

文章编号:1005-6947(2008)11-1084-04

· 基础研究 ·

成体小鼠肝脏卵圆细胞的分离及培养

张磊, 王伟伟, 梁慧芳, 陈孝平, 张万广, 张伟

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 肝脏外科中心, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 建立一种稳定的成体小鼠卵圆细胞的分离和培养方法。方法 采用喂饲2-乙酰氨基苄(AAF)加2/3肝切除方法诱导肝脏卵圆细胞的增殖。经门静脉灌注消化法和等密度离心法分离卵圆细胞,并在体外进行长期培养。免疫荧光和免疫双标法对培养的卵圆细胞加以鉴定。结果 体外培养的卵圆细胞呈集落样生长,稳定传代并已培养至3个月。免疫荧光和免疫双标法证实培养的细胞为卵圆细胞,并显示该细胞具有分化潜能。结论 该方法是一种稳定的成体小鼠卵圆细胞的分离和培养方法,为肝脏干细胞的相关研究和应用奠定基础。

[中国普通外科杂志,2008,17(11):1084-1087]

关键词: 卵圆细胞,肝;细胞分离;细胞鉴定;细胞培养

中图分类号:R 36-33

文献标识码:A

Isolation and culture of hepatic oval cells from adult mice

ZHANG Lei, WAN Weiwei, LIANG Huifang, CHEN Xiaoping, ZHANG Wanguang, ZHANG Wei
(Hepatic Surgery Center, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: Objective To establish a reliable method for isolation and culture of murine adult oval cells.

Methods Oval cell response was stimulated by treatment with N-2-acetylaminofluorene (2-AAF) diet and partial hepatectomy. A modification of a two-step perfusion protocol and isopycnic centrifugation were used to isolate oval cells from livers. Immunofluorescence and double-fluorescence immunostaining were used for identification of oval cells. **Results** Isolated oval cells were grown as colonies in vitro and had been cultured for three months. Isolated cells were identification by immunofluorescence and double-fluorescence immunostaining, which also indicated isolated cells were bipotential. **Conclusions** This method mentioned above is a reliable method for isolation and primary culture of oval cells, which would provide a useful tool for investigating oval cell biology. [Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(11): 1084-1087]

Key words: Oval Cell, Liver; Cell Separation; Characterization; Cell Culture

CLC number: R 36-33

Document code: A

正常情况下肝组织损伤后多由残存的肝实质细胞再生加以修复,但当肝实质细胞无法再生或再生受抑时,肝脏祖细胞被诱导增殖进行修

复^[1-5]。在啮齿类动物体内,肝脏祖细胞被称为卵圆细胞。卵圆细胞具有双向分化潜能,可以分化为肝实质细胞和胆管上皮细胞,在特定情况下,还可以分化为神经胶质细胞、胰腺内分泌细胞和心肌细胞^[6-8]。目前,卵圆细胞的研究主要集中在细胞治疗和成瘤两方面,但相关研究多为体内实验。因此,建立一种稳定的卵圆细胞分离和培养方法非常重要。现有方法主要是利用大鼠,而分离和培养小鼠卵圆细胞的相关报道较少。本文介绍本实验室建立的小鼠卵圆细胞的分离、培养,对所培养细胞鉴定方法。

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(30430670);卫生部部属医院临床学科重点项目(2007-353);湖北省肝脏外科医学研究中心项目。

收稿日期:2008-08-20; **修订日期:**2008-10-20。

作者简介:张磊,男,华中科技大学同济医学院附属同济医院博士研究生,主要从事肝脏疾病的临床与基础方面的研究。

通讯作者:陈孝平 E-mail:chenxp@medmail.com.cn

1 材料与amp;方法

1.1 实验试剂和器材

高糖DMEM, F-10、胶原酶IV和胎牛血清购自Gibco公司;小鼠IV型胶原蛋白购自R&D公司;2-乙酰氨基芴(2-AAF), 链霉蛋白酶E (pronase E), DNA酶I (Dnase I), Percoll和胰岛素购自Sigma公司;丙酮酸激酶M2型(PKM2)抗体购自Cell Signaling公司;CK19抗体购自Abcam公司;各种二抗购自武汉博士德公司;25 cm²培养瓶购自Corning公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型的建立 采用8周雄性Balb/c小鼠(购自华中科技大学同济医学院实验动物中心),在饮水中加入AAF,浓度为0.04%,持续喂饲5 d;于第6天在乙醚麻醉下行2/3肝切除。手术后继续喂饲AAF,分别于术后4, 6, 8 d剖杀动物,留取部分肝组织待测并分离卵圆细胞。

