

## 技术与方法

# 全反式维甲酸调控自噬促进肝祖细胞成熟分化的作用研究

崔洁洁<sup>1,2</sup> 方姝煜<sup>1</sup> 龚梦嘉<sup>1</sup> 何 昀<sup>1</sup> 毕 杨<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>重庆医科大学附属儿童医院儿研所干细胞实验室, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 重庆市干细胞治疗工程技术研究中心, 重庆 400014; <sup>2</sup>濮阳市人民医院儿科, 濮阳 457000)

**摘要** 该研究探讨全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)体外诱导小鼠胚胎肝祖细胞HP14-19细胞成熟分化及ATRA对细胞自噬水平的调控作用。应用1 μmol/L ATRA处理小鼠胚胎肝祖细胞HP14-19细胞, 不同时间点进行荧光素酶报告基因检测ALB-Gluc活性, Real-time PCR检测肝细胞相关标志基因的表达, 吖啶菁绿(indocyanine green, ICG)及过碘酸-希夫(periodic acid-schiff, PAS)染色检测细胞的成熟功能; 透射电镜观察自噬体及细胞连接, ptfLC3质粒转染细胞, 激光共聚焦显微镜观察自噬流, Western blot检测自噬相关标志蛋白质水平等综合分析自噬的变化情况。结果显示, 与对照组相比, ATRA可显著增强HP14-19细胞ALB-Gluc活性, 抑制肝前体细胞标志DLK和AFP的表达, 促进成熟肝细胞标志ALB、CK18、TAT和ApoB的表达, ICG及PAS染色阳性细胞数显著增多( $P < 0.05$ ); 透射电镜结果可见ATRA诱导组出现大量自噬体和自噬溶酶体, 同时细胞间紧密连接增多, 并且自噬相关标志蛋白质Beclin1、LC3-II、RAB7水平增高, P62水平无显著变化, LC3-II/LC3-I的比值明显增加( $P < 0.05$ ); 激光共聚焦显微镜可见ATRA组细胞质内黄色斑点的自噬体及红色斑点的自噬溶酶体均较对照组明显增多, 自噬抑制剂3-MA和Bafilomycin可抑制ATRA诱导的HP14-19细胞的ICG摄取和糖原合成功能。综上所述, ATRA可能通过调节细胞自噬水平有效诱导小鼠胚胎肝祖细胞的分化成熟。

**关键词** 肝祖细胞; 全反式维甲酸; 自噬; 细胞分化

## Effects of All-Trans Retinoic Acid on Autophagy in Inducing Maturation and Differentiation of Hepatic Progenitor Cells and Its Mechanisms

Cui Jiejie<sup>1,2</sup>, Fang Shuyu<sup>1</sup>, Gong Mengjia<sup>1</sup>, He Yun<sup>1</sup>, Bi Yang<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Stem Cell Biology and Therapy Laboratory, Children's Hospital of Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Chongqing 400014, China; <sup>2</sup>Department of Pediatrics, Puyang People's Hospital, Puyang 457000, China)

**Abstract** In this study, we try to investigate the effect of all-trans retinoic acid (ATRA) on the differentiation of mouse embryonic hepatic progenitor cells HP14-19 and the effect of ATRA on autophagy level.

收稿日期: 2017-09-13 接受日期: 2017-12-11

重庆市自然科学基金(批准号: cstc2016jcyjA0228)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-63633113, E-mail: yang\_bi1981@hospital.cqmu.edu.cn

Received: September 13, 2017 Accepted: December 11, 2017

This work was supported by the Natural Science Foundation of Chongqing City (Grant No.cstc2016jcyjA0228)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-63633113, E-mail: yang\_bi1981@hospital.cqmu.edu.cn

网络出版时间: 2018-05-21 16:29:01

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180521.1628.006.html>

The HP14-19 cells were treated with DMEM culture medium containing ATRA with final concentration of 1  $\mu\text{mol/L}$ . ALB-Gluc assay was performed to evaluate ALB synthetic ability at different induction days. Real-time PCR was used to detect the mRNA level of hepatic related markers. ICG uptake and PAS staining were carried out to detect the metabolism and synthetic function of ATRA-induced HP14-19 cells. Simultaneously, transmission electron microscopy was used to observe autophagosomes and cell-cell junction. ptfLC3 plasmid was transfected to cells, then laser confocal microscopy was used to track autophagy flow at indicated times. The levels of autophagy-related proteins were detected by Western blot. As results, The ALB-Gluc activity began to increase at 3 days after ATRA induction, and continuously increased. The mRNA levels of *ALB*, *CK18*, *TAT* and *ApoB* present in mature hepatic cells were up-regulated significantly in ATRA group, while, that of *DLK* and *AFP* as liver progenitor cells markers were inhibited compared with the control group. After ATRA induction, HP14-19 cells showed apparent comparable ICG uptake and glycogen storage function. Surprisingly, much more autophagosomes and autolysosomes can be observed in ATRA group under the transmission electron microscopy. Interestingly, the tight junctions between cells were also more than those in the control group. The proteins levels of Beclin1, LC3-II and RAB7 in the ATRA-induced group was significantly higher than those in the control group, whereas P62 protein had no significant change after ATRA induction. More convincingly, the result of laser confocal microscopy showed that autophagosomes (yellow spots) and autolysosomes (red spots) in ATRA group were more than those in the control group obviously. ATRA induced ICG uptake and PAS staining function of HP14-19 cells were inhibited by autophagy inhibitor, 3-Methyladenin or Bafilomycin. In summary, ATRA might effectively induce the differentiation and mature of mouse hepatic progenitor cells by regulating autophagy.

