

过表达FGD6对肝干细胞分化的调控作用

余师师¹ 沙鸥¹ 李宛玲¹ 胡倩¹ 何通川² 张秉强^{1*}

(¹重庆医科大学附属第一医院消化内科, 重庆 400016; ²美国芝加哥大学医学中心分子肿瘤实验室, 芝加哥 600637)

摘要 该文主要探讨过表达*FGD6*(faciogenital dysplasia 6)基因对肝干细胞分化的调控作用及其可能的机制。将*FGD6*基因插入腺病毒载体使其过表达, 并包装成腺病毒(Ad-FGD6), 感染小鼠胚胎肝干细胞HP14.5, 以空载体腺病毒(Ad-null组)和未感染腺病毒组(Blank control组)作为对照; 半定量PCR和Western blot分别检测*FGD6*、肝干细胞标志物(AFP)、肝细胞标志物(ALB)、胆管上皮细胞标志物(CK19、SOX9)及Wnt经典通路中的标志物(β -catenin、wnt3a)的mRNA和蛋白表达水平; 并通过糖原染色法(PAS染色)检测细胞内糖原合成的变化情况; CCK8检测各组细胞增殖情况。结果显示, 感染Ad-FGD6腺病毒后, 与Ad-null组及Blank control组相比, HP14.5细胞中的*FGD6*的mRNA和蛋白表达水平升高($P < 0.05$), 肝干细胞标志物(AFP)及胆管上皮标志物(CK19、SOX9)的mRNA及蛋白的表达水平降低($P < 0.05$), 而肝细胞标志物ALB及Wnt经典通路中的标志物(β -catenin、wnt3a)的mRNA和蛋白的表达水平平均升高($P < 0.05$); PAS染色发现, Ad-FGD6组存在紫红色颗粒, 呈阳性反应, 这说明有糖原合成。CCK8检测发现, Ad-FGD6组能促进肝干细胞增殖($P < 0.05$)。因此, 过表达HP14.5细胞的*FGD6*会使HP14.5细胞向肝细胞分化并促进细胞增殖, 而这一过程可能通过Wnt经典信号通路实现。

关键词 *FGD6*基因; 肝干细胞; 分化调控; 重组腺病毒; Wnt经典信号通路

The Effect of Over-Expressing FGD6 on the Differentiation in Hepatic Stem Cells

YU Shishi¹, SHA Ou¹, LI Wanling¹, HU Qian¹, HE Tongchuan², ZHANG Bingqiang^{1*}

(¹Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

²Molecular Oncology Laboratory, University of Chicago Medical Center, Chicago 600637, USA)

Abstract The aim of this study was to investigate the effect of over-expressing *FGD6* (faciogenital dysplasia 6) on the differentiation of hepatic stem cells and its possible mechanism. The *FGD6* gene was inserted into an adenovirus vector to over-express and packaged into an adenovirus (Ad-FGD6) to infect hepatic stem cells HP14.5, where the empty vector adenovirus group (Ad-null group) and the uninfected adenovirus group (Blank control group) were used as comparisons. The mRNA and protein expression levels of *FGD6*, hepatic stem cell marker (AFP), hepatocyte markers (ALB), bile duct epithelial cell markers (CK19 and SOX9) and the canonical Wnt pathway markers (β -catenin and wnt3a) were detected by semi-quantitative PCR and Western blot respectively. The change in intracellular glycogen synthesis was detected by glycogen staining (PAS staining), and the cell proliferation was detected by CCK8. The results showed that the mRNA and protein levels of *FGD6* when HP14.5 cells were infected by the Ad-FGD6 adenovirus were increased compared with the Ad-null group and the Blank control group ($P < 0.05$). The mRNA and protein levels of hepatic stem cell marker (AFP) and bile duct epithelial markers

收稿日期: 2018-11-24 接受日期: 2019-07-08

重庆市自然科学基金计划项目(批准号: CSTC,2011BB5123)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-89012012, E-mail: zhbqingqiang@163.com

Received: November 24, 2018 Accepted: July 8, 2019

This work was supported by Chongqing Natural Science Fund Project (Grant No.CSTC,2011BB5123)

*Corresponding author. Tel: +86-23-89012012, E-mail: zhbqingqiang@163.com

网络出版时间: 2019-11-12 12:25:58 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20191112.1027.008.html>

(CK19, SOX9) were decreased ($P < 0.05$). But the mRNA and protein levels of hepatocyte marker (ALB) and the canonical Wnt pathway markers were elevated ($P < 0.05$). There were the purplish-red granules in the Ad-FGD6 group that represented the positive reaction, which indicated that the HP14.5 had the function of glycogen synthesis. CCK8 detection found that Ad-FGD6 group can promote hepatic stem cell proliferation ($P < 0.05$). Therefore, the up-regulation of FGD6 gene expression can facilitate HP14.5 cells to differentiate into hepatocytes and promote cell proliferation, which may be achieved through the canonical Wnt pathway.

Keywords FGD6 gene; liver stem cells; differentiation regulation; recombinant adenovirus; canonical Wnt pathway

近年来, 由于肝细胞移植成为治疗终末期肝病的一种新的有效手段^[1], 干细胞的研究受到人们的广泛关注^[2], 但如何有效地诱导肝干细胞分化为成熟的肝细胞是目前该领域研究的重点及难点。因此, 寻找有效调控肝干细胞分化的相关因子并揭示其调控的详细作用机制对肝细胞移植的研究具有重要的理论指导意义。1958年, Wilson和Leduc^[3]首次提出肝干细胞的概念。干细胞具有自我更新能力和双向分化潜能, 可在体内或体外被诱导分化为成熟肝细胞和胆管内皮细胞。参与肝干细胞分化的信号通路也有许多, 其中包括Wnt经典及非经典信号通路等。目前, 用于研究治疗终末期肝病的干细胞主要包括肝成体干细胞、胎肝细胞、间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)及诱导性多能干细胞等。其中小鼠胚胎肝干细胞HP14.5具有稳定、永久、非致瘤性肝祖样肝细胞的特征^[4], 故本文将其作为研究对象。

