

研究论文

脂多糖诱导血管内皮细胞分泌的细胞外基质调节人肝实质细胞紧密连接蛋白表达的研究

李卫红¹ 马悦佼² 贺旭¹ 王梓祎² 郭昕悦² 张海燕^{2*}¹首都医科大学基础医学院基础医学国家级实验教学中心, 北京 100069;²首都医科大学基础医学院细胞生物学系, 北京 100069)

摘要 该文分析脂多糖诱导人血管内皮细胞去分化促进细胞外基质分泌增加, 调节人肝实质细胞紧密连接蛋白表达的作用。利用脂多糖诱导体外培养人脐静脉内皮细胞72 h后, 分析内皮细胞特征以及分泌的细胞外基质成分表达及超微结构变化; 将人肝实质细胞接种于脂多糖或对照处理的内皮细胞分泌的基质上培养72 h后, 分析肝实质细胞中紧密连接蛋白、整合素及DNA甲基化及羟甲基化的变化。结果表明, 脂多糖诱导人脐带静脉内皮细胞去分化, 以及分泌的细胞外基质成分组成及结构发生变化; 脂多糖诱导内皮细胞分泌的基质下调人肝实质细胞中紧密连接蛋白Claudin 1和整合素 $\alpha 5$ 蛋白及DNA羟甲基化的水平。研究表明, 受损血管内皮细胞分泌的细胞外基质抑制人肝实质细胞紧密连接蛋白Claudin 1的表达。

关键词 血管内皮细胞; 细胞外基质; 去分化; 肝实质细胞; 紧密连接

Research on the Endothelial Cell-Derived Matrix Induced by Lipopolysaccharide Regulates the Tight Junction Protein Expression in Human Hepatocytes

LI Weihong¹, MA Yuejiao², HE Xu¹, WANG Ziyi², GUO Xinyue², ZHANG Haiyan^{2*}

(¹Experimental Center for Basic Medical Teaching, School of Basic Medical Science, Capital Medical University, Beijing 100069, China; ²Department of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract This study was to analyze the dedifferentiation of human vascular ECs (endothelial cells) and the increased extracellular matrix secretion induced by LPS (lipopolysaccharide). The regulated effect and mechanism of the EC matrix (endothelial cell-derived extracellular matrix) induced by LPS on the expression of tight junction protein in human hepatocytes were study. The characteristics of endothelial cells, the components and ultrastructural changes of EC matrix were analyzed in human umbilical vein endothelial cells treated with control or LPS for 72 h. The changes of tight junction protein, integrin and DNA methylation and hydroxymethylation in human hepatocytes were analyzed after 72 h of culture on the control-EC matrix or

收稿日期: 2024-01-12 接受日期: 2024-04-15

国家自然科学基金(批准号: 81770616)资助的课题

*通信作者。Tel: 010-83950409, E-mail: culture@ccmu.edu.cn

Received: January 12, 2024

Accepted: April 15, 2024

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81770616)

*Corresponding author. Tel: +86-10-83950409, E-mail: culture@ccmu.edu.cn

LPS-EC matrix. LPS induced the dedifferentiation of human umbilical vein endothelial cells, and promoted the change of the composition and structure of extracellular matrix secreted by endothelial cells. LPS-EC matrix down-regulated the protein levels of Claudin 1 and integrin $\alpha 5$ proteins and DNA hydroxymethylation in human hepatocytes. This study indicated that the injury of vascular endothelial cell affected the tight junction protein in human hepatocytes.

Keywords vascular endothelial cells; extracellular matrix; dedifferentiation; hepatocytes; tight junction

肝实质细胞的成熟分化与功能获得依赖其独特微环境中信号分子的精确调控^[1]。血管内皮细胞分泌的信号分子及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)是肝脏微环境的重要组成部分^[2]。研究表明,血管内皮细胞可分泌包括胶原、蛋白聚糖、弹性蛋白、纤粘连蛋白、层粘连蛋白(fibronectin, FN)和许多其他糖蛋白组成的细胞外基质^[3-5]。利用交联技术可将体外培养细胞分泌的ECM固化于特定基质上,经碱处理的方法将细胞去除后,可获得细胞来源的基质(cell derived matrix)。细胞来源的基质与体内ECM在许多方面非常相似,如组成成分均为纤维蛋白及糖类分子,均可形成交织的、高度组织的纤维网络结构,具有一定的机械弹性。细胞来源的基质在某些方面能够模拟内源性细胞外基质的成分和结构^[6-7]。

我们前期研究表明,人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)分泌的细胞外基质能促进人肝实质细胞药物代谢功能的成熟^[8]。但是,当机体发生感染后,如感染中毒性休克,脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)会随着细菌的感染进入机体血液。脂多糖是革兰氏阴性菌细胞壁外膜上的一种脂质和多糖的复合物,脂多糖可引起内皮细胞的去分化或损伤,增加炎症因子的表达及分泌^[9-10]。但去分化内皮细胞分泌的细胞外基质对于肝实质细胞的影响尚不清楚。

肝实质细胞紧密连接(tight junctions, TJs)是肝实质细胞功能成熟的结构基础^[11]。Claudins是组成肝实质细胞紧密连接复合体的关键蛋白。Claudins与细胞内支架蛋白ZO-1结合,继而与纤维样肌动蛋白(F-actin)等细胞骨架蛋白相结合^[11-12],参与调节细胞旁屏障的离子和水渗透性,对于肝实质细胞极性的维持至关重要^[11]。在已发现的哺乳动物27个Claudins家族成员中, Claudin 1在肝脏组织中的表达最为丰富^[12]。本研究旨在探究脂多糖诱导内皮细胞分泌的细胞外基质对于肝实质细胞 Claudin 1表达的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

