

doi: 10.3788/gzxb20144306.0630004

# 单个大鼠胎肝干细胞的激光光镊喇曼光谱

王雁军<sup>1</sup>, 覃宗定<sup>2</sup>, 姚辉路<sup>2</sup>, 汪蕴<sup>1</sup>, 丰美福<sup>1</sup>

(1 中国科学院动物研究所 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100101)

(2 广西科学院 生物物理实验室, 南宁 530003)

**摘 要:** 激光光镊喇曼光谱系统是将激光光镊与喇曼光谱相结合的一项光学技术, 可以在接近自然的生理状态下研究单个生物细胞的识别及其构成成分的检测. 本文采用胶原酶消化法, 分离 10~21 天不同孕期大鼠的胎肝干细胞和成体大鼠的肝实质细胞, 应用激光光镊喇曼光谱技术检测分离到单个胎肝干细胞和肝实质细胞, 以及 WB-F344 大鼠肝干细胞系细胞, 并比较了胎肝干细胞和肝实质细胞的喇曼光谱. 结果发现, 13 天以前孕大鼠胎肝干细胞在  $1\ 336\ \text{cm}^{-1}$  (代表多聚核苷酸链(嘌呤)) 和  $1\ 446\ \text{cm}^{-1}$  (代表蛋白的弯曲模型) 处的峰依次增高, 13 天孕大鼠胎肝干细胞在  $1\ 336\ \text{cm}^{-1}$  和  $1\ 446\ \text{cm}^{-1}$  处的平均峰值最高, 14 天以后逐渐降低. 结果表明激光光镊喇曼光谱系统可以鉴别不同孕期的胎肝细胞和成体肝实质细胞, 分析胎肝干细胞的分化机理, 为临床应用肝干细胞治疗奠定基础.

**关键词:** 光谱学; 细胞生物物理学; 激光光镊喇曼光谱; 大鼠胎肝干细胞; 喇曼光谱; 激光束; 细胞; 分析  
中图分类号: O657.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-4213(2014)06-0630004-5

## Laser-tweezer Raman Spectroscopy Study of Single Rat Fetal Liver Stem Cell

WANG Yan-jun<sup>1</sup>, QIN Zong-ding<sup>1</sup>, YAO Hui-lu<sup>2</sup>, WANG Yun<sup>1</sup>, FENG Mei-fu<sup>1</sup>

(1 State Key Lab of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Institute of Zoology,  
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(2 Laboratory for Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530003, China)

**Abstract:** Laser tweezers Raman spectroscopy system is an optical technique combining the laser tweezers and Raman spectroscopy technique, which could be able to study recognition and detect constituent components of single biological cell in close to its natural state. Rat fetal liver stem cells at 10~21 days of gestation and adult rat hepatocytes were separated by collagenase digestion. Single fetal liver stem cell, hepatocyte and WB-F344 rat liver stem cell line were detected by laser tweezers Raman spectroscopy technique, and their Raman spectrum was compared. It was indicated that the value of  $1\ 336\ \text{cm}^{-1}$  (assigned to Polynucleotide chain, DNA-purine bases) and  $1\ 446\ \text{cm}^{-1}$  (CH<sub>2</sub> bending mode of proteins) band increased before 13th day and decreased after 14th day of gestation, and the mean of peak value of  $1\ 336\ \text{cm}^{-1}$  and  $1\ 446\ \text{cm}^{-1}$  bands at 13th day of gestation was the highest. The results showed that the Laser tweezers Raman spectroscopy system could differentiate fetal liver stem cells of different period of gestation from adult hepatocytes, and analyze differentiation and development mechanism of fetal liver stem cells, which lay a foundation for clinical application of hepatic stem cells therapy.

