

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.16.009

## 建立同时分离培养小鼠肝细胞及肝星状细胞的技术\*

李海媛 王 雪 时永全 韩 英<sup>△</sup>

(第四军医大学西京消化病医院肿瘤生物学重点实验室 陕西 西安 710032)

**摘要 目的:**建立一种简便、经济、高产的同步分离培养肝细胞以及肝星状细胞的方法。**方法:**在参照国内外方法的基础上加以改良,首先采用肝脏原位胶原酶灌注消化的方法,获得总细胞悬液,经多次低速离心分离肝细胞;再用 Nycodenz 作为分离介质,通过密度梯度离心法从非实质细胞中得到肝星状细胞。通过台盼蓝染色方法鉴定细胞的活力,用倒置相差显微镜、立体显微镜、CK-18、白蛋白免疫荧光细胞化学染色对培养的肝细胞形态以及功能进行检测。使用 Desmin、 $\alpha$ -SMA 免疫荧光细胞化学对肝星状细胞进行鉴定。**结果:**成功的在体外同步分离、培养肝细胞及肝星状细胞,肝细胞产率为  $5-6 \times 10^7$ /只小鼠,两只小鼠肝星状细胞产率达  $1 \times 10^6$  个。细胞存活率及纯度均可达 90%。肝细胞在培养 24h 后呈不规则铺路石样形态,此为典型的肝细胞形态,其标志分子 CK-18 以及白蛋白免疫荧光染色阳性。倒置相差显微镜下可见贴壁后的肝星状细胞呈典型的星形细胞形态,且其标志分子 Desmin、 $\alpha$ -SMA 免疫荧光染色阳性。**结论:**改良的原位灌注以及分离方法可以同时分离并且培养具有高活性和功能的肝细胞和肝星状细胞。

**关键词:**分离方法;小鼠;肝细胞;肝星状细胞

**中图分类号:**Q95-3;R575.2;Q813;R-331 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)16-3033-05

## Establish a Technology of Isolating and Culturing Mouse Hepatocytes and Hepatic Stellate Cells Simultaneously\*

LI Hai-yuan, WANG Xue, SHI Yong-quan, HAN Ying<sup>△</sup>

(State Key Laboratory of Cancer Biology, Xijing Hospital of Digestive Disease, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

**ABSTRACT Objective:** To establish a simple, economical and high-efficiency technique to isolate and culture the mouse hepatocytes and hepatic stellate cells coinstantaneous. **Methods:** In situ collagenase perfusion of liver was performed for the total cell suspension and then repeated low-speed centrifugation was used for the separation of hepatocytes. Hepatic stellate cells could be obtained from non-parenchymal cells by density gradient centrifugation using Nycodenz as a separation medium. Cell viability was identified by Typan staining. The inverted phase contrast microscope, stereoscopic microscope and immunofluorescence staining of CK-18 and albumin were used to determine the morphology and function of hepatocytes. Immunofluorescence staining of desmin and  $\alpha$ -SMA were used to determined hepatic stellate cells. **Results:** Hepatocytes and hepatic stellate cells were separated synchronously and cultured *in vitro*.  $5-6 \times 10^7$  hepatocytes were harvested per mouse and the yield of hepatic stellate cells was  $1 \times 10^6$  or so per two mice. Both cell viability and purity could reach 90%. After incubation for 24h, hepatocytes presented typical irregular cobblestone morphology and positive staining of CK-18 and albumin. Hepatic stellate cells showed typical morphology of star-shapes and positive staining of Desmin and  $\alpha$ -SMA. **Conclusions:** Improved situ perfusion method can be used for simultaneous isolation of hepatocytes and hepatic stellate cells with high viability and function.

