技术方法

文章编号:1000-5404(2013)04-0366-03

一种改进的大鼠胎肝干细胞分离纯化方法

王亚萍,佟明华,雷香丽,孔祥平,罗显荣 (510600 广州,南方医科大学附属解放军第458医院肝病防治中心)

[摘要] **目的** 改进大鼠胎肝干细胞的分离纯化方法,提高肝脏干细胞分离的纯度和活力。**方法** 采用剪碎酶消化法分离大鼠胎肝干细胞,差速离心结合选择性消化法进行进一步纯化,含10%优等胎牛血清的DMEM/F12培养液培养。利用免疫细胞化学方法分别检测P1和P10代肝干细胞表面标志物。**结果** 分离的大鼠胎肝干细胞接种培养瓶24 h后开始贴壁,5 d后细胞体积增大,呈梭形或多边形。经1~2次差异性消化传代后,细胞呈集落样生长,边缘清晰且折光率强。免疫细胞化学检测示:P1代大鼠胎肝干细胞C-Kit、甲胎蛋白(AFP)抗原、OV6、细胞角蛋白(CK)19呈阳性表达,不表达Alb。P10代肝干细胞C-Kit、CK19、OV-6及CD34呈阳性表达。**结论** 大鼠胎肝干细胞分离纯化、培养扩增及鉴定方法简单易行。

[关键词] 肝干细胞;细胞分离;纯化;免疫细胞化学;鉴定

[中图法分类号] R329-33 [文献标志码] A

肝干细胞是一种成体多能干细胞,它具有自我更新、高度增殖及向肝细胞分化的能力[1]。肝脏星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)的分离、培养是人工肝制备的前提条件,可以为急性肝衰竭和肝代谢性疾病提供一种新的治疗手段[2]。肝干细胞在肝脏疾病治疗中具有较大的应用前景,已经引起人们的广泛关注。但是,成年动物肝脏中肝干细胞含量非常少,肝干细胞的获得常先经药物或手术造成肝脏损伤,刺激肝干细胞增殖后,再进行分离和纯化,操作复杂且成本较高。而胎肝中肝干细胞数量相对较多,可不经过刺激,直接从肝组织中分离,操作简便且成本较低[3]。本研究选择大鼠胚胎肝脏作为细胞来源,采用机械剪碎酶消化法分离获得肝干细胞,后经简单的离心分离法以及胰蛋白酶选择性消化法,得到较纯净的大鼠胎肝干细胞。

1 材料与方法

1.1 实验动物

近交系孕15 d SD雌性大鼠(SPF级)1只,体质量200 g左右,由中山大学医学实验动物中心提供。实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

1.2 主要试剂和仪器

EGF、Ⅳ胶原酶购自Peprotech公司;氢化可得松(Amresco);Anti-Mouse IgG Fragment购自Cellsignal公司;DAPI(Millipore);抗兔免疫组化检测试剂盒(DAKO);小鼠抗大鼠OV-6单克隆抗体购自RD公司;兔抗鼠AFP、CK19、C-Kit、CD34多克隆抗体均购自北京Bioss公司。倒置显微镜、荧光显微镜、普通光学显微镜均购自日本OLYMPUS公司。

1.3 方法

1.3.1 大鼠胎肝干细胞的分离和初次纯化 无菌取出大鼠胚胎肝脏,将胎肝组织置于培养皿中以PBS充分洗涤,用眼科剪剪碎肝脏成1 mm×1 mm×1 mm组织块,以冷PBS清洗去除血细胞。滴加0.05% Ⅳ型胶原酶液,于37 ℃水浴中消化15 min,加入等量DMEM完全培养液终止消化,并用吸管反复吹打混合液,200目筛网过滤制成单细胞悬液。细胞悬液经55×g离心5 min。转移上清液于另一容器中,并将其置于冰上。用PBS重悬沉淀细胞,再次以55×g离心5 min。保留上清液并弃掉最后的沉淀细胞。将2次所得上清液以220×g离心5 min,收集沉淀细胞,PBS重悬洗涤细胞2次(220×g,5 min)。弃上清,在沉淀中加入含10%胎牛血清、20 ng/mL EGF、0.2 mol/L谷氨酰胺,5 μg/mL胰岛素(Sigma公司),1 μg/ml氢化可的松的DMEM/F12培养液,制成胎肝干细胞悬液接种于0.2%明胶处理的塑料培养瓶中[3-4]。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。