内皮细胞专用培养基购自德国 Promocell 公司;青霉素、链霉素、胰蛋白酶购自美国 Hyclone 公司;明胶、II型胶原酶、戊二醛、乙醇胺购自美国 Sigma-Aldrich 公司;小鼠抗人 ZO-1 单克隆抗体(稀释比例 1:400)、兔抗 Claudin 1 多克隆抗体(稀释比例 1:400)购自美国 Invitrogen 公司;兔抗整合素 $\alpha 5$ (Integrin $\alpha 5$, ITGA5)单克隆抗体(稀释比例 1:500)、兔抗 5hmC 单克隆抗体(稀释比例 1:500)、兔抗 5mC 单克隆抗体(稀释比例 1:1000)购自美国 Abcam 公司;兔抗人 β -catenin 单克隆抗体(稀释比例 1:400)、Alexa Fluor[®] 488 标记羊抗兔 IgG 及 Alexa Fluor[®] 488 标记羊抗小鼠 IgG 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;小鼠抗人纤粘连蛋白(fibronectin, FN)单克隆抗体(工作液)、兔抗人 I 型胶原(collagen I, COLL I)多克隆抗体(工作液)、鼠抗人 IV 型胶原(collagen IV, COLL IV)多克隆抗体(工作液)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;细胞核染料 4',6'-二氨基-2'-苯基吲哚(4',6'-2 amino-2'-phenyl indole, DAPI)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;反转录试剂盒、实时定量 RT-PCR 试剂盒、荧光定量 96 孔 PCR 板、光学贴膜(ABI)购自美国 ThermoFisher Scientific 公司;RNA 提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司;薄壁管、Tips 购自美国 Axygen 公司;直径 100 mm 细胞培养皿购自美国 BD 公司;恒温二氧化碳培养箱(Galaxy)购自英国 RS Biotech 公司;分光光度计(ND-1000)购自美国 Nanodrop 公司;GeneAmp PCR System 2400 PCR 仪、7300 Real-Time PCR 仪购自新加坡 ABI 公司;倒置荧光显微镜(Olympus DP72)购自日本 Olympus 公司;正置荧光显微镜(Zeiss Imager A2)购自德国 Zeiss 公司;高分辨发射扫描显微镜(S-4800)购自日本 Hitachi 公司。

1.2 人脐带静脉内皮细胞的原代分离及传代培养

在无菌超净台内将脐带(已取得知情同意,且相关实验经首都医科大学医学伦理委员会批准,编号为

2017SY10)取出,将整个脐带用含100 U/mL青霉素及100 μ g/mL链霉素的PBS清洗,去除表面血迹;用10 mL注射器从脐静脉注入含100 U/mL青霉素及100 μ g/mL链霉素的无菌PBS,反复冲洗脐静脉,至无血块;将脐带一端用止血钳夹住,用10 mL注射器从脐静脉注入0.1 mg/mL II型胶原酶,直至将脐静脉血管充满,无菌钳夹住脐带顶端,放在无菌玻璃平皿中,置于37 °C恒温培养箱中孵育15~20 min。自37 °C恒温培养箱中取出玻璃平皿,将脐带悬空,置于50 mL离心管上方,松开下侧无菌钳,使消化液流入50 mL离心管中,用手轻轻揉搓脐带,至消化液全部流出。用10 mL注射器注入含100 U/mL青霉素及100 μ g/mL链霉素的PBS冲洗脐静脉2次,收集洗液至50 mL离心管中。将50 mL离心管放入离心机,4 °C条件下2 000 r/min离心5 min。弃去上清液,用无菌PBS重悬,4 °C条件下1 000 r/min离心5 min,重复2次。弃去上清,内皮细胞培养基重悬细胞后,将其接种在0.2%明胶包被的培养皿中,并置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养。

1.3 去细胞基质的制备及表面特征鉴定

将圆形玻璃盖玻片放于24孔板中,每孔加入400 μ L 0.2%明胶,37 °C包被60 min;弃上清,用PBS洗1次,每孔加入350 μ L 1%戊二醛,室温避光孵育30 min;弃上清,用PBS洗1次,每孔加入350 μ L 1 mol/L乙醇胺,室温孵育30 min;弃上清,用PBS洗2次,放入37 °C温箱备用。将对数期的HUVECs(第2~4代)按照每孔 0.8×10^4 个细胞的浓度接种至上述处理后的载玻片;37 °C、5% CO₂培养至85%~90%汇合时,弃去旧培养基,用PBS浸洗细胞;分为对照组和实验组,分别加入新的内皮细胞培养基和用培养基稀释过的各浓度LPS,37 °C、5% CO₂培养72 h;弃去旧液,用PBS洗1次,加入500 μ L去细胞液(各成分体积比为99.663 mL PBS、0.067 mL 15 mol/L氨水、0.3 mL Triton X-100),37 °C孵育10 min。弃旧液,用PBS洗3次,4 °C存放备用。去细胞基质经PBS洗3次,每孔加入1 mL 2.5%戊二醛,4 °C固定2 h,再进行扫描电镜样品制备及观察。

1.4 人脂肪干细胞培养及定向诱导肝实质细胞分化

人脂肪干细胞(human adipose stem cells, hASCs)由本实验室建立^[13],将hASCs培养于含有10%胎牛血清,100 U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素的DMEM/F12培养基中,置于37 °C、5% CO₂及饱和

湿度的培养箱中培养。参照本实验室建立的三阶段诱导程序体外诱导人脂肪干细胞获得肝实质样细胞(hASCs derived hepatocyte-like cells, hASC-HLCs)^[13]。