**Key words:** Spectroscopy; Cell biophysics; Laser tweezers Raman spectroscopy; Fetal liver stem cells of rats; Raman Spectroscopy; Laser Beams; Cells; Analysis

**OCIS Codes:** 300.6360; 170.5660; 170.1530

基金项目: 国家自然科学基金(No. 60868002)资助

第一作者: 王雁军(1976-), 女, 博士研究生, 主要研究方向为肝干细胞. Email: wangyanjun117@163.com

导师(通讯作者): 丰美福(1941-), 女, 研究员, 主要研究方向为干细胞与组织工程. Email: fengmf@ioz.ac.cn

收稿日期: 2013-08-22; 录用日期: 2013-11-19

<http://www.photon.ac.cn>

## 0 引言

器官损伤或功能衰竭是人类健康面临的一大问题. 器官移植受到来源缺乏和免疫排斥等限制, 很难满足临床救治工作的需要. 胎肝干细胞作为种子细胞可用于肝组织、器官损伤的治疗<sup>[1-2]</sup>. 所以分析研究干细胞自我更新和分化的调控机理对于组织工程和再生医学是很重要的<sup>[3]</sup>. 传统研究胎肝干细胞的方法有流式细胞分选、免疫荧光和逆转录聚合酶链式反应 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) 等. Chen Qing-fen 等用流式细胞分选法进行研究, 发现尽管人的肝祖细胞和造血祖细胞来自于同一祖先, 但它们是不相同的. 但肝干细胞缺乏单一或联合特异性表面标记, 这给肝干细胞或肝祖细胞的分离纯化带来了一定的难度, 进而影响到肝干细胞研究的进展. 因此目前胎肝干细胞的发育过程和分化等机理均不十分清楚<sup>[4-7]</sup>.

喇曼光谱是研究物质分子结构的重要手段之一, 其特征峰位置、强度和线宽可提供构成物质的分子振动、转动方面的信息, 从而反映出分子中不同的化学键或官能团, 具有高敏感、反应快、简单、可重复和无损伤的定性定量分析等优点. 光镊是以激光力学效应为基础的一种物理工具, 利用强会聚的光场与微粒相互作用时形成的光学势阱来俘获粒子, 可以非接触、无损伤地操纵尺度位于数纳米到数十微米之间的生物细胞、亚细胞、生物大分子以及胶体粒子, 已经成为生命科学领域不可缺少的研究工具. 任洪亮等<sup>[8]</sup>根据几何光学, 对基于有限光学系统显微镜的光镊光路进行了分析计算, 可以在保持物镜后瞳充满度的情况下调整阱位和刚度, 具有捕获力大、被捕获的粒子成像清晰等优点. 激光光镊喇曼光谱技术将光学囚禁技术与显微喇曼光谱技术相结合, 可以在接近自然的生理状态下研究单个细胞或细胞器, 探索其生命活动<sup>[9-11]</sup>. Wood 等<sup>[12]</sup>在体外模拟活体环境进行红细胞携氧态和去氧态光谱差异研究, 为了解红细胞最基本的运氧功能及诊断有关红细胞疾病提供了依据. H Wu 等<sup>[13]</sup>使用喇曼光谱研究活体单个细胞脂类代谢, 实时分析监测单细胞在不同生长条件下脂类的变化. 目前已有研究报道喇曼光谱应用于胚胎干细胞的研究<sup>[14]</sup>, 但对胎肝干细胞的研究较少. 本文采用激光光镊喇曼光谱技术, 检测比较大鼠胎肝干细胞的激光光镊喇曼光谱, 找到了不同孕期的大鼠喇曼光谱峰的变化, 并分析其分化机理, 为胎肝干细胞的临床应用提供基础.

## 1 实验部分

### 1.1 实验装置

实验所采用的激光光镊喇曼光谱仪如图 1. 图中,

TC 为温度控制器; DL 为二极管激光器; OP 为光隔离器; IF 为干扰滤波片; PH 为小孔; HNF<sub>1</sub>、HNF<sub>2</sub> 为陷波滤波片 (780 nm RazorEdge, Semrock); CCD 为光电耦合探测器 (PIXIS 400BR, Princeton Instruments); DM 为二向色镜 (FM01, THORLABS); BS 为分光镜; Obj 为物镜; EP 为目镜; VC 为摄像机.