1.3.2 大鼠胎肝干细胞的二次纯化 观察大鼠肝干细胞的贴壁、生长情况和形态变化。待细胞>80%长满时,加入质量分数0.25%的胰酶消化。由于成纤维细胞较肝干细胞对胰酶更为敏感,通过控制消化时间,待大部分成纤维细胞脱落,而肝干细胞仍然贴壁时,去除消化液,终止消化,继续培养,如此反复1~2次后,基本可以将成纤维细胞去除,得到较为纯化的肝干细胞[4]。待细胞80%长满以后,1∶3消化传代。

1.3.3 免疫细胞化学法检测胎鼠肝脏干细胞的OV-6、AFP、CD34、C-Kit、Alb和CK19的表达情况 将卵圆细胞接种于预先用0.2%明胶处理的盖玻片上置于24孔培养板中,37 ℃,5% CO_2孵箱培养24 h,至细胞长成单层,弃培养液,PBS冲洗3次5 min/次,加入4%多聚甲醛固定25 min;PBS洗涤,用0.3% Triton X-100透化细胞10 min;PBS洗涤,山羊血清封闭50 min;分别加入抗OV-6、AFP、C-Kit、Alb及CK19抗体(1∶100),置于湿盒中,4 ℃过夜。PBS洗涤,免疫荧光细胞化学技术检测时,加入Alexa Fluor 488 Conjugate二抗(1∶200),37 ℃孵育1 h;PBS冲洗,5 min×3次(注意避光,防止荧光淬灭),荧光封片液封片,荧光显微镜观察[5]。免疫酶法检测时滴加辣根过氧化物酶标记的抗兔IgG抗体。37 ℃孵育40 min。滴加显色剂DAB工作液50 μL,室温孵育10 min,光镜下控制显色。显色完全后,用PBS冲洗终止显色。将Mayor's苏木精

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2010CB945502)

[通信作者] 佟明华,E-mail:minghuat109@163.com
孔祥平,E-mail:xiangping-kong@hotmail.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121211.1308.007.html(2012-12-11)

滴加在实验标本上,待完全覆盖标本 60 s 后,用 PBS 将其从标本上冲洗干净,然后将标本浸入饱和 Na_2HPO_4 溶液中 2 min,待标本颜色变蓝后即可洗涤,然后取出标本封片,观察。

2 结果

2.1 肝干细胞存活率及形态特征

台盼蓝染色证实分离的细胞存活率为 90%。镜下见分离的肝干细胞大小均匀,呈鹅卵石形态(图 1A)。接种培养瓶 24 h 细胞开始贴壁并伸展(图 1B);培养 3 d 后细胞体积增大,呈梭形或多角形(图 1C)。经 1 ~2 次差异性消化传代后,即可得到较纯的肝干细胞,细胞呈集落样生长,边缘清晰且折光率强(图 1D)。

2.2 肝干细胞的免疫荧光化学技术检测结果

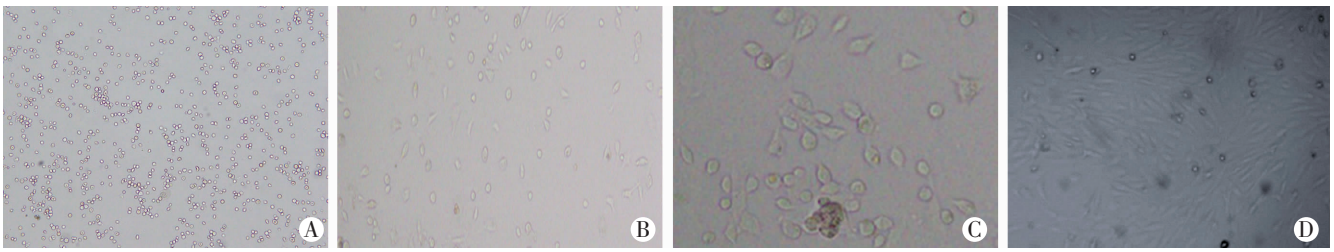
P1 代细胞 C-Kit、AFP、OV6、CK19 呈阳性表达(图 2A ~ D),Alb 表达呈阴性,图 F 为与图 E 同一视野下 DAPI 核染结果。