1.2.2 卵圆细胞的分离 乙醚麻醉后开腹,暴露门静脉,置入肝素化静脉留置针后固定;100 mL 37 °C预热的磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗肝内血液,0.01% 胶原酶IV 20 mL以2 mL/min速度灌注10 min;取下肝组织置入含0.01% 胶原酶IV的高糖DMEM中,剪碎后吹打分散细胞,并过100目筛网;离心法分离肝脏非实质细胞,加入含0.01% pronase E和0.005% Dnase I的消化液,37 °C消化30 min;Percoll梯度离心提取卵圆细胞,LE培养基悬浮细胞^[9],接种于培养瓶,37 °C 5% CO₂培养。

1.2.3 卵圆细胞增殖的测定 对留取的肝组织常规用10%中性多聚甲醛固定,石蜡包埋,4 μm切片。切片脱蜡,PBS洗3次;3% H₂O₂去除内源性过氧化物酶,PBS洗3次;抗原微波热修复,血清封闭和阻断非特异性反应;滴加一抗,4 °C过夜;PBS洗3次,滴加过氧化物酶标记二抗,37 °C 1 h, DAB显色,复染、脱水、透明封片,镜下观察。

1.2.4 卵圆细胞的鉴定 接种分离的细胞置24孔板内。当细胞生长至合适密度时,PBS洗3次,以4 °C预冷的丙酮与甲醇混合物(1:1)固定;PBS洗3次,0.1% 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)处理,血清封闭和阻断非特异性反应;滴加一抗,4 °C过夜;PBS洗3次,滴加生物素标记

二抗,37 °C 30 min;滴加亲和素-FITC,37 °C 30 min,4',6-二脒基-2-苯吡啶盐酸(DAPI)染核,荧光显微镜下观察。为进一步明确细胞特性:进行免疫双标实验,前期处理同上,滴加PKM2抗体,4 °C过夜;PBS洗3次,滴加生物素标记二抗,37 °C 30 min;PBS洗3次,滴加CK19抗体,4 °C过夜;滴加亲和素-FITC和Cy-3标记二抗,37 °C 30 min,在Nikon Digital ECLIPSE C1激光共聚焦显微镜下观察。

1.3 统计学处理

数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用SPSS12.0统计软件包进行t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 分离细胞的特点

经肝脏原位灌注、酶消化和Percoll密度梯度离心法获得的细胞组成:卵圆细胞约90%,星形细胞约9%,成纤维细胞<1%。充分的肝脏灌注后,分离细胞中只有极少数血细胞;pronase E和Dnase I消化后,分离的细胞中无肝实质细胞。

2.2 卵圆细胞的培养

分离纯化的卵圆细胞呈单个游离状态,培养1 h后少数开始贴壁,24 h后大部分贴壁。贴壁细胞呈圆形或卵圆形,表现为上皮细胞的特点。在培养后约7 d逐渐聚集,14 d呈克隆样增殖,20 d开始大量增殖(图1)。

2.3 卵圆细胞的鉴定

PKM2和CK19均是常见的小鼠卵圆细胞标志物,均为胞浆表达。PKM2主要在卵圆细胞和未成熟肝实质细胞内表达,CK19主要在卵圆细胞和胆管上皮细胞内表达。卵圆细胞内两者均有表达,少数卵圆细胞为单一标志物阳性。在双表达的细胞中,两种标志物的表达强度并不一致(图2)。

2.4 小鼠肝脏卵圆细胞的增殖情况

本模型可见,随着时间的延长,肝组织内PKM2和CK19阳性细胞增多,显示有明显的卵圆细胞增殖。在肝切除后第6天最为明显,表现为卵圆形小核细胞增多,细胞胞浆少,体积大小不一,增殖的卵圆细胞呈团簇状,分布于汇管区及其周围,或呈团状向肝实质内延伸(图3)。

