

摘要

肝臟星狀細胞位於肝細胞與血竇內皮細胞間之 space of Disse 中，具有相當多的生物功能，如分泌細胞外基質 (extracellular matrix) 及儲存維他命 A 等。過去已知肝臟星狀細胞之活化與肝硬化有密切的關係，近來又發現肝臟星狀細胞可以分泌多種與免疫功能相關的細胞激素 (cytokine)，如第一介白質 (interleukin-1, IL-1)、第六介白質、(interleukin-6, IL-6)、第八介白質 (interleukin-8, IL-8)、第十介白質 (interleukin-10, IL-10)、第一單核細胞趨化蛋白 (monocyte chemoattractive protein 1, MCP-1) 及 β 轉形生長因子 (transforming growth factor β , TGF- β) 等。而上述由肝臟星狀細胞分泌的細胞激素中，許多都具有免疫抑制的功能。所以本論文的目的在於探討肝臟星狀細胞是否會因分泌的媒介物而抑制 T 細胞的反應。目前我利用肝臟灌注及 Nycodenz 梯度離心法，自小鼠的肝臟分離出星狀細胞，每隻 C57BL/6 小鼠約可獲得 2×10^6 肝臟星狀細胞。經培養後它們呈現典型的星狀形態，並且在紫外光的激發下，可見內含之維他命 A 發出藍紫色螢光。利用免疫螢光染色法，也證實這些細胞表現肝臟星狀細胞的特定分子 - 神經膠原纖維酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP)。其次，利用反轉錄後的 cDNA 進行即時聚合酶連鎖反應 (real-time PCR)，測得肝臟星狀細胞可表現第一單核細胞趨化蛋白 (MCP-1) 及第十介白質 (IL-10) 的 mRNA。接著利用 ELISA 的方法，也可確定肝臟星狀細胞會分泌第一單核細胞趨化蛋白、第十介白質以及 β 轉形生長因子。最後則利用混合淋巴細胞反應 (mixed lymphocyte reaction, MLR) 的方法測試肝臟星狀細胞的免疫抑制性質；在此方法中，BALB/c 與 C57BL/6 兩種小鼠的淋巴細胞共同培養，在試管中模擬異體移植，並測定 T 細胞的活化及增殖。我們發現肝臟星狀細胞對於 T 細胞之增殖有抑制之作用，但其抑制機轉則有待進一步之實驗方得釐清。

Abstract

Hepatic stellate cells (HSCs), which are located in the space between hepatocytes and the sinusoidal endothelium (the space of Disse), have many important functions, including secretion of extracellular matrix (ECM) and storage of vitamin A. Recently, HSCs have been suggested to participate in immune responses. HSCs secrete various cytokines, such as transforming growth factor β (TGF- β), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), interleukin-10 (IL-10), monocyte chemoattractive protein 1 (MCP-1), *etc.* Many of these cytokines have been reported to be immunosuppressive. Thus, the aim of my thesis was to investigate whether HSCs could modulate T cell responses. I have established a culture system for studying mouse HSCs using liver perfusion and Nycodenz gradient centrifugation. Two millions of HSCs could be obtained from a C57BL/6 mouse liver. The cells showed characteristically star-shaped morphology. Under the excitation of UV light, the retinoids which were stored in the lipid droplets emitted auto-fluorescence in blue-green color. Furthermore, more than 80 % of the cells expressed an HSC-specific molecule, glial fibrillary acidic protein (GFAP) using immunostainings. The mRNAs of IL-10 and MCP-1 were expressed in cultured HSCs using real-time RT-PCR. IL-10, MCP-1 and TGF- β were also detected in the medium of cultured HSC. Finally, the immunosuppressive effect of HSCs was tested using a mixed lymphocyte reaction (MLR) assay *in vitro*. In this assay, lymphocytes from C57BL/6 and BALB/c mice were co-cultured. The presence of HSC suppressed the proliferation of T lymphocytes. However, the mechanism of T cell suppression remains to be studied.

緒論

肝臟為人體內最大的器官，位於腹腔內之右側。肝臟主要由兩條血管供給血液，分別是肝動脈 (hepatic artery) 以及門靜脈 (portal vein)，其中門靜脈將小腸中吸收的物質送入肝臟，因此肝臟在吸收、合成、代謝以及解毒中扮演很重要的角色。當血液流入肝臟後，就會進入血竇 (sinusoid) 中，藉由血竇內皮細胞之間的空隙，血液得以自由進出此空間，有利於和肝臟細胞 (hepatocyte) 進行物質交換與代謝。血竇中，亦存有著肝臟的巨噬細胞，Kupffer 細胞，另外在血竇內皮細胞與肝臟細胞之間的 space of Disse，則是肝臟星狀細胞 (hepatic stellate cell, HSC) 出現的位置。

在 1969 年，Clane 等人先利用恆河猴 (rhesus monkey) 為實驗動物，在肝臟的異體移植的結果中發現其中的一隻動物能夠存活到六個月。之後他們利用豬為實驗動物，進行肝臟、皮膚以及心臟的異體移植實驗。他們發現在皮膚及心臟的移植實驗中，皮膚和心臟都受到排斥，其中心臟的排斥作用甚為劇烈，症狀包含了出血、水腫以及單核細胞之滲入。不過，肝臟的移植實驗中，在未使用免疫抑制藥物的狀況下，肝臟被排斥的現象亦相當輕微，且其功能也與一般無不同，而動物存活的時間都超過 18 週以上，甚至能夠存活至繁衍後代 (Calne *et al.*, 1969)。

而近年在臨床報告中，肝臟移植後，各個年齡層的病人存活率也相當的高。在對一百名有膽道閉鎖 (biliary atresia, BA) 症狀的新生兒和幼童進行肝臟移

植手術後，存活率約 98% (Chen *et al.*, 2006)。另外，在對 35 名患有 B 型肝炎或 C 型肝炎的中年患者（男性平均年齡為 48 歲，女性平均年齡為 54 歲）進行肝臟移植手術後，三年存活率高達 96%，而五年存活率則為 90% (Concejero *et al.*, 2008)。另外一篇報導指出，針對 5,630 位 65 歲以上和 75 歲以上的老年人進行肝臟移植後，發現五年後約有六成的存活率而 65 歲以上的族群之十年存活率也有四成左右 (Kemmer *et al.*, 2008)。

因此，肝臟不需經過配對即可進行移植的特性，其中的機制就受到許多人的研究及討論。有人認為捐贈者中的樹突細胞 (dendritic cell, DC)，在 CTLA4 分子的存在下，會使其共同刺激分子 (costimulatory molecule) 表現受到抑制，導致 T 細胞無法活化而進行細胞凋亡 (Thomson *et al.*, 1999)。另外也有科學家認為肝臟中的 Kupffer 細胞能夠表現一氧化氮 (NO)，使得 T 細胞之活化受到抑制 (Crispe, 2002)。也有人發現肝臟內的第十介白質 (interleukin-10, IL-10)、 β 轉形生長因子 (transforming growth factor β , TGF- β)、以及前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) 等分子都有免疫抑制的功能，最後能抑制 T 細胞的活化 (Lau *et al.*, 2003)。而近年來，許多科學家也發現肝臟中另一種細胞，肝臟星狀細胞，在免疫調節方面，也扮演了一個非常重要的角色。

肝臟星狀細胞最早在 1876 年，由德國科學家 Kupffer 在研究肝臟的神經分布時所發現的。之後，Ito 和 Nemoto 發現肝臟星狀細胞的核周圍具有脂質滴的構造，因此稱此類細胞為脂質儲存細胞 (fat-storing cells)。最後在 1971 年，

Wake 確定了脂質滴裡內含有大量的維他命 A (Winau *et al.*, 2007)。並且在紫外光的激發下，能夠發出藍紫色螢光，此性質後做為鑑定肝臟星狀細胞之用 (Popper *et al.*, 1944)。

肝臟星狀細胞位於肝細胞與血竇內皮細胞之間的 space of Disse 中，會分泌細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 及基質金屬蛋白酵素 (matrix metalloproteinase)，使肝臟內的細胞外基質達到平衡，並維持肝臟的立體結構。不過，當肝臟處於慢性發炎時，例如受到病毒的慢性感染，會使肝臟內的細胞外基質大量累積，造成肝臟的纖維化，甚至演變成肝硬化。而其中的機制包括：(1) 基質金屬蛋白酵素的作用受到抑制、(2) 血小板衍生生長因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 促使肝臟星狀細胞增生、(3) α 腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor α , TNF- α)、 β 轉形生長因子 (transforming growth factor β , TGF- β) 或第一型膠原蛋白 (collagen 1) 抑制肝臟星狀細胞之細胞凋亡及(4) β 轉形生長因子對肝臟星狀細胞之刺激，使膠原蛋白增加。綜合以上因素，肝臟內的細胞外基質不正常的大量累積，最後造成肝臟的病變 (Bataller *et al.*, 2005; George *et al.*, 1999)。

肝臟星狀細胞也具有吸收、儲存和分泌視黃酸 (retinoid acid, RA) 的功能。視黃酸與其受體結合時，形成一轉錄因子，可活化與視覺、生殖、以及表皮分化相關之基因表現 (Kastner *et al.*, 1995)。近期的報導中，則發現視黃酸亦參與一些免疫反應。例如，視黃酸可輔助 CD3 分子所誘發的 T 細胞活化過程中，扮

演一個輔助的角色 (Allende *et al.*, 1997)。視黃酸也會誘導 T 細胞的表面上表現 $\alpha 4 \beta 7$ 以及 CCR9 兩種分子，而這兩種分子可在小腸發炎時，促使特異性 T 細胞移動到發炎組織附近，行使免疫反應 (Kang *et al.*, 2007)。另有報告指出，在小腸組織中，反式視黃酸會增加調節性 T 細胞 (regulatory T cell, Treg) 的數量 (Sun *et al.*, 2007)。再者，在有 β 轉形生長因子的存在之下，視黃酸亦可誘導調節性 T 細胞的產生 (Coomes *et al.*, 2007)。最近的報告中也發現，視黃酸可以藉由抑制第六介白質 (interleukin-6, IL-6) 和第 23 介白質 (interleukin-23, IL-23) 之受器，進而抑制 Th17 細胞之發育生成 (Xiao *et al.*, 2008)。