2.3 免疫细胞化学(辣根过氧化物酶法)检测 P10 代肝干细胞表面标志

细胞 CD34、C-Kit、OV6、CK19 呈阳性表达。见图 3。

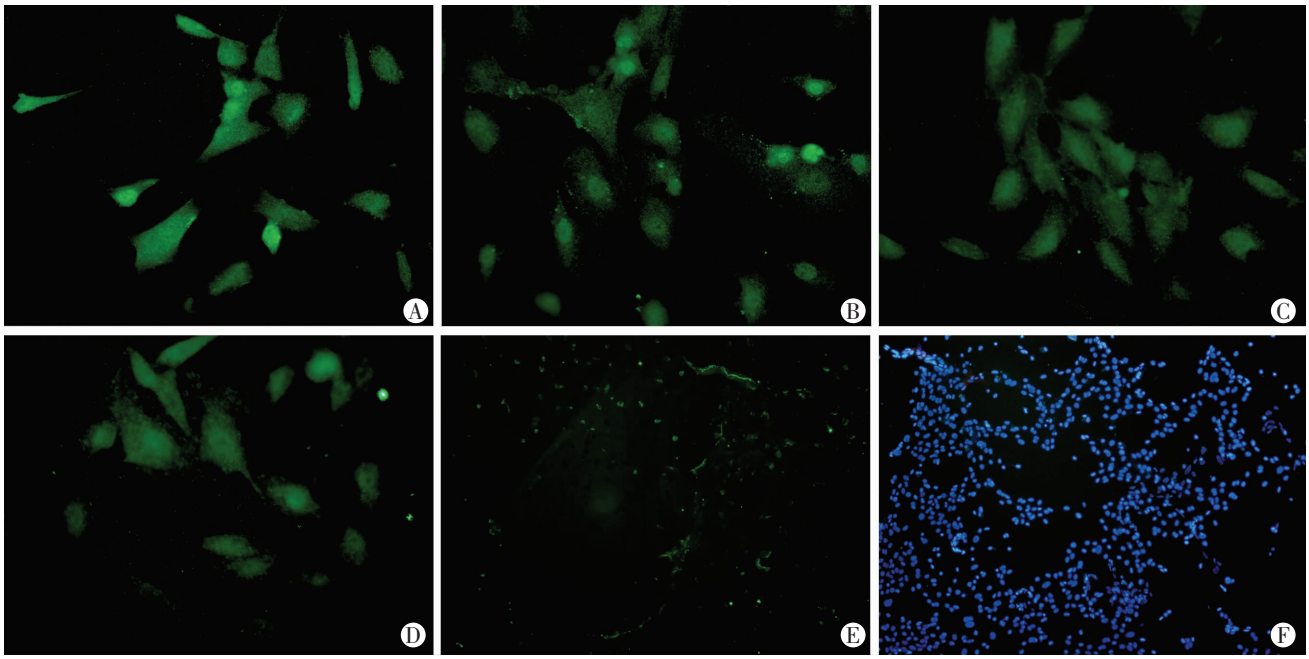
3 讨论

肝干细胞是肝组织中存在的一类具有自我复制和分化能力的细胞,在肝脏疾病治疗中具有较大的应用前景。正常情况下,体内肝干细胞多处于静息期,数量



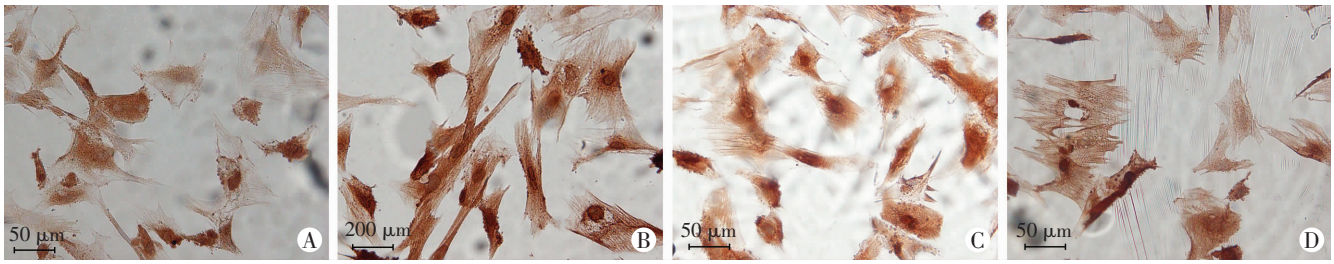
A:新分离时;B:培养 24 h 后;C:培养 3 d 后;D:第 1 次差异性消化后

图 1 不同原代培养时间的肝干细胞形态学变化 (双相倒置显微镜 ×200)



A ~ D:分别为 P1 代大鼠肝干细胞表面标志物 C-Kit、AFP、OV6、CK19 的免疫荧光鉴定(×400);E:Alb(×100),F:图 E 同一视野下 DAPI 核染结果(×100)

图 2 肝干细胞免疫荧光细胞化学染色观察



A:CD34; B:C-Kit; C:OV6; D:CK19

图 3 P10 代大鼠肝干细胞表面标志物的免疫荧光鉴定

极少,分离时常先经药物或手术造成肝脏损伤,肝脏灌流或联合细胞分离液分离来获得肝干细胞[6-7],操作复杂且成本较高。相比较传统的肝干细胞分离培养方法而言,本实验室采用先机械剪碎酶消化法分离获得肝干细胞,简单的离心分离法和胰蛋白酶选择性消化法相结合,从孕15 d大鼠胎肝组织中成功分离出肝干细胞。此方法在原代即可获得形态均一、增殖速度快、性状稳定的LSCs,且具有操作简单、快捷、实用、对细胞损伤小等优点,为其作为组织工程种子细胞提供了实验基础。

