

小鼠胎肝细胞透明质酸3D培养体系的建立

颜洁心¹ 王怡² 王韞芳¹

(¹ 广西医科大学, 南宁 530021;

² 北京军事科学院 军事医学研究院 卫生勤务与血液研究所 再生医学研究室, 北京 100039)

摘要 目的 利用透明质酸建立小鼠胎肝细胞3D培养体系。方法 分离获得胚胎12-14天胎肝细胞,利用KM培养基进行初步2D肝干/祖细胞的筛选培养,并利用透明质酸及KM培养基配制水凝胶建立3D细胞培养体系。结果 胎肝细胞在2D体系中呈现克隆状生长。分离培养获得的肝干/祖细胞克隆在透明质酸建立的3D培养体系保持增殖活性,并进一步获得肝细胞功能特性,表现为3D培养上清中白蛋白合成和尿素水平显著增加。Q-PCR结果显示随着3D培养时间的延长,其肝细胞干性标志如AFP、CK19、EpCAM、Prox1等表达水平都大幅度降低且接近成年小鼠肝脏表达水平。结论 本研究成功建立基于透明质酸的小鼠胎肝细胞的3D无血清培养体系,并可促进小鼠胎肝细胞肝细胞功能进一步成熟。

关键词 胎肝细胞,3D培养,透明质酸

科学分类号

DOI: 10.16476/j.pibb.xxxx.0001

非常感谢编辑老师提出的修改意见,各图译文已在文中相应位置修改,图1~7的高精度图文件已按要求上传。

非常感谢审稿老师提出的评审意见,我们已针对这些问题做出补充实验和相应修改,具体如下:

1. 有些语句存在语义错误,需要再仔细修改。

我们进一步通读全文,并对文章的撰写进行进一步推敲,修正文中表述错误的地方。

2. 为什么只选择培养5天,这个培养周期会不会太短?

本文中显示的数据是阶段性结果,旨在建立这一3D培养体系,为后续研究奠定基础。在实际应用中,将在此基础上,进一步考察其他基质组分对肝细胞功能的影响。

3. 图三中可看到细胞球聚集在一起,为什么在后续的荧光染色中只是独立的单个细胞球?

在免疫荧光染色时,我们选取部分细胞球为样品。由于免疫荧光染色需要经历固定、破膜、抗体孵育和洗涤等多个步骤,而细胞球之间的连接相对脆弱。当免疫染色过程中,细胞球与球分离,在最终激光共聚焦荧光显微镜拍摄中,通常可以获得单个细胞球的染色结果。

4. 对于图5, 6, 7的实验数据的阐释太简单,还需再深入。

谢谢审稿老师的意见,我们在文章中相应位置做进一步阐释。

5. 图6细胞球的免疫荧光染色, 只给出第5天的实验结果, 并不能体现出蛋白的表达趋势。

谢谢老师的意见。已添加第3天染色结果, 与第5天结果进行对比, 表现部分蛋白表达变化。这些结果与文章定量PCR结果相互呼应, 显示3D体系的建立以及其对肝细胞功能的支持作用。

Tel: 13126822167 E-mail: wangyf2011126@126.com

肝移植是目前临床上治疗肝癌、终末期肝病等难治性肝病的主要手段, 而器官短缺、免疫排斥反应、价格昂贵等因素, 严重限制了该手段在临床上的应用。作为替代手段, 肝细胞移植技术简单、免疫排斥反应相对减轻, 对患者伤害小, 应用前景好^[1,2]。近年来肝细胞发育领域的巨大进展, 使得肝干/祖细胞以至于多能干细胞成为终末期肝病细胞治疗理想种子细胞来源^[3,4]。然而如何获得具有增殖分化能力、贴近体内功能的肝细胞并安全地投入临床仍是一个问题。

在体内, 细胞周围通常是由细胞外基质所包绕或是由其他细胞直接接触, 细胞处在一个三维(3 dimension, 3D)的环境中进行生命活动。与2D培养体系相比, 3D体系能更好地模拟细胞在人体的生长环境^[5]。