**Key words:** Isolation methods; Mouse; Hepatocyte; Hepatic stellate cell

**Chinese Library Classification(CLC):** Q95-3; R575.2; Q813; R-331 **Document Code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2014)16-3033-05

### 前言

近年来,对于肝纤维化发病机制的研究越来越多,认识也逐步深入。肝纤维化是一种涉及到肝脏多种细胞以及细胞因子的复杂疾病<sup>[1]</sup>。有报道证实,肝细胞凋亡在肝纤维化进展中起着重

要的作用,并且同疾病的严重程度以及肝纤维化的严重程度密切相关<sup>[2]</sup>。在正常肝脏中,肝星状细胞处于静止状态,但是在损伤肝脏中,肝星状细胞被激活,导致细胞外基质聚集<sup>[3]</sup>。有文献报道,在一些损伤因素的作用下,肝细胞凋亡成为细胞面对毒素的第一个反应,这些凋亡的肝细胞释放脂质信号,被肝星状

\* 基金项目:国家 863 计划项目(2011AA020111);国家自然科学基金(面上项目)(81370519);国家自然科学基金(青年项目)(81200290)

作者简介:李海媛(1986-),女,硕士研究生,主要研究方向:终末期肝病的诊断和治疗,E-mail:lihaiyuan198611@126.com

<sup>△</sup>通讯作者:韩英,电话:029-84771522,E-mail:hanying@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2014-01-20 接受日期:2014-02-15)

细胞摄取。随后,肝星状细胞吞噬凋亡小体,并释放促纤维化因子进一步激活肝星状细胞的活化,肝星状细胞的这种持续激活又可以进一步促进肝细胞凋亡,使得肝脏炎症程度达到了高峰<sup>[4]</sup>。同时,肝星状细胞激活后可释放细胞外基质,在肝纤维化中发挥着重要的作用<sup>[56]</sup>。因此,肝细胞和肝星状细胞间的相互作用成为肝纤维化研究的热点。由此看来,建立简便、稳定的肝细胞与肝星状细胞同步分离的方法,为进一步研究这两种细胞间的相互作用提供了基础,这对于肝纤维化以及抗肝纤维化的研究是非常重要的。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

C57BL/6 雄性小鼠(25-30g)购于第四军医大学实验动物中心,常规饲料喂养,正常自由饮水。实验前禁食 12 小时。

### 1.2 试剂

地塞米松、胰岛素、IV 型胶原酶由美国 Sigma 公司提供;Nycodenz 由挪威 Axis-Shield 公司提供;RPMI-1640 培养基、胎牛血清以及 William's E 培养基由美国 Gibco 公司提供;青霉素、链霉素以及胰蛋白酶由美国 Hyclone 公司提供;抗 CK-18、Alb、 $\alpha$ -SMA、Desmin 由美国 Abcam 公司提供;I 型鼠尾胶原由美国 BD 公司提供;培养板由美国 Corning 公司提供。

### 1.3 分离用液和培养用液配置

#### 1.3.1 分离用液配置

1) Buffer 1: NaCl 818 mg, KCl 40 mg, NaHCO<sub>3</sub> 35 mg, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11 mg, EDTA 20 mg, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6 mg, HEPES 596 mg 加双蒸水至 100 mL;

2) Buffer2: NaCl 800 mg, NaHCO<sub>3</sub> 35 mg, KCl 40 mg, CaCl<sub>2</sub> 56mg, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 19 mg, HEPES 238 mg, 加双蒸水至 100 mL;

3) Buffer 3: IV 型胶原酶 0.05g 加入到 100 mL 的 Buffer2 液中,用直径为 0.22  $\mu$ m 滤器过滤除菌并存放至 -20℃ 冰箱中备用;

4) Nycodenz 分离液: 8g Nycodenz 加入到 28 mL GBSS-A 中。GBSS-A: KCl 370 mg, CaCl<sub>2</sub> 225 mg, 葡萄糖 991 mg, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30 mg, MgCl<sub>2</sub> 210 mg, MgSO<sub>4</sub> 70 mg, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 75 mg, NaHCO<sub>3</sub> 227 mg 加双蒸水至 1 L;

5) GBSS-B: CaCl<sub>2</sub> 225 mg, 葡萄糖 991 mg, KCl 370 mg, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30 mg, MgCl<sub>2</sub> 210 mg, MgSO<sub>4</sub> 70 mg, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 75 mg, NaHCO<sub>3</sub> 227 mg, NaCl 8g 加双蒸水至 1L。上述液体均调 pH 为 7.4-7.6 后灭菌。

