文章编号:1000-5404(2014)08-0797-05

论著

5-甲基胞嘧啶羟化酶TET1在肝再生时卵圆细胞向肝细胞分化过程中的作用

张霹雳,王 斌,王 军,魏艳玲,孙文静,吴 林,罗 茜,陈东风 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所消化内科)

[摘要] **目的** 研究5-甲基胞嘧啶羟化酶TET1在肝脏再生时卵圆细胞向肝细胞分化过程中的作用。**方法** 采用SD大鼠2-乙酰氨基芴(2-AAF)灌胃加2/3肝切除法建立肝脏再生模型,胶原酶灌注联合percoll密度梯度离心法提取纯化大鼠原代卵圆细胞,免疫荧光实验鉴定卵圆细胞特异性标志物OV6的表达;RT-PCR和Western blot检测肝切后不同时间(3、6、9、12、15 d)TET1 mRNA和蛋白表达变化。培养WB-F344卵圆细胞,SCF 20 μg/L、HGF 10 μg/L、EGF 10 μg/L、地塞米松1.0×10^{-7} mol/L和DMSO 1.5%处理7 d,诱导其向肝细胞样细胞分化(对照细胞不加任何细胞因子)。倒置相差显微镜观察卵圆细胞形态变化,RT-PCR和Western blot检测TET1表达变化。**结果** ①成功建立肝再生动物模型,分离获得大鼠原代卵圆细胞,其OV6阳性率≥80 %。②与对照细胞相比,卵圆细胞被诱导分化后,细胞形态由圆形变为梭形。③与对照细胞相比,卵圆细胞被诱导分化后,TET1 mRNA和蛋白水平均显著下降($P<0.01$),此时肝细胞特异性标记物ALB表达升高,卵圆细胞分化为肝细胞样细胞。**结论** 5-甲基胞嘧啶羟化酶TET1可能参与了卵圆细胞增殖和肝再生过程。

[关键词] 肝脏再生;卵圆细胞;细胞分化;TET1
[中图法分类号] R322.47;R341;R364.33 [文献标志码] A

Effect of TET1 on hepatocytic differentiation of oval cells in liver regeneration

Zhang Piyun, Wang Bin, Wang Jun, Wei Yanling, Sun Wenjing, Wu Lin, Luo Xi, Chen Dongfeng (Department of Gastroenterology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of ten-eleven-translocation 1 (TET1) a 5-methylcytosin hydroxylase, on the hepatocytic differentiation of oval cells in liver regeneration. **Methods** A liver regeneration model was established by gavage of 2-acetylaminofluorine (2-AAF) and surgical resection of 70% liver in SD rats. The expression of TET1 was analyzed by RT-PCR and Western blotting at 3, 6, 9, 12, and 15 d after liver resection. Primary rat oval cells were isolated by collagenase perfusion, purified by density-gradient centrifugation and stained for OV6 detection by immunofluorescence assay. WB-F344 oval cells were treated by dexamethasone 1.0×10^{-7}mol/L and DMSO 1.5%, with or without a mixture of cytokines including SCF 20 μg/L, HGF 10 μg/L, and EGF 10 μg/L, for 7 d. Cell differentiation was examined by detection of morphological changes and differentiation maker such as ALB. The expressions of TET1 were further determined. **Results** A large number of primary rat oval cells were obtained, with 80% $OV6^+$ oval cells. After induced differentiation for 7 d, oval cells showed a shape change from round to polygonal. Furthermore, induced differentiation resulted in reduce of TET1 expression ($P<0.01$) and dramatically increased expression of ALB ($P<0.01$), suggesting oval cells underwent hepatocytic differentiation. **Conclusion** TET1 participates in the proliferation of oval cells and liver regeneration possibly.

