

- inflammatory cytokines across the placenta[J]. *Obstet Gynecol*, 2004, 103(3):546-550.
- [13] Osman I, Young A, Ledingham MA, et al. Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during Labour at term[J]. *Mol Hum Reprod*, 2003, 9(1):41-45.
- [14] Sakai M, Sasaki Y, Yoneda S, et al. Elevated interleukin-8 in cervical mucus as an indicator for treatment to prevent premature birth and preterm, pre-labor rupture of membranes; a prospective study[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2004, 51(3):220-225.
- [15] Marvin KW, Keelan JA, Eykholt RL, et al. Use of cDNA arrays to generate differential expression profiles for inflammatory genes in human gestational membranes delivered at term and preterm[J]. *Mol Hum Reprod*, 2002, 8(4):399-408.
- [16] Athayde N, Romero R, Maymon E, et al. Interleukin 16 in pregnancy, parturition, rupture of fetal membranes, and microbial invasion of the amniotic cavity[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2000, 182(1Pt 1):135-141.
- [17] Hsu TY, Lin H, Lan KC, et al. High interleukin-16 concentrations in the early second trimester amniotic fluid: an independent predictive marker for preterm birth [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2013, 26(3):285-289.
- [18] D'Acquisto F, Maione F, Pederzoli-Ribeil M. From IL-15 to IL-33; the never-ending list of new players in inflammation. Is it time to forget the humble aspirin and move ahead? [J]. *Biochemical Pharmacol*, 2010, 79(4):525-534.
- [19] Dubicke A, Fransson E, Centini GA, et al. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in human preterm and term cervical ripening[J]. *J Reprod Immunol*, 2010, 84(2):176-185.
- [20] Chatterjee P, Chiasson VL, Bounds KR, et al. Regulation of the anti-inflammatory cytokines interleukin-4 and interleukin-10 during pregnancy[J]. *Front Immunol*, 2014, 5:253.
- [21] Dudley DJ, Hunter C, Varner MW, et al. Elevation of amniotic fluid interleukin-4 concentrations in women with preterm labor and chorioamnionitis[J]. *Am J Perinatol*, 1996, 13(7):443-447.
- [22] Hutchins AP, Diez D, Miranda-Saavedra D. The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges[J]. *Brief Funct Genomics*, 2013, 12(6):489-498.
- [23] Terrone DA, Rinehart BK, Granger JP, et al. Interleukin-10 administration and bacterial endotoxin-induced preterm birth in a rat model[J]. *Obstet Gynecol*, 2001, 98(3):476-480.
- [24] Sadowsky DW, Novy MJ, Witkin SS, et al. Dexamethasone or interleukin-10 blocks interleukin-1beta-induced uterine contractions in pregnant rhesus monkeys[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2003, 188(1):252-263.
- [25] Gotsch F, Romero R, Kusanovic JP, et al. The anti-inflammatory limb of the immune response in preterm labor, intra-amniotic infection/inflammation, and spontaneous parturition at term; a role for interleukin-10 [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2008, 21(8):529-547.

(收稿日期:2015-05-15 修回日期:2015-07-06)

• 综述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.34.038

## 小鼠肝脏细胞分离和原代培养技术研究进展\*

杨东<sup>1</sup>综述,刘鑫<sup>2</sup>,郑新川<sup>2</sup>,郑江<sup>2△</sup>审校

(1. 解放军第 163 医院检验科,湖南长沙 410003; 2. 第三军医大学西南医院综合实验中心,重庆 400038)

