

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.06.007

小鼠肝血窦内皮细胞分离与鉴定新方法*

蒋子剑 岳振生 杨毅聪 阮 柏 段娟丽 岳树强[△]

(空军军医大学第一附属医院肝胆外科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:改进小鼠原代肝血窦内皮细胞的分离方法。**方法:**经过小鼠肝脏的原位灌洗、消化制备单细胞悬液、差速离心、密度梯度离心以及免疫磁珠分选等步骤,分离获得小鼠原代肝血窦内皮细胞,再通过流式细胞仪鉴定、细胞内吞功能染色以及对细胞超微结构的电子显微镜观察,对分离出的肝血窦内皮细胞进行鉴定。**结果:**肝血窦内皮细胞的平均得率为 5.6×10^6 个/只小鼠,细胞活性比率约为 96% 左右;细胞流式鉴定结果显示新鲜分离出的肝血窦内皮细胞 VEGFR3 阳性率达到 95.8%, VEGFR2+CD31+ 双阳性细胞阳性率达到 93.7%。分选出的 LSECs 能够有效吞噬 FITC-FSA 和 Dil-Ac-LDL。培养 1 天后肝血窦内皮细胞的微观结构,可见其特征性的窗孔和筛板。**结论:**本文总结的分离方法可以稳定、高效地获得小鼠原代肝血窦内皮细胞。

关键词:肝血窦内皮细胞;分离;鉴定

中图分类号:R-33; R813; R322.47 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)06-1034-06

Improvement Method of Isolation of Mouse Liver Sinusoidal Endothelial Cell*

JIANG Zi-jian, YUE Zhen-sheng, YANG Yi-cong, RUAN Bai, DUAN Juan-li, YUE Shu-qiang[△]

(Department of Hepato-biliary Surgery, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To improve the method of isolation of LSECs. **Methods:** The mouse primary liver sinusoidal endothelial cells were isolated by a series of methods, such as lavage of mouse liver in situ, digestion and making single cell suspension, differential centrifugation, density gradient centrifugation and magnetic activated cell sorting. Then the isolated liver sinusoidal endothelial cells were identified by flow cytometry, cell endocytosis staining and cell ultrastructure observation with electron microscopy. **Results:** The average yield and Viability of LSECs was respectively 5.6×10^6 per mouse and 96%; the flow cytometry results showed that the VEGFR3 positive rate of isolated liver sinusoidal endothelial cells was 95.8%, the VEGFR2+CD31+ double positive rate of LSECs was 93.7%. The isolated LSECs could phagocytose FITC-FSA and Dil-Ac-LDL efficiently. The characteristic fenestrate and sieve plate of LSECs could be observed after 24 hours'cultivation in electron microscopy. **Conclusions:** The isolation method summarized in this article could steadily and efficiently obtain mouse primary LSECs.

Key word: Liver sinusoidal endothelial cell; Isolation; Identification

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R813; R322.47 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)06-1034-06

前言

肝脏是人体主要的消化、代谢器官,同时也是重要的免疫器官。其功能的多样性很大程度上来源于肝脏构成细胞的多样性。肝血窦内皮细胞(Liver Sinusoidal Endothelial Cells, LSECs)是肝脏组织特异性的血管内皮细胞,是肝脏非实质细胞群中数量最大的一群细胞,约占整个肝脏体积的 3%,占有肝脏细胞数目的 15%-20%,占肝脏非实质细胞数目的 50%以上^[1]。LSECs 的组织特异性主要表现在:① 细胞表面布满窗孔(Fenestration),窗孔间融合可形成筛板样结构(Sieve Plates)^[2];② 缺乏连续性基底膜^[3];③ 具有很强的吞噬能力(Endocytosis)^[4];④ 在标志物和基因表达谱层面有别于其它类型的血管内皮细胞^[5]。肝血窦内皮细胞不仅是构成肝血窦的基本结构,也广泛参与了

肝脏的各项生理功能,如肝细胞再生^[6,7]、肝脏代谢^[8,9]和免疫调节^[10-12],以及病理性疾病发生发展,如肝脏纤维化^[3,13-15]、肝硬化^[16]和肝肿瘤^[17]。因此,能够科学、准确、高效地分离并获得小鼠原代 LSECs,对于研究肝血窦内皮细胞在肝脏不同生理或病理情况下发挥的作用和具体机制具有重要意义。现在比较公认的 LSECs 分离方法主要包括:① 依据表面标志物的流式细胞分选法(FACS);② 免疫磁珠分选法(MACS)。流式细胞分选技术主要依靠流式细胞仪,但存在细胞表面标志分子不统一、细胞活性差、设备昂贵等缺点。免疫磁珠分选法不依赖特殊仪器,分选所得细胞活性高,且方便、快捷,是常用的肝血窦内皮分选方法。笔者参阅国内外文献,结合多次试验摸索,以免疫磁珠分选法为基础,通过多步骤优化改进,总结出一套稳定且高效的小鼠原代 LSECs 分离鉴定方法,归纳报道如下。