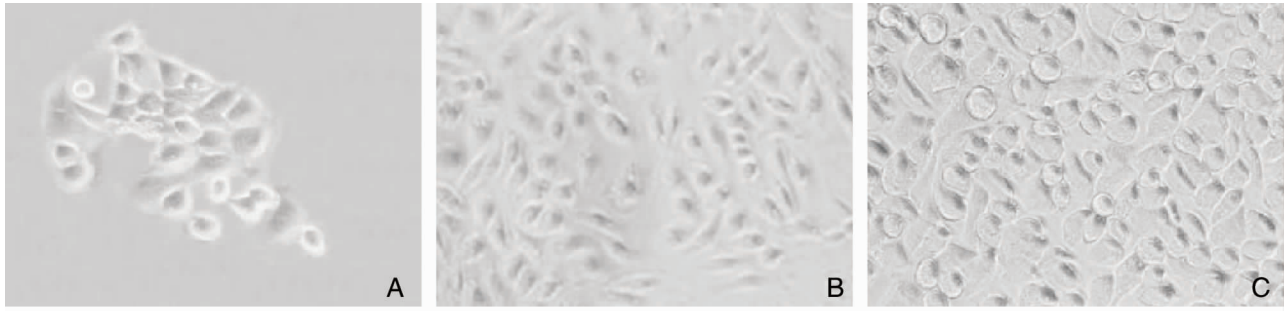


图1 卵圆细胞的培养($\times 200$) A:7 d; B:14 d; C:20 d

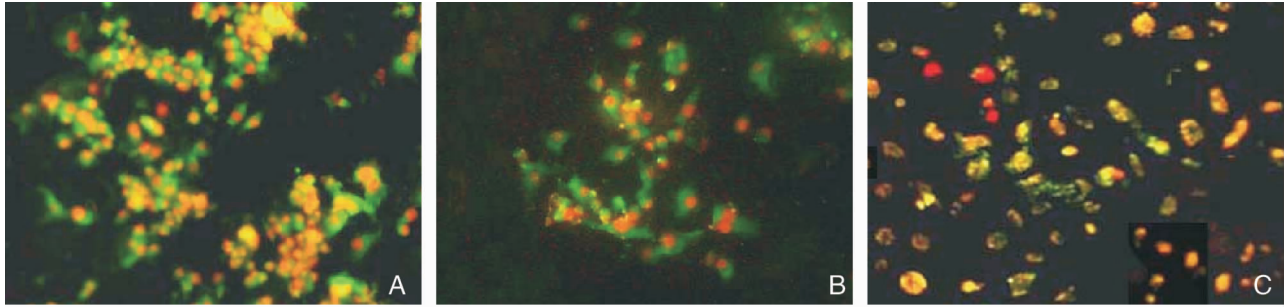


图2 卵圆细胞的鉴定($\times 200$) A:PKM2 的表达; B:CK19 的表达; C:双标的结果

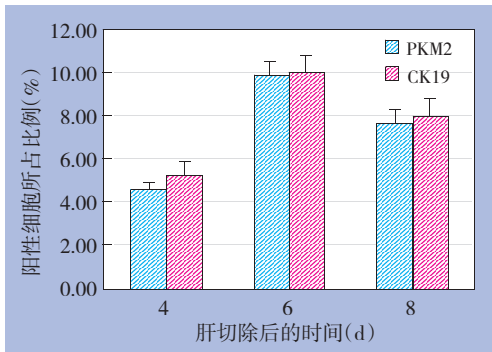


图3 AAF + 肝切除诱导的卵圆细胞增殖情况($\times 40$)

3 讨论

AAF + 肝切除模型是目前最常用的大鼠卵圆细胞增殖模型。本实验结果显示本方法同样可应用于小鼠,小鼠行 AAF + 肝切除后肝脏有明显的卵圆细胞增殖。与其他诱导方式相比,本方法诱导时间更短。在大鼠模型中,卵圆细胞沿肝细胞索向肝实质中延伸,并形成小胆管状结构。而在小鼠模型中,增殖的卵圆细胞始终分布于门静脉周围,未分化为肝实质细胞或胆管上皮细胞,提示卵圆细胞的增殖并非为了修补损伤的肝组织,从本模型中分离的卵圆细胞可能保持更长时间的分化潜能。

分离纯化卵圆细胞的方法有离心冲洗^[10-11]、

梯度离心加免疫磁珠分选^[12]、Histopaque 密度梯度方法^[13]和 Percoll 方法等。Percoll 分离与前3种方法相比更为经济、省时和不需要特殊的设备和试剂。更为重要的是 Percoll 分离得到的卵圆细胞为异型性的,代表了肝脏中各种亚型的卵圆细胞;而其他方法针对某种标志物,只能得到一种亚型的卵圆细胞。该法分离培养中主要的污染细胞是星形细胞,它可分泌多种因子促进卵圆细胞的增殖和分化^[14]。因此,在培养早期适当地保留星形细胞有利于卵圆细胞的增殖。星形细胞和卵圆细胞的贴壁时间均在 24h 左右。使用反复贴壁的方法无法去除星形细胞,0.25% 的胰蛋白酶 5 min 消化即可去除星形细胞。通过离心和 pronase 及 Dnase I 的充分消化,分离的细胞中无肝实质细胞。本研究通过卵圆细胞和星形细胞的共培养,可以观察星形细胞是如何诱导卵圆细胞分化的。

正常情况下,卵圆细胞分布于门静脉区,数量极少,具有独特的形态特征:细胞体积较小、高核浆比、胞浆较少且淡、细胞器较少,在多个方面具备肝实质细胞和胆管上皮细胞的特征。本实验分离培养的细胞同样存在这种特征,PKM2 和 CK19 共表达,说明培养的细胞有双向分化的潜能。卵圆细胞的定向分化机制目前尚不明了。本试验的结果显示:PKM2 和 CK19 同时表达在卵圆细胞的胞浆内,但部分细胞两者的表达强度并

