文章编号:1000-5404(2006)22-2259-04

论著

大鼠成体肝卵圆细胞分离培养及诱导分化的初步研究

金世龙, 刘宝华,刘宏鸣,杨俊涛,顾红光,申海军,肖 静 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所肝胆外科,重庆 400042)

提 要: 目的 通过成体大鼠肝卵圆细胞分离培养获取纯净的干细胞并观察诱导分化前后从肝卵圆细胞到肝细胞的形态变化。**方法** 采用AAF/PH肝干细胞刺激模型,胶原酶Ⅳ消化分离和Percoll梯度离心纯化肝卵圆细胞的方法,用地塞米松、DMSO和EGF、HGF、SCF、LIF等生长因子联合应用诱导肝卵圆细胞增殖和分化为肝实质细胞。观察肝卵圆细胞到肝细胞形态变化过程,用免疫荧光技术,Western blotting分析检测了干细胞标志c-kit和RT-PCR分析法检测肝干细胞白蛋白和CK19 mRNA表达鉴定卵圆细胞。**结果** 分离得到的肝卵圆细胞活度达到90%,细胞形态包括大小和颜色呈不均质,卵圆细胞直径是肝细胞直径的1/4~1/6。诱导后出现大而圆的肝细胞,可见卵圆细胞到肝细胞的中间变化过程,新分离的肝卵圆细胞在生长因子诱导下有向肝细胞分化的特性。经c-kit免疫荧光染色显黄绿色荧光,Western blotting检测肝卵圆细胞有c-kit蛋白条带,而大鼠肝细胞及胆管细胞则未出现条带。PCR分析显示卵圆细胞有CK19和白蛋白mRNA表达。**结论** 新分离的肝卵圆细胞同时表达c-kit,CK19和白蛋白3种抗原,诱导分化出现一系列从卵圆细胞到肝细胞的形态学变化,这种现象证明分离的肝卵圆细胞就是肝干细胞,经诱导分化可以产生成熟的肝细胞,成为进一步研究肝干细胞生物学特性的基础。

关键词: 肝卵圆细胞;细胞培养;诱导分化
中图法分类号: R322.47;R329.28 **文献标识码**: A

Isolation, culture and differentiation of oval cells from adult rat liver

JIN Shi-long, LIU Bao-hua, LIU Hong-ming, YANG Jun-tao, GU Hong-guang, SHEN Hai-jun, XIAO Jin (Department of Hepatobiliary Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To observe the morphologic changes of hepatic stem cells differentiating into hepatic parenchymal cells by isolating and culturing oval cells from adult rat liver. **Methods** The oval cells that were activated by AAF/PH in Wistar rats were isolated and purified from heterogeneous liver cell population by selective enzymatic digestion and density gradient centrifugation. The hepatic oval cells were induced to proliferate and differentiate into hepatic parenchymal cells by dexamethasone, DMSO and several growth factors. The morphologic changes from hepatic oval cells to hepatic cells were observed. c-kit, a marker of stem cells, was examined by immunofluorescence and Western blotting. The expression of albumin and CK19 mRNA of hepatic stem cells was identified by RT-PCR. **Results** The activity of the freshly isolated oval cells was more than 90%, the morphologic characterization including color and size was not the same, and the diameter of oval cells was 1/4 to 1/6 of the diameter of hepatocytes. The morphologic changes from hepatic oval cells to large and round hepatocytes were observed. The freshly isolated oval cells was positive for c-kit by immunofluorescence, positive for albumin and CK19 mRNA by RT-PCR. **Conclusion** The morphologic changes of freshly isolated hepatic oval cells during differentiation to hepatocytes provides data of biological properties of hepatic stem cells.

Key words: hepatic stem cells; cell culture; induced differentiation

当肝脏受到严重急性损害时,肝卵圆细胞被活化,迅速增生以弥补受损的肝脏,其存在已十分肯定有肝内和肝外2个来源[1,2],并且认为肝卵圆细胞是一种双向潜能的肝脏干细胞,可向肝细胞和胆管上皮细胞分化,呈现两种细胞的生物学特性[3,4]。因肝卵圆细胞可以成为肝再生来源和肝细胞移植治疗肝急性衰竭,国内近几年也加紧开展分离和培养研究[5-7],然而

