

基于共聚焦和光片显微成像技术实现全肝细胞的追踪

刘晓丽

(中国科学院 分子细胞科学卓越创新中心, 上海 200031)

摘要: 细胞分析技术平台拥有多台激光共聚焦及其他高端成像设备, 具备共聚焦显微成像、超高分辨率显微成像、光片显微成像等技术。本案例主要介绍了平台基于共聚焦和光片显微成像技术辅助课题组完成全肝细胞的显微追踪。

关键词: 共聚焦显微成像技术;光片显微成像技术;细胞增殖

1 专业技术成果介绍

细胞分析技术平台拥有适合固定玻片样品的正置共聚焦、适合活细胞长时间动态观测的搭配温控和二氧化碳的倒置共聚焦、适合特殊激发波长的全光谱共聚焦等多台激光共聚焦显微镜, 这些共聚焦应用照明针孔与检测针孔共轭成像, 可以有效抑制非聚焦平面的杂散射光, 基于这些共聚焦我们可以满足各研究组不同样品的成像需求, 可对标本各层分别成像, 对活细胞行无损伤的光学“CT”成像, 不仅可观察固定的细胞、组织切片, 还可对活细胞的结构、分子、离子进行实时动态地观察和检测和蛋白示踪。

对于较大的组织样本, 共聚焦技术空间分辨率较差, 光片显微成像技术使用薄层光束从侧面激发荧光样品, 即检测方向与照射方向相垂直, 只有被检测的层面被光束照亮, 随后从样品的上部或下部检测所产生的荧光信号, 光片显微镜配合更快且灵敏度更高的相机, 获取非常大的图像数据组的能力会比其他任何技术都快得多, 同时仍然保证了极高的信噪比和较小的光毒性。基于我平台的激光片层扫描系统 Luxendo MuVi SPIM 利用光片技术我们可以实现大视场、大景深成像, 快速获取全组织样本清晰的三维图像。

基于细胞分析技术平台的共聚焦显微成像技术和光片显微成像技术, 我研究所谱系示踪与细胞命运可塑性研究组, 开发了一种可以长时间不间断捕捉细胞增殖的新技术——ProTracer, 利用该技术研究人员发现了成体肝脏中新生肝细胞的来源。该研究为肝脏疾病治疗提供新途径。相关研究成果“Proliferation tracing reveals regional hepatocyte generation in liver homeostasis and repair”于 2021 年 2 月 26 日发表于《Science》杂志上。在该研究中, 我们为研究组提供了关键的共聚焦及光片显微成像技术支撑, 在前期样品制备, 透明化处理, 免疫荧光标记, 后期显微成像、数据分析等关键步骤均提供了技术支持。

肝脏是人体内重要的代谢器官，主要功能细胞是肝细胞。肝脏一旦受损，需要“新生”肝细胞才能完成功能修复。因此，肝脏疾病治疗中寻找新生肝细胞的来源是科学家致力解决的问题。肝脏的基本单位是肝小叶，肝小叶中的肝细胞通过自我增殖产生新的肝细胞。每个肝小叶可以分为多个区域，这些区域中的肝细胞“不尽相同”，了解哪一区域的肝细胞具有较强的增殖能力，非常必要。

本单位突破了以往有关肝细胞来源的研究均是依赖单个分子标记来追踪肝脏中某一肝细胞亚群，再观察这个亚群的扩增情况，因为该方法效率较低，且缺少对整个肝脏所有肝细胞增殖能力的分析，开发了一种能够捕捉细胞增殖的录像机——ProTracer，既可以在长时间内不间断地追踪细胞增殖，又可以精准定位，追踪某一特定细胞类群（如肝细胞）的细胞增殖。研究组首先采用广谱性的 ProTracer（所有类型细胞的增殖都能够被检测）在成体启动细胞增殖的记录，并在启动后的多个不同时间点检测肝细胞的增殖信号，在细胞分析技术平台指导下对 E-CAD 和 GS 等肝细胞分区标记基因进行了免疫荧光共染色以及激光共聚焦成像，发现在生理稳态过程中肝细胞通过缓慢的增殖维持自我更新。

