

· 论 著 ·

不同 Wnt 信号分子对胚胎肝干细胞分化的影响研究

彭 利¹, 马文军², 崔洁洁², 龚梦嘉², 何 昀^{2△}

(重庆医科大学附属儿童医院:1. 医学检验科;2. 儿科研究所干细胞实验室/儿童发育疾病研究教育部重点实验室/儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地/儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014)

摘 要:**目的** 探讨不同 Wnt 蛋白对小鼠胚胎肝祖细胞 HP14-19 分化的作用,筛选有效的肝干细胞定向分化体系,为治疗肝衰竭提供理论基础。**方法** 携带不同 Wnt 蛋白基因的 19 种重组腺病毒,分别感染 HP14-19,检测清蛋白启动子启动的荧光素酶报告基因活性;实时荧光定量 PCR 检测 *detla* 蛋白 *DLK*、甲胎蛋白 (AFP)、清蛋白 (ALB)、上皮特异性标志物细胞角蛋白 (CK18) 等肝细胞分化成熟相关标志物的表达情况;糖原 (PAS) 染色实验和吲哚菁绿 (ICG) 摄取实验用于检测肝细胞合成代谢功能。**结果** 19 种 Wnt 腺病毒均能有效感染 HP14-19 细胞并表达相应的 Wnt 信号蛋白,随着处理时间的延长,荧光素酶值逐渐升高,其中 Wnt3a 的作用最明显;Ad-Wnt3a 组肝干细胞标志 *DLK*、AFP 表达明显下降;肝细胞特异性成熟标志 ALB、CK18 明显上调;Ad-Wnt3a 处理后 PAS 染色可见 70%~80% 的细胞染色阳性,细胞由多角形变为长梭形;ICG 摄取实验可见大量绿色圆形或者多边形阳性细胞。**结论** Wnt3a 蛋白是诱导 HP14-19 细胞成熟分化的重要蛋白,诱导分化后的细胞类似于成熟肝细胞,有较强的合成代谢功能;对进一步研究肝干细胞分化调控及肝移植应用有重要意义。

关键词: Wnt 信号分子; 胚胎肝祖细胞; 分化

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.17.016

中图法分类号: R34

文章编号: 1673-4130(2020)17-2121-05

文献标识码: A

Effect of different Wnt signaling molecules on the differentiation of embryonic liver stem cells

PENG Li¹, MA Wenjun², CUI Jiejie², GONG Mengjia², HE Yun^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Laboratory of Stem Cell Biology and Therapy, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To explore the effects of different Wnt proteins on the differentiation of mouse embryonic liver progenitor cells HP14-19, and to screen an effective hepatic stem cell-directed differentiation system to provide a theoretical basis for the treatment of liver failure. **Methods** HP14-19 were infected with 19 recombinant adenoviruses carrying different Wnt protein gene respectively, and the activity of the luciferase reporter gene initiated by the albumin promoter was detected; real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect the expression of hepatocyte differentiation and maturation related markers such as *DLK*, AFP, albumin (ALB), epithelial specific marker cytokeratin (CK18); glycogen (PAS) staining test and indocyanine green (ICG) uptake test were used to detect the anabolic function of liver cells. **Results** All 19 Wnt adenoviruses could effectively infect HP14-19 cells and expressed the corresponding Wnt signal protein. As the treatment time increased, the luciferase value gradually increased, and Wnt3a had the most obvious effect. The expression of hepatic stem cell markers *DLK* and AFP in the Ad-Wnt3a group was significantly decreased; the hepatocyte-specific maturation markers ALB and CK18 were significantly increased; after Ad-Wnt3a treatment, 70%—80% of the cells were stained positively in PAS staining, and the cells changed from a polygonal

作者简介: 彭利,女,主管技师,主要从事临床免疫学检验。△ **通信作者,** E-mail: dr_yun_he@hospital.cqmu.edu.cn.

本文引用格式: 彭利, 马文军, 崔洁洁, 等. 不同 Wnt 信号分子对胚胎肝干细胞分化的影响研究[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(17): 2121-2124.

shape to a long spindle shape; a large number of green round or polygonal positive cells were seen in the ICG uptake experiment. **Conclusion** Wnt3a protein is an important protein that induces the maturation and differentiation of HP14-19 cells. The induced differentiated cells are similar to mature hepatocytes and have a strong anabolic function; it is of great significance for further research on the regulation of hepatic stem cell differentiation and liver transplantation.

