

## 人胰腺星状细胞分离方法改良

田 蕾, 陆子鹏, 吴鹏飞, 蔡宝宝, 赵良涛, 钱 栋, 徐庆成, 朱 毅, 张静静, 杜 青, 蒋奎荣, 吴峻立, 苗 毅\*

(南京医科大学胰腺研究所, 南京医科大学第一附属医院胰腺中心, 普外科实验室, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** **目的:**探讨人胰腺星状细胞的两种新分离方法。**方法:**通过酶消化-密度梯度离心法进行静止态的人正常胰腺星状细胞的分离, 分离获得的细胞在含 10%FBS 的 DMEM/F12 继续培养。通过组织块外植法获得激活态的人肿瘤相关胰腺星状细胞(CaPSCs), 分离获得的细胞在含 20%FBS 的 DMEM/F12 继续培养。**结果:**通过方法改良, 1 g 人正常胰腺组织能够获得 $(0.5\sim 5.0)\times 10^6$ 个星状细胞, 细胞活率约为 90%。使用新的组织块外植法后, 组织块不易掉落, 细胞爬出时间显著缩短, 约 5~10 d 即可获得 CaPSCs。所有细胞贴壁良好, 细胞倍增时间约为 24 h。正常胰腺星状细胞(normal pancreatic stellate cells, NPSCs)培养早期形态符合典型静止态星状细胞特征, 细胞为多边形或圆形, 内含丰富脂滴, 在荧光显微镜下可观察到 320 nm 激发波长下的蓝绿色自发荧光。NPSCs 培养晚期和 CaPSCs 呈多触角状, 胞内无脂滴, 细胞增殖速度明显快于静止态细胞。激活态的细胞均表达  $\alpha$ -SMA、Desmin、vimentin、GFAP 等胰腺星状细胞特征性标记。**结论:**新的原代培养方法能够满足静止态和激活态两种状态胰腺星状细胞的分离培养, 同时能够增加细胞得率、缩短分离培养时间, 所获得细胞的活性和纯度符合进一步实验的要求, 为胰腺星状细胞的相关研究提供了便利。

**[关键词]** 胰腺星状细胞; 分离方法; 改良

**[中图分类号]** R329.28

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)05-595-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20150501

## Improvement of a in isolation method for pancreatic stellate cells from human pancreas

Tian Lei, Lu Zipeng, Wu Pengfei, Cai Baobao, Zhao Liangtao, Qian Dong, Xu Qingcheng, Zhu Yi, Zhang Jingjing, Du Qing, Jiang Kuirong, Wu Junli, Miao Yi\*

(Pancreas Institute of NJMU, Pancreas Center, Lab for Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To describe our novel modification in isolating pancreatic stellate cells (PSCs) from normal human pancreas and human pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) tissue. **Methods:** Normal PSCs were isolated with enzyme digestion and ladder centrifuge. Isolated PSCs were cultured in DMEM/F12 containing 10% fetal bovine serum. Cancer-associated PSCs were obtained by an outgrowth method. Isolated PSCs were cultured in DMEM/F12 containing 20% fetal bovine serum. **Results:** With our modifications, normal pancreas tissue from human yields an adequate number of PSCs (approximately 0.5-5 million/g pancreas) for in vitro studies, and the cell viability was about 90%. After new outgrowth method applied, tissue blocks were attached more tightly and cells grew out earlier compared to the previous method. Primary isolated PSCs were verified with appearance, auto-fluorescence, positive expression of  $\alpha$ -SMA, Vimentin, Desmin, GFAP. **Conclusion:** Our modification for PSCs isolation significantly increase the isolating efficiency with shorter culture period, which can provide great convenience for future researches on PSCs.