[关键词] 肝细胞;细胞分离;原代培养

[中图分类号] R-1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)34-4851-04

肝脏是机体主要的消化、代谢器官,同时也是重要的免疫器官;获得肝脏细胞[肝细胞(hepatocytes, HCs)、肝窦内皮细胞(liver sinusoidal endothelial cells, LSECs)、肝星形细胞(hepatic stellate cells, HSCs)和枯否细胞(kupffer cells, KCs)等]并进行成功的原代培养,将有助于为研究肝脏的生物学特性(药物代谢、免疫及生理功能等)和“人工肝”工程等提供实验工具和材料;故探索和研究肝脏细胞的分离和原代培养技术具有重要意义。1976年,Seglen首次建立完整的大鼠肝脏原位2步酶灌洗消化技术,而据其方法改良产生了小鼠肝脏细胞的分

离和培养技术,并随着分子生物学技术和实验动物学技术的进步,也取得了较大的进展。

小鼠肝脏细胞的分离和原代培养技术主要包括:小鼠肝脏的原位灌洗分离和各型单个细胞制备、肝脏细胞的鉴定和活性测定、各型细胞的培养等,主要涉及肝脏2步灌洗技术、机械消化、酶消化、密度梯度离心、结合荧光抗体标记的流式细胞仪分选、免疫磁珠法、原代细胞培养等技术。

### 1 小鼠肝脏的原位灌洗分离和各型单个细胞悬液的制备

肝脏的原位灌洗分离技术:大量有活力的肝脏单细胞悬液

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81372089)。 作者简介:杨东(1977—),主管技师,在读博士,主从事脓毒症拮抗策略研究。

△ 通讯作者, Tel: (023)68765468; E-mail: zhengj99219@gmail.com。

的获得是原代细胞培养成功的重要保证。1967 年,霍华德等首次从小鼠肝脏成功分离出存活的 HCs。随着研究的深入,肝脏原位 2 步灌洗分离和细胞悬液制备方法逐步形成。肝脏原位灌洗通常在小鼠麻醉或脱颈处死后进行,主要分为 2 步,第 1 步采用无钙、镁离子的平衡盐溶液(如 D-Hank's 平衡溶液、KRB 平衡溶液或 PBS 缓冲溶液等)灌洗,以清除掉肝脏血管内的细胞成分,并去除钙离子依赖性的细胞间连接;第 2 步采用含钙和胶原酶的平衡盐溶液灌洗,最大程度去除细胞外基质的连接(以观察到肝脏完全变为土黄色,轻触有明显压痕为准)<sup>[1-2]</sup>。

目前,按灌洗液流经方向,原位灌洗主要分为以下 3 种方式:经典方式是环形结扎肝前上腔静脉,将灌流液由肝门静脉注入,由肝后腔静脉流出(流经方式同小鼠血流方向)。随着研究的深入,又发展出了另外 2 种灌流方案:(1)先环形结扎肝后腔静脉,然后快速切开小鼠心包,插入导管经右心房直达下腔静脉,灌流液从心脏下腔静脉流入,由肝门静脉流出。(2)采用逆向灌流法,先环形结扎肝前上腔静脉,导管插入肝后腔静脉,灌流的同时切开肝门静脉,灌流液流经方向为肝后腔静脉流入,肝门静脉流出<sup>[1-3]</sup>。

各型单个细胞悬液的制备技术:目前,多采用机械解离、酶消化、密度梯度离心、流式细胞仪分离技术和免疫磁珠法相结合的方案<sup>[1,3-4]</sup>。经原位灌洗的肝脏完整剥离置于含胶原酶的细胞培养基中,机械法剪切为小颗粒组织;培养基中可加入脱氧核糖核酸酶,消化细胞释放出的 DNA 成分,防止细胞聚团;剪切后组织消化后经 100 目、100  $\mu\text{m}$  和 70  $\mu\text{m}$  细胞滤器超滤,得到单细胞悬液。基于配体结合原理,有研究者<sup>[3,5]</sup>对一种广泛存在于 HCs 表面的受体唾液酸糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor, ASGPR)的配体进行生物素化荧光标记,然后结合流式细胞术,快速得到产率高、活力好的 HCs;同样,采用流式细胞仪分选的方法也可以获得纯化的 HSCs、KCs 和 LSECs。由于激光照射会对细胞造成损伤,分离过程容易污染,故该方法更适宜于即分即用的情况。由于 HSCs 与 KCs 密度接近,用密度梯度离心常不容易把它们分开;Chang 等<sup>[4]</sup>采用了小鼠术前注射静脉脂质体包被的二氯亚甲基二磷酸盐(CL2MDP),大量消除肝脏内的 KCs 的方法,经常规灌洗、分离和梯度离心后 HSCs 的产率和纯度有较大改善,且细胞生存率不受影响。

