doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.25.002

不同二步酶灌注法分离大鼠肝星状细胞的比较研究*

张佳玲 张 峰 边康麒 王晖晖 诸葛宇征[△] (南京医科大学附属鼓楼临床医学院消化科 江苏南京210008)

摘要 目的:在现有二步酶灌注法分离大鼠肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)的基础上,探索更加高效的分离 HSC 方法。方法: 分别采用链酶蛋白酶 + 胶原酶循环灌注、链酶蛋白酶非循环灌注 + 胶原酶循环灌注以及胶原酶单独循环灌注法分离大鼠 HSC,比较三种方法的细胞获得率、活性和纯度差异。应用 0.4 %台盼蓝染色判断活性,结蛋白(desmin)、波形蛋白(vimentin)细胞 免疫荧光方法鉴定纯度。结果:链酶蛋白酶非循环灌注 + 胶原酶循环灌注法细胞获得率高于另两种方法,细胞活力高于链酶蛋白酶循环灌注 + 胶原酶循环灌注 + 胶原酶循环灌注 + 胶原酶循环灌注 / 胶原酶循环灌注 , 三组得到的细胞纯度均高于 90 %且无显著差异。结论:在三种二步酶灌注方法中,链酶蛋白酶 非循环灌注 + 胶原酶循环灌注法能显著提高 HSC 获得率,且对细胞活力影响小,不降低细胞纯度,是一种高效的分离方法,有利于 HSC 相关肝脏疾病的生物学研究。

关键词:肝星状细胞;链酶蛋白酶;原代培养

中图分类号: R-332; R322.47 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2014) 25-4806-05

Comparative Study on Isolation of Rat Primary Hepatic Stellate Cells by Different Two-step Enzyme Perfusion*

ZHANG Jia-ling, ZHANG Feng, BIAN Kang-qi, WANG Hui-hui, ZHUGE Yu-zheng

(Department of Gastroenterology, the Affiliated Drum Tower Hospital of NJMU, Nanjing, Jiangsu, 210008, China)

ABSTRACT Objective: To explore a more efficient method for HSC isolation based on the method of the two-step enzymatic infusion. **Methods:** Three methods including circulatory pronase+circulatory collagenase perfusion, non-circulatory pronase + circulatory collagenase perfusion and single collagenase perfusion were performed, and cell yield rate, viability and purity were compared. Cells viability was examined by 0.4% trypan blue. Desmin and vimentin immunofluorescence was used to identify cell purity. **Results:** The yield of HSC by non-circulatory pronase + circulatory collagenase perfusion was higher than that of the other two methods, and cell viability was higher than that by circulatory pronase + circulatory collagenase perfusion. Cell purity of all groups was over 90%, and there was no significant difference. **Conclusion:** Among the three two-step enzymatic perfusion methods, non-circulatory pronase + circulatory collagenase perfusion can significantly improve the obtaining rate of HSC, and have little effect on cell viability without reducing cell purity, which is a highly efficient isolation method and benefits the biological research for HSC related liver diseases.

Key words: Hepatic stellate cells; Pronase; Primary culture

Chinese Library Classification (CLC): R-332;R322.47 Document code: A Article ID:1673-6273 (2014) 25-4806-05

前言

肝脏主要由实质细胞和非实质细胞组成,后者包括:枯否 细胞 Kupffer cells (KC),肝窦内皮细胞 Endothelial cells (EC), 肝星状细胞 Hepatic stellate cells (HSC) 和隐窝细胞 pit cells。 HSC 存在于肝脏 Disse 间隙内,约占非实质细胞总数的 10 %^[1], 含有大量的脂肪和维生素 A,生理状态下为静止状态,病理条 件下,失去脂肪活化,在与炎症因子及其他细胞相互作用下参 与肝纤维化^[23],近年来发现 HSC 通过负性免疫调节和非免疫 学机制参与肝脏肿瘤的发生、浸润和转移^[4],原代 HSC 的培养 可以探索肝脏疾病发病机制,为肝病的治疗提供新的依据。因 此,获取原代 HSC 对肝病研究有重要意义。目前国内外大多采 用链酶蛋白酶和胶原酶灌注消化(二步酶灌注)及密度梯度离 心分离 HSC^[57],但对链酶蛋白酶的使用不一:链酶蛋白酶的是 否使用,以及是否循环灌注,且对实验条件要求较高。本研究从 细胞分离率、细胞活性及纯度方面比较不同二步酶灌注法分离 HSC 的差异,探索提高 HSC 分离效能的方法,为体外研究 HSC 奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级成年 SD 雄性大鼠,体重大于 400 g,购于南通大学实 验动物中心,由鼓楼医院动物实验中心饲养,实验前禁食 12 h。 1.2 实验材料

