论著

文章编号:1000-5404(2013)20-2208-04

Wnt3a 诱导小鼠肝前体细胞上皮-间质转化

胡代曦[1,2],张锡峰[1,2],芦永良[1,2],冯 涛[1,2],黄佳祎[1,3] (400016 重庆,重庆医科大学:分子医学与肿瘤研究中心[1],生物化学与分子生物学教研室[2],病理生理学教研室[3])

[摘要] **目的** 探讨 Wnt3a 对小鼠肝前体细胞发生上皮-间质转化的影响。**方法** 将表达 Wnt3a 的腺病毒 Ad-GFP-Wnt3a 转入小鼠肝前体细胞中,与空白对照组相比,观察其形态变化。细胞划痕实验和细胞迁移实验观察其对小鼠肝前体细胞迁移能力的影响。实时荧光定量 Real-time PCR 和 Western blot 分别检测小鼠肝前体细胞中上皮标志物和间质标志物的表达改变。**结果** 镜下观察,高表达 Wnt3a 的小鼠肝前体细胞由不规则多边形变为长梭形。细胞划痕实验结果显示,Ad-Wnt3a 组细胞 48h 迁移距离为(0.53 ± 0.05)mm, Ad-GFP 组细胞 48 h 迁移距离为(0.33 ± 0.02)mm,相对对照组,其迁移距离增加,差异具有统计学意义($P<0.05$)。细胞迁移实验结果显示,Ad-GFP 组 24 h 穿过小孔的细胞为(10.33 ± 2.08)个,而 Ad-Wnt3a 组穿过的细胞为(62.00 ± 3.60)个,相对对照组,其穿过小孔的细胞数量增加,差异具有统计学意义($P<0.01$)。RT-PCR 和 Western blot 结果显示,间质标志物 N-cadherin、vimentin 和 snail 的 mRNA 和蛋白水平表达上调,相反上皮标志物 E-cadherin 和 CK-18 的 mRNA 水平和蛋白水平表达下调,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** Wnt3a 能够促使小鼠肝前体细胞发生上皮-间质转化,提示其可能参与了肝纤维化的发展进程。

[关键词] Wnt3a;小鼠肝前体细胞;上皮-间质转化

[中图法分类号] R322.47;R394.1;R730.2 [文献标志码] A

Wnt3a induces epithelial-mesenchymal transition in mouse hepatic progenitor cells

Hu Daixi[1,2], Zhang Xifeng[1,2], Lu Yongliang[1,2], Feng Tao[1,2], Huang Jiayi[1,3] ([1]Research Center of Molecular Medicine and Cancer; [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, [3]Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of Wnt3a on epithelial mesenchymal transition in mouse hepatic progenitor cells. **Methods** The mouse hepatic progenitor cells were infected with Ad-GFP-Wnt3a virus. Light microscopy was used to observe the morphology of mouse hepatic progenitor cells compared with blank cells. The metastatic capacity of cells was observed by wound healing assay and Transwell assay. The expression of epithelial and mesenchymal markers at mRNA and protein levels was detected by real-time PCR and Western blotting. **Results** The mouse hepatic progenitor cells were highly infected by Ad-GFP-Wnt3a virus. Mouse hepatic progenitor cells had morphological changes from epithelial to a spindle-like shape. Wound-healing assay showed the migration distance of were 0.53 ± 0.05 and 0.33 ± 0.02 mm, respectively for Ad-Wnt3a cells and Ad-GFP cells ($P<0.05$). Transwell assay showed the cells permeating the Transwell membrane were 62.00 ± 3.60 and 10.33 ± 2.08 respectively for Ad-Wnt3a cells and Ad-GFP cells ($P<0.01$). Real-time PCR and Western blotting showed the mRNA and protein levels of epithelial markers N-cadherin, vimentin and snail were increased significantly, but, those of mesenchymal markers E-cadherin and CK-18 were decreased significantly ($P<0.05$). **Conclusion** Wnt3a can induce epithelial mesenchymal transition in mouse hepatic progenitor cells indicating that Wnt3a might be involved in the progress of liver fiberosis.