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81370556)

作者简介:蒋子剑(1992-),硕士,研究方向:肝血窦内皮与肝损伤,电话:18681940770, E-mail: 604764577@qq.com

[△] 通讯作者:岳树强(1965-),博士,主任医师,研究方向:肝损伤,电话:13991182898, E-mail: blanker36@163.com

(收稿日期:2017-11-08 接受日期:2017-11-23)

1 材料与方 法

1.1 实验动物

6-8 周龄野生雄性 C57BL/6 小鼠,体重 20 g 左右,购自第四军医大学实验动物中心,饲养于 SPF 级环境中。

1.2 实验试剂

细胞分离相关:小鼠 CD146(LSEC)免疫磁珠(Miltenyi 公司:130-092-007)、MS Columns (Miltenyi 公司:130-042-201)、gentleMACSTM C tubes(Miltenyi 公司:130-096-334)、OptiPrep 分离液 (AXIS-SHIELD PoC AS 公司:1114542)、ECM 培养基套装 (Sciencell 公司:1001)、HBSS 缓冲液 (Hyclone 公司:SH30030.02)、DMEM 培养基 (Hyclone 公司:SH30022.01)、IV 型胶原酶 (Sigma 公司:C5138)、DNase-I (Roche 公司:10-104-159-001)、100 μ m 细胞筛网(BD 公司:352360)。

细胞鉴定相关:台盼蓝(Sigma 公司:HZB0368)、DiI 标记乙酰化低密度脂蛋白 (Solarbio 公司:H7970)、VEGFR3 抗体 (R&D system 公司:AF734)、PE-VEGFR2 抗体 (Biosciences 公司:561052)、FITC-CD31 抗体 (Biosciences 公司:558738)、Alexa Fluor® 488 标记驴抗山羊荧光二抗 (Invitrogen 公司:A-11055)。

FITC-FSA 制备:将 BSA 和福尔马林加入 0.2M 碳酸盐缓冲液(pH=10)10 mL 中,使二者的终浓度分别为 10 mg/mL 和 10 %(w/v),连续作用 3 天后,用 PBS 进行透析,每 6 h 更换一次,共进行 3 次,取出袋内的液体,称容量并计算浓度。将得到的 FSA 与 FITC 加入 0.5M 碳酸氢钠缓冲液 (pH=9.0)10 mL 中,使二者终浓度分别为 5 mg/mL 和 2.5 mg/mL,在 4 °C 条件下避光作用 10 h,用 PBS 进行透析,每 6 h 更换一次,共 3 次,取出袋内液体,称容量并计算浓度,分装并保存于 -20 °C 冰箱备用。

1.3 仪器设备

FACScalibur 流式细胞仪(BD 公司)、gentleMACSTM 全自动组织处理器(Miltenyi 公司)、低温高速离心机(Eppendorf 公司)、细胞培养箱 (Thermo 公司)、Olympus X71 倒置相差 / 荧光显微镜(Olympus 公司)、S-3400N 扫描电镜(Hitachi 公司)、FC500 流式细胞仪(Beckman 公司)。

1.4 主要缓冲液

PBS 缓冲液:(谷歌生物公司:G0002);小鼠肝脏灌注液 A:9 g NaCl + 0.416 g KCl + 2.1 g NaHCO₃ + 1.08 g Glucose + 4.8 g Hepes + 0.58 g EDTA,加去离子水至 1000 mL,0.22 μ m 小滤器过滤后 4 °C 保存。小鼠肝脏灌注液 B:9 g NaCl + 0.416 g KCl + 2.1 g NaHCO₃ + 1.08 g Glucose + 4.8 g Hepes + 0.222 g CaCl₂ + 0.4065 g MgCl₂·6H₂O 加去离子水至 1000 mL,0.22 μ m 小滤器过滤后 4 °C 保存,使用前现加 IV 型胶原酶至终浓度 0.5 mg/mL。磁珠 Buffer:0.5 %BSA + 0.58 g/L EDTA 溶于 1000 mL PBS 中,5M NaOH 调 pH 至 7.2-7.4,0.22 μ m 小滤器过滤后 4 °C 保存。OptiPrep 密度梯度分离液:OptiPrep 工作液(40 %):2 mL OptiPrep™ + 1 mL DMEM;11.5 % iodixanol (w/v):1 mL OptiPrep 工作液 + 3 mL DMEM;17.6 %iodixanol (w/v):1.76 mL OptiPrep 工作液 + 2.24 mL DMEM。

