

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.12.026

具有双向分化潜能的鼠胎肝干细胞的分离、培养及鉴定*

于黎明¹, 陈 姝², 何 松^{1△}

(重庆医科大学附属第二医院:1. 消化内科;2. 血液科 400010)

[摘要] 目的 优化体外分离、培养和筛选胎鼠肝脏干细胞(LSC)的方法,并鉴定其双向分化的潜能。方法 通过密度梯度离心和细胞差异性贴壁法分离小鼠胎肝干细胞(FLSC),以细胞平板克隆技术和四甲基偶氮唑蓝(MTT)法测定 FLSC 的增殖,通过添加二甲亚砜(DMSO)和 HGF 等诱导干细胞分化。结果 分离后的 FLSC 24 h 内贴壁,卵圆形,排列紧密,1~2 周内活化,CD133、CD49f、EPCAM 的阳性率分别为(97.95±1.21)%、(92.71±3.49)%、和(50.73±3.45)%,表达甲胎蛋白(AFP)、细胞角蛋白 19(CK19);诱导分化后糖原染色(PAS)法染色可见红色糖原颗粒,表达清蛋白(ALB)、肝细胞核因子 4 α (HNF-4 α)。结论 联合密度梯度离心和差异性贴壁法成功分离 FLSC,分离后的 FLSC 干性强,增殖能力强,具有向肝细胞和胆管上皮细胞双向分化的能力。

[关键词] 胚胎肝干细胞;离心法,梯密度;细胞,培养的;细胞分化

[中图分类号] R329

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)12-1666-04

Isolation, culture and identification of bi-directional differentiation potential liver stem cells in fetal mice*

Yu Liming¹, Chen Shu², He Song^{1△}

(1. Department of Gastroenterology; 2. Department of Hematology, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

[Abstract] **Objective** To optimize the method of isolating, culturing and screening fetal mouse liver stem cells in vitro, and to identify the potential of bi-directional differentiation. **Methods** The fetal liver stem cells of mouse were isolated by the density gradient centrifugation and cell difference adherence method, the proliferation of stem cells was determined by cell plate cloning technique and MTT method; stem cells were induced for differentiation by adding DMSO and HGF. **Results** The isolated stem cells showed adherence within 24 h, which were orbicular-ovate, closely packed, activated within 1~2 weeks; the positive rates of CD133, CD49f and EPCAM were (97.95±1.21)%, (92.71±3.49)% and (50.73±3.45)% respectively; AFP and CK19 proteins were expressed; red glycogen granules were seen by PAS after induced differentiation; ALB and HNF-4 α were expressed. **Conclusion** Fetal hepatic stem cells are successfully isolated by the density gradient centrifugation combined with difference adherence method, and the isolated cells have strong stemness and proliferation ability, as well as the ability of bi-directional differentiation towards hepatocytes and bile duct epithelial cells.

[Key words] fetal liver stem cells; centrifugation, density gradient; cells, cultured; cell differentiation

肝脏干细胞(liver stem cell, LSC)是具有自我增殖和多向分化潜能的细胞,在适当条件下可以向肝细胞、胆管上皮细胞、胰腺细胞^[1]、神经细胞等细胞进行分化。目前 LSC 的来源主要有成体肝脏和胎肝。由于成体肝脏中干细胞数量极少,占肝脏中总细胞数约为 0.5%~1.5%^[2-3],通过 DDC(3,5-dithiocarbonyl-1,4-dihydro-collidine)处理构建肝损伤模型^[4]可提高 LSC 含量;有报道^[5]指出孕 8.5~14.5 d 胎肝中 LSC 的含量可达 2%~5%,且细胞的活性高,便于实验的开展。本实验旨在采用简化的密度梯度离心法联合细胞差异性贴壁法^[6]筛选并培养胎肝干细胞(fetal liver stem cells, FLSC),并验证其具有向肝细胞和胆管上皮细胞双向分化的潜能。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 SPF 级 C57BL/6 孕鼠,孕期 13.5 d,体质量 40~50 g,由重庆医科大学实验中心提供,实验过程对动物的处置符合动物伦理学标准。