[**Key words**] Wnt3a;mouse hepatic progenitor cells;epithelial mesenchymal transition

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81071770,81201679). Corresponding author: Huang Jiayi, E-mail: e738741@126.com

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是一种常见的、恶性程度极高的肿瘤。我国是肝癌的高发国家之一,其中病毒性肝炎后肝硬化引起的原发性肝癌在我国尤为流行。流行病学调查显示,约 80% 的 HCC 伴有慢性肝炎和肝硬化的发生[1]。肝脏受到致病因子的侵袭后,首先发生肝纤维化,而后进一步发展为肝硬化,进而导致肝脏的功能障碍。上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的激活是导

[基金项目] 国家自然科学基金(81071770,81201679)

[通信作者] 黄佳祎,E-mail:e738741@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130619.1558.019.html(2013-06-19)

致纤维化发生的关键环节。研究证明,EMT 在肾脏、肝脏、肺、眼睛和浆膜的纤维化病变过程中起着重要的作用[2]。EMT 即上皮细胞改变其形态,获得间质细胞的特性,同时伴随细胞的侵袭迁移能力增加的一种现象。在 EMT 的过程中,肝前体细胞通过细胞骨架重排和基因改变,逐渐丧失上皮表型和免疫表型[3]。研究 EMT 在肝纤维化过程中的作用,阻断肝前体细胞发生 EMT 的信号通路,可能是一种有效阻止甚至逆转肝纤维化进一步发展为不可逆转肝硬化的治疗方法。研究显示,Wnt 信号通路参与了多种器官 EMT 的发生和上皮细胞纤维化的过程[4]。由此我们想到 Wnt 信号途径是否也参与肝前体细胞发生 EMT 的转化。结合预实验的筛选结果,以腺病毒为载体,研究 Wnt3a 对于促进小鼠肝前体细胞发生 EMT 的相关分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与腺病毒 小鼠肝前体细胞 14-19 由美国芝加哥大学肿瘤研究中心赠送;Ad-Wnt3a/Ad-GFP 腺病毒由冯涛教授构建并保存;HEK293 细胞由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基及胎牛血清均购置 HyClone 总 RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒及实时荧光定量试剂盒 SYBR® Premix Ex *Taq*™(Tli RNaseH Plus)均购自宝生物大连公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥公司,兔抗小鼠 β-actin 抗体,兔抗小鼠 E-cadherin 抗体和兔抗小鼠 N-cadherin 抗体、兔抗小鼠 vimentin 抗体、兔抗小鼠 CK-18 抗体均购自 Bioworld;兔抗小鼠 Wnt3a 抗体,兔抗小鼠 Snail1 抗体购自 Cell signal。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与腺病毒扩增 HEK293 和 14-19 细胞复苏后用含 10% 胎牛血清的 DMEM,置 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度培养箱中培养,当细胞融合度达到 70% ~80% 时,用 0.25% 的胰酶消化传代。扩增腺病毒时,将 HEK293 按照 70% ~80% 的密度接种于底面积为 100 cm^2 的玻璃培养瓶中,当细胞贴壁并有形态时,加入 1 μL 的 Ad-GFP 和 Ad-Wnt3a,分别于 24、48、72 h 观察细胞感染率,当细胞感染率达到 95% 以上时,收集细胞并离心(1 500 r/min,离心 10 min),加入适量 PBS,反复冻融细胞 4 次,12 000 r/min 离心 4 min,收集上清即为病毒液。于 -80 ℃保存备用。

1.2.2 腺病毒对 14-19 细胞感染率测定及实验分组 将 14-19 细胞分为 2 组:Ad-GFP 组(空白对照组)和 Ad-Wnt3a 组(实验组)。按照 0.5×10^4 个/孔接种于 24 孔板中,待细胞贴壁并有形态时,将 Ad-Wnt3a、Ad-GFP 病毒液以 2、4、8、16 μL 的浓度加入孔中,分别观察 24、48、72 h 细胞的感染率,荧光显微镜下计数阳性细胞百分率及细胞的生长情况。

1.2.3 细胞划痕实验 取对数生长期的 14-19 细胞,以 4×10^5 个/孔接种于 6 孔板,分别转染 Ad-Wnt3a 和 Ad-GFP 病毒 24 h 后,细胞铺满。200 μL 移液器的枪头笔直画 1 条线,PBS 洗去漂浮的细胞,2 组细胞分别加入 500 μL 含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养,14-19 细胞的愈合能力用于检测其迁移能力。在同一部位做好标记,倒置显微镜分别于 0、24、48 h 观察并拍照,分别测量细胞迁移距离,取 3 组随机数据计数。实验重复 3 次。

