

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.03.004

全反式维甲酸诱导肝前体细胞向肝细胞分化的研究

白光文¹, 李红丽², 申利红², 芦永良², 冯涛²

(1. 重庆市丰都人民医院普外科, 重庆 408200; 2. 重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨全反式维甲酸(All-trans retinoic acid, ATRA)对肝前体细胞分化的影响。方法:取孕 14.5 d 胎鼠制备肝前体细胞,瞬时转染带白蛋白启动子(Albumin promoter)的荧光素酶报告质粒 pALB-Luc,以便实时检测细胞的分化状态。优化 ATRA 诱导条件,分别于诱导后 3、6、9 d 收集细胞总 RNA,半定量 RT-PCR 检测分化相关指标的变化。并于诱导后 11 d 用苏木精-伊红染色法观察细胞形态的改变, PAS 染色观察细胞的分化成熟程度。结果:ATRA 浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时对肝前体细胞分化诱导作用最强。与对照组相比,随培养时间的延长, ATRA 组分化早期指标膜蛋白(Delta like, DLK)、细胞角蛋白(Cytokeratin19, CK19)表达降低更为明显,而甲胎蛋白(Alpha fetal protein, AFP)、白蛋白(Albumin, ALB)表达更为升高。形态学观察细胞体积增大,呈多边形,核浆比率降低,相嵌紧密排列,可见双核细胞。PAS 染色阳性率上升。结论:浓度 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 ATRA 对肝前体细胞分化诱导作用最强, ATRA 能诱导肝前体细胞分化为类肝细胞。

【关键词】肝前体细胞;全反式维甲酸;诱导分化;PAS 染色法

【中国图书分类法分类号】R575

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-12-19

Role of all-trans retinoic acid in the differentiation of hepatic progenitor cells

BAI Guangwen¹, LI Hongli², SHEN Lihong², LU Yongliang², FENG Tao²

(1. Department of General Surgery, the People's Hospital of Chongqing Fengdu;

2. Molecular Medicine and Cancer Research Center, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of all-trans retinoic acid (ATRA) in the differentiation of hepatic progenitor cell.

作者介绍:白光文(1970-),男,副主任医师,
研究方向:肿瘤发生机制及基因治疗。

通信作者:冯涛,男,教授, Email: fengtao9_9@yahoo.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81071770)。

Methods: The hepatic progenitor cell was isolated from E14.5 mouse liver and transfected with pALB-Luc, in which the expression of luciferase was driven by (Albumin, ALB) promoter. The concentration of ATRA based on the expression of ALB was optimized. The change of differentiation markers of (Alpha

[4] Clement P M, Hanauske-Abel H M, Wolff E C, et al. The antifungal drug ciclopirox inhibits deoxyhypusine and proline hydroxylation, endothelial cell growth and angiogenesis in vitro[J]. Int J Cancer, 2002, 100(4):491-498.

[5] Zhang M, Volpert O, Shi Y H, et al. Maspin is an angiogenesis inhibitor[J]. Nat Med, 2000, 6(2):19.

[6] Chen E I, Yates J R. Maspin and tumor metastasis[J]. IUBMB Life, 2006, 58(1):25-29.

[7] Zhang M, Shi Y H, Zhang M. Maspin overexpression modulates tumor cell apoptosis through the regulation of Bcl-2 family proteins[J]. BMC Cancer, 2005, 5:50.

[8] Oshiro M M, Watts G S, Wozniak R J, et al. Mutant p53 and aberrant cytosine methylation cooperate to silence gene expression[J]. Oncogene, 2003, 22(23):3624-3634.

[9] Yoshizawa K, Nozaki S, Okumura A, et al. Loss of maspin is a negative prognostic factor for invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma[J]. Journal of Oral Pathology and Medicine, 2009, 38(6):535-539.

[10] Bal N, Kocer N E, Ertorer M E, et al. Maspin, E-selectin, and P-

selectin expressions in papillary thyroid carcinomas and their correlation with prognostic parameters[J]. Pathol Res Pract, 2008, 204():743-750.