1.5 实时定量RT-PCR检测细胞内各基因的mRNA水平

利用RNeasy Mini Kit试剂盒,按照说明书提取上述各组细胞总RNA。利用Superscript III逆转录试剂盒,按照说明书的步骤将RNA逆转录成cDNA。实时定量RT-PCR检测各基因mRNA表达水平。使用Primer Premier 5软件设计引物,引物由北京奥科生物技术有限责任公司合成。PCR引物序列见表1。

1.6 免疫细胞化学检测细胞内蛋白的表达

各组细胞及去细胞基质经多聚甲醛室温固定20 min后,用PBS浸洗3次,每次500 μ L,浸洗5 min,然后存放于4 °C。进行免疫细胞化学染色时,每孔加入500 μ L 0.3% Triton X-100室温孵育5 min后PBS浸洗3次,每孔加入300 μ L封闭用羊血清工作液,室温孵育60 min,吸弃封闭液。分别加入上述一抗,4 °C孵育过夜。吸弃旧液,用PBS浸洗3次,每次500 μ L,浸洗5 min,分别避光加入400 μ L Alexa Fluor 488标记羊抗小鼠抗体(1:500倍稀释)、Alexa Fluor 488标记羊抗兔抗体(1:500倍稀释),37 °C避光孵育30 min。吸弃旧液,用PBS浸洗细胞3次,每次500 μ L,浸洗5 min。吸弃旧液,24孔板中每孔加入400 μ L DAPI工作液,室温避光孵育10 min复染细胞核。吸弃DAPI工作液,用PBS浸洗3次,每次500 μ L,浸洗5 min,利用封片剂进行封片。TCS SP8激光共聚焦显微镜下观察,应用MicroSystem LAS AF-TCS SP8图像软件拍摄照片。

1.7 蛋白印迹及半定量分析

分别收集不同培养条件下细胞的总蛋白质,BCA定量后,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转印,抗体孵育及检测,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)的表达作为内参,分析靶蛋白表达的变化。ImageJ计算目的条带和内参GAPDH单位面积内光密度值,目的蛋白光密度值/GAPDH光密度值得到目的蛋白相对含量。实验重复3次。

1.8 统计学分析

所有实验重复3次,数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS 16.0统计软件对实验结果进行分析,

表1 本研究使用的PCR引物表
Table 1 List of PCR primers used in this study

mRNA编号 mRNA accession number	基因名 Name	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')
NM_000088.4	<i>COL1A1</i>	F: TTG TGC GAT GAC GTG ATC TGT G R: TTG GTC GGT GGG TGA CTC TG
NM_000090.4	<i>COL3A1</i>	F: TCG CTC TGC TTC ATC CCA CT R: TCC GCA TAG GAC TGA CCA AGA T
NM_001303110.2	<i>COL4A1</i>	F: CCG CTG CCA AGT CTG TAT GA R: GAG GTC AAT GAA GCA GGG TG
NM_004360.5	<i>CDH1</i>	F: GCT TCC CTC TTT CAT CTC CT R: TCA TAG TTC CGC TCT GTC TTT
NM_001306129.1	<i>FN1</i>	F: AAA CTT GCA TCT GGA GGC AAA CCC R: AGC TCT GAT CAG CAT GGA CCA CTT
NM_000600.5	<i>IL6</i>	F: GGC TCT TCG GCA AAT GTA GC R: TGC CCA GTG GAC AGG TTT CT
NM_002205.4	<i>ITGA5</i>	F: TGT GAC TAC TTT GCC GTG AAC C R: CGG AGA TGA GGG ACT GTA AAC C
NM_001205254.2	<i>OCLN</i>	F: ACA AGC GGT TTT ATC CAG AGT C R: GTC ATC CAC AGG CGA AGT TAA T
NM_000594.4	<i>TNF</i>	F: CGA GTG ACA AGC CTG TAG CC R: TGA AGA GGA CCT GGG AGT AGA T
NM_001317964.1	18S	F: CAC CCA AGA ACA GGG TTT GT R: TGG CCA TGG GTA TGT TGT TA

两组间比较采用 student's *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA), *P*<0.05为显著性差异, 具有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS损伤HUVECs细胞间的连接

细胞间丰富的细胞连接是血管内皮细胞成熟分化的特征之一。我们首先比较 1 μg/mL LPS处理 HUVECs 72 h后细胞连接蛋白表达的变化。实时定量RT-PCR分析表明, LPS处理HUVECs 72 h后, 细胞中编码黏附连接蛋白E-cadherin的基因*CDH1*和编码紧密连接蛋白Occludin的基因*OCLN*的mRNA水平明显下降(图1A)。免疫细胞化学染色以及荧光半定量分析显示, LPS处理后细胞内与E-cadherin结合的β-catenin的表达水平明显降低; 与Occludin相结合的紧密连接相关蛋白ZO-1呈明显的点状分布(图1B)。扫描电子显微镜分析发现, 对照组细胞间连接丰富且细胞表面有绒毛, 细胞呈扁圆形; 经LPS处理后细胞间连接程度与表面绒毛数量明显减少, 细胞形态呈梭形(图1C)。这些结果表明, LPS抑制细胞间连接蛋白的表达, 减弱细胞间连接的特征。

2.2 LPS上调HUVECs中炎症因子的表达以及ECM的分泌

为探究LPS是否引起血管内皮细胞受损从而促进细胞分泌炎症因子及ECM的变化, 本文利用实时定量RT-PCR分析两组细胞中炎症因子和ECM组分表达的变化。结果表明, 与对照组相比, LPS处理组HUVECs中的炎症因子*IL6*和*TNF*的mRNA水平显著升高(图2A); ECM成分中编码纤粘连蛋白的基因*FN1*以及编码I型胶原的基因*COL1A1*和编码IV型胶原的基因*COL4A1*的mRNA水平也显著增加(图2B), 差异有统计学意义。