FGD系列包括FGD1、FGD2、FGD3、FGD4、FGD5及FGD6等^[5-10]。其中, FGD1编码鸟嘌呤核苷酸交换因子(guanine nucleotide-exchange factor, GEFs)能激活cdc42, 通过慢病毒过表达FGD1能促进人间充质干细胞的成骨作用^[7]。FGD5能识别骨髓的造血干细胞^[9]。虽然FGD6广泛存在于人体组织及器官中, 但是有何作用及其作用机制目前在国内外鲜有文献报道。由于FGD6与FGD家族高度同源, 结构相似, 因此FGD6功能极有可能与干细胞的分化密切相关。本文拟采用Ad Easy腺病毒载体系统, 构建重组腺病毒Ad-FGD6、Ad-null, 并经测序验证^[11], 研究上调HP14.5细胞中FGD6基因的表达, 探索FGD6与肝干细胞分化调控的关系, 为肝细胞移植提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及材料

pAdTrace、pAeasy-1、DH5 α 菌种由美国芝加

哥大学医学中心何通川教授惠赠; 小鼠胚胎肝干细胞HP14.5、HEK293细胞株由重庆医科大学生命科学院唐霓教授惠赠; pCR-XI-TOPO-FGD6重组质粒购自美国Open Biosystems公司; *Kpn*I酶、*Not*I酶、T4 DNA连接酶、*Pac* I酶购自日本TaKaRa公司; 胶回收纯化试剂盒购自Vazyme Biotech公司; 转染试剂Lipofectamine 2000购自美国Invitrogen公司; DMEM培养基购自美国HyClone公司; 胎牛血清购自德国PAN公司; FGD6、GAPDH、AFP、ALB及SOX9一抗体购自美国Santa Cruz公司; β -catenin和wnt3a购自万类生物科技有限公司; CK19一抗体购自Abcam公司; 辣根过氧化物酶(horse-radish peroxidase, HRP)标记免疫球蛋白G二抗体购自北京中杉金桥生物技术公司; BCA蛋白定量试剂盒及增强化学发光显色液均购自中国碧云天生物技术研究所; Trizol、反转录试剂盒、DNA分子标准物及高保真Taq酶均购自日本TaKaRa公司; 引物及测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成; 琼脂糖购自上海基因科技有限公司; TAE缓冲液购自上海百赛生物技术有限公司; Goldview II和糖原染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; CCK8试剂购自东仁化学科技有限公司。

1.2 细胞培养及实验分组

HP14.5细胞和HEK293细胞培养于含10%胎牛血清及1%青/链霉素的DMEM中, 放置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下的孵箱培养48 h, 融合至80%~90%, 用0.25%胰酶+0.02% EDTA消化传代以备用, 实验分为3组: Ad-FGD6组(FGD6组)、Ad-null组(空载病毒组)、Black control组(未感染病毒组)。

1.3 过表达FGD6质粒构建及腺病毒包装和扩增

通过购买装载有目的基因FGD6(NM_053072.3)的CDS序列的重组质粒, 即含有FGD6序列的pCR-XI-TOPO重组质粒, 用*Kpn*I酶和*Not*I酶分别双酶切含有目的基因的质粒和穿梭质粒pAdTrace。酶切后

跑琼脂糖电泳并在紫外灯下切胶回收纯化得到所需片段,然后用T4 DNA连接酶将目的片段克隆至穿梭载体上,再用限制性核酸内切酶*Pac I*将重组质粒线性化后与骨架质粒pAdeasy-1用电穿孔法转化到DH5 α 感受态细菌中进行重组,将其接种到含有卡那霉素的平板中,挑选阳性克隆、摇菌、提取质粒、送其测序,将测序正确的重组质粒用*Pac I*酶线性化,加入转染试剂Lipofectamine 2000,转染HEK293细胞。约2周之后,待细胞漂浮约60%,收集细胞,用1 mL的PBS重悬细胞后,反复振荡,冻融3次(37 °C、80 °C)后经离心(4 °C、15 000 r/min, 15 min)收集上清液,用提取的上清液反复感染HEK293细胞,扩增4轮后进行病毒纯化和滴度测定^[1],上述构建过表达腺病毒Ad-FGD6和Ad-null都带有红色荧光蛋白(RFP)的表达,可以在荧光显微镜下观察。将HP14.5细胞接种于24孔板中,接种密度为 1×10^5 个,24 h细胞贴壁后,倍比稀释病毒,分别感染HP14.5细胞,继续培养48 h后用荧光显微镜观察RFP荧光阳性的细胞数,按下式计算其病毒滴度,筛选出感染复数(multiplicity of infection, MOI)为110的最合适的病毒滴度。病毒滴度(pfu/mL)=GFP荧光阳性细胞数 \times 病毒上清稀释倍数/0.4。

1.4 腺病毒载体感染HP14.5细胞

将HP14.5细胞接种于6孔培养板,每孔 1.5×10^5

个细胞。24 h后,待细胞融合为30%~40%时,弃掉原培养基,将FGD6组和Ad-null组的病毒加入对应组的细胞中,用含2%胎牛血清的DMEM进行培养,每孔1 mL,8 h后,将其培养基更换为含有10%胎牛血清的DMEM,继续于37 °C、5% CO₂条件下的孵箱培养,以备后续使用。