**Keywords** hepatic progenitor cells; all-trans retinoic; autophagy; differentiation

全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)是维生素A在体内的重要活性代谢产物,在胚胎发育,组织器官形成,细胞增殖、分化、代谢及肿瘤的发生发展中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。我们前期的研究发现,ATRA对小鼠胚胎肝祖细胞(hepatic progenitor cells, HPCs)及肝癌细胞有很强的诱导分化作用<sup>[2-4]</sup>,但其具体的分子机制还不清楚。自噬(autophagy)即自体吞噬,是一个吞噬自身细胞质蛋白质或细胞器使其包被进入囊泡,并与溶酶体融合形成自噬溶酶体,降解其所包裹的内容物的过程,藉此实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新。自噬可以被对细胞不利环境条件激活,如营养缺乏、缺氧、药物作用和不同类型的治疗应激等,是一种保守的蛋白质水解机制,通过这种机制消除细胞内不必要或功能失调的成分<sup>[5-6]</sup>,从而确保维持细胞稳态。自噬可参与多种干细胞的干性维持及分化,并且多项研究表明,ATRA及其维甲酸信号可参与调节多种细胞的自噬水平<sup>[7-9]</sup>,而自噬是否参与ATRA诱导胚胎肝祖细胞的分化过程尚不清楚。本研究以小鼠胚胎肝祖细胞HP14-19为对象,探讨ATRA体外诱导肝祖细胞分化

过程中细胞的自噬水平及自噬流是否通畅,为进一步探究ATRA有效诱导肝祖细胞成熟分化的生物学机制奠定重要基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

小鼠胚胎肝脏祖细胞HP14-19:取自胚胎期14.5天的小鼠肝脏,由美国芝加哥大学分子肿瘤实验室分离鉴定;DMEM高糖培养基、胰蛋白酶及胎牛血清购自Gibco公司;ATRA及吖啶菁绿(indocyanine green, ICG)、3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)、巴伐洛霉素A1(Bafilomycin A1, Baf)购自Sigma公司;过碘酸-希夫(periodic acid-schiff, PAS)染色试剂盒购自索来宝公司;ptfLC3双荧光质粒购自Addgene公司;鼠抗兔 $\beta$ -actin一抗,兔抗鼠LC3一抗、兔抗鼠Beclin1一抗及山羊抗兔IgG、山羊抗鼠IgG二抗均购自Abcam公司;蛋白质裂解液及除抗体外的Western blot所用试剂均购自上海碧云天生物技术有限公司;荧光检测试剂盒、RNA提取试剂盒及Real-time PCR试剂盒购自Bioteck公司;逆转录试剂盒购

自Promega公司; ptfLC3质粒购自Addgene公司; PCR引物由深圳华大基因股份有限公司合成。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** HP14-19细胞用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100  $\mu$ g/mL链霉素的DMEM培养基于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>的温育箱中培养,待贴壁生长至80%~90%的汇合率时,用胰蛋白酶进行消化、传代。

**1.2.2 细胞分组与处理** 取对数生长期的细胞接种于培养皿,细胞贴壁后加入1  $\mu$ mol/L终浓度的ATRA,同时设置空白对照组。自噬抑制剂组: 3-甲基腺嘌呤(3-MA) 4  $\mu$ mol/L、巴伐洛霉素A1(Baf) 50 nmol/L处理3 h,换ATRA诱导培养基,诱导过程中每3天加自噬诱导剂处理3 h。以上实验均重复至少3次。

**1.2.3 荧光素酶报告基因检测** 细胞贴壁后用携带ALB启动子的荧光素酶报告基因的质粒转染细胞,每组设置3复孔,转染8 h后实验组加入1  $\mu$ mol/L终浓度的ATRA。于诱导后0、3、6、9天取细胞培养上清,加入G-luciferin反应液(反应缓冲液:底物=100:1,新鲜配置),混合后立即置于荧光检测仪下读数。

**1.2.4 Real-time PCR检测肝细胞相关标志蛋白质的mRNA水平** 细胞经ATRA处理7天后,试剂盒提取各组细胞总RNA,逆转录合成cDNA。Real-time PCR扩增相关基因,引物序列见表1。以肌动蛋白 $\beta$ -actin为内参标准化模板,检测基因水平表达情况。Real-time PCR反应体系为: cDNA 2  $\mu$ L, 上、下游引物各1  $\mu$ L, 2 $\times$ SYBR Green反应液10  $\mu$ L, 加ddH<sub>2</sub>O至20  $\mu$ L。Real-time PCR反应条件为: 72  $^{\circ}$ C 3 min; 94  $^{\circ}$ C 3 min; 94  $^{\circ}$ C 10 s, 55  $^{\circ}$ C 20 s, 72  $^{\circ}$ C 20 s, 共40个循环; 熔解曲线65  $^{\circ}$ C~95  $^{\circ}$ C, 每5 s增加0.5  $^{\circ}$ C, 读板。

**1.2.5 PAS染色** 细胞如1.2.2处理9天后,室温下进行如下操作: PBS洗3次,4%多聚甲醛固定10 min, PBS再洗3次,吸弃固定液,0.5%高碘酸液处理5 min;流水冲洗5 min,滴加Schiff染液,染色15 min,流水清洗5 min,显微镜下观察拍照。每组选取大于10个非重复视野,胞质染为紫红色即为阳性细胞。

**1.2.6 ICG摄取释放实验** 细胞如1.2.2处理9天后,移除孔内培养基, PBS洗3次,加入1 mg/mL ICG染液(用培养基稀释) 200  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>孵箱孵育1 h, PBS洗3次,显微镜下观察照相,每组选取大于10个非重复视野,胞核染为绿色即为阳性细胞。随后,移除孔内PBS,换回原来的培养基,37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>孵箱孵育6 h,显微镜下观察细胞ICG释放。