#### 1.3.2 培养用液体配置

1) 肝细胞培养液: William's E 培养基, 20%胎牛血清, 0.5 U·mL<sup>-1</sup> 胰岛素, 1×10<sup>-7</sup> 地塞米松, 100 U·mL<sup>-1</sup> 青霉素, 100 U·mL<sup>-1</sup> 链霉素;

2) 肝星状细胞培养液: RPMI-1640 培养基, 10%胎牛血清, 100 U·mL<sup>-1</sup> 青霉素, 100 U·mL<sup>-1</sup> 链霉素。

### 1.4 主要仪器

蠕动泵: 陕西超杰生物科技有限公司; 共聚焦显微镜: 日本 Olympus 公司。

### 1.5 实验方法与步骤

#### 1.5.1 肝脏灌注以及低速离心分离肝脏实质细胞与非实质细胞

C57BL/6 小鼠称重, 3%戊巴比妥钠(1 mL·100g<sup>-1</sup>)腹腔麻醉, 备皮、固定小鼠于操作台上并充分暴露腹部, 消毒腹部并注入肝素钠注射液抗凝。下腹部正中切口打开腹腔, 暴露肝脏以及门静脉。用小镊子从门静脉下方放置一根 1 号缝线(暂不结扎), 留置针缓慢插入门静脉中, 并用缝线打结固定。用连接好的蠕动泵以 25 mL·min<sup>-1</sup> 的速度灌注已预热至 37℃ 的 Buffer1, 同时快速剪开小鼠下腔静脉。当肝脏变成土黄色时(约 3 min), 以相同的速率灌注 Buffer2, 此时应穿透膈肌, 结扎上腔静脉。2 min 后连接 Buffer3 即胶原酶以 10 mL·min<sup>-1</sup> 灌注约 7 分钟, 待观察小鼠肝脏有细小颗粒、组织松软、压迫肝脏后不再回缩, 并且肝包膜下组织呈现龟裂状时即为肝细胞消化成功, 此时停止灌注。小心剪断肝周韧带, 将肝脏放置于无菌的培养皿内, 去除血管等结缔组织、去除胆囊, 加入 4℃ RPMI-1640 培养基, 用培养基冲洗两次后转入新的无菌培养皿中, 用镊子将肝包膜撕破, 使肝细胞充分散落到液体中, 用 200 目滤网过滤并收集细胞悬液至离心管中。将所得的细胞悬液放入 4℃ 离心机中, 50×g, 离心 3 min, 沉淀为肝细胞, 上清中富含肝脏非实质细胞。将上清收集, 沉淀再用培养基重悬, 45×g, 离心 3 min。收集上清, 沉淀用培养基重悬, 40×g, 离心 3 min, 收集上清。此时, 沉淀为肝细胞, 收集的三次上清液中富含肝脏非实质细胞。

1.5.2 肝细胞活性检测以及培养 将肝细胞悬液取 10  $\mu$ L, 加入 10  $\mu$ L 台盼蓝混匀后, 取 10  $\mu$ L 混合液滴加到血细胞计数板上进行肝细胞存活率的检测。将 1-2×10<sup>5</sup> 个肝细胞接种于已预铺好 I 型胶原的 24 孔培养板中, 或者将其接种至已预铺好 I 型胶原的玻片上进行细胞爬片, 用肝细胞培养液培养, 将其置于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养, 4-8 小时后首次换液, 以后每两天换液。

1.5.3 肝星状细胞分离和培养 将上述收集的富含肝非实质细胞的上清 4℃ 离心, 600×g, 10 min。将沉淀用 GBSS-B 重悬至 18 mL, 向其中加 7 mL 的 Nycodenz 并混匀。将混匀的细胞悬液平均转移到 2 个 15 mL 离心管中。将离心管倾斜, 缓慢的向细胞悬液上加 2 mL 的 GBSS-B, 4℃ 离心, 1500×g, 15min。离心完毕后, 肝细胞沉在管底, 肝星状细胞在中间形成白色的环状层。小心收集中间包含肝星状细胞的环状层, 用 GBSS-B 洗, 4℃ 离心, 600×g, 10 min。弃去上清, 细胞用肝星状细胞培养液重悬。以 2×10<sup>4</sup> 个细胞·cm<sup>-2</sup> 的密度接种至培养皿中。24 小时后换液, 以后隔天换液。