为了检测LPS处理是否可以增加血管内皮细胞分泌的细胞外基质(vascular endothelial cell-derived extracellular matrix)成分的变化, 利用去细胞基质的方法, 分别制备对照组及LPS处理组EC matrix(图3A)。首先利用免疫细胞化学染色比较两组EC matrix基质成分的变化。结果如图3B所示, LPS-EC matrix中COLL I和COLL IV的荧光强度显著增强, FN的纤维呈现明显增粗缠绕的形态改变。扫描电子显微镜进一步分析表明, 与对照组EC matrix相比, LPS-EC matrix组纤维密度和纤维

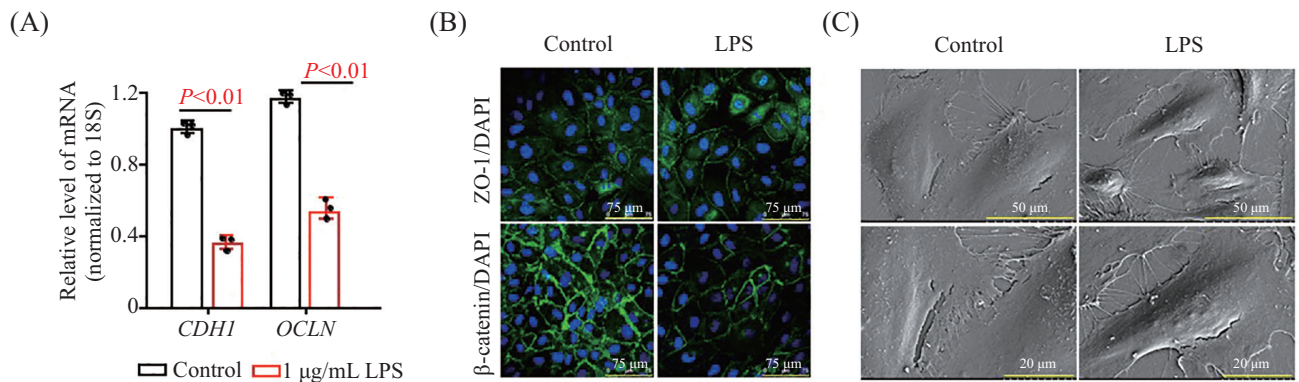
直径显著增加(图3C)。以上结果表明, LPS引起血管内皮细胞ECM分泌水平的增加。综合上述结果, 我们认为LPS可引起血管内皮细胞去分化; LPS-EC matrix可以部分模拟组织内血管受损伤时基质改变的微环境。

2.3 LPS处理组EC matrix下调了人肝实质细胞紧密连接蛋白Claudin 1的表达

考虑到肠道源性LPS在原发性硬化性胆管炎

(primary sclerosing cholangitis, PSC)发生过程中起关键作用^[14], 而在新生儿鱼鳞病和硬化性胆管炎(neo-natal ichthyosis-sclerosing cholangitis, NISCH)肝脏组织中发现, 肝实质细胞紧密连接蛋白Claudin 1表达减少与NISCH综合征肝脏病理中细胞旁胆汁渗漏有关^[15-16]。

我们前期研究表明, hASC-HLCs具有与成熟人肝实质细胞相似的结构和功能^[8,13,16-17]。为探究LPS-

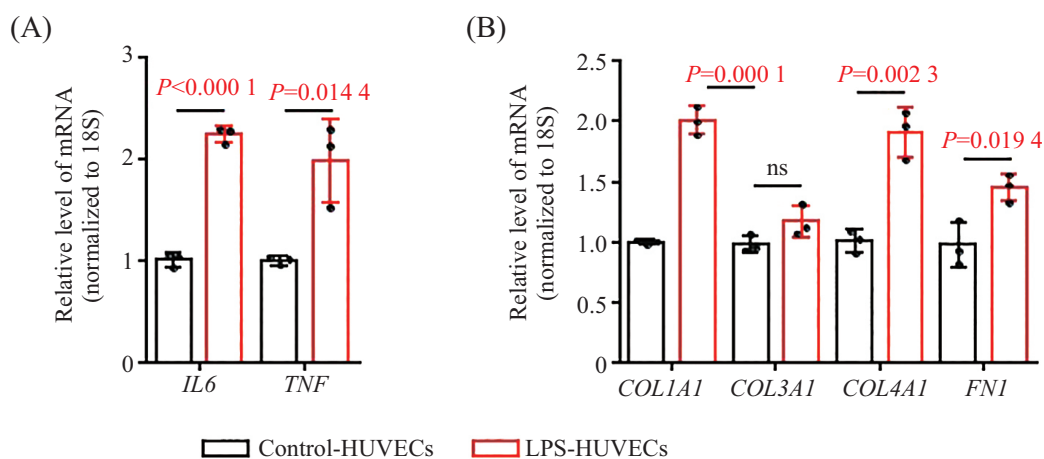


A: 实时定量RT-PCR分析正常培养与1 μg/mL LPS刺激72 h后HUVECs中细胞连接蛋白CDH1及OCLN的mRNA表达水平变化, $P < 0.01$ 。B: 免疫细胞化学染色分析HUVECs中蛋白ZO-1和β-catenin的表达水平。C: 扫描电子显微镜观察对照组与1 μg/mL LPS刺激72 h后HUVECs形态结构的变化。Control: 对照组; LPS: 脂多糖。

A: relative mRNA levels of *CDH1* and *OCLN* in 1 μg/mL LPS- and control-treated HUVECs were determined by quantitative RT-PCR, $P < 0.01$. B: the ZO-1 and β-catenin levels in LPS- and control-treated HUVECs were determined by immunofluorescence staining. C: the morphology of HUVECs in LPS- and control-treated groups was evaluated using scanning electron microscopy. Control: control group; LPS: lipopolysaccharide.