**1.2.7 透射电镜观察细胞自噬** 细胞经ATRA处理12、24 h后进行检测。吸弃培养基, PBS洗3次,加入1 mL PBS,以中间为圆用细胞刮刮下细胞,细胞液装入1.5 mL EP管中,1 200 r/min离心10 min,吸净上清液,沿管壁缓慢加入4%戊二醛固定,送至重庆医科大学生命科学研究院电镜室进行样品固定、漂洗、脱水、浸透、包埋,超薄切片后进行透射电镜观察。

**1.2.8 Western blot检测自噬相关标志蛋白质水平** 细胞经ATRA处理24 h后进行检测。4  $^{\circ}$ C预冷PBS洗细胞3次,加入1 mL PBS,用细胞刮刮下细胞,转移至1.5 mL EP管中,13 000 r/min离心5 min,弃上清,加入适量蛋白质裂解液吹打细胞,冰上裂解,每隔10 min用振荡器剧烈震荡,共裂解30 min,13 000 r/min离心5 min,取上清。BCA法测定蛋白质浓度,12% SDS-PAGE 100 V电泳, PVDF膜100 V转膜,5%脱脂牛奶室温封闭1 h,一抗 $\beta$ -actin、LC3、Beclin1、RAB7、P62(1:1 000) 4  $^{\circ}$ C过夜,对应二抗室温孵育1 h。ECL发

表1 Real-time PCR引物序列

Table 1 Sequences of primers for Real-time PCR

基因名称 Name of genes	引物序列(5'→3')	
	正义链 Forward	反义链 Reverse
<i>DLK</i>	GCT GGG ACG GGA AAT TCT	AAC CCA GGT GTG CAG GAG
<i>AFP</i>	ACG AGG AAA GCC CCT CAG	GCC ATT CCC TCA CCA CAG
<i>ALB</i>	CCA GAC ATT CCC CAA TGC	CAA GTT CCG CCC TGT CAT
<i>CK18</i>	GCC ATT CCC TCA CCA CAG	ACA GAG CCA CCC CAG ACA
<i>TAT</i>	ACC TTC AAT CCC ATC CGA	TCC CGA CTG GAT AGG TAG
<i>ApoB</i>	CAT GTG ATC CCC ACA GCA	TCC CAG GAC CAT GGA AAA
$\beta$ -actin	AGG GAA ATC GTG CGT GAC	CGC TCG TTG CCA ATA GTG A

光显影, ImageJ软件分析Western blot条带灰度值。

1.2.9 双荧光质粒ptfL3质粒转染 铺板细胞贴壁后即使用ptL3质粒转染细胞, 转染8 h后诱导组加入1  $\mu\text{mol/L}$ 终浓度的ATRA。诱导后12 h、24 h于激光共聚焦显微镜下观察细胞内红色及绿色亮点, 每组随机选取大于10个非重复视野拍照。

### 1.3 统计学分析

数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表达, 采用SPSS 13.0软件进行统计学检验, 组间比较采用单因素方差分析,  $P<0.05$ 为结果有显著性差异。

## 2 结果

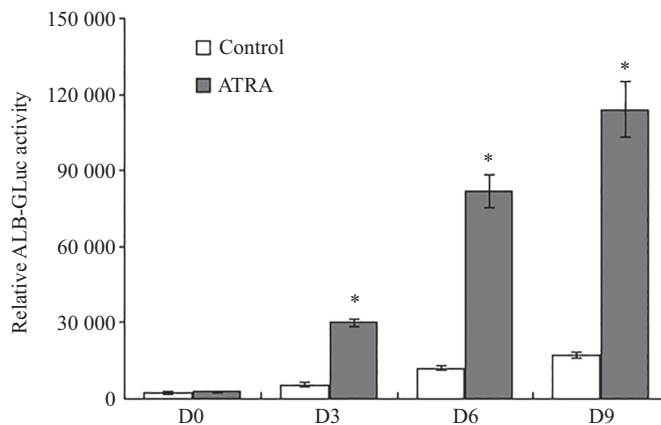
### 2.1 ATRA诱导小鼠胚胎肝祖细胞成熟分化

ALB-GLuc活性检测可间接反映ALB的表达水平。与对照组相比, 诱导组ALB-GLuc活性在3天

已经增强, 随着ATRA诱导时间的逐渐增加, ALB-GLuc活性较对照组增强越多(图1,  $P<0.05$ )。Real-time PCR结果显示, ATRA诱导后肝前体标志蛋白质DLK和AFP的表达明显下调, 成熟肝细胞标志蛋白质ALB、CK18、TAT、ApoB的表达显著增强(图2,  $P<0.05$ )。

### 2.2 ATRA诱导小鼠胚胎肝祖细胞的成熟肝细胞功能

ICG摄取实验及PAS染色用于检测肝细胞的解毒及糖原合成功能<sup>[10-11]</sup>。如图3所示, 对照组几乎没有细胞摄取吲哚青绿, 而ATRA诱导后摄取吲哚青绿的细胞数明显增多( $P<0.05$ ); 与ICG结果相似, 对照组细胞质内几乎没有紫红色颗粒, 即对照组几乎没有糖原合成, 而ATRA处理组的细胞质内的紫红色明显增多( $P<0.05$ )。综上, ATRA可有效诱导小鼠胚胎肝

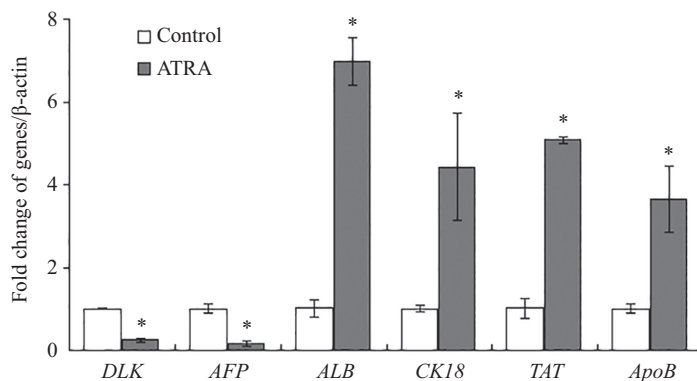


\* $P<0.05$ , 与对照组比较。

\* $P<0.05$  compared with the control group.