上述方法仅可获得部分细胞亚型,如何一次性分离得到小鼠肝脏的几种主要的细胞(HCs、HSCs、LSECs 和 KCs),而又不对所得细胞的活力产生较大影响呢?Liu 等<sup>[1]</sup>在研究中引入一种由改良的小鼠肝原位灌洗分离、密度梯度离心与磁珠免疫分离相结合的方法。通过原位灌洗分离结合密度梯度离心分离得到 HCs 和 HSCs,然后分别采用 LSECs 和 KCs 表面标志物 CD146 和 F4/80 相应抗体标记的免疫磁珠法进行分离,得到高纯度和活力的 LSECs[纯度(91.7 $\pm$ 2.1)%],活率(94.3 $\pm$ 2.1)%和 KCs[纯度(98.3 $\pm$ 1.2)%],活率(94.0 $\pm$ 2.3)%]。

## 2 小鼠肝脏细胞的鉴定与活力测定技术

肝脏细胞类型的鉴别一般依赖观察培养中的细胞形态,生物学特性及检测细胞膜标志物等方法进行;而细胞的活率测定一般采用台盼蓝排除实验。根据细胞形态鉴定:HCs 体积远大于其他几类细胞,初分离时为立方体样形态,可因后续培养方式的不同呈不同形态变化;在 2 d 培养模式,数天后,呈多边形或不规则形。HSCs 经分离后其形态在倒置显微镜下呈球

形,折光性强,24 h 内处于静止状态,可见细胞质内闪光脂滴,培养 5 d 后,细胞由静止状态进入增殖活化状态,呈现星形样伪足,胞质内脂滴浓度逐渐减少,培养 14 d 后,细胞完成活化,胞质内不见脂滴,转化为成纤维样细胞<sup>[4]</sup>。而 KCs 细胞分离培养后 1~2 h 在培养基贴壁生长。LSECs 在加入促血管内皮细胞生长因子的胶原蛋白预包被培养基中培养则会出现贴壁生长和细胞间的融合。

根据细胞生物学活性和免疫学特征鉴定:成熟巨噬细胞膜可表达独特的表面抗原 F4/80,可用于 KCs 的鉴别及纯度检测<sup>[6-8]</sup>。此外,ED2 抗体是 KCs 的特异抗体。利用 KCs 的吞噬碳颗粒特性,观察计算培养基内吞噬有碳颗粒的细胞数也可判断 KCs 产率。富集维生素 A 的 HSCs 具有吞噬凋亡小体的能力,但不能如 KCs 一样吞噬碳颗粒,故据其细胞特性可对 HSCs 采用染色方法,如高尔基银染色和脂肪染色等进行区别<sup>[4]</sup>。LSECs 可用 CD31 抗体<sup>[9]</sup>进行标记并区分。同时 LSECs 同血管内皮细胞一样都具有摄取乙酰低密度脂蛋白(acetylated-low density lipoprotein, DiI-Ac-LDL)和体外培养形成血管的能力。在培养基中加入荧光标记的 DiI-Ac-LDL,并经荧光显微镜观察计数摄取 DiI-Ac-LDL 的细胞数可对分离所得 LSECs 产率进行判断<sup>[10]</sup>。