1.5 RT-PCR法检测细胞的基因表达

收集腺病毒感染48 h后的HP14.5细胞,用Trizol法提取细胞总RNA,紫外分光光度计检测其纯度及浓度。将质量合格RNA样品安装宝日生物技术(北京)有限公司的逆转录试剂说明书合成cDNA。以cDNA为模板,由特定引物(表1)扩增出对应的产物。其中,PCR反应体系:12.5 μ L PremixTaq酶、1 μ L上游引物(10 μ mol/L)、1 μ L下游引物(10 μ mol/L)、1 μ L cDNA模板、9.5 μ L去离子水,总体积为25 μ L。循环条件:94 °C预变性4 min;94 °C变性30 s,58 °C退火30 s(退火温度据不同引物而定),72 °C延伸45 s,变性、退火及延伸过程在30个循环后于72 °C延伸3 min。取PCR产物5 μ L上样,5 μ L DNA分子量标准物作参照。使用1.3%琼脂糖进行电泳,于紫外投影仪下拍照,其图片用于结果分析。

1.6 免疫印迹检测相关蛋白表达

收集腺病毒转染72 h后的HP14.5细胞,用RIPA裂解液提取细胞总蛋白,BCA法检测蛋白浓度(严格

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	长度/bp Length /bp	温度/°C Tm /°C
SOX9	Forward AAG AAA GAC CAC CCC GAT TAC A	126	56
	Reverse CAG CGC CTT GAA GAT AGC ATT A		
CK19	Forward AGG TCA GTG TGG AGG TGG ATT C	195	56
	Reverse TGA CTT CGG TCT TGC TTA TCT GG		
ALB	Forward CTG CGA TAA ACC ACT GTT GAA GAA	169	55
	Reverse ATA TTC ATA CAA GAA CGT GCC CAG		
AFP	Forward CCA GTG CGT GAC GGA GAA GAA TG	223	58
	Reverse GCA GCC TGA GAG TCC ATA CTT GTT AG		
FGD6	Forward CCT TTA TTA GGC TTC ACC GTC AC	145	60
	Reverse CCT GAA ATG CGT CTA TCC ACC T		
β -catenin	Forward AAC AGG GTG CTA TTC CAC GAC T	206	58
	Reverse TGG AAT GGT ATT GAG TCC TCG G		
Wnt3a	Forward CGG CTG TAG TGA GGA CAT TGAA	197	58
	Reverse ACC AGC AGG TCT TCA CTT CAC A		
GADPH	Forward ATC CAC TGG TGC TGC CAA G	367	60
	Reverse CAT GTA GGC CAT GAG GTC CA		

参照试剂盒说明书步骤操作)。定量后的蛋白按照30 μg /孔上样, 进行SDS-PAGE凝胶电泳分离, 将蛋白转移至PVDF膜, 用5%脱脂奶粉室温封闭2 h, 加入对应的一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 第二天用0.1% TBST洗膜3次, 每次10 min。然后用对应种属的二抗于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1.5 h, 0.1% TBST洗膜3次, 每次10 min。最后用化学发光试剂ECL于暗室显色曝光分析。

1.7 糖原染色

HP14.5细胞接种于96孔板中, 将其分为4组: Ad-FGD6组、Ad-null组、Black control组及DMSO组(用来作阳性对照)^[12]。待24 h细胞融合度为30%~40%时, 弃掉原培养基, 再分别加入对应的重组腺病毒, 用含2%胎牛血清的DMEM进行培养, 并在第6天严格按照糖原染色试剂盒说明书进行糖原染色。先弃掉培养基, 采用磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗3次, 每孔加入100 μL 的固定液, 室温固定10 min; PBS漂洗后加入高碘酸溶液100 μL , 室温放置16 min; PBS冲洗后加入Schiff溶液100 μL 染色12 min, 流水冲洗2 min, 于倒置显微镜下观察拍照, 用于反映细胞的糖原合成功能。

1.8 CCK8增殖

将HP14.5细胞以每孔 3×10^3 个细胞接种于96孔板中, 分为Ad-FGD6组、Ad-null组、Black control组3组, 每组设3个复孔, 待24 h细胞融合度在30%~40%时候, 弃掉原培养基, 再分别加入对应的重组腺病毒, 用含2%胎牛血清的DMEM于孵箱中培养。于加入腺病毒后24 h、48 h、72 h, 每孔加入CCK8混合液110 μL (含100 μL 完全培养基和10 μL 的CCK8试剂), 培养2 h, 待液体呈橙色时, 用酶标仪测定450 nm处的吸光度 D 值, 进行统计分析。

1.9 统计学处理

应用SPSS 21统计学软件对所有的实验数据进行统计学分析, Graphpad 5.01软件进行制图。各组数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较则采用LSD- t 检验, 每组实验均独立重复3次以上, 检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 腺病毒的包装

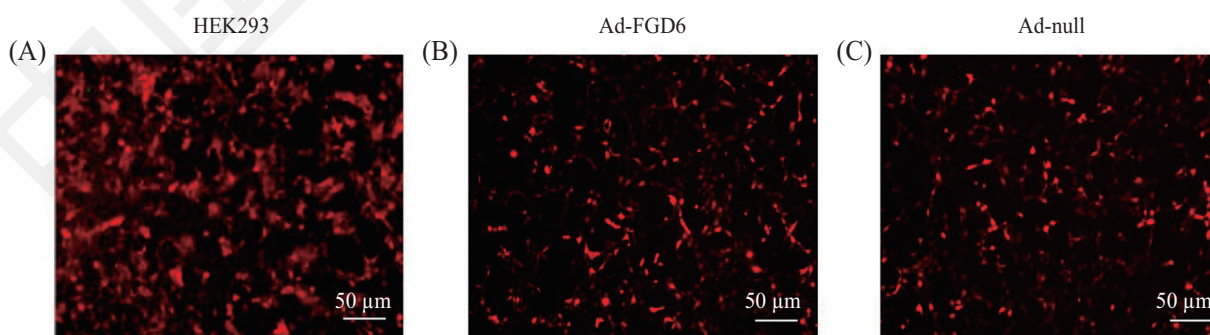
将重组质粒交由生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 结果证实序列正确。再将其序列正确的重组质粒经Pac I酶线性化后转染HEK293细胞, 第7天于倒置荧光镜下观察到红色荧光出现, 说明腺病毒载体包装成功(图1A)。