图1 LPS对HUVECs中连接相关蛋白表达的影响

Fig.1 Effects of LPS on the expression of junction related proteins in HUVECs

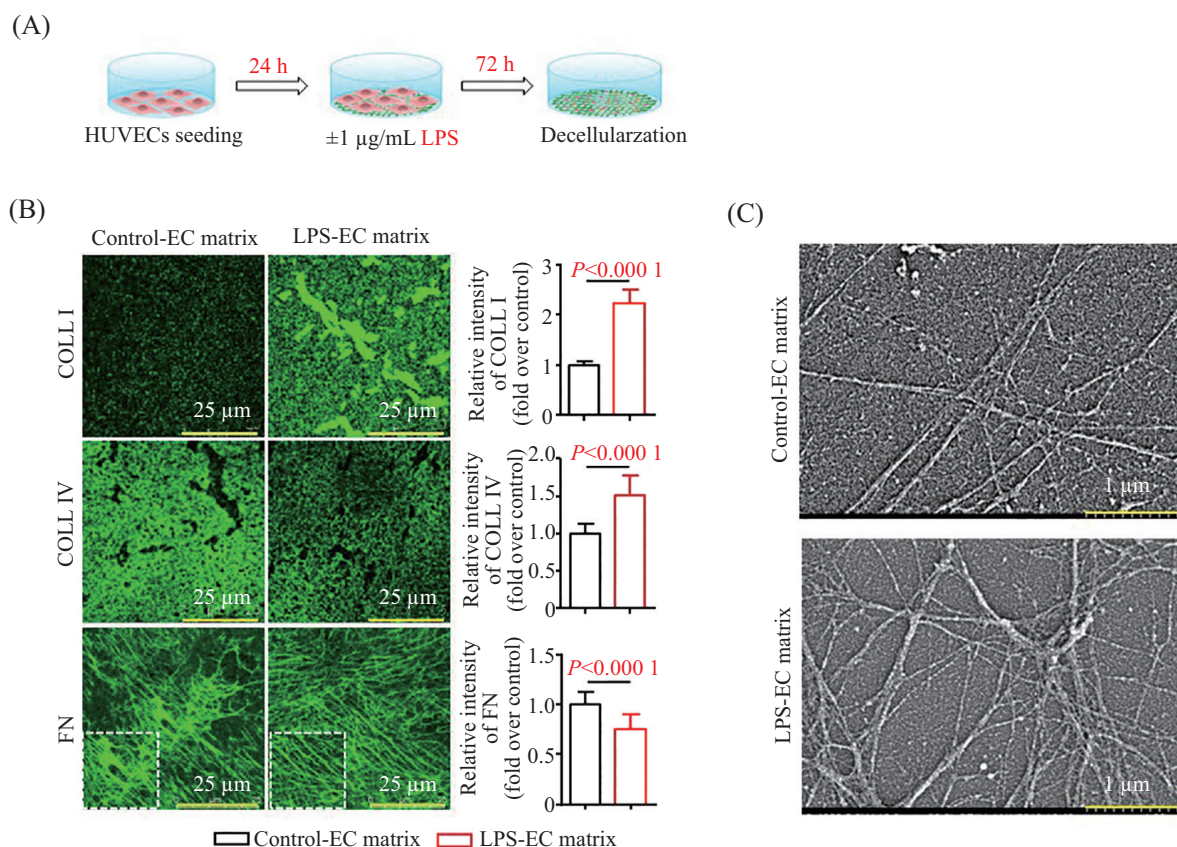


A: 实时定量RT-PCR分析IL6和TNF在LPS和对照处理的HUVECs中的mRNA水平。B: 实时定量RT-PCR分析在LPS和对照处理HUVECs中COL1A1、COL3A1、COL4A1和FN1的mRNA水平。ns: $P > 0.05$ 。

A: relative mRNA levels of *IL6* and *TNF* in LPS- and control-treated HUVECs were determined by quantitative RT-PCR. B: relative mRNA levels of *COL1A1*, *COL3A1*, *COL4A1* and *FN1* in LPS- and control-treated HUVECs were determined by quantitative RT-PCR. ns: $P > 0.05$.

图2 LPS上调HUVECs中炎症因子和ECM组分的mRNA水平

Fig.2 The mRNA levels of inflammatory factors and ECM components related genes in HUVECs were up-regulated by LPS



A: EC-matrix制备示意图。B: 免疫化学染色和ImageJ荧光半定量分析COLL I、COLL IV和FN在LPS处理和对照处理组的蛋白水平。C: 扫描电子显微镜分析LPS处理和对照处理组EC-matrix表面超微结构。

A: preparation diagram of EC-matrix. B: the COLL I, COLL IV and FN levels in control-EC matrix and LPS-EC matrix were determined by immunofluorescence staining, and the relative fluorescence intensity of COLL I, COLL IV and FN was analyzed using ImageJ software C: surface views of the EC-matrix in control- and LPS- treated groups were examined using scanning electron microscopy.