作者简介:张佳玲(1988-),女,硕士研究生,从事消化内科专业,电话:18262637029,E-mail: zhangjialingone@163.com △通讯作者:诸葛宇征,男,教授,硕士生导师,E-mail: yuzheng9111963@yahoo.com.cn (收稿日期:2014-03-20 接受日期:2014-04-21)

^{*}基金项目:江苏省自然科学基金项目(BK2011094)

链酶霉蛋白酶(瑞士 Roche 公司)、IV 型胶原酶(美国 Life Technologies)、DNase I (美国 Sigma 公司)、Percoll(德国 Pharmacia 公司)、D-Hanks 及 Hanks (美国 HyClone 公司);DMEM 高糖培养基(加拿大 Wisentine 公司)、胎牛血清(以色列 BI 公 司)、结蛋白 desmin 单克隆抗体(美国 Bioworld 公司)、波形蛋 白 vimentin 单克隆抗体 (美国 Millipore 公司)、α 平滑肌蛋白 (α-SMA)单克隆抗体(武汉博士德生物公司);荧光二抗 Alexa Fluor Goat anti-Mouse(美国 Life Technologies 公司)。

1.3 主要实验器材

22G 留置针(美国 BD 公司)、恒温培养振荡器(上海智城 分析仪器制造公司)、离心机(德国 Eppendorf 公司)、荧光倒置 显微镜(德国 zesis 公司)。

1.4 方法

1.4.1 **肝星状细胞分离** 实验根据酶灌注液的使用不同分三 组:链酶蛋白酶循环灌注 + 胶原酶循环灌注组(PC+CC组)、链 酶蛋白酶非循环灌注 + 胶原酶循环灌注组(PN+CC组)、胶原酶 循环灌注组(CC组),每组 7 只大鼠。主要操作不同点在离体消 化部分,具体操作如下:

1.4.1.1 原位灌洗 大鼠以氯胺酮 50 mg/kg 及安定 5 mg/kg 腹 腔注射麻醉后予 75 % 酒精浴 20 min,仰卧固定。U 型剖腹暴露 并游离门静脉,于近肝脏处穿丝线备用,游离下腔静脉肝前段 穿丝线备用,于门静脉距离肝脏约1cm 处采用 22G 静脉留置 针穿刺,结扎固定,接装含 50 mL 37℃ 预热 D-Hanks 灌注液的 注射器,以15 ml/min 快速灌注肝脏迅速变为黄白色。结扎下腔 静脉肝后段,并于肝前段剪开下腔静脉,继续推注 D-Hanks 灌 注液约150 mL 后, 肝脏变为土黄色, 游离肝脏, 用 D-Hanks 灌 注液冲洗肝脏表面。将布氏漏斗放置无菌烧杯上,把游离的肝 脏置于漏斗中,注意保护门静脉内的留置针,转至无菌操作台。 1.4.1.2 离体消化 配制 0.1%链酶蛋白酶液、0.05% 胶原酶液 37 ℃ 预热备用。PC+CC 组: 先予 50 mL 链酶蛋白酶液灌注, 收 集消化液重复灌注1次,再予50mL胶原酶液灌注,收集胶原 酶消化液重复灌注 2 次。PN+CC 组: 先予 100ml 链酶蛋白酶液 灌注,再予 50 mL 胶原酶液灌注,收集胶原酶消化液重复灌注 2次。CC组:予50mL胶原酶液灌注后,收集胶原酶消化液重 复灌注 2 次。均以 10 ml/min 速度灌注。观察到肝脏包膜下组织 呈液化状态,停止灌注。

