

肖志刚,郑丽,王梓瀛,等. 小鼠第 13.5 天胚肝细胞诱导 HepG2 细胞分化的作用机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 47-53.

Xiao ZG, Zheng L, Wang ZY, et al. The effect and mechanism of differentiation of HepG2 cells induced by mouse embryonic hepatocytes at day 13.5 of gestation [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 47-53.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.04.007

小鼠第 13.5 天胚肝细胞诱导 HepG2 细胞分化的作用机制

肖志刚¹, 郑丽^{1,3}, 王梓瀛¹, 刘昆¹, 王瑜², 齐锦生^{1*}, 栗彦宁²

(1.河北医科大学中西医结合学院,石家庄 050017;2.河北医科大学实验动物学部,石家庄 050017;

3.邢台医学高等专科学校,河北邢台 054000)

【摘要】 目的 探讨小鼠第 13.5 天胚肝细胞是否通过抑制 β -Catenin 诱导人肝细胞肝癌细胞株 HepG2 细胞分化及其作用机制。**方法** 用免疫荧光法检测肝细胞标记分子-白蛋白 (ALB) 的分布,以鉴定小鼠第 13.5 天胚肝细胞。小鼠第 13.5 天胚肝细胞与 HepG2 细胞株共培养 24 h、48 h 后,采用 qRT-PCR 方法检测 HepG2 细胞株中肝癌标记分子-甲胎蛋白 (AFP)、肝细胞分化调控因子-肝细胞核因子 4 α (HNF-4 α) 和成熟肝细胞标记分子-细胞色素 P450 家族成员 1B1 (CYP1B1) 和乙醇脱氢酶 1C (ADH1C) 的 mRNA 表达。共培养 48 h 后,观察 HepG2 细胞株形态变化,采用 Western blot 法检测 AFP、HNF-4 α 和 β -Catenin 的蛋白含量,免疫荧光法检测 β -Catenin 蛋白在细胞的分布。应用 β -Catenin 抑制剂处理后,观察 HepG2 细胞株形态变化并且检测 AFP 蛋白表达。**结果** 原代培养细胞 ALB 荧光显示阳性。与对照组相比,共培养后 HepG2 细胞株中,AFP 相对 mRNA 表达量在 24 h 和 48 h 均显著降低,HNF-4 α 、CYP1B1 和 ADH1C 的相对 mRNA 表达量在 24 h 和 48 h 均显著升高。与对照组相比,共培养 48 h 后,HepG2 细胞株生长明显抑制,细胞形态趋于正常肝细胞的六边形,AFP 和 HNF-4 α 蛋白表达明显升高。与对照组相比,共培养 48 h 后, β -Catenin 的蛋白含量明显降低,同时 HepG2 细胞株中 β -Catenin 的荧光明显减弱。与对照组相比, β -Catenin 抑制剂处理可明显改变 HepG2 细胞株形态,引起共培养组 HepG2 细胞株形态更剧烈的变化,显著抑制 AFP 的蛋白表达。**结论** 小鼠第 13.5 天胚肝细胞可能主要通过抑制 β -Catenin,诱导 HepG2 细胞株分化。

【关键词】 HepG2;细胞分化;胚肝细胞; β -Catenin;HNF-4 α

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0047-07

The effect and mechanism of differentiation of HepG2 cells induced by mouse embryonic hepatocytes at day 13.5 of gestation

XIAO Zhigang¹, ZHENG Li^{1,3}, WANG Ziyang¹, LIU Kun¹, WANG Yu², QI Jinsheng^{1*}, LI Yanning²

(1. College of Integrated Chinese and Western Medicine of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China.

2. Hebei Key Lab of Laboratory Animal Science of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017.

3. Xingtai Medical College, Xingtai 054000)

【Abstract】 Objective To explore the differentiation of HepG2 cells induced by mouse embryonic hepatocytes at day 13.5 of gestation through the inhibition of β -Catenin. **Methods** The distribution of hepatocyte marker molecule-albumin (ALB) was detected by immunofluorescence to identify the hepatocytes of mouse embryo on day 13.5. After HepG2 cells were co-cultured with embryonic hepatocytes at day 13.5 of gestation for 24 h and 48 h, the mRNA