2.2 腺病毒扩增及滴度测定

用腺病毒原液感染HEK293细胞, 用倒置荧光显微镜观察红色荧光表达监测病毒扩增效率。经4轮扩增, 共25个T75培养瓶细胞(约 5×10^6 个/瓶), 提取病毒, 浓缩纯化病毒后测得腺病毒Ad-FGD6滴度为 1×10^9 PFU/mL。同样的方法得到Ad-null组病毒滴度为 4×10^9 PFU/mL, 在MOI值为110的情况下, 需滴度为 10^7 可成功感染上HP14.5, 且感染率接近70%, 病毒毒性较小。

2.3 腺病毒感染HP14.5细胞

腺病毒感染HP14.5后第1天, 在荧光显微镜下可见少量红色荧光, 第2天可见较多红色荧光, 表明Ad-FGD6及Ad-null组腺病毒都能成功感染HP14.5细胞(图1B、图1C), 感染率约为70%。



A: 腺病毒载体在HEK293细胞包装过程中的第7天; B: 感染过表达FGD6腺病毒48 h的HP14.5细胞; C: 感染空载组腺病毒48 h的HP14.5细胞。

A: the adenovirus in the process of packaging HEK293 cells on the seventh day; B: HP14.5 cell infected by over-expressing FGD6 for 48 h; C: HP14.5 cell infected by adenovirus empty group for 48 h.

图1 荧光倒置显微镜下的细胞

Fig.1 The cells under the inverted fluorescence microscope

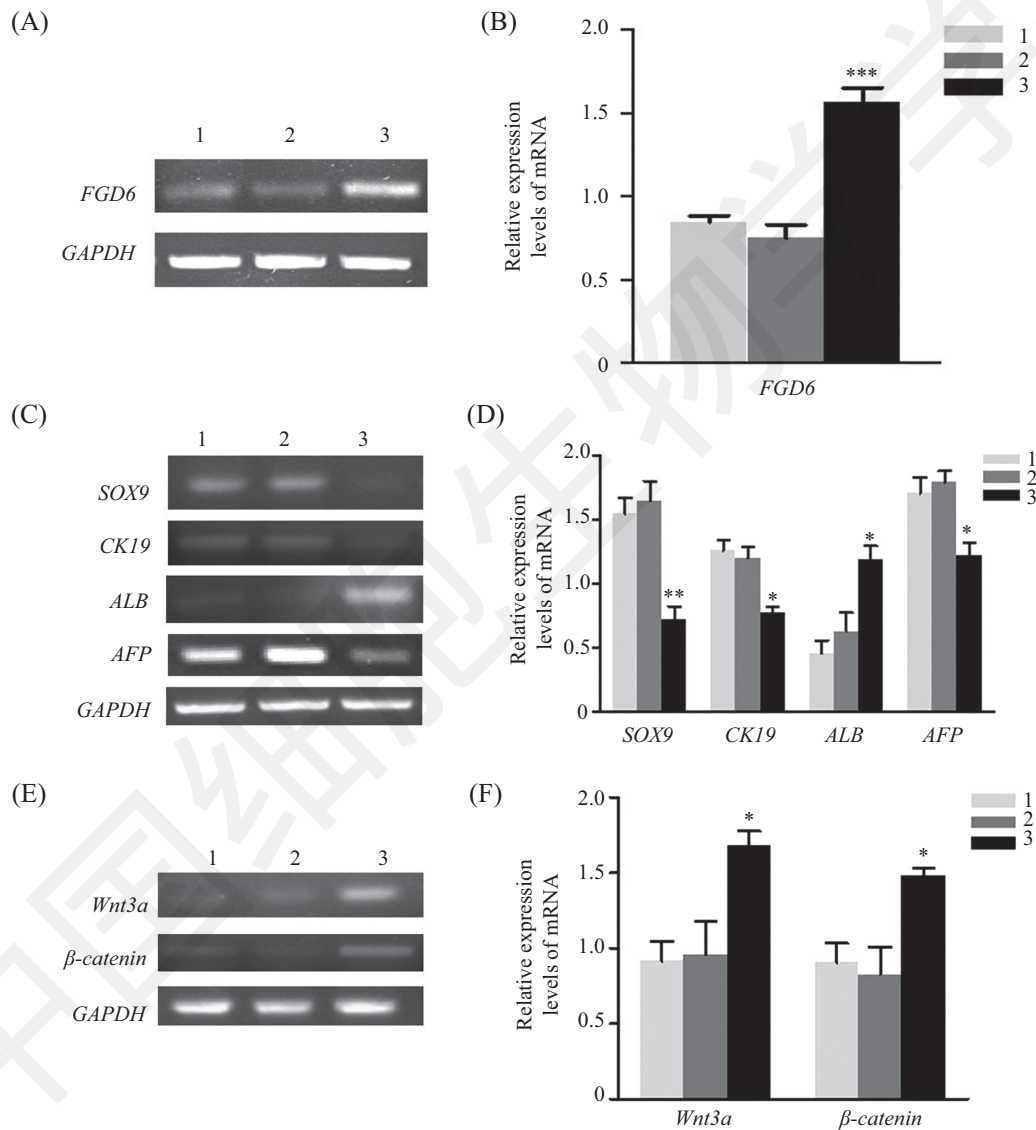
2.4 重组腺病毒感染HP14.5后*FGD6*及相关标志物的mRNA表达情况

在腺病毒感染细胞48 h时,可见*FGD6*基因在实验组中较对照组明显上调($P<0.001$)(图2A和图2B)。相应的肝干细胞标志物*AFP*的基因表达水平下调,肝细胞标志物*ALB*基因表达水平升高($P<0.05$),胆管内皮细胞标志物*CK19*、*SOX9*基因表达水平明显下调($P<0.05$)(图2C和图2D)。并且发现过表达*FGD6*

后,*β-catenin*和*wnt3a*的表达也相应升高($P<0.05$)(图2E和图2F)。这表明,HP14.5细胞过表达*FGD6*基因水平后,HP14.5会向肝细胞方向分化,且可能会通过Wnt经典信号通路在基因水平上影响肝干细胞的分化,并促使其向肝细胞分化。