Key words: Wnt signaling molecule; embryonic liver progenitor cells; differentiation

肝功能衰竭是临床最常见的病死率极高的肝病症候群,严重威胁着人类的健康^[1]。治疗肝衰竭最有效的方法是肝移植,但由于供肝来源严重缺乏,手术难度高等,导致很大一部分患者得不到移植的机会。最新研究结果显示,肝干细胞移植在急慢性肝功能衰竭的治疗中有重要作用,但也存在着肝细胞在体外不能大量扩增且传代后不能保持其原有细胞特性的问题。本课题组前期研究发现,肝干细胞具有长时间持续增生的能力,并且能在体外扩增获得足够的细胞数,但如何筛选和优化稳定的诱导体系、使肝干细胞定向分化在目前阶段亟待解决。Wnt 信号通路在细胞增殖、分化、生长、迁徙及氧化应激等多方面有复杂的信号级联反应,调控肝脏发育和肝细胞分化^[2-4]。迄今为止,对于肝细胞分化及其调控信号通路研究主要集中于 β -catenin^[5],而对 Wnt 信号其他成员的研究相对较少。因此,本研究将集中探讨 Wnt 家族成员对小鼠胚胎肝干细胞诱导分化的影响,筛选出最优通路和诱导因素,以期建立有效的肝干细胞定向分化体系,为临床肝细胞移植治疗肝衰竭提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及材料 DMEM 培养基、荧光素酶检测试剂盒(NEB 公司)、胎牛血清(Gibco 公司)、清蛋白(ALB)抗体(Santa Cruz),实时荧光定量 PCR 试剂(Real-time PCR-SYBR[®] Green II, 宝生物工程公司),糖原(PAS)染色试剂盒(SIGMA 公司),吖啶菁绿(ICG)试剂(SIGMA 公司)。

1.2 细胞与腺病毒感染 小鼠胚胎肝祖干细胞 HP14-19 由美国芝加哥大学肿瘤研究中心赠送, HEK293 细胞由本实验室保存。HP14-19 在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 37 °C、5% CO₂ 环境下培养。19 种 Ad-Wnt 腺病毒和表达绿色荧光蛋白的腺病毒(Ad-GFP)(阴性对照)由美国芝加哥大学肿瘤研究中心馈赠,扩增腺病毒,当细胞感染率达到 95% 时,收集细胞并离心,得病毒液, -80 °C 保存。病毒感染细胞接种于 24 孔板上, 24 h 荧光显微镜检测 GFP 表达。

1.3 荧光素酶活性检测 在 24 孔板上接种携带

ALB-Gluc 报告基因的 HP14-19 细胞,分别加入 Ad-GFP 和 Ad-Wnt 病毒液,在转染后的第 4、6、9 天取上清液检测荧光素酶活性。每组设置复孔,重复试验 3 次,在酶标仪上选择 470 nm 波长处读数。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测 delta 蛋白(DLK)、甲胎蛋白(AFP)等肝细胞特征性标志物 mRNA 水平采用 SYBR Green[®] I 染料法检测各组细胞中 DLK、ALB、AFP、上皮特异性标志物细胞角蛋白 18(CK18)等标志物 mRNA 的表达量。分别收集各组细胞转染 9 d 后总 RNA, 逆转录制备 cDNA, 实时荧光定量 PCR: SRBR Premix Ex Taq[™] II 12.5 μ L, 模板 cDNA 2 μ L, 上下引物各 0.5 μ L (10 μ mol/L), 灭菌双蒸水 10 μ L。PCR 条件: 95 °C 5 min, 94 °C 15 s, 65 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环。实验重复 3 次。

1.5 PAS 染色实验 HP14-19 细胞加入 Ad-GFP 和 Ad-Wnt3a 病毒液。弃原培养基, 4% 多聚甲醛固定 15 min; 后加入高碘酸溶液, 室温放置 5 min; 希夫试剂染色 15 min; 苏木染色 1 min; 流水冲洗 2 min, 1% 氨水 10 s, 流水冲洗。显微镜观察。

1.6 ICG 摄取功能检测实验 HP14-19 细胞分别加入 Ad-GFP 和 Ad-Wnt3a 病毒液, 24 孔板进行分化培养, 加入配制好的 ICG 工作液于 24 孔板中(500 μ L/孔), 在 37 °C 中孵育 1 h; 显微镜下观察细胞被诱导后的 ICG 摄取情况及细胞形态变化, 拍照记录。