## 3 小鼠肝脏细胞的培养困境及技术发展

HCs 培养一直被认为是肝脏原代细胞培养中的难点。研究发现,经深入酶灌洗后 HCs 脱离了细胞外基质的作用并成为单细胞悬液,自发的细胞凋亡<sup>[11-12]</sup>就开始加速;“失巢凋亡”现象被认为在 HCs 的凋亡过程中发挥重要作用<sup>[2]</sup>;同时,HCs 在培养过程中的细胞去分化现象也是自发和渐进的过程<sup>[13]</sup>。为提高分离细胞在培养中的存活率、降低凋亡率和细胞去分化速度,分离过程控制、培养基成分及培养方案、细胞外基质作用替代方案等成为了细胞培养过程中必须考虑的因素。

**3.1 HCs 的培养基及主要辅助成分** HCs 培养基有:DMEM 培养基(dulbecco's modified eagle's medium),L-15 培养基(lei-bovitz L-15 medium),MEM 培养基(minimum essential medium),WE 培养基(william's medium E)和 KSFM 培养基(keratinocyte-stimulating factor medium)<sup>[14]</sup>。其中 L-15 由 Kojima 最早于 1995 年提出;不含血清的 WE 培养基被认为是短期培养(小于 10 d)的较理想的培养基,可较好地保持 HCs 的活性,而含血清的 WE 培养基可被用于数周时间内的 HCs 培养<sup>[5]</sup>。含有脑下垂体腺提取物和表皮生长因子的 KSFM,被认为可通过阻止肝富集转录因子的丧失来较长时间保持肝细胞的特异基因表达和功能<sup>[15]</sup>。

培养 HCs 有时还需要在培养基中加入一些有利于保持 HCs 表型的辅助成分。如表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)、HCs 生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)和尼克酰胺,可以保留 HCs 在不同的体外培养基中的增生能力。微量金属离子成分,如铁、铜、锌、锰离子等和微摩级浓度的人工合成糖皮质激素(如地塞米松)、胰岛素、氨基酸、分化因子和胎牛血清等可保持 HCs 在培养期间更好的分化特性。此外,为提高培养 HCs 的存活率和促进生长,在细胞外基质中也常加入胶原蛋白、成纤维细胞和胶原蛋白/人工基底膜结合物成分作为培养支持物<sup>[2,14,16]</sup>。

## 3.2 HCs 的培养技术<sup>[2,5,13,16-20]</sup>

**3.2.1 2D 培养技术** 2D 培养技术是一种短期的 HCs 培养技术,方法为将 HCs 直接接种于单层胶原蛋白包被的培养基上。在这种条件下培养,HCs 可以分泌出清蛋白和尿素,但却

只能展示出极少量的细胞色素 P450 活性,而这种培养方式只能维持短期的培养,第 1 周 HC<sub>s</sub> 就会很快失去一些特殊的生物学功能。

### 3.2.2 3D 培养技术

**3.2.2.1 三明治夹心法** 1989 年,Dunn 等提出了三明治夹心法培养 HC<sub>s</sub> 的技术。方法为:细胞接种于胶原蛋白层之间,培养形成广泛的微管网络结构,并可保证局部的 Ntcp 表达循环和维持 5 d 时间的转运活力。在鼠 HC<sub>s</sub> 三明治夹心法培养模型中,HC<sub>s</sub> 的立方体形态可保持达 42 d,分离培养 1 周内主要的酶和复合物活性仍保持较好,可见细胞间形成 E-钙黏蛋白和胆小管,但不表达表皮细胞受体,如 EGF-R 和 LDL-R。

**3.2.2.2 人工基底膜构建的球状 HC<sub>s</sub> 培养支持物** 将 HC<sub>s</sub> 接种在人工基底膜构建的球状 HC<sub>s</sub> 培养支持物,其形成的 HC<sub>s</sub> 形态为球形,并非肝组织中 HC<sub>s</sub> 的立方体形。培养中,主要的酶和复合物活性在分离培养 1 周内仍保持较好,HC<sub>s</sub> 表达 E-钙黏蛋白,并形成广泛的胆小管,细胞间接触面的内皮细胞表面标志物得到了保留。