3D细胞培养依赖的支架材料主要包括以几丁质、胶原等ECM成分为代表的天然材料, 以及聚酯类可降解聚合物(如聚乳酸、聚乙醇酸、聚乳酸乙醇胺和聚乳酸/羟基乳酸共聚物)等合成材料^[6]。作为糖氨聚糖家族的一员, 透明质酸是细胞外基质的重要组成部分, 在脐带、玻璃体、滑膜液等体液和组织中都可富含。它可作为生物支架与其他基质成分结合, 同时在多种生命活动中, 如调控细胞黏附、细胞凋亡、细胞分化、细胞增殖、传递信号等^[7,8], 透明质酸都发挥重要的生物学作用。由于其独特的粘弹性和极好的生物相容性, 透明质酸是理想的3D细胞培养依赖的材料来源之一^[9]。本文以透明质酸为基础成功构建胎肝细胞的3D培养体系, 并实现肝细胞功能的明显增强。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF级孕12-14日龄C57BL/6J雌性小鼠, 由斯

贝福公司提供遵循的程序符合国家及提供实验动物单位制订的有关实验动物福利的规则和制度。

1.2 小鼠胎肝细胞的分离培养及鉴定

以脊椎脱臼法处死孕鼠, 以70%酒精消毒, 于超净台中开腹, 取出胎肝置于0.01%□型胶原酶(SIGMA, C5138)溶液中, 剧烈震荡后37□消化6分钟。离心收集细胞, 以accutase消化酶(SIGMA, A6964)重悬细胞, 剧烈震荡后37□消化至单细胞悬液。离心收集细胞, 以含2%胎牛血清(Biological Industries, 04-001-1A)的PBS缓冲液重悬细胞, 过70μm筛网, 离心收集细胞, 以含8%胎牛血清的KM培养基^[10](RPMI 1640(GIBCO, 31800105), 0.1%白蛋白(GIBCO, 11021029), 4.5 mM尼克酰胺, 0.1 nM硫酸锌, 10⁻⁸ M氢化可的松, 5 μg/ml转铁蛋白, 5 μg/ml胰岛素, 游离脂肪酸)重悬细胞, 以2×10⁵/平方厘米种于0.1%明胶打底的6孔板中, 于37□、5% CO₂普通培养箱中培养。细胞贴壁后, 将培养基换成不含血清的KM培养基, 此后隔日换液。

1.3 3D细胞培养体系的建立

透明质酸(SIGMA, 53747)60Gry照射灭菌后, 利用KM培养基配置成20mg/ml, 并以500μl/孔加至24孔板中。将加好透明质酸的孔板置于37□、5%CO₂普通培养箱中孵育30分钟。将培养3天的胎肝细胞克隆以2mg/ml的Dispase消化酶37□消化, 使得每个细胞团约包含50-100个细胞, 离心收集细胞, 以无血清的KM培养基重悬细胞团, 将细胞团以2×10⁵/孔沿孔壁缓慢加至装有透明质酸的24孔板中, 37□、5% CO₂普通培养箱中孵育2小时, 沿孔壁缓慢加入无血清的KM培养基, 使液体总量达1ml/孔, 37□、5% CO₂普通培养箱中培养, 隔天补液。

1.4 3D细胞培养体系功能检测

荧光实时定量PCR

离心收集细胞至1.5ml离心管中, 利用RNA提取细胞试剂盒(Invitrogen, 12183025), 提取细胞总RNA, 利用Aver反转录试剂盒(toyobo)获得cDNA, Syber Green法行荧光实时定量PCR测定基因的表达。所用引物列表参见表格1, 比较胎肝细胞AFP、CK19、EpCAM、Prox1、G6PC、CYP3A41a mRNA的表达。

尿素检测

提前24小时将孔板中的培养基更换为含1mM NH₄Cl的无酚红、无血清KM培养基, 37□、5%CO₂普通培养箱中孵育24小时, 收取上清。按照尿素试

Table 1 Primer sequence for Q-PCR

Gene	Forward primer 5' → 3'	Reverse primer 5' → 3'
AFP	CTTCCCTCATCCTCTGCTAC	ACAAACTGGGTAAGGTGATGG
CK19	GGGGGTTCAGTACGCATTGG	GAGGACGAGGTCACGAAGC
EpCAM	GCGGCTCAGAGAGACTGTG	CCAAGCATTAGACGCCAGTTT
Prox1	AGAAGGGTTGACATTGGAGTGA	TGCGTGTTGCACCACAGAATA
G6PC	CGACTCGTATCTCCAAGTGA	GTTGAACCAGTCTCCGACCA
CYP3A41a	TGGACAGAATGAAGGAAAGCC	AATGACTGGGCTGTGATCTC
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTC

剂盒(BioAssay System, DIUR-100)说明书测定上清包含的尿素量。

白蛋白测定

提前24小时将孔板中的培养基更换为无酚红、无血清KM培养基, 37℃、5%CO₂普通培养箱中孵育24小时, 收取上清。按照小鼠白蛋白酶联免疫测定试剂盒(Bethyl, E99-134)测定上清中白蛋白(Albumin, ALB)含量。