作者简介:金世龙(1963-),男,湖北省丹江口市人,博士,副教授,主要从事肝脏肿瘤和肝干细胞wnt信号转导方面的研究,发表论文25篇。电话:(023)68757247,E-mail: Shilongjin828@sina.com.cn
通讯作者:刘宏鸣,电话:(023)68757247
收稿日期:2006-03-08;修回日期:2006-10-18

肝干细胞在分化过程中形态变化过程观察十分有限，甚至将其视为单一的细胞克隆。本实验观察卵圆细胞分化过程的光学显微镜下的形态学变化。

1 材料与方法

1.1 成体肝卵圆细胞刺激大鼠模型的建立

清洁型雄性 Wistar 大鼠 30 只，体质量(100±20)g(第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供)，室内温度 18～27℃，湿度 40%～80%，正常饲料喂养。在饮用水中加入 2-乙酰氨基芴(N-2-fluorenylacetamide，AAF，美国 Sigma 公司提供)，鼠自动饮用，按 30 mg·kg^{-1}·d^{-1}，连续喂养 6 d。第 7 天在 3%戊巴比妥钠溶液，经腹腔注射全身麻醉下施行左肝切除术或 2/3 肝切除术。第 8 天继续喂养 AAF(剂量同术前)，喂养到术后 11 d。于手术第 11～12 天，在全麻下行上腹正中切口，迅速切取肝脏，放入冰 D-Hanks 液中漂洗[7]。

1.2 大鼠肝卵圆细胞分离和提纯

切取的肝在冰 D-Hanks 液中清洗 2 次，用眼科剪将肝组织剪成 0.1 cm×0.1 cm 的组织块，用冰 D-Hanks 液洗 1 次，取出肝组织加入 2 ml 含 0.10% 胶原酶 (美国 Sigma 公司)和 0.025% EDTA 的 DMEM 培养基(Gifico 公司产品)，继续剪碎肝组织，再加入上述消化液 8 ml，倒入 50 ml 三角烧杯。37 ℃水浴震洗 15 min，取上部液体经 100 目滤器过滤，残存组织进行1～2次重复上面消化过程。细胞悬液经 600 r/min，4 ℃离心 5 min。取上清液在 1 400 r/min，4 ℃离心 10 min。弃上清液，沉淀的细胞用 2 ml DMEM 培养基悬浮，加入 50 ml 含 0.10% Pronase E(Amerdhsn Biosciences 供给)，0.005% Dnase I (Amerdhsn Biosciences 供给)的 DMEM 培养基，经 37 ℃，5% CO_2培养 30 min。培养后的细胞悬液经 4 ℃，1 400 r/min，10 min。沉淀物用 2 ml D-Hanks 悬浮[8]。

用 D-Hanks 将 Percoll 按体积分数配成 90%、70% 和 50% 3 种浓度梯度，自离心管底部开始逐层铺加，富含肝卵圆细胞的悬液沿管壁置最上层。经 4 ℃、3 000 r/min，离心 30 min，吸取位于 50% 与 70% Percoll(购自 Amerdhsn Biosciences 公司)之间细胞层。细胞经 5 ml D-Hanks 液洗后，在 4 ℃，2 000 r/min，离心 10 min。2 ml DMEM 悬浮沉淀的细胞，接种于 0.2% 明胶处理的含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液(Hyclone 公司)的培养瓶。在 37 ℃，5% CO_2孵箱中培养过夜。新分离的细胞用 0.25% 台盼蓝染色观察细胞活力和干细胞表面标志鉴定。

1.3 免疫荧光和 Western blotting 检测大鼠肝卵圆细胞标志 c-kit

新分离纯化的肝卵圆细胞悬液 1 滴于载玻片，涂片后室温下凉干，4%缓冲多聚甲醛固定，PBS 充分漂洗。c-kit 多克隆抗兔 Ig 抗体(一抗)按 1∶100～1∶150 滴加，4 ℃的湿盒内过夜。经 PBS 洗 3 次，每次 3 min。加入 FITC 山羊抗兔 Ig 荧光抗体(二抗)，37 ℃，40 min。PBS 洗 3 次，每次 3 min。0.1% 尹人蓝衬染 3 min，PBS 洗 3 次，每次 3 min，2%缓冲甘油封片。在 LEICA DMIRB 荧光显微镜扫描摄像。