1.5.4 肝细胞形态以及功能检测 使用倒置相差显微镜以及立体显微镜对其进行形态学观察; 将已做细胞爬片的肝细胞用 4%多聚甲醛固定, 行 CK-18 以及 Alb 免疫荧光细胞化学染色, 后用 DAPI 复染细胞核, 行共聚焦观察。

#### 1.5.5 肝星状细胞的鉴定

1) 倒置显微镜下形态学观察;

2) 荧光显微镜观察: 刚分离的肝星状细胞在 328 nm 波长的紫外光激发下观察;

3) 免疫荧光细胞化学染色: 将培养 7 天后的肝星状细胞用 4%多聚甲醛固定, 进行  $\alpha$ -SMA 以及 Desmin 免疫荧光细胞化学染色, 后用 DAPI 复染细胞核, 共聚焦观察。

## 2 结果

### 2.1 细胞数量以及存活率

采用改良原位灌注方法以及低速离心方法分离小鼠肝细胞(图1),每只小鼠可以获得  $5-6 \times 10^7$  个肝细胞。用 Nycodenz

密度梯度离心,两只小鼠共可获得肝星状细胞数量约  $1 \times 10^6$ 。细胞存活率以及纯度都可达到 90%。

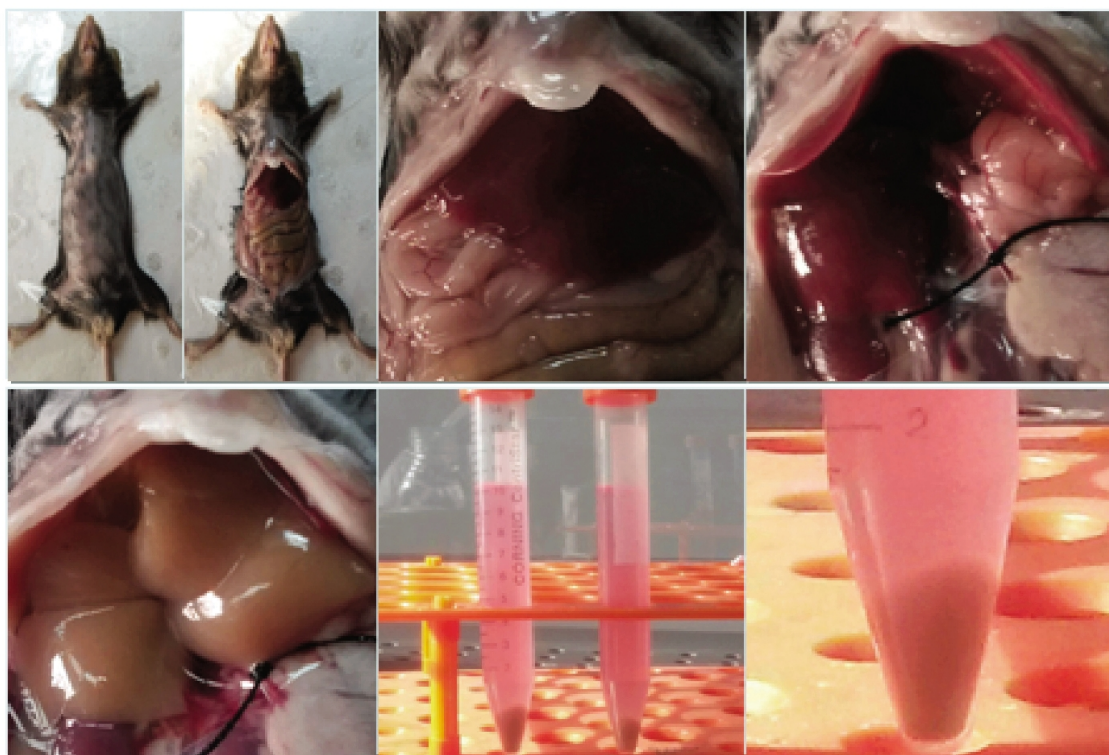


图1 改良原位灌注方法分离细胞的过程

Fig. 1 Improved process of isolating cells with situ perfusion method

## 2.2 肝细胞形态以及功能检测

**2.2.1 肝细胞形态学观察** 倒置显微镜和立体显微镜均可观察到细胞界限清晰,细胞在分离接种 6-8 小时后可贴壁生长,呈不规则形铺路石样形态。细胞核多为单核或多核,圆形或椭圆形,核仁清晰(图 2A、2B)。

**2.2.2 肝细胞功能检测** 接种在小玻片上的肝细胞在培养 3 天后行 CK-18 以及 Alb 免疫荧光细胞化学染色。CK-18 染色后,可见 CK-18 均匀分布于肝细胞内,CK-18 表达阳性(图 2C)。Alb 免疫荧光细胞化学染色可见 Alb 在肝细胞胞浆内有呈现均质分布,Alb 表达阳性(图 2D)。

## 2.3 肝星状细胞鉴定

### 2.3.1 肝星状细胞形态学观察

1) 倒置显微镜下观察,刚分离出来的肝星状细胞胞浆中含有脂滴,折光性强,细胞呈圆形,较肝细胞小。培养 24 小时后可见大部分细胞呈现椭圆形,细胞已贴壁,部分细胞开始有伪足伸出。培养 2-3 天后,细胞贴壁呈多样性,大部分呈伸展状态生长,一部分已有伪足,为星状细胞的典型形态。约 7-8 天即可以传代。