【基金项目】 河北省自然科学基金 (H2020206328, H2020206386); 邢台市科技局自筹项目 (2018ZC133)。

【作者简介】 肖志刚 (1991—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中医药防治和逆转肿瘤细胞的分子机制研究。E-mail: 1345449822@qq.com

【通信作者】 齐锦生 (1960—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中医药防治和逆转肿瘤细胞的分子机制研究。

E-mail: qijinsheng777@163.com

expressions of *AFP* (biomarker of hepatocellular carcinoma), *HNF-4 α* (controller of hepatocyte differentiation), *CYP1B1* (biomarker of mature hepatocytes) and *ADHIC* (another biomarker of mature hepatocytes) were measured by reverse transcriptional quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). After HepG2 cells were co-cultured with day 13.5 of gestation embryonic hepatocytes for 48 h, the morphology was observed; AFP, HNF-4 α and β -catenin expressions were measured by Western blot and β -Catenin distribution was determined by immunofluorescence. Following treatment with the β -catenin inhibitor, morphology was observed and AFP content was measured. **Results** Most cells were ALB-positive. The relative mRNA expression of *AFP* decreased significantly after 24 h and 48 h co-culture, and *HNF-4 α* , *CYP1B1* and *ADHIC* increased significantly at 24 h and 48 h co-culture compared with the levels in the controls. The proliferation of HepG2 cells was suppressed and cell morphology tended to be hexagonal like normal hepatocytes; AFP protein content decreased and HNF-4 α protein content increased after co-culture with embryonic hepatocytes at day 13.5 of gestation for 48 h. Compared with the levels in the control, β -Catenin protein content decreased in the co-culture group and β -catenin was markedly attenuated in the co-cultured HepG2 cells in immunofluorescence result. Compared with the effects in the control group, β -catenin inhibitor treatment caused notable morphological changes of HepG2 cells and induced more dramatic morphological changes of HepG2 cells; furthermore, it reduced AFP protein content. **Conclusions** HepG2 cells may be induced to undergo differentiation by embryonic hepatocytes at day 13.5 of gestation mainly through the suppression of β -catenin.

【Keywords】 HepG2; cell differentiation; embryonic hepatocytes; β -Catenin; HNF-4 α

原发性肝癌是全球第四位的致死性癌症,我国肝癌发病人数占全球一半以上,其中,肝细胞来源的肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)约占 90%,是原发性肝癌中最常见的类型^[1]。目前,针对 HCC 治疗主要以手术切除为主,切除率低及复发率高等,严重影响了病人生存率,亟需治疗新思路^[2-3]。基于胚胎干细胞和肿瘤细胞有很多共同特性,例:可塑性、永生化、免疫逃逸等,齐锦生教授提出“同源同步诱导分化”理论,即肿瘤是发育受阻于某个阶段而无限增殖的“干细胞”或是“返祖细胞”,而胚胎发育过程包含了所有组织细胞的所有发展阶段,用相同组织来源、发育阶段匹配的胚胎干细胞可诱导相应肿瘤细胞分化,且根据越原始越相似的理论,这种诱导作用是不受种属限制的^[4-6]。在此理论指导下,本课题组前期研究证实小鼠第 13.5 天胚肝细胞可诱导 HepG2 细胞株分化,但机制尚未阐明^[5-6]。已知,高度保守的 Wnt/ β -Catenin 信号通路与发育、分化等密切相关,也是促进 HCC 分化的重要因素^[7-8]。那么,小鼠第 13.5 天的胚肝细胞是否通过调控 β -Catenin,诱导 HepG2 细胞株分化,尚不清楚。本文以小鼠第 13.5 天胚肝细胞与 HepG2 细胞株体外共培养模型,研究了小鼠第 13.5 天胚肝细胞调控 β -Catenin,诱导 HepG2 细胞株分化机制,为 HCC 治疗提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

清洁级健康 KM 小鼠,雄鼠 30 只,雌鼠 90 只,

体重 25~30 g,6~8 周龄,由河北医科大学实验动物中心提供[SCXK(冀)2018-004],饲养条件如下:自由进食和饮水,温度约 25℃,湿度约 50%,12 h 光照/12 h 黑暗,在河北医科大学实验动物中心饲养动物[SYXK(冀)2018-008],动物实验经由实验动物管理委员会批准(2018-0042),实验过程中严格遵循实验动物使用的 3R 原则,给予人道主义关怀。