图3 LPS-EC matrix基质组分增加

Fig.3 The ECM components in LPS-EC matrix were increased

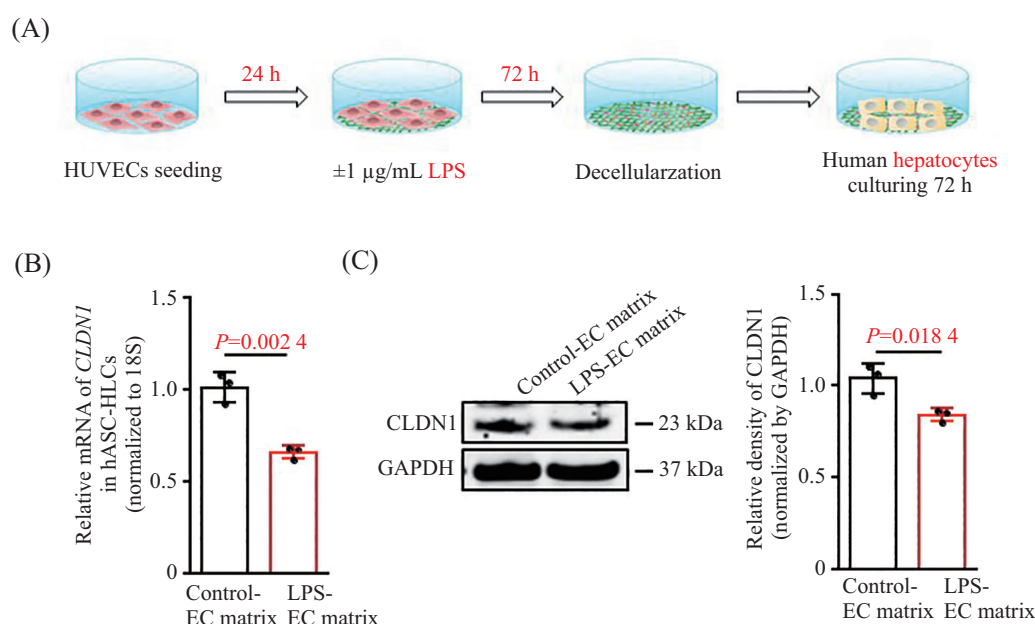
EC matrix是否对人肝实质细胞中Claudin 1表达产生影响, 将hASC-HLCs分别接种于LPS或对照处理的EC matrix上培养72 h后测定细胞中Claudin 1的表达变化(图4A)。实时定量RT-PCR结果表明, 与在对照EC matrix上培养的人肝实质细胞相比, 在LPS-EC matrix上培养的hASC-HLCs中*CLDN1*的mRNA水平显著降低, 差异有统计学意义(图4B)。蛋白质印迹结果表明, 在LPS处理的EC matrix上培养的hASC-HLCs中Claudin 1的蛋白水平也明显低于对照组(图4C)。

2.4 LPS-EC matrix调节人肝实质细胞整合素 $\alpha 5$ 表达及DNA羟甲基化水平

整合素 $\alpha 5$ (integrin $\alpha 5$, ITGA5)是介导细胞与ECM相互作用的关键^[17]。我们前期研究发现, 敲减人肝实质细胞中编码整合素 $\alpha 5$ 基因*ITGA5*的表达通

过调节DNA羟甲基化水平降低Claudin 1的表达水平^[15]。为探究LPS-EC matrix下调人肝实质细胞中Claudin 1的表达是否与整合素 $\alpha 5$ 表达及DNA羟甲基化及甲基化水平有关, 将hASC-HLCs分别接种在LPS或对照处理的EC matrix上培养72 h后, 测定细胞中整合素 $\alpha 5$ 表达及DNA羟甲基化及甲基化水平的变化。实时定量RT-PCR结果显示, 与对照组相比, 在LPS-EC matrix上培养72 h后hASC-HLCs中整合素 $\alpha 5$ 的mRNA水平显著降低(图5A)。免疫细胞化学染色及半定量分析表明, 在LPS-EC matrix上培养72 h后hASC-HLCs中整合素 $\alpha 5$ 的蛋白水平(图5B)及DNA羟甲基化水平显著降低(图5C), DNA甲基化水平明显增加(图5D)。

上述结果表明, LPS-EC matrix可能通过下调人肝实质细胞整合素 $\alpha 5$ 表达及DNA羟甲基化水平,



A: 人肝实质细胞接种于EC matrix的实验示意图; B: 实时定量RT-PCR分析hASC-HLCs培养在对照EC matrix和LPS处理的EC matrix上编码Claudin 1基因 $CLDN1$ 的mRNA水平; C: 蛋白质印迹和ImageJ测定分析Claudin 1在对照EC matrix和LPS-EC matrix上培养的hASC-HLCs中的蛋白水平。

A: experimental diagram of human hepatocytes cultured on EC matrix; B: relative mRNA levels of $CLDN1$ in hASC-HLCs cultured on control- and LPS-EC matrix were determined by quantitative RT-PCR; C: the protein levels of Claudin 1 in hASC-HLCs cultured on control- and LPS-EC matrix were determined by Western blot, and the relative fluorescence intensity of CLDN1 was analyzed using ImageJ software.

图4 LPS-EC matrix下调了人肝实质细胞中Claudin 1的表达

Fig.4 The expression of Claudin 1 in human hepatocytes was down-regulated upon cultured on LPS-EC matrix