1.2 主要试剂与仪器 胰岛素(insulin)、白血病分化抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)、IV 型胶原酶购自美国 Sig-

ma 公司;Percoll 分离液购自美国 Pharmacia 公司;表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)购自美国 Peprotech 公司;清蛋白(ALB)、细胞角蛋白 19(CK19)、肝细胞核因子 4 α (HNF-4 α)兔抗鼠多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;PCR 逆转录试剂盒、TRIzol 购自 Takara 公司。流式细胞仪购自美国 BD 公司;凝胶成像仪购自 Bio-Rad 公司。

1.3 FLSC 的分离 麻醉(4%水合氯醛,10 mL/kg)孕期 13.5 d 的 C57BL/6 小鼠,无菌取出胎肝,剪碎至约 1 mm×1 mm×1 mm 大小,加入 0.1% IV 胶原酶及 DNase I,37℃水浴消化 30 min,吹打混匀后将细胞悬液依次经 75、150 μ m 过滤器过滤。收集滤液,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,重悬沉淀至 2~3 mL。配制 70%、50%、30%的 percoll 密度梯度离心液,重悬的细胞沉淀铺于梯度离心液上方。常温下,400×g 离心 25 min,吸取 30%~50%间的细胞条带;常温下 300×g 离心 10 min,收集沉淀,加入含有 10%胎牛血清(FBS)、2 mmol/L L-谷氨酰胺、20 μ g/L EGF、10 μ g/L LIF、10 mg/L 胰岛素、1×10⁻⁷ mol/

* 基金项目:重庆市卫生局医学科研计划重点项目(2013-1-019)。作者简介:于黎明(1986-),住院医师,在读硕士,主要从事消化内科研究。△ 通讯作者,E-mail: hedoctor65@sina.com。

L 地塞米松、1%青霉素-链霉素双抗的 DMEM/F-12 培养基重悬。台盼蓝染色计算细胞的总数和存活率。

1.4 小鼠 FLSC 的纯化与培养 以 1×10^6 个/皿密度接种至鼠尾胶原包被(浓度^[6]为 1×10^{-10} $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)的 60 mm 培养皿中。置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养,24 h 后换液。待细胞融合约 80%~90%时加入 Tryple Express,37 °C 消化 2.5 min,此时体积较大的肝细胞、星形细胞和成纤维细胞会消化下来,而体积较小的 FLSC 则大部分贴壁。运用此种方法纯化细胞 2~3 次,可以得到纯度较高的 FLSC。

1.5 FLSC 的鉴定

1.5.1 流式细胞术 消化细胞,收集 1×10^6 细胞悬液,离心后含 1%牛血清清蛋白(BSA)的磷酸盐缓冲液(PBS)重悬细胞至 100 μL ,封闭 30 min,加入 CD133、EPCAM、CD49f 抗体及同型对照,4 °C 避光孵育 30 min,离心,PBS 重悬至 100 μL ,流式细胞仪检测。

1.5.2 细胞免疫荧光 接种 FLSC 至 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 鼠尾胶原预包被的铺有爬片的 24 孔板中,37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养 3~5 d,待细胞融合约 30%~50%,取出爬片,预冷 PBS 冲洗 5 min \times 3 次,加入 4%多聚甲醛固定 30 min,PBS 冲洗 5 min \times 3 次,6%大鼠血清室温固定 30 min,加入抗体 CD133、EPCAM、CD49f,4 °C 避光孵育 1 h,PBS 冲洗 5 min \times 3 次,二脒基苯基吲哚(DAPI)染核 5 min,避光条件下 PBS 冲洗 5 min \times 3 次,抗荧光淬灭剂封片,荧光显微镜下观察。