1.7 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行处理。组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 免疫荧光染色结果 重组腺病毒 Ad-GFP 和 Ad-Wnt 1-16 均能够高效转染 HP14-19 细胞, 转染率为 60% ~ 80%, 其中 GFP、Wnt3a、Wnt5b 和 Wnt11 转染结果见图 1。

2.2 荧光素酶报告基因活性检测结果 19 种 Wnt 腺病毒均能有效感染 HP14-19 细胞并表达相应的 Wnt 信号蛋白, 随着处理时间的延长, 荧光素酶值的读数逐渐升高, 组间比较发现, Wnt2、Wnt3a、Wnt7a 和 Wnt8a 组较 GFP 阴性对照组明显增高, 其中 Wnt3a 的作用最明显。见图 2。

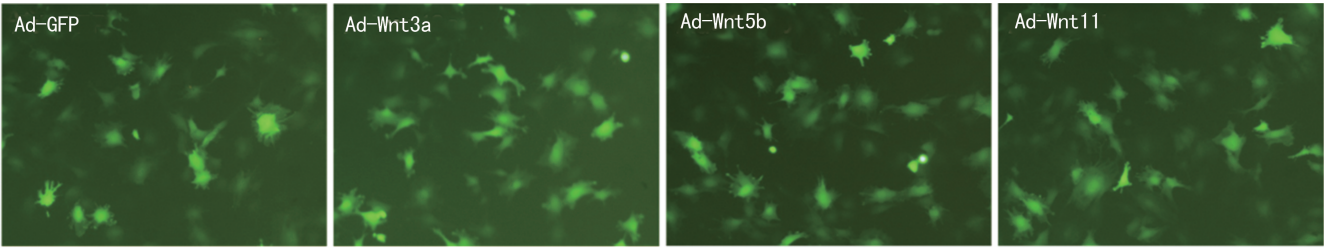


图 1 不同重组腺病毒对 HP14-19 细胞的感染情况 (200×)

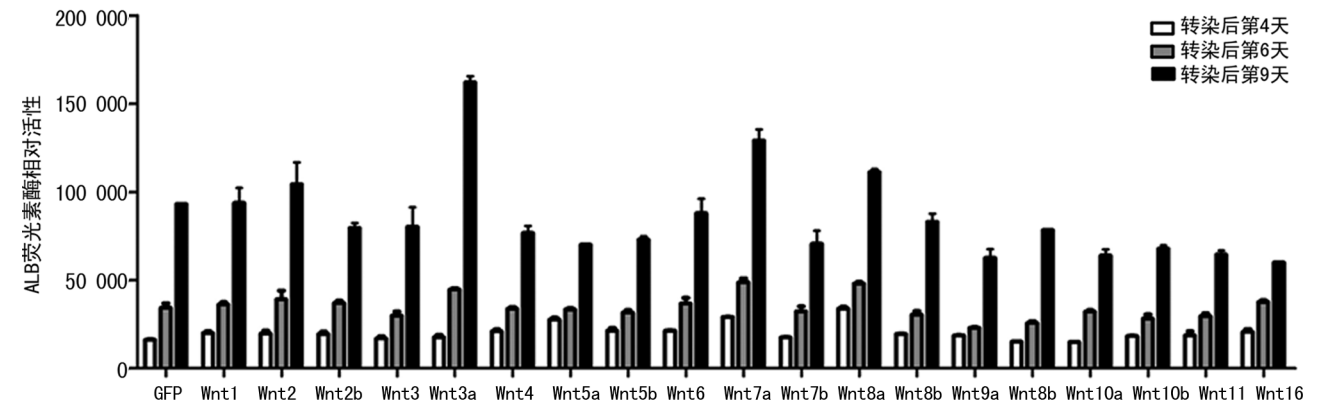


图 2 HP14-19 转染后第 4、6、9 天的 ALB-GLuc 活性

2.3 mRNA 表达情况比较 实时荧光定量 PCR 结果显示,Ad-Wnt3a 组肝干细胞标志 DLK、AFP 表达明显下降;肝细胞特异性成熟标志 ALB、CK18 明显上调(图 3),差异有统计学意义($P<0.05$)。