1.5 方法步骤

1.5.1 小鼠肝脏的原位灌注分离和各型单个细胞悬液的制备

LSECs 分离前将小鼠禁食 12 h,每次实验使用 3-4 只小鼠。37 °C 数箱预热灌注液 A 和灌注液 B。用 75 %乙醇消毒小鼠腹部,腹腔注射 1 %戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉,迅速沿腹正中切口打开腹腔,暴露肝脏、门静脉、下腔静脉,用无菌 30G 针头插入下腔静脉固定,同时剪开门静脉以便灌注液流出。用 37 °C 灌注液 A 灌注 10 min 使肝脏完全脱色,速度 7 mL/min,之后用 37 °C 灌注液 B 灌注 10 min,速度不变。两步灌注结束后,小心解剖下肝脏,剔除胆囊,转移至含有灌注液 B 和 100 μ g/mL DNase I 的美天旋 C 管中,将 C 管置于组织匀浆器上匀速匀浆 30 s,取下 C 管置于 37 °C 恒温摇床 20 min。充分消化后向 C 管中加入磁珠 Buffer 6-8 mL 终止消化,将组织匀浆液从 100 μ m 孔径的细胞筛网中过滤,以去除未消化的组织碎片,收集单细胞悬液。

1.5.2 低速离心法去除肝细胞 将单细胞悬液置入提前预冷的高速离心机,50 $\times$ g 离心 3 min 以沉淀肝细胞,收集上清,重复离心 2-3 次,沉淀可以通过密度梯度离心法进一步纯化以获得新鲜原代肝细胞,上清液中主要包含非实质细胞和细胞碎片。

1.5.3 LSECs 的获得与培养 OptiPrep 不连续密度梯度离心:将富含肝非实质细胞的上清液以 350 $\times$ g 离心 7 min,弃上清,留细胞沉淀。细胞沉淀用 17.6 %密度梯度分离液重悬,充分混匀后小心加到 15 mL 离心管中,再缓慢加入 11.5 %密度梯度分离液,最后在液面最上层加入 2 mL DMEM 培养基,关闭刹车 1400 $\times$ g 离心 20 min。收集 17.6 %与 11.5 %密度梯度分离液中间层的细胞团,其中富含 LSECs 和 Kupffer 细胞。将收集到的细胞悬液与等体积的 DMEM 培养基混合,吹打混匀,350 $\times$ g 离心 7 min。弃上清,将细胞沉淀用磁珠 buffer 洗 1 次,350 $\times$ g 离心收沉淀。

免疫磁珠分选 (Magnetic Activated Cell Sorting, MACS):用磁珠 Buffer 90 μ L 重悬细胞沉淀,加入 10 μ L CD146-LSEC 磁珠抗体,吹打混匀,于 4 °C 避光孵育 30 min。3 mL 磁珠 Buffer 洗细胞,350 $\times$ g 离心 5 min,弃上清(重复 2 次)。将 MS 柱安装在磁力架上,以 0.5 mL 磁珠 Buffer 冲洗 MS 柱 1 遍。加入磁珠 Buffer 1 mL 重悬细胞,将单细胞悬液移至 MS 柱中,待细胞悬液滴完后,再将 0.5 mL 磁珠 Buffer 加入 MS 柱中。向 MS 柱中加满磁珠 Buffer,取下 MS 柱,转移到 15 mL 离心管中,用活塞迅速推下。将得到的细胞悬液 350 $\times$ g 离心 5 min,弃上清,加 PBS 洗细胞 2 次,即得到小鼠 LSECs。

细胞活率及产量分析:将刚分离的细胞悬液混匀后取 100 μ L 与体积分数为 0.4 %台盼蓝溶液以 1:1 混合,随即滴片于计数板,在倒置显微镜下观察,计算出活细胞数(未着色细胞数)所占细胞总数的百分率,即活率。细胞得率按常规计数法显微镜下进行计数。

LSECs 培养:将新鲜分离得到的 LSECs 用含有血清 ECGS 和抗生素的 ECM 培养基重悬,接种于细胞培养板中(必要时可提前一天以鼠尾胶原处理细胞培养板),在 37 °C、5 %CO₂ 的恒温培养箱中进行培养,4-5 h 后细胞即可贴壁,对贴壁后的细胞进行换液并去除未贴壁的悬浮死细胞,之后每 2 天换液一次。

