

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+胶原酶循环灌注法,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^[2,3],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^[5,7],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

* 基金项目:江苏省自然科学基金项目(BK2011094)

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)

链酶蛋白酶(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 Wisentinc 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 原位灌注 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 1 cm 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 50 mL 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 50 mL 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 目筛网过滤,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 ml DMEM 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

间可见一层乳白色细胞沉淀,收集该细胞沉淀,加入 3 ml DMEM 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 1×10^6 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 μ L 与 0.4 % 的台盼蓝溶液按照 1:1 比例混匀,取 10 μ L 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 $\times$ 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 一抗 1:100、Alexa Fluor 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 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ 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
Table 1 Comparison of the numbers, viability and purity of cells in three methods

Groups	Cell numbers(× 10 ⁷)	Cell viability(%)	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注 + 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, PN+CC: non-circulatory pronase + circulatory collagenase perfusion; CC: single collagenase perfusion.

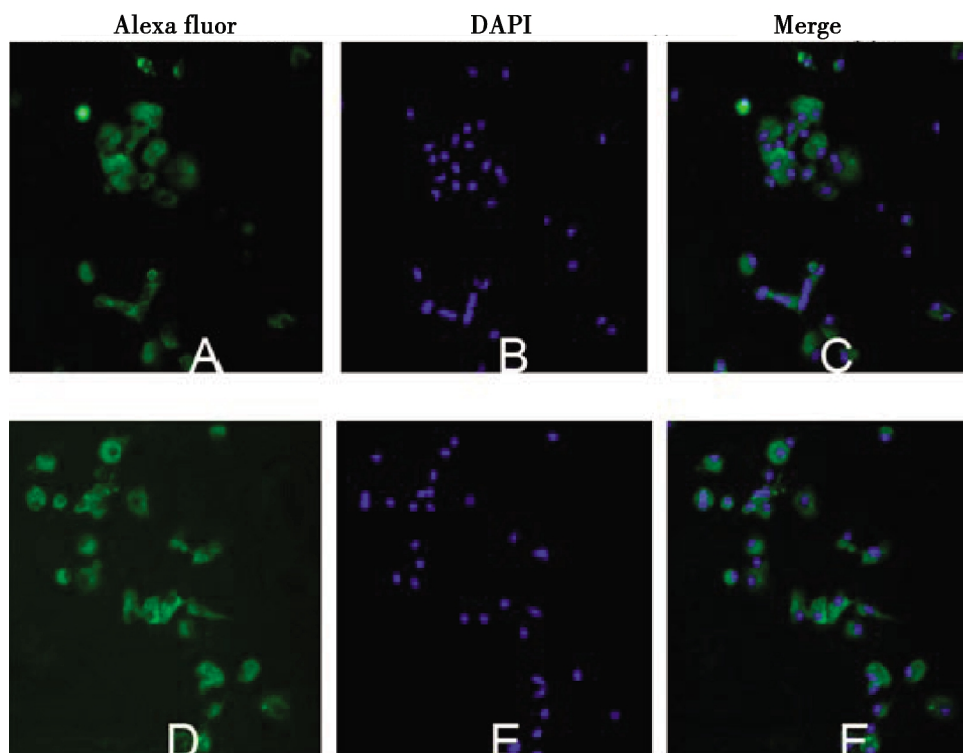


图 1 培养 24 h 细胞免疫荧光

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^[8]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 Percoll[®],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^[10]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。