2.5 重组腺病毒感染HP14.5后*FGD6*及相关标志物蛋白表达

在腺病毒感染细胞72 h时,*FGD6*蛋白表达水



A: 感染腺病毒后*FGD6*在mRNA表达水平的变化; B: 感染腺病毒后*FGD6*在mRNA表达水平的统计分析; C: 各分化指标在mRNA表达水平的变化; D: 各分化指标在mRNA表达水平的统计分析; E: *Wnt/β-catenin*的指标在mRNA表达水平的变化; F: *Wnt/β-catenin*的指标在mRNA表达水平的统计分析; 1: Black control组; 2: Ad-null组; 3: Ad-FGD6组; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与Black control组相比。

A: changes at mRNA expression levels of *FGD6* after being infected by adenovirus; B: statistical analysis at mRNA expression levels of *FGD6* after being infected by adenovirus; C: changes for the various differentiation indicators at mRNA expression levels; D: statistical analysis for the various differentiation indicators at mRNA expression levels; E: changes for *Wnt/β-catenin* indicators at mRNA expression levels; F: statistical analysis for *Wnt/β-catenin* indicators at mRNA expression levels. 1: Black control group; 2: Ad-null group; 3: Ad-FGD6 group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with Black control group.

图2 感染腺病毒后HP14.5细胞中各分子标志物在mRNA水平的表达的变化

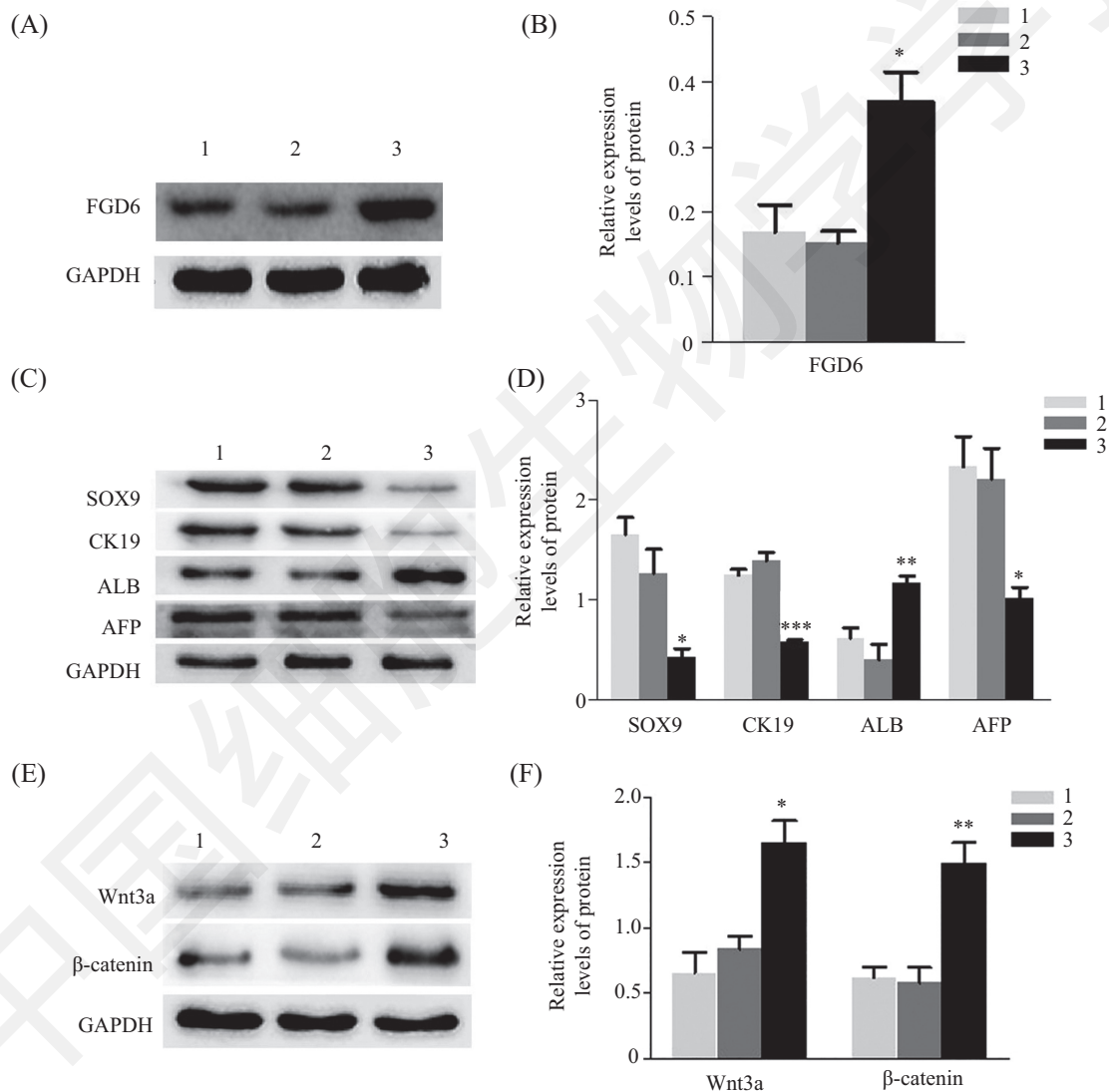
Fig.2 Changes in expression of various molecular markers in HP14.5 cells at mRNA level after being infected by adenovirus

平在实验组中较空载组明显上升($P<0.05$)(图3A和图3B)。相应的肝干细胞标志物AFP的蛋白表达水平下降,肝细胞标志物ALB蛋白表达水平上升($P<0.01$),胆管内皮细胞标志物CK19、SOX9基因表达水平明显下调($P<0.05$)(图3C和图3D)。并且发现过表达FGD6后, β -catenin和wnt3a的表达也相应升高($P<0.05$)(图3E和图3F)。这表明,在HP14.5过表达FGD6蛋白后,HP14.5会向肝细胞方向分化,且可能会通过Wnt经典信号通路在蛋白水平上影响肝干细