1.5.4 细胞流式鉴定 新鲜分离的 LSECs 重悬于流式液(含

0.5 %胎牛血清 + 0.1 %叠氮钠的 PBS 缓冲液)中,每支流式管加入 1×10^6 个以上的细胞,① 将 VEGFR3 以 1:100 的稀释比例稀释于流式液中,并对 LSECs 进行冰上染色 30 min,1200 rpm 离心 5 min 洗 3 次后,将稀释好的 Alexa Fluor® 488 标记的驴抗山羊荧光二抗 (1:200) 对细胞进行冰上染色 30 min,1200 rpm 离心 5 min 洗 3 次后上机检测;② 将 FITC-CD31 抗体、PE-VEGFR2 抗体以 1:100 的稀释比例稀释于流式液中,并对 LSECs 进行冰上染色 30 min,1200 rpm 离心 5 min 洗 3 次后上机检测。

1.5.5 细胞内吞功能鉴定 新鲜分离的 LSECs 体外培养贴壁以后,将含有 FITC-FSA ($100 \mu\text{g/mL}$) 和 DiI-Ac-LDL ($20 \mu\text{g/mL}$) 的 ECM 培养基于 37°C 孵箱中避光孵育细胞 30 min, PBS 洗涤细胞 2 次,4 % PFA 固定细胞 10 min, PBS 洗 1 次, PBS 洗 1 次后倒置显微镜下观察 LSECs 对 FITC-FSA 和 DiI-Ac-LDL 的吞噬情况。

1.5.6 细胞窗孔电镜观察 将新鲜分离的 LSECs 用含有血清、ECGS 和抗生素的 ECM 培养基重悬,接种于细胞玻片上,

待细胞贴壁以后,弃去培养基, PBS 洗 1-2 次,加入 2 %戊二醛固定 12 h, 后用 2 %锇酸处理 1 h, PBS 冲洗, 梯度乙醇脱水, HMDS (六甲基二硅胺) 干燥, 喷镀金属。细胞样品置于 S-3400N 扫描电镜中观察窗孔形态。

2 结果

2.1 细胞得率与活性检测

重复 6 次分离实验, LSECs 的活率平均为 $(96 \pm 2)\%$ 左右, 产量平均为 $(5.6 \pm 1.6) \times 10^6$ 只。表明提取的 LSECs 在数量和活性上可以满足实验需要。

2.2 肝血窦内皮细胞培养与细胞形态

将分选出的 LSECs 在 ECM 培养基中孵育约 4-5 h 后, 大部分细胞即可贴壁, 1 天后在倒置显微镜下观察, 可见细胞呈卵圆形且形态均一。培养 5 天后细胞呈现长梭形, 伸展良好(图 1)。原代肝窦内皮细胞体外培养过程中无增殖现象, 培养时间多不超过 10 天。



图 1 培养 1d 与 5d 后的 LSECs 形态

Fig.1 Morphology of sinusoidal endothelial cell after cultured for 1d and 5d

2.3 流式细胞仪鉴定

如图 2 所示, 细胞流式鉴定结果显示新鲜分离出的 LSECs VEGFR3 阳性率达到 95.8 %, VEGFR2+CD31+ 双阳性细胞阳性率达到 93.7 %。表明分离的 LSECs 在纯度上可以满足实验的需要。

2.4 细胞内吞功能鉴定结果

FITC-FSA 和 DiI-Ac-LDL 是检验 LSECs 吞噬能力的手段之一, 分别以含有 FITC-FSA 和 DiI-Ac-LDL 的培养基孵育 LSECs 约 30 min 后, 倒置荧光显微镜下观察发现所分选出的 LSECs 能够有效吞噬 FITC-FSA 和 DiI-Ac-LDL(图 3)。