[**Key words**] liver regeneration; oval cells; cell differentiation; ten-eleven-translocation 1

Supported by the Key Project of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BA5060). Corresponding author: Chen Dongfeng, Tel: 86-23-68757741, E-mail: chendf1981@126.com

[基金项目] 重庆市自然科学基金重点项目(CSTC2009BA5060)
[通信作者] 陈东风,电话:(023)68757741,E-mail:chendf1981@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140225.0922.003.html(2014-02-25)

肝脏作为人体一个重要代谢器官,当其受到创伤、手术、感染或中毒等原因导致的部分肝脏功能损伤后,会发生不同细胞增殖的肝再生(liver regeneration)。肝再生是一个极其复杂的生物学过程,受到肝脏微环境,神经系统,生长因子等因素的精密调控。当肝脏质量与功能恢复到与自身相适应的容量,肝再生将受到抑制[1]。在肝再生的众多途径中,最关键的是肝脏成体干细胞即卵圆细胞增殖的肝再生。既往研究发现,当肝脏损伤后,富含卵圆细胞的干细胞池被激活,继而延伸进入肝小叶分化为肝细胞和胆管细胞[2]。而目前关于卵圆细胞增殖分化的调控机制尚存在争议。最新研究发现,表观遗传学的DNA去甲基化与干细胞的自我更新和分化密切相关[3]。TET1(ten-eleven-translocation 1)作为一种羟化酶,催化5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine,5 mC)生成5-羟甲基胞嘧啶(5-hydroymethy1cytosine,5 hmC)的作用,精密调控基因组甲基化和去甲基化平衡,在维持胚胎干细胞自我更新和分化中发挥重要作用[4-5]。因此我们推测,卵圆细胞作为一种肝脏的成体干细胞,TET1可能通过影响其自我更新和定向分化而参与肝再生。本研究通过检测TET1在大鼠肝脏组织和卵圆细胞分化过程中的表达变化,探讨TET1是否参与了卵圆细胞增殖和肝再生过程。

1 材料与方法

1.1 材料及实验仪器

WB-F344(上海拜力生物有限公司,中国)、IMDM培养基、特级胎牛血清、胰蛋白酶、青链霉素混合液、HBSS粉末(Hyclone,美国),Ⅳ型胶原酶(Gibco,美国),PronaseE酶、DNase Ⅰ酶(Roche,美国),percoll(Pharmacia,美国),2-乙酰氨基芴(2-acetaminofluorene,AAF,日本TCI公司产品),Trizol试剂盒(*Hyclone*,美国),RT-PCR试剂盒(Fermantas,美国),抗体OV6(R&D,美国),TET1(Santa cruz,美国),ALB(Santa cruz,美国),CK19(Abcam,美国),大鼠IgG抗体(Santa cruz,美国),CY3(中山金桥,中国),FITC(中山金桥,中国)。CO_2培养箱(Therrno scientific 8000),ST-40R冷冻离心(Thermo,美国),激光共聚焦显微镜(Carl Zeiss,德国),高速冷冻离心机(Eppendorf,德国),荧光定量PCR仪(Bio-rad iCYcler,美国)。

1.2 动物模型的建立及分组

SPF级SD大鼠25只,5-6周龄,雄性,质量150~200 g,由第三军医大学实验动物中心提供,批号SYXK(渝)2012-0002。适应性饲养1周后,分为5组,每组5只。每日用2-AAF(2-乙酰氨基芴)灌胃[6],10 mg/kg·d,连续4 d。第5天在水合氯醛(7 mL/kg)全身麻醉下行2/3肝切除术,第6天继续2-AAF灌喂,肝切后第3、6、9、12、15天处死大鼠取肝脏标本。手术前后环境相同(室温15~25 ℃,正常昼夜节律,足够的饮水,无强光、噪音)。

1.3 卵圆细胞的获取及培养

用水合氯醛麻醉SD大鼠[7],切开其腹部暴露肝脏并钝性分离门静脉,24G静脉留置针穿刺门静脉并固定,预先推注5 mL肝素钠溶液(25 U/mL),HBSS液灌注肝脏呈黄白色,再依次用0.1% Pronase E酶溶液及0.1% Ⅳ型胶原酶液灌注肝脏至呈糜状,用牙刷轻轻刷下细胞,重复操作直至肝脏只剩下肝纤维鞘。用含有0.0025% EDTA和0.06% Ⅳ型胶原酶的HBSS液37 ℃水浴摇床孵育,200目细胞筛过滤,300 r/min离心去除肝细胞,肝脏间质细胞可以通过2 000 r/min离心获得,以DMEM培养液重悬,离心管内依次加入50%、70%、90% percoll工作液,再把细胞悬液加入,以12 000 r/min离心30 min,工作液之间淡黄色细胞带即为目的细胞。用含20%胎牛血清的DMEM培养基重悬细胞,以2×10^6密度接种于25 cm^2细胞培养瓶,常规培养。