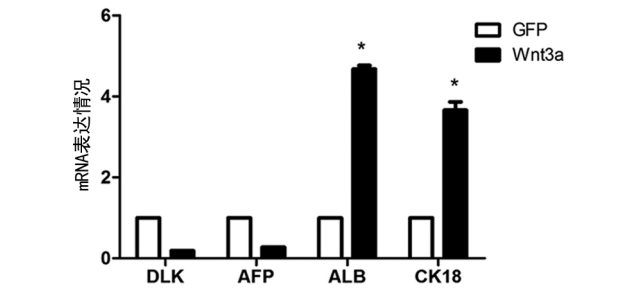


图 3 肝表面标志物 DLK、AFP、ALB、CK18 的 mRNA 表达情况

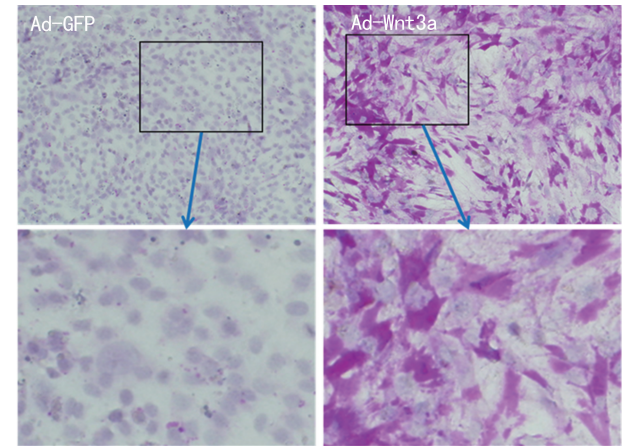


图 4 Ad-Wnt3a 处理后 HP14-19 细胞 PAS 染色情况 (100×)

2.4 PAS 染色实验结果 HP14-19 细胞 PAS 染色呈弱阳性,而 Ad-Wnt3a 处理后 10 d,PAS 染色可见 70%~80% 的细胞染色阳性,细胞质内存在大量紫红色颗粒,细胞形态由多角形变为长梭形(图 4)。

2.5 ICG 摄取实验结果 HP14-19 细胞几乎没有 ICG 摄取能力,但经 Ad-Wnt3a 处理后,ICG 摄取实验可见大量绿色圆形或者多边形阳性细胞(图 5)。

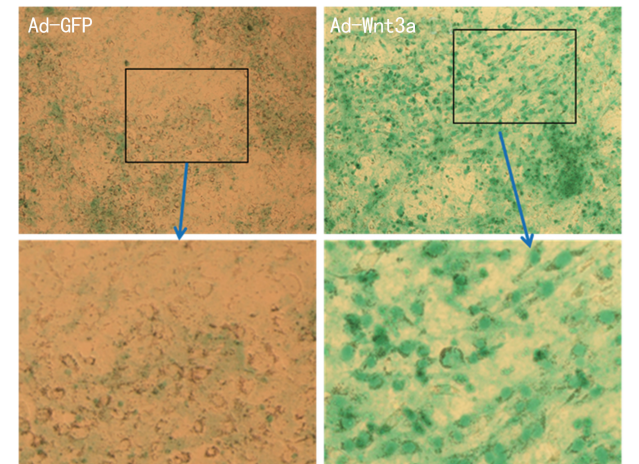


图 5 Ad-Wnt3a 处理后 HP14-19 细胞 ICG 摄取情况 (100×)

3 讨 论

肝功能衰竭是临床最常见的肝病症候群,其病死率高,且在我国发病率呈上升趋势。肝癌干细胞/前体细胞理论的提出是人们对肝脏疾病及其治疗认识的新开始^[6]。肝干细胞移植已经成功应用在动物模型及体外试验中^[7-8],但其在细胞的再生、分化中的作