不一致。由此推测,部分卵圆细胞已有定向分化的趋势。至于其机制有待进一步研究。

总之,AAF + 肝切除这种诱导卵圆细胞增殖的方法同样适用于小鼠。这种小鼠成体卵圆细胞的分离和培养方法是一种稳定和经济学的方法,培养的卵圆细胞同样具备双向分化潜能。这为卵圆细胞的相关研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Libbrecht L, Desmet V, Van Damme B, *et al.* The immunohistochemical phenotype of dysplastic foci in human liver: correlation with putative progenitor cells [J]. *J Hepatol*, 2000, 33(1): 76 - 84.
- [2] Selden C, Chalmers SA, Jones C, *et al.* Epithelial colonies cultured from human explanted liver in subacute hepatic failure exhibit hepatocyte, biliary epithelial, and stem cell phenotypic markers [J]. *Stem Cells*, 2003, 21(6): 624 - 631.
- [3] Lowes KN, Croager EJ, Abraham LJ, *et al.* Upregulation of lymphotoxin β expression in liver progenitor (oval) cells in chronic hepatitis C [J]. *Gut*, 2003, 52(9): 1327 - 1332.
- [4] 谭岫,陈积圣. 肝肿瘤干细胞的研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2008, 17(1): 79 - 81.
- [5] 张伟,陈孝平. 卵圆细胞与肝脏微环境[J]. *中国普通外科杂志*, 2008, 17(1): 82 - 84.
- [6] Deng J, Steindler DA, Laywell ED, *et al.* Neural trans-differentiation potential of hepatic oval cells in the neonatal mouse brain [J]. *Exp Neurol*, 2003, 182(2): 373 - 382.
- [7] Yang L, Li S, Hatch H, *et al.* In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone producing cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(12): 8078 - 8083.
- [8] Muller-Borer BJ, Cascio WE, Anderson PA, *et al.* Adult-derived liver stem cells acquire a cardiomyocyte structural and functional phenotype ex vivo [J]. *Am J Pathol*, 2004, 165(1): 135 - 145.
- [9] Lázaro CA, Rhim JA, Yamada Y, *et al.* Generation of hepatocytes from oval Cell precursors in culture [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(23): 5514 - 5522.
- [10] Kaplanski C, Pauley CJ, Griffiths TG, *et al.* Differentiation of rat oval cells after activation of peroxisome proliferator-activated receptor α 43 [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(3): 580 - 587.
- [11] Dumble ML, Croager EJ, Yeoh GC, *et al.* Generation and characterization of p53 null transformed hepatic progenitor cells: oval cells give rise to hepatocellular carcinoma [J]. *Carinogenesis*, 2002, 23(3): 435 - 445.
- [12] Wright N, Samuelson L, Walkup MH, *et al.* Enrichment of a bipotent hepatic progenitor cell from naïve adult liver tissue [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 366(2): 367 - 372.
- [13] Corcelle V, Stieger B, Gjinovci A, *et al.* Characterization of two distinct liver progenitor cell subpopulations of hematopoietic and hepatic origins [J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(15): 2826 - 2836.
- [14] Nagai H, Terada K, Watanabe G, *et al.* Differentiation of liver epithelial (stem-like) cells into hepatocytes induced by coculture with hepatic stellate cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 293(5): 1420 - 1425.

胆道系统恶性肿瘤外科治疗及其进展学习班(第二期)通知

为了促进我国胆道系统恶性疾病的基础研究和临床诊疗水平的提高,总结和交流近年来胆道肿瘤外科工作的新进展以及学术研究成果,以便进一步推动本学科的发展,由第二军医大学东方肝胆外科医院主办的“胆道系统恶性肿瘤外科治疗及其进展”学习班(第二期)即将召开。现将有关事项通知如下:1. 授课时间:2008-12-08至2008-12-12;2. 授课地点:上海东方肝胆外科医院示教室;3. 报到时间:2008-12-07 全天报到;4. 招生对象:全国普通外科或肝胆外科主治以上医务人员(含主治医师);5. 学分授予:完成学业,授予国家 I 类学分 12 分;6. 收费标准:培训费 1200 元,食宿统一安排,费用自理;7. 报名办法:可来信或来电报名,通讯地址:上海长海路 225 号东方肝胆外科医院胆道一科,邮编:200438。联系人:罗祥基/谭蔚锋,联系电话:02165564166 - 70768/75388,13636319828/13817566840, E-mail: twf1231@263.net, 报名者可以打电话索取报名表,也可以发 E-mail 索取电子版报名表。