新分离的肝卵圆细胞用 Hanks 液洗 2 遍，震荡混匀 1 次将细胞悬液放入 1.5 ml 的 EP 管中，5 000 r/min，0 ℃离心 5 min，加入细胞裂解液 100 μl(上海申能博彩生物科技有限公司，RIPA)冰上孵育 15 min，间歇震荡，14 000 r/min，0 ℃离心 5 min，上清液为细胞质蛋白，取 5 μl 立即进行蛋白定量，蛋白样品加入样品缓冲液(1∶1)，煮 3 min 上样蛋白电泳(12% 分离胶，4% 积层胶)，转移至 PADV 膜，用含 5% 脱脂奶粉的 PBS 封闭过夜，一抗 C-kit 按 1∶500(3% BSA)，25 ℃ 震摇 1 h，PBS 漂洗。二抗按 1∶2 500(3% BSA)，25 ℃ 震摇 1 h，PBS 漂洗。用化学发光法(ELC)显色。

1.4 RT-PCR 分析肝卵圆细胞白蛋白及 CK19 表达

用 Trizol 从所纯化的肝卵圆细胞中提取总 RNA，用 TaKaRa RT-PCR 试剂盒将 RNA 转录成 cDNA，加 20 μl 反应体系为10×Buffer RT 2 μl，dNTP 0.5 mmol/L，Oligo-dT 1 μmol/L，RNA 酶抑制剂 10 U，逆转录酶 AMV(5 U/μl)，RNA 模板 1～2 μg，加无 RNA 酶的水至 20 μl。反应温度为 37 ℃，时间为 1 h，以 cDNA 为模板，用 *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μl)扩增目的片段。所用引物序列为：白蛋白：上游引物 5′-GAGAAGTGCTGTGCTGAAGG-3′，下游引物 5′-TCAGAGTGGAAGGTGAAGGT-3′。CK19：上游引物 5′-CTGTCTTGGTCCGGTCACTG-3′，下游引物 5′-GGCATCTTGGTCTGTGTCAT-3′。95 ℃预变性 15 min，循环参数为 94 ℃变性 1 min，56 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 1 min，循环次数为 30 次，最后延伸 5 min。

1.5 大鼠肝卵圆细胞增殖培养和诱导分化

DMEM/F12(1∶1)培养基按青霉素 100 U/ml，链霉素 100 μg/ml，二性霉素 B 1 ng/ml 配制。细胞悬液按 1×10^4个细胞/瓶接种到 DMEM/F12 培养瓶，加 10% 胎牛血清。肝卵圆细胞时加多种生长因子，生长因子浓度按 SCF 20 ng/ml(Cytolab/Peprotech Asia 公司)，HGF 10 ng/ml，EGF 10 ng/ml(Cytolab/Peprotech Asia 公司)，LIF 10 ng/ml(Cytolab/Peprotech Asia 公司)，地塞米松 1.0×10^{-7} mol/L，1.5% 二甲亚砜(DMSO)诱导分化时撤去 LIF[8]。在 95% 空气、5% CO_2条件下持续培养，每 3 天换 1 次新鲜培养基，双相倒置显微镜观察细胞生长及分化情况，记录细胞形态。

2 结果

2.1 新分离的肝卵圆细胞形态特征

通过胶原酶消化法自大鼠 AAF/PH 模型中分离单个肝细胞，用 EDTA 消除成纤维细胞，低速离心(600 r/min)5 min 将肝实质细胞与非实质细胞分离。上清液为非实质细胞含肝卵圆细胞，再经 1 400 r/min 离心 l0 min，沉淀的细胞经过含 Pronase E 和 Dnase I 的培养，进一步消除成熟的肝细胞，经过 Percoll 梯度离心，所得细胞台盼蓝染色证实分离的细胞存活率为 90%。双相倒置显微镜观察培养瓶内的细胞形态，新分离的肝卵圆形细胞大小基本均匀，为卵圆形，肝卵圆细胞色彩分布一致，大部分较暗，少数细胞发亮发白，大小不十分一致(图 1)，新分离细胞在中倍视野见到一个大而圆的肝细胞(图 2)作为与肝卵圆细胞的对照，其直径相当于 4～6 个卵圆细胞，数量很少，细胞核着色较深，核物质颗粒较粗大，通过比较看出肝细胞和卵圆细胞在体积和颜色上的差别，形态上易于区别 2 种细胞。接种培养瓶 24 h 后肝卵圆细胞半贴壁生长，细胞体积增大，形态不规则多边或多角形，排列成葡萄状。