**[Key words]** pancreatic stellate cells; isolation method; modification

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(05):595-599]

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81272239); 国家自然科学基金青年基金(81300351)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: miaoyi@njmu.edu.cn

胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)是一种恶性程度极高的肿瘤,5年生存率低,是发达国家人群中第4位致死的疾病,临床治疗效果不佳<sup>[1]</sup>。慢性胰腺炎和胰腺癌间质中以大量纤维结缔组织增生为其组织学特点,而激活的胰腺星状细胞(pancreatic stellate cells, PSCs)则是参与间质纤维化的主要细胞成分<sup>[2]</sup>。近年来,随着 Apte 和 Bachem 等<sup>[3-6]</sup>在 PSCs 原代培养技术方面做出的技术改良,大大提高了 PSCs 体外培养的效率, PSCs 的相关研究也广泛开展,对于其参与慢性胰腺炎和 PDAC 发生发展过程的作用机制也逐渐深化。目前,绝大部分的 PSCs 研究均建立在细胞原代培养的基础之上,因此,高效、稳定的原代培养技术是 PSCs 相关研究能否顺利开展的决定因素<sup>[7-8]</sup>。

本研究在既往经典 PSCs 分离方法的基础上,对静止态的人正常胰腺星状细胞(normal pancreatic stellate cells, NPSCs)和激活态的人肿瘤相关胰腺星状细胞(cancer-associated pancreatic stellate cells, CaPSCs)的分离方法进行优化改良。对于 NPSCs,本研究在先前方法的基础上对于酶消化这一过程进行了条件优化,不仅大幅度地提高了细胞产量,细胞活力也有了明显提升,相较于之前,方法更稳定,提取成功率更高<sup>[9-11]</sup>;而对于 CaPSCs,改良后的方法在保持其简单可行的前提下,利用血浆凝固这一生理过程,为原代细胞提供了细胞因子、钙离子和纤维蛋白骨架结构,使得细胞爬出的时间显著缩短,并提高了细胞质量<sup>[11]</sup>。两种改良方法的应用显著提高了 PSCs 分离的效率,为后续实验提供便利。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人正常胰腺组织和胰腺癌组织分别由南京医科大学第一附属医院胰腺中心良性胰腺疾病患者(如胰腺神经内分泌肿瘤、十二指肠腺瘤等)和 PDAC 患者行手术获得,所有病例均经过最终病理报告确定疾病诊断。所有标本的获取和细胞培养过程,均已经患者知情同意并获得南京医科大学第一附属医院伦理协会审核通过。

含有氯化钠的格氏平衡盐溶液(GBSS+NaCl, Sigma-Aldrich 公司,美国)。GBSS+NaCl 中的酶溶液(以下按消化 1 g 胰腺组织所需消化酶量):在 100 mL GBSS+NaCl 中,加入胶原酶 P (Roche 公司,德国) 65 mg,蛋白酶 (Sigma-Aldrich 公司,美国) 50 mg,

DNA 酶 (Roche 公司,德国) 1 mg,充分混匀,现配现用。胰腺星状细胞培养基:在每 100 mL DMEM/F12 (WISENT 公司,加拿大)中加入 10%或 20%胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, WISENT 公司,加拿大),4 mmol/L L-谷氨酰胺 (Sigma-Aldrich 公司,美国),1 mL 双抗母液 (青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 μg/mL, Thermo Scientific 公司,美国),充分混匀,4℃储存,2 周内用完。28.7% W/V Nycodenz 密度梯度分离液:在每 100 ml GBSS+NaCl 中加入 28.7 g Nycodenz (Axis-Shield, Oslo Norway),充分混匀,现配现用。台盼蓝染色细胞存活率检测试剂盒 (Beyotime 公司,中国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 静止态的人 NPSCs 分离