**3.2.2.3 同 LSECs 的共培养技术** HC<sub>s</sub> 同 LSECs 一起培养,可保留 HC<sub>s</sub> 大部分的极性标志物,并在 HC<sub>s</sub> 与 LSECs 接触面之间表达高水平的内皮细胞受体,如 EGF-R 和 LDL-R,并可因部分的细胞接触,HC<sub>s</sub> 生长受到生成因子的介导。

**3.2.2.4 同 3T3 纤维原细胞的共培养技术** Bhatia 等提出了将 HC<sub>s</sub> 同 3T3-J2 鼠纤维原细胞的一起培养的技术,培养中观察到可形成独特的细胞集落,细胞间的接触表现为连接蛋白-32 和胆小管,但不表达 EGF-R 和 LDL-R。

**3.3 流体培养技术** 流体培养技术是基于模仿体内 HC<sub>s</sub> 生长环境而构建的一种培养技术。激素、营养及氧成梯度通过漂浮的生物反应器,并被培养中的细胞摄取;这种梯度可使培养细胞呈现新陈代谢的成带现象,同时可加速物质的传输速度,观察到更高的药物代谢水平。

**3.4 接种密度与氧供** HC<sub>s</sub> 氧代谢旺盛,而培养中 HC<sub>s</sub> 的活力和耗氧量跟氧供水平及细胞外基质有关。Lorenna 等研究发现,小鼠 HC<sub>s</sub> 在补充了人工基底膜作为细胞外基质的培养基中培养时,接种细胞密度、氧供水平、培养基深度等因素都会影响培养细胞表面的氧浓度,而人工基底膜结合氧浓度调节可较好维持培养 HC<sub>s</sub> 产生清蛋白的水平和功能。

**3.5 LSECs、KC<sub>s</sub> 和 HSC<sub>s</sub> 的培养** LSECs 在肝脏脂代谢、细胞分化、免疫、炎性等反应中发挥重要作用。其培养可使用 EGM2mv 培养基,也可加入 5 ng/mL 的 VEGF 后与 HC<sub>s</sub> 共培养<sup>[5]</sup>。KC<sub>s</sub> 被认为是定植于肝脏的吞噬细胞。在培养中,KC<sub>s</sub> 不易快速活化、增殖;对 KC<sub>s</sub> 的培养可用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基进行<sup>[21]</sup>。HSC<sub>s</sub> 是主要的肝脏基质细胞,在肝的再生、分化和炎性反应中发挥重要作用。培养中的 HSC<sub>s</sub> 可快速活化并增殖,可使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基进行培养<sup>[21-22]</sup>。

## 4 无菌培养控制和提高细胞收益的方案

**4.1 无菌控制** 为保证获得没有细菌污染的初分离细胞悬液,肝脏的原位 2 步酶灌洗应该在可控温的无菌安全柜中进行。采用的灌洗用具,如泵管、18 G 或 22 G 针头、灌洗缓冲液等都应当无菌。获取细胞在首次培养的培养基中还可加入一定浓度的抗菌素,如(100 units 青霉素+100 μg 链霉素)/mL 等<sup>[5]</sup>。

**4.2 收益提高** 首先,肝脏的原位灌洗应做好时间的统筹安排。由于 HC<sub>s</sub> 有氧化代谢旺盛,为降低手术中 HC<sub>s</sub> 氧化代谢水

平,肝脏原位灌洗手术可采用将手术平板置于冰水混合物上进行。实验使用的灌洗缓冲液及酶消化液应提前预温到 37 °C,而细胞离心时应控制在 4 °C。其次,由于钙离子在灌洗过程中起双重作用,对钙离子控制是肝脏原位灌洗阶段应该被重视的环节。因此,2 步法所用的缓冲液不可混用;胶原酶的浓度和活性直接关系到 HC<sub>s</sub> 的分离效率,也应进行相应控制。再次,灌注液 pH 应控制在 7.4,因此,需采用较强的缓冲体系如添加有机缓冲物羟乙基哌嗪乙硫磺酸[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid, HEPES]等方法。此外,灌流速度、合适的密度梯度离心液和离心速度等也是应特别注意的因素。