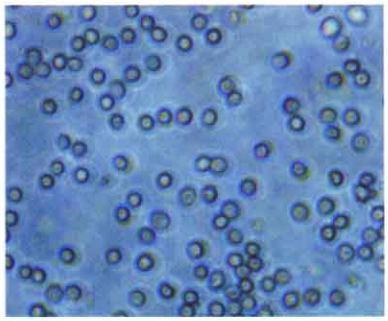


图 1　新分离的肝卵圆细胞（倒置显微镜 ×400）

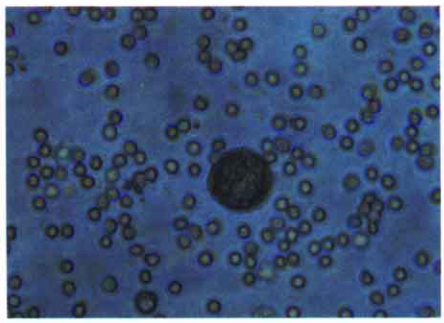


图 2　新分离细胞含有肝细胞（倒置显微镜 ×400）

2.2　肝卵圆细胞分化时的形态变化

在明胶处理培养瓶的条件下，培养基加入 SCF、EGF 和 HGF 等生长因子，地塞米松和 DMSO，72 h 卵圆细胞无明显增加，许多颜色较暗的细胞漂浮于培养基表面，细胞形态变成多角形，核碎裂或固缩，颜色变黄提示已死亡，这种细胞可能在分离时受到损害。肝卵圆细胞呈半贴壁生长，大小很不一致，观察时摇动培养瓶，可见发亮的卵圆细胞由小到体积较大的变化过程，最后接近肝细胞的体积，颜色也变为肝细胞的颜色。体积较小的发亮的卵圆细胞可以来回游动，体积较大的卵圆细胞则较为固定。细胞分化成不同的细胞形态，包括肝细胞和卵圆细胞，但没有见到胆管样细胞，显示出干细胞向肝细胞分化的能力，分化得到的肝细胞在形态和大小，颜色都与原肝细胞相同（图 3）。培养瓶换液，加入诱导剂继续培养到第 5 天观察，发现暗色卵圆细胞继续减少，肝细胞增加，出现细胞崩裂坏死现象。

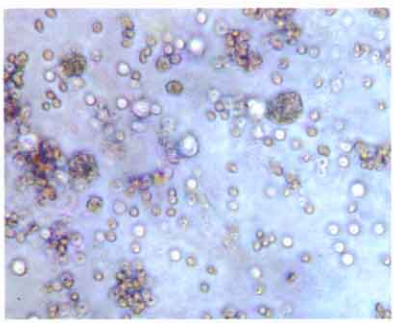


图 3　培养 72 h 后的肝细胞和卵圆细胞（倒置显微镜 ×400）

2.3　免疫荧光技术和 Western blotting 鉴定肝卵圆细胞

培养 1 d 后的肝卵圆细胞经过 c-kit 抗体和荧光抗体作用，表达 c-kit 抗原的肝干细胞发出黄绿色荧光，细胞呈卵圆型（图 4），成熟的肝细胞不发荧光。免疫印迹分析新分离的肝卵圆细胞有 c-kit 抗原蛋白表达，提示分离的肝卵圆细胞有干细胞的标志，而成熟的肝细胞和胆管细胞就没有 c-kit 蛋白条带。

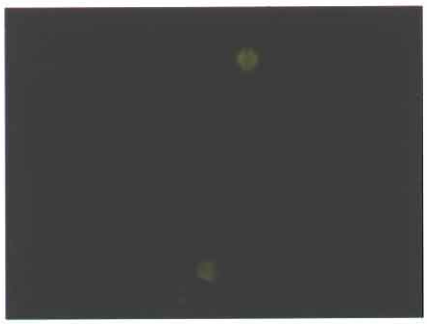
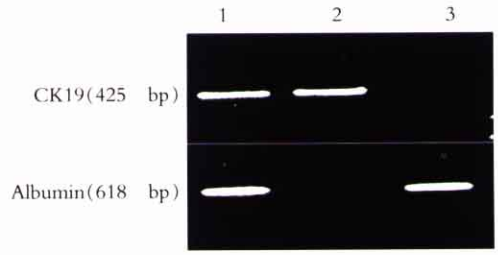