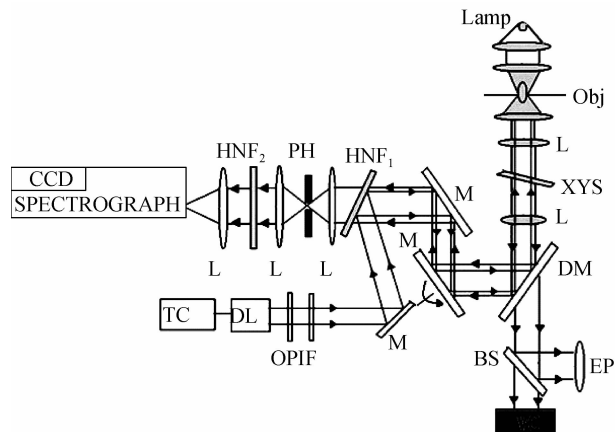


图 1 激光光镊喇曼光谱实验装置

Fig. 1 Setup of Laser-tweezer Raman spectrum

一束 785 nm, 20 mW 的二极管激光经过滤波后被导入一台倒置显微镜 (Nikon TE2000-U), 激光束经显微镜物镜 (油浸, NA 1.30, 100 $\times$ ), 聚焦后在焦点附近形成光镊, 同时构成光镊的激光束也用来激发被俘获细胞的喇曼散射光谱. 喇曼散射信号被聚焦进光谱仪 (SpectraPro2300i, Acton 600g/mm Blazed at 870 nm) 狭缝入口处, 通过电荷耦合元件 (Charge-coupled Device, CCD) 探测器接受信号, 并传输到计算机形成喇曼光谱图.

### 1.2 实验材料

从美国模式培养物集存库 (American Type Culture Collection, ATCC) 购买大鼠肝干细胞系 WB-F344. 从广西药检所获取 10 天、13 天、14 天、16 天、21 天孕大鼠和成体鼠各三只, 重量 250~400 克, 大鼠食料由药检所提供.

### 1.3 实验方法

大鼠胚胎从断颈处死的孕大鼠中获得 (孕期为 10 天、13 天、14 天、16 天、21 天), 无菌取出胎肝, 用磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffer Solution, PBS) 冲洗数次, 切碎后用 0.6% IV 胶原酶于 37 $^{\circ}$ C 消化 20~30 min, 消化后悬液, 用 200 目筛网过滤. 获得的细胞悬液的离心力为 270 $\times g$ ,  $g = 980 \text{ cm/s}^2$  为重力加速度, 离心 5 min, 细胞沉淀用 PBS 洗 2 次后置于含 10% 胎牛血清的改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium Dulbecco, DMEM) 培养液中.

### 1.4 数据处理

进显微镜前激光功率为 20 mW, 激光光斑大小为

2 mm. 将激光定位在胎肝干细胞上,积分时间为 20 s,采集胎肝干细胞的喇曼光谱.测量的背景光谱是胎肝干细胞所在的含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液的光谱,也是在光谱积分时间为 20 s 的条件下取得.分别取得不同孕期的 20 个胎肝干细胞的喇曼光谱之后取平均值,重复实验 3 次.单个细胞的光谱在细胞被捕获后立即收集.光谱数据的处理过程包括减背景、5 点平滑、基线校正和求平均,所有数据的处理都是在 Origin8.0 软件中进行.