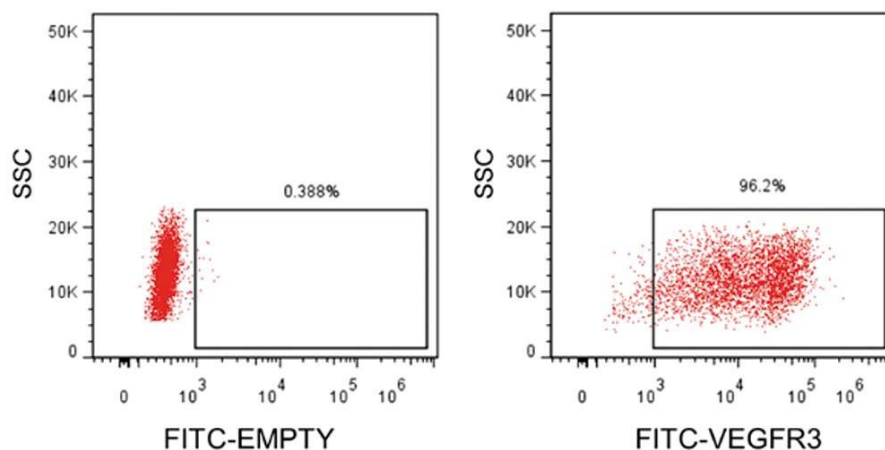
2.5 细胞窗孔电镜结果

扫描电镜下观察培养 1 天后 LSECs 的微观结构, 可见其特征性的窗孔和筛板(图 4)。

3 讨论

LSECs 是肝脏非实质细胞群中数量最大的一群细胞, 是构成肝血窦的最主要细胞。静息生理状态下, 成体肝脏中的 LSECs 与大血管的内皮细胞一样, 基本处于不增殖的状态, 并且拥有很长的细胞周期。LSECs 的生理功能包括:① 调节血流。LSECs 通过感知血流剪切力来调控自身某些舒张血管物质的表达, 从而达到调节血流和血管压力的目的, KLF2 (Kruppel-like factor 2) 是一种血管内皮特异性的转录因子, 研究发现