1.6 FLSC 的增殖

1.6.1 FLSC 克隆形成 消化 FLSC,以 1 000 个/孔密度接种至胶原包被的 6 孔板中,添加含有 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ EGF、10 $\mu\text{g}/\text{L}$ LIF 的 DMEM/F-12 培养基,37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养 3~4 周,观察细胞克隆形成的时间、体积及克隆中细胞的数目。

1.6.2 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测干细胞增殖 收集对数生长期的 FLSC,调整细胞浓度至每毫升 4×10^4 个,每孔 100 μL 接种于 96 孔板(4 000 个/孔),每组设 6 个复孔,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中。分别于接种后 1、2、3、4、5 d 加入 20 μL 浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液,37 °C、5% CO₂ 孵箱中继续培养 4 h。吸取孔内培养基,加入 150 μL DMSO,摇床上避光低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。酶标仪测量各孔 490 nm 处的吸光度值[A₄₉₀]。

1.7 检测 FLSC 分化潜能

1.7.1 合成糖原功能检测 除去 LIF 同时添加 1% DMSO、10 $\mu\text{g}/\text{L}$ HGF 合成分化培养基,接种 FLSC,连续培养 2 周,观察细胞形态变化,按照试剂盒说明书进行糖原染色(PAS)^[6-7],正置显微镜下观察细胞质中的糖原颗粒。

1.7.2 细胞免疫荧光 分别接种 FLSC 至普通培养基和分化培养基,37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养 2~3 周,预冷 PBS 冲洗 5 min \times 3 次,加入 4%多聚甲醛固定 30 min,PBS 冲洗 5 min \times 3

次,常温下 0.1% Triton-100 透化细胞 10 min;6%山羊血清室温固定 30 min,分别加入抗体 ALB(1:50)、HNF-4 α (1:50),置于湿盒中,4 °C 孵育过夜,PBS 冲洗 5 min \times 3 次,加入四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC)标记的羊抗兔二抗(1:50)、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗兔二抗(1:50),避光 37 °C 孵育 1 h,PBS 冲洗 5 min \times 3 次;DAPI 染核 5 min,避光条件下 PBS 冲洗 5 min \times 3 次,抗荧光淬灭剂封片正置荧光显微镜下观察。

1.7.3 RT-PCR 检测 收集普通和分化条件下培养 2 周的 FLSC,加入 TRIzol,提取总 RNA,按照试剂盒说明书反转录为 cDNA。用 Prime5.0 软件设计目的基因 AFP、ALB、HNF-4 α 及内参 GAPDH 的 PCR 引物序列,委托上海英俊公司进行引物的合成。引物序列见表 1。反应条件:95 °C 10 min;95 °C 30 s,54~58 °C 30 s,72 °C 30 s,35 个循环;最后 72 °C 10 min;3%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪显影。

1.8 检测 FLSC 胆管上皮细胞分化潜能 培养基中除去 LIF,同时接种 FLSC 至细胞外基质上,观察细胞形态学差异性,同时应用细胞免疫荧光技术及 RT-PCR 检测胆管细胞标记物 CK19 的表达。

1.9 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行单因素方差分析及 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FLSC 分离与培养 FLSC 接种后生长缓慢,约 1~2 周后细胞活化增殖加快,体积小,成圆形或卵圆形(图 1A);连续培养后 FLSC 逐渐增多,排列紧密(图 1B)。培养至融合约 80%~90%时,消化细胞按 1:2 传代,传代后的细胞生长迅速,增殖能力较原代细胞明显增强(图 1C),但连续多次传代后,细胞增殖能力则逐渐下降。

2.2 FLSC 鉴定

2.2.1 细胞免疫荧光检测干细胞表面标记物的表达 结果显示卵圆形、多边形 FLSC 中 EPCAM、CD133 阳性表达(图 2A);而集落样排列的 FLSC 中,CD49f 高表达,EPCAM 表达相对较弱(图 2B)。

