小鼠类肝前体细胞的流式分析与分选

Fluorescence Activated Cell Sorting of Mouse Hepatic Progenitor-like Cells

崔磊, 李露*

细胞生物学国家重点实验室, 上海生物化学和细胞生物研究所, 中国科学院, 中国科学院大学, 上海

*通讯作者邮箱: lilu2014@sibcb.ac.cn

引用格式: 崔磊, 李露. (2019). 小鼠类肝前体细胞的流式分析与分选. *Bio-101* e1010308. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010308.

How to cite: Cui, L. and Li, L. (2019). *Bio-101* e1010308. Fluorescence Activated Cell Sorting of Mouse Hepatic Progenitor-like Cells. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010308. (in Chinese)

摘要: 小鼠肝脏器官在受到胆汁淤积性肝损伤过程中, 部分肝细胞会去分化为类肝前体细胞, 开始表达肝前体细胞相关的蛋白 SOX9。经典的肝脏灌流实验可获得纯度超高的小鼠原代肝细胞悬液。为获得类肝前体细胞, 我们利用的是转基因小鼠 Sox9-EGFP。由于该小鼠的 Sox9 基因的启动子后插入 EGFP, 因此 EGFP 表达即可指示 SOX9 蛋白的表达。通过流式分选 GFP 阳性的原代肝细胞, 即可获得类肝前体细胞。

关键词: 小鼠, 类肝前体细胞, 流式分选

材料与试剂

1. 注射器 (康德莱)
2. 输液器 (康利医疗, catalog number: CE0123)
3. 一次性静脉留置针 (普益医疗, catalog number: CE0197)
4. 无菌棉棒、无菌镊子及剪刀
5. Sterile cell strainer nylon mesh 70 μ m (BD, catalog number: 352350)
6. 培养皿 6 cm Dish (Corning, catalog number: 430167)
7. 小鼠: Sox9-EGFP 小鼠 (MMRRC, catalog number: 011019-UCD)
8. Collagenase IV (Invitrogen, catalog number: 17104019)
9. FBS (Invitrogen, catalog number: 10099141C)
10. 70%乙醇
11. 浓盐酸

12. 氢氧化钠
13. 三溴乙醇
14. 叔戊醇
15. NaCl
16. $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
17. KCl
18. D-Glucose
19. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
20. CaCl_2
21. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
22. EGTA (国药集团)
23. HEPES (Solarbio)
24. High glucose DMEM with glutamine (Gibco)
25. DDC (3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine) (Sigma-Aldrich, catalog number: 137030, 0.1% DDC 饲料在上海普路腾生物科技有限公司合成)
26. 1x PBS (Invitrogen, catalog number: c10010500bt)
27. 10x EBSS without Ca^{2+} and Mg^{2+} 溶液 (见溶液配方)
28. 10x EBSS with Ca^{2+} and Mg^{2+} 溶液 (见溶液配方)
29. 溶液 I (见溶液配方)
30. 溶液 II (见溶液配方)
31. 溶液 III (见溶液配方)
32. 小鼠麻醉剂 (见溶液配方)

仪器设备

1. 蠕动泵 (Longerpump, model: BT3002J)
2. 恒温水浴锅
3. 离心机 (Eppendorf, model: centrifuge 5810R)
4. 高速流式细胞分选仪-Aria Sorp (FACS Aria SORP)
5. 水浴锅

实验步骤

1. 配置小鼠肝灌流缓冲液 I、II、III。
2. 三种灌流液于 37 °C 水浴锅中预热。
3. 将输液管固定在蠕动泵中，一端置于溶液 I 液面下，另一端接上针头，打开蠕动泵，调节转速为 8~12，使液体充盈管道。
4. 小鼠麻醉，腹腔注射小鼠麻醉剂，注射体积按 10 µl/g 体重计算。
注：为获得类肝前体细胞，需提前对 Sox9-EGFP 小鼠和野生型基因的小鼠用 0.1% DDC 饲料喂养 1 周，野生型基因的小鼠用于分选时的阴性对照。
5. 小鼠麻醉后将四肢固定在泡沫垫上，泡沫垫下面放置托盘。由腹下部至颈部纵向剪开腹侧皮毛，将皮毛固定于左右两侧。由腹下部横向剪开腹腔壁，沿身体左右两侧向上剪开至颈部下（中间要剪断隔膜和肋骨），将腹腔壁固定于头部右侧，充分暴露心脏和肝脏，用棉棒拨开腹部脂肪和小肠，暴露下腔静脉和肝门静脉，用止血钳夹住下腔静脉。
6. 将针头由心窝刺入上腔静脉（注意不要刺破上腔静脉），打开蠕动泵电源，即可见肝脏，下腔静脉和肝门静脉充盈鼓起，剪断肝门静脉，开始灌流（示意图见图 1）。

