mouse model[J]. J Gastroenterol, 2017, 52(3):341-351.
- [13] Elvevold K, Smedsrod B, Martinez I. The liver sinusoidal endothelial cell: a cell type of controversial and confusing identity[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008, 294(2):G391-G400.
- [14] Meurer SK, Tihaa L, Lahme B, et al. Identification of endoglin in rat hepatic stellate cells: new insights into transforming growth factor beta receptor signaling[J]. J Biol Chem, 2005, 280(4):3078-3087.
- [15] Lalor PF, Edwards S, McNab G, et al. Vascular adhesion protein-1 mediates adhesion and transmigration of lymphocytes on human hepatic endothelial cells[J]. J Immunol, 2002, 169(2):983-992.
- [16] Deleve LD, Wang X, Guo Y. Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence[J]. Hepatology, 2008, 48(3):920-930.
- [17] Tokairin T, Nishikawa Y, Doi Y, et al. A highly specific isolation of rat sinusoidal endothelial cells by the immunomagnetic bead method using SE-1 monoclonal antibody[J]. J Hepatol, 2002, 36(6):725-733.
- [18] 王建国, 张一帆, 李玉凤, 等. Colgalt2基因敲除小鼠Kupffer细胞形态及亚型差异[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2016, 8(2):58-62.
- [19] Kitani H, Takenouchi T, Sato M, et al. A novel isolation method for macrophage-like cells from mixed primary cultures of adult rat liver cells[J]. J Immunol Methods, 2010, 360(1-2):47-55.
- [20] Sica A, Invernizzi P, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology[J]. Hepatology, 2014, 59(5):2034-2042.
- [21] Lacotte S, Slits F, Orci L A, et al. Impact of myeloid-derived suppressor cell on Kupffer cells from mouse livers with hepatocellular carcinoma[J]. Oncoimmunology, 2016, 5(11):e1234565.

收稿日期: 2017-08-01

潘艳, 王万鹏, 张启迪, 等. 大鼠肝脏细胞同步分离与培养方法的建立[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2018, 10(1):28-34.