大鼠胚胎肝脏细胞分为实质细胞和非实质细胞。肝细胞是肝脏中主要的实质细胞,非实质细胞包括卵圆细胞,Kupper细胞,肝星状细胞,隐窝细胞[8]。本实验根据卵圆细胞本质上属于非实质细胞的特点,不同的离心转数和时间即可将肝细胞和非实质细胞分开。经过我们实验室的不断的摸索,发现剪碎消化过滤后的细胞悬液经2次55 ×*g*、5 min离心后,可以去除肝细胞。离心后的上清液以220 ×*g*离心5 min,收集的沉淀细胞即为我们所需要的肝脏非实质细胞。通过此离心方法分离获得的非实质细胞中,经检测不到2%的细胞表达肝细胞的表面标志P450(CYP3A2)。这说明了简单的离心分离可以很明显的去除肝实质细胞,从而获得较为纯净的非实质细胞[9]。

由于采用简单离心分离方法,细胞悬液中有较多的成纤维细胞夹杂在肝干细胞中,能否去除其中的成纤维细胞将直接影响肝干细胞的存活[10]。有研究显示,在肝干细胞原代培养时,夹杂的成纤维细胞分泌的细胞因子可能有助于肝干细胞的存活和增殖,但当肝干细胞适应体外培养环境并开始增殖后,成纤维细胞的存在可能就不利于维持肝干细胞的长期体外培养了。此时,成纤维细胞的去除则显得尤为重要[11]。在培养过程中我们发现肝干细胞较成纤维细胞消化时间更长,因此本研究采用胰蛋白酶(含EDTA)选择性消化的方法去除成纤维细胞。即通过控制消化时间,待大部分成纤维细胞脱落,而肝干细胞仍然贴壁时,去除消化液,终止消化,继续培养。经过1~2次选择性消化可以大大的降低成纤维细胞在培养物中的比例,从而得到较为纯净的肝脏干细胞。