[11] Clement P M, Johansson H E, Wolff E C, et al. Differential expression of eIF5A-1 and eIF5A-2 in human cancer cells[J]. FEBS Journal, 2006, 273(6):1102-1114.

[12] Luo J H, Hua W F, Rao H L, et al. Overexpression of EIF-5A2 predicts tumor recurrence and progression in pTa/pT1 urothelial carcinoma of the bladder[J]. Cancer Sci, 2009, 100(5):896-902.

[13] He L R, Zhao H Y, Li B K, et al. Overexpression of eIF5A-2 is an adverse prognostic marker of survival in stage I non-small cell lung cancer patients[J]. Int J Cancer, 2010, 129(1):143-150.

[14] Tang D J, Dong S S, Ma N F, et al. Overexpression of Eukaryotic initiation factor 5A enhances cell motility and promotes tumor metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2010, 51(4):1255-1263.

[15] Lee D Y, Park C S, Kim H S, et al. Maspin and p53 protein expression in gastric adenocarcinoma and its clinical applications[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2008, 16(1):13-18.

(责任编辑:冉明会)

fetal protein, AFP), (Delta like, DLK), (Cytokeratin19, CK19) and ALB in the hepatic progenitor cell treated with ATRA was evaluated by RT-PCR. The morphological change was observed by HE staining and PAS staining. **Results:** The expression of ALB was the highest when the cell was treated with ATRA a concentration of 1 $\mu\text{mol/L}$. Compared with control group, the expressions of early markers of DLK and CK19 more clearly decreased while AFP and ALB were increased in experimental group. The morphological changes were mainly enlargement of cellular size, decrease of karyoplasms ratio and increase of glycogenesis. **Conclusion:** ATRA can induce the differentiation of hepatic progenitor cell, especially at the concentration of 1 $\mu\text{mol/L}$.

【Key words】hepatic progenitor cell; all-trans retinoic acid; differentiation; periodic acid-schiff stain

维甲酸(Retinoic acid, RA)是维生素 A 的衍生物。和其它类视黄醇一样,它在脊椎动物的发育、内环境的稳定及细胞的增殖分化中都有重要的作用。做为小分子化合物,维甲酸主要通过和核受体 RXRs、RARs 结合,从而调节下游靶基因,行使其功能。

肝脏疾病多最终导致功能的紊乱和脏器的衰竭。肝移植为肝脏疾病的治疗提供了无限的前景。但供体肝源不足、排斥反应及长期免疫抑制剂的治疗限制了肝移植的发展。近年发展起来的干细胞移植给肝脏疾病的治疗提供了新的思路。研究表明胚胎干细胞^[1]、骨髓造血干细胞、间充质干细胞^[2]、脐血干细胞、胎肝前体细胞及成体肝前体细胞均可诱导分化为肝细胞。但其诱导分化的机制及优化诱导分化条件仍不完全清楚。本实验研究拟通过研究全反式维甲酸(All-trans retinoic acid, ATRA)对胎肝前体细胞分化的影响,获得一种诱导肝前体细胞分化的新方法,并进一步研究 RA 诱导肝分化的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

带白蛋白启动子(Albumin promoter)的荧光素酶报告质粒 pALB-Luc 由本实验室构建; ATRA、PAS 染色试剂盒购自 Sigma; RT 及 PCR 相关试剂、Gaussia luciferase 试剂盒购自 Biolabs; TRIzol、LipofectAMINE 以及细胞培养相关试剂购自 invitrogen。

1.2 方法

1.2.1 肝前体细胞的分离和培养 分离孕 14.5 d 胎鼠肝组织,用无钙镁 PBS 冲洗 1 次。将胎肝组织剪成 1 mm 左右组织块,无血清培养基冲洗 3 次后,用 0.25%胰蛋白酶室温消化 20~30 min。观察细胞离散后,用含 10%FBS 的 DMEM 终止消化,反复吹打至细胞分散。800 r/min 离心 3 min,弃上清液,细胞重悬于 10%FBS 的 DMEM,接种于 25 ml 塑料培养瓶中,置于 37.0℃、5%CO₂ 孵箱培养 3~5 h,吸出未贴壁细胞,接种于 collagen 包被的 25 ml 塑料培养瓶中,置于 37.0℃、5%CO₂ 孵箱培养。