图1 ATRA诱导小鼠胚胎肝祖细胞HP14-19的ALB-Gluc活性检测

Fig.1 The relative ALB-GLuc activity of ATRA-induced HP14-19 cells



\* $P<0.05$ , 与对照组比较。

\* $P<0.05$  compared with the control group.

图2 Real-time PCR检测ATRA诱导小鼠胚胎肝祖细胞HP14-19的肝细胞标志物的mRNA水平

Fig.2 The mRNA level of hepatic specific markers of ATRA-induced HP14-19 cells detected by Real-time PCR



祖细胞HP14-19成熟分化, 并具有成熟肝细胞的代谢解毒和糖原合成储存功能。

### 2.3 透射电镜观察自噬体及细胞间连接

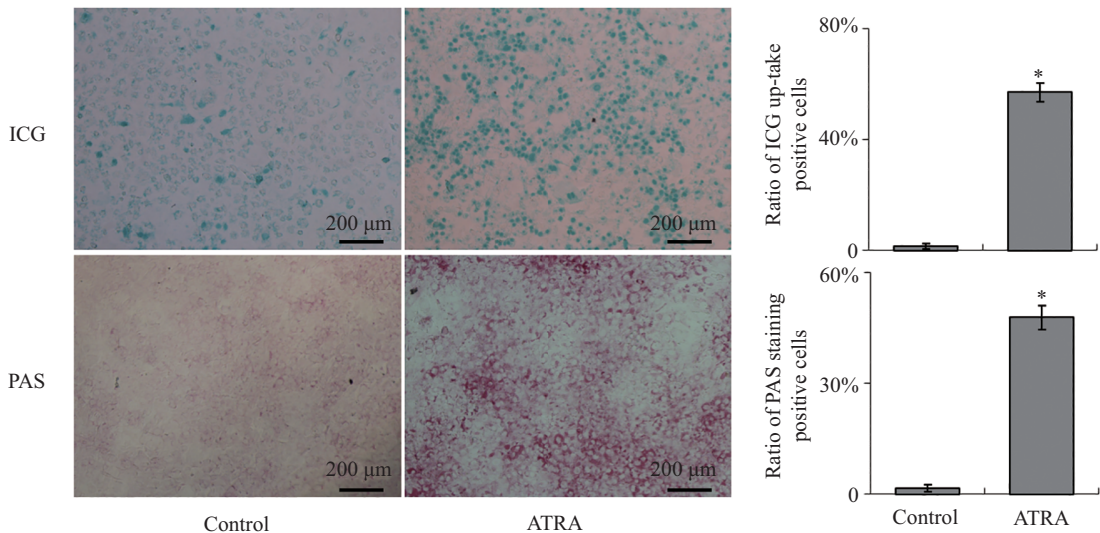
利用透射电镜能清晰地观察到自噬体的独立双层膜结构以及自噬体、自噬溶酶体等自噬各阶段不同形态学变化, 是国内外普遍认可的检测自噬最为可靠的方法和金标准。如图4所示, ATRA诱导组可见大量双层膜或多层膜结构的“自噬体”包裹细胞质和细胞器, 同时可见附近溶酶体与自噬体融合形成较大的自噬溶酶体, 而在对照组细胞质内少见。有趣的是, 我们同时发现, ATRA诱导组细胞间出现较多的紧密连接, 而对照组细胞间多为桥粒连接, 少见紧密连接(图5)。

### 2.4 ATRA促进HP14-19细胞内自噬活性

ptfLC3双荧光质粒转染细胞用于标记及追踪自噬体以及自噬流的变化。激光共聚焦扫描显微镜成像后的结果(图6)显示, 对照组自噬体形成较少, 细胞内呈现弥漫均匀的绿色或红色荧光, 24 h可见少量黄色斑点(指示自噬体)以及红色斑点(指示自噬溶酶体), ATRA诱导后12 h出现大量的自噬体及自噬溶酶体, 24 h自噬增多, 部分细胞仅可见红色斑点状的自噬溶酶体, 提示ATRA组细胞自噬水平增多, 并且自噬体形成到自噬溶酶体阶段流通通畅。

### 2.5 ATRA增强HP14-19细胞中自噬相关标志蛋白水平

Beclin1、LC3、RAB7、P62是参与自噬发生

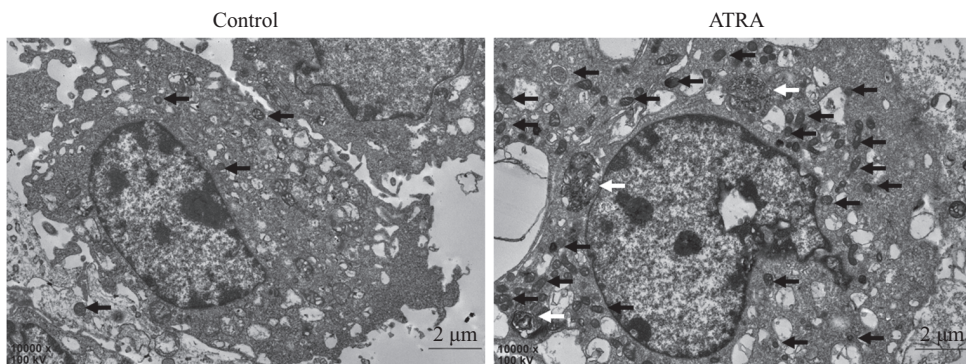


\* $P < 0.05$ , 与对照组比较。

\* $P < 0.05$  compared with the control group.