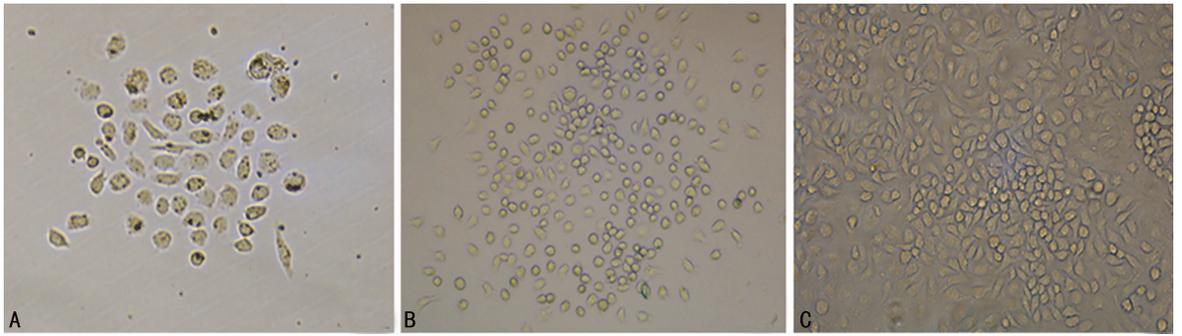
2.2.2 流式细胞术检测 FLSC 中 CD133、CD49f、EPCAM 阳性率分别为(97.95 \pm 1.21)%、(92.71 \pm 3.49)%、(50.73 \pm 3.45)%(*n* = 3)。

2.3 FLSC 增殖

2.3.1 FLSC 平板克隆实验结果 实验发现接种细胞密度较低时细胞增殖能力受到抑制,提高接种密度后细胞增殖能力明显增强。FLSC 接种后连续培养 2 周开始出现小的细胞克隆,继续培养至 4 周可见细胞克隆体积增大,克隆中细胞数目明显增加。

表 1 引物序列和退火条件

基因	引物	产物大小 (bp)	退火温度 (°C)
AFP	反向:5'-CCTGACATCCAGGTAGATTTCCA-3'正向:5'-ACCTTCCTGTCTCAGTCATTCT-3'	93	58
ALB	反向:5'-TTACTTCCTGCACTAATTTGGCA-3'正向:5'-CAAGAGTGAGATCGCCCATCG-3'	131	54
CK19	反向:5'-GAGGACGAGGTCACGAAGC-3'正向:5'-GTTTCAGTACGCATTGGGTCAG-3'	109	58
HNF-4 α	反向:5'-TGGGAGAGGTGATCTGCTGGGA-3'正向:5'-CGGGCTGGCATGAAGAAGGAAG-3'	142	54
GAPDH	反向:5'-GGGGTCGTTGATGGCAACA-3'正向:5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTG-3'	95	54



A:FLSC 原代培养 2 周;B:FLSC 原代培养 3 周;C:第二代培养 2 周。

图 1 FLSC 原代培养相差显微镜图(×100)