1.4 诱导卵圆细胞定向分化的分组及诱导方法

分为对照组和诱导组,诱导组卵圆细胞株WB-F344诱导方法[8],用含20 μg/L SCF+10 μg/L HGF+10 μg/L EGF+1.5% DMSO+1.0×10^{-7} mol/L地塞米松+10% FBS的IMDM培养基培养,以后每隔1 d换液,诱导7 d。对照组卵圆细胞用未加任何细胞因子含10% FBS的IMDM培养基培养7 d。

1.5 细胞免疫荧光实验

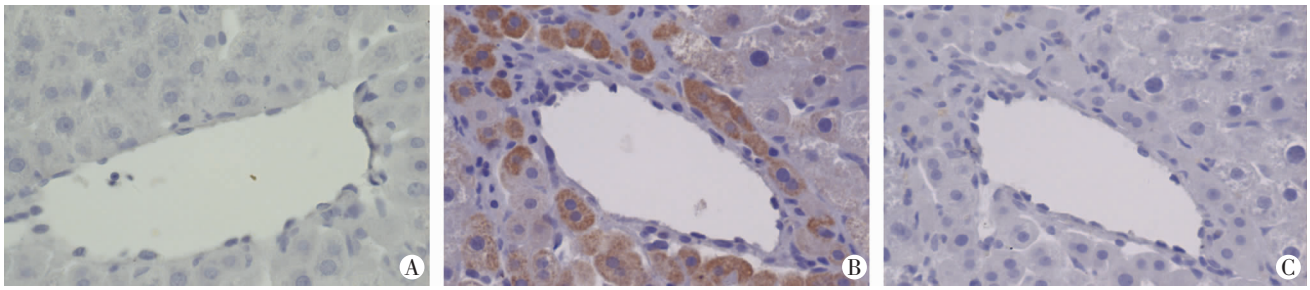
实验组和对照组的细胞分别爬片24 h,4 % 多聚甲醛固定;0.25 % Triton X-100打孔;2 % BSA溶液封闭;孵育一抗OV6(1∶50)、ALB(1∶20)、CK19(1∶200)、TET1(1∶20),4 ℃过夜,PBS洗3次;孵育二抗CY3(1∶200)、FITC(1∶200)室温2 h,PBS洗3次;DAPI染核,室温10 min,PBS洗5次;封片。通过激光共聚焦显微镜观察。

1.6 免疫组织化学实验

将对照组与实验组的肝脏组织分别在甲醛中嵌块包埋,对照组为每只大鼠肝切除前的正常肝脏组织,实验组为肝切后不同时间点(3、6、9、12、15 d)的剩余肝脏。将组织蜡块切成5 μm厚的薄切片,脱蜡后抗原修复,用微波炉加热20 min,冷却后3% H_2O_2室温孵育10 min,PBS洗3次;10%山羊血清封闭10 min;4 ℃冰箱中孵育一抗(OV6 1∶50;IgG 1∶50)过夜,然后通过37 ℃孵育2 h。定位的二次抗体通过有苏木精的抗复染色剂观察,肝细胞的计数在×200的视野下取任意5个视野计数。

1.7 Real-time PCR

检测对照组和实验组TET1的表达及变化,对照组为每只大鼠肝切除前的正常肝脏组织,实验组为肝切后不同时间点的剩余肝脏。用Trizol法提取肝脏组织及细胞系总RNA,然后逆转录为cDNA,按试剂RT-PCR KIT ReverTra Ace(Fermentas公司)说明书操作步骤完成。再以cDNA为模板通过Real-time PCR检测TET1在肝切后3、6、9、12、15 d的表达水平,以及在卵圆细胞分化过程中的变化。引物序列如下:TET1正义链:5′-TGGCCAGAAGGGAAAAGCAA-3′,反义链:5′-TAATCACCCACTTGGCGACC-3′,扩增长度98 bp;GAPDH正义链:5′-TGCCACTCAGAAGACTGTGG-3′,反义链:5′-TTCAGCTCTGGGATGACCTT-3′,扩增长度129 bp。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。



A:正常肝脏组织几乎无 OV6 染色的阳性细胞;B:肝切除再生模型汇管区有较多 OV6 染色阳性细胞;C:IgG 阴性对照

图 1　卵圆细胞在正常肝组织和肝再生模型的免疫组织化学 OV6 染色结果　(×400)