图3 ATRA诱导小鼠胚胎肝祖细胞HP14-19的ICG摄取和PAS染色功能

Fig.3 The ICG uptake and PAS staining function of ATRA-induced HP14-19 cells

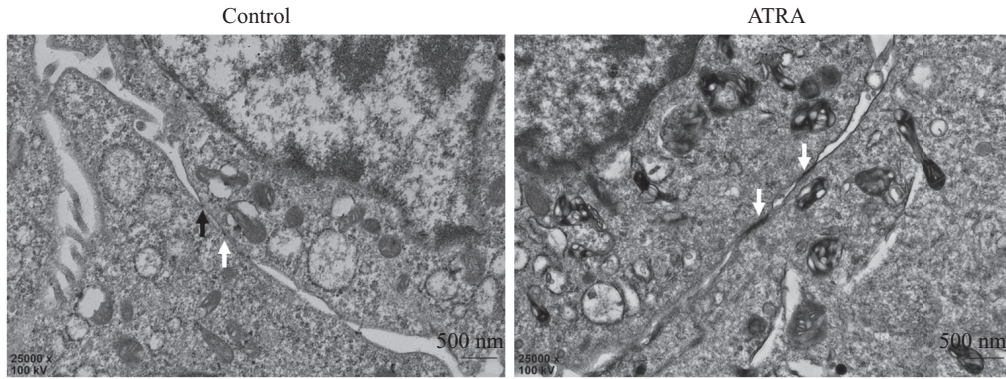


黑色箭头: 自噬体; 白色箭头: 自噬溶酶体。

Black arrow: autophagosome; White arrow: autolysosome.

图4 透射电镜观察HP14-19细胞内自噬体

Fig.4 Autophagy in cytoplasm of HP14-19 cells observed by transmission electron microscopy



黑色箭头: 桥粒; 白色箭头: 紧密连接。

Black arrow: desmosome; White arrows: tight junction.

图5 透射电镜观察HP14-19细胞间连接

Fig.5 Cell-cell junction of HP14-19 cells observed by transmission electron microscopy

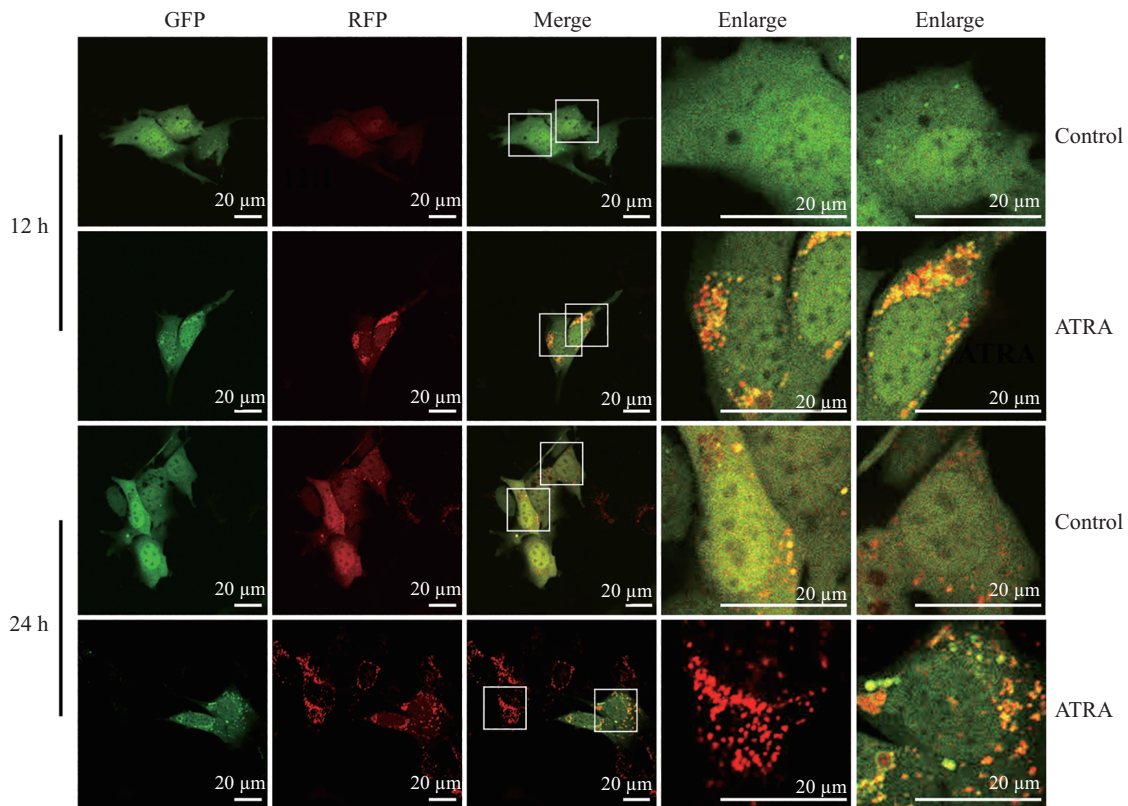


图6 ptfLC3双荧光质粒转染追踪自噬活性

Fig.6 Autophagy activity detected by mRFP-GFP tandem fluorescence-tagged LC3 plasmid transfection

的标志蛋白质。Western blot结果显示, ATRA诱导HP14-19细胞24 h后, Beclin1、LC3-II及RAB7蛋白质水平均明显上调, LC3-II/LC3-I比值显著增高(图7,  $P < 0.05$ ), 而P62蛋白质水平无显著变化。以上提示, ATRA诱导后可增强HP14-19细胞中的自噬水平。