MACS SORTING CELLS



MACS SORTING CELLS

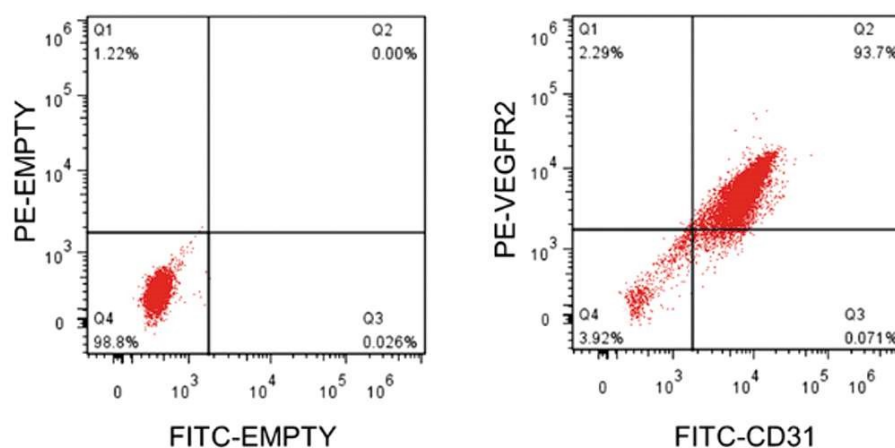


图2 细胞流式鉴定结果

Fig.2 Results of flow cytometry

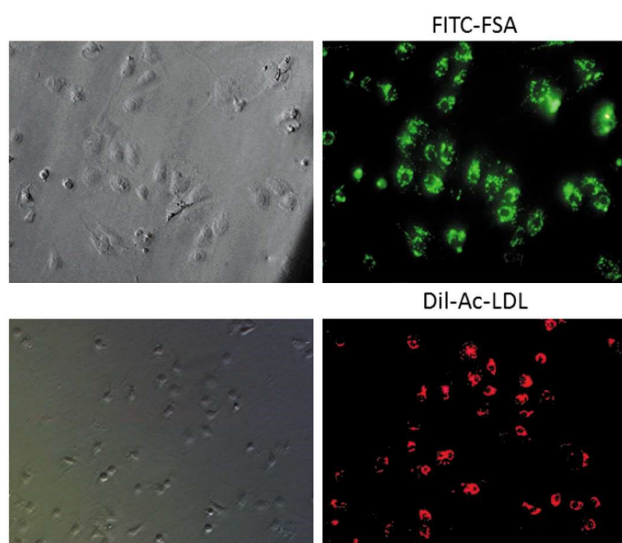


图3 细胞内吞功能染色结果

Fig.3 Results of cell endocytosis staining

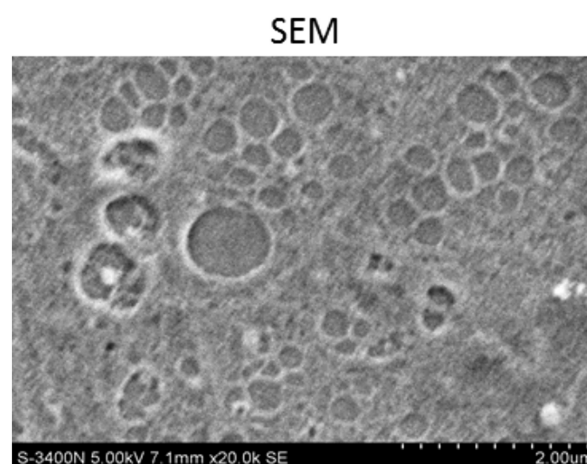


图4 细胞窗孔电镜照片

Fig.4 SEM picture of cell fenestrate

LSECs 通过感受剪切力的大小精确调控 KLF2 的表达,而 KLF2 能够促进一氧化氮(Nitric Oxide,NO)等血管舒张物质的

产生^[18];② 调节物质交换。LSECs 的窗孔结构、基底膜缺失等特性,决定了 LSECs 是人体通透性最高的血管屏障之一。LSECs

表面窗孔的直径为 50-150 nm 不等,其孔径大小及窗孔数目在肝脏内不同区域当中也是不同的^[19]。在正常生理条件下,LSECs 屏障作用的存在使得血液中的各类细胞能够正常在肝血窦中流动,同时像直径<200 nm 的血清蛋白、代谢物质、脂蛋白、药物分子、乳糜颗粒、病毒和外泌体(Exosomes)等都能够顺利通过 LSECs 的血管屏障到达 Disse 间隙,从而被肝细胞或 HSCs 所吸收或利用^[20];② 吞噬。LSECs 被认为是人体内吞噬功能最强的细胞类型之一,同时,LSECs 具有很强的溶酶体酶活性,使得其具有足够的清除血液中代谢废物的能力。与单核吞噬细胞的吞噬作用所不同的是,经典的单核吞噬细胞以吞噬大分子物质如细胞碎片、细菌、异物等为主,而像 LSECs 这样具有清道夫功能的内皮细胞,主要以胞饮作用(Endocytosis)吞噬一些可溶性分子或小分子物质,而且其吞噬过程主要依赖于细胞表面的一些胞饮受体^[21]。③ 通过旁分泌途径调控肝细胞增殖与更新。近几年的研究发现,各个组织器官里的血管内皮不仅仅是发挥物理屏障的作用,而由血管内皮细胞所构成的血管微环境在组织损伤和修复中扮演者及其重要的角色。在肝脏中,Ding^[22]等率先报道了 LSECs 来源的旁分泌因子对肝再生过程中的重要意义,由 LSECs 产生的 HGF/Wnt2a 等肝细胞生长因子对急性损伤后肝细胞的增殖必不可少。此外,在肝切除不同时间点,LSECs 也能够通过精确调控 Angpt2、TGF- β 等因子的表达完成分泌诱导期肝细胞增殖和血管生成期内皮细胞增殖之间的转换^[6]。而在慢性肝损伤过程中,LSECs 在损伤早期和晚期呈现出不同的分子表达模型,分别营造出促再生(Pro-regenerative)和促纤维化(Pro-fibrotic)的血管微环境,精确介导肝脏的修复过程,这也为未来肝损伤修复的干预策略提供了理论依据^[23]。

随着人们对 LSECs 的不断认识与关注,得到高纯度和高活性的 LSECs 也逐渐成为研究者们努力的目标。在早期,最常使用的 LSECs 分离方法为淘析离心法(Centrifugal Elutriation)和差异贴壁法^[24]。虽然前者能够从动物肝脏中高效地得到数量可观的 LSECs,但是其耗时长且依赖于昂贵的超速离心设备,难以普及应用;而后者虽然操作简便、耗时短,但很难得到高纯度的 LSECs,往往会被巨噬细胞等污染。近十年来,随着更多相对特异性的 LSECs 标志物的发现,以及流式细胞荧光分选技术(Fluorescence Activated Cell Sorting,FACS)和免疫磁珠分选技术(Magnetic Activated Cell Sorting,MACS)的发展,人们开始使用分子标志物对 LSECs 进行分选^[25-27]。虽然细胞得率低于淘析离心法和差异贴壁法,但却能够保证较高的细胞纯度,结合 LSECs 的鉴定方法,广泛地被应用于 LSECs 领域的研究。

然而,截止目前分离和鉴定 LSECs 仍存在相当大的困难和争议,国际上不同研究组采用不同方法所得到的 LSECs 也存在一定程度的差异,而且目前针对 LSECs 特异性的表面标志也尚未达成共识,这些都为 LSECs 领域研究的统一性和规范性带来了困难。现在比较公认的 LSECs 分离方法主要包括:① 依据表面标志物的流式细胞分选法(FACS);② 免疫磁珠分选法(MACS)。流式细胞分选技术主要依靠流式细胞仪,但存在细胞表面标志分子不统一、细胞活性差、设备昂贵等缺点。免疫磁珠分选法不依赖特殊仪器,分选所得细胞活性高,且方便、

快捷,是常用的肝血窦内皮分选方法。本文中使用常规差速离心法和连续密度梯度离心法分离到富含 LSECs 和 Kupffer 细胞的悬液,然后使用了免疫磁珠分选法,通过孵育特异性磁珠抗体 CD146 来分离 LSECs 和 Kupffer 细胞,整套方法简便可行,最终获得的 LSECs 纯度高,活性好,且数量多。