肝臟星狀細胞會受到多種肝臟中生長因子的調節而活化，例如血小板、內皮細胞、Kupffer 細胞和肝臟細胞所分泌的血小板衍生生長因子、表皮生長因子 (epidermal growth factor, EGF) 或 β 轉形生長因子會使肝臟星狀細胞活化，而活化後的肝臟星狀細胞也會分泌不同的細胞動素 (cytokine)，進而調控其他細胞之功能。肝臟星狀可以分泌 α 轉形生長因子和表皮生長因子，可促使肝臟細胞的增生以及肝臟星狀細胞的分裂。肝臟星狀細胞也會分泌血小板衍生生長因子，繼而以自體分泌的方式刺激自身的增生以及細胞質內視黃酸的釋出。另外，血小板衍生生長因子也會使肝臟星狀細胞具有趨化之現象 (Friedman *et al.*, 2008)。活化的肝臟星狀細胞也會分泌第一單核細胞趨化蛋白 (monocyte chemotactic peptide 1, MCP-1)，具有吸引白血球之功能 (Marra *et al.*, 1993)。而肝臟

星狀細胞分泌的內皮素 (endothelin, ET) 亦可誘導 α 平滑肌動蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMC) 的表現量增加，使得肝臟星狀細胞轉變成具有像平滑肌細胞一樣的收縮性，而這樣的特性也使得在肝臟纖維化過程中造成肝靜脈壓增加。

肝臟星狀細胞在培養過程中或是經過不同物質刺激後，也能表現各式的介白質。在 α 腫瘤壞死因子的刺激下，可以增加 β 第一介白質 (interleukin-1 β , IL-1 β) 及第八介白質 (interleukin-8, IL-8) 的表現，而同時加入體抑素 (somatostatin) 時，則會抑制腫瘤壞死因子所誘導出的結果 (Lang *et al.*, 2005)。另外，在脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS) 的處理之下，會經由和第四類鐸受器 (toll-like receptor-4, TLR-4) 的結合，增加第八介白質的產生 (Paik *et al.*, 2003)。此外，肝臟星狀細胞也能夠表現第二類鐸受器，能夠與革蘭氏陽性菌細胞壁表面的分子，像是肽聚醣 (peptidoglycan) 和脂磷壁酸 (leptoteichoic acid) 結合 (Friedman *et al.*, 2008)。再者，在 CD40 及 CD-40L (ligand) 的結合後，可以促使人類的肝臟星狀細胞表現第八介白質 (Schwabe *et al.*, 2001)。而大鼠的肝臟星狀細胞在含血清的培養基中培養六天後，會表現第六介白質 (interleukin-6, IL-6) (Smart *et al.*, 2001)。活化的肝臟星狀細胞也會產生第十介白質 (interleukin-10, IL-10)。大鼠和小鼠的肝臟星狀細胞在純化後分別培養 4 天或 120 天後，均能表現第十介白質，並且在 α 腫瘤壞死因子、 β 轉形生長因子以及脂多醣的處理之下，可以增進第十介白質的產生

(Thompson *et al.*, 1998)。在另一篇報告中也指出，經過膽管結紮 (bile duct ligation, BDL)處理後的大鼠，從其中分離出來的肝臟星狀細胞，經過培養後，也能夠表現第十介白質 (Mathruin *et al.*, 2002 and Wang *et al.*, 1998)。第十介白質是一種抗發炎的細胞動素。除此之外，第十介白質也可藉由降低第一膠原蛋白的表現，進而產生抗纖維化生成的功能。最後，新鮮分離出的肝臟星狀細胞，在培養過程中可分泌 β 轉形生長因子。而 β 轉形生長因子除了是肝臟星狀細胞活化時所表現的重要細胞動素之一之外，也具有抑制作用 T 細胞 (effector T cell) 以及過敏反應之功能 (Vignali *et al.*, 2008)。

近來的報導中，也發現肝臟星狀細胞具有抗原呈獻細胞的功能 (antigen-Presenting cell, APC)。首先，肝臟星狀細胞可表現 CD1d 分子，並且在試管以及在活體的實驗中都證實，肝臟星狀細胞能夠呈獻抗原並且活化自然殺手 T 細胞 (natural killer cell, NKT)。再者，肝臟星狀細胞也會表現第一型 (class I) 以及第二型主要組織相容複合體 (major histocompatibility complex, MHC)，同樣的，在試管以及在活體的實驗中都證明，肝臟星狀細胞能夠呈獻特定的胜肽 (peptide) 給 $CD4^+$ T 細胞以及 $CD8^+$ T 細胞，並且會其活化 (Winau *et al.*, 2006)。相反的，也有報告指出，肝臟星狀細胞對於 T 細胞有免疫抑制之作用。在試管的實驗中，活化的肝臟星狀細胞會表現 B7-H1 分子，會和其表現在 T 細胞上的受器 PD-1 結合，進而導致 T 細胞的細胞凋亡 (Yu *et al.*, 2004)。接著，在活體的實驗中，將肝臟星狀細胞和胰島細胞共同移植進異種的小鼠腎臟中，發

現肝臟星狀細胞能夠保護胰島細胞不被宿主的 T 細胞攻擊，並且發揮原來胰島細胞具有的正常功能，而其中的機制，就是靠著表現於肝臟星狀細胞上表現的 B7-H1 引發 T 細胞的細胞凋亡造成的 (Chen *et al.*, 2006)。而且在最近的一篇報告中，也指出肝臟星狀細胞會藉由 T 細胞所分泌之 γ 干擾素 (interferon- γ , IFN- γ) 所誘導而活化，進而使得肝臟星狀細胞誘導調節性 T 細胞之增加 (Jiang *et al.*, 2008)。

因此，綜合以上前人所做的實驗，可以發現肝臟中的許多細胞都參與和免疫抑制相關的功能，另外也有許多文獻指出肝臟星狀細胞能夠分泌許多的細胞動素以及能夠表現出抑制 T 細胞活化的功能。不過肝臟星狀細胞所分泌的細胞動素是否也和免疫抑制有關，其機制仍不清楚。因此，進一步地了解肝臟星狀細胞，是我有興趣去探討的，希望藉此研究能更深了解肝臟星狀細胞在免疫方面之功能。

材料與方法

小鼠

C57BL/6 小鼠購自於財團法人國家實驗動物中心（台北，台灣）。C57BL/6 小鼠平均週齡為 9 至 12 週。BALB/c 小鼠購自於財團法人國家實驗動物中心（台北，台灣），並由台中榮民總醫院腎臟科陳呈旭醫師提供，平均週齡為 7 至 10 週。

肝臟星狀細胞之分離

C57BL/6 小鼠以 0.7 ml 之 Avertin 麻醉藥 (2,2,2 tribromoethanol, Tert-amyl alcohol, 以生理食鹽水 80 倍稀釋成 working solution) 注射至腹腔，待小鼠昏迷後，解剖開小鼠腹部使肝臟及肝門靜脈曝露其外，將 27G X 1/2” 之蝴蝶針插入肝門靜脈，並使用血管夾固定。利用蠕動幫浦將不含鈣鎂離子之第一儲存溶液(stock solution-1, SC-1[表二])灌流至老鼠肝臟 (30 ml, 共 5 分鐘)，待肝臟膨脹並呈現白色時，將肝靜脈剪開，使溶液和血液流出，接著依序以蛋白酵素溶液 (0.5 mg/ml pronase 溶於第二儲存溶液中(stock solution-2, SC-2[表二]) 和膠原蛋白酵素溶液 (0.25 mg/ml collagenase 溶於 SC-2 溶液中) 灌流 (各 25ml, 共 4 分鐘)，灌流完畢後，移除膽囊並取出肝臟，將肝臟輕輕的均勻磨碎後，加到消化溶液 (digest solution) 中 (0.5 mg/ml pronase, 0.5 mg/ml collagenase, 0.02mg/ml DNase 溶於 SC-2 溶液中)，在

37°C 水浴中反應 20 分鐘。經鐵網過濾至 50ml 離心管中，並用 SC-2 溶液清洗，於 4°C 下，400 x g，離心 10 分鐘，去除上清液，加入 Gey balance salt solution(GBSS，表二)再懸浮細胞，並再以 400 x g，離心 10 分鐘，去除上清液。先將 4 ml 的 17.2% Nycodenz (0.86g Nycodenz 溶於 4.14ml GBSS[Axis-Shield PoC, Oslo, Norway]) 加入 15 ml 離心管中，接著取 4 ml 的 11.5% Nycodenz (0.575g Nycodenz 溶於 4.425ml GBSS) 將前述清洗後的細胞懸浮，輕輕加至 17.2% Nycodenz 的上層，最後在最上層加入 1.5 ml 的 GBSS 溶液，1400 x g 速度下離心 15 分鐘。離心完成後，如圖一所示，在 GBSS 與 11.5% Nycodenz 層中間有一層細胞，此層細胞富含肝臟星狀細胞。

細胞免疫染色

將純化後的肝臟星狀細胞，懸浮於含有 10%胎牛血清的 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)中培養在事先已放入圓形蓋玻片(直徑為 12mm)的 24 孔培養盤中，一個孔洞中約放入 2×10^6 顆細胞，並加入 2ml 之 DMEM。首先，抽出培養液後，風乾玻片 30 分鐘，並使用 PBS 清洗 5 分鐘，重覆 3 次。每一孔洞中加入 0.5%的 Triton X-100 約 1 ml，反應 10 分鐘後，使用 phosphate buffered salin 溶液(PBS) 清洗 5 分鐘，重覆 2 次。以 5% 的脫脂牛奶固定細胞，反應 30 分鐘，並使用 PBS 清洗 2 分鐘。於 4°C 中加入 rabbit anti-gial fibrillary acidic protein 抗體 (Dakocytomation, Glostrup, Denmark)，反應至少 16 小時以上，之後使用 PBS 清洗 5 分鐘，重覆 5 次再加入 FITC 標識的 swine

anti-rabbit immunoglobulins 抗體 (Dakocytomation, Glostrup, Denmark)及 Phalloidin (Sigma Aldrich, USA) ，於黑暗的室溫下反應 1 小時，使用 PBS 清洗 5 分鐘，重覆 5 次。在載玻片上加入約 80 μ l 的 mounting medium (Biomed, CA, USA) ，再將蓋玻片倒蓋至載玻片上，周圍以透明指甲油封住，最後以共軛焦螢光顯微鏡觀察。