### 2.6 自噬抑制剂3-MA和Bafilomycin可抑制ATRA诱导的HP14-19成熟分化

与ATRA诱导组相比, 3-MA及Baf处理组ICG

及PAS染色阳性细胞率显著减少(图8,  $P < 0.05$ ), Baf组更为显著, 提示自噬抑制剂可抑制ATRA诱导的HP14-19细胞成熟分化。

### 3 讨论

自噬是真核生物进化过程中非常保守的机制, 对细胞内环境稳态维持发挥极其重要的作用。最近有研究表明, 自噬在干细胞的干性维持和分化中发挥重



要作用, 但不同干细胞中的生物学机制不同<sup>[13-15]</sup>。研究发现, 骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化后自噬水平降低。自噬能够通过减少氧自由基的形成有效抑制辐射对间充质干细胞自我更新和分化潜能的损伤<sup>[16-17]</sup>。而在造血干细胞、心肌干细胞及神经干细胞分化过程中自噬水平则增高, 抑制自噬将阻止其正常分化<sup>[13]</sup>。研究发现, 在小鼠和人的胚胎干细胞早期分化过程中自噬水平快速上升<sup>[18]</sup>。在小鼠早期胚胎形成过程中, 受精卵向胚胎细胞转化过程中自噬是激活的。

ATRA是目前公认的能有效诱导干细胞和肿瘤细胞分化的重要因子。我们前期研究发现, ATRA对小鼠胚胎肝祖细胞有很强的诱导分化作用<sup>[2-3]</sup>。另有研究表明, ATRA及其维甲酸信号可参与调节多种细胞的自噬水平<sup>[7-9]</sup>, 而自噬是否在ATRA诱导胚胎肝祖细胞分化过程中发挥作用尚不清楚。

本研究以小鼠胚胎肝祖细胞HP14-19为研究对象, 首先通过检测ALB-Gluc活性、肝细胞相关标志基因的表达以及ICG和PAS染色证实了ATRA对肝祖细胞成熟分化的诱导作用。透射电镜是国内外普遍认可的检测自噬最为可靠的方法和金标准。我们发现, ATRA组可以清晰观察到大量包裹着细胞质和/或细胞器的双层膜或多层膜结构的“自噬体”, 以及部分溶酶体与自噬体融合形成的较大自噬溶酶体, 而在对照组细胞质内少见, 证明ARTA可诱导HP14-19细胞发生自噬。同时, 我们发现, ATRA诱导组细胞间出现较多的紧密连接, 而空白对照组则多为桥粒连接(属于黏着连接), 少见紧密连接。紧密连接可封闭相邻细胞间的接缝, 防止溶液中的分子沿细胞间隙渗入体内, 保证细胞内环境相对稳定。肝细胞是典型的极化细胞, 在肝脏内彼此以紧密连接排列成肝板<sup>[19-20]</sup>。紧密连接的出现是ATRA诱导肝细胞成熟分化的重要实验依据。ATRA诱导的自噬可能通过影响细胞连接、细胞骨架的形成, 维持细胞内环境稳定, 从而确保肝祖细胞向正常成熟肝细胞分

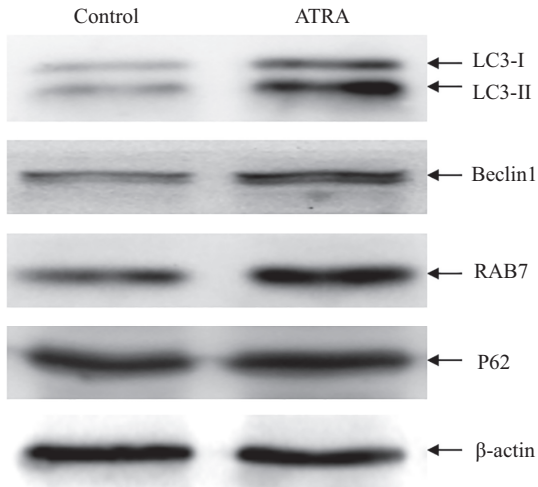
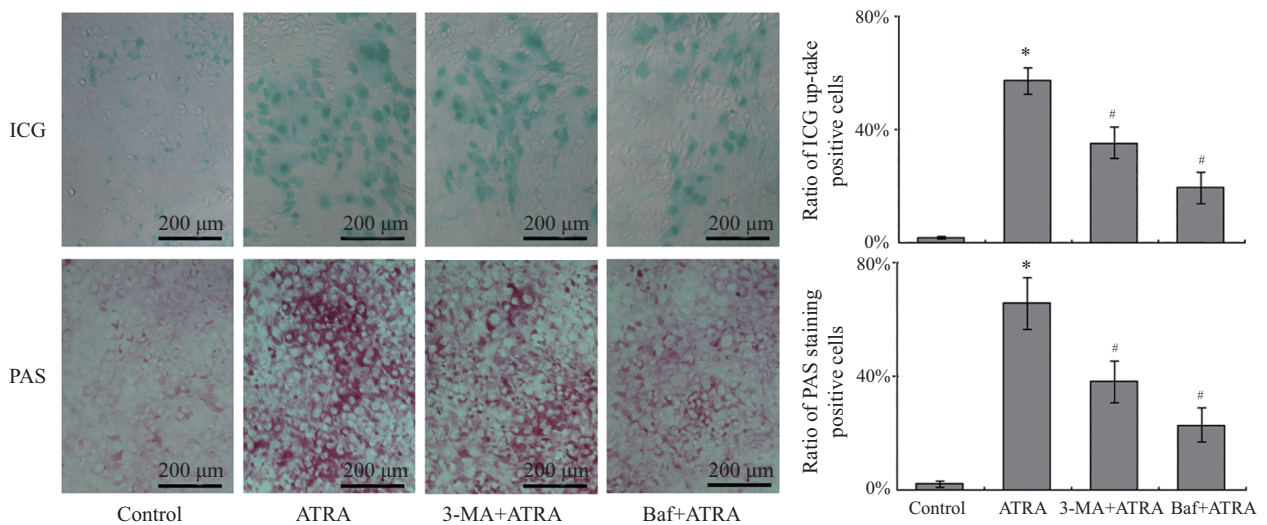