1.2.2 瞬时转染质粒 pALB-Luc 接种细胞第 2 天,观察细胞融和度达 40%~60%后,转染受白蛋白(Albumin, ALB)启动子调控的荧光素酶报告基因质粒 pALB-Luc。具体操作见 LipofectAMINE 试剂操作步骤。转染后第 2 天,读数检测转染效率。

1.2.3 ATRA 诱导浓度的优化 以 30%密度接种肝前体细胞 E14.5pool-ALB-Luc 于 24 孔细胞培养板。12 h 后分别加入处理因素:空白对照组、对照组(DMSO 2 $\mu\text{l/ml}$)、ATRA 10、5、1、0.5、0.1、0.05 $\mu\text{mol/L}$ 及 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 组(所有组的 ATRA 均溶于终浓度为 2 $\mu\text{l/ml}$ 的 DMSO 中)。分别于 1、4、7、10、13、15 d 取细胞上清液,每孔 20 μl ,加入荧光素酶工作液 10 μl (荧光素底物 10 μl + 反应 buffer 1 ml),混匀,读数。

1.2.4 RT-PCR 检测细胞分化指标的改变 将细胞分为空白对照组、对照组(DMSO 2 $\mu\text{l/ml}$)、ATRA 1 $\mu\text{mol/L}$ 组(ATRA 溶于终浓度为 2 $\mu\text{l/ml}$ 的 DMSO 中)。分别于诱导后 3、6、9 d 收集细胞。TRIzol 法提取总 RNA, RT-PCR 获得 cDNA。引物序列如下:甲胎蛋白(Alpha fetal protein, AFP): F: 5'-ACGAG-GAAAGCCCTCAG-3'; R: 5'-GCCATTCCCTCACCACAG-3'。细胞角蛋白(Cytokeratin19, CK19): F: 5'-GCCCTAGAGCAGGC-CAAT-3'; R: 5'-ATCTTGTCGCGCAAGTCC-3'。细胞膜蛋白(Delta like, DLK): F: 5'-GCTGGGACGGGAAATTCT-3'; R: 5'-AACCCAGGTGTGCAGGAG-3'。ALB: F: 5'-CCAGACATTCCC-CAATGC-3'; R: 5'-CAAGTTCCGCCCTGTTCAT-3'。GAPDH: F: 5'-GGCTGCCCAGAACATCAT-3'; R: 5'-CGGACACATTGGGGG-TAG-3'。PCR 反应采用 20 μl 体系:上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.2 μl 、模板 2 μl 、dNTP mix(10 mmol/L)0.4 μl 、Taq 酶(5 U/ μl)0.2 μl 、10×PCR buffer 2 μl 、MgCl₂ 25 mmol/L 1.2 μl 、灭菌双蒸水 13.8 μl 。循环条件为 94℃预变性 5 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 40 s, 共 28 个循环。

1.2.5 HE 染色观察细胞形态的改变 将细胞分为空白对照组、对照组(DMSO 2 $\mu\text{l/ml}$)、ATRA 1 $\mu\text{mol/L}$ 组。(ATRA 溶于终浓度为 2 $\mu\text{l/ml}$ 的 DMSO 中。)培养 11 d 后于 4%多聚甲醛固定 10 min, HE 染色。光镜下观察细胞形态的改变。

1.2.6 PAS 染色观察细胞功能的改变 将细胞分为空白对照组、对照组(DMSO 2 $\mu\text{l/ml}$)、ATRA 1 $\mu\text{mol/L}$ 组(ATRA 溶于终浓度为 2 $\mu\text{l/ml}$ 的 DMSO 中)。培养 11 d 后做 PAS 染色。4%多聚甲醛固定 10 min, 流水冲洗 2~3 min, 0.5%Periodic Acid Solution 室温氧化 5 min, 流水冲洗 2~3 min, Schiff's 试剂染色 15~20 min, 流水冲洗 2~3 min, Hematoxylin 染色 1~2 min, 流水冲洗 2~3 min。光镜下观察细胞内糖原沉积情况。