## 2 实验结果

分别将采集到的 20 个大鼠肝实质细胞、20 个 WB-F344 肝干细胞与 20 个不同孕期大鼠胎肝干细胞的激光喇曼光谱做平均光谱及差值光谱.图 2 为大鼠肝干细胞系 WB-F344 细胞的平均激光喇曼光谱.图 3 为孕期 10~21 天的大鼠胎肝干细胞和成体肝实质细胞的平均激光喇曼光谱.图 4 为不同孕期胎肝细胞的

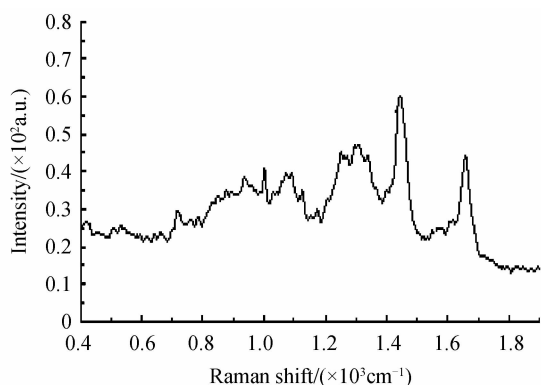


图 2 大鼠肝干细胞系(WB-F344)细胞的平均激光光镊喇曼光谱

Fig. 2 Mean spectra of Laser-tweezer Raman spectra of a rat liver stem cell line, WB-F344 cells

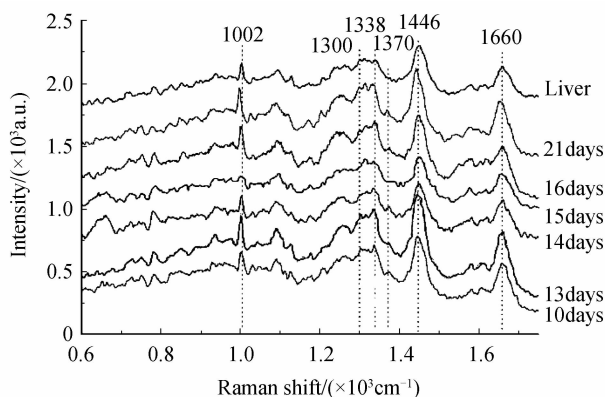


图 3 10~21 天孕大鼠的胎肝干细胞和成体肝实质细胞的平均激光光镊喇曼光谱

Fig. 3 Mean spectra of Laser-tweezer Raman spectra of fetal liver stem cells at 10~21 days of gestation and adult rat hepatocytes

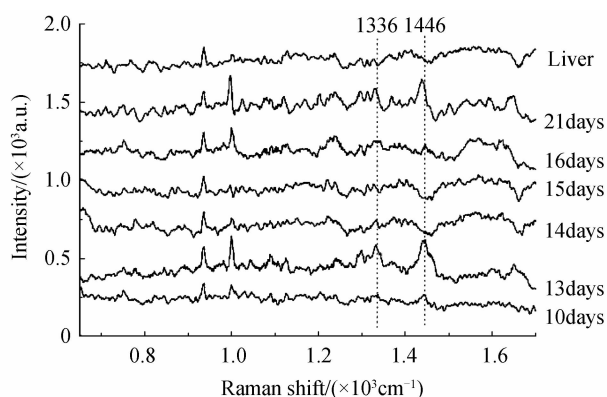


图 4 不同孕期大鼠的胎肝干细胞和成体肝实质细胞分别与孕期 10 天大鼠的胎肝干细胞的激光光镊喇曼光谱的差谱图

Fig. 4 Difference spectra of Laser-tweezer Raman spectra of rat fetal liver stem cells at different pregnant days (d10-21th) and adult rat hepatocytes with rat fetal liver stem cells of gestation at 10th day

平均激光喇曼光谱与孕期 10 天胎肝干细胞的平均激光喇曼光谱的差谱.由图可见大鼠肝干细胞系 WB-F344 细胞与大鼠胎肝干细胞的特征峰出现在  $600 \sim 1800 \text{ cm}^{-1}$ .以 WB-F344 肝干细胞的激光光镊喇曼光谱为基准,在胎肝中寻找与其相近的峰形,定为胎肝干细胞.通过比较,可见在  $600 \sim 1800 \text{ cm}^{-1}$  特征峰范围内,13 天以前孕大鼠胎肝干细胞在  $1336 \text{ cm}^{-1}$  和  $1446 \text{ cm}^{-1}$  处的峰依次增高,13 天孕大鼠胎肝干细胞在  $1336 \text{ cm}^{-1}$  和  $1446 \text{ cm}^{-1}$  处的峰很明显,平均峰值最高,14 天以后逐渐降低.各峰所代表的的归属值见表 1.