## 5 展 望

小鼠肝脏细胞分离及培养技术的建立和发展为人类快速、有效获取肝脏细胞作为研究对象提供了可能;特别是建立和完善 HC<sub>s</sub> 的可靠、长期培养技术将为人类人工生物肝脏研究和临床应用提供参考技术,具有重要意义。

## 参考文献

- [1] 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.
- [2] Vinken M, Maes M, Oliveira AG, et al. Primary hepatocytes and their cultures in liver apoptosis research[J]. *Arch Toxicol*, 2014, 88(2): 199-212.
- [3] Severgnini M, Sherman J, Sehgal A, et al. A rapid two-step method for isolation of functional primary mouse hepatocytes: cell characterization and asialoglycoprotein receptor based assay development[J]. *Cytotechnology*, 2012, 64(2): 187-195.
- [4] 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.
- [5] Shulman M, Nahmias Y. Long-term culture and coculture of primary rat and human hepatocytes[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 945: 287-302.
- [6] Kinoshita M, Uchida T, Sato A, et al. Characterization of two F4/80-positive Kupffer cell subsets by their function and phenotype in mice[J]. *J Hepatol*, 2010, 53(5): 903-910.
- [7] Kitani H, Takenouchi T, Sato M, et al. A simple and efficient method to isolate macrophages from mixed primary cultures of adult liver cells[J]. *J Vis Exp*, 2011(51), e3449.
- [8] Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease[J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 445-455.
- [9] Ma L, Cheung KC, Kishore M, et al. CD31 exhibits multiple roles in regulating T lymphocyte trafficking in vivo[J]. *J Immunol*, 2012, 189(8): 4104-4111.
- [10] 赵秀华, 罗彬, 罗盘, 等. 小鼠肝脏窦状内皮细胞分离和培养的一种新方法[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2010, 30(1): 1-7.
- [11] Schmich K, Schlatter R, Corazza N, et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$  sensitizes primary murine hepatocytes to Fas/CD95-induced apoptosis in a Bim- and Bid-dependent

- manner[J]. *Hepatology*, 2011, 53(1):282-292.
- [12] Hohenester S, Gates A, Wimmer R, et al. Phosphatidylinositol-3-kinase p110 $\gamma$  contributes to bile salt-induced apoptosis in primary rat hepatocytes and human hepatoma cells[J]. *J Hepatol*, 2010, 53(5):918-926.
- [13] Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, et al. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME [J]. *Arch Toxicol*, 2013, 87(8):1315-1530.
- [14] Li WC, Ralphs KL, Tosh D. Isolation and culture of adult mouse hepatocytes[J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 633:185-196.
- [15] Li WC, Ralphs KL, Slack JM, et al. Keratinocyte serum-free medium maintains long-term liver gene expression and function in cultured rat hepatocytes by preventing the loss of liver-enriched transcription factors[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(3):541-554.
- [16] Buck LD, Inman SW, Rusyn I, et al. Co-regulation of primary mouse hepatocyte viability and function by oxygen and matrix[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2014, 111(5):1018-1027.
- [17] Streeter I, Cheema U. Oxygen consumption rate of cells in
- 综 述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.34.039
- 3D culture: The use of experiment and simulation to measure kinetic parameters and optimise culture conditions[J]. *Analyst*, 2011, 136(19):4013-4019.
- [18] Miszczuk GS, Barosso IR, Zucchetti AE, et al. Sandwich-cultured rat hepatocytes as an in vitro model to study canalicular transport alterations in cholestasis [J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(6):979-990.
- [19] Noel G, Le Vee M, Moreau A, et al. Functional expression and regulation of drug transporters in monolayer- and sandwich-cultured mouse hepatocytes [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 49(1):39-50.
- [20] Swift B, Brouwer KL. Influence of seeding density and extracellular matrix on bile acid transport and mrp4 expression in sandwich-cultured mouse hepatocytes [J]. *Mol Pharm*, 2010, 7(2):491-500.
- [21] Li PZ, Li JZ, Li M, et al. An efficient method to isolate and culture mouse Kupffer cells[J]. *Immunol Lett*, 2014, 158(1/2):52-56.
- [22] Wilson CL, Mann J, Walsh M, et al. Quiescent hepatic stellate cells functionally contribute to the hepatic innate immune response via TLR3[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1):e83391.