RNA 純化、RNA 反轉錄和即時定量聚合酶鏈反應

RNA 純化係以 Genelute™ Mammalian Total RNA Kit (Sigma Aldrich, USA) 所提供之手冊流程操作。首先利用 2-mercaptoethanol (5 μ l 2-ME, 0.5 ml lysis solution) 將 2×10^6 細胞溶解，並將溶解物加至過濾管柱 (filtration column) 中，以 14,000 x g，離心 2 分鐘。將等量的 70% 酒精加入過濾管柱後的懸浮液中，混合均勻後，以 700 μ l 為上限，加至結合管柱 (binding column) 中，以 14,000 x g 離心 15 秒後丟棄上清液。接著加入 500 μ l 的清洗溶液 1 (wash solution 1) 至結合管柱上並以 14,000 x g 離心 15 秒，去除上清液，加入 500 μ l 之清洗溶液 2 並離心 15 後去除上清液，再次加入清洗溶液 2 後，以 14,000 x g 離心 2 分鐘。最後加入 50 μ l 之洗提溶液 (elution solution) 至管柱上，離心 1 分鐘後，即可得到純化的 RNA。

RNA 之反轉錄以 SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, USA) 之操作手冊進行實驗。首先，將 RNA/primer 混

合物 (1 μ l RNA, 1 μ l 10 mM dNTP mix, 1 μ l Oligo(dT), 7 μ l DEPC-H₂O) 於 65°C 中反應 5 分鐘, 接著設定溫度為 4°C, 2 分鐘後加入反應混合物 (2 μ l 10X RT buffer, 4 μ l 25 mM MgCl₂, 2 μ l 0.1 M DTT, 1 μ l RNase inhibitor), 並且於 42°C 下反應 2 分鐘後, 加入反轉錄酶繼續反應 3 分鐘。接著設定 70°C, 反應 15 分鐘。4°C 溫度下 3 分鐘後, 加入 RNase-H, 並於 37°C 下反應 29 分鐘, 冷卻後完成。

即時定量聚合酶鏈反應, 流程參考自 LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche, Mannheim, Germany)。配製好之聚合酶鏈反應混合物 (4 μ l H₂O, 1.2 μ l MgCl₂, 0.5 μ l forward primer, 0.5 μ l reverse primer, 0.9 μ l LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I), 加入至毛細管離心, 接著放入 LightCycler 1.5 Instrument 中進行反應。首先在熱啟動 (hotstart) 中, 設定溫度為 95°C, 時間為 600 秒, 接著進行 45 回合的聚合酶反應, 其中包括變性 (denature): 溫度為 95°C, 時間為 10 秒, 黏合 (annealing): 60°C 下反應 5 秒鐘, 延長 (elongation): 70°C 反應 20 秒鐘, 最後為熔解 (melting), 溫度梯度由 65°C 升至 90°C, 上升速率為每秒 0.1°C。最後產量利用 LightCycler3 Front Screen (Roche, Mannheim, Germany) 軟體定量分析。

酵素連結免疫吸附分析

(Enzyme-Link immunosorbent assay, ELISA)

肝臟星狀細胞分泌之蛋白測定，是利用 Quantikine[®] (R&D System, Minneapolis, USA) 所提供之方法操作。在測定 β 轉形生長因子之前，需先在 100 μ l DMEM 培養液中加入 20 μ l 的 1N 鹽酸(HCl)，混合均勻後，靜置十分鐘後再加入 13 μ l 的 1.2M 氫氧化鈉(NaOH)及 0.5M HEPES 混合液，之後再進行以下流程。首先，依欲測蛋白所需要，準備已在底部覆蓋有專一性抗體之孔盤，在每孔中加入 50 μ l 的 Assay Diluent，接著在每孔中加入標準樣品溶液、控制組樣品、以及培養不同天數的培養液樣品，輕輕混合 1 分鐘後，蓋上膠紙，室溫下作用 2 小時。加入 400 μ l 的清洗溶液清洗 5 次，最後完全移除之，接著在每孔中加入 100 μ l 的 conjugate，蓋上膠紙，室溫下作用 2 小時，並同樣以清洗溶液清洗 5 次。接著在每孔中加入 100 μ l 的受質溶液 (substrate solution, 12.5mL/vial of stabilized hydrogen peroxide and chromogen)，作用 30 分鐘，最後在每個孔中加入 100 μ l 的終止溶液 (stop solution, 23mL/vial of a diluted hydrochloric acid solution)。最後利用 Multiskan Spectrum (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)讀取 450 nm 的波長所得到的數值，並利用標準樣品所讀出的標準曲線，計算出欲測樣品蛋白之濃度。

脾臟之 T 細胞與 B 細胞之分離

將小鼠以 CO₂ 犧牲，取出脾臟後，將脾臟放置於濾網上，輕輕的將脾臟壓碎，同時以 10ml 的 Mishell-Dutton(MD) 培養液 (Minimum Essential Medium [Invitrogen], 50mM Hepes, 0.225% NaHCO₃, 3.9x10⁻⁶ % 2-mercaptoethanol, 1X

penicillin-streptomycin solution[Biological industries], 5% fetal bovine serum)沖洗至 6 公分的培養盤中，移除濾網，重覆沖洗脾臟細胞懸浮液後吸出，最後再以 5ml 的 MD 培養液沖洗濾網和培養盤，一併放入 15ml 離心管，以 400 xg 之速度離心 10 分鐘後，去除上清液，加入 ACK 溶液(155 mM NH₄Cl, 10 mM NaHCO₃, 1 mM EDTA)，使細胞懸浮其中，將紅血球溶解，再以 400 xg 之速度離心 10 分鐘。去除上清液，加入 20ml 之 MD 培養液將沉澱之細胞再懸浮，在兩個十公分培養盤中各加入 10ml，於培養箱中靜置 1 小時後，輕輕將未黏附之細胞懸浮液吸取，即為反應細胞。接著以 10ml 之 MD 培養液沖洗培養盤底部，沖堤下來之細胞則當作抗原呈獻細胞。

T 細胞之二醋酸鹽琥珀酰亞胺酯(Carbofluorescein diacetate, succinimidyl ester, CFSE)標定

欲測定 T 細胞之增殖現象，將上述方法中分離出 T 細胞以 CFSE 標定。取出 0.5 μ l 之 CFSE(Invitrogen, USA)儲存溶液(10mM)加至 37°C 的 10ml 之 PBS 溶液中，使最終濃度達到 1 μ M。視所需之 T 細胞數量，每 1×10^7 顆細胞中，加入 1ml 的 CFSE 溶液。於 37°C 中，在培養箱反應 15 分鐘。作用完後，以 400 xg 之速度，離心 10 分鐘，離心後去除上清液後，加入含有 5% 血清之 MD 培養液即可。

混合淋巴細胞反應 (Mixed Lymphocytes Reaction, MLR)

為了在試管中模擬異體移植之現象，我將以 BALB/c 小鼠之黏附細胞

(adherent cells)為抗原呈獻細胞 (antigen presenting cells, APCs)，並以 C57BL/6 小鼠之懸浮細胞為反應細胞 (respond cells)，在二者的共培養下，觀察反應細胞是否有增殖之現象，另外將加入肝臟星狀細胞之處理，以探討肝臟星狀細胞在此反應中之角色。利用此系統，我分別共培養不同處理之細胞：(1)單獨 C57BL/6 之 T 細胞(1×10^5)，(2) C57BL/6 之 T 細胞(1×10^5)和 BALB/c 之 B 細胞(1×10^4)，(3) C57BL/6 之 T 細胞(1×10^5)和 BALB/c 之 B 細胞(1×10^4)，並加上 C57BL/6 之肝臟星狀細胞(1×10^4)，(4) C57BL/6 之 T 細胞(1×10^5) 加上 C57BL/6 之肝臟星狀細胞(1×10^4)。

統計方法

本實驗中為瞭解不同處理間之差異，利用 SAS 軟體並採用多重比較(multiple comparison)分析，在 95%的信心水準下，所進行的檢定。

結果

肝臟星狀細胞辨識與純度

因肝臟星狀細胞能夠表現神經膠原纖維酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP)，為了能夠確認純化出之細胞為肝臟星狀細胞，我分別取出 Nycodenz 離心後之 A、B、C 三層細胞(圖一)，利用免疫染色法，測定神經膠原纖維酸性蛋白之表現。

圖二 a 顯示 A 層的大部分的細胞表現神經膠原纖維酸性蛋白，我以放大 100 倍的倍率，在載片上選取 10 個不同且不重覆的視野，計算表現神經膠原纖維酸性蛋白的細胞數目，再除以全部細胞數目，得知 A 層細胞表現神經膠原纖維酸性蛋白的比例為 86%。B 層細胞中表現神經膠原纖維酸性蛋白的有 21%(圖二 b)，C 層細胞中，則只有 3%表現神經膠原纖維酸性蛋白。

而從過去的文獻得知，肝臟星狀細胞在紫光外的照射下，可以發出藍紫色螢光 (Friedman SL *et al.*, 1985)，因此我也利用此特性來辨識肝臟星狀細胞。在倒立顯微鏡的觀察下，A 層細胞經紫外光的照射後，的確具有自發性的藍紫色螢光 (圖三 a)，而 B 層以及 C 層細胞在紫外光的照射下，則少有或幾乎沒有自發性的藍紫色螢光 (圖三 b，圖三 c)。

肝臟星狀細胞表現第一單核細胞趨化蛋白及第十介白質之 mRNA

為了測定肝臟星狀細胞內特定 mRNA 之表現，我將 RNA 純化後，將 RNA 反轉錄成 cDNA，最後再利用即時定量聚合酶鏈反應來測定細胞內之 mRNA 含量。在此實

驗中，我分別採用培養在第零天、第二天、第四天及第八天之肝臟星狀細胞。發現從第零天起即表現第一單核細胞趨化蛋白及第十介白質之 mRNA，雖然從圖四 b 上可見從第四天起第十介白質的表現量有上升之現象，不過並沒有統計上之意義。因此在此實驗中，可以得知培養的肝臟星狀細胞從第零天開始，即常態性的表現第一單核細胞趨化蛋白及第十介白質之 mRNA。

肝臟星狀細胞表現第一單核細胞趨化蛋白、第十介白質及 β 轉形生長因子之蛋白

測定肝臟星狀細胞是否分泌特定的蛋白，我將培養的肝臟星狀細胞，在不同的天數，收取其培養液，並利用酵素連結免疫吸附法測定。從第零天開始，每隔兩天收集培養液，一直到第八天，並測定第一單核細胞趨化蛋白、第十介白質以及 β 轉形生長因子之蛋白表現。圖五顯示從第零天到第八天都有第一單核細胞趨化蛋白、第十介白質及 β 轉形生長因子的分泌。在此實驗中，負控制組 (negative control) 為含有 10% 胎牛血清之 DMEM，其中測得的第一單核細胞趨化蛋白、第十介白質及 β 轉形生長因子的濃度分別為 19.07、15.55 及 1.46 pg/ml。