图 4　培养 1 d 肝卵圆细胞免疫荧光（×400）

2.4　肝卵圆细胞白蛋白及 CK19 的表达

为了评价增殖细胞的分化潜能，我们检测了分化标志白蛋白 CK19 的 mRNA 表达。RT-PCR 分析显示，成熟的肝细胞仅表达白蛋白基因，胆管上皮细胞表达 CK19 的 mRNA，不表达白蛋白。而新分离的肝卵圆细胞表达 CK19 和白蛋白 2 种基因，提示肝卵圆细胞有 2 种分化的潜能。由此本实验观察到肝卵圆细胞在培养和诱导后分化肝细胞和胆管细胞，而且发现卵圆细胞形态的连续性变化。见图 5。



1：肝卵圆细胞；2：胆管上皮细胞；3：成熟肝细胞

图 5　白蛋白和 CK19 mRNA 表达 PCR 分析

3　讨论

肝干细胞的分离与培养是研究其生物学特性以及通过细胞移植治疗肝病的必要前提，因而备受重视，国内已有较多研究报道肝卵圆细胞的分离和培养结果，所使用的方法不尽相同，但均培养出肝卵圆细胞[5-7,9-11]。卵圆细胞是目前研究较多的一种肝干细胞，多应用鼠类动物研究卵圆细胞的活化及发展过程，其基本条件：一是需肝实质损害；二是需有肝再生需求；三是残存肝细胞常因肝细胞毒性作用而致再生受阻。只有当发生了肝细胞本身的再生机制障碍时，卵圆细胞发生活化，向肝细胞转化并发生增殖[12]。

本实验 AAF + 肝部分切除术就是运用这一原理制造模型的。分离肝卵圆细胞时，本实验用 0.10% 胶原酶Ⅳ和 0.025% EDTA 消化剪碎的肝组织，所得的

细胞悬液已去除成纤维细胞，消除了成纤维细胞对培养物的影响，肝卵圆细胞培养结果也证实了其有效性[8]。肝组织消化后的细胞经 600 r/min 低速离心，第 1 步就将实质细胞和非实质细胞分开，富含卵圆细胞的位于上清液中，这 1 步骤保证把卵圆细胞与肝及胆管细胞分开[7]，因此分离提纯的卵圆细胞几乎没有肝细胞和胆管细胞。卵圆细胞悬液再经 0.10% Pronase E，0.005% Dnase I 培养非实质细胞悬液 30 min，去除少量的成熟的肝细胞，因为成熟的肝细胞易贴壁及被酶破坏[8]，有利于我们观察卵圆细胞的分化过程。我们观察离心管难以承受以往文献报道的梯度离心时 12 000 r/min 的压力，进口离心管也易于破裂，细胞分层也不十分好[5-7]，按 3 000 r/min 离心 30 min，可将细胞和细胞碎片很好分开，细胞活度在 90% 以上，避免了离心管的破裂问题。本实验使用胶原酶消化自成体大鼠分离卵圆细胞和 Percoll 浓度梯度离心分离过程得到的细胞纯度和活力均较高，卵圆细胞的形态特征与国外报道相似[13]，分离和提纯方法有明显改进，方法显得简单实用。流式细胞技术分离的干细胞能够达到很高的纯度，细胞损伤较小，分离得到的细胞也能培养，但是需要大型的设备，技术要求较高，目前分离肝干细胞的技术还不够成熟。免疫磁珠分离技术得到的干细胞纯度高，但是分离费用高，细胞损伤也较大，因此肝卵圆细胞分离仍很少采用免疫磁珠分离技术。

双相倒置显微镜观察新分离的细胞大小基本均匀，为卵圆形，细胞色彩一致，大部分较暗，少数细胞发亮发白，发亮发白的细胞大小也不太一致（图 1），新分离在中倍视野偶见大而圆的肝细胞（图 2），其直径相当于 4～6 个卵圆细胞之和，数量很少，胞核着色较深，通过比较看出肝细胞和卵圆细胞在体积上的差别，形态上易于鉴别。肝干细胞表达白蛋白、CK19 和干细胞抗原，干细胞抗原有 OV6、c-kit、CD34 等多种抗原，实验证实 c-kit 阳性的卵圆细胞 90% 为 OV6 阳性细胞，说明两者有很好的相关性[14,15]。成熟肝细胞仅表达白蛋白，胆管细胞仅表达 CK19。本研究新分离的卵圆细胞 c-kit 免疫荧光显色和免疫印迹分析提示表达 c-kit，直观而形象地证实了分离的肝卵圆细胞表达干细胞抗原。RT-PCR 分析显示新分离的肝卵圆细胞表达 CK19 和白蛋白 2 种基因 mRNA，而对照肝细胞仅表达白蛋白 mRNA 和胆管细胞只表达 CK19 mRNA，实验结果显示分离的细胞为肝干细胞，而且观察到肝卵圆细胞不是均匀一致的，大小和颜色均不一致（图 2），提示肝卵圆细胞可能为过渡性细胞。