1.2.4 细胞 Transwell 迁移实验 将转染 Ad-Wnt3a、Ad-GFP 病毒 24 h 后的 14-19 细胞消化下来,制成 100 μL 细胞悬液,以 2×10^4 个/孔接种于小室内,下室加入 500 μL 10% 胎牛血清的 DMEM,置 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度培养箱中培养。孵育 12 h 后,PBS 清洗 2 次,甲醇室温固定 30 min,自然风干,每孔加入 0.25% 结晶紫溶液染色 10 ~15 min,PBS 清洗 3 次,棉球小心将上层小室内细胞擦净,置于显微镜下观察迁移的细胞,取 5 个视野计数。实验重复 3 次。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测 采用 SYBR Green® Ⅰ染料法检测各组细胞中 CK-18、E-cadherin、N-cadherin、snail、vimentin 等标志物 mRNA 水平的表达量。引物由上海生物技术有限公司合成。分别收集各组细胞转染后 72 h 的总 RNA,逆转录制备 cDNA,荧光定量 PCR 采用 2.5 μL 体系:SRBR Premix *Ex Taq*™ Ⅱ 12.5 μL,模板 cDNA 2 μL 上下引物各 0.5 μL(10 μmol/L),灭菌双蒸水 10 μL。反应条件:95 ℃ 5 min、94 ℃ 15 s、65 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s,40 个循环,95 ℃ 保温 1 min 后制作溶解曲线,检测引物的特异性。相对基因表达分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法,$\Delta\Delta Ct=(C_{t目的基因}-C_{t内参})$ 处理组 $-(C_{t目的基因}-C_{t内参})$ 未处理组,RQ(Realtive Quantitation)处理组 $=2^{\Delta\Delta Ct}$,$RQ_{对照组}=1$。实验重复 3 次。

1.2.6 Western blot 检测 14-19 细胞转染 72 h 后,收集各组细胞,用遇冷的 RIPA 蛋白裂解液与 pmsf 混合液(比例为 100∶1)4 ℃裂解 30 min,12 000 r/min 4 ℃离心 5 min。取上清液用 BCA 法测定蛋白浓度,待蛋白浓度调整至一致时,加入 SDS 上样缓冲液(蛋白样品∶SDS 上样缓冲液 =4∶1),100 ℃变性 6 min。取 30 μg 总蛋白,根据待测目的蛋白分子量配制相应浓度的 SDS 胶,蛋白样品经电泳分离后,电转移至硝酸纤维素膜上。将 PVDF 膜置于 5% 脱脂奶粉的 TBST 中室温封闭 1 h,随后加入相应的一抗 37 ℃摇床孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次 ×8 min,加入相应二抗室温孵育 1 h,TBST 洗涤 3 次 ×8 min,ECL 发光。实验重复 3 次。

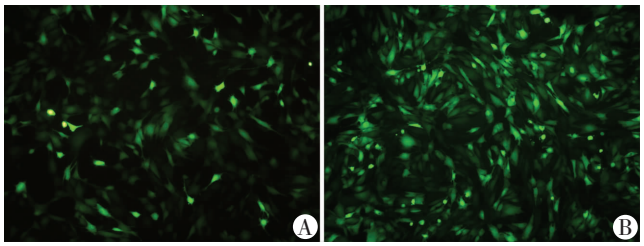
1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行组间配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 Wnt3a 高效感染 14-19 细胞

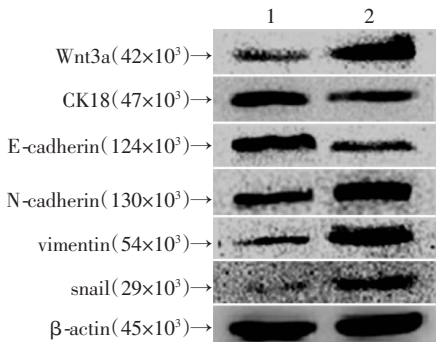
Ad-GFP 和 Ad-Wnt3a 能高效的感染 14-19 细胞,当病毒滴度为 4 pfu/mL 时,荧光表达达 90% 以上(图 1)。感染病毒 72 h 后收集细胞提取蛋白,Western blot 检测目的基因 Wnt3a 的表达情况(图 2)。



A:Ad-GFP 组;B:Ad-Wnt3a 组

图 1 重组腺病毒 Ad-GFP-Wnt3a 对 14-19 细胞的感染情况

(荧光显微镜 ×100)