胞的分化,并促使其向肝细胞分化。

2.6 糖原染色结果

腺病毒感染肝干细胞后第6天,经PAS染色,可见Ad-FGD6组和DMSO组中大量细胞的细胞质被染成紫红色,呈阳性反应,表明Ad-FGD6组中的细胞与阳性对照组(DMSO组)的结果相同,都具有合成糖原的功能。而Black control组及Ad-null组无明显变化,结果呈弱阳性或阴性反应(图4)。结果表明,HP14.5细胞过表达FGD6后,具有糖原合成的功能,而对照



A: 感染腺病毒后FGD6在蛋白表达水平的变化; B: 感染腺病毒后FGD6在蛋白表达水平的统计分析; C: 各分化指标在蛋白表达水平的变化; D: 各分化指标在蛋白表达水平的统计分析; E: Wnt/ β -catenin的指标在蛋白表达水平的变化; F: Wnt/ β -catenin的指标在蛋白表达水平的统计分析; 1: Black control组; 2: Ad-null组; 3: Ad-FGD6组; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$,与Black control组相比。

A: changes at protein expression levels of FGD6 after being infected by adenovirus; B: statistical analysis at protein expression levels of FGD6 after being infected by adenovirus; C: changes for the various differentiation indicators at protein expression levels; D: statistical analysis for the various differentiation indicators at protein expression levels; E: changes for Wnt/ β -catenin indicators at protein expression levels; F: statistical analysis for Wnt/ β -catenin indicators at protein expression levels. 1: Black control group; 2: Ad-null group; 3: Ad-FGD6 group; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ compared with Black control group.

图3 感染腺病毒后HP14.5细胞中各分子标志物在蛋白水平的表达的变化

Fig.3 Changes in expression of various molecular markers in HP14.5 cells at protein levels after being infected by adenovirus

组几乎无糖原合成功能。

2.7 CCK8检测结果

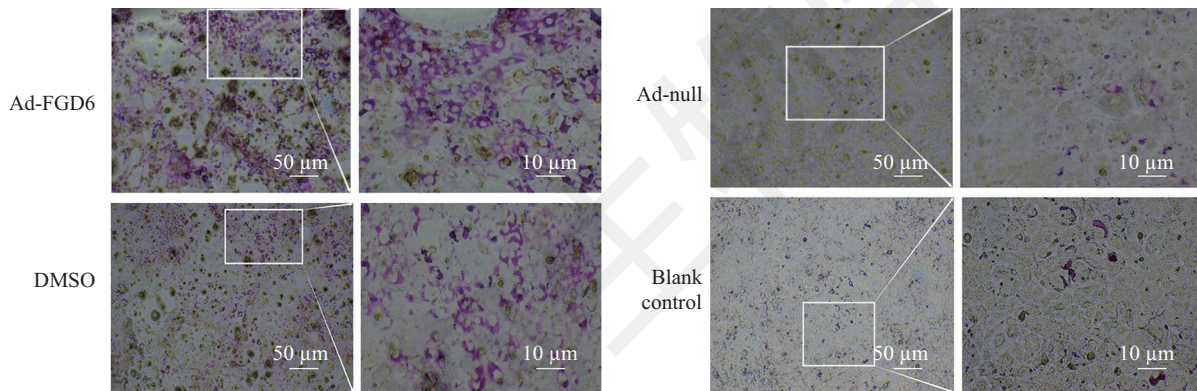
腺病毒感染细胞后,分别在24 h、48 h、72 h时检测各组细胞450 nm处的吸光度值(D),感染细胞24 h时,3组细胞的吸光度之间均无统计学差异($P>0.05$),在48 h和72 h时Ad-FGD6组细胞吸光度均明显低于Blank control组及Ad-null组($P<0.05$)(图5)。结果表明,过表达FGD6可促进HP14.5细胞的增殖。

3 讨论

肝细胞移植在终末期肝病的治疗中具有广阔的应用前景,但由于肝细胞在体外不能大量扩增并保持其原有特性,导致其发展受限。虽然,肝脏干细胞在体外具有长时间持续增殖的能力,能在体外通

过扩增获得足够数量肝干细胞,但目前能促使其安全有效、稳定分化为成熟肝细胞的诱导剂较少。

肝干细胞分化是一个复杂的变化过程。参与肝干细胞分化的细胞因子包括干细胞因子及其受体肥大/干细胞生长因子受体(c-kit proto-oncogene protein, c-kit)、干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)及白细胞介素6(interleukin 6, IL-6)等。参与肝干细胞分化的信号通路包括经典Wnt信号通路、非经典Wnt信号通路、Notch信号通路以及维A酸信号通路等。肝干细胞在不同分化阶段表达的特异蛋白质不同,AFP是反映小鼠胚胎分化的良好指标之一,ALB是反映肝干细胞向成熟肝细胞分化的良好指标之一,即成熟的肝细胞高表达ALB。目前,CK19与SOX9被认为是

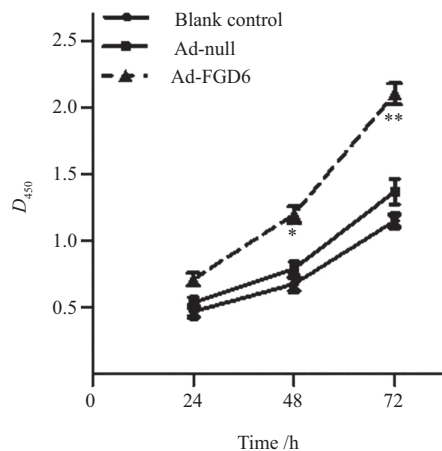


紫红色表示阳性反应,白色箭头表示紫红色区域。

Purplish-red color represents a positive reaction, and the white arrow indicates the purplish-red region.