图 1. 小鼠灌流示意图 图上标记了上腔静脉、肝门静脉和下腔静脉在小鼠体内相对位置，肝门静脉是图中从右侧肝走向肠系膜的静脉

7. 溶液 I 灌流 50~100 ml，约 5 min 肝脏不见血色后换溶液 II。溶液 II 灌流 50~100 ml，约 5 min 后换溶液 III。

注：若解剖时间较慢，肝脏可能出现凝血情况，可以在灌流溶液 I 的同时，用润湿的棉签轻轻拍打肝脏，帮助肝内血液流出。另外，换灌流液时要暂停蠕动泵。

8. 溶液 III 灌流 100~150 ml，约 10~15 min 后肝脏组织具有一定流动性，当用润湿的棉签轻轻拍打肝脏，发现表皮与肝实质完全脱离，表明已充分消化肝脏。
9. 关掉蠕动泵，拔出针头，将肝脏剪下，置于 6 cm dish 中，加入 2 ml 细胞培养基，用黄枪头挤压肝脏，将肝细胞挤出，弃掉肝表皮。
10. 用 Sterile cell strainer nylon mesh (70 μ m) 过滤，用培养基将细胞悬起。

11. 将细胞悬液 $50 \times g$ 离心 1 min，弃上清，沉淀细胞继续用培养基重悬并离心，重复 2 次，总共 3 次离心后得到的沉淀细胞即为肝细胞。
12. 肝细胞沉淀用含 5% FBS 的 1x PBS 重悬，用 $40 \mu\text{m}$ 孔径无菌滤膜过滤，准备流式分析和分选。
13. 采用高速流式细胞分选仪，利用 $100 \mu\text{m}$ 喷嘴进行分选。

结果与分析

小鼠肝脏在受到 DDC 慢性损伤 7 天后，SOX9 阳性的类肝前体细胞会大量出现 (Yanger 等, 2013)，这些细胞同时表达 eGFP，通过肝脏灌流及流式分选可以获得纯度较高的 SOX9 阳性的类肝前体细胞 (Li 等, 2016; Hu 等, 2018)。

图 2 为对 DDC 饲料喂养的野生型小鼠进行肝脏灌流后流式分析的结果，结果表明几乎没有 GFP 阳性的肝细胞。图 3 为对 DDC 饲料喂养的 Sox9-EGFP 小鼠进行肝脏灌流后流式分析的结果，结果表明存在少量 GFP 阳性的肝细胞，即类肝前体细胞 (Li 等, 2019)。

图 2. 流式细胞仪分析 DDC 饲料喂养的野生型小鼠肝脏中 GFP 阳性肝细胞的比例

图 3. 流式细胞仪分析 DDC 饲料喂养的 Sox9-EGFP 小鼠肝脏中 GFP 阳性类肝前体细胞的比例

失败经验

1. 关于灌流：初学者由于解剖小鼠手法不熟练，操作时间较长，可能会导致肝中有血凝块，肝叶内的血凝块会导致部分肝叶灌流不充分，这时用润湿的棉签轻轻拍打可能会有助于充分灌流；由于胶原酶在低温下活性降低，因此在温度较低的环境中做实验时，应尽量缩短输液管的长度，如果条件允许，可以用烤灯加热，提高操作环境温度；由于 DDC 处理后小鼠肝会出现纤维化，DDC 处理的时间越长，肝脏的消化越困难，因此可根据实际情况酌情增加胶原酶浓度和灌流时间，保证肝脏充分消化，若小鼠肝脏灌流不充分，则会影响分选时类肝前体细胞的比例。
2. 关于分选：由于小鼠肝细胞本身体积较大，直径 20~30 μm ，因此上样前必须将肝细胞仔细吹打均匀并用 40 μm 孔径的滤膜过滤，以免细胞黏在一起堵塞流式分选仪的管道；分选时应该选择 100 μm 的喷嘴，用小于的 100 μm 的喷嘴分选，极易堵塞分选仪器。