脾臟細胞純度之測定

C57BL/6 小鼠脾臟中分離出細胞，分別以 PE-anti-CD4 及 PE-anti-CD8 或 PE-anti-B220 抗體標示 T 及 B 淋巴細胞，再以流式細胞儀分析。C57BL/6 之懸浮細胞中約有 56% 為 CD4⁺ 或 CD8⁺ 的 T 細胞，而黏附細胞則有 66% 為 B220⁺ 的 B 細胞。而由 BALB/c 小鼠脾臟中得到的黏附細胞有 57% 為 B220⁺ 的 B 細胞(圖六)。

BALB/c 小鼠之 B 細胞可誘導 C57BL/6 小鼠之 T 細胞分裂

將 C57BL/6 小鼠之 T 細胞以 CFSE 標示後，培養於 96 孔洞之培養盤中，每個盤孔培養 1×10^5 個細胞，加入 1×10^4 個 BALB/c 小鼠之 B 細胞，與單獨 C57BL/6 小鼠之 T 細胞之處理作為控制組，並於培養六天後測定 C57BL/6 小鼠之 T 細胞的分裂情況。單獨 C57BL/6 小鼠之 T 細胞之處理，依橫軸約 10^2 往左判定為細胞是分裂的狀態，發現分裂的比例約為 13%(圖七 a)，而與 BALB/c 小鼠之 B 細胞共同培養後，分裂的比例增至 53%(圖七 b)。利多重比較統計，在 95%信心水準下所進行的檢定，C57BL/6 小鼠之 T 細胞加入 BALB/c 小鼠之 B 細胞之處理，其 C57BL/6 小鼠之 T 細胞之分裂比例，顯著高於單獨 C57BL/6 小鼠之 T 細胞之處理(表一)。

C57BL/6 小鼠之肝臟星狀細胞可抑制 BALB/c 小鼠之 B 細胞誘導 C57BL/6 小鼠之 T 細胞分裂現象

如將 C57BL/6 小鼠之 T 細胞以 CFSE 標示後，將 1×10^5 個細胞培養於 96 孔洞之培養盤中，並加入 1×10^4 個 BALB/c 小鼠之 B 細胞及 1×10^4 個 C57BL/6 小鼠之肝臟星狀細胞，並與前述之圖七 a、b 比較。結果發現加入肝臟星狀細胞後，C57BL/6 小鼠之 T 細胞分裂的比例由 53%(圖七 b)降至 22%(圖七 c)。但如僅將 10^4 個 C57BL/6 的肝臟星狀細胞與 C57BL/6 的 T 細胞共同培養，T 細胞分裂比例為 17%(圖七 d)，與控制組相當(圖七 a)，圖七之結果以柱狀圖表示於圖八。另外，從三次實驗所得到之結果，確定肝臟星狀細胞之處理的確具有抑制 T 細胞分裂之能力(圖九)。

討論

肝臟的免疫耐受性，在 1969 年進行動物的異體移植時就被發現(Calne *et al.*, 1969)，而到現今，這樣的特性也應用於臨床的人體肝臟移植，而且從許多的臨床文獻報告中，病患移植肝臟後的存活率都非常的高。因此，異體間進行肝臟移植時，不需經過配對即可成功。其中的機轉一直引起許多科學家的興趣，其中，肝臟內的細胞與外界細胞間的交互作用是研究者主要探討的角度之一。

首先，肝臟的內皮細胞及樹突細胞均可造成 T 細胞的凋亡，而其中樹突細胞所造成的細胞凋亡，可藉由 CTLA4-Ig 分子抑制其共同刺激分子 (costimulatory molecule) 之表現 (Thomson *et al.*, 1999)；再者，也有文獻指出，肝臟中的 Kupffer 細胞能夠表現一氧化氮、第十介白質以及 β 轉形生長因子等，它們都可能抑制 T 細胞活化的分子(Lau *et al.*, 2003)。而在另一篇報導中也闡述了樹突細胞能夠表現 β 轉形生長因子及視黃酸，此兩種分子為誘導調節性 T 細胞產生的重要分子，而調節性 T 細胞的功能，則和抑制 T 細胞的活化有很重要的關係(Lau *et al.*, 2003)。然而，肝臟中另一種細胞，肝臟星狀細胞，其表面分子或是其分泌的各種細胞素也可能影響免疫功能，也是許多科學家想研究瞭解的。

肝臟星狀細胞已知與肝纖維化及肝硬化有密切的關係 (Bataller *et al.*, 2005; George *et al.*, 1999)，除此之外，肝臟星狀細胞在免疫上之角色，也是許多科學家深感興趣的。

肝臟星狀細胞可做為抗原呈獻細胞。肝臟星狀細胞表面可表現 CD1d 分子、第

一型及第二型主要組織相容複合體，進而活化自然殺手細胞、 $CD4^+$ 以及 $CD8^+$ T 細胞(Winawin *et al.*, 2006)。肝臟星狀細胞亦可以吸收、儲存並且分泌視黃酸，而視黃酸可以活化特定之 T 細胞 (Kang *et al.*, 2007)，也能在誘導調節性 T 細胞生成中，扮演一個重要的輔助角色 (Sun *et al.*, 2007)。另外，肝臟星狀細胞也具有抑制 Th17 細胞發育的功能 (Xiao *et al.*, 2008)。此外，肝臟星狀細胞能夠表現 B7-H1，當 T 細胞上 PD-1 分子與之結合後，會造成 T 細胞凋亡 (Yu *et al.*, 2004)。

肝臟星狀細胞也可分泌不同之細胞素，進而執行不同的功能。肝臟星狀細胞可表現第十介白質，而第十介白質可抑制 T 細胞之活化 (Mosser & Zhang, 2008)；肝臟星狀細胞在活化之狀態下，也能夠表現 β 轉形生長因子 (Thompson *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1997)，而 β 轉形生長因子也和抑制過敏反應和抑制 T 細胞活化有關 (Vignali *et al.*, 2008)；再者，肝臟星狀細胞也能夠表現單核細胞趨化蛋白以及第六介白質，而這兩種蛋白也分別能夠抑制 T 細胞之活化和發炎反應 (Chensue *et al.*, 1996; Tilg *et al.*, 1997)。因此，更深入探討肝臟星狀細胞之免疫功能，是我所感興趣的地方。

首先，純化出的肝臟星狀細胞，約有 86% 表現神經膠原纖維酸性蛋白，說明了所使用之 Nycodenz 密度分層法可有效的分離出我所需的肝臟星狀細胞。另外，利用 UV 光源的照射，我們也發現肝臟星狀細胞能夠如文獻所述，自發性的散發出藍紫色螢光 (Friedman SL *et al.*, 1985)。

接著，我測定肝臟星狀細胞是否能夠表現特定細胞素之 mRNA 及蛋白。結果顯示，肝臟星狀細胞能夠常態的表現第一單核細胞趨化蛋白及第十介白質之 mRNA。ELISA 也証實肝臟星狀細胞能分泌第一單核細胞趨化蛋白、第十介白質以及 β 轉形生長因子。不過，ELISA 的結果僅為一次實驗，尚需重覆此實驗，才能更確定其結果。

最後，為測定在試管中，肝臟星狀細胞是否具有免疫抑制之功能，我利用混合淋巴細胞反應，取出 BALB/c 小鼠之 B 細胞刺激 C57BL/6 之 T 細胞的分裂。如果將 C57BL/6 之肝臟星狀細胞共同培養，發現肝臟星狀細胞能夠抑制 BALB/c B 細胞對 C57BL/6 T 細胞之活化現象。在此實驗中，我們仍需証明是否此抑制現象為肝臟星狀細胞所特有，C57BL/6 的 B 細胞、巨噬細胞或 Kupffer 細胞是否也有抑制功能，有待進一步之證實。綜合以上實驗，肝臟星狀細胞在試管中的異種移植模式中，似乎可以降低 T 細胞之活化。然而其中的機制是否藉由肝臟星狀細胞分泌出免疫抑制性細胞素，則需進一步之證明，如此，方能更加瞭解肝臟星狀細胞在肝臟耐受性上的真正作用。

參考文獻

1. Akdis, C. A., and Blaser, K.. Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. *Immunology* **103**: 131-136, 2001.
2. Bachem, M. G., Meyer, D., Melchior, R., Sell, K. M., and Gressner, A. M.. Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblastlike cells. *J Clin Invest* **89**: 19-27, 1992.
3. Bataller, R., and Brenner, D.A. Liver fibrosis. *J Clin Invest* **115**: 209-218, 2005.
4. Belkaid, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* **7**: 875-888, 2007.
5. Calne, R. Y., Sells, R. A., and Davis, D. R.. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* **223**: 472-476, 1969.
6. Chen, C. H., Kuo, L. M., Chang, Y., Wu, W., Goldbach, C., Ross, M. A., Stolz, D.B., Chen, C., Fung, J. J., Lu, L., and Qian, S. In vivo immune modulatory activity of hepatic stellate cells in mice. *Hepatology* **44**: 1171-1181, 2006.
7. Chensue, S. W., Warmington, K. S., Ruth, J. H., Sanghi, P. S., Lincoln, P., and Kunkel, S. L.. Role of monocyte chemoattractant Protein-1 (MCP-1) in Th1 (Mycobacterial) and Th2 (Schistosomal) antigen-induced granuloma formation. Relationship to local inflammation, Th cell expression, and IL-12 production. *J Immunol* **157**: 4602-4608, 1996.
8. Choi, I., Kang, H. S., Yang, Y., and Pyun, K. H. IL-6 induces hepatic inflammation and collagen synthesis *in vivo*. *Clin Exp Immunol* **95**: 530-535, 1994.
9. Crispe, I. N.. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev* **3**: 51-62, 2002.
10. Das, A., Hoare, H., Matthew, D., Nathan, L., Ross, D., Claire, K., Patrick, T. F., Alexander, G., Finney, H., Lawson, A., Plunkett, F. J., Bertolotti, A., Akbar, A. N., and Maini, M. K. Functional skewing of the global CD8 T cell population in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med* **9**:2111-2124, 2007.
11. Friedman, S. L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* **88**:125-172, 2007.
12. Green, J., and Jotte, R.. Interactions between T helper cells and dendritic cells during the rat mixed lymphocyte reaction. *J Exp Med* **162**: 1546-1569, 1985.
13. Jalenques, I., Albuissou, E., Despres, G., and Romand, R.. Distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the cochlear