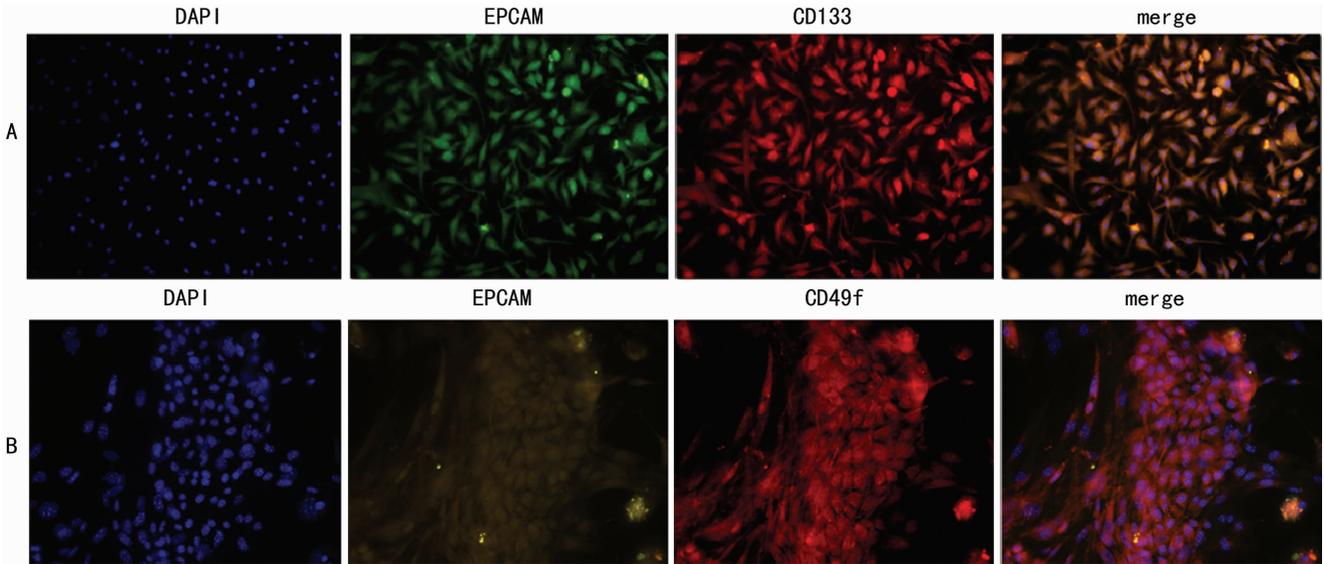


图 2 细胞免疫荧光鉴定 FLSC 中 EPCAM、CD133、CD49f 的表达(×100)

2.3.2 细胞增殖曲线 结果显示 FLSC 接种后 1~2 d 内增殖缓慢,3 d 后, A_{490} 值增加明显,FLSC 表现出强大的增殖能力(图 3)。

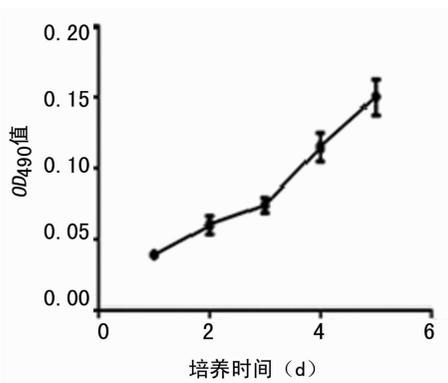


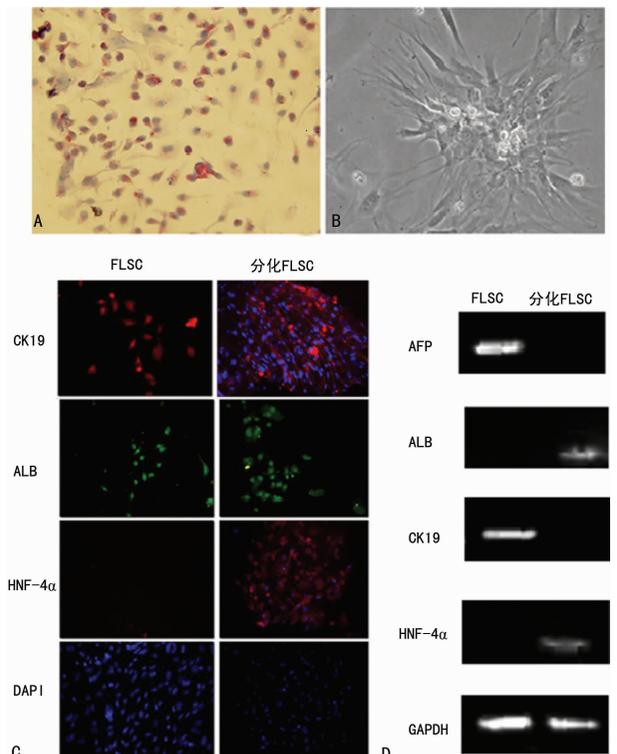
图 3 FLSC 增殖曲线

2.4 FLSC 具有双向分化潜能

2.4.1 PAS 结果 FLSC 在分化培养基中连续培养 2~3 周,部分细胞体积增大,脱离细胞集落且出现双细胞核,PAS 结果显示,细胞质中可见红色的糖原颗粒(图 4A)。FLSC 接种至细胞外基质中,可见细胞集落伸出树枝状结构(图 4B)。