目前尚未发现肝干细胞的特异性标志物,但已筛选出一些肝干细胞高度表达的标志物,如OV6、CK7、CK18、CK19、AFP、C-Kit[12-14]等。Weiss等[15]报道,CK7和CK19为胆管细胞特异性标志物,白蛋白和肝代谢酶细胞色素P450可作为肝细胞特异性标志物。甲胎蛋白(AFP)在胎肝细胞和肝干细胞中均有表达。此外,肝干细胞也高度表达造血干细胞的标志Thy-1、CD34、C-Kit等。本研究利用免疫细胞化学的方法对培养的细胞进行鉴定,结果显示培养的细胞高水平表达肝细胞的标志分子AFP和胆管细胞的分子标记(CK19、OV6),表明其具有双向分化的潜能。分离的细胞还表达造血干细胞的标志分子(CD34、C-Kit),这与文献[16]报道一致。说明本研究分离培养的细胞具有干细胞特性,是肝干细胞。

参考文献:

[1] Cienfuegos J A, Baixauli J. Stem cells and liver regeneration: looking toward the future[J]. Gastroenterol Hepatol, 2012, 35(9): 675.

[2] Rao M S, Khan A A, Parveen N, *et al*. Characterization of hepatic progenitors from human fetal liver during second trimester[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(37): 5730-5737.

[3] Dolle L, Best J, Empsen C, *et al*. Successful isolation of liver progenitor cells by aldehyde dehydrogenase activity in na? ve mice[J]. Hepatology, 2012, 55(2): 540-552.

[4] 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.

[5] Hirata M, Amano K, Miyashita A, *et al*. Establishment and characterization of hepatic stem-like cell lines from normal adult rat liver[J]. J Biochem, 2009, 145(1): 51-58.

[6] Shupe T D, Piscaglia A C, Oh S H, *et al*. Isolation and characterization of hepatic stem cells, or "oval cells," from rat livers[J]. Methods Mol Biol, 2009, (482): 387-405.

[7] 黄利华, 郭姣, 黄珮, 等. 新生大鼠肝干细胞的分离、培养与鉴定[J]. 广东药学院学报, 2010, 26(4): 416-419.

[8] 龚建平, 韩本立. 肝脏细胞的分离、培养和鉴定技术[J]. 世界华人消化杂志, 1999, 7(5): 417-419.

[9] Rountree C B, Ding W, Dang H, *et al*. Isolation of CD133$^+$ liver stem cells for clonal expansion[J]. J Vis Exp, 2011, (56): 22006186.

[10] Ling L, Ni Y, Wang Q, *et al*. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells derived from human fetal lung to hepatocyte-like cells[J]. Cell Biol Int, 2008, 32(9): 1091-1098.

[11] Evarts R P, Hu Z, Fujio K, *et al*. Activation of hepatic stem cell compartment in the rat: role of transforming growth factor alpha, hepatocyte growth factor, and acidic fibroblast growth factor in early proliferation[J]. Cell Growth Differ, 1993, 4(7): 555-561.

[12] Parveen N, Aleem A K, Habeeb M A, *et al*. An update on hepatic stem cells: bench to bedside[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2011, 12(2): 226-230.

[13] Zhang Y, Bai X F, Huang C X. Hepatic stem cells: existence and origin[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(2): 201-204.

[14] Dan Y Y, Yeoh G C. Liver stem cells: a scientific and clinical perspective[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2008, 23(5): 687-698.

[15] Weiss M C, Strick-Marchand H. Isolation and characterization of mouse hepatic stem cells *in vitro*[J]. Semin Liver Dis, 2003, 23(4): 313-324.

[16] Lee H S, Sherley J L, Chen J J, *et al*. EMP-1 is a junctional protein in a liver stem cell line and in the liver[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 334(4): 996-1003.

(**收稿**:2012-10-02;**修回**:2012-11-26)

(编辑 张 维)