2) 荧光显微镜下,刚分离的肝星状细胞在 328nm 波长紫外光激发下出现一过性自发荧光。

**2.3.2 肝星状细胞功能检测** 制备肝星状细胞爬片,在培养 7 天后行  $\alpha$ -SMA(图 3A)以及 Desmin(图 3B)免疫荧光细胞化学染色,可以看到几乎所有细胞都呈阳性。

## 3 讨论

近年来,对于肝纤维化的认识逐步深入。研究表明,由病毒性肝炎、酒精性肝病等引起的肝脏损伤以及纤维化中,肝细胞发生凋亡。同生理性的凋亡不同,肝脏的病理性凋亡不仅由炎症以及纤维化引起,还可以反过来扩大这些反应,尤其是肝脏中主要的纤维化细胞类型——肝星状细胞<sup>[4,7]</sup>。肝星状细胞可以吞噬凋亡小体,刺激 TGF- $\beta$ 1 的表达并且诱导 I 型胶原的生成,导致肝纤维化<sup>[8,9]</sup>。肝细胞凋亡和肝星状细胞之间的活化就成为了肝纤维化机制的研究热点。因此,急需建立一种稳定、高效的同步分离肝细胞与肝星状细胞的方法。

在正常肝脏中,肝星状细胞大约占非实质细胞的 1/3,占肝脏中所有细胞的 15%<sup>[10,11]</sup>。其主要分布于肝脏的 Disse 间隙内,其功能主要是合成和分泌细胞外基质。小鼠肝星状细胞的密度为  $1.047-1.061 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,而枯否细胞的密度为  $1.083-1.095 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ <sup>[2]</sup>。由于肝星状细胞数量少,同 Kupffer 细胞的密度差异不是很明显,并且肝星状细胞与肝细胞易于吸附,因此如何高效的、高纯度的提取肝星状细胞就成为分离的重点和难点。

由于肝星状细胞富含脂滴这个特点,使得其密度在肝脏所有细胞中最低,所以大部分文献均采用密度梯度离心方法分离该细胞<sup>[13]</sup>。我们查阅了国内外文献,大部分报道的是单独分离肝细胞或肝星状细胞的方法<sup>[14-16]</sup>,这样就会导致这两种细胞的来源不同,即来源于不同的个体,在研究这两种细胞的相互作