1.5 细胞免疫荧光

向培养5天的3D胎肝细胞中加入透明质酸酶(SIGMA, H3506), 37℃消化2小时, PBS缓冲液洗涤细胞, 离心收集细胞球。将收集的3D细胞球和2D培养的胎肝细胞用4%多聚甲醛溶液室温固定20分钟, PBS缓冲液洗3次, 用0.2% TritonX-100室温孵育10分钟破膜, 分别用10%驴血清或10%羊血清室温孵育1小时, 一抗4℃孵育过夜, PBS缓冲液洗3次, 二抗室温避光孵育1小时, PBS缓冲液洗3次, 300μM DAPI 1:1000稀释室温避光孵育10分钟,

PBS缓冲液洗3次, 封片, 拍照。

1.6 3D细胞活力的鉴定

活死细胞染色

取培养至第5天3D胎肝细胞球, 用PBS缓冲液洗3次, 利用细胞活力染色试剂盒(LIVE/DEAD™ Viability / Cytotoxicity Kit, for mammalian cells, Invitrogen, L3224)检测培养的细胞球的活力。

1.7 统计学分析

数据以平均值±标准误的格式显示, 利用Student T检验进行统计学分析。P<0.05为有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠胎肝细胞的分离培养

用无血清的KM培养基培养小鼠胎肝细胞, 贴壁后的胎肝细胞呈克隆化增殖状态, 克隆内细胞致密(见图1)。

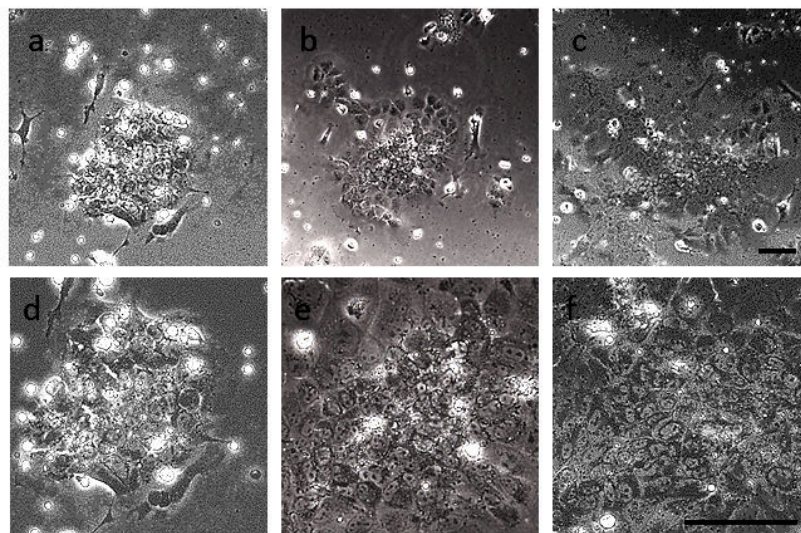


Fig.1 2D culture of mouse fetal liver cells.

a-c. The images about isolation and culture of mouse fetal liver cells from Day1 to Day3 (100X); d-f: 200X. Scale Bar=100 μm.

2.2 小鼠胎肝细胞的鉴定

对无血清的KM培养基培养3天后小鼠胎肝细胞克隆进行肝干/祖细胞标志进行检测. 免疫荧光染色结果显示胎肝细胞克隆具有肝细胞的干/祖标志EpCAM、SOX9、CK19及AFP及功能标志ALB(见图2A). 同时克隆内细胞CK19⁺Ki67⁺阳性率达71.10%±2.16%, 显示获得的胎肝细胞克隆具有增殖能力(见图2B).

Fig.2 Identification of mouse fetal liver cells.

2.3 小鼠胎肝细胞3D培养

在透明质酸构建的3D体系中用无血清的KM培养基培养小鼠胎肝细胞1天后, 可见大量光滑透亮的3D细胞球形成(见图3a). 随着时间推移, 3D细胞球出芽生长(见图3b, c箭头处). 吸取3D培养5天后获得的细胞球, 活死细胞染色发现3D细胞球中, 活细胞占绝大部分(见图4a), 仅有少数为死细胞(见图4b), 显示小鼠胎肝细胞3D细胞球活力良好.

Fig.3 3D culture of mouse fetal liver cells.