表 1 激光光镊喇曼光谱峰的位置所代表的物质

Table 1 Tentative peak assignments for Laser-Tweezer Raman Tissue-Spectra

Peak position/ $\text{cm}^{-1}$	Major assignments
1 336	Polynucleotide chain (DNA-purine bases)
1 443	$\text{CH}_2$ deformation (lipids and proteins)
1 446	$\text{CH}_2$ bending mode of proteins
1 485	Nucleic acid purine bases (guanine and adenine)

图 5 为孕期 10~16 天大鼠胎肝干细胞在  $1336 \text{ cm}^{-1}$  处的峰值比较.图 6 为孕期 10~16 天大鼠胎肝干细胞在  $1446 \text{ cm}^{-1}$  处的峰值比较.可见孕期 13 天的胎肝干细胞在  $1336 \text{ cm}^{-1}$  和  $1446 \text{ cm}^{-1}$  处的平均峰值最高,而后减低.

已知  $1336 \text{ cm}^{-1}$  峰代表多聚核苷酸链(嘌呤),  $1446 \text{ cm}^{-1}$  峰代表蛋白的弯曲模型,这些物质和结构可能与胎肝干细胞的分化和成熟有关.

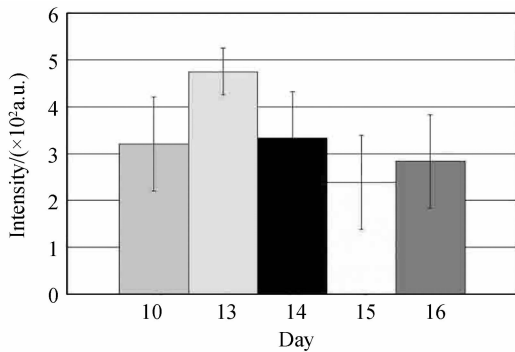


图5 不同孕期大鼠的胎肝干细胞的激光光镊喇曼光谱在  $1336\text{ cm}^{-1}$  处的峰值

Fig. 5 Bar-column inferred that the distribution of intensity value of Laser-tweezer Raman spectra of rat fetal liver stem cells at different pregnant days in  $1336\text{ cm}^{-1}$  peak

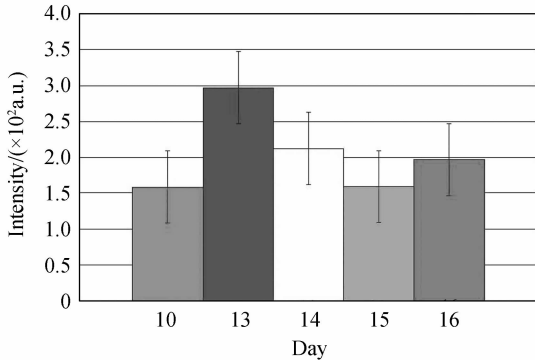


图6 不同孕期大鼠的胎肝干细胞的激光光镊喇曼光谱在  $1446\text{ cm}^{-1}$  处的峰值

Fig. 6 Bar-column inferred that the distribution of intensity value of of laser-tweezer raman spectrum of fetal liver stem cells at different pregnant days in  $1446\text{ cm}^{-1}$  peak