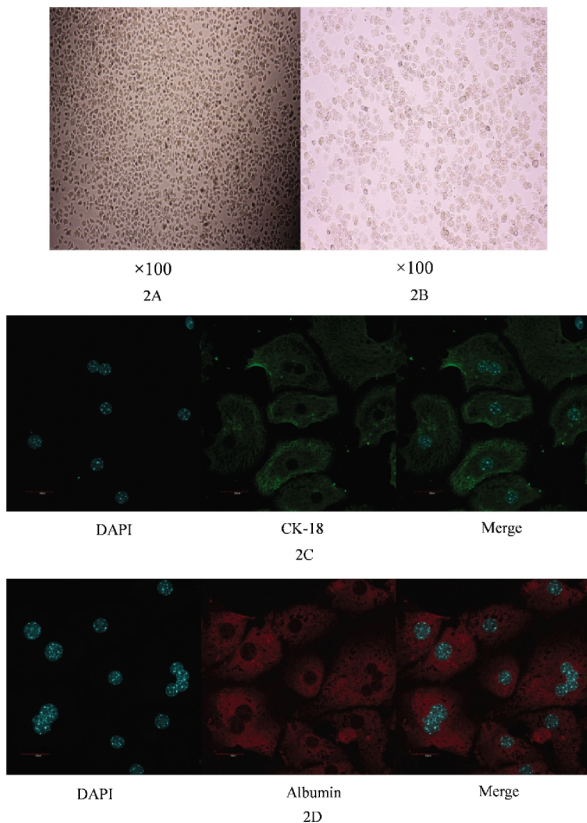


图2 原代肝细胞形态观察以及功能检测:培养24 h后倒置显微镜下肝细胞形态学(2A);培养24 h后立体显微镜下肝细胞形态学(2B);肝细胞培养3天后细胞免疫荧光CK-18观察(2C);白蛋白(Albumin)细胞免疫荧光染色观察(2D)

Fig. 2 Analysis of morphology and function of hepatocytes: The morphological analysis by Inverted Microscope (2A) and by stereoscopic microscope (2B) after 24h; CK-18 immunofluorescence staining (2C) and Albumin immunofluorescence staining (2D)

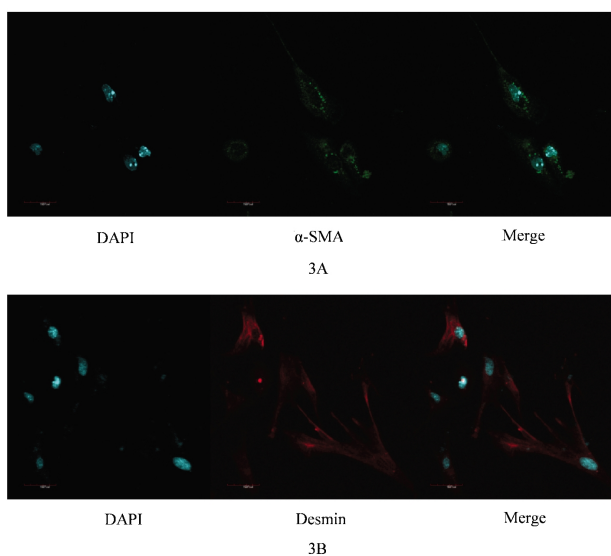


图3 肝星状细胞培养7天后,α-SMA(3A)以及 Desmin(3B)免疫荧光细胞化学染色观察

Fig. 3 Hepatic stellate cells stained by α-SMA (3A) and Desmin (3B) immunofluorescence after 7 days of culture