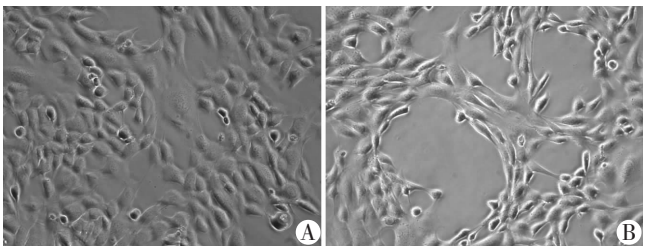


1:Ad-GFP 组;2:Ad-Wnt3a 组

图2 Western blot 检测感染 Ad-Wnt3a 在 14-19 细胞中的表达及其对 14-19 细胞 CK-18、E-cadherin、N-cadherin、vimentin、snail 蛋白的表达

2.2 Wnt3a 可促进 14-19 细胞发生 EMT

空白对照组细胞常规培养细胞形态呈多边形、卵圆形生长,且细胞之间连接紧密,而实验组细胞形态则发生了改变,由上皮样形态向长梭形转变,且细胞之间变得松散,间隔增大(图3)。由此可见,Wnt3a 可使 14-19 细胞失去极性,由上皮细胞转化为间质细胞形态,此变化提示 Wnt3a 可能促进 14-19 细胞发生 EMT 改变。



A:Ad-GFP 组;B:Ad-Wnt3a 组

图3 重组腺病毒 Ad-GFP-Wnt3a 对 14-19 细胞表型的影响 (倒置荧光显微镜 ×200)

2.3 Wnt3a 可提高 14-19 细胞迁移能力

细胞划痕实验结果显示,Ad-Wnt3a 组细胞展示出强大的移动运动能力。为排除细胞增殖对实验可能出现的干扰,划痕后使用含1%胎牛血清的培养基培养观察48 h(图4)。结果显示:Ad-Wnt3a 组细胞48 h 迁移距离为(0.53±0.05)mm,而 Ad-GFP 组细胞48 h 迁移距离为(0.33±0.02)mm,相对对照组,其迁移距离增加,差异具有统计学意义($P<0.05$)。Transwell 迁移实验(图5)结果显示,Ad-GFP 组 24 h 穿过小孔的细胞为(10.33±2.08)个,而 Ad-Wnt3a 组穿过的细胞为(62.00±3.60)个,与对照组比较,其穿过小孔的细胞数量增加,差异具有统计学意义($P<0.01$)。

2.4 Wnt3a 可降低 14-19 细胞上皮标志物的表达,同时促进间质标志物的表达

运用实时荧光定量 PCR 法和免疫印迹法分别检测 Wnt3a 对 14-19 细胞 EMT 相关标志物 mRNA 水平和蛋白水平的表达,结果显示,与空白对照组相比,Ad-Wnt3a 感染 14-19 细胞,72 h 后上皮标志物 E-cadherin,CK18 表达明显下降;间质标志物 N-caherin、vimentin、snail 明显上调(图6),差异具有统计学意义($P<0.05$)。

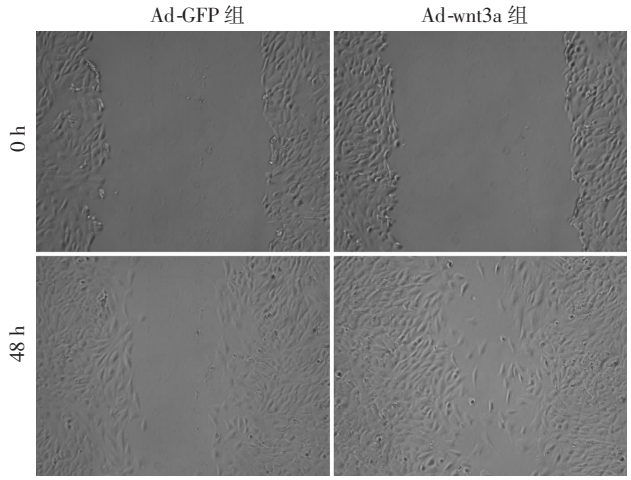
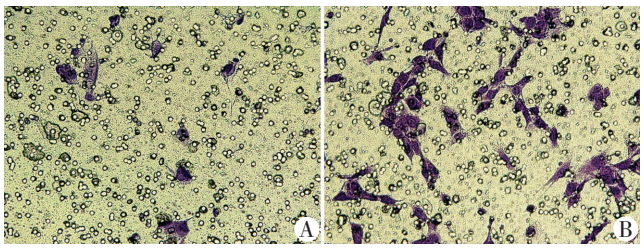
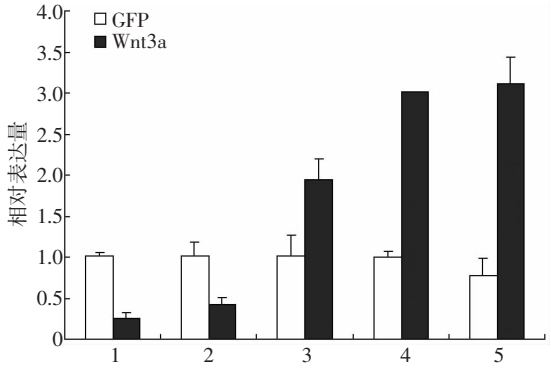