1.8　Western blot

加入蛋白裂解液,提取细胞和组织蛋白。裂解物通过 BCA 定量后使用。取蛋白 50 μg/孔进行 SDS-PAGE 电泳后湿转法转移至 PVDF 膜上,BSA 封闭 4 h 后,加入一抗孵育过夜,具体为羊抗 TET1 多克隆抗体 (1∶300),GAPDH(1∶1 000)。次日,TBST 洗涤 3 次,15 min/次,加入相应的二抗,即驴抗羊 IgG (1∶25 00)孵育 2 h (37 ℃),TBST 洗涤 3 次,15 min/次,化学显影剂孵育 2 min 后在 Bio. Rad 蛋白化学发光仪中显影。用 Image lab 软件进行图像分析。

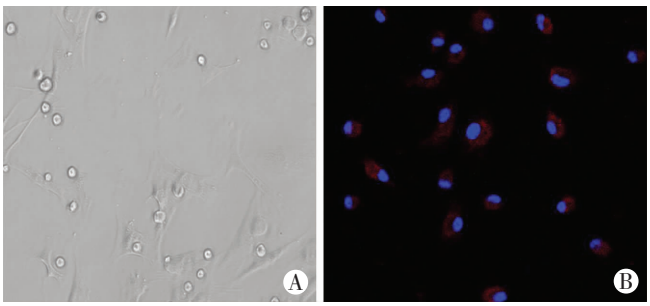
1.9　统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,实验数据比较采用配对样本 t 检验。

2　结果

2.1　肝脏再生过程中卵圆细胞明显增生

与正常肝脏组织(图 1A)OV6 染色呈阴性相比,肝切除再生模型的肝脏组织组化染色可见汇管区周围有较多的 OV6 染色阳性的双核细胞,细胞质呈红褐色,提示该处有卵圆细胞增殖(图 1B)。IgG 阴性对照组同一切片位置未见阳性染色(图 1C)。正常大鼠肝脏几乎不能分离出卵圆细胞,在本肝再生动物模型成功分离提取出的原代卵圆细胞,数量最多可达 1.34×10^5/mL。通过倒置相差显微镜观察呈圆球形,体积较小,核浆较少,细胞质折光性强,悬浮于培养液中,24 h 后细胞呈半贴壁状态(图 2A)。大鼠卵圆细胞免疫荧光染色鉴定,3 d 爬片卵圆细胞特异性蛋白表达抗体 OV6 (图 2B),阳性细胞数≥80%。

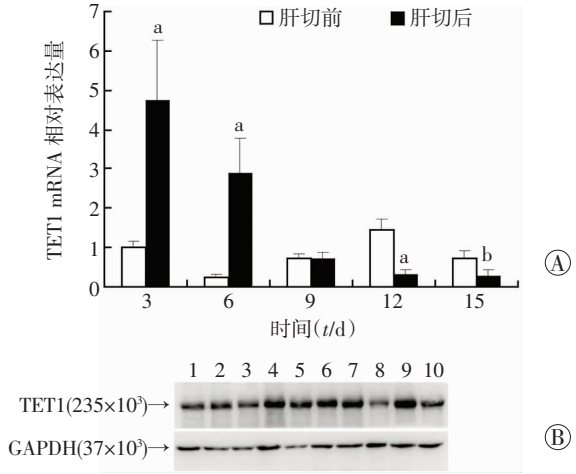


A: 原代培养卵圆细胞(×200);B: OV6 染色激光共聚焦观察(×400)

图 2　卵圆细胞的培养与细胞免疫荧光 OV6 染色结果

2.2　肝再生过程中 TET1 表达的动态变化

Real-time PCR 结果显示,TET1 在肝再生动物模型中的表达趋势有明显变化。即与肝切前自体的正常肝脏组织对比,肝切后的前期(3、6 d)TET1 蛋白明显增高,其中 6 d 增高明显($P<0.01$)。第 9 天的表达量与肝切前表达无统计学差异性($P>0.05$)。而肝切后的后期(12、15 d) TET1 的表达显著下降($P<0.05$)。TET1 在肝再生模型中的表达变化呈先升高后降低的趋势(图 3A)。Western blot 提示在蛋白水平上的表达与基因水平变化相一致($P<0.05$)(图 3B)。