1.1.2 细胞

人肝癌细胞 HepG2,购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库(TCHu 72)。

1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清购自北京全式金公司(货号:FS101); Gibco 的 DMEM 培养基(货号: C11885500BT) 购自 Life Technology 公司; Millicell 细胞培养小室(货号: PICMORG50)购自美国 Millipore 公司; β -Catenin 抑制剂 XAV-939 购自 Selleck(货号: S1180); 白蛋白(ALB, 货号: sc-271605)、甲胎蛋白(AFP, 货号: sc-8399)、肝细胞核因子 4 α (HNF-4 α , 货号: sc-374229)、 β -Catenin 抗体(货号: sc-7963)、 β -actin(货号: sc-8432)购自美国 Santa Cruz 公司; TRITC 标记二抗(货号: BA1089)购自博士德公司; DAPI (2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride, 货号: D9542-1MG)购自 SIGMA 公司; TRIzol 试剂(货号: 15596-026)购自美国 Invitrogen 公司; 反转录试剂盒(货号: K1622)购自 Thermo Fisher Scientific 公司; qPCR 试剂盒(SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II, 货号: RR820A)购自日本 TaKaRa 公司; PCR 引物由上海捷瑞生物工程技术有限公司合成; 0.45 μ m

PVDF 膜(货号 IPVH00010)购自美国 Merck milipore 公司。二氧化碳培养箱(英国 NEW BRUNSWICK 公司,型号:Galaxy 170R);体视显微镜(德国 Leica 公司产品,型号:S9);倒置荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司产品,型号:IX-51);PCR 仪(美国 Thermo 公司产品,型号:PX2);实时荧光定量 PCR 仪(中国香港 Gene 公司产品,型号:Corbett Rotor-Gene 3000);Odyssey 双色红外荧光成像系统(中国香港 Gene 公司产品,型号:9120)。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠第 13.5 天胚肝细胞分离纯化

采用本实验室方法,用 6~8 周龄 KM 小鼠,雌鼠:雄鼠=3:1 合笼,次日出现阴栓日期为妊娠 0.5 d,取 13.5 d 孕鼠,消毒,在体视显微镜下取出胚肝,分离成小块,采用 IV 型胶原酶消化。过滤网后,采用差速贴壁法纯化胚肝细胞,常规培养,备用于鉴定及共培养实验^[5-6]。

1.3.2 小鼠第 13.5 天胚肝细胞与 HepG2 细胞株的共培养

将 HepG2 细胞株置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。培养液为高糖培养基,含 1% 的非必需氨基酸,10% 的新生牛血清。利用“Transwell”小室建立小鼠第 13.5 天胚肝细胞与 HepG2 细胞株的非接触式共培养模型,1 mL 胚肝细胞(每毫升 1×10⁶ 个)培养于六孔板中“Transwell”小室上层膜上,2 mL HepG2(每毫升 5×10⁴ 个)培养于六孔板中,于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。分为对照组、共培养组,培养 24、48 h 后检测相关指标。

1.3.3 β-Catenin 抑制剂处理及分组

建立小鼠第 13.5 天胚肝细胞与 HepG2 细胞株的共培养模型后,给予 β-Catenin 抑制剂 XAV-939 处理,分为对照组、XAV-939 组(1 μmol/L)、共培养+XAV-939 组(1 μmol/L)、共培养组,作用 48 h 后,相差显微镜观察 HepG2 细胞株形态,同时检测 AFP、β-Catenin 的蛋白含量。

1.3.4 免疫荧光法检测 ALB 的分布

取原代胚肝细胞,4% 多聚甲醛固定后,1% 的 TritonX-100 室温下处理 30 min,10% 山羊血清 37℃ 封闭 1 h。弃除封闭液,加入 AFP 抗体(1:50),4℃ 孵育过夜,加入 FITC 标记二抗(1:50),避光 37℃ 孵育 1 h,加入细胞核染色液 DAPI,避光室温作用 15 min,滴加适量的抗荧光衰减封片液(50% 甘油),盖玻片封片后荧光倒置显微镜下观察、拍照。ALB 的