- nucleus of adult and aged rats. *Brain Res* **686**:223-232, 1995.
14. Jiang, G., Yang, H. R., Wang, L., Wildey, G. M., Fung, J., Qian, S., and Lu, L.. Hepatic stellate cells preferentially expand allogeneic CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells in an IL-2-dependent manner. *Transplantation* **86**: 1492-1502, 2008.
 15. Kawada, N., Tran-Thi, T. A., Klein, H., and Decker, K.. The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. *Eur J Biochem* **213**: 815-823, 1993.
 16. Kristensen, D. B., Kawada, N., Imamura, K., Miyamoto, Y., Tateno, C., Seki, S., Kuroki, T., and Yoshizato, K.. Proteome analysis of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* **32**: 268-277, 2000.
 17. Lau, A. H., de Creus, A., Lu, L., and Thomson, A. W.. Liver tolerance mediated by antigen presenting cells: fact or fiction? *Gut* **52**: 1075-1078, 2003.
 18. Mayanagi, T., Kurosawa, R., Ohnuma, K., Ueyama, A., Ito, K., and Takahashi, J.. Purification of mouse primordial germ cells by Nycodenz. *Reproduction* **125**: 667-675, 2003.
 19. McCusky, R. S. The hepatic microvascular system in health and its response to toxicants. *Anat Rec* **291**: 661-671, 2008.
 20. Mosser, D. M. and Zhang, X.. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* **226**: 205-218, 2008.
 21. Neubauer, K., Knittel, T., Aurisch, S., Fellmer, P., and Ramadori, G. Glial fibrillary acidic protein - a cell type specific marker for Ito cells *in vivo* and *in vitro*. *J Hepatol* **24**: 719-730, 1996.
 22. Niki, T., Pekny, M., De Bleser, P., Berg, K. V. D., Vaeyens, F., Quartier, E., Schuit, F., and Geerts, A.. Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* **29**: 520-527, 1999.
 23. Suematsu, M., Oda, M., Suzuki, H., Kaneko, K., Watanabe, W., Norehito, F., Tadasu, M., Shoichi, and Tsuchiya, Masaharu. Intravital and electron microscopic observation of Ito cells in rat hepatic microcirculation. *Microvasc Res* **46**: 28-42, 1993.
 24. Thompson, K. C., Trowern, A., Fowell, A., Marathe, M., Haycock, C., Arthur, M. J. P., and Sheron, N.. Macrophage inhibitor cytokine interleukin-10 during the course of activation *in vitro*. *Hepatology* **28**: 1518-1524.
 25. Thomson, A. W., and Lu, L.. Are dendritic cells the key to liver transplant tolerance? *Immunol Today* **20**: 27-32, 1999.
 26. Tilg, H., Dinarello, C. A., and Mier, J. W.. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunol Today* **18**:

- 428-432, 1997.
27. Tourkova, I. L., Yurkovetsky, Z. R., Shurin, M. R., Shurin, G. V.. Mechanisms of dendritic cell-induced T cell proliferation in the primary MLR assay. *Immunol Lett* **78**: 75-82, 2001.
 28. Vignali, D. A. A., Collison, L. W., and Workman, C. J.. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* **8**: 523-532, 2008.
 29. Wang, S. C., Ohata, M., Laura, S., Rippe, R. A., and Tsukamoto, H.. Expression of interleukin-10 by *in vitro* and *in vivo* activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* **273**: 302-308, 1998.
 30. Winau, F., Quack, C., Darmoise, A., and Kaufmann, S. H. E. Starring stellate cells in liver immunology. *Curr Opin Immunol* **19**: 1-7, 2007.
 31. Yu, M. C., Chen, C. H., Liang, X., Wang, L., Gandhi, C. R., Fung, J. J., Lu, L., and Qian, S. Inhibition of T-cell responses by hepatic stellate cells via B7-H1-mediated T-cell apoptosis in mice. *Hepatology* **40**: 1312-1321, 2004.

表目及圖目

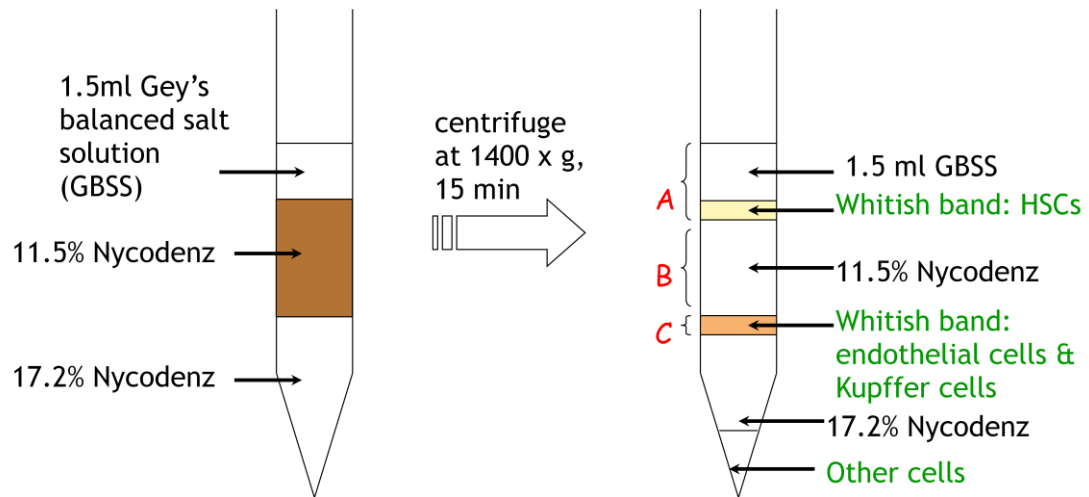
表一、不同處理對於 C57BL/6 之 T 細胞分裂之比例-----	27
表二、SC-1、SC-2、GBSS 緩衝液之調配-----	28
圖一、肝臟細胞經 Nycodenz 梯度離心後純化出肝臟星狀細胞-----	29
圖二、各層之細胞純度之測定-----	30
圖三、利用自發性螢光測定肝臟星狀細胞之純度-----	32
圖四、肝臟星狀細胞表現單核細胞趨化蛋白以及第十介白質之 mRNA-----	34
圖五、肝臟星狀細胞表現單核細胞趨化蛋白、第十介白質以及 β 轉型生長因子-----	35
圖六、脾臟細胞之純測定-----	36
圖七、C57BL/6 肝臟星狀細胞抑制 BALB/c 刺激 C57BL/6 T 細胞之分裂-----	37
圖八、C57BL/6 肝臟星狀細胞抑制 BALB/c 刺激 C57BL/6 T 細胞之分裂-----	39
圖九、C57BL/6 肝臟星狀細胞抑制 BALB/c B 細胞刺激 C57BL/6 T 細胞之分裂-----	40

表一、不同處理對於 C57BL/6 之 T 細胞分裂之比例(%)

	T Cells(C57BL/6)	T Cells(C57BL/6) + B Cells(BALB/c)	T Cells(C57BL/6)+ B Cells(BALB/c)+ HSCs(C57BL/6)	T Cells(C57BL/6)+ HSCs(C57BL/6)
Percent of divided cells (%)	8	53	21	16
	13	54	22	15
	13	46	18	16
	20	75	62	13
	28	74	60	14
	23	79	60	20
	22	62	28	9
	15	51	31	15
	18	68	21	9
Average	17.78	62.44	35.89	14.11

表二、SC-1、SC-2、GBSS 緩衝液之調配

	SC-1 solution	SC-2 solution	GBSS
CaCl ₂ · 2H ₂ O (Merck, Darmstadt, Germany)	—	0.56	0.225
MgCl ₂ · 6H ₂ O (Merck, Darmstadt, Germany)	—	—	0.21
MgSO ₄ · 7H ₂ O (Merck, Darmstadt, Germany)	—	—	0.07
KCl (Merck, Darmstadt, Germany)	0.4	0.4	0.37
KH ₂ PO ₄ (Merck, Darmstadt, Germany)	—	—	0.03
NaHCO ₃ (Merck, Darmstadt, Germany)	0.35	0.35	0.227
NaCl (Merck, Darmstadt, Germany)	8.0	8.0	8.0
NaH ₂ PO ₄	0.068	0.068	—
Na ₂ HPO ₄ (Galbiochem, Darmstadt, Germany)	0.120	0.120	0.06
D-Glucose (Bioshop, Burlington, Canada)	0.9	—	0.991
HEPES (Sigma, USA)	2.38	2.38	—
EGTA (Sigma, USA)	0.19	—	—



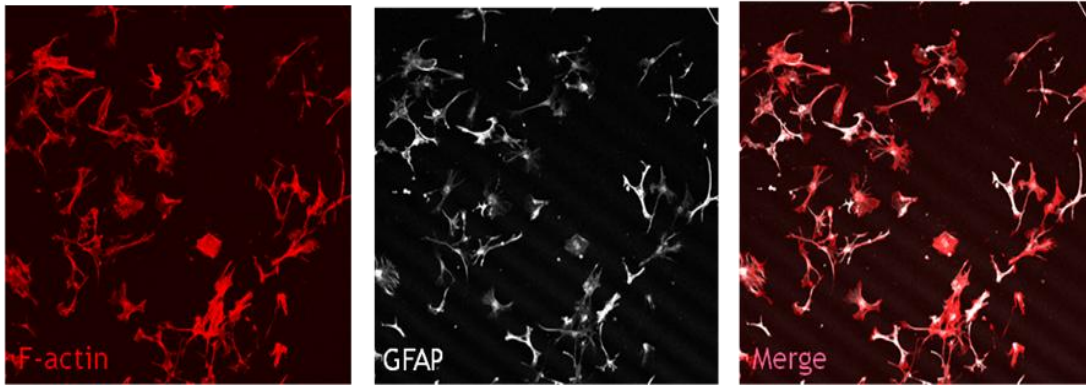
圖一、肝臟細胞經 Nycodenz 梯度離心後純化出肝臟星狀細胞

將所有肝臟細胞溶於 11.5% 之 Nycodenz 中，並加至 17.2% 之 Nycodenz 上，經 1400 xg，離心 15 分鐘後，即可得到圖一右方之分層現象，而其中 A 層即為所需之肝臟星狀細胞