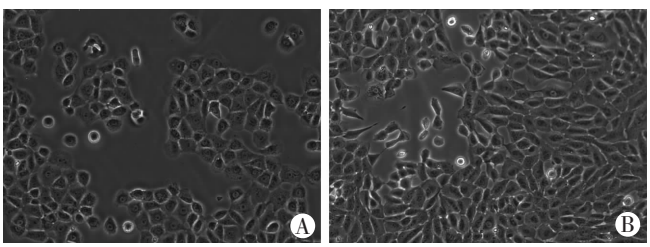


A: Real-time PCR 检测结果; a:$P<0.01$, b:$P<0.05$, 与肝切前比较; B:Western blot 检测结果;1、3、5、7、9:对照组;2、4、6、8、10:肝切后 3、6、9、12、15 d 诱导组

图 3　Real-time PCR 和 Western blot 检测 TET1 在肝切后不同时间点的表达变化

2.3　WB-F344 卵圆细胞诱导后发生细胞形态变化

卵圆细胞常规培养 7 d 后呈圆形 (图 4A)。用 HGF, EGF, SCF 等细胞因子联合诱导培养 7 d,随着诱导时间的延长,卵圆细胞由圆形逐渐向多角形或长梭形状改变,核质比减少,其形态类似于培养状态下肝细胞(图 4B)。



A:正常卵圆细胞株 WB-F344;B:诱导为肝细胞样细胞

图 4　倒置相差显微镜观察大鼠卵圆细胞诱导分化培养结果　(×100)

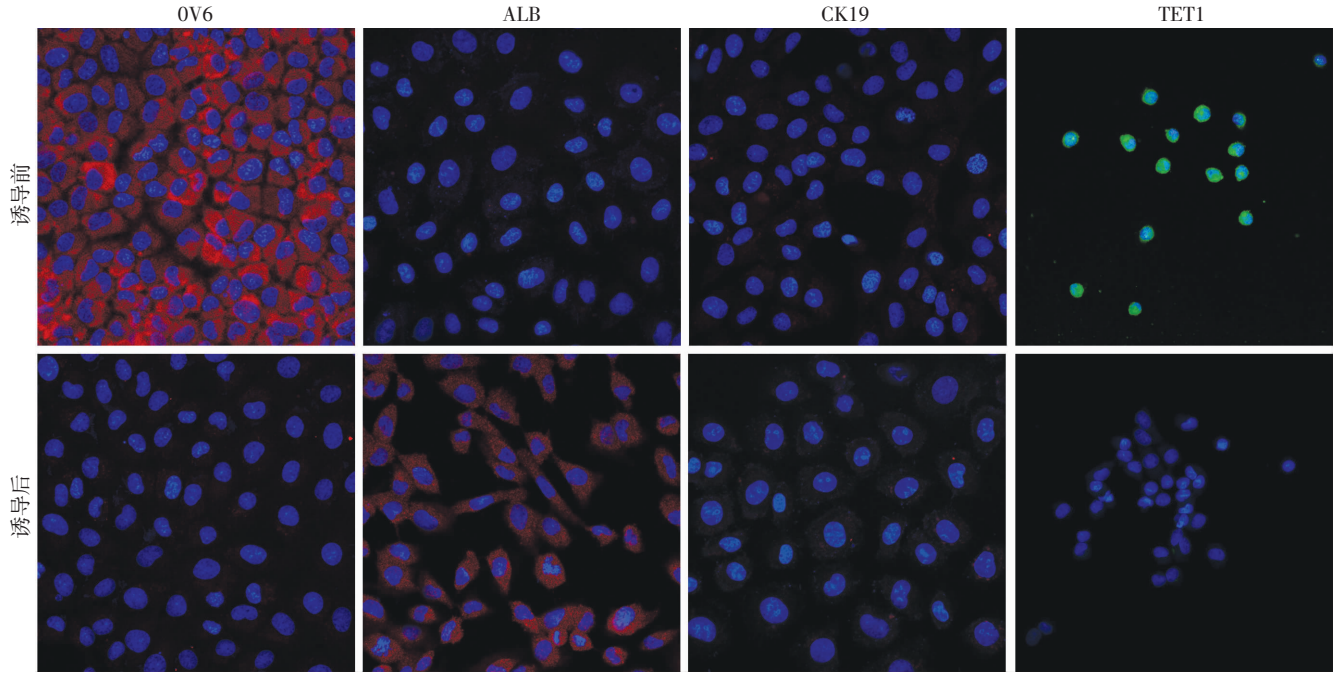


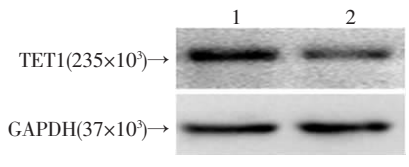
图5 免疫荧光观察卵圆细胞株分化前后 OV6、ALB、CK19、TET1 的表达变化 （×400）