(收稿日期:2015-05-08 修回日期:2015-07-05)

## 急性周围神经损伤模型建立方法研究进展\*

程兴龙, 王培综述, 孙勃, 高云峰, 刘士波, 何新泽, 于昌玉<sup>△</sup>审校  
(承德医学院附属医院手足外科, 河北承德 067000)

[关键词] 模型, 动物; 急性周围神经损伤; 综述

[中图分类号] R745

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)34-4854-04

急性周围神经损伤是个古老而又棘手的医学难题, 各种损伤因素导致突发周围神经结构及功能不同程度的损伤, 引起肢体运动、感觉及温度调节等功能障碍, 病残率极高。随着社会的发展, 发病率逐年上升, 给社会及家庭带来了沉重的负担, 一直是医学界研究的热门课题。众多学者一直在为推动该病的研究、寻求更好的治疗方案努力, 促使急性周围神经损伤模型及损伤修复研究在不断地发展和前进。

通常急性周围神经损伤模型采用兔或大鼠坐骨神经制作, 建立的急性周围神经损伤模型有一个多世纪之久, 复制损伤机制提供确切的神经病理损伤类型<sup>[1]</sup>。早在第二次世界大战时期 Seddon 根据他观察数百创伤病例, 进行的神经损伤三元分类, 即神经失用、轴突断裂及神经断裂, 这种分类法一直沿用至 20 世纪 70 年代。1968 年 Sunderland 对 Seddon 基础上补充至五度, 主要将轴突裂细化分为三型, 根据病理组织学而非伤害的程度, 以电生理和临床再生结果指导是否有手术干预的可能性。1988 年, Mackinnon 和 Del-LON 提出第六度, 有区别于神

经组织结构损伤的前五度伤害, 引起神经干断裂损伤的混合性损伤综合征<sup>[1]</sup>; 神经的恢复基于传统组织学、电生理学、行为学理论判定。对于传统的功能评定, Lee 等<sup>[2]</sup>学者认为, 既往多采用的神经电生理、组织病理学、坐骨神经指数等检查并不能完全反映神经功能的恢复, 在测定功能恢复评价上, 踝趾运动角及肌肉等长收缩力测定比坐骨神经指数更具有优势。随着后人研究的不断完善和深入, 各种急性周围神经模型的建立推动着神经损伤修复理论不断健全, 现将常用的急性周围神经损伤动物模型综述如下。

### 1 横断伤法

历史观点认为神经横断法的使用可追溯到 20 世纪初, Santiago Ramón y Cajal 在他 1906 诺贝尔奖的获奖感言中描述<sup>[1]</sup>。1974 年 Wall 和 Gutnick 采用横断损伤法制作了早期的动物模型, 暴露兔一侧腓总神经并直视下锐性切断, 后采用外膜缝合或神经移植修复, 设置挤压损伤及假手术对照组, 术后连续行组织病理学观察, 记录再生有髓神经纤维直径、形态及

\* 基金项目: 河北省科技计划基金资助项目(142777105D)。 作者简介: 程兴龙(1988—), 在读硕士, 主要从事骨科学临床及基础研究。

<sup>△</sup> 通讯作者, Tel: 15633142808; E-mail: cdguwp@sina.com。