1.4.1.3 细胞分散 D-Hanks 液冲洗肝脏表面,剪去肝包膜及 结缔组织,将肝脏剪成 5 mm× 5 mm 大小,放入含 0.02 %链酶 蛋白酶、0.05 %胶原酶及 0.005 % DNase I 的分散液中,于恒温 培养振荡器上 200 rpm 37℃振荡 30 min 后,加入 1 mL 胎牛血 清终止消化。

1.4.1.4 细胞纯化 将分散消化后的细胞悬液及少量肝脏组 织块通过 200 目钢筛过滤,组织块用无菌注射器针芯研磨,收 集过滤液,500 rpm 离心 4 min,小心收集上清,予 3 mL Hanks 及 1 mL 0.005% DNase I 溶液吹打混匀,1 700 rpm 4 ℃离心 7 min,收集细胞沉淀,Hanks 液重复洗细胞 1 次;所得细胞沉淀 用 8 mlDMEM 悬浮。

1.4.1.5 **密度梯度离心** 取 15 mL 离心管,每管自下而上缓慢 加入 50 %、25 % Percoll 液及细胞悬液各 4 mL,升降速度均为 0,2500 rpm,4℃ 离心 20 min。在 25 % Percoll 液层与上清液之

间可见—层乳白色细胞沉淀,收集该细胞沉淀,加入 3 mlD-MEM 悬浮,反复吹打分散细胞后,4℃ 1500 rpm 离心 5 min, DMEM 再重复洗 1 次。

1.4.2 原代 HSC 培养、鉴定

1.4.2.1 原代 HSC 培养、传代 离心后的细胞用含 20% 胎牛 血清的高糖 DMEM 悬浮,接种不超过 1× 10⁶ 个细胞至 25 cm² 培养瓶中,于 37℃5% CO₂ 孵箱中培养,每隔 15 min 上下左右 十字型轻轻晃动培养瓶,1h 后将培养瓶中细胞悬液转移到新的培养瓶中。24 h 后更换含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM, 48-72 h 换液。细胞传代:待细胞密度生长至 90%左右,弃上清, 加 1 mL 0.25%胰酶,消化 5-10 min 后加入 2 mL DMEM 完全 培养基终止消化,1500 rpm 离心 5 min。

1.4.2.2 HSC 活力及纯度的鉴定 台盼蓝染色判断细胞活力: 取细胞悬液 90 μL 与 0.4 %的台盼蓝溶液按照 1:1 比例混匀, 取 10 μL 于 3 min 内在细胞计数板下计数,活细胞镜下未被染 成蓝色。细胞活力=活细胞数 / 细胞总数× 100 %。免疫荧光染 色鉴定细胞纯度:将分离的 HSC 接种到铺有盖玻片的六孔板 内爬片,分别于 24 h、7 d 取出盖玻片,经 4 % 多聚甲醛固定, PBS 清洗,10 % 山羊血清封闭,desmin 及 vimentin —抗 1:100、 Alexa Flour 荧光二抗 1:200 孵育后,DAPI 染核,最后于荧光显 微镜下计算阳性细胞率。细胞形态学变化:光镜下观察及记录 HSC 形态学变化,体外培养 24 h、6 d 采用细胞免疫荧光法检测 α -SMA 判断 HSC 活化。

1.5 统计学方法

所有数据均以平均值±标准差(mean±SD)表示,多组比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK-q检验,SPSS17.0分析数据,P<0.05认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝星状细胞计数、活力及纯度

三种灌注方法获得 HSC 数量、细胞活力和细胞纯度见表 1。免疫荧光染色鉴别细胞纯度(图 1、2)。细胞获得率:PN+CC 组显著高于 PC+CC 组,PC+CC 组高于 CC 组,组间比较差异 均有统计学意义(F=11.216,P<0.05);细胞活力:CC 组所获得 细胞活力高于 PN+CC 组,而 PN+CC 组活力高于 PC+CC 组, 组间比较差异均有统计学意义(F=18.336,P<0.05)。细胞纯度: 24 h 细胞纯度三组之间差异无统计学意义(F=0.164,P>0.05)。