为了排除非肝细胞增殖信号的干扰，研究组在广谱性 ProTracer 技术的基础上，结合肝细胞特异性表达的基因 Albumin (Alb) 启动子，开发了肝细胞特异性的 ProTracer 技术，给增殖的肝细胞打上“唯一标记”，实现了直接在肝脏器官整体水平上展现肝细胞增殖。在小鼠实验中，将肝细胞特异性 ProTracer 在小鼠成体启动后，我们协助研究组利用光片显微技术对肝脏的全标本进行了荧光成像，结果发现被 tdTomato 红色荧光标记的增殖的肝细胞呈现出一圈圈类似“甜甜圈”的形状（图 A），说明肝细胞增殖具有区域偏好性。

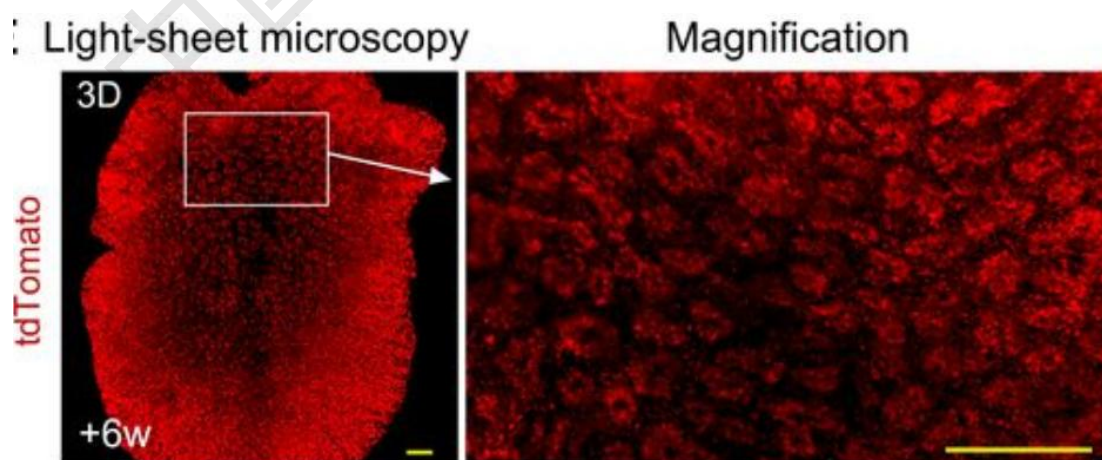


图 A 利用肝细胞特异性的 ProTracer 标记增殖肝细胞的成体小鼠肝脏。tdTomato⁺的增殖肝细胞呈现出一圈圈的类似“甜甜圈”的形状。

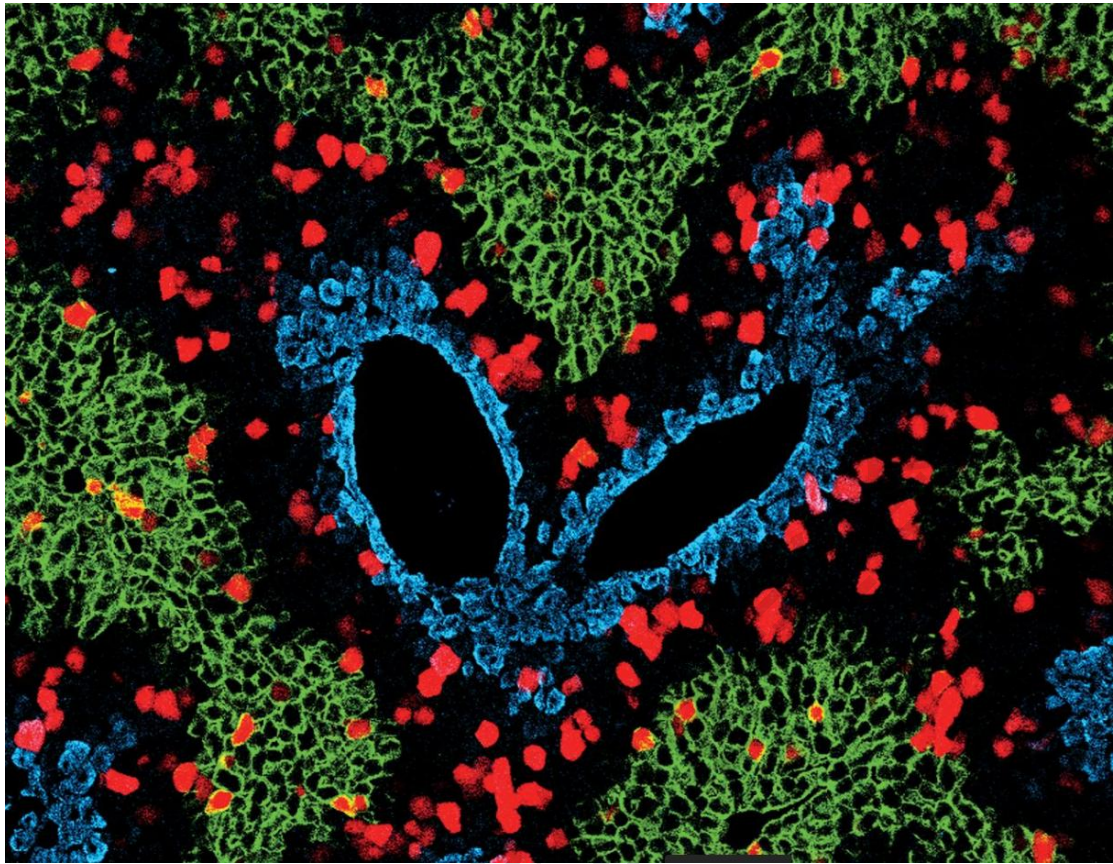


图 B 利用 ProTracer 揭示成体肝脏中新生肝细胞 (tdTomato+) 主要来源于 E-CAD-GS-Zone 2。E-CAD (绿色); GS (青色)。红色信号即新生的肝细胞, 集中在肝小叶的中间区

肝脏组织切片的免疫荧光染色共聚焦显微成像进一步证实了成体肝脏中新生肝细胞主要来源于肝小叶中间区域, 即 E-CAD-GS-的 Zone 2 (图 B)。我们在这一重大发现的实验过程中给研究组提供了肝组织切片免疫荧光染色和共聚焦成像等技术指导以及肝全组织样品荧光标记和肝脏全组织透明化处理、光片显微成像等关键技术支持。

2 专业技术人才介绍

2.1 个人简介