2.4.2 细胞免疫荧光检测 FLSC 中 CK19、ALB、HNF-4 α 的表达 结果显示 FLSC 表达 ALB,低表达或不表达 HNF-4 α ,在分化培养条件下细胞出现双核结构,且成熟肝细胞标记物 ALB 和 HNF-4 α 表达明显增加;在细胞外基质中培养,细胞出

现导管状结构,同时高表达胆管细胞标记物 CK19(图 4C)。



A、B: PAS; C: 免疫荧光图(×200); D: RT-PCR 凝胶分离图。

图 4 FLSC 具有双向分化潜能

2.4.3 RT-PCR 检测 FLSC 分化前后 AFP、ALB、CK19、HNF-4 α 结果与细胞免疫荧光较为一致,分化条件下连续培养 2~3 周,AFP、CK19 表达降低,ALB、HNF-4 α 表达增强。

3 讨论

LSC 是一种具有自我增殖和多向分化潜能的细胞,有研究指出 LSC 起源于肝脏组织,而不是来源于肝脏外的造血干细胞或骨髓干细胞^[8],同时 LSC 与肝细胞癌、肝脏的损伤后修复有重要关系。普遍认为在正常情况下,LSC 处于静息状态,当肝脏急性损伤后肝内的 LSC 会爆发性增殖,但肝脏慢性损伤时,LSC 则不会增殖^[8]。由于成体肝脏中 FLSc 的含量稀少,且细胞多处于静息状态,虽然有研究采用 DDC 饮食构建急性肝损伤模型^[4],促进 LSC 的增殖,但是成体肝脏中含有实质细胞和非实质细胞^[9],细胞种类较多,普通方法难以分离,目前多采用细胞流式分选法联合或不联合免疫磁珠分选法^[2],虽然明显提高了 LSC 的含量与纯度,但是由于 LSC 没有特异性的标记物,分选时通常需要联合多种表面标记物,如 EP-CAM^[9-10]、CD133^[2]、CD49f 等阳性分选,CD31、CD45、CD11b 等阴性分选,造价较高,同时细胞流式分选术和免疫磁珠分选术对实验条件、技术、设备等要求较高,限制了成体肝脏 LSC 的分离及应用。有报道^[5]指出胎肝中 LSC 含量较丰富,远高于成体肝脏中 LSC 的含量,同时胎肝中干细胞的活性更高,便于干细胞的分离、培养和后续试验的开展。Liu 等^[5]在实验中发现通过构建 30%、50%、70% 不同密度的 percoll 液经非连续密度梯度离心后,大鼠 FLSC 主要集中在 30%~50% 的 percoll 液层面中,而早期在(choline-deficient ethionine,CDE)饲喂构建小鼠肝脏损伤模型中发现,肝脏卵圆细胞则主要集中于 20% percoll 液层面^[11]。但是针对小鼠 FLSC 的研究则不多。