进而抑制Claudin 1的表达。

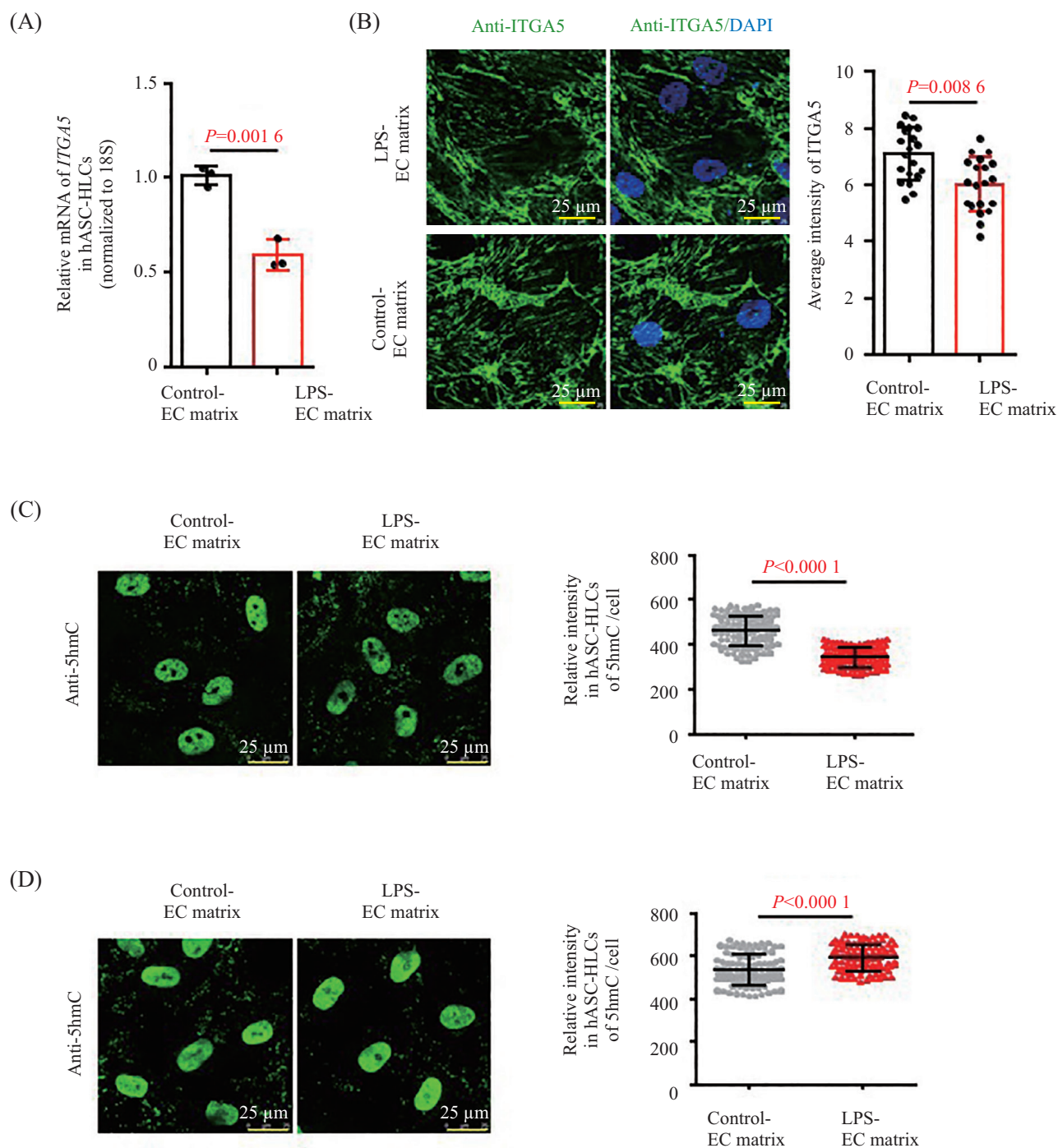
3 讨论

紧密连接作为肝实质细胞间主要的连接, 充当着相邻肝实质细胞间旁细胞扩散的守门人, 限制肝脏中血液和胆汁的混合, 为肝脏提供生理保护作用, 维持肝脏结构与功能的稳态。紧密连接蛋白在肝脏生理和病理发生中的作用十分广泛^[11]。肝实质细胞中Claudin 1的缺失或突变可导致胆管结构异常和肝极性受损, 进而引发去极化相关的肝损伤和胆汁淤积等肝脏疾病^[15]。

整合素作为ECM受体, 在调节上皮细胞紧密连接的组成和功能, 以及调控旁细胞通透性中发挥关键作用^[18]。我们的研究发现, 人胆汁淤积性肝硬化肝组织切片中, 胶原纤维沉积区域的肝实质细胞的整合素 $\alpha 5$ 、Claudin 1以及DNA羟甲基化水平显著减少。利用体外培养整合素 $\alpha 5$ 敲减人肝实质细胞以及特异性敲减肝实质细胞整合素 $\alpha 5$ 小鼠模型, 进一步研究证明, 整合素 $\alpha 5$ 通过SRC信号转导和十一转位酶1(ten-eleven translocation enzyme 1, TET1)介导

的DNA羟甲基化表观遗传调控依赖的方式在调节肝实质细胞Claudin 1的表达以及肝实质细胞极性维持中发挥关键作用^[16]。但是, 有关肝实质细胞中整合素 $\alpha 5$ 下调的机制尚不明确。

已知脂多糖是大多数革兰氏阴性细菌细胞壁的主要成分, 能诱发宿主细胞固有免疫反应, 在细菌的识别、黏附、转移、致病等过程中发挥非常重要的作用。血管内皮细胞作为细菌入侵组织的第一道屏障, 当其受到LPS损伤后通过特定的信号影响肝实质细胞。我们前期研究表明, 血管内皮细胞分泌的基质具有丰富的纤维连接蛋白FN、I型胶原蛋白和IV型胶原蛋白, 可激活整合素 $\alpha 5$ -SRC信号调节肝实质细胞代谢功能的成熟^[8]。本研究发现, LPS可诱导血管内皮细胞去分化, 上调炎症因子及ECM的表达。LPS刺激血管内皮细胞分泌的基质下调肝实质细胞中紧密连接蛋白Claudin 1的表达, 同时, 整合素 $\alpha 5$ 的表达和DNA羟甲基化水平也降低, 由此我们认为, LPS-EC matrix可能通过下调人肝实质细胞整合素 $\alpha 5$ 表达及DNA羟甲基化水平, 进而抑制Claudin 1的表达, 影响细胞间连接的形成。