2.2 分离 HSC 的原代培养

采用倒置显微镜观察原代培养的 HSC 在分离后不同时间 细胞形态改变。结果表明: 刚分离出的 HSC 圆形透亮, 在 328 nm 荧光激发下自发绿色荧光, 因含高浓度维生素 A 荧光极易 淬灭。培养 24 h 的细胞已经贴壁生长, 大部分开始有伪足伸 展,整个细胞折光性变低, 形态不规则。培养第 7 d 时细胞呈星 状、梭状, 有明显的伪足。此时可传代生长, 传代后的细胞生长 迅速, 第二天即表现为星状(图 3)。这些结果也证实所分离培 养细胞确实为 HSC, 且无其他类型细胞生长。

2.3 原代培养 HSC 的 α-SMA 的表达

采用免疫荧光染色检测所培养细胞发现,培养 24 h 时 α-SMA 已开始表达,培养 6 d 时 α-SMA 表达明显增多,表明体 外培养的原代 HSC 能够自活化(图 4)。

| 表 1 | 三种灌注方法所得细胞数。 | 细胞活力和纯度的比较 |
|-------|--------------|------------|
| 1 2 1 | | 油泥油刀带花皮的比较 |

Table 1 Comparison of the numbers, viability and purity of cells in three methods

| Groups | Cell numbers ($\times 10^7$) | Cell viablity(%) | Cell purity in 24 h(%) |
|--------|--------------------------------|------------------|------------------------|
| PC+CC | 2.15± 0.60* | 91.00± 1.00** | 92.29± 1.38 |
| PN+CC | 2.73± 0.58* | 93.14± 1.21** | 92.71± 1.60 |
| CC | 1.44± 0.30* | 95.71± 1.98** | 92.57± 1.27 |

注:* 组间两两相比,F=11.216,P<0.05;** 组间两两相比,F=18.336,P<0.05;PC+CC 为链酶蛋白酶循环灌注 + 胶原酶循环灌注组、PN+CC 为链酶 蛋白酶非循环灌 + 胶原酶循环灌注组、CC 为胶原酶循环灌注组。

Note:*Compared between the two groups, F=11.216, P<0.05; ** compared between the two groups, F=18.336, P<0.05; PC+CC: circulatory pronase + circulatory collagenase perfusion; CC: single collagenase perfusion.



图 1 培养 24 h 细胞免疫荧光 Fig.1 Immunofluorescence of cells cultured for 24 hours A. desmin(200×), B. DAPI(200×), C. desmin+DAPI(200×), D. viment(200×), E. DAPI(200×), F. viment+DAPI(200×)

A. desmin(200×), B. DAPI(200×), C. desmin+DAPI(200×), D. viment(200×), E. DAPI(200×), F. viment+DAPI(200×)

3 讨论

本研究比较了不同二步酶灌注法分离大鼠 HSC 的效能, 包括链酶蛋白酶 + 胶原酶循环灌注、链酶蛋白酶非循环灌注 + 胶原酶循环灌注及胶原酶单独循环灌注三种方法,结果发现应 用链酶蛋白酶能够显著提高细胞获得数,循环灌注所获得细胞 是胶原酶灌注的 1.5 倍,非循环灌注获得细胞是胶原酶灌注的 1.9 倍。翁山耕等¹⁸指出:肝细胞容易与星状细胞粘附,若不使用 链酶蛋白酶灌注,那么通过低速离心法去除肝细胞后只能获得 较少 HSC。本实验中在低速离心分离肝细胞之前,采用链酶蛋 白酶灌注以减少肝细胞与星状细胞的粘附,也更容易将细胞碎 片与非实质细胞悬液分离,结果使 HSC 的获得数量明显增加。

另一方面,低速密度梯度离心介质选择了 Percoll¹⁹,同其他 分离液相比它经济无毒,粘滞度低,对离心力及离心时间的要 求较高,2500 rpm 离心 20 min,升降速度均为 0,确保细胞分散 在各个密度层,同时对细胞的损害降低到最小。依据许小兵等 人¹⁰⁰实验方法,我们采用 25 %及 50 %两个梯度,HSC 密度最 低,会沉积在 25 % Percoll 与细胞悬液之间。