用机制仍没有明确。深入开展胚胎肝干细胞分化成熟机制的研究对认识肝脏发育、治疗肝衰竭及肝干细胞的临床应用有重要作用。

肝干细胞的分化是一个复杂、受多种因素影响的过程,多种因子和通路在促进分化的过程中起关键性调控作用。Wnt 信号通路具有广泛的生物学功能,在多种细胞增殖、分化、生长、迁徙及氧化应激等多方面具有复杂的信号级联反应,也在肝脏发育和肝细胞分化调控中具有重要作用。现阶段已发现的 Wnt 蛋白有 19 种,分别参与了细胞生长分化、胚胎形成及肿瘤发生过程^[9]。本研究中,通过 ALB 启动子启动的荧光素酶报告基因活性检测筛选发现,Wnt2、Wnt3a、Wnt7a 和 Wnt8a 均能有效诱导肝细胞清蛋白表达,其中 Wnt3a 组 ALB 荧光素酶活性最高,提示 Wnt3a 可在成熟的肝细胞中高表达。HP14-19 细胞自身 PAS 染色呈弱阳性,几乎没有 ICG 摄取能力,而经 Ad-Wnt3a 处理后,70%~80% 的细胞 PAS 染色可见阳性,ICG 摄取实验可见大量绿色圆形或者多边形阳性细胞,证实 Wnt3a 诱导的 HP14-19 细胞可表达成熟肝细胞表面标志物,由此得出结论,Wnt3a 能够诱导 HP14-19 向成熟肝细胞分化。Wnt3a 是 Wnt 蛋白中一种重要的亚型,其分布广泛,调节基因多样,主要通过经典 Wnt 信号途径发挥作用^[10-11]。课题组前期研究发现,Frizzled 受体的同源分泌形式即分泌型同源卷曲蛋白家族(SFRPs)能够与 Wnt 蛋白特异性结合,从而竞争性抑制 Wnt 蛋白与 Frizzled 受体结合,阻止信号传导^[12]。Frzb 是 SFRP2 的一个亚型,二者仅可在发育早期的肝组织中被检测到,而成熟阶段的肝细胞中几乎检测不到,即 Frzb 的表达下调,由此推测在肝细胞的分化过程中,Wnt3a 高表达而其拮抗因子 Frzb 表达下调可能是肝脏发育和肝细胞分化所必需的。

研究发现 Ad-Wnt3a 诱导 HP 14-19 细胞高表达 Wnt3a 后,PAS 染色结果显示细胞形态由多角形转变为长梭形,同时实时荧光定量 PCR 结果显示,HP14-19 细胞中 CK18 的表达量明显下调。有研究发现 Wnt 信号途径在小鼠肝前体细胞发生上皮-间质转化(EMT)的过程中发挥重要作用^[13],但其具体的机制仍不明确。Wnt3a 是 Wnt 经典途径的代表蛋白^[14-15],此外,Wnt3a 的高表达可以显著升高 EMT 转录因子 Snail 的表达,而 Snail 作为 EMT 过程中的关键调控因子,可通过抑制间质标志物 E-钙黏附蛋白的表达使 N-钙黏附蛋白表达上调,从而削弱细胞间的连接,诱导 EMT 发生^[16]。由此,研究者推断 Wnt3a 在诱导 HP14-19 向成熟肝细胞分化的同时介导了 EMT 的发

生。

4 结 论

Wnt 信号通路在肝脏发育和肝细胞分化调控中具有重要作用。本研究利用不同 Wnt 蛋白基因的 19 种重组腺病毒,分别感染 HP14-19 细胞,通过荧光素酶报告系统筛选、肝细胞相关标志物的表达检测,PAS 实验和 ICG 摄取实验检测肝细胞功能,Wnt3a 蛋白是诱导 HP14-19 细胞成熟分化的重要蛋白,诱导分化后的细胞类似于成熟肝细胞,有较强的合成代谢功能。研究结果进一步说明了 Wnt 蛋白在肝干细胞分化调控中的作用,对进一步研究肝干细胞分化调控及肝移植应用有重要意义。

参考文献

- [1] 中华医学会肝病学分会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊治指南[J]. 中华肝病杂志,2012,21(3):177-183.
- [2] KIM H, KIM S, SONG Y, et al. Dual Function of Wnt Signaling during Neuronal Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells [J]. Stem Cells Int, 2015, 2015: 459301.
- [3] LEWIS A E, VASUDEVAN H N, O'NEILL A K, et al. The widely used Wnt1-Cre transgene causes developmental phenotypes by ectopic activation of Wnt signaling[J]. Dev Biol, 2013, 379(2):229-234.
- [4] CREMA A, LEDDA M, FIORETTI D, et al. Combination of cord blood-derived human hepatic progenitors and hepatogenic factors strongly improves recovery after acute liver injury in mice through modulation of the Wnt/ β -catenin signaling[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2019, 13(6):1031-1043.
- [5] TAN Y F, TANG L, OUYANG W X, et al. β -catenin-coordinated lncRNA MALAT1 up-regulation of ZEB-1 could enhance the telomerase activity in HGF-mediated differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocytes [J]. Pathol Res Pract, 2019, 215(3):546-554.
- [6] DHAWAN A, STROM S C, SOKAL E, et al. Human hepatocyte transplantation[J]. Methods Mol Biol, 2010, 640:525-534.
- [7] BOYD A, NEWSOME P, LU W Y. The role of stem cells in liver injury and repair[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 13(7):623-631.
- [8] LIU Q W, LIU Q Y, LI J Y, et al. Therapeutic efficiency of human amniotic epithelial stem cell-derived functional hepatocyte-like cells in mice with acute hepatic failure[J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1):321-333.
- [9] 谢亮海, 蒋晗, 吴福生. Wnt/ β -catenin 信号通路在肝细胞癌中的促进作用[J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(6): 913-916.