染色为绿色,细胞核的染色为蓝色。采用 Image Pro Plus 6.0 版软件计数 3 个随机视野中免疫荧光阳性细胞。

1.3.5 qRT-PCR 检测 mRNA 水平

收集共培养 24 h、48 h 的 HepG2 细胞株,采用 TRIzol 法提取 RNA,并测定 RNA 浓度。按照试剂盒进行反转录和 PCR 反应。PCR 反应条件:95℃ 30 s,95℃ 5 s,60℃ 20 s,72℃ 20 s,第 2 步至第 3 步进行 40 个循环。以 β-actin 为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 计算相关基因的 mRNA 的相对表达量。引物见表 1。

1.3.6 Western blot 检测蛋白含量

共培养及 β-Catenin 抑制剂处理 48 h 后,收集 HepG2 细胞株,用 RIPA 裂解液进行裂解,取上清至预冷的 EP 管中,即为细胞总蛋白提取物。蛋白精确定量后,取蛋白样品每孔 150 μg 经 SDS-PAGE 电泳分离后将蛋白转至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭后,一抗封闭(5% 牛奶 1:200 稀释),4℃ 过夜,二抗(5% 牛奶 1:2000 稀释)室温孵育 2 h,采用 Odyssey 双色红外荧光成像系统读取图像。将所得图片用美国 UVP 公司 LabWorks 4.5 软件对条带进行定量分析,计算目的条带的灰度值。

1.3.7 免疫荧光法检测 β-Catenin 的分布

方法同 1.3.2,共培养 48 h 的 HepG2 细胞株,使用 β-Catenin 抗体(1:50)和 TRITC 标记的二抗,检测 β-Catenin 蛋白的分布。β-Catenin 的染色为红色,细胞核的染色为蓝色。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,所得结果采用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)。两组之间采用独立样本 *t* 检验分析,多组之间分析先进行方差齐性检验,组间比较采用 One-Way-ANOVA 法,进一步两两比较,采用 LSD-*t* 检验,*P*<0.05 为有统计学差异。

表 1 Real-time PCR 引物序列
Table 1 Primers for Real-time PCR

基因名称 Gene name	序列(5'-3') Sequence	产物长度 Product length
AFP	F:AGAGGAGATGTGCTGGATTG R:CTCCTGGTATCCTTTAGCAACT	327 bp
HNF-4α	F:GATGACAATGAGTATGCCTACCT R:GTCGTTGATGTAGTCTCCAA	132 bp
CYP1B1	F:TCTGTCTTGGGCTACCACATTCC R:TGGGTTGGCCCTGAAATCG	270 bp
β-actin	F:CTCCATCCTGGCCTCGCTGT R:GCTGTCACCTTCACCGTTCC	268 bp

2 结果

2.1 小鼠 13.5 天胚肝细胞的鉴定

原代胚肝细胞分离培养后,用免疫荧光法检测肝细胞标记分子 ALB 蛋白的分布。结果显示,91.84% 的 ALB 荧光染色阳性,见图 1。

2.2 qRT-PCR 检测相关基因的 mRNA 表达水平

与对照组相比,共培养 HepG2 细胞株中 *AFP* 相对 mRNA 表达量在 24 h 和 48 h 均显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), *HNF-4 α* 相对 mRNA 表达量在 24 h 和 48 h 均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), *CYP1B1* mRNA 的相对表达量在 24 h 无明显差异,48 h 显著升高 ($P < 0.01$), *ADH1C* mRNA 的相对表达量在 24 h 无明显差异,48 h 显著升高 ($P < 0.01$),见图 2。

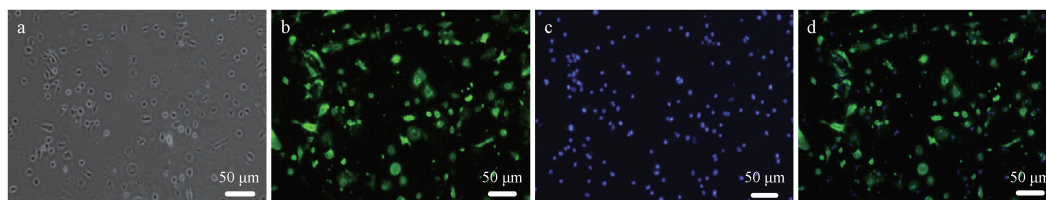
2.3 显微镜下观察细胞形态变化

对照组 HepG2 细胞株生长旺盛、密度大,形态

呈多角形或梭形,胞浆透亮,细胞核多且形状不规则。与小鼠第 13.5 天胚肝细胞共培养 48 h 后, HepG2 细胞株生长受到明显抑制,形态多为六边形,接近正常成熟肝细胞,胞浆透亮度下降,细胞核多为单核,见图 3。