本研究也发现,应用链酶蛋白酶降低了获得细胞的活力, 链酶蛋白酶循环灌注+胶原酶循环灌注法较胶原酶单独灌注 法获得细胞活力平均下降4.7%,而链酶蛋白酶非循环灌注法 细胞活力平均下降2.6%。由此可见,链酶蛋白酶非循环灌注+ 胶原酶循环灌注法对细胞活力的影响相对较小,而同获得细胞 数量的增加比例相比,细胞活力下降的比例也可忽略不计。消 化及分离液选用的酶浓度参照罗云等人^[11]的方法,大大节省了 酶用量。链酶蛋白酶的使用会影响细胞活力,但本实验也证实 链酶蛋白酶在浓度和使用总量相同的情况下,非循环灌注能减 少细胞损伤,其原因可能是循环灌注导致酶作用温度升高,酶 的活性更大,作用更明显,从而影响了细胞活力。

另外,本研究者三种灌注法获得的细胞纯度无显著差异。



图 2 培养 7 d 细胞免疫荧光 Fig.2 Immunofluorescence of cells cultured for 7 days

A. desmin(200×), B. DAPI(200×), C. desmin+DAPI(200×), D. viment(200×), E. DAPI(200×), F. viment+DAPI(200×) A. desmin(200×), B. DAPI(200×), C. desmin+DAPI(200×), D. viment(200×), E. DAPI(200×), F. viment+DAPI(200×)



图 3 分离 HSC 的形态学变化 Fig.3 HSC morphological changes

A.刚分离细胞(200×),B.培养 24 h 细胞(200×),C.培养 7 d 细胞(200×),D.培养两周细胞(200×)

A. Cells cultured for 0 hour(200×), B. Cells cultured for 24 hour(200×), C. Cells cultured for the 7 days(200×), D. Cells cultured for 2 weeks(200×)

枯否细胞密度为 1.060 g/ml, 星状细胞密度为 1.053 g/ml, 极为 相近, 密度梯度离心得到的星状细胞难免会混有部分枯否细 胞,但因为枯否细胞更易贴壁,故在分离细胞后两小时内每半 小时"十"字上下左右摇晃培养瓶,两小时后更换培养瓶,可 去除枯否细胞,从而获得较高纯度的 HSC。

中间纤维和肌动蛋白一起调控活化星状细胞的形态学变化^[12],vimentin 和 desimin 作为中间纤维,在体外培养的活化的HSC 表达均升高^[13,14],故分离培养 HSC24 h 后,同时做两种蛋白的免疫荧光可以对分离的 HSC 进一步鉴别。HSC 的活化与疾病的发生密切相关^[15-17],体外培养α-SMA 的表达增高是细胞活化的标志之一^[18-20],我们观察到,分离 24 h 的 HSC 形态发生变化,通过免疫荧光检测到 24 h α-SMA 少量表达,培养第 6 d

已经明显增多,细胞基本完全活化。根据 HSC 体外培养 4 h 已 经开始贴壁并伴有形态学变化,推测此时细胞可能已开始活 化,因此要研究未活化原代 HSC,应尽量在分离后 4 h 内进行。

综上所述,采用链酶蛋白酶非循环灌注联合胶原酶循环灌 注的二步酶法可以显著提高大鼠 HSC 的获得率,且对细胞活 力影响小,还不降低获得细胞的纯度,是一种高效的分离方法。 分离获得的 HSC 在体外培养 24 h 后开始逐渐活化。原代 HSC 为生物内提取,用来研究相关发病机制更为可靠。活化的 HSC 与多种肝脏疾病有关,近年来发现 HSC 与肝脏肿瘤的关系不 容忽视。通过研究 HSC 的体外活化以及与肝细胞、肝癌细胞共 培养等一系列生物学研究,能为疾病的发生、发展提供更好认 识,从而指导肝病的治疗,链酶蛋白酶非循环灌注联合胶原酶