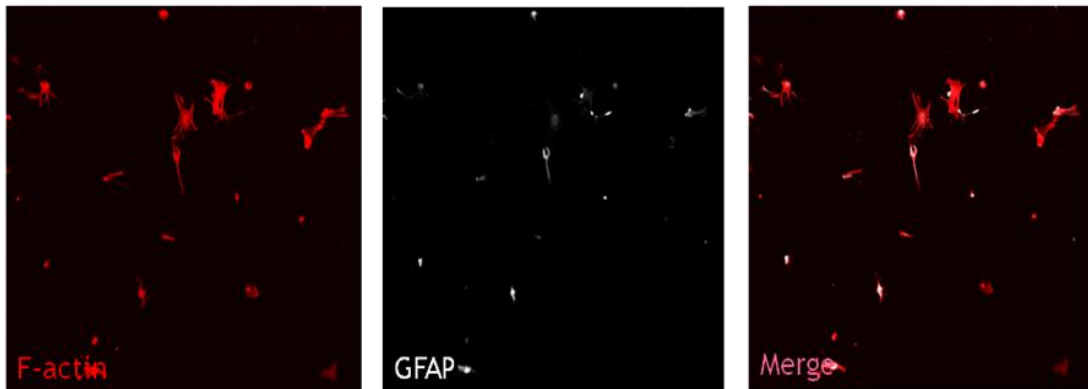
圖二、各層之細胞純度之測定

肝臟的細胞經過分層後，分別取出 A、B 以及 C 層之細胞，培養至預先放入圓形玻片之 24 孔洞之培養盤，利用 anti-GFAP 和 Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins/FITC 抗體測定細胞內之神經膠原纖維酸性蛋白表現。圖中左方為利用 Phalloidin 染細胞之形態，圖中為利用 anti-GFAP 抗體測定細胞內之神經膠原纖維酸性蛋白表現，圖右方為前述二張照片合併後的圖。此次實驗照片感謝林成翰學長協助拍攝。

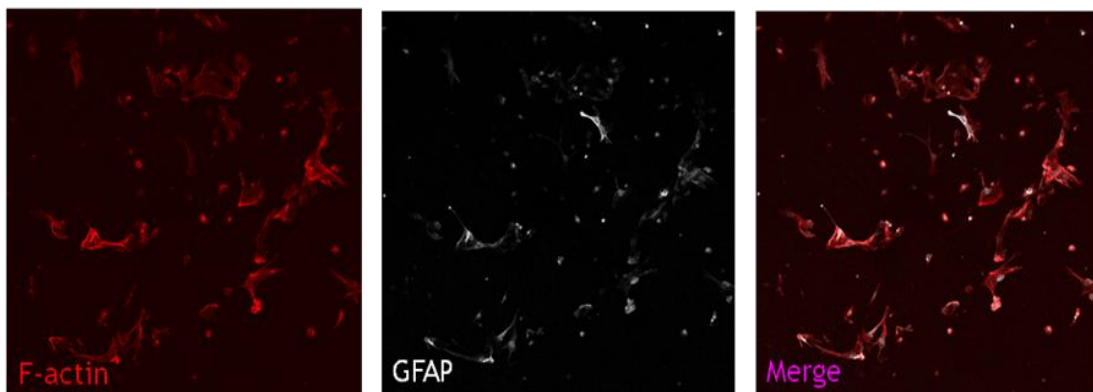
(a) 第 A 層之細胞



(b) 第 B 層之細胞



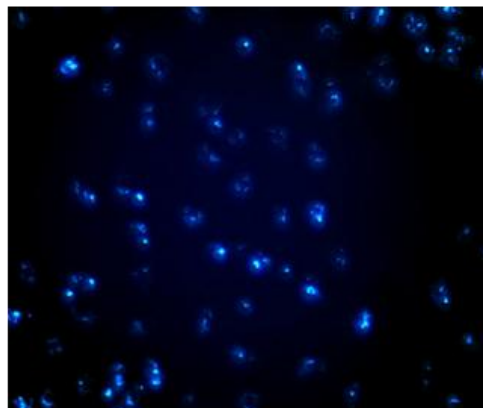
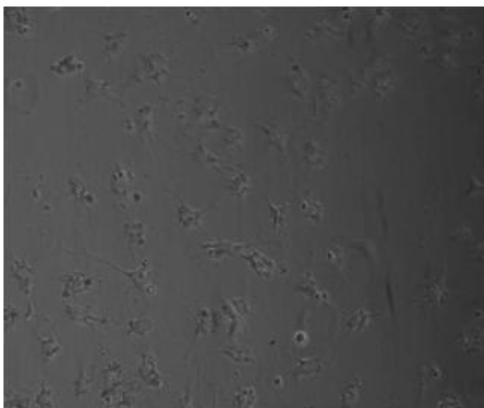
(c) 第 C 層之細胞



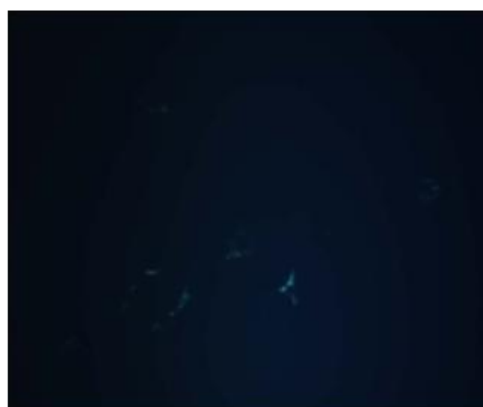
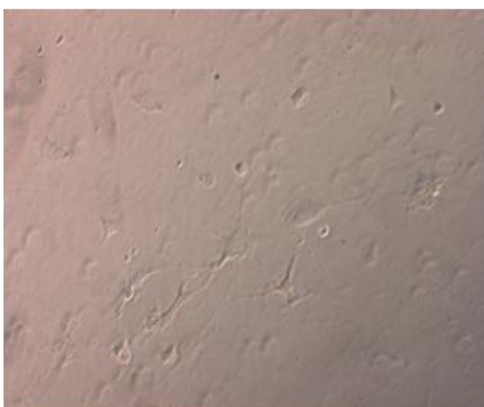
圖三、利用自發性螢光測定肝臟星狀細胞之純度

將分層後之細胞，分別將 A、B、C 三層之細胞取出，培養至 24 孔洞培養盤中，培養二天後，利用紫外光照射，並在倒立顯微鏡下觀察自發性的藍紫色螢光之表現。圖左方為在一般光學條件下觀察各層細胞之形態，圖右方為在紫外光照射下，觀察細胞內之脂質滴受激發後，表現出藍紫色螢光之表現。

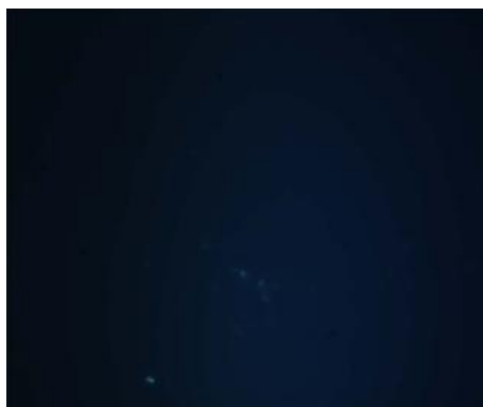
(a) 第 A 層之細胞

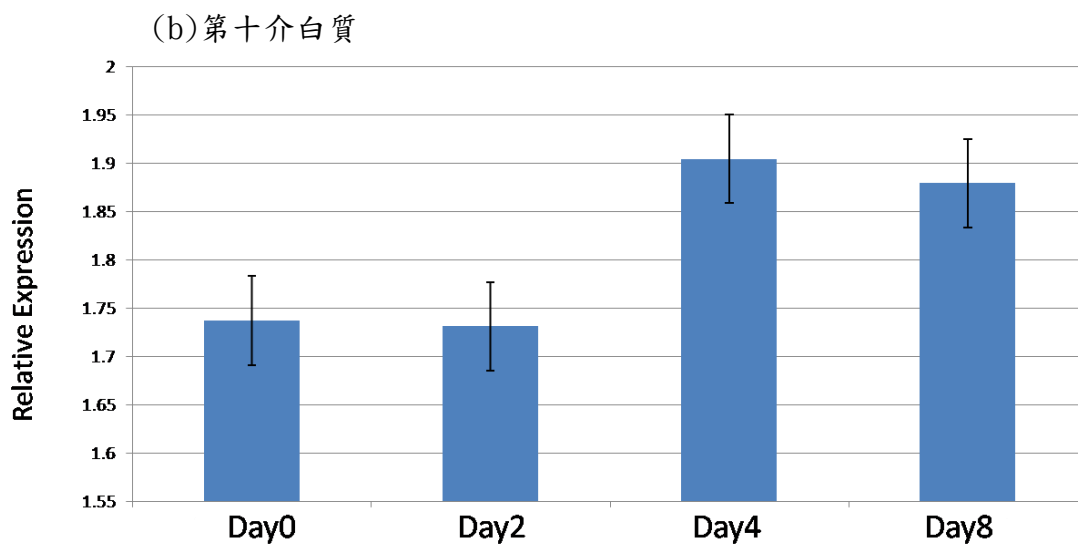
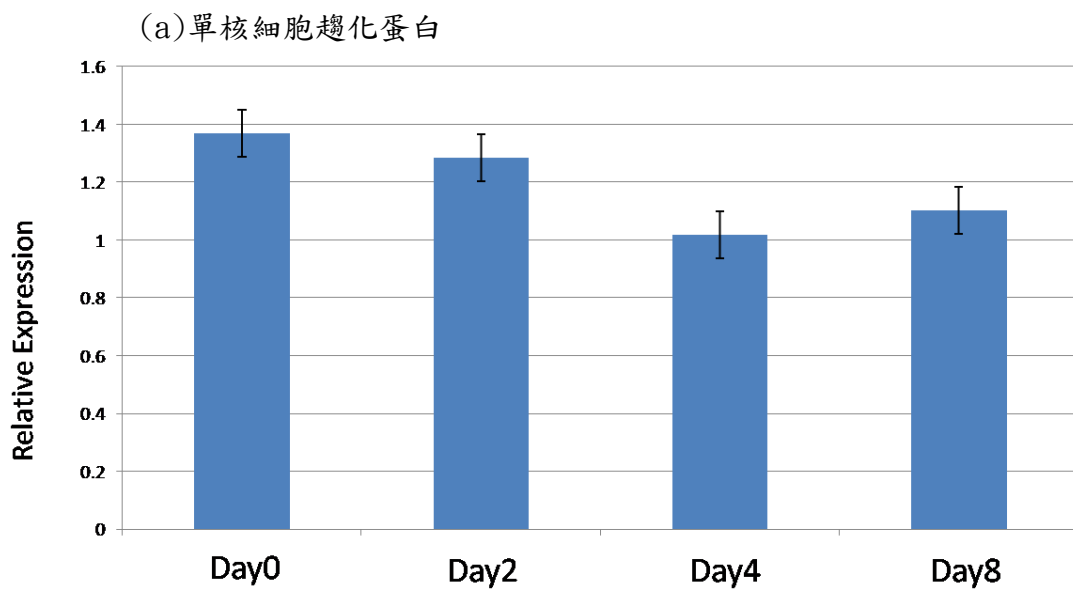