2.4 Western blot 法检测 AFP、HNF-4 α 、 β -Catenin 的蛋白含量

与小鼠第 13.5 天胚肝细胞共培养 48 h 后,提取总蛋白,Western blot 法检测 HepG2 细胞株中, AFP、HNF-4 α 、 β -Catenin 的蛋白含量。计算 Western blot 条带灰度值并统计,发现与对照组相比,AFP 蛋白含量在共培养组 ($P < 0.05$) 显著降低, HNF-4 α 蛋白含量在共培养组显著升高 ($P < 0.05$)。同时,与对照组相比, β -Catenin 蛋白含量在共培养组显著下降 ($P < 0.05$),见图 4。



注: a: 明视场; b: ALB 荧光; c: DAPI 荧光; d: ALB 和 DAPI 荧光叠加图。

图 1 小鼠第 13.5 天胚肝细胞鉴定

Note. a, Bright field. b, ALB fluorescence. c, DAPI fluorescence. d, ALB and DAPI fluorescence merge.

Figure 1 Identification of 13.5 day mouse embryo hepatocytes

2.5 免疫荧光检测 β -Catenin 的分布

与小鼠第 13.5 天胚肝细胞共培养 48 h 后,免疫荧光法检测 HepG2 细胞株中 β -Catenin 的分布。结果可见,对照组 HepG2 细胞株增殖旺盛, β -Catenin 的荧光染色明显,提示其高含量;相比于对照组,共培养组 HepG2 细胞株数量明显减少, β -Catenin 的荧光强度显著减弱。结果验证了,与小鼠第 13.5 天胚肝共培养后, HepG2 细胞株中 β -Catenin 的含量减少,见图 5。

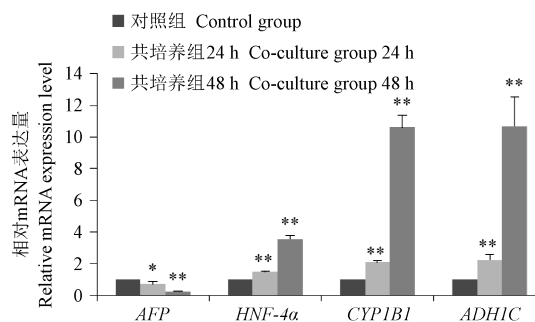
2.6 抑制 β -Catenin 引起 HepG2 细胞株形态变化

与对照组 HepG2 细胞株相比, β -Catenin 抑制剂 XAV-939 处理后,细胞生长受到抑制,胞浆透亮度下降,细胞形态不规则,趋于死亡。而相对于共培养组, β -Catenin 抑制剂 XAV-939 处理后,细胞形态变化的基础上,接近崩解,见图 6。

2.7 抑制 β -Catenin 减少 AFP 的蛋白含量

对照及共培养 HepG2 细胞株, β -Catenin 抑制剂 XAV-939 处理 48 h 后, Western blot 法检测 AFP 和

β -Catenin 的蛋白含量。与对照组相比, AFP 蛋白含量和 β -Catenin 蛋白含量在 XAV-939 组显著降低 ($P < 0.01$);同时,与共培养组相比, AFP 蛋白含量和 β -Catenin 蛋白含量在共培养+XAV-939 组显著降低 ($P < 0.01$),见图 7。