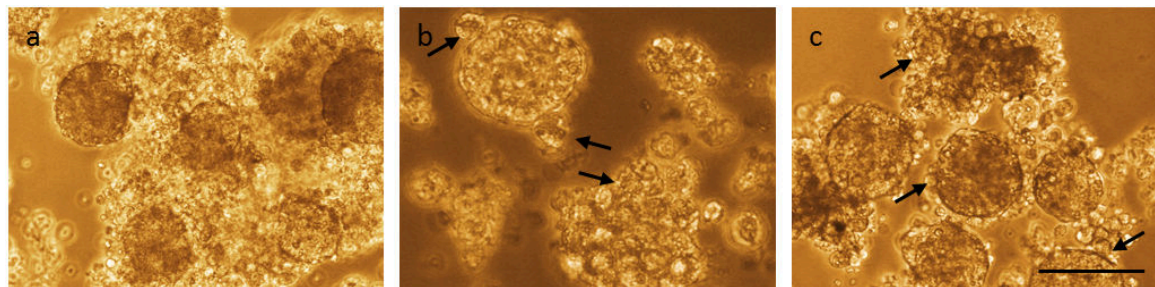
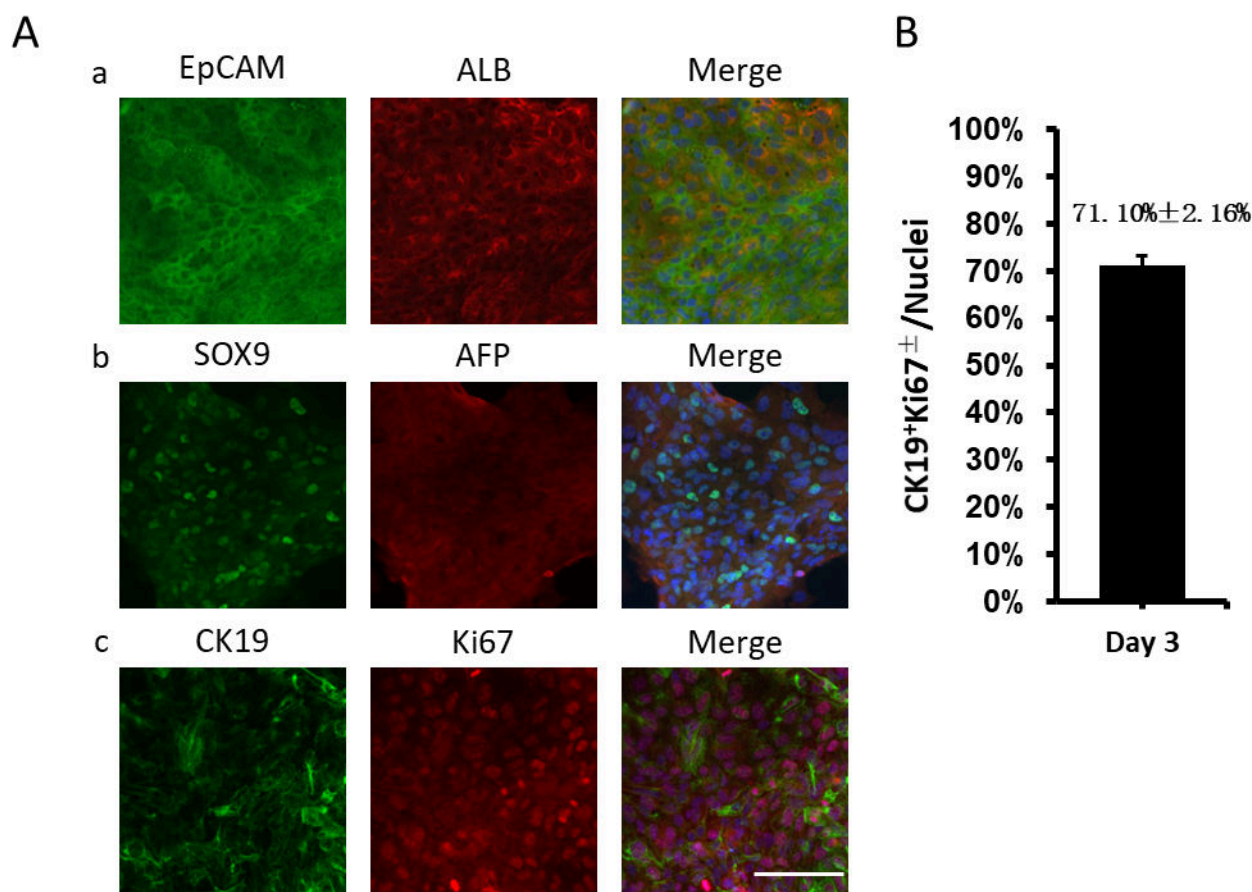
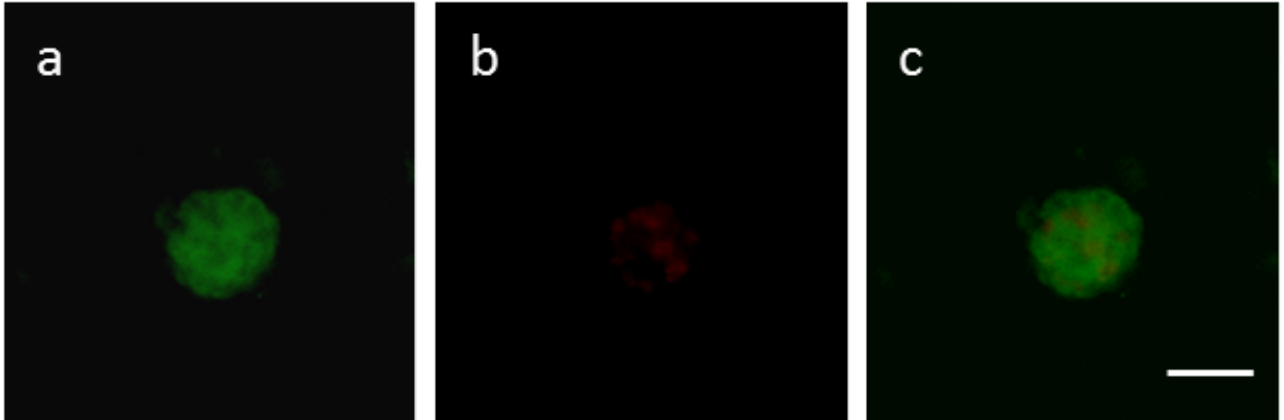