(b) 第 B 層之細胞



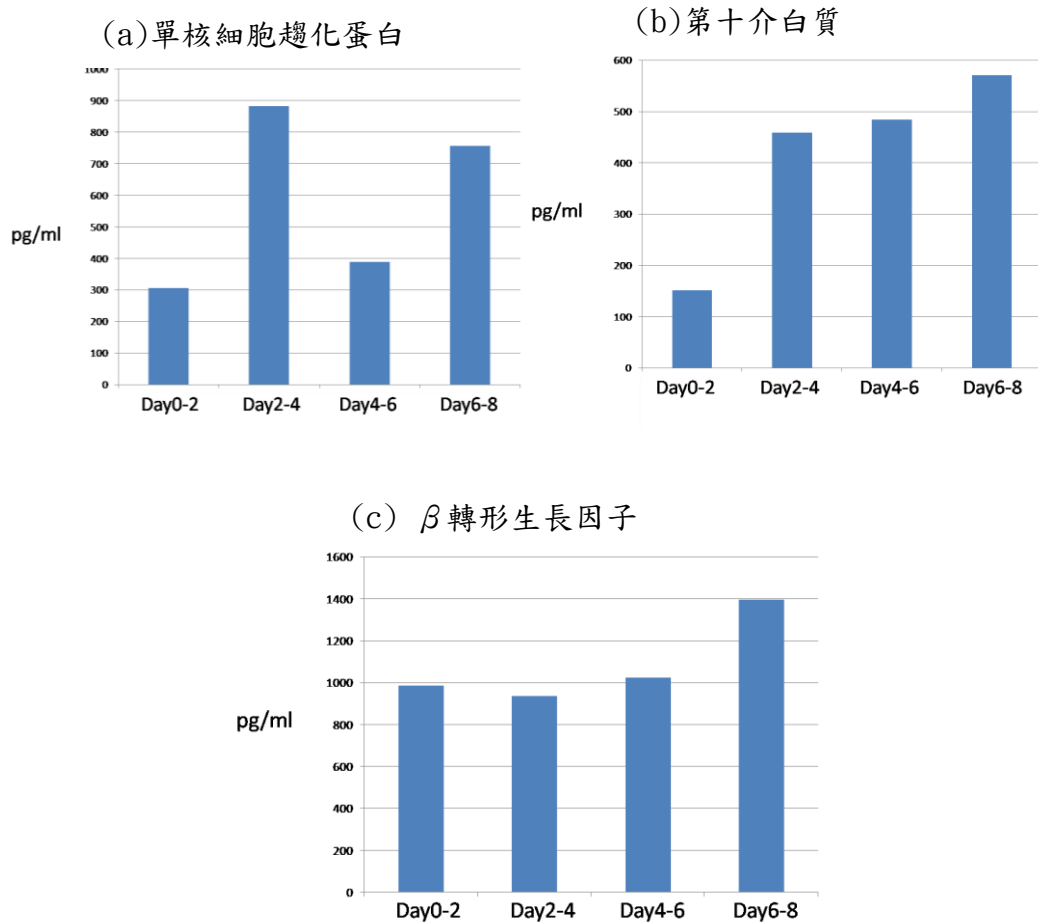
(c) 第 C 層之細胞





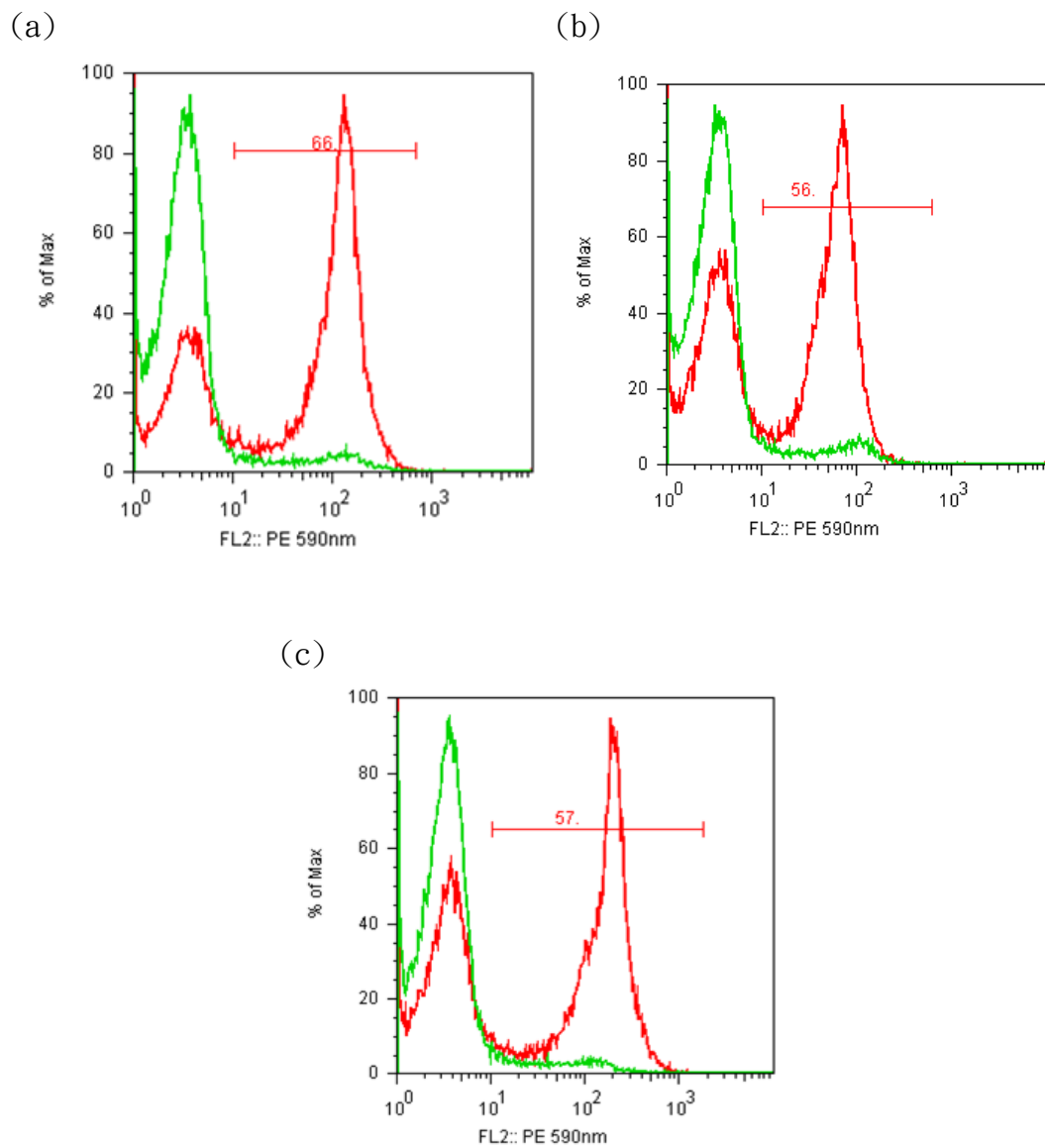
圖四、肝臟星狀細胞表現單核細胞趨化蛋白以及第十介白質之 mRNA

將 RNA 反轉錄成 cDNA，接著分別測定了培養在第零天、第二天、第四天以及第八天，利用即時定量聚合酶鏈反應來決定肝臟星狀細胞內之 mRNA 含量。(a)肝臟星狀細胞表現單核細胞趨化蛋白 mRNA，(b)肝臟星狀細胞表現第十介白質之 mRNA



圖五、肝臟星狀細胞表現單核細胞趨化蛋白、第十介白質以及 β 轉形生長因子

從第零天開始，每隔二天收集培養液，一直到第八天，並測定單核細胞趨化蛋白、第十介白質以及 β 轉形生長因子之蛋白表現量。(a)單核細胞趨化蛋白，(b)第十介白質，(c) β 轉形生長因子之蛋白表現。



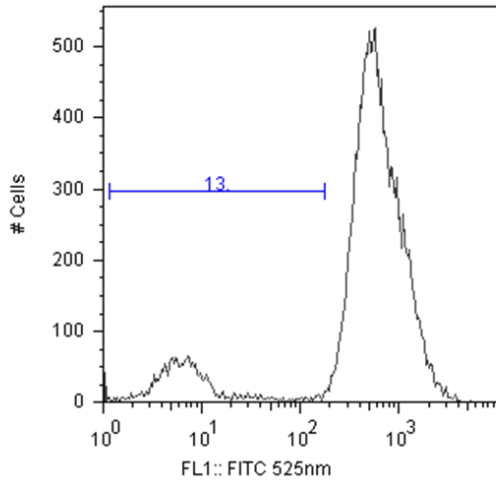
圖六、脾臟細胞之純度測定

C57BL/6 以及 BALB/c 小鼠的脾臟細胞分別以 PE-anti-CD4 & -CD8、PE-anti-B220 抗體標示培養靜置後的黏附細胞以及懸浮細胞。綠色區域為染 IgG2a，為控制組，紅色區域分別為(a)以 PE-anti-CD4 & -CD8 染 C57BL/6 小鼠之懸浮細胞，(b)以 PE-anti-B220 染 C57BL/6 小鼠之黏附細胞，(c) 以 PE-anti-B220 染 BALB/c 小鼠之黏附細胞。

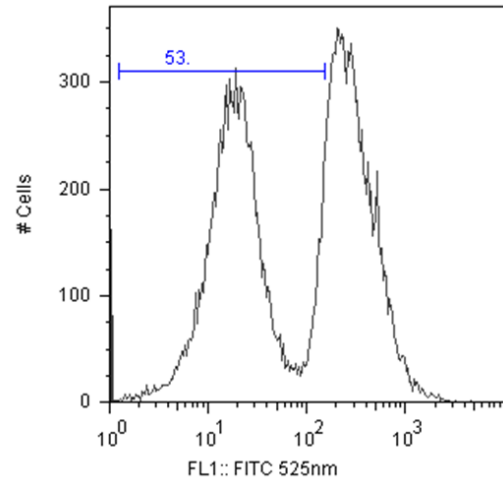
圖七、C57BL/6 肝臟星狀細胞抑制 BALB/c 刺激 C57BL/6 T 細胞之分裂

事先以 CFSE 標示 C57BL/6 的 T 細胞，加入不同細胞處理，培養六天後，觀察細胞分裂之狀況。(a) C57BL/6 的 T 細胞，(b) C57BL/6 的 T 細胞加上 BALB/c 之 B 細胞，(c) C57BL/6 的 T 細胞加上 BALB/c 之 B 細胞後，再加上 C57BL/6 的肝臟星狀細胞，(d) C57BL/6 的 T 細胞加上 C57BL/6 的肝臟星狀細胞。