用时,往往很难将其控制在同一条件下,并且增加了成本。因此,首先我们先用 Buffer 1(不含钙离子)冲去肝脏中的血液成分,用 Buffer 2(含钙离子)灌注肝脏,使肝内血管扩张,胶原酶易于进入肝脏微循环,并且钙离子可以增强胶原酶的活性提高消化的作用,使消化更充分。再用胶原酶灌注,获得细胞悬液。将细胞悬液低温、低速离心,得到沉淀为肝细胞,上清为非实质细胞(包括 Kupffer 细胞、肝星状细胞等)。在灌注消化肝脏时,我们去除了链酶蛋白酶消化这个环节,在保证了对所分离细胞的纯度外,减少了链酶蛋白酶对细胞的损伤,易于细胞分离和生长,并且缩短了操作时间。其次,我们选取了 8%-8.2%的 Nycodenz 作为分离介质。目前报道的分离原代肝星状细胞最常用的分离介质包括 Nycodenz<sup>[17]</sup>、Percoll<sup>[18]</sup>、Optiprep 等,其中,Nycodenz 因其分层稳定、无毒性、配制较简单而常用,故本实验采用 Nycodenz 作为分离介质<sup>[19]</sup>。文献报道的加入 Nycodenz 的方法一般包括两种,一种是将配制好的一定密度的 Nycodenz 与细胞悬液混匀,从而形成一定密度的 Nycodenz 液,再向上面覆盖少量的 PBS 或 Hanks 液;另外一种是将 Nycodenz 先加入到管底,上面缓慢加上细胞悬液,利用密度形成一个界面<sup>[20]</sup>。我们经过反复验证,最终选择了第一种方式,并且在前期的大量实验中,我们用不同浓度的 Nycodenz 分离细胞,发现当其浓度在 8%-8.2%时,梯度离心后形成的细胞层最明显,细胞含量多,结果理想。由于肝星状细胞所占的比例较少,因此我们每次分离 2-3 只小鼠,这样可以增加所得的细胞数量,有利于进一步的实验。再次,我们使用蠕动泵替代传统的手工推注的方法来灌注液体,使灌注速度均匀,减少操作过程中人为因素的失误,提高分离效率。最后,我们采用非循环在体灌注,相比离体灌注肝脏的方法,这种方法不仅可以避免混有杂质细胞,提高细胞纯度,而且可以节省分离所用的时间,提高分离效率。这种同时分离获得两种细胞的方法,不仅保证了高纯度和高存活率,而且将实验时间控制在 1.5 h-2 h 内,缩短了分离所用的时间,为今后的研究提供了快速简单的方法。

但是,在整个分离过程中仍然需要注意一些问题,这些细节往往对细胞成活率以及纯度都有很大的影响,比如:1)在小鼠周龄和体重方面的选择比较重要,我们选取了周龄较小但体重大于 25 g、皮下脂肪较厚、营养状况良好的小鼠。周龄较小的小鼠细胞活力好,生长较快;体重较大且皮下脂肪厚的小鼠肝星状细胞数量较多;2)使用蠕动泵灌注液体时,要提前将软管中的气体排尽,同时在灌注过程中要时刻注意软管中不能进入气体,防止气体进入肝脏导致肝包膜破裂,灌注液流出,不仅对消化细胞有影响而且容易污染;3)灌注完毕,按照肝脏的轮廓小心剪下肝脏,并尽量将肝脏周围的结缔组织剪掉,如 Glisson、肝周韧带以及胆囊等,从而减少混杂细胞的污染。但注意此时不能剪破肝包膜以及胃肠道,防止污染;4)在接种细胞时,要使接种的细胞密度适宜,密度太高影响细胞生长,密度太低会减弱细胞间的相互作用,同样影响细胞生长;5)在培养肝细胞时,培养皿要预铺 I 型胶原,使肝细胞更容易贴壁,并且在肝细胞培养液中添加多种有利于肝细胞贴壁生长的因子。