### 3 讨论

激光光镊喇曼光谱可以通过检测胎肝干细胞的生物分子结构和量来快速识别胎肝干细胞. 喇曼光谱收集的积分时间受到样品和激光功率的影响, 激光功率一定时, 积分时间越长收集到的信息越多. 实验中, 激光功率为  $20\text{ mW}$ , 积分时间为  $20\text{ s}$  的情况下已经能收集到较好的光谱, 不考虑缩短采集时间. 而且它不需要为获得大量细胞而开展其他生物实验所需的耗时过程. 激光光镊喇曼光谱还可以用来识别沿着孕期发展在生理环境下被捕获的胎肝干细胞. 在胎肝干细胞发育的过程中, 蛋白和其他生物物质被合成, 但这一复杂的过程并未被完全研究清楚. 在实验中, 发现了  $1336\text{ cm}^{-1}$  和  $1446\text{ cm}^{-1}$  峰的变化, 这一变化很可能与体内的分化和成熟过程相关. 已有研究报道大鼠的胎肝干细胞在孕期  $9.0\sim 9.5$  天开始表达肝系的基因, 起初是肝细胞的甲胎蛋白和白蛋白, 紧接着是胆管细胞

的细胞角蛋白 19 (Cytokeratin 19, CK-19), 这些细胞形成肝丛, 在孕期 16 天时, 定向为肝细胞, 或者胆管细胞. 另有研究表明肝来源于肠内胚层, 在大鼠孕期 9.5 天时, 前肠原始上皮细胞接触中胚叶并形成肝憩室, 这些细胞广泛地增值, 侵入隔膜, 开始分化, 在 10.5 天时形成肝母细胞, 表达甲胎蛋白, 紧接着是白蛋白. 在 15~16 天, 大鼠的肝脏包含不成熟的肝实质细胞<sup>[15-18]</sup>. 因此, 不同孕期的激光光镊喇曼光谱  $1336\text{ cm}^{-1}$  和  $1446\text{ cm}^{-1}$  峰的改变很可能反映了在胎肝干细胞分化发育过程中蛋白和核酸合成活性的一个变化,  $1336\text{ cm}^{-1}$  和  $1446\text{ cm}^{-1}$  峰在孕期为 13 天时达到顶峰, 可能是肝干细胞的嘌呤核酸、弯曲模型的蛋白质在那时正蓄积到一个顶峰, 13 天过后, 开始分化成肝实质细胞和胆管细胞, 肝干细胞内的核酸和弯曲模型的蛋白质开始降低, 比较符合胎肝发育过程中的分化和变化过程. 激光光镊喇曼光谱可以测量孕大鼠发育过程中胎肝干细胞, 探寻肝干细胞的物质组成变化, 分析肝干细胞的分化发育机理.

### 4 结论

采用喇曼光谱与激光光镊相结合技术研究大鼠胎肝干细胞和肝实质细胞, 光谱的对比分析发现了不同孕期胎肝干细胞喇曼光谱峰的变化, 即 13 天以前孕大鼠胎肝干细胞在  $1336\text{ cm}^{-1}$  和  $1446\text{ cm}^{-1}$  处的峰依次增高, 13 天孕大鼠胎肝干细胞在  $1336\text{ cm}^{-1}$  和  $1446\text{ cm}^{-1}$  处的平均峰值最高, 14 天以后逐渐降低.  $1336\text{ cm}^{-1}$  和  $1446\text{ cm}^{-1}$  处的峰值的变化很可能与胎肝发育过程中的分化和变化过程有关. 应用喇曼峰位移的不同特征了解肝干细胞的物质组成变化, 从分子水平探讨肝干细胞的分化发育机理, 为肝干细胞的研究提供一种新方法, 为临床肝干细胞应用提供实验基础.