无菌条件下留取新鲜手术切除标本中的正常胰腺组织,置入 4℃生理盐水中;移至超净台,4℃生理盐水冲洗 3 遍,仔细修剪去除脂肪组织、结缔组织和血管,放入玻璃皿中称重;根据组织的重量按比例配制酶溶液,然后用 1 mL 注射器将 10 mL 消化液反复注射至胰腺组织中,直至胰腺组织肿胀,腺叶分散,此步骤控制在 4~6 min;转移胰腺组织及剩余的消化液至锥形瓶中,另加入 10 mL 酶溶液(总共 20 mL),37℃恒温水浴摇床中孵育 7 min,高速(80 r/min) 4 min,低速(50 r/min) 3 min;将经预消化的胰腺组织移至玻璃皿,去除杂质后,用弯剪精细剪碎,此步骤控制在 4~6 min。观察组织匀浆的粘稠度,如黏稠度大,可添加 20 μL DNA 酶(4 mg/mL),再放入 37℃的水浴摇床中,50 r/min,此步骤需要不断观察消化液中的细胞数量和状态,如发现细胞数量不随消化时间延长而增加,同时细胞碎片增加,则应立即终止消化,此步骤一般需要 7 min 左右;将经过消化的胰腺细胞悬液移入 50 mL 离心管中,加入 20 mL 完全培养液终止消化,充分轻柔吹打,经 250 μm 尼龙滤网进行过滤,收集含有细胞的滤液;将获得的细胞悬液进行离心(460 g, 4℃, 10 min);用含 0.3% BSA 的 GBSS+NaCl 洗涤细胞后离心(460 g, 4℃, 10 min);用 9.5 mL 含 0.3% BSA 的 GBSS+NaCl 重悬细胞,然后加入 8 mL 含有 28.7% Nycodenz (Nycodenz 终浓度为 11.4%)的 GBSS+NaCl 溶液,充分轻柔混匀,用 20 mL 注射器将混合液加到盛有 6 mL 含 0.3% BSA 的 GBSS+NaCl 溶液的 50 mL 离心管底部,注意保护好溶液分层界面,然后离心(1 400 g, 4℃, 20 min);离心后,两层溶液之间的界面会形成模糊的条带,即为 PSCs 所在的区域,在不

扰乱密度梯度分层的情况下,收集模糊条带。用含 0.3% BSA 的 GBSS+NaCl 溶液轻柔洗涤所收集 PSCs 细胞,离心(460 g,4℃,10 min)后将其重悬于 10%FBS+DMEM/F12 培养液中,经细胞计数后转移至 6 cm 培养皿,37℃,5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。

### 1.2.2 激活态的人 CaPSCs 分离

术前取手术患者血 2 mL,装在含有 EDTA 的静脉血样采集容器中,离心(3 000 r/min,15 min)后留取血浆,0.45 μm 滤网过滤,4℃备用;无菌条件下留取新鲜手术切除标本中的胰腺癌组织,置于 4℃的无菌生理盐水中,移至超净台,生理盐水洗涤组织块 3 遍;将组织块放在玻璃皿中,用锋利的手术刀将组织切成 1 mm×1 mm×1 mm 的小块;用镊子将切好的组织块贴在 6 孔板底,迅速将同一患者血浆与无菌氯化钙溶液混匀,并小心地将血浆-氯化钙混合物滴加在组织块周围,放入培养箱中待血浆凝固,每个孔加 2 mL 含 20%FBS 的 DMEM/F12 培养液,37℃,5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。

## 2 结果

### 2.1 静止态的人 NPSCs 分离

每克胰腺组织能够获得的 NPSCs 为 (0.5~5.0)×10<sup>6</sup> 个,经台盼蓝染色实验鉴定细胞存活率约为 90%左右。

酶消化-密度梯度离心法获得的细胞经 8~96 h 贴壁,在培养早期呈现典型的静止态 PSCs 的特点:

细胞体积较小,增殖较慢,外形呈圆形或多边形,内含脂滴,在荧光显微镜 320 nm 激发波长下可观察到短暂性自发蓝绿色荧光(图 1A、B)。随着体外培养时间的延长和传代,细胞由最初的静止态转为激活态,细胞体积逐渐增大,增殖加快,形状由圆形或多边形变成星形,伸出伪足,细胞内脂滴消失(图 1C)。