综上所述,我们的研究在整合了国内外小鼠肝细胞和肝星状细胞的原代分离、培养方法的基础上进行了改进,研究了同时分离、培养肝细胞和肝星状细胞的方法,取得了良好的结果,

是一种经济、简便、可靠的方法。

### 参 考 文 献(References)

- [1] Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis [J]. *Lancet*, 2008, 371(9615): 838-851
- [2] Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis as a mechanism for liver disease progression [J]. *Semin Liver Dis*, 2010, 30(4): 402-410
- [3] Mòdol T, Natal C, Pérez de Obanos MP, et al. Apoptosis of hepatic stellate cells mediated by specific protein nitration [J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 81(3):451-458
- [4] Dechêne A, Sowa JP, Gieseler RK, et al. Acute liver failure is associated with elevated liver stiffness and hepatic stellate cell activation [J]. *Hepatology*, 2010, 52(3): 1008-1016
- [5] Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6(3):425-456
- [6] Tacke F, Zimmermann HW. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis [J]. *J Hepatol*, 2014, 8. pii: S0168-8278(14)00005-1
- [7] Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis [J]. *Hepatology*, 2004, 39 (2):273-278
- [8] Canbay A, Taimr P, Torok N, et al. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic [J]. *Lab Invest*, 2003,83(5): 655-663
- [9] Bian EB, Huang C, Wang H, et al. Repression of Smad7 mediated by DNMT1 determines hepatic stellate cell activation and liver fibrosis in rats[J]. *Toxicol Lett*, 2014, 224(2):175-185
- [10] Giampieri MP, Jezequel AM, Orlandi F. The lipocytes in normal human liver [J]. *Digestion*, 1981, 22(4):165-169
- [11] Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis [J]. *Compr Physiol*, 2013, 3(4):1473-1492
- [12] 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
- [13] Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, et al. NADPH oxidase signal transduces angiotension II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(9):1383-94
- [14] 叶娟,王群,付溪,等. 原代大鼠肝细胞分离及培养鉴定 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2012, 27(7):531-533  
Ye Juan, Wang Qun, Fu Xi, et al. Isolation culture and identification of hepatocytes of primary rat [J]. *J Appl Clin Pediatr*, 2012, 27(7): 531-533
- [15] 王燕,周露婷,章卫平,等.高活力原代小鼠肝细胞的分离与纯化[J]. *医学研究杂志*, 2011, 40(3):28-31  
Wang Yan, Zhou Lu-ting, Zhang Wei-ping, et al. Isolation of Primary Mouse Hepatocytes with High Viability [J]. *J Med Res*, 2011, 40(3): 28-31
- [16] Meurer SK, Alsamman M, Sahin H, et al. Overexpression of endoglin modulates TGF- $\beta$ 1-signalling pathways in a novel immortalized mouse hepatic stellate cell line[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56116
- [17] D'Ambrosio DN, Walewski JL, Clugston RD, et al. Distinct populations of hepatic stellate cells in the mouse liver have different capacities for retinoid and lipid storage [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24993
- [18] Weiskirchen R, Gressner AM. Isolation and culture of hepatic stellate cells [J]. *Methods Mol Med*, 2005, 117(2): 99-113
- [19] Maschmeyer P, Flach M, Winau F. Seven steps to stellate cells [J]. *J Vis Exp*, 2011, 10:(51),e2710
- [20] Rickwood D, Ford T, Graham J. Nycodenz: a new nonionic iodinated gradient medium [J]. *Anal Biochem*, 1982, 123(1): 23-31

(上接第 3032 页)

- [14] Tilley D, Levit I, Samis JA. Measurement of factor v activity in human plasma using a microplate coagulation assay [J]. *J Vis Exp*. 2012 Sep 9(67). pii:3822
- [15] Kohert U, Rudolph R, Verheijen JH. Weening-Verhorff J, Stern A, Opitz U. et al. Biochemical properties of the kringle 2 and protease domains are maintained in the refolded t-PA deletion variant BM 06.022[J]. *Protein Eng*, 1992, 5(1):93-100
- [16] Tilley D, Levit I, Samis JA. Measurement of factor v activity in human plasma using a microplate coagulation assay [J]. *J Vis Exp*, 2012, 9(67):3822-3829
- [17] Mir Mohammad Sadeghi H, Rabbani M, Rismani E, et al. Optimization of the expression of reteplase in *Escherichia coli*[J]. *Res Pharm Sci*, 2011, 6(2): 87-92
- [18] Jankun J, Aleem AM, Struniawski R, et al. Accelerated thrombus lysis in the blood of plasminogen activator inhibitor deficient mice is inhibited by PAI-1 with a very long half-life[J]. *Pharmacol Rep*, 2009, 61(4): 673-680
- [19] Ozolina A, Strike E, Jaunalksne I, et al. PAI-1 and t-PA/PAI-1 complex potential markers of fibrinolytic bleeding after cardiac surgery employing cardiopulmonary bypass [J]. *BMC Anesthesiol*, 2012, 30(12): 27
- [20] Davami F, Sardari S, Majidzadeh AK, et al. A novel variant of t-PA resistant to plasminogen activator inhibitor-1; expression in CHO cells based on In Silico experiments[J]. *BMB Rep*, 2011, 44(1): 34-39
- [21] Jensen JK, Thompson LC, Bucci JC, et al. Crystal Structure of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in an Active Conformation with Normal Thermodynamic Stability [J]. *Biol Chem*, 2011, 286 (34): 29709 - 29717