2.4 WB-F344 卵圆细胞具有向肝细胞样细胞分化的潜能

免疫荧光显示在正常对照组 OV6 呈阳性表达，在细胞质内着色丰富，ALB 在细胞质内未见着色，仅留下细胞核的影像，CK19 在细胞质表达阴性。诱导组卵圆细胞经过多种细胞因子联合向肝细胞样细胞诱导 7 d 后，细胞质 OV6 染色消失，但 ALB 免疫荧光染色在细胞质内丰富表达，CK19 在细胞质内未见表达（图5）。

2.5 卵圆细胞向肝细胞样细胞分化过程中 TET1 表达下调

细胞荧光实验结果显示，对照组卵圆细胞 TET1 定位于胞核，呈阳性表达（图5）。诱导组卵圆细胞向肝细胞样细胞分化过程中 TET1 阳性表达逐渐降低（图5）。Real-time PCR 结果示 TET1 mRNA 相对表达量分化前为（1.00 ± 0.19），分化后为（0.43 ± 0.13）与 Western blot（图6）表达变化均与荧光结果相一致，即卵圆细胞向肝细胞样细胞分化过程中 TET1 的表达水平呈降低趋势（$P < 0.01$）。



1：对照组；2：诱导组

图6 Western blot 检测卵圆细胞株诱导前后 TET1 的表达变化

3 讨论

当肝脏发生各种类型损伤时，不同的细胞参与了肝脏的修复[9]。目前普遍认为在急性肝损伤中，成熟肝细胞迅速分裂增殖完成其修复过程；在慢性或者慢性加急性的损伤过程中，卵圆细胞是肝再生的核心细胞，会在各种刺激下迅速增殖，分化成为肝细胞与胆管细胞，完成肝脏的再生修复[10]。卵圆细胞作为肝脏的成体干细胞，其调控机制目前还不明确。最新研究发现，去甲基化酶 TET1 在小鼠胚胎干细胞的分化发育过程中具有促进干性保持基因转录及抑制发育分化基因表达的双重作用。胚胎干细胞中的 TET1 呈高表达趋势，而在干细胞分化过程中其表达逐渐下调[11]，但其具体分子机制尚不明确。目前在肝再生过程中，TET1 的表达是否有变化及在卵圆细胞分化中的作用尚少见报道。

本研究制作了完整的卵圆细胞增殖的大鼠肝再生动物模型，通过大体肝脏组织免疫组化染色验证了 OV6 在汇管区双核细胞的细胞质内丰富着色，证明在肝再生过程中有卵圆细胞增殖现象。文献[12]报道，正常大鼠肝脏内卵圆细胞几乎不存在，我们通过对不同时相点的肝切除再生大鼠采用标准胶原酶灌注联合 percoll 密度梯度离心法，能获得较多的卵

圆细胞,数量可达 1.34×10^5/mL。这证明肝切除再生模型卵圆细胞明显增生。既往研究发现,神经系统、生长因子、肝脏微环境、成熟肝脏细胞等都参与卵圆细胞增殖分化的调控。其中2007年Yeoh等[13]发现STAT-3的过度活化是导致卵圆细胞自我更新能力增强的一个关键通路,其通路的上下游调控基因能否影响卵圆细胞的增殖与分化,目前还少见报道,值得深入研究。