### 2.2 激活态的人 CaPSCs 分离

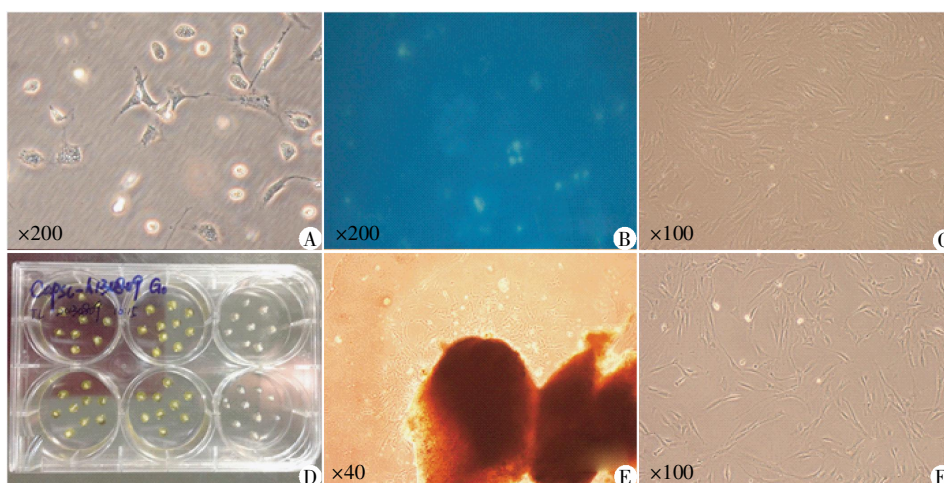
人胰腺癌组织贴壁 5~10 d 后可观察到 CaPSCs 自组织块边缘爬出,贴壁生长,此时 CaPSCs 即呈现出激活态的特征,细胞体积较大,胞内无脂滴,外形呈多触角状(图 1D、E)。经过 2~3 周左右,原代细胞呈 90%融合,即可进行第 1 次细胞传代。随着体外培养和细胞传代的不断进行,CaPSCs 可进一步激活,表现为细胞体积进一步增加,增殖加快,胞内纤维结构更为明显(图 1F)。而在未加血浆混合物的对照组中,则需要经过 2 周以上才能够观察到 CaPSCs 爬出,通常需要经过 4~5 周才能够第 1 次进行细胞传代。

### 2.3 PSCs 的表型鉴定

经细胞免疫化学染色和细胞免疫荧光染色鉴定,所分离培养的细胞表达 PSCs 的特异性标记物:Vimentin、α-SMA、GFAP 和 Desmin(图 2)。

## 3 讨论

有效分离培养 PSCs 开展体外及体内实验,是阐明 PSCs 参与慢性胰腺炎及胰腺癌发病机制的关键技术和基础。虽然目前永生化的 PSCs 已经被应

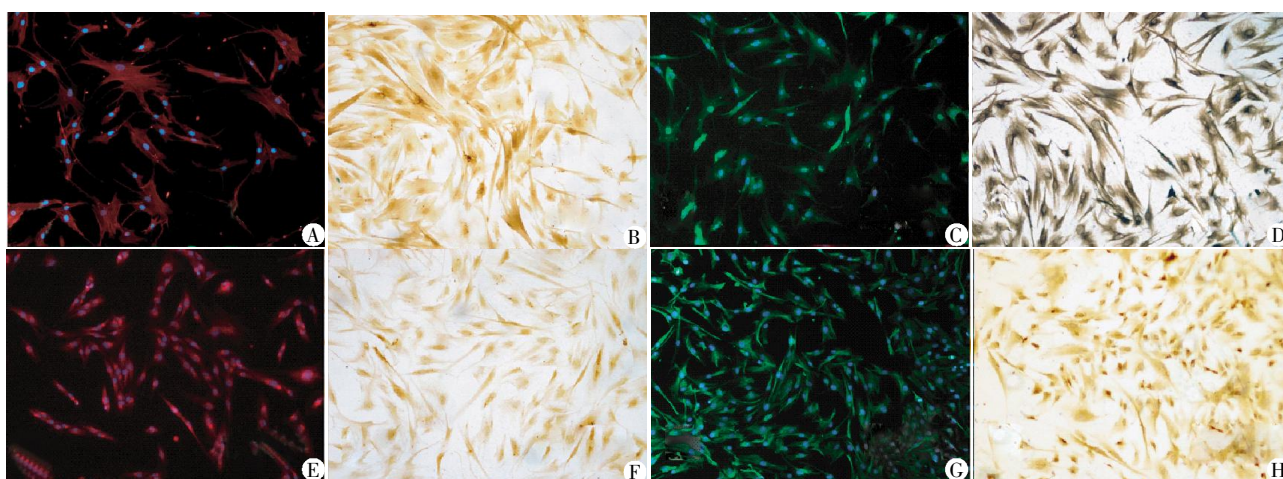


A: 体外培养早期 NPSCs,可见细胞体积较小,胞内含脂滴,胞体呈圆形或多边形;B: 荧光显微镜下观察胞内脂滴特征性的自发短暂蓝绿色荧光;C: 体外培养后期的 NPSCs,呈现典型的激活态特点,细胞体积增大,胞内脂滴消失,形态呈多触角状;D: 改良的组织块外植法,左 4 孔中可见胰腺癌组织块浸于血浆滴中,右 2 孔为传统组织块外植法对照组;E: 组织块外植法培养 5~10 d 后即可见细胞自组织块边缘爬出,贴壁生长;F: 体外培养的 CaPSCs,呈典型的激活态表现。