本研究中采用非连续密度梯度离心分离孕期 13.5 d 的小鼠胎肝,发现 FLSC 主要集中于 30%~50% 的 percoll 液层面中,与早前大鼠中的结果相一致^[5],通过联合后期细胞差异性消化法,成功分离出 FLSC。经流式细胞术联合细胞免疫荧光技术检测,验证了筛选的 FLSC 高表达 CD133、CD49f、EPCAM 等目前常用的干细胞表面标记物;同时通过细胞克隆增殖实验发现细胞接种后 1~2 周内开始活化,之后表现出强大的增殖能力;在 HGF 及 DMSO 促肝细胞分化条件下,连续培养 2~3 周后,PAS 实验、细胞免疫荧光、RT-PCR 等实验结果表明细胞向肝细胞方向进行分化,这与之前的研究相一致^[4-5]。将细胞接种于细胞外基质上,连续培养后发现细胞周边出现胆管上皮细胞特异性的树枝状结构和高表达 CK19 的导管状细胞结构,早前的研究认为 CK19 主要表达于胆管区域,同时也表达于许多 LSC^[3],可以作为胆管上皮细胞和 LSC 共同的标记物。

本实验成功分离出纯度较高的 FLSC,方法较为简单,便于后续实验的开展。肝脏 LSC 对肝细胞癌及急性肝损伤后的治疗有重要的意义,有文献^[12]报道肝脏 LSC 与肿瘤 LSC 有一定的关系,在适当条件下可以转化为肿瘤 LSC,进而引发肝癌,但二者之间发生转化的具体机制仍未明了,同时肝脏 LSC 向肝细胞、胆管上皮细胞、软骨细胞、胰岛细胞等进行分化的具体机制还不清楚,研究这些问题将对未来肝细胞癌的治疗产生重要的意义。

参考文献

- [1] Cardinale V, Wang Y, Carpino G, et al. Multipotent stem/progenitor cells in human biliary tree give rise to hepatocytes, cholangiocytes, and pancreatic islets[J]. *Hepatology*, 2011, 54(6): 2159-2172.
- [2] Rountree CB, Ding W, Dang H, et al. Isolation of CD133⁺ liver stem cells for clonal expansion[J]. *J Vis Exp*, 2011, 10(56): 3183.
- [3] Turner R, Lozoya O, Wang Y, et al. Human hepatic stem cell and maturational liver lineage biology[J]. *Hepatology*, 2011, 53(3): 1035-1045.
- [4] Galicia VA, He L, Dang H, et al. Expansion of hepatic tumor progenitor cells in Pten-null mice requires liver injury and is reversed by loss of AKT2[J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(6): 2170-2182.
- [5] Liu WH, Li R, Dou KF. Convenient and efficient enrichment of the CD133⁺ liver cells from rat fetal liver cells as a source of live stem/progenitor cells[J]. *Stem Cell Reviews*, 2011, 7(1): 94-102.
- [6] Luo N, Cai Y, Zhang J, et al. The C-terminal region of the hepatitis B virus X protein is required for its stimulation of HBV replication in primary mouse hepatocytes[J]. *Virus Res*, 2012, 165(2): 170-178.
- [7] Bi Y, Huang J, He Y, et al. Wnt antagonist SFRP3 inhibits the differentiation of mouse hepatic progenitor cells[J]. *J Cell Biochem*, 2009, 108(1): 295-303.
- [8] Rountree CB, Mishra L, Willenbring H. Stem cells in liver diseases and cancer: recent advances on the path to new therapies[J]. *Hepatology*, 2012, 55(1): 298-306.
- [9] Yoon SM, Gerasimidou D, Kuwahara R, et al. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) marks hepatocytes newly derived from stem/progenitor cells in humans[J]. *Hepatology*, 2011, 53(3): 964-973.
- [10] Yamashita T, Ji J, Budhu A, et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features[J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(3): 1012-1024.
- [11] Tirnitz-Parker JE, Tonkin JN, Knight B, et al. Isolation, culture and immortalisation of hepatic oval cells from adult mice fed a choline-deficient, ethionine-supplemented diet[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(12): 2226-2239.
- [12] Wang C, Yang W, Yan HX, et al. Hepatitis B virus X (HBx) induces tumorigenicity of hepatic progenitor cells in 3, 5-diethoxycarbonyl-1, 4-dihydrocollidine-treated HBx transgenic mice[J]. *Hepatology*, 2012, 55(1): 108-120.