鉴定方法主要包括以下几个方面:① 根据其拥有的高效、迅速的吞噬能力,我们可以用特殊处理过的一些蛋白分子如荧光标记的经甲醛处理的白蛋白(Formaldehyde-treated Serum Albumin,FSA)、胶原 α 链和乙酰化低密度脂蛋白(acLDL)^[28]等对得到的 LSECs 进行共孵育,检测其对这些分子的吞噬能力。② 采用扫描电镜(SEM)观察 LSECs 表面的窗孔和筛板结构^[29]。由于窗孔是 LSECs 所特有的,因此也是 LSECs 鉴定的金标准。③ 根据细胞分子表面标志物对 LSECs 进行鉴定。目前用于鉴定 LSECs 的分子标志有些是内皮细胞所共有的标志,有些是血细胞源性的标志,尚没有某一个单独的特异性标志用于 LSECs 的鉴定,因此多项分子标记相结合或许是可行的方案。例如 Ding^[22]等以 VEGFR3+ CD34- VEGFR2+ VE-Cadherin+ FactorVIII+ CD45- 作为 LSECs 的标志物,Lalor^[31]等以 CD31+ Lyve1+ L-SIGN+ Stabilin-1+ CD34- Prox-1- 作为 LSECs 的标志物。本文中使用经典内皮细胞表面标志物 VEGFR3、VEGFR2 以及 CD31 对分离出的 LSECs 进行流式细胞检测,结果显示阳性率均在 93 %以上,提示分选方法可靠,所得 LSECs 纯度较高。

综上所述,本文采用的小鼠肝血窦细胞分离鉴定方法科学稳定,方便快捷,并获得良好的效果。分离获得的 LSECs 数量多,活性好,纯度高,细胞窗孔清晰明显,具有很强的内吞功能,且表达特征性的内皮细胞表面标志物,为研究 LSECs 在肝脏不同生理或病理情况下发挥的作用和具体机制奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] Maslak E, Gregorius A, Chlopicki S. Liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) function and NAFLD; NO-based therapy targeted to the liver [J]. Pharmacological reports: PR, 2015, 67(4): 689-694
- [2] Yokomori H, Oda M, Yoshimura K, et al. Recent advances in liver sinusoidal endothelial ultrastructure and fine structure immunocytochemistry[J]. Micron (Oxford, England : 1993), 2012, 43 (2-3): 129-134
- [3] Natarajan V, Harris EN, Kidambi S. SECs (Sinusoidal Endothelial Cells), Liver Microenvironment, and Fibrosis [J]. BioMed research international, 2017, 2017: 4097205
- [4] Lao Y, Li Y, Hou Y, et al. Proteomic Analysis Reveals Dab2 Mediated Receptor Endocytosis Promotes Liver Sinusoidal Endothelial Cell Dedifferentiation[J]. Scientific reports, 2017, 7(1): 13456
- [5] Poisson J, Lemoine S, Boulanger C, et al. Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases [J]. Journal of hepatology, 2017, 66(1): 212-227
- [6] Hu J, Srivastava K, Wieland M, et al. Endothelial cell-derived angiopoietin-2 controls liver regeneration as a spatiotemporal rheostat [J]. Science (New York, NY), 2014, 343(6169): 416-419
- [7] Wang L, Wang X, Xie G, et al. Liver sinusoidal endothelial cell progenitor cells promote liver regeneration in rats [J]. The Journal of clinical investigation, 2012, 122(4): 1567-1573
- [8] Leibing T, Geraud C, Augustin I, et al. Angiocrine Wnt signaling