图 1 静止态人正常胰腺星状细胞和激活态人肿瘤相关胰腺星状细胞分离

Figure 1 Isolation of quiescent normal pancreatic stellate cells (NPSCs) and cancer-associated pancreatic stellate cells (CaPSCs)





激活态 PSCs 表达相应的表面标记: A、C、E、G: 细胞免疫荧光染色, 蓝色为核标记 DAPI; B、D、F、H: 细胞免疫化学染色, 紫色为苏木素染色核标记。A、B:  $\alpha$ -SMA; C、D: Vimentin; E、F: GFAP; G、H: Desmin。

图 2 原代分离胰腺星状细胞细胞标记物鉴定( $\times 100$ )

Figure 2 Expression of cellular markers in primary isolated pancreatic stellate cells( $\times 100$ )

用于实验研究,但由于存在个体化差异,并考虑到永生过程对于细胞状态的影响,原代培养细胞在 PSCs 的研究中仍然具有不可替代的地位<sup>[5]</sup>。

PSCs 的原代分离培养方法主要是包括酶消化-密度梯度离心法和组织块外植法两种<sup>[5]</sup>。酶消化-密度梯度离心法主要适用于静止态的 PSCs 分离,所使用的密度梯度分离液有 Nycodenz、Percoll、碘海醇、碘克沙醇等,对于 NPSCs 分离,本研究小组使用的是 Nycodenz, 该密度梯度分离液细胞毒性相对较小,梯度制备较方便。在之前的文献中,每一篇对消化步骤的描述都不同,而消化的程度却是决定最终细胞提取质量的关键<sup>[9,12-13]</sup>。本研究相较于之前的文献报道,主要对消化的条件进行了改良。首先调整了消化酶的浓度,消化 1 g 人正常胰腺组织所使用的胶原酶 P 和蛋白酶的浓度是分离鼠类 PSCs 时用量的一半。经过多次预实验对比,发现使用与大鼠正常 PSCs 分离一致的消化酶浓度,会产生较多细胞碎片,同时细胞产率会降低,本文分析可能是由于同样的消化酶浓度对于人源性 PSCs 毒性较大,导致细胞过度消化从而使得细胞产量低下,降低了酶浓度后可确保消化程度适中。其次改进了预消化和消化过程中水浴振荡的转速,相比 Apte 等<sup>[7]</sup>报道的高速 240 r/min 和低速 120 r/min,使用的 80 r/min 和 50 r/min 的转速更加温和,能够使胰腺组织得到柔和并充分的消化。最后改良了消化时间,这也是最难以掌握的一个变量,通过不断在镜下观察消化液中的细胞数量和状态,以判断消化程度,并根据观察的情

况确定是否终止消化。通过上述 3 项改进,PSCs 产量及提取成功率明显增加,这也充分证明了合适的消化过程是酶消化-密度梯度离心法提取 PSCs 成功的关键。

而组织块外植法主要是适用于激活态的 PSCs 分离,相比较之前报道的方法<sup>[11,14]</sup>,本研究中所使用的方法,在保证方法简单可行的基础之上,利用血浆凝固过程使组织块贴壁更牢固,减少了掉片率,从根本上增加了细胞数量。同时在培养的过程中,通过血浆中的生长因子、钙离子和纤维蛋白的三维骨架结构,尽可能为星状细胞的爬出提供适宜的生物和物理环境。通过方法改良,细胞爬出时间从之前的 2 周以上明显缩短至 5~10 d 左右,同时,第 1 次传代时间由原先的 4~5 周缩短至 2~3 周。

然而,由于人胰腺组织存在较为致密的细胞间质,同时患者之间也存在较为显著的异质性,因此在实际分离操作的过程中,特别是在酶消化-密度梯度离心法的过程中,也会常常遇到分离成功率不高、细胞产率低、细胞活力低下等问题,还需要在今后的实验过程中进一步改进。