分离的卵圆细胞诱导后观察到 3 种现象：一是，培养第 3 天已见到较多的肝细胞，肝细胞出现早，与新分离的肝细胞形态、颜色相似。肝卵圆细胞的变化过程和分化成熟的肝细胞形态与肝卵圆细胞比较国内文献没有详细的报道。二是卵圆细胞由小到大的变化过程，最后接近肝细胞时由亮细胞变成肝细胞（图 3），实际上是一群过渡性细胞。三是诱导后卵圆细胞自我更新能力似乎较差，数目越来越少，肝细胞也易死亡，其原因和机制不清楚。总之，我们从 AAF/PH 刺激肝干细胞增殖模型大鼠分离和提纯了干细胞标志 c-kit 阳性的卵圆细胞，它们具有向成熟肝细胞分化的生物学特性，证实为肝干细胞，这为进一步研究分化机制和肝干细胞与肝癌的关系打下基础。

参考文献：

[1] OMORI M, OMORI N, EVARTS R P, *et al*. Coexpression of flt-3 ligand/flt-3 and SCF/c-kit signal transduction system in bile-duct-ligated SI and W mice[J]. Am J Pathol, 1997,150(4): 1179－1187.

[2] 马俊勋，方弛华，张 伟，等. 大鼠肝干细胞定位及形态学特征研究[J]. 中华实验外科杂志，2004,21(8): 940－941.

[3] INAGAKI M, ARIKURA J, HUILING X, *et al*. Albumin-producing hepatocytes derived from cryopreserved F344 rat bone marrow cells transplanted in the livers of congenic Nagase's analbuminemic rats [J]. Surg Today, 2005, 35(11): 955－960.

[4] DAWN B, BOLLI R. Adult bone marrow-derived cells: regenerative potential, plasticity, and tissue commitment[J]. Basic Res Cardiol, 2005, 100(6): 494－503.

[5] 秦爱兰，周霞秋，谢 青，等. 大鼠肝卵圆细胞增殖模型建立及其纯化鉴定[J]. 上海实验动物科学，2004,24(1): 7－10,15.

[6] 何忠杰，方弛华，马俊勋，等. 大鼠肝卵圆细胞免疫组化定位及超微结构观察[J]. 解放军医学杂志，2005,30(4): 322－324.

[7] 王宇明，陈耀凯，郎 松，等. 大鼠肝卵圆细胞的分离培养及脾内移植研究[J]. 中华肝脏病杂志，2003,11(6): 328－330.

[8] HE Z P, TAN W Q, TANG Y F, *et al*. Activation, isolation, identification and in vitro proliferation of oval cells from adult rat livers[J]. Cell Prolif, 2004,37(2): 177－187.

[9] 姚 鹏，詹轶群，许望翔，等. 细胞生长因子体外对大鼠肝干细胞的影响[J]. 中华肝脏病杂志，2003, 11(1): 33－36.

[10] 张淑莲，曾平鲁，肖 荣，等. 肝干细胞分离培养条件的筛选[J]. 肝脏，2003, 8(1): 31－32.

[11] 王 萍，贾继东，唐淑珍，等. 丁酸钠诱导体外培养的大鼠肝卵圆细胞分化为成熟肝细胞[J]. 中华肝脏病杂志，2004, 12(12): 718－721.

[12] ALISON M R, GOLDING M, SARRAF C E, *et al*. Liver damage in the rat induces hepatocyte stem cells from biliary epithelial cells[J]. Gastroenterology, 1996, 110(4): 1182－1190.

[13] YASUI O, MIURA N, TERADA K, *et al*. Isolation of oval cells from Long-Evans Cinnamon rats and their transformation into hepatocytes *in vivo* in the rat liver[J]. Hepatology, 1997, 25(2): 329－334.

[14] QIN A L, ZHOU X Q, ZHANG W, *et al*. Characterization and enrichment of hepatic progenitor cells in adult rat liver[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(10): 1480－1486.

[15] CROSBY H A, HELLY D A, STRAIN A J. Human hepatic stem-like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium[J]. Gastroenterology, 2001, 120(2): 534－544.

（编辑 张大春）