Fig.4 LIVE/DEAD staining of mouse fetal liver cell balls.

a. Day1; b.Day3; c.Day5; Scale Bar= 100µm.



2.4 3D培养对小鼠胎肝细胞肝细胞特性的影响

利用Q-PCR对3D培养后小鼠胎肝细胞干性及成熟基因进行检测,结果显示肝细胞干性标志如AFP、CK19、EpCAM、Prox1等与种子细胞相比都有大幅度的降低,而G6PC、CYP3A41a等功能指标则有不同程度的提高(见图5)。G6PC是糖代谢的关键酶,可调节肝糖原释放,维持血糖平衡,其表达程度与肝细胞成熟相关。CYP3A41a是小鼠体内重要的药物代谢第一相酶,存在于肝细胞内质网膜及线粒体内膜上,表达与肝脏功能息息相关。该3D培养体系可使胎肝细胞向成熟方向发展。

在此基础上,我们对3D体系培养5天后获得的细胞球进行免疫荧光,进一步检测小鼠胎肝细胞培养后肝细胞干性标志及功能标志的表达,结果显示

3D细胞球对ALB与氨基甲酰磷酸合成酶1(carbamoyl phosphate synthetase 1, CPS1)的表达随着培养时间的推移而增强,而干性标志包括EpCAM和CK19的表达水平则与此相反(图6)。

肝细胞具有多种功能,白蛋白仅在肝细胞内合成,是肝功能的指标,而当肝功能衰竭时,由于肝脏氨代谢紊乱等可能导致肝性脑病,出现精神神经症状,故氨代谢也是非常重要的肝功能的指标。我们选择检测白蛋白的合成和氨解代谢等肝细胞最基本的功能作为代表来检测对3D体系小鼠胎肝细胞的影响。结果显示透明质酸3D培养上清中白蛋白和尿素的浓度都随着时间的推移而增高,显示该体系胎肝细胞功能的增强,胎肝细胞向肝向成熟分化。