图4 细胞划痕实验单层细胞划痕感染 Ad-GFP-Wnt3a 24 h 后 0、48 h 细胞迁移情况 (倒置荧光显微镜 ×100)



A:Ad-GFP 组;B:Ad-Wnt3a 组

图5 光镜下观察 Transwell 小室迁移实验 24 h 细胞穿过小孔的细胞数变化 (荧光显微镜 ×200)



1:CK-18;2:E-cadherin;3:N-cadherin;4:vimentin;5:snail

图6 Real-time PCR 检测 Ad-Wnt3a 对 14-19 细胞 CK-18、E-cadherin、N-cadherin、vimentin、snail mRNA 的表达

3 讨论

关于原发性肝癌起源的认识不一,现多倾向于认为 HCC 是由肝内未分化的肝细胞"成熟受阻"分化异常所致[5]。但肝干细胞如何向肝癌细胞转化的具体机制还在进一步的研究中。

在肝脏的发育和慢性肝损伤过程中,EMT 和间质-上皮转化(mesenchymal to epithelial transition, EMT)发挥着作用。在 EMT/MET 中,上皮-间质和肝前体细胞标志物均有表达。有研究发现,肝内细胞通过上皮间质转化可以成为肌成纤维细胞,分泌细胞外基质,参与

组织修复。这一理论认为,EMT/MET 的平衡关系,影响了慢性肝病的转归。如果 EMT 超过 MET,则肝脏修复以纤维化为主;如果 MET 超过 EMT,则正常上皮增生、纤维化逆转。因此,通过抑制 EMT 减轻或逆转肝纤维化,可能是阻止肝硬化发生、发展的新的研究靶点。

Wnt 信号途径在肝前体细胞的分化过程中发挥着重要的作用,但其在诱导肝前体细胞发生 EMT 的过程中的具体机制的依然不明确。在本课题组的相关实验中发现,激活的经典 Wnt 信号途径参与了肝前体细胞的上皮间质化过程。Wnt3a 是 Wnt 经典途径的代表蛋白[6-7],在本实验中,我们通过转染 Ad-Wnt3a 诱导 14-19 细胞高表达 Wnt3a,观察其对细胞运动迁移能力和上皮间质相关标志物表达的影响。在形态学上,高表达 Wnt3a 的 14-19 细胞由纺锤体形态转变为长梭形,细胞划痕实验和细胞迁移实验证明,高表达 Wnt3a 的 14-19 细胞迁移能力大大提高;同时 RT-PCR 和 Western blot 实验,证实了在 mRNA 水平和蛋白水平,高表达 Wnt3a 下调 14-19 细胞中上皮标志物 E-cadherin 和细胞角蛋白 18 (cytokeratin-18)的表达,上调间质标志物 N-cadherin、vimentin 和 snail 的表达;这些结果都提示了 Wnt3a 能诱导 14-19 细胞发生 EMT 现象。