图4 显微镜下肝干细胞被腺病毒感染后第6天的PAS染色

Fig.4 The PAS staining results of liver stem cells after being infected by adenovirus under the observation of microscope



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 与Blank control组比较。

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with Blank control group.

图5 CCK8检测细胞的增殖

Fig.5 Cell proliferation detected by CCK8

胆管内皮细胞表达的标志物^[12]。此外,成熟的肝细胞有合成糖原的功能,而肝干细胞没有合成糖原的功能。通过以上的方法检测可以初步判定细胞的分化阶段。本文选用第三代腺病毒载体,通过分子克隆将*FGD6*基因克隆至腺病毒载体中,获取高滴度的重组腺病毒。由于*FGD6*为重组腺病毒载体介导,该基因不会被整合到宿主细胞HP14.5的基因组中,因此*FGD6*促进肝细胞的增生分化作用不会长期存在,这保证了肝干细胞的生物学性状稳定,避免了肝干细胞因无限增生而形成肿瘤的可能,进而增加实验的严谨性。

*FGD6*基因位于人类染色体12q22区域,含有一个FYVE-type锌指结构、两个PH(pleckstrin homology)结构域及一个DH(Dbl homology)结构域^[6]。与*FGD1*相似,该基因编码的GEFs同样可以促进*cdc42*中GTP对GDP的替换,从而激活*cdc42*^[13]。*cdc42*信号与多功能造血干细胞的增殖、凋亡、黏附及定向迁移相关^[14]。有相关报道指出,*cdc42*缺陷的干细胞具有细胞分裂缺陷及分化能力降低的特点^[15]。综上所述表明,*FGD6*与干细胞分化存在一定相关性,但目前将*FGD6*用于肝干细胞分化调控的研究鲜有报道。本研究发现,随着上调*FGD6*表达,相应肝干细胞和胆管内皮细胞标志物表达降低,而成熟肝细胞标志物表达上升,表明过表达*FGD6*能促进肝干细胞向成熟的肝细胞方向分化,抑制向胆管内皮细胞方向分化。PAS染色阳性再次证明,过表达*FGD6*后HP14.5有肝细胞糖原合成的功能,这与视黄酸诱导小鼠胎肝来源的肝干细胞的分化结果相似^[16-17]。

Wnt经典通路又称为Wnt/ β -catenin通路,是控制多种干细胞向肝细胞分化的主要通路,可以调控干细胞增殖^[18]。Hu等^[19]在特异性敲除 β -catenin小鼠中分离出肝干细胞,在*wnt3a*培养条件下, β -catenin大量聚集于胞质,并转位入胞核结合T细胞因子/淋巴增强因子,激活下游靶基因的转录,使细胞进入增殖周期,表明 β -catenin信号在肝干细胞的增殖中也发挥着重要的作用。同时研究发现,Wnt拮抗剂SFRP3抑制小鼠肝干细胞HP14.5分化^[20]。此外,研究表明,*Lgr5*⁺肝干细胞的可以通过激活Wnt经典信号通路的从而促进细胞的增殖^[21],*Lgr5*同样也能通过激活Wnt/ β -catenin信号通路的从而促进猪上皮细胞的增殖^[22]。本研究发现,上调*FGD6*不仅使Wnt经典信号通路的标志物(*wnt3a*、 β -catenin)显著升高,还能促进细胞增殖,表明该细胞分化增殖过程极有可能参与Wnt经典信号通

路,实现肝干细胞向肝细胞分化并促进其增殖,此外,该过程可能与*Lgr5*也有紧密的相关性,但需要进一步开展实验来验证推断。

本研究的结果与之前本课题组敲低*FGD6*的表达可以促进肝干细胞向肝细胞方向分化的结论相似^[23]。一些基因的过表达或低表达都会造成胚胎发育及细胞分化等的异常,基因在众多刺激的作用下严格按照时空性顺序表达,这种有条不紊的程序可能会被环境中的某些因素所打乱而使整项工程出现基因层面的失衡,进而表现为形态学层面的异常。在发育早期的内皮细胞中,*EphrinB2*无论过表达还是敲低均可导致明显的血管形成缺陷,并导致孕中期胚胎死亡,可见*EphrinB2*水平的稳态对促进新生血管芽生和调节血管重塑、稳定血管结构具有重要的作用^[24-25]。同时长链非编码*H19*基因在BMP9刺激MSCs的早期阶段急剧上调,随后迅速下降并逐渐恢复到基础水平,若单独对MSCs中的*H19*过表达或沉默均将损害BMP9诱导的体内外的成骨过程。这一结果表明,良好协调的lncRNA *H19*的双向表达可能是BMP9诱导的MSCs成骨分化所必需的,而*H19*表达失调可能损害正常的成骨,从而导致致病过程,如骨肿瘤发生发展^[2]。由此可见,同一种基因是存在无论过表达或敲低均促使某种结果朝一致方向的发展的现象,动态的平衡保证了其重要功能。这表明,*FGD6*同样可能对肝干细胞的干性的维持起着重要的作用,过高或者过低都有可能引起肝干细胞的分化。

综上所述,*FGD6*平衡的紊乱能促进肝干细胞向成熟的肝细胞分化。过表达*FGD6*除了促进肝细胞的分化还能促进细胞增殖,并且该过程有可能参与Wnt经典信号通路。因此,可以将*FGD6*作为一种新的肝干细胞分化调控的靶点,为肝细胞移植治疗提供了新思路。本研究上存在些许不足,比如在细胞分化、通路等方面仅存在现象的观察,在下一步的工作中,本课题组将从细胞分化后细胞形态学、组织形态学、细胞功能改变及动物实验等多方面进行深入研究,并进一步探索*FGD6*的作用。

参考文献 (References)