图 4 HSC 的 α-SMA 免疫荧光染色 Fig.4 α-SMA immunofluorescence of HSC

A. 24 h α -SMA(200×), B. DAPI(200×), C. α -SMA+DAPI(200×), D.6 d α -SMA(200×), E. DAPI(200×), F. α -SMA+DAPI(200×)

A. 24 h α -SMA(200×), B. DAPI(200×), C. α -SMA+DAPI(200×), D. 6 d α -SMA(200×), E. DAPI(200×), F. α -SMA+DAPI(200×)

循环灌注的二步酶法高效、简便,能为相关肝病研究提供细胞 学基础。

参考文献(References)

- Hendriks HF, Verhoofstad WA, Brouwer A, et al. Perisinusoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver[J]. Experimental Cell Research, 1985, 160(1): 138-149
- [2] Meng F, Wang K, Aoyama T, et al. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice[J]. Gastroenterology, 2012, 143(3): 536-539
- [3] Zhao G, Hatting M, Nevzorova YA, et al. Jnk1 in murine hepatic stellate cells is a crucial mediator of liver fibrogenesis [J]. Gut, 2013 [Epub ahead of Print]
- [4] Chen Y, Huang Y, Reiberger T, et al. Differential effects of sorafenib on liver versus tumor fibrosis mediated by SDF1α/CXCR4 axis and Gr-1+ myeloid cell infiltration in mice [J]. Hepatology, 2014,59(4): 1435-1447
- [5] Weiskirchen R, Gressner AM. Isolation and culture of hepatic stellate cells[J]. Methods Mol Med, 2005, 117: 99-113
- [6] Shu JC, Zhao JR, Yang DH, et al. An improved method for the isolation of rat hepatic stellate cells [J]. Chinese Journal of Hepatology, 2004, 12(6): 353-355
- [7] 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
- [8] 翁山耕, 冷希圣, 魏玉华, 等. 改良法大鼠肝星状细胞的分离培养及鉴定[J]. 北京大学学报(医学版), 2001, 33(1): 83-86
 Weng Shan-geng, Leng Xi-sheng, Wei Yu-hua, et al. An improved

method of isolating and identirying rat hepatic stellate cells [J]. Journal of Peking University(Health Sciences), 2001, 22(1): 83-86

- [9] Xu C, Chen X, Chang C, et al. Analysis of gene expression profiles of liver stellate cells during liver regeneration in rats[J]. Mol Cells, 2011, 31(1): 17-23
- [10] 许小兵,李敏利,郭婧芸,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
 Xu Xiao-bing, Li Min-li, Guo Jing-yun, et al. Density gradient centrifugation of rat hepatic stellate cells by Percoll [J]. Journal of Medical Postgraduates, 2009, 22(6): 668-669, 672
- [11] 罗云,戴立里,沈鼎明,等. 原位循环灌流法分离大鼠肝星状细胞
 [J]. 重庆医科大学学报, 2002, 27(1): 48-49, 52
 Luo Yun, Dai Li-li, Shen Ding-ming, et al. The isolation and culture of rat hepatic stellate cells with collagenase in situ liver recirculating perfusion[J]. Journal of Chong qing Medical University, 2002, 27(1): 48-49, 52
- [12] Mezaki Y, Morii M, Hebiguchi T, et al. Differential Increases in the Expression of Intermediate Filament Proteins and Concomitant Morphological Changes of Transdifferentiating Rat Hepatic Stellate Cells Observed In Vitro [J]. Acta Histochem Cytochem, 2013, 46(5): 137-143
- [13] Wang Q, Wang LX, Zeng JP, et al. Histone demethylase retinoblastoma binding protein 2 regulates the expression of α-smooth muscle actin andvimentin in cirrhotic livers [J]. Braz J Med Biol Res, 2013, 46(9): 739-745
- [14] IKim SJ, Ise H, Goto M, et al. Interactions of vimentin- or desmin-expressing liver cells with N-acetylglucosamine-bearing polymers[J]. Biomaterials, 2012, 33(7): 2154-2164 (下转第 4831页)

and expanded CD4+CD25+ immune regulatory cells inhibits graftversus-host disease lethality[J]. Blood, 2002, 99: 3493-3499