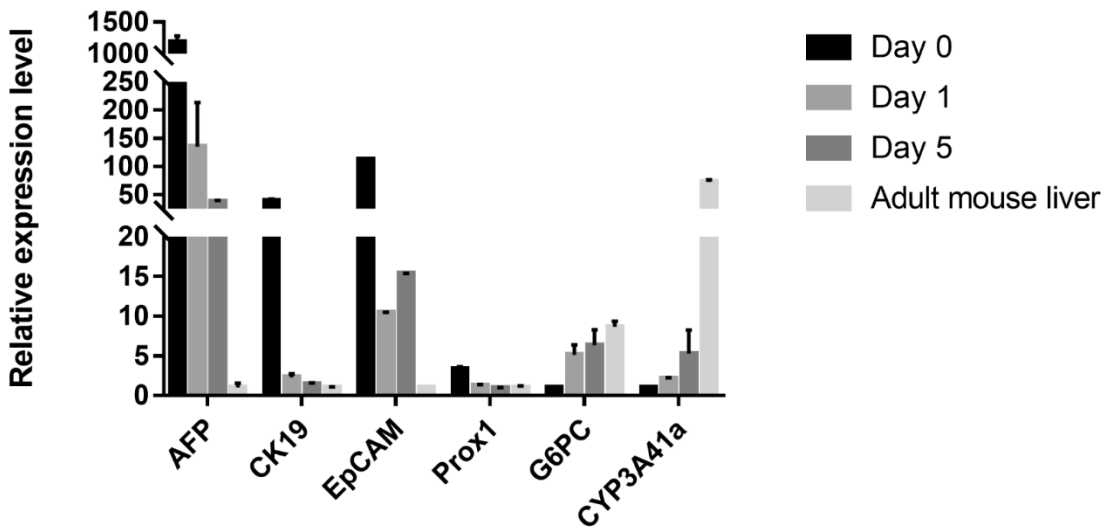


Fig.5 The impact of 3D culture system to hepatic relative gene expression by Q-PCR.

The cDNAs come from 3D culture (Day1, Day3 and Day5) and adult C57BL/6J mouse liver cells.

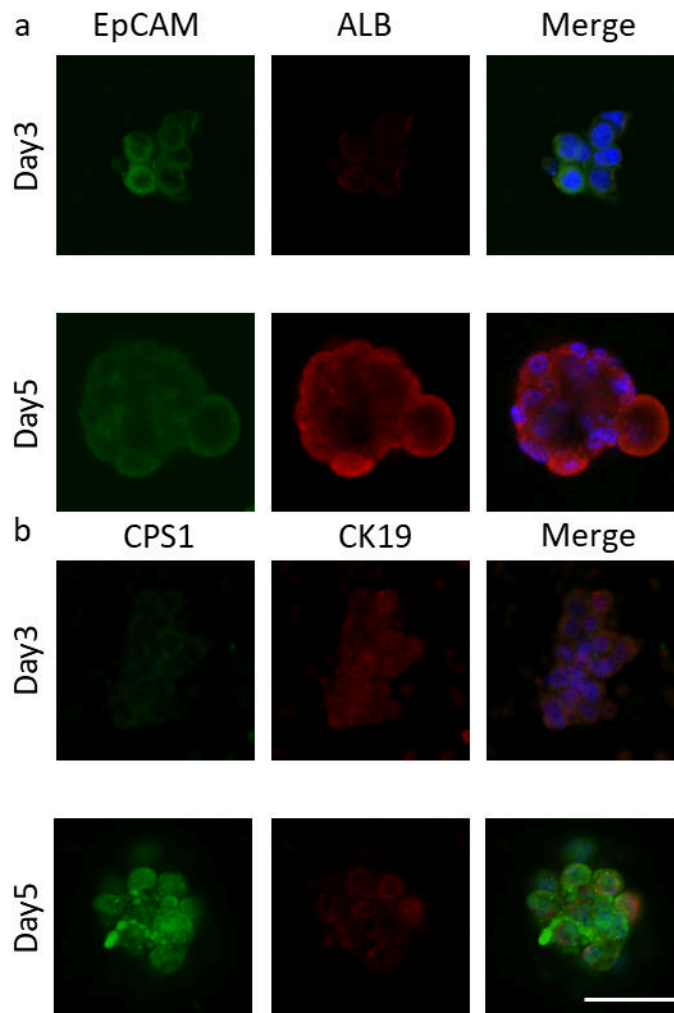


Fig.6 The immunofluorescence of mouse fetal liver cell balls. Scale Bar=40μm.

3 讨论

肝脏是一个由肝实质细胞、内皮细胞、星状细胞、Kuffer细胞等多种细胞组成的复杂器官,具有合成代谢、胆汁分泌、储存脂质、解毒等多种生物转化功能,其功能的实现,依赖于肝脏内各种细胞-细胞间和细胞-细胞外基质间的相互作用^[11].肝脏细胞的复杂性、结构的复杂性以及功能的复杂性使得肝癌、终末期肝病等难治性肝病在临床上难以治愈.作为肝移植的替代手段之一,肝细胞移植具有应用前景好.然而种子细胞的数量和功能成熟是细胞移植面临的重大问题.