图7 Western blot检测自噬相关标志蛋白质水平  
Fig.7 The protein level of autophagy related markers detected by Western blot



\* $P < 0.05$ , 与对照组比较; # $P < 0.05$ , 与ATRA组比较。

\* $P < 0.05$  compared with control group; # $P < 0.05$  compared with ATRA group.

图8 3-MA和Bafilomycin可抑制ATRA诱导小鼠胚胎肝祖细胞HP14-19的ICG摄取和PAS染色功能  
Fig.8 ATRA-induced ICG uptake and PAS staining function of HP14-19 cells were inhibited by 3-methyladenin and Bafilomycin

化。ptfLC3双荧光质粒转染细胞,可通过GFP及RFP的荧光弥散或斑点状聚集较准确地反映细胞中LC3的分布及状态<sup>[21]</sup>。自噬体进入第二阶段形成自噬溶酶体,由于溶酶体的酸性环境,可以将酸敏感型GFP蛋白淬灭,而mRFP不受影响。激光共聚焦成像结果显示,对照组自噬体形成较少,24 h可见少量黄色斑点(指示自噬体)以及红色斑点(指示自噬溶酶体),而ATRA诱导组自噬体及自噬溶酶体均明显多与对照组,ATRA诱导12 h即出现大量的自噬体及自噬溶酶体,24 h自噬增多,半数以上细胞仅可见红色斑点状的自噬溶酶体,提示ATRA组细胞自噬水平增多,并且自噬体形成到自噬溶酶体阶段通畅。48 h后ATRA组几乎不见红绿荧光,提示外源LC3形成的自噬体代谢全过程通畅。因此,这些结果可以得出,在ATRA诱导肝祖细胞成熟分化中自噬活性明显增强,ATRA可能通过自噬调控肝细胞的分化。

Beclin1、LC3、RAB7、P62是参与自噬发生的标志蛋白质<sup>[22]</sup>。其中,Beclin1是一个多功能蛋白质,可接受自噬信号及其他信号对自噬进行调节,是自噬启动的“守门人”<sup>[21]</sup>。自噬形成时,MAP1-LC3由细胞质型(即LC3-I)转位到自噬体膜(即LC3-II),因此,LC3-II/LC3-I比值反映自噬体数量<sup>[24]</sup>。RAB7是自噬体与溶酶体融合进程中的关键蛋白质,促进自噬体识别和融合溶酶体<sup>[25]</sup>。ATRA诱导后,Beclin1、LC3-II、RAB7蛋白质水平均明显上调,并且LC3-II/LC3-I比值较对照组增加,这提示ATRA诱导后HP14-19细胞质内已触发自噬的发生,并且已到达自噬溶酶体阶段。P62结合泛素化的蛋白质及LC3-II形成复合物,并在自噬溶酶体中降解,P62蛋白质水平通常被用作自噬溶酶体降解的指标,反映自噬流是否通畅<sup>[26-27]</sup>。而本研究结果显示,ATRA诱导后24 h p62蛋白质水平小幅上调。有研究表明,饥饿处理小鼠胚胎成纤维细胞MEFs和人肝癌细胞HepG2诱导自噬时,仅在最初的几个小时期间才能观察到SQSTM1/p62蛋白质明显的减少,而长时间的饥饿诱导自噬时则导致SQSTM1/p62蛋白质水平恢复<sup>[28]</sup>。3-甲基腺嘌呤可通过抑制III型PI3K而抑制自噬体形成,而巴伐洛霉素A1可阻断自噬体与溶酶体融合过程从而抑制自噬。我们发现,3-甲基腺嘌呤和巴伐洛霉素A1诱导组,细胞的ICG摄取和糖原合成能力显著下降,提示自噬参与了ATRA诱导的肝细胞成熟分化,巴伐洛霉素A1的作用更强,提示自噬流被阻

断后,受损的物质和细胞器在细胞中堆积,可能会影响细胞的成熟分化<sup>[29]</sup>,具体的自噬机制还需要进一步探讨。

综上所述,本研究初步证明了ATRA在有效诱导小鼠胚胎肝祖细胞分化成熟的同时,显著上调细胞的自噬水平,抑制自噬可阻碍ATRA促肝祖细胞成熟分化的作用。本研究结果为进一步深入探讨ATRA诱导肝细胞成熟分化的分子生物学机制奠定了坚实的基础。