- [6] Joffre O, Santolaria T, Calise D, et al. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes
 [J]. Nature Medicine, 2008, 14(1): 88-92
- [7] Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, et al. Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation[J]. Eur. J. Immunol, 2009, 39: 1088-1097
- [8] Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+T cell-mediated suppression by dendritic cells [J]. Science, 2003, 299: 1033-1036
- [9] Kong N, Lan Q, Chen MG, et al. Antigen-specific TGF-β -induced regulatory T cells but not natural Tregs ameliorate autoimmune arthritis by shifting the balance of Th17 toward Treg cells[J]. Arthritis & Rheumatism, 2012, 64(8): 2548-2558
- [10] Mays LE, Chen HY. Maintaining immunological tolerance with Foxp3[J]. Cell Research, 2007, 17: 904-918
- [11] Guo XM, Jie Y, Ren D, et al. In vitro-expanded CD4+CD25high-Foxp3+ regulatory T cells controls corneal allograft rejection [J]. Human Immunology, 2012, 73: 1061-1067
- [12] Kong N, Lan Q, Chen MG, et al. Induced T regulatory cells suppress osteoclastogenesis and bone erosion in collagen-induced arthritis better than natural T regulatory cells [J]. Ann Rheum Dis., 2012, 71

(9): 1567-1572

- [13] Nguyen TL, Sullivan NL, Ebel M, et al. Antigen-specific TGF-beta-induced regulatory T cells secrete chemokines, regulate T cell trafficking, and suppress ongoing autoimmunity [J]. J. Immunol. 2011, 187: 1745-1753
- [14] Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor[J]. Immunity, 2009, 30: 899-911
- [15] Pot C, Apetoh L, Kuchroo VK. Type1 regulatory T cells (Tr1) in autoimmunity[J]. Semin. Immunol, 2011, 23: 202-208
- [16] Qian X, Wang K, Wang X, et al. Generation of human regulatory T cells de novo with suppressive function prevent xenogeneic graft versus host disease[J]. Int. Immunopharmacol, 2011, 11: 630-637
- [17] Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+ Foxp3T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype[J]. Blood, 2007, 110: 2983-2990
- [18] Chen Q, Kim YC, Laurence A, et al. IL-2 controls the stability of Foxp3 expression in TGF-beta-induced Foxp3+T cells in vivo [J]. J. Immunol, 2011, 186: 6329-6337
- [19] Chen W, Konkel JE. TGF-beta and 'adaptive' Foxp3+ regulatory T cells[J]. J. Mol. Cell Biol, 2011, 2: 30-36

(上接第 4810 页)

- [15] Chen A, Tang Y, Davis V, et al. Liver fatty acid binding protein (L-Fabp) modulates murine stellate cell activation and diet-induced nonalcoholic fatty liver disease [J]. Hepatology, 2013, 57 (6): 2202-2212
- [16] Troeger JS, Mederacke I, Gwak GY, et al. Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis resolution in mice [J]. Gastroenterology, 2012, 143(4): 1073-1083
- [17] Zhang DW, Zhao YX, Wei D, et al. HAb18G/CD147 promotes activation of hepatic stellate cells and is a target for antibody therapy of liver fibrosis[J]. J Hepatol, 2012, 57(6): 1283-1291
- [18] Guvendiren M, Perepelyuk M, Wells RG, et al. Hydrogels with

differential and patterned mechanics to study stiffness-mediated myofibroblastic differentiation of hepatic stellate cells [J]. J Mech Behav Biomed Mater, 2013[Epub aheaed of print]

- [19] Woodhoo A, Iruarrizaga-Lejarreta M, Beraza N, et al. Human antigen R contributes to hepatic stellate cell activation and liver fibrosis[J]. Hepatology, 2012, 56(5): 1870-1882
- [20] Lakner AM, Moore CC, Gulledge AA, et al. Daily genetic profiling indicates JAK/STAT signaling promotes early hepatic stellate cell transdifferentiation [J]. World J Gastroentero, 2010, 16 (40): 5047-5056