本实验通过RT-PCR、Western blot等方法检测了TET1在肝再生模型上的表达趋势,证明在肝脏损伤修复过程中,TET1同卵圆细胞呈相同的表达趋势,即在肝切后前期,两者均呈增高的趋势,但我们发现TET1增高的高峰值(肝切除后6 d)比卵圆细胞的增殖高峰(肝切除后9 d)提前一个时间点,与项帅等[14]报道在大鼠肝切除模型中研究的卵圆细胞增殖动力学趋势相一致;之后随着卵圆细胞增殖的减弱,TET1也呈下降趋势。我们推测TET1可能与卵圆细胞的自我更新与分化密切相关。同时在体外实验卵圆细胞株WB-F344向肝细胞样细胞诱导分化过程中,伴随着OV6的表达水平下降,卵圆细胞干性的丢失,ALB表达增强,形成肝细胞样细胞,此时TET1表达水平明显下调。这些结果提示TET1与卵圆细胞的分化过程密切相关,其表达水平在卵圆细胞诱导成肝细胞样细胞的过程中逐渐下降。已有研究发现,TET1与胚胎干细胞的干性维持与自我更新密切相关[15]。有研究[11]发现,Tet1缺少可通过阻碍其产物5 hmc与STAT3通路的结合,影响下游多种干性基因表达,导致胚胎干细胞分化,但TET1是否通过STAT3通路调控卵圆细胞的自我更新和分化尚待进一步研究。

综上所述,我们的研究结果提示5-甲基胞嘧啶羟化酶TET1可能参与了卵圆细胞增殖和肝再生过程,这一发现丰富了我们对卵圆细胞分化调控机制的认识。但TET1是否参与了向肝细胞或胆管上皮细胞定向分化的过程以及相关调控机制,仍值得进一步深入研究。

参考文献:

[1] Li D, Cen J, Chen X, *et al*. Hepatic loss of survivin impairs postnatal liver development and promotes expansion of hepatic progenitor cells in mice[J]. Hepatology, 2013, 58(6): 2109-2121.
[2] Chen Y H, Chang M H, Chien C S, *et al*. Contribution of mature hepatocytes to small hepatocyte-like progenitor cells in retrorsine-exposed rats with chimeric livers[J]. Hepatology, 2013, 57(3): 1215-1224.
[3] Xu Y, Wu F, Tan L, *et al*. Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells [J]. Mol Cell, 2011, 42(4): 451-464.
[4] Wu H, D'Alessio A C, Ito S, *et al*. Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells[J]. Nature, 2011, 473(7347): 389-393.
[5] Guo J U, Su Y, Zhong C, *et al*. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain[J]. Cell, 2011, 145(3): 423-434.
[6] Dezso K, Papp V, Bugyik E, *et al*. Structural analysis of oval-cell-mediated liver regeneration in rats[J]. Hepatology, 2012, 56(4): 1457-1467.
[7] Yovchev M I, Dabeva M D, Oertel M, *et al*. Isolation, characterization, and transplantation of adult liver progenitor cells[J]. Methods Mol Biol, 2013, 976: 37-51.
[8] Ishikawa T, Factor V M, Marquardt J U, *et al*. Hepatocyte growth factor/c-met signaling is required for stem-cell-mediated liver regeneration in mice[J]. Hepatology, 2012, 55(4): 1215-1226.
[9] 张霹雲, 王军, 陈东风. 肝脏再生过程中干细胞分化调控机制的研究进展[J]. 肝脏, 2012, 17(8): 599-602.
[10] 罗茜, 王斌, 雷增杰, 等. 肝星状细胞具有向肝细胞样细胞分化的干细胞潜能[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(7): 604-608.
[11] Freudenberg J M, Ghosh S, Lackford B L, *et al*. Acute depletion of Tet1-dependent 5-hydroxymethylcytosine levels impairs LIF/Stat3 signaling and results in loss of embryonic stem cell identity [J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(8): 3364-3377.
[12] Turner R, Lozoya O, Wang Y, *et al*. Human hepatic stem cell and maturational liver lineage biology[J]. Hepatology, 2011, 53(3): 1035-1045.
[13] Yeoh G C, Ernst M, Rose-John S, *et al*. Opposing roles of gp130-mediated STAT-3 and ERK-1/2 signaling in liver progenitor cell migration and proliferation[J]. Hepatology, 2007, 45(2): 486-494.
[14] 项帅, 陈孝平, 张伟, 等. 大鼠2-乙酰胺基芴/部分肝切除模型中卵圆细胞增殖动力学的初步研究[J]. 中华外科杂志, 2010, 48(8): 615-618.
[15] Almeida R D, Loose M, Sottile V, *et al*. 5-hydroxymethyl-cytosine enrichment of non-committed cells is not a universal feature of vertebrate development[J]. Epigenetics, 2012, 7(4): 383-389.

(**收稿**:2014-01-13;**修回**:2014-02-03)
(编辑 王 红)