2 结果

2.1 原代肝前体细胞的分离及质粒 PALB-LUC 的瞬时转染 机械消化法获得肝前体细胞(见图 1),经脂质体法瞬时

转染质粒 PALB-LUC, 转染第 2 天检测荧光素酶表达, 读值分别为未转染组 1136, 转染组 13291。说明质粒转染成功, 荧光素酶在 ALB 启动子的启动下表达。

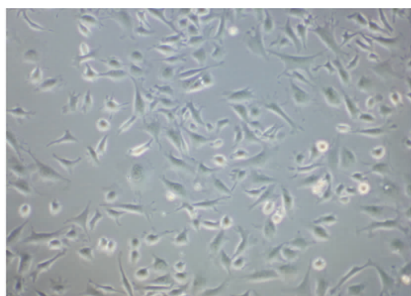


图 1 原代肝前体细胞 (100×)

Fig.1 Morphology of primary hepatic progenitor cells (100×)

2.2 ATRA 诱导浓度的优化

以不同浓度 ATRA 诱导细胞后, 于不同的时间点收集细胞上清液检测荧光素酶表达。结果可见当 ATRA 浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时荧光素酶表达最高。因该荧光素酶表达受 ALB 启动子的调控, 可以推论当 ATRA 浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时, ALB 的表达最高, 对肝前体细胞分化诱导作用最强 (见图 2)。

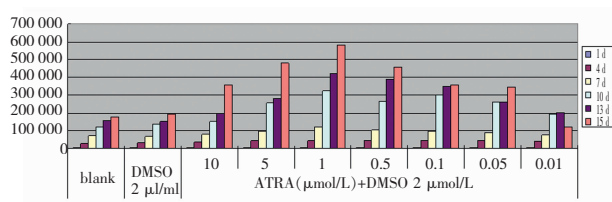


图 2 ATRA 诱导浓度的筛选

Fig.2 Concentration of all-trans retinoic acid-induced screening

2.3 RT-PCR 检测细胞分化指标的改变

将细胞分为空白对照组、对照组 (DMSO 2 $\mu\text{l/ml}$)、ATRA 1 $\mu\text{mol/L}$ 组 (ATRA 溶于终浓度为 2 $\mu\text{l/ml}$ 的 DMSO 中)。分别于 3、6、9 d 收集细胞, 检测肝前体细胞分化指标 AFP、DLK、CK19、ALB 的改变。结果显示分化早期指标 DLK、CK19 随培养时间的延长表达降低, 在 RA 诱导下降低更为明显。晚期指标 ALB 随培养时间的延长表达上升, ATRA 组上升更为明显。而 AFP 随培养时间的延长表达上升, 与其体内的表达规律相一致。以上结果说明肝前体细胞有自发分化的趋势, 而 RA 可进一步促进其分化 (见图 3)。

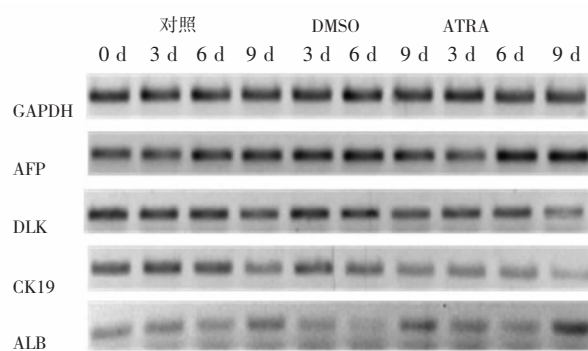
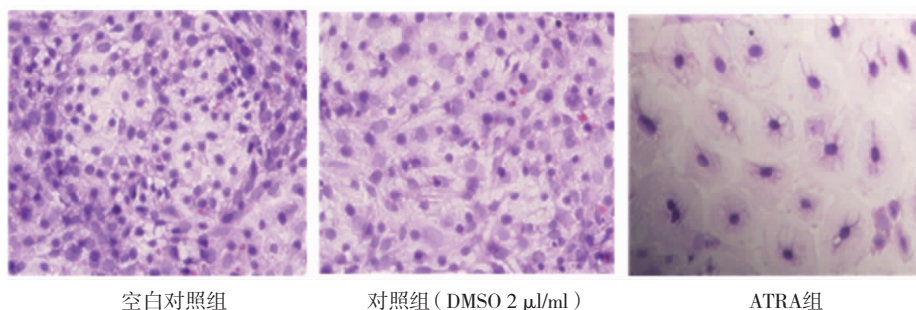