Group [EB/OL]. (2020-2-11) [2020-2-24]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.07.937862v>.

[6] YANG Y, LU Q, LIU M, et al. Epidemiological and clinical features of the 2019 novel coronavirus outbreak in China[EB/OL]. (2020-2-21) [2020-2-24]. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.10.20021675v2>.

[7] HUANG C, WANG Y, LI X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China[J]. Lancet, 2020, 395(10223):497-506.

[8] RALPH R, LEW J, ZENG T, et al. 2019-nCoV (Wuhan virus), a novel Coronavirus; human-to-human transmission, travel-related cases, and vaccine readiness[J]. J Infect Dev Ctries, 2020, 14(1):3-17.

[9] BAJEMA K L, OSTER A M, MCGOVERN O L, et al. Persons Evaluated for 2019 Novel Coronavirus- United States, January 2020 [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2020, 69(6):166-170.

[10] CHAN J F, YUAN S, KOK K H, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission; a study of a family cluster[J]. Lancet, 2020, 395(10223):514-523.

[11] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第六版)的通知(国卫办医函〔2020〕145号)[EB/OL]. (2020-02-19) [2020-02-25]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202002/8334a8326dd94d329df351d7da8aefc2.shtml>.

[12] ZHANG H, KANG Z, GONG H, et al. The digestive system is a potential route of 2019-nCoV infection; a bioinformatics analysis based on single-cell transcriptomes [EB/OL]. (2020-01-31) [2020-02-24]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.01.30.927806v1>.

[13] CHEN H, GUO J, WANG C, et al. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records[EB/OL]. (2020-02-13) [2020-02-24]. [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(20\)30360-3/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(20)30360-3/fulltext).

[14] TIAN X, LI C, HUANG A, et al. Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody[J]. Emerg Microbes Infect, 2020, 9(1):382-385.

[15] RICHARDSON P, GRIFFIN I, TUCKER C, et al. Baricitinib as potential treatment for 2019-nCoV acute respiratory disease[J]. Lancet, 2020, 395(10223):e30-e31.

[16] YANG Y, LU Q, LIU M, et al. Epidemiological and clinical features of the 2019 novel coronavirus outbreak in China [EB/OL]. (2020-02-12) [2020-02-24]. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.10.20021675v2>.

[17] 重庆市卫生健康委员会. 2月13日重庆市新冠肺炎疫情防控工作新闻发布会疫情通报[EB/OL]. (2020-02-13) [2020-02-15]. http://wsjkw.cq.gov.cn/zwgk_242/fdzdgnr/tzgg/202002/t20200213_6490000.html.

(收稿日期:2020-02-28 修回日期:2020-06-19)

(上接第 2124 页)

[10] HE S, LU Y, LIU X, et al. Wnt3a; functions and implications in cancer[J]. Chin J Cancer, 2015, 34(12):554-562.

[11] PASHIRZAD M, FIUJI H, KHAZEI M, et al. Role of Wnt3a in the pathogenesis of cancer, current status and prospective[J]. Mol Biol Rep, 2019, 46(5):5609-5616.

[12] COLLAVIN L, KIRSCHNER M W. The secreted Frizzled-related protein Sizzled function as a negative feedback regulator of extreme ventral mesoderm[J]. Development, 2003, 130(4):805-816.

[13] BI Y, HUANG J, HE Y, et al. Wnt antagonist SFRP3 inhibits the differentiation of mouse hepatic progenitor cells [J]. J Cell Biochem, 2009, 108:295-305.

[14] NALESSO G, SHERWOOD J, BERTRAND J, et al. Wnt-3a modulates articular chondrocyte phenotype by activating both canonical and noncanonical pathways[J]. J Cell Biol, 2011, 193(3):551-564.

[15] LUAN F, MA K, MAO J, et al. Differentiation of human amniotic epithelial cells into osteoblasts is induced by mechanical stretch via the Wnt/ β catenin signalling pathway [J]. Mol Med Rep, 2018, 18(6):5717-5725.

[16] LARRIBA M J, BONILLA F, MUNOZ A. The transcription factors Snail1 and Snail2 repress vitamin D receptor during colon cancer progression[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2010, 121(1/2):106-109.

(收稿日期:2020-01-06 修回日期:2020-04-18)