相对于二维单层细胞培养技术在细胞接触抑制生长、以及细胞相互作用建立的局限,3D 细胞培养

就是细胞以 3D 空间的方式在其中生长,并以 3D 方式与周围微环境中的细胞外基质、各种细胞因子、化学因子、物理机械力以及其它细胞发生交流与相互作用.3D 培养比 2D 培养的优势在于它拉近了细胞培养体系和细胞生理学之间的距离,使得细胞在增殖和功能获得上具有更好的空间和环境优势.我们通过分离小鼠胎肝,获得的小鼠胎肝细胞具有良好增殖分化潜能.经 3D 培养所获得的胎肝细胞球活性良好,其白蛋白合成及氨代谢等功能都有不同程度的提高.通过 Q-PCR 发现 3D 培养后的胎肝细胞,其肝细胞干性标志如 AFP、CK19、EpCAM、Prox1 等表达水平呈现不同程度的下降,而其功能指标则远高于 3D 培养前表达水平,显示出基于透明质酸水凝胶的 3D 培养体系可促进具有增殖分化能力的胎肝细

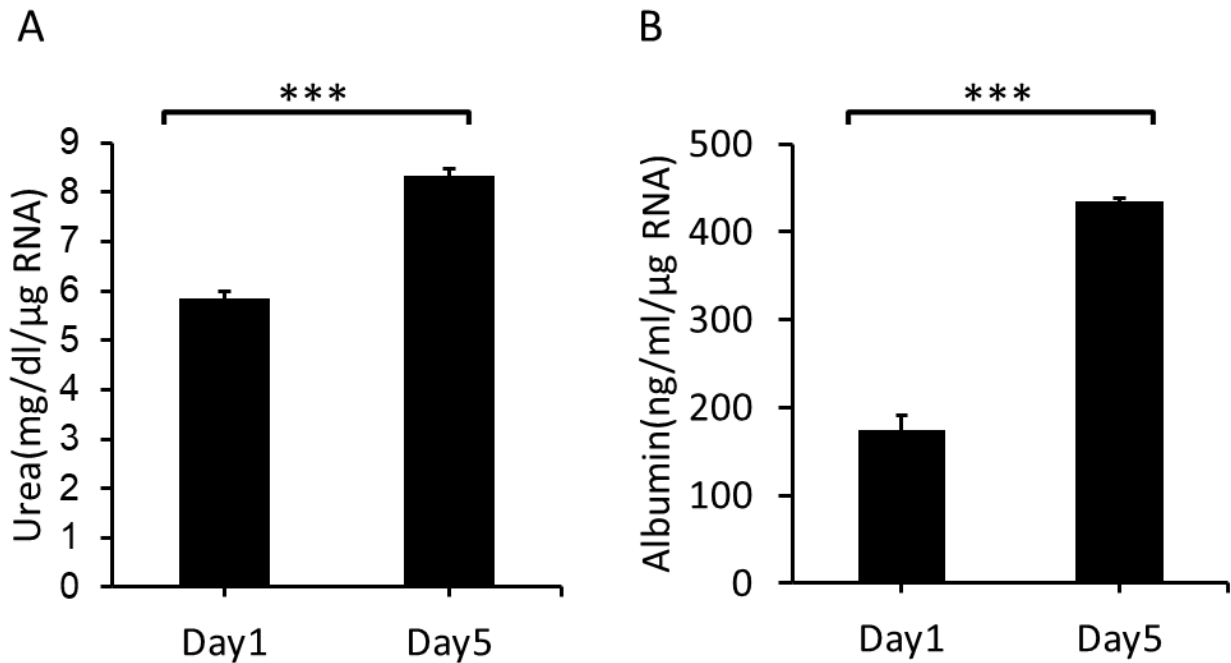


Fig.7 The function of albumin and urea about 3D culture cells.

A. Urea content in culture supernatant, $P < 0.01$; B. Albumin content in culture supernatant, $P < 0.01$.

胞分化成熟,且该体系操作简单、易于获得,使得透明质酸也可能成为细胞移植的候选辅助材料。

细胞外基质为细胞生长提供物理化学支持,是细胞表面受体的附着位点,可调节各生命过程中得到信号分子^[12].透明质酸是细胞外基质的重要组成部分.本研究利用透明质酸制备水凝胶并建立的胎肝细胞的3D培养体系,为研究肝细胞干性维持或是分化成熟中重要的ECM组分的具体功能和作用机制提供了范例。