溶液配方

1. 10x EBSS without Ca^{2+} and Mg^{2+} 溶液

在 800 ml 去离子水中加入 65.7 g NaCl, 2.91 g $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 3.9 g KCl, 9.7 g D-Glucose

磁力搅拌架上搅拌溶解

加水定容至 1 L, 4 °C 保存

2. 10x EBSS with Ca^{2+} and Mg^{2+} 溶液

在 800 ml 去离子水中加入 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4 g KCl, 68 g NaCl, 1.583 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 g D-Glucose 溶解

同时在 100 ml 去离子水中加入 2 g CaCl_2 至溶解

最后将 100 ml CaCl_2 溶液缓缓加入 800 ml 其他组分的溶液中, 并定容到 1 L, 4 °C 保存

3. 溶液 I (100 ml/只小鼠, 过滤除菌, 调节 pH 为 7.4)

10 ml 10x EBSS without Ca^{2+} and Mg^{2+}

0.5 ml 100 mM EGTA

89.5 ml ddH₂O, 4 °C 保存

4. 溶液 II (100 ml/只小鼠, 过滤除菌, 调节 pH 为 7.4)

10 ml 10x EBSS with Ca^{2+} and Mg^{2+}

1 ml 1 M HEPES

89 ml ddH₂O, 4 °C 保存

5. 溶液 III (100 ml/只小鼠, 过滤除菌, 调节 pH 为 7.4)

10 ml 10x EBSS with Ca^{2+} and Mg^{2+}

1 ml 1 M HEPES

89 ml ddH₂O

50 mg Collagenase IV, 现配现用

6. 小鼠麻醉剂

1 g 的三溴乙醇放到 625 μl 的叔戊醇中过夜, 然后溶解在 50 ml 的生理盐水中

注: 三溴乙醇见光易分解, 需要全程避光。

致谢

该项研究得到了国家自然科学基金委、科技部和上海市科委的资助。该研究数据收集工作得到生化与细胞所公共技术服务中心分子平台、细胞平台、动物平台的支持。

参考文献

1. Hu, C., Li, W., Tian, F., Jiang, K., Liu, X., Cen, J., He, Q., Qiu, Z., Kienast, Y., Wang, Z., Zhang, H., Ji, Y., Hu, J. and Hui, L. (2018). [Arid1a regulates response to anti-angiogenic therapy in advanced hepatocellular carcinoma.](#) *J Hepatol* 68(3): 465-475.
2. Li, D., Fu, J., Du, M., Zhang, H., Li, L., Cen, J., Li, W., Chen, X., Lin, Y., Conway, E. M., Pikarsky, E., Wang, H., Pan, G., Ji, Y., Wang, H. Y. and Hui, L. (2016). [Hepatocellular carcinoma repression by TNFalpha-mediated synergistic lethal effect of mitosis defect-induced senescence and cell death sensitization.](#) *Hepatology* 64(4): 1105-1120.
3. Li, W., Yang, L., He, Q., Hu, C., Zhu, L., Ma, X., Ma, X., Bao, S., Li, L., Chen, Y., Deng, X., Zhang, X., Cen, J., Zhang, L., Wang, Z., Xie, W. F., Li, H., Li, Y. and Hui, L. (2019). [A homeostatic arid1a-dependent permissive chromatin state licenses hepatocyte responsiveness to liver-injury-associated YAP signaling.](#) *Cell Stem Cell* 25(1): 54-68 e55.
4. Yanger, K., Zong, Y., Maggs, L. R., Shapira, S. N., Maddipati, R., Aiello, N. M., Thung, S. N., Wells, R. G., Greenbaum, L. E. and Stanger, B. Z. (2013). [Robust cellular reprogramming occurs spontaneously during liver regeneration.](#) *Genes Dev* 27(7): 719-724.