图 3 肝前体细胞分化指标的改变

Fig.3 Indicators of liver precursor cells change

2.4 HE 染色观察细胞形态的改变

将细胞分为空白对照组、对照组 (DMSO 2 $\mu\text{l/ml}$)、ATRA 1 $\mu\text{mol/L}$ 组 (ATRA 溶于终浓度为 2 $\mu\text{l/ml}$ 的 DMSO 中)。培养后 11 d 后做 HE 染色。与对照组相比, ATRA 组细胞体积增大、呈多边形、核浆比率降低、相嵌紧密排列、出现双核细胞 (见图 4)。



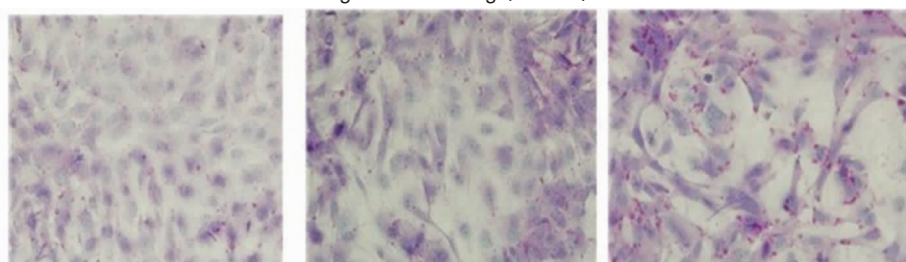
空白对照组

对照组 (DMSO 2 $\mu\text{l/ml}$)

ATRA 组

图 4 HE 染色 (200×)

Fig.4 HE staining (200×)



空白对照组

对照组 (DMSO 2 $\mu\text{l/ml}$)

ATRA 组

图 5 PAS 染色 (200×)

Fig.5 PAS staining (200×)

2.5 PAS 染色观察细胞功能的改变

将细胞分为空白对照组、对照组(DMSO 2 μ l/ml)、ATRA 1 μ mol/L 组(ATRA 溶于终浓度为 2 μ l/ml 的 DMSO 中)。培养后 11 d 后做 PAS 染色。可见与对照组相比,ATRA 组出现较多的糖原染色阳性细胞(见图 5)。

3 讨论

肝前体细胞具有双向分化潜能,即可分化为肝细胞,有时也可分化为胆管细胞。在肝前体细胞的谱系分化中有多种转录因子参与了调节,如核受体家族的肝细胞核因子 6(Hepatic nuclear factor 6, Hnf 6)早期可抑制肝前体细胞向胆管细胞分化,但后期却促进胆系的分化和胆管的形成^[9]。亮氨酸链转录因子 C/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein α , Cebp α)的缺失或抑制阻碍肝前体细胞向肝细胞分化,同时诱导其向胆系分化^[4]。Tbx3 通过抑制肿瘤抑制基因 p19ARF 的表达来促进肝前体细胞向肝细胞分化等^[9]。同时,一些细胞因子如肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor, HGF),表皮生长因子(Epidermal growth factor, EGF),细胞外基质,地塞米松等均有报道可促进肝前体细胞的分化^[6]。尽管如此,肝前体细胞谱系分化的调控机制仍然不清,仍然没有统一的、优化的分化培养条件。深入研究肝前体细胞的谱系分化调控机制对于理解肝脏的发生、组织形成、各种肝脏疾病的发病机理及肝细胞移植的临床应用都有重要意义。