EMT 的分子学标志为上皮表面标志蛋白 E-cadherin 表达下调,间质相关蛋白上调。随着纤维化进程中 EMT 的发生、发展,E-cadherin 下调激活间质细胞特异性基因的转录,引起细胞之间的粘附力下降,使细胞之间的连接丧失。在此过程中,细胞的上皮屏障功能发生明显的改变。发生 EMT 的上皮细胞在经历了短暂的结构改变后,与周围细胞和基质的接触减少,上皮细胞变成成纤维细胞,细胞的迁移和运动能力增强[8]。E-cadherin 的下调甚至缺失在其他的一些器质性疾病中也有发生,比如肾、肺和眼睛[9-10]。在 E-cadherin 缺失时会表达新的间质钙粘蛋白,如 N-cadherin。N-cadherin 可增加细胞的移动力,协助细胞和内皮基质细胞形成新的粘附[11]。本研究显示,实验组细胞中 E-cadherin 的 mRNA 和蛋白表达量显著降低,同时 N-cadherin 的 mRNA 和蛋白水平表达量显著上调,这一现象是发生 EMT 的中间环节。vimentin 是一个主要的间质标志物,在病理条件下,它参与多种细胞转变为肌纤维母细胞的过程。Wnt3a 的高表达使 EMT 转录因子 Snail 的表达量显著升高。研究发现,Snail 作为 EMT 过程中的关键调控因子,其可通过抑制 E-cadherin 的同时上调 N-cadherin 的表达,以削弱细胞间的连接,从而诱导 EMT 发生[12]。近年来,研究发现,肝癌组织存在大量异常表达的 CK-18,CK-18 是构成肝脏细胞中间丝蛋白的主要成分之一[13],其在维持肝细胞的结构和功能完整中具有重要作用。在胚胎发育过程中,胚胎肝细胞表达 CK-18[14]。生理环境下,肝细胞中 CK-18 高度丰富,为损伤诱导表达的应激蛋白。其突变将导致肝损伤或凋亡的易感性,甚至造成肝病患者进展至晚期,以及慢性肝病患者肝纤维化[13]。本研究显示,Ad-Wnt3a 感染 14-19 细胞 3 d 后会导致 CK-18 的下降,进一步说明 Wnt3a 诱导 14-19 细胞向恶性纤维化转化。

综上,Wnt 信号途径在小鼠肝前体细胞发生 EMT 转化的过程中发挥着重要的作用,其中经典分泌糖蛋白 Wnt3a 被证实能够诱导小鼠肝前体细胞发生 EMT 转化,提示 Wnt 信号途径可能参与肝纤维化的发生、发展过程,进一步为研究原发性肝癌的治疗方法及肝癌的起源奠定了基础。

参考文献:

[1] Kensler T W, Qian G S, Chen J G, *et al*. Translational strategies for cancer prevention in liver[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(5): 321-329.

[2] Guarino M, Tosoni A, Nebuloni M. Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition[J]. Hum Pathol, 2009, 40(10): 1365-1376.

[3] Deng H, Wang H F, Gao Y B, *et al*. Hepatic progenitor cell represents a transitioning cell population between liver epithelium and stroma [J]. Med Hypotheses, 2011, 76(6): 809-812.

[4] He W, Dai C, Li Y, *et al*. Wnt/beta-catenin signaling promotes renal interstitial fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(4): 765-776.

[5] Lau C K, Yang Z F, Fan S T. Role of stem cells in normal liver and cancer[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2011, 11(6): 522-528.

[6] 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.

[7] Tan C W, Gardiner B S, Hirokawa Y, *et al*. Wnt signalling pathway parameters for mammalian cells[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e31882.

[8] Tian X, Liu Z, Niu B, *et al*. E-cadherin/beta-catenin complex and the epithelial barrier[J]. J Biomed Biotechnol, 2011, 2011: 567305.

[9] Zheng G, Lyons J G, Tan T K, *et al*. Disruption of E-cadherin by matrix metalloproteinase directly mediates epithelial-mesenchymal transition downstream of transforming growth factor-beta1 in renal tubular epithelial cells[J]. Am J Pathol, 2009, 175(2): 580-591.

[10] Rygiel K A, Robertson H, Marshall H L, *et al*. Epithelial-mesenchymal transition contributes to portal tract fibrogenesis during human chronic liver disease[J]. Lab Invest, 2008, 88(2): 112-123.

[11] Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells[J]. Cancer Res, 2001, 61(9): 3819-3825.

[12] 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.

[13] Ku N O, Strnad P, Zhong B H, *et al*. Keratins let liver live: Mutations predispose to liver disease and crosslinking generates Mallory-Denk bodies[J]. Hepatology, 2007, 46(5): 1639-1649.

[14] Masson N M, Currie I S, Terrace J D, *et al*. Hepatic progenitor cells in human fetal liver express the oval cell marker Thy-1[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006, 291(1): G45-G54.

(**收稿**:2013-04-21;**修回**:2013-05-02)

(编辑 汪勤俭)