- controls liver growth and metabolic maturation in mice [J]. *Hepatology* (Baltimore, Md), 2017
- [9] Olsavsky V, Ulbrich F, Singh S, et al. GATA4 and LMO3 balance angiocrine signaling and autocrine inflammatory activation by BMP2 in liver sinusoidal endothelial cells[J]. *Gene*, 2017, 627: 491-499
- [10] Bottcher JP, Schanz O, Garbers C, et al. IL-6 trans-signaling-dependent rapid development of cytotoxic CD8⁺ T cell function [J]. *Cell reports*, 2014, 8(5): 1318-1327
- [11] Wittlich M, Dudek M, Bottcher JP, et al. Liver sinusoidal endothelial cell cross-priming is supported by CD4 T cell-derived IL-2[J]. *Journal of hepatology*, 2017, 66(5): 978-986
- [12] Yao Z, Mates JM, Cheplowitz AM, et al. Blood-Borne Lipopolysaccharide Is Rapidly Eliminated by Liver Sinusoidal Endothelial Cells via High-Density Lipoprotein[J]. *J Immunol*, 2016, 197(6): 2390-2399
- [13] DeLeve LD. Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis[J]. *Hepatology* (Baltimore, Md), 2015, 61(5): 1740-1746
- [14] Li H, You H, Fan X, et al. Hepatic macrophages in liver fibrosis: pathogenesis and potential therapeutic targets [J]. *BMJ open gastroenterology*, 2016, 3(1): e000079
- [15] Kitano M, Bloomston PM. Hepatic Stellate Cells and microRNAs in Pathogenesis of Liver Fibrosis [J]. *Journal of clinical medicine*, 2016, 5(3)
- [16] Fernandez-Iglesias A, Gracia-Sancho J. How to Face Chronic Liver Disease: The Sinusoidal Perspective [J]. *Frontiers in medicine*, 2017, 4: 7
- [17] Eggert T, Greten TF. Tumor regulation of the tissue environment in the liver[J]. *Pharmacology & therapeutics*, 2017, 173: 47-57
- [18] Gracia-Sancho J, Russo L, Garcia-Caldero H, et al. Endothelial expression of transcription factor Kruppel-like factor 2 and its vasoprotective target genes in the normal and cirrhotic rat liver[J]. *Gut*, 2011, 60(4): 517-524
- [19] Monkemoller V, Oie C, Hubner W, et al. Multimodal super-resolution optical microscopy visualizes the close connection between membrane and the cytoskeleton in liver sinusoidal endothelial cell fenestrations[J]. *Scientific reports*, 2015, 5: 16279
- [20] Geraud C, Evdokimov K, Straub BK, et al. Unique cell type-specific junctional complexes in vascular endothelium of human and rat liver sinusoids[J]. *PloS one*, 2012, 7(4): e34206
- [21] Sorensen KK, McCourt P, Berg T, et al. The scavenger endothelial cell: a new player in homeostasis and immunity [J]. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*, 2012, 303(12): R1217-1230
- [22] Ding BS, Nolan DJ, Butler JM, et al. Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration [J]. *Nature*, 2010, 468(7321): 310-315
- [23] Ding BS, Cao Z, Lis R, et al. Divergent angiocrine signals from vascular niche balance liver regeneration and fibrosis [J]. *Nature*, 2014, 505(7481): 97-102
- [24] Meyer J, Gonelle-Gispert C, Morel P, et al. Methods for Isolation and Purification of Murine Liver Sinusoidal Endothelial Cells: A Systematic Review[J]. *PloS one*, 2016, 11(3): e0151945
- [25] Murthy A, Shao YW, Defamie V, et al. Stromal TIMP3 regulates liver lymphocyte populations and provides protection against Th1 T cell-driven autoimmune hepatitis [J]. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950), 2012, 188(6): 2876-2883
- [26] Katz SC, Pillarisetty VG, Bleier JI, et al. Liver sinusoidal endothelial cells are insufficient to activate T cells [J]. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950), 2004, 173(1): 230-235
- [27] 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
- [28] Li R, Oteiza A, Sorensen KK, et al. Role of liver sinusoidal endothelial cells and stabilins in elimination of oxidized low-density lipoproteins [J]. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*, 2011, 300(1): G71-81
- [29] Cogger VC, O'Reilly JN, Warren A, et al. A standardized method for the analysis of liver sinusoidal endothelial cells and their fenestrations by scanning electron microscopy[J]. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 2015, (98): e52698
- [30] Peng Q, Zhang Q, Xiao W, et al. Protective effects of *Sapindus mukorossi* Gaertn against fatty liver disease induced by high fat diet in rats [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2014, 450(1): 685-691
- [31] Lalor PF, Lai WK, Curbishley SM, et al. Human hepatic sinusoidal endothelial cells can be distinguished by expression of phenotypic markers related to their specialised functions in vivo[J]. *World journal of gastroenterology*, 2006, 12(34): 5429-5439

(上接第 1132 页)

- [19] Bi Y, Mao J, Wang X, et al. Traditional Chinese medicine syndrome patterns and qi-regulating, chest-relaxing and blood-activating therapy on cardiac syndrome X [J]. *J Tradit Chin Med*, 2013, 33(2): 194-199
- [20] Luo J, Xu H, Yang G, et al. Oral Chinese proprietary medicine for angina pectoris: an overview of systematic reviews/meta-analyses[J]. *Complement Ther Med*, 2014, 22(4): 787-800
- [21] Luo J, Shang Q, Han M, et al. Traditional Chinese medicine injection for angina pectoris: an overview of systematic reviews[J]. *Am J Chin Med*, 2014, 42(1): 37-59
- [22] Dufang M, Yongcheng W, Ping J, et al. N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide Levels Inversely Correlated With Heart Rate Variability in Patients With Unstable Angina Pectoris [J]. *Int Heart J*, 2016, 57(3): 292-298
- [23] Sumin AN, Korok EV, Gaifulin RA, et al. Immediate Outcomes of Coronary Artery Bypass Grafting in Patients With Multifocal Atherosclerosis: Gender Differences [J]. *Kardiologiia*, 2016, 56(8): 33-39