另一方面,药源性肝毒性不仅是诱发肝脏损伤的重要原因之一,也是药物研发中面临的巨大障碍^[13].3D培养的细胞球(类器官)可模拟体内生长模式,更接近人体的组织微结构,模拟肝脏的功能^[14],在评价药物毒性时克服2D细胞模型掩盖药物毒性的缺陷^[15],从而在药物特异质毒性评价方面更具优势.本研究构建的类器官3D培养模型也有望成为的药物肝脏毒性评价的重要平台之一。

Abstract Objective: To establish a 3D organoid culture system of mouse fetal liver cell using hyaluronic acid. **Method:** The fetal liver cells isolated from 12 to 14 days mouse embryos were preliminary

screening of 2D liver stem/progenitor cells by Kubota's Medium (KM) and 3D organoid culture in hyaluronan hydrogel. **Result:** Fetal liver cells grew as clones in 2D cell culture system. Liver stem/progenitor cell colonies maintained proliferation activity. The albumin and urea levels in supernatant increased significantly, which indicated hepatic functional maturation of the cell colonies in 3D hyaluronic hydrogels. The results of Q-PCR showed that the expression levels of liver stem/progenitor markers, such as AFP, CK19, EpCAM and Prox1, significantly reduced and were close to the expression level in adult mouse liver. **Conclusion:** In this study, stem-cell derived, functional mouse hepatic organoids in hyaluronan hydrogels was successfully established.

参 考 文 献

- [1] Chen LP, Ye H. Research progress of hepatocyte transplantation for acute liver failure. *Sichuan Medical Journal*, 2012,33(05):892-894
- [2] Christ B, Brückner S, Winkler S. The Therapeutic Promise of Mesenchymal Stem Cells for Liver Restoration. *Trends Mol Med*, 2015, 21(11):673-686

- [3] Basma H, Soto-Gutiérrez A, Yannam GR, et al. Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes. *Gastroenterology*, 2009,136(3):990-999
- [4] Shi XL, Gao Y, Yan Y, et al. Improved survival of porcine acute liver failure by a bioartificial liver device implanted with induced human functional hepatocytes. *Cell Res*, 2016,26(2):206-216
- [5] Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, et al. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol*, 2013,87(8):1315-1530
- [6] Heidari R, Soheili ZS, Samiei S, et al. Alginate as a cell culture substrate for growth and differentiation of human retinal pigment epithelial cells. *Appl Biochem Biotechnol*, 2015,175(5):2399-2412
- [7] Fakhari A, Berkland C. Applications and emerging trends of hyaluronic acid in tissue engineering, as a dermal filler and in osteoarthritis treatment. *Acta Biomater*, 2013,9(7):7081-7092
- [8] Rother S, Galiazzo VD, Kilian D, et al. Hyaluronan/Collagen Hydrogels with Sulfated Hyaluronan for Improved Repair of Vascularized Tissue Tune the Binding of Proteins and Promote Endothelial Cell Growth. *Macromol Biosci*, 2017,17(11)
- [9] Liu L, Ye Q, Lu M, et al. A new approach to reduce toxicities and to improve bioavailabilities of platinum-containing anti-cancer nano-drugs. *Sci Rep*, 2015,5:10881
- [10] Wauthier E, Schmelzer E, Turner W, et al. Hepatic stem cells and hepatoblasts: identification, isolation, and ex vivo maintenance. *Methods Cell Biol*, 2008,86:137-225
- [11] Allen JW, Bhatia SN. Engineering liver therapies for the future. *Tissue Eng*, 2002,8(5):725-737
- [12] Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*, 2010,123(Pt 24):4195-4200
- [13] Huang YY, Sun R. 系统生物学技术用于中药肝毒性发现与评价的研究进展. *中国药物警戒*, 2013,10(4):219-222
- [14] Lau TT, Lee LQ, Leong W, et al. Formation of model hepatocellular aggregates in a hydrogel scaffold using degradable genipin cross-linked gelatin microspheres as cell carriers. *Biomed Mater*, 2012,7(6):065003
- [15] Ramaiahgari SC, den Braver MW, Herpers B, et al. A 3D in vitro model of differentiated HepG2 cell spheroids with improved liver-like properties for repeated dose high-throughput toxicity studies. *Arch Toxicol*, 2014,88(5):1083-1095

Stem-cell Derived, Functional Mouse Hepatic Organoids In Hyaluronan Hydrogels

Yan Jie-Xin¹, Wang Yi², Wang Yun-Fang¹

⁽¹⁾ Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;

⁽²⁾ Regenerative Medicine Lab, Institute of Health Service and Transfusion Medicine, Beijing 100039, China)

Key words mouse fetal liver cell, 3D organoid culture, hyaluronan hydrogels

DOI: 10.16476/j.pibb.xxxx.0001