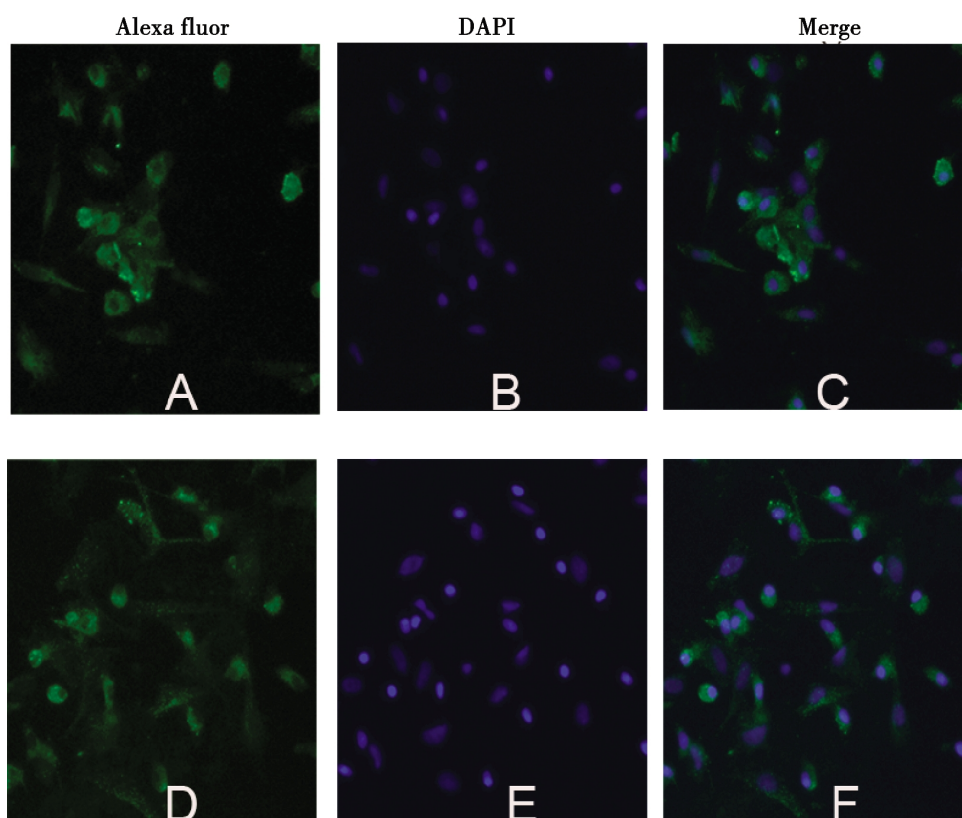


图2 培养7 d 细胞免疫荧光

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×)

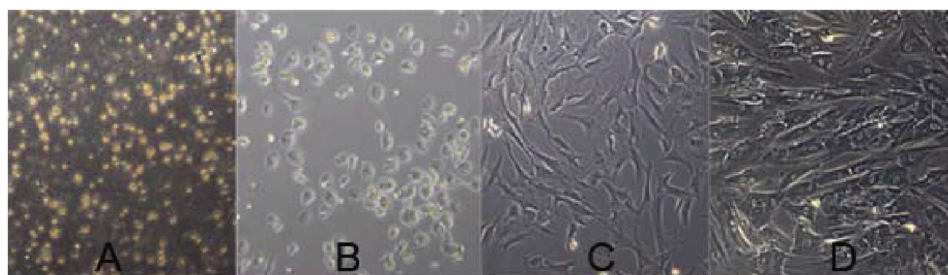


图3 分离HSC的形态学变化

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×)

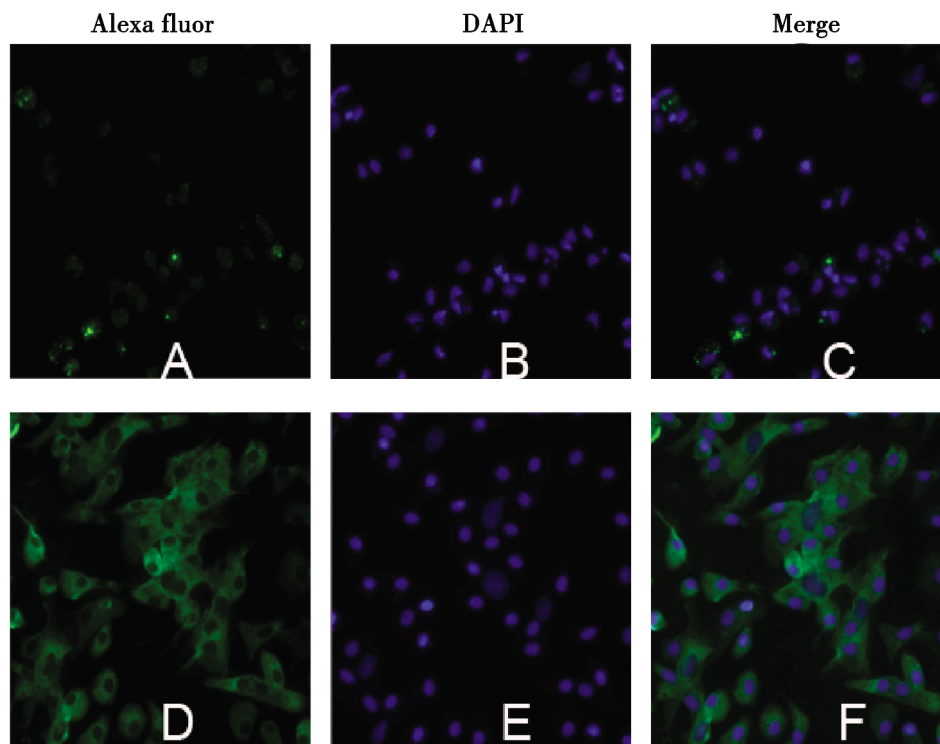
A. Cells cultured for 0 hour(200×), B. Cells cultured for 24 hour(200×), C. Cells cultured for the 7 days(200×), D. Cells cultured for 2 weeks(200×)

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

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)

- [1] 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 SDF1 α /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 identifying 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. 原位循环灌注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 and vimentin 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 graft-versus-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 ahead 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, Gullledge 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