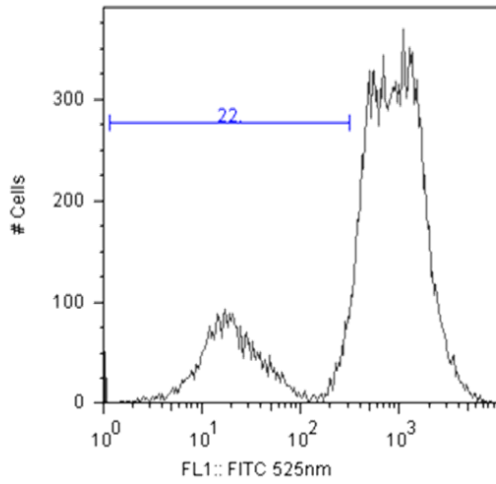
(a) C57BL/6 的 T 細胞



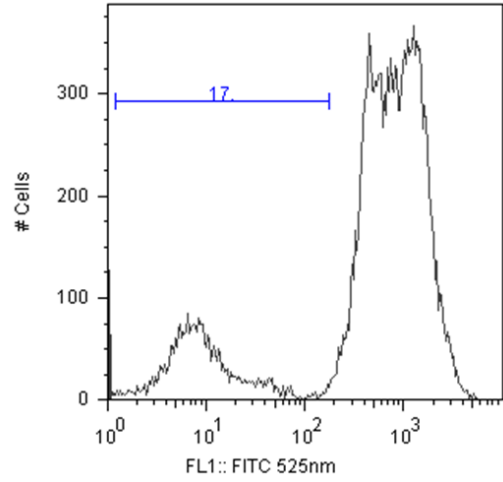
(b) C57BL/6 T 細胞+BALB/c B 細胞

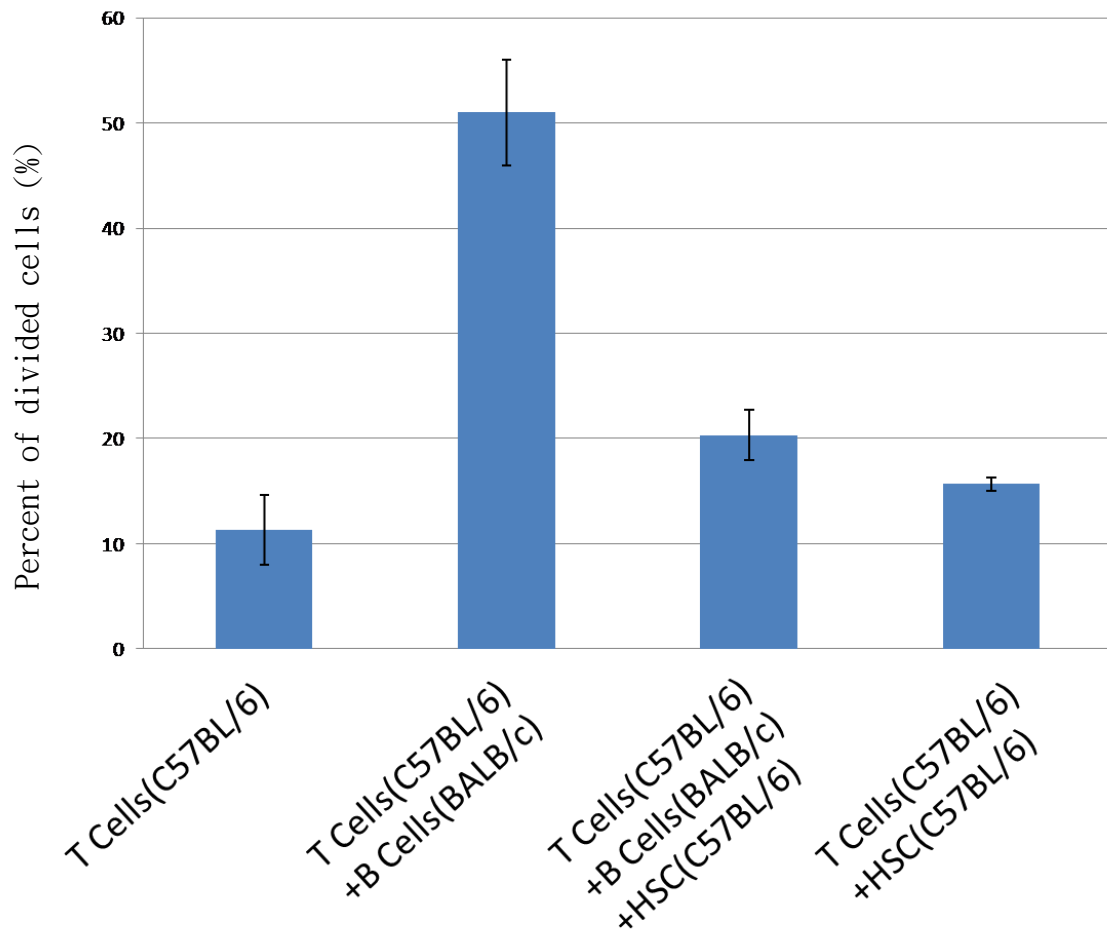


(c) C57BL/6 T 細胞+BALB/cB 細胞後+C57BL/6 肝臟星狀細胞



(d) C57BL/6 T 細胞+C57BL/6 肝臟星狀細胞

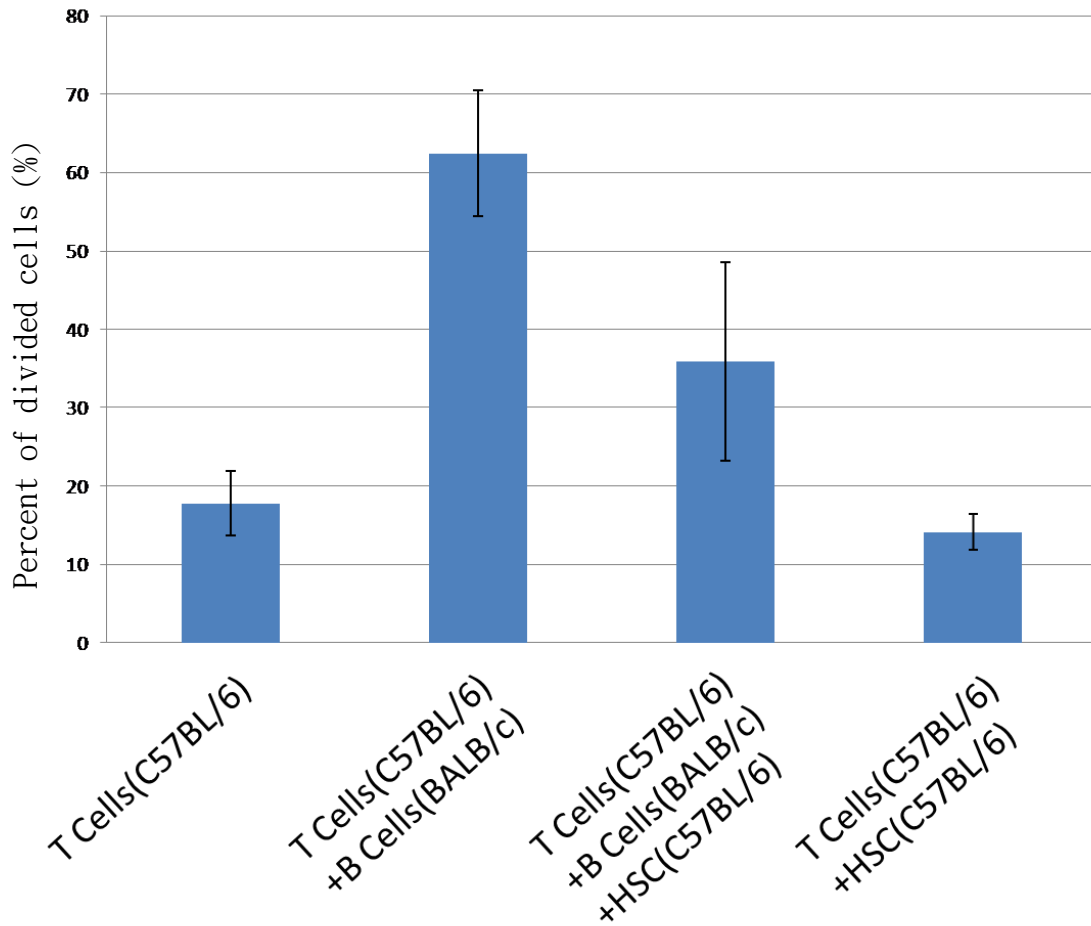




圖八、C57BL/6 肝臟星狀細胞抑制 BALB/c 刺激 C57BL/6 T 細胞之分裂

圖七為三重覆實驗其中一次之結果，本圖將三重覆平均後，繪製成柱狀圖表示。

事先以 CFSE 標示 C57BL/6 的 T 細胞，加入不同細胞處理，培養六天後，觀察細胞分裂之狀況。處理分別為 C57BL/6 的 T 細胞，C57BL/6 的 T 細胞加上 BALB/c 之 B 細胞，C57BL/6 的 T 細胞加上 BALB/c 之 B 細胞後，再加上 C57BL/6 的肝臟星狀細胞，及 C57BL/6 的 T 細胞加上 C57BL/6 的肝臟星狀細胞。



圖九、C57BL/6 肝臟星狀細胞抑制 BALB/c B 細胞刺激 C57BL/6 T 細胞之分裂

本圖之結果，為二次和實驗室助理蘇祐萱共同實驗之結果，以及一次我自己操作之結果，每次三重覆之平均，繪製成柱狀圖。CFSE 標示 C57BL/6 的 T 細胞，加入不同細胞處理，培養六天後，觀察細胞分裂之狀況。處理分別為 C57BL/6 的 T 細胞，C57BL/6 的 T 細胞加上 BALB/c 之 B 細胞，C57BL/6 的 T 細胞加上 BALB/c 之 B 細胞後，再加上 C57BL/6 的肝臟星狀細胞，及 C57BL/6 的 T 細胞加入 C57BL/6 的肝臟星狀細胞。

個人資料

姓名：唐光佑

英文姓名：Guang-you Tang

戶籍地：臺灣，南投

E-mail：tomone9@hotmail.com

學歷：私立東海大學生命科學系學士

國立中興高級中學

南投縣立中興國民中學

南投縣立平和國民小學