综上所述,本分离方法成功地分离出静止态的人 NPSCs 以及激活态的 CaPSCs,并在原有的方法进行有效改良,提高了分离的产率和成功率,并缩短了细胞分离时间,所获得细胞的活性和纯度符合进一步实验的要求,为后续的体外、体内实验奠定良好的基础,有望对今后胰腺细胞的相关研究提供便利条件。

[参考文献]

- [1] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1):9-29
- [2] Apte MV, Park S, Phillips PA, et al. Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells [J]. Pancreas, 2004, 29(3):179-187
- [3] Wilson JS, Pirola RC, Apte MV. Stars and stripes in pancreatic cancer: role of stellate cells and stroma in cancer progression [J]. Front Physiol, 2014, 5(1):52
- [4] Apte MV, Wilson JS, Lugea A, et al. A starring role for stellate cells in the pancreatic cancer microenvironment [J]. Gastroenterology, 2013, 144(6):1210-1219
- [5] Erkan M, Adler G, Apte MV, et al. StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research [J]. Gut, 2012, 61(2):172-178
- [6] Erkan M. Understanding the stroma of pancreatic cancer: co-evolution of the microenvironment with epithelial carcinogenesis [J]. J Pathol, 2013, 231(1):4-7
- [7] Apte MV, Yang L, Phillips PA, et al. Extracellular matrix composition significantly influences pancreatic stellate cell gene expression pattern: role of transgelin in PSC function [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2013, 305(6):G408-417
- [8] Hu Y, Wan R, Yu G, et al. Imbalance of Wnt/Dkk negative feedback promotes persistent activation of pancreatic stellate cells in chronic pancreatitis [J]. PLoS One, 2014, 9(4):e95145
- [9] Apte MV, Haber PS, Applegate TL, et al. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture [J]. Gut, 1998, 43(1):128-133
- [10] 周龙安, 杨桂元, 钱祝银. 腹主动脉灌注法分离胰腺星状细胞及其培养、鉴定 [J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2007, 27(1):11-14
- [11] Bachem MG, Schneider E, Gross H, et al. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans [J]. Gastroenterology, 1998, 115(2):421-32
- [12] 谷 华, 赵 秋. 胰腺星状细胞分离培养的研究进展 [J]. 医学综述, 2005, 11(10):868-869
- [13] Vonlaufen A, Phillips PA, Yang L, et al. Isolation of quiescent human pancreatic stellate cells: a promising *in vitro* tool for studies of human pancreatic stellate cell biology [J]. Pancreatology, 2010, 10(4):434-443
- [14] Kruse ML, Hildebrand PB, Timke C, et al. Isolation, long-term culture, and characterization of rat pancreatic fibroblastoid/stellate cells [J]. Pancreas, 2001, 23(1):49-54

[收稿日期] 2015-02-27

## 科技出版物中数字的用法

1. 凡是可以用阿拉伯数字且很得体的地方, 均应使用阿拉伯数字。
2. 日期和时刻的表示。需注意年份不能简写, 如 1997 年不能写成 97 年。
3. 计量或计数单位前的数字应采用阿拉伯数字; 多位阿拉伯数字不能拆开转行; 小数点前或后超过 4 位数 (含 4 位) 的应从小数点起向左或向右每 3 位空出适当间隙, 不用千分撇“,”; 数值的有效数字应全部写出, 如“1.50、1.75、2.00”, 不能写成“1.5、1.75、2”。
4. 参数与偏差范围的表示:
  - (1) 数值范围: 5~10; 注意  $3 \times 10^3 \sim 8 \times 10^3$ , 不能写成  $3 \sim 8 \times 10^3$ ;
  - (2) 百分数范围: 20%~30%, 不能写成 20~30%;
  - (3) 具有相同单位的量值范围: 1.5~3.6 mA 不必写成 1.5 mA~3.6 mA;
  - (4) 偏差范围:  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$  不写成  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $(85 \pm 2)\%$  不能写成  $85 \pm 2\%$ ;
5. 附带尺寸单位的量值相乘写为: 50 cm×80 cm×100 cm, 不能写成 50×80×100 cm, 或 50×80×100 cm<sup>3</sup>。

(本刊编辑: 接雅俐)