A: 实时定量RT-PCR分析hASC-HLCs在对照EC matrix和LPS处理的EC matrix上培养72 h后 $ITGA5$ 的mRNA水平。B: 免疫细胞化学染色和ImageJ荧光半定量分析hASC-HLCs在对照EC matrix和LPS处理的EC matrix上培养72 h后 $ITGA5$ 蛋白水平。C: 免疫细胞化学染色和ImageJ荧光半定量分析DNA羟甲基化(5hmC)水平。D: 免疫细胞化学染色和ImageJ荧光半定量分析DNA甲基化(5mC)水平。

A: relative mRNA levels of *ITGA5* in hASC-HLCs cultured on control- and LPS-EC matrix for 72 h were determined by quantitative RT-PCR. B: the protein levels of *ITGA5* in hASC-HLCs cultured on control- and LPS-EC matrix for 72 h were determined by immunofluorescence staining, and the relative fluorescence intensity of *ITGA5* was analyzed using ImageJ software. C: the DNA hydroxymethylation (5hmC) level in hASC-HLCs cultured on control- and LPS-EC matrix for 72 h were determined by immunofluorescence staining, and the relative fluorescence intensity of DNA hydroxymethylation level was analyzed using ImageJ software. D: the DNA methylation (5mC) level in hASC-HLCs cultured on control- and LPS-EC matrix for 72 h were determined by immunofluorescence staining, and the relative fluorescence intensity of DNA methylation level was analyzed using ImageJ software.

图5 LPS-EC matrix下调人肝实质细胞中 $ITGA5$ 的表达及DNA羟甲基化水平

Fig.5 The expression of *ITGA5* and the DNA hydroxymethylation level in human hepatocytes was down-regulated upon cultured on LPS-EC matrix

由于ECM调控组织稳态和功能方面有着关键作用,ECM组分的沉积和重塑也被严格地调控。如果失去了这种调节,基质结构被破坏,这会导致细胞行为受损,从而导致组织功能和稳态的破坏^[19]。血管内皮细胞受损后通过改变其分泌基质的组分及结构直接影响与之相邻的细胞的结构与功能。本研究为肝脏基质沉积或Claudin 1表达异常所致肝实质细胞极性破坏型的肝脏疾病提供了新的治疗靶点。

参考文献 (References)

- [1] GORDILLO M, EVANS T, GOUON-EVANS V. Orchestrating liver development [J]. *Development*, 2015,142(12): 2094-108.
- [2] RAFII S, BUTLER J M, DING B S. Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells [J]. *Nature*, 2016, 529(7586): 316-25.
- [3] THEOCHARIS A D, SKANDALIS S S, GIALELI C, et al. Extracellular matrix structure [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 97: 4-27.
- [4] HALPER J, KJAER M. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 802: 31-47.
- [5] JENSEN S A, HANDFORD P A. New insights into the structure, assembly and biological roles of 10-12 nm connective tissue microfibrils from fibrillin-1 studies [J]. *Biochem J*, 2016, 473(7): 827-38.
- [6] ASSUNCAO M, DEGHAN-BANIANI D, YIU C H K, et al. Cell-derived extracellular matrix for tissue engineering and regenerative medicine [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 602009.
- [7] HOCH A I, MITTAL V, MITRA D, et al. Cell-secreted matrices perpetuate the bone-forming phenotype of differentiated mesenchymal stem cells [J]. *Biomaterials*, 2016, 74: 178-87.
- [8] GUO X, LI W, MA M, et al. Endothelial cell-derived matrix promotes the metabolic functional maturation of hepatocyte via integrin-Src signalling [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(11): 2809-22.
- [9] ECHEVERRÍA C, MONTORFANO I, SARMIENTO D, et al. Lipopolysaccharide induces a fibrotic-like phenotype in endothelial cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2013, 17(6): 800-14.
- [10] KIM I S, YANG E J, SHIN D H, et al. Effect of arazyme on the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human endothelial cells [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(2): 1025-9.
- [11] ZEISEL M B, DHAWAN P, BAUMERT T F. Tight junction proteins in gastrointestinal and liver disease [J]. *Gut*, 2019, 68(3): 547-61.
- [12] ROEHLEN N, ROCA SUAREZ A A, EL SAGHIRE H, et al. Tight junction proteins and the biology of hepatobiliary disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 825.
- [13] LI X, YUAN J, LI W, et al. Direct differentiation of homogeneous human adipose stem cells into functional hepatocytes by mimicking liver embryogenesis [J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229(6): 801-12.
- [14] HOV J R, KARLSEN T H. The microbiota and the gut-liver axis in primary sclerosing cholangitis [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2023, 20(3): 135-54.
- [15] GROSSE B, CASSIO D, YOUSEF N, et al. Claudin-1 involved in neonatal ichthyosis sclerosing cholangitis syndrome regulates hepatic paracellular permeability [J]. *Hepatology*, 2012, 55(4): 1249-59.
- [16] MA Y, ZHANG W, LI W, et al. alpha5 integrin regulates hepatic tight junctions through SRC-TET1-mediated DNA hydroxymethylation [J]. *iScience*, 2022, 25(12):105611.
- [17] YUAN J, LI W, HUANG J, et al. Transplantation of human adipose stem cell-derived hepatocyte-like cells with restricted localization to liver using acellular amniotic membrane [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 217.
- [18] SCHUMACHER S, DEDDEN D, NUNEZ R V, et al. Structural insights into integrin alpha5 beta1 opening by fibronectin ligand [J]. *Sci Adv*, 2021, 7(19): eabe9716.
- [19] TONTI O R, LARSON H, LIPP S N, et al. Tissue-specific parameters for the design of ECM-mimetic biomaterials [J]. *Acta Biomater*, 2021, 132: 83-102.