- 1 Iansante V, Mitry RR, Filippi C, Fitzpatrick E, Dhawan A. Human hepatocyte transplantation for liver disease: current status and future perspectives. *Pediatr Res* 2018; 83(1/2): 232-40.
- 2 Liao J, Yu X, Hu X, Fan J, Wang J, Zhang Z, et al. lncRNA *H19*

- mediates BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) through Notch signaling. *Oncotarget* 2017; 8(32): 53581-601.
- 3 Wilson JW, Leduc EH. Role of cholangioles in restoration of the liver of the mouse after dietary injury. *J Pathol Bacteriol* 1958; 76(2): 441-9.
- 4 Bi Y, He Y, Huang J, Su Y, Zhu GH, Wang Y, *et al.* Functional characteristics of reversibly immortalized hepatic progenitor cells derived from mouse embryonic liver. *Cell Physiol Biochem* 2014; 34(4): 1318-38.
- 5 Kondo D, Shinoda K, Yamashita KI, Yamasaki R, Hashiguchi A, Takashima H, *et al.* A novel mutation in FGD4 causes charcot-marie-tooth disease type 4H with cranial nerve involvement. *Neuromuscul Disord* 2017; 27(10): 959-61.
- 6 Huang L, Zhang H, Cheng CY, Wen F, Tam PO, Zhao P, *et al.* A missense variant in FGD6 confers increased risk of polypoidal choroidal vasculopathy. *Nat Genet* 2016; 48(6): 640-7.
- 7 Gao L, Gorski JL, Chen CS. The Cdc42 guanine nucleotide exchange factor FGD1 regulates osteogenesis in human mesenchymal stem cells. *Am J Pathol* 2011; 178(3): 969-74.
- 8 Sun Y, Willis S, Lin X, Achua J, Williams C, Leylandjones B. Abstract 3926: is Fgd3 a potentially prognostic marker for breast cancer. *Cancer Res* 2017; 77(13 Supplement): 3926.
- 9 Gazit R, Mandal PK, Ebina W, Ben-Zvi A, Nombela-Arrieta C, Silberstein LE, *et al.* Fgd5 identifies hematopoietic stem cells in the murine bone marrow. *J Exp Med* 2014; 211(7): 1315-31.
- 10 Huber C, Mårtensson A, Bokoch GM, Nemazee D, Gavin AL. FGD2, a CDC42-specific exchange factor expressed by antigen-presenting cells, localizes to early endosomes and active membrane ruffles. *J Biol Chem* 2008; 283(49): 34002-12.
- 11 Jager L, Hausl MA, Rauschhuber C, Wolf NM, Kay MA, Ehrhardt A. A rapid protocol for construction and production of high-capacity adenoviral vectors. *Nat Protoc* 2009; 4(4): 547-64.
- 12 Ogawa M, Ogawa S, Bear CE, Ahmadi S, Chin S, Li B, *et al.* Directed differentiation of cholangiocytes from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2015; 33(8): 853-61.
- 13 张煜, 魏然, 黄萍, 贾茜雅, 熊丽霞. Cdc42作为功能性因子调控纤维化. *中国细胞生物学学报*(Zhang Yu, Wei Ran, Huang Ping, Jia Xiya, Xiong Lixia. Cdc42 as a functional meditation factor in fibrosis *Chinese Journal of Cell Biology*) 2017; (3): 348-55.
- 14 Wang L, Yang L, Filippi MD, Williams DA, Zheng Y. Genetic deletion of Cdc42GAP reveals a role of Cdc42 in erythropoiesis and hematopoietic stem/progenitor cell survival, adhesion, and engraftment. *Blood* 2006; 107(1): 98-105.
- 15 Sakamori R, Das S, Yu S, Feng S, Stypulkowski E, Guan Y, *et al.* Cdc42 and Rab8a are critical for intestinal stem cell division, survival, and differentiation in mice. *J Clin Invest* 2012; 122(3): 1052-65.
- 16 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.
- 17 He Y, Cui J, He T, Bi Y. 5-azacytidine promotes terminal differentiation of hepatic progenitor cells. *Mol Med Rep* 2015; 12(2): 2872-8.
- 18 Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities. *Cell* 2017; 169(6): 985-99.
- 19 Hu M, Kurobe M, Jeong YJ, Fuerer C, Ghole S, Nusse R, *et al.* Wnt/ β -catenin signaling in murine hepatic transit amplifying progenitor cells. *Gastroenterology* 2007; 133(5): 1579-91.
- 20 Bi Y, Huang J, He Y, Zhu GH, Su Y, He BC, *et al.* Wnt antagonist SFRP3 inhibits the differentiation of mouse hepatic progenitor cells. *J Cell Biochem* 2009; 108(1): 295-303.
- 21 Huch M, Dorrell C, Boj SF, Van Es JH, Li VS, Van de Wetering M, *et al.* *In vitro* expansion of single Lgr5⁺ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 2013; 494(7436): 247-50.
- 22 Li XG, Wang Z, Chen RQ, Fu HL, Gao CQ, Yan HC, *et al.* LGR5 and BMI1 increase pig intestinal epithelial cell proliferation by stimulating WNT/ β -catenin signaling. *Int J Mol Sci* 2018; 19(4): 1036.
- 23 薛倩, 杨金凤, 李冰, 何通川, 张秉强. Faciogenital dysplasia6基因对肝干细胞分化的调控作用. *中华肝脏病杂志* (Xue Qian, Yang Jinfeng, Li Bing, He Tongchuan, Zhang Bingqiang. Regulatory effect of faciogenital dysplasia 6 gene on hepatic stem cell differentiation. *Chinese Journal of Hepatology*) 2017, 25(4): 268-72.
- 24 Wang Y, Nakayama M, Pitulescu ME, Schmidt TS, Bochenek ML, Sakakibara A, *et al.* Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature* 2010; 465(7297): 483-6.
- 25 Foo SS, Turner CJ, Adams S, Compagni A, Aubyn D, Kogata N, *et al.* Ephrin-B2 controls cell motility and adhesion during blood-vessel-wall assembly. *Cell* 2006; 124(1): 161-73.