ATRA 是种作用很强的分化诱导剂,在脊椎动物的胚胎发育中具有重要的生物学作用。RA 主要通过与其受体结合调节下游靶基因,同时也可和其它胚胎发育中关键的信号系统如成纤维细胞生长因子(Fibroblast growth factors, FGFs)^[7]及 sonic hedgehog(SHH)、BMP、Wnt^[8]等,发生交互作用,行使功能。同时 RA 在多种组织的前体细胞谱系分化中也有重要作用,尤其是对神经干细胞的研究较多。已有研究发现脑组织的干细胞 NICHE 区域有 RA 信号途径的活化,且该信号途径参与了神经元的分化。将该区域的神经干细胞团与 RA 合成抑制剂(Diethylaminobenzaldehyde, DEAB)共培养可降低神经元的形成和放射状胶质细胞指标的表达^[9]。该研究的发现可解释老年性神经变性疾病。另外,RA 在心脏、肺、肾等组织中也可见类似报道。但其对肝前体细胞的诱导分化作用未见报道。

本实验从 E14.5 d 的胎鼠中成功分离肝细胞,此时的肝细胞被认为是具有双向分化潜力的肝前体细胞。转染荧光素酶报告质粒 pALB-Luc,以 ALB 启动子启动 luciferase 的表达,从而可通过检测细胞培养上清液中荧光素酶表达的改变来模拟白蛋白表达的改变,极大的方便了监测肝前体细胞分化的成熟程度。用 ATRA 诱导以后,发现肝细胞分化指标 ALB 及原始肝细胞指标 AFP 表达上升,而早期分化指标 DLK 及胆

系指标 CK19 表达降低。说明 ATRA 能诱导肝前体细胞向肝细胞分化。为进一步证明该结论,用 HE 染色观察诱导后肝前体细胞的形态改变,发现 ATRA 组细胞形态明显增大,核浆比率降低,成多边形,排列紧密,可见双核细胞。细胞的分化程度明显高于对照组。而糖原染色可见 ATRA 组阳性细胞明显增加。以上结果均证实 ATRA 能诱导肝前体细胞向肝细胞分化,为进一步研究肝前体细胞向肝细胞分化的条件奠定了基础。但是目前 ATRA 诱导肝前体细胞向肝细胞分化的机制仍然不清。其作用的信号途径及受体直接调节的下游基因都是我们下一步研究的目标。

参 考 文 献

- [1] Takamichi I, Ken F, Kentaro Y, et al. Effects of extracellular matrixes and growth factors on the hepatic differentiation of human embryonic stem cells[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, 295(2): 313–321.
- [2] Zheng Y B, Gao Z L, Xie C, et al. Characterization and hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic fluid and human bone marrow: A comparative study[J]. *Cell Biol Int*, 2008, 32(11): 1439–1448.
- [3] Clotman F, Lannoy V J, Reber M, et al. The onecut transcription factor HNF6 is required for normal development of the biliary tract[J]. *Development*, 2002, 129(8): 1819–1828.
- [4] Yamasaki H, Sada A, Iwata T, et al. Suppression of C/EBP α expression in periportal hepatoblasts may stimulate biliary cell differentiation through increased Hnf6 and Hnf1b expression[J]. *Development*, 2006, 133(21): 4233–4243.
- [5] Atsushi S, Sayaka S, Dirk B, et al. Tbx3 controls the fate of hepatic progenitor cells in liver development by suppressing p19ARF expression[J]. *Development*, 2008, 135(9): 1589–1595.
- [6] Qin A, Zhou X Q, Yu H, et al. Growth factors and extracellular matrix of liver precursor cell proliferation and differentiation[J]. *Chinese Journal of Hepatology*, 2004, 12(7): 406–409.
- [7] Diez D, Corral R, Storey K G, et al. Opposing FGF and retinoid pathways: a signalling switch that controls differentiation and patterning onset in the extending vertebrate body axis[J]. *Bioessays*, 2004, 26(8): 857–869.
- [8] Ribes V, Wang Z, Dollé P, et al. Retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2)-mediated retinoic acid synthesis regulates early mouse embryonic forebrain development by controlling FGF and sonic hedgehog signaling[J]. *Development*, 2006, 133(2): 351–361.
- [9] Haskell G T, LaMantia A S. Retinoic acid signaling identifies a distinct precursor population in the developing and adult forebrain[J]. *J. Neurosci*, 2005, 25(33): 7636–7647.

(责任编辑:冉明会)