#### 参考文献

- [1] DROSOS I, KOLIOS G. Stem cells in liver regeneration and their potential clinical applications[J]. *Stem Cell Reviews and Report*, 2013, **9**(5): 668-684.
- [2] VESTENTOFT P S. Development and molecular composition of the hepatic progenitor cell niche [J]. *Danish Medical Journal*, 2013, **60**(5): B4640.
- [3] KOIKE H, TANIGUCHI H. Characteristics of hepatic stem/progenitor cells in the fetal and adult liver[J]. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, 2012, **19**(6): 587-93.
- [4] CHEN Qing-feng, KHOURY M, LIMMON G, et al. Human fetal hepatic progenitor cells are distinct from, but closely related to, hematopoietic stem/progenitor cells [J]. *Stem Cells*, 2013, **31**(6): 1160-1169.
- [5] CHRIST B, PELZ S. Implication of hepatic stem cells in functional liver repopulation[J]. *Cytometry Part A*, 2013, **83**(1): 90-102.
- [6] HE Yun, ZHOU Jian-Wu, XU Lei, et al. Comparison of proliferation and differentiation potential between mouse primary hepatocytes and embryonic hepatic progenitor cells in

- vitro [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2013, 11.
- [7] ORTICA S, TARANTINO N, AULNER N, *et al.* The 4 Notch receptors play distinct and antagonistic roles in the proliferation and hepatocytic differentiation of liver progenitors [J]. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 2014, **28**(2): 1-12.
- [8] REN Hong-liang, DING Pan-feng, LI Xiao-yan. Design and adjust for optic tweezers based on finite conjugate microscope systems[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2012, **34**(6): 454-458.  
任洪亮,丁攀峰,李小燕.基于有限远光学系统的光镊设计和调整[J].*中国激光*,2012, **34**(6):454-458.
- [9] CHAN J W. Recent advances in laser tweezers Raman spectroscopy (LTRS) for label-free analysis of single cells[J]. *Journal of Biophotonics*, 2013, **6**(1): 36-48.
- [10] OJEDA J F, XIE Chang-an, LI Yong-qing, *et al.* Chromosomal analysis and identification based on optical tweezers and Raman spectroscopy[J]. *Optics Express*, 2006, **14**(12): 5385-5393.
- [11] CHEN Xiu-li, LIU Jun-xian, SHEN Wei-dong, *et al.* Probing into the oxygen carrying capability of red cells using Raman tweezers[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2010, **39**(5): 907-912.  
陈秀丽,刘军贤,申卫东,等.喇曼光镊分析血红细胞的携氧能力[J].*光子学报*,2010, **39**(5): 907-912.
- [12] WOOD B R, HAMMER L, DAVIS L, *et al.* Raman microspectroscopy and imaging provides insights into heme aggregation and denaturation within human erythrocytes[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2005, **10**(1): 014005.
- [13] WU H, VOLPONI J V, OLIVER A E, *et al.* Atul N. Parikh In vivo lipidomics using single-cell Raman spectroscopy [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, **9**(108): 3809-3814.
- [14] CHAN J W, LIEU D K, HUSER T, *et al.* Label-free separation of human embryonic stem cells and their cardiac derivatives using Raman spectroscopy [J]. *Analytical Chemistry*, 2009, **81**(4): 1324-31.
- [15] SUMITRAN-HOLGERSSON S, JOSHI M, OLAUSSON M. Fetal liver cell transplantation[J]. *Human Fetal Tissue Transplantation*, 2013, 219-235
- [16] CHAPPLE RH, TIZIOTO P C, WELLS K D, *et al.* Characterization of the rat developmental liver transcriptome [J]. *Physiological Genomics*, 2013, **45**(8): 301-11.
- [17] SI-TAYEB K, LEMAIGRE F P, DUNCAN S A. Organogenesis and development of the liver [J]. *Developmental Cell*, 2010, **18**(2): 175-189.
- [18] MANSUROGLU T, DUDÁS J, ELMAOUHOUB A, *et al.* Hepatoblast and mesenchymal cell-specific gene-expression in fetal rat liver and in cultured fetal rat liver cells [J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2009, **132**(1): 11-19.