刘晓丽, 硕士, 工程师, 现任职于中国科学院分子细胞科学卓越创新中心细胞分析技术平台荧光显微成像技术部门。2013年毕业于河北师范大学, 2016年上海大获硕士学位; 2013-2016年中国科学院苏州纳米技术与纳米仿生研究所硕士研究生联合培养; 在中科院苏州纳米所纳米-生物界面国家重点实验室做研究生期间, 致力于多肽药物设计与毒性机理研究, 相关研究成果发表于 Journal of Medicinal Chemistry; 2016年加入中科院生物化学和细

胞生物学研究所细胞分析平台，致力于细胞影像技术的开发及应用推广、荧光显微成像大型仪器运维及技术服务的共享。

2.2 专业技术研究方向

主要利用荧光显微成像、共聚焦显微成像、多光子成像、光片成像、超高分辨率成像（SIM、STED、TIRF）、荧光寿命成像、活细胞显微成像、光刺激（FRET、FRAP）等细胞影像技术以及生物图像分析软件为研究所及其他单位提供荧光显微成像专业技术支撑。

2.3 承担科技项目及代表论著

代表性论著：

- [1] Liu, X.; Cao, R.; Wang, S.; Jia, J.; Fei, H., Amphipathicity determines different cytotoxic mechanisms of lysine or arginine rich cationic hydrophobic peptides in cancer cells. J. Med. Chem. 2016, 59, 11, 5238–5247
- [2] 刘晓丽.基于 KLA 的阳离子双亲性抗肿瘤多肽的设计及毒性机理研究[D].上海大学. DOI: CNKI:CDMD:2.1016.745926
- [3] 费浩,丁皓中,刘晓丽,等.阳离子双亲性多肽及其应用:CN107216368A[P]. 2017.

3 获奖及荣誉

2017 年所级中心爱岗敬业奖。