### 参考文献 (References)

- Rhinn M, Dollé P. Retinoic acid signaling during development. *Development* 2012; 139(5): 843-58.
- Huang J, Bi Y, Zhu GH, He Y, Su Y, He BC, *et al.* Retinoic acid signalling induces the differentiation of mouse fetal liver-derived hepatic progenitor cells. *Liver Int* 2009; 29(10): 1569-81.
- 周建武, 何 均, 龚梦嘉, 毕 杨. 重组siRAR $\gamma$ 腺病毒构建及其对小鼠肝脏祖细胞分化的影响. *基础医学与临床*(Zhou Jianwu, He Yun, Gong Mengjia, Bi Yang. Construction of recombinant adenovirus vector siRAR $\gamma$  and its effect on mouse hepatic progenitor cells differentiation. *Basic & Clinical Medicine*) 2014; 34(1): 22-8.
- Cui J, Gong M, He Y, Li Q, He T, Bi Y. All-trans retinoic acid inhibits proliferation, migration, invasion and induces differentiation of hep1-6 cells through reversing EMT *in vitro*. *Int J Oncol* 2016; 48(1): 349-57.
- Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol* 2013; 15(7): 713-20.
- Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 2010; 40(2): 280-93.
- Li Y, Li G, Wang K, Xie YY, Zhou RP, Meng Y, *et al.* Autophagy contributes to 4-Amino-2-Trifluoromethyl-Phenyl Retinate-induced differentiation in human acute promyelocytic leukemia NB4 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2017; 15(319): 1-11.
- Orfali N, O'Donovan TR, Nyhan MJ, Britschgi A, Tschan MP, Cahill MR, *et al.* Induction of autophagy is a key component of all-trans-retinoic acid-induced differentiation in leukemia cells and a potential target for pharmacological modulation. *Exp Hematol* 2015; 43(9): 781-93.
- Chen ZH, Wang WT, Huang W, Fang K, Sun YM, Liu SR, *et al.* The lncRNA HOTAIRM1 regulates the degradation of PML-RARA oncoprotein and myeloid cell differentiation by enhancing the autophagy pathway. *Cell Death Differ* 2017; 24(2): 212-24.
- Yamada T, Yoshikawa M, Kanda S, Kato Y, Nakajima Y, Ishizaka S, *et al.* In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. *Stem Cells* 2002; 20(2): 146-54.
- Kamo N, Yasuchika K, Fujii H, Hoppo T, Machimoto T, Ishii T, *et al.* Two populations of Thy1-positive mesenchymal cells regulate in vitro maturation of hepatic progenitor cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292(2): G526-34.
- Mack NA, Georgiou M. The interdependence of the Rho GTPases and apical cell polarity. *Small GTPases* 2014; 5(2): 1-16.



- 13 Guan JL, Simon AK, Prescott M, Menendez JA, Liu F, Wang F, *et al.* Autophagy in stem cells. *Autophagy* 2013; 9(6): 830-49.
- 14 Pan H, Cai N, Li M, Liu GH, Izpisua Belmonte JC. Autophagic control of cell 'stemness'. *EMBO Mol Med* 2013; 5(3): 327-31.
- 15 Phadwal K, Watson AS, Simon AK. Tightrope act: autophagy in stem cell renewal, differentiation, proliferation, and aging. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70(1): 89-103.
- 16 Oliver L, Hue E, Priault M, Vallette FM. Basal autophagy decreased during the differentiation of human adult mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2012; 21(15): 2779-88.
- 17 Hou J, Han ZP, Jing YY, Yang X, Zhang SS, Sun K, *et al.* Autophagy prevents irradiation injury and maintains stemness through decreasing ROS generation in mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis* 2013; 4(10): e844.
- 18 Tra T, Gong L, Kao LP, Li XL, Grandela C, Devenish RJ, *et al.* Autophagy in human embryonic stem cells. *PLoS One* 2011; 6(11): e27485.
- 19 Erdélyi-Belle B, Török G, Apáti Á, Sarkadi B, Schaff Z, Kiss A, *et al.* Expression of tight junction components in hepatocyte-like cells differentiated from human embryonic stem cells. *Pathol Oncol Res* 2015; 21(4): 1059-70.
- 20 Gamal W, Treskes P, Samuel K, Sullivan GJ, Siller R, Srsen V, *et al.* Low-dose acetaminophen induces early disruption of cell-cell tight junctions in human hepatic cells and mouse liver. *Sci Rep* 2017; 7: 37541.
- 21 黄桢钧, 刘彬, 刘本荣, 刘少军. 双荧光mRFP-eGFP-LC3体系在细胞自噬中的作用. 贵阳医学院学报(Huan Zhenjun, Liu Bin, Liu Benrong, Liu Shaojun. Evaluating the effect of Dual-fluorescence mRFP-eGFP-LC3 in autophagy. *Journal of Guiyang Medical College*) 2015; 40(10): 1029-32.
- 22 Bak DH, Zhang E, Yi MH, Kim DK, Lim K, Kim JJ, *et al.* High  $\omega$ 3-polyunsaturated fatty acids in fat-1 mice prevent streptozotocin-induced Purkinje cell degeneration through BDNF-mediated autophagy. *Sci Rep* 2015; 5: 15465.
- 23 Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(25): 15077-82.
- 24 McLeland CB, Rodriguez J, Stern ST. Autophagy monitoring assay: qualitative analysis of MAP LC3-I to II conversion by immunoblot. *Methods Mol Biol* 2011; 697: 199-206.
- 25 Zhan L, Chen S, Li K, Liang D, Zhu X, Liu L, *et al.* Autophagosome maturation mediated by Rab7 contributes to neuroprotection of hypoxic preconditioning against global cerebral ischemia in rats. *Cell Death Dis* 2017; 8(7): e2949.
- 26 Lee Y, Wehl CC. Regulation of SQSTM1/p62 via UBA domain ubiquitination and its role in disease. *Autophagy* 2017; 13(9): 1615-6.
- 27 Pugsley HR. Assessing autophagic flux by measuring LC3, p62, and LAMP1 co-localization using multispectral imaging flow cytometry. *J Vis Exp* 2017; doi: 10.3791/55637.
- 28 Sahani MH, Itakura E, Mizushima N. Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids. *Autophagy* 2014; 10(3): 431-41.
- 29 Cao Y, Fang Y, Cai J, Li X, Xu F, Yuan N, *et al.* ROS functions as an upstream trigger for autophagy to drive hematopoietic stem cell differentiation. *Hematology* 2016; 21(10): 613-8.