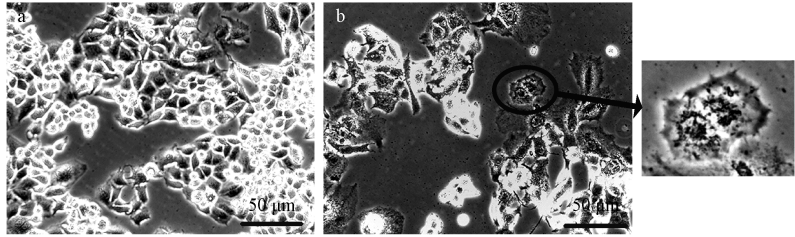


注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 2 共培养后相关基因 mRNA 表达水平

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

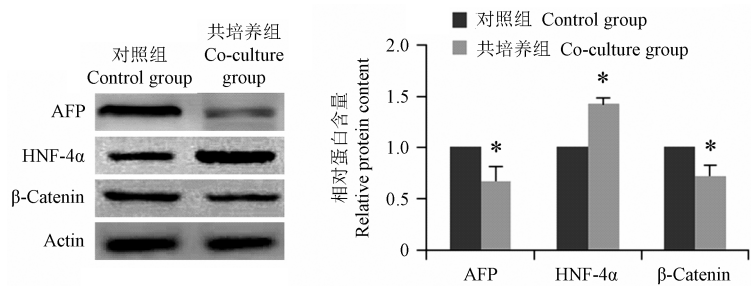
Figure 2 mRNA expression levels of related genes after co-culture



注:a:对照组;b:共培养组。
图3 对照组和共培养组 HepG2 细胞株的形态

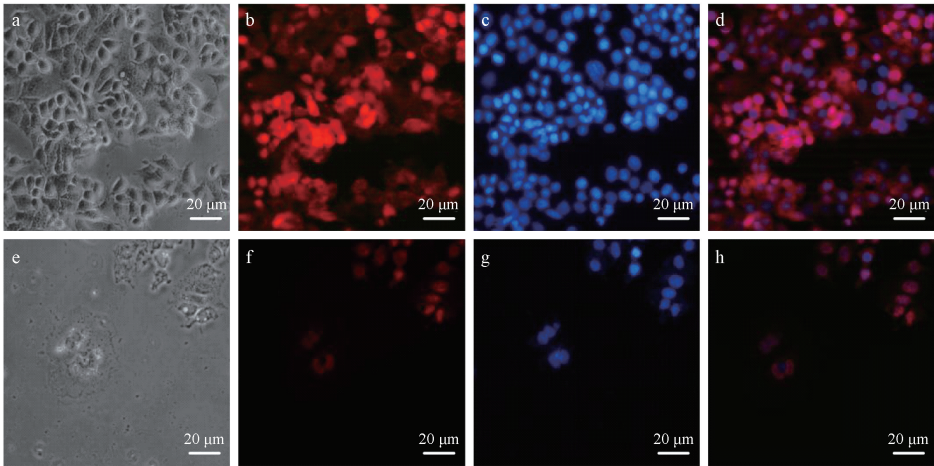
Note. a, Control group. b, Co-culture group.

Figure 3 Morphology of HepG2 cells in the control group and co-culture group



注:与对照组比较, * $P<0.05$ 。
图4 共培养 HepG2 细胞株中 AFP、HNF-4α 和 β-Catenin 的蛋白表达
Note. Compared with the control group, * $P<0.05$.

Figure 4 Protein expression levels of AFP、HNF-4 and β-Catenin in co-culture group

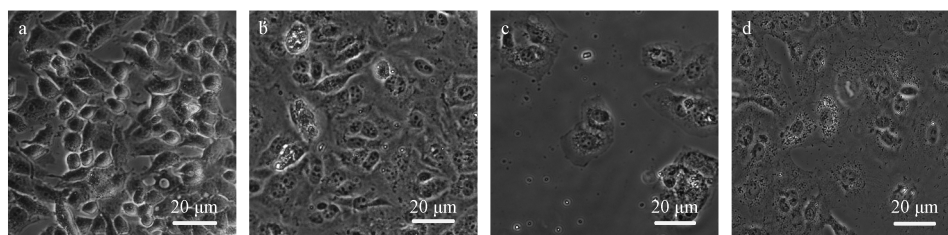


注:a:对照组明视场;b:对照组 β-Catenin 荧光;c:对照组 DAPI 荧光;d:对照组 β-Catenin 和 DAPI 荧光叠加图;e:共培养组明视场;f:共培养组 β-Catenin 荧光;g:共培养组 DAPI 荧光;h:共培养组 β-Catenin 和 DAPI 荧光叠加图。

图5 HepG2 细胞株中 β-Catenin 的分布

Note. a, Bright field in the control group. b, β-Catenin fluorescence in the control group. c, DAPI fluorescence in the control group. d, β-Catenin and DAPI fluorescence merge in the control group. e, Bright field in the co-culture group. f, β-Catenin fluorescence in the co-culture group. g, DAPI fluorescence in the co-culture group. h, β-Catenin and DAPI fluorescence merge in the co-culture group.

Figure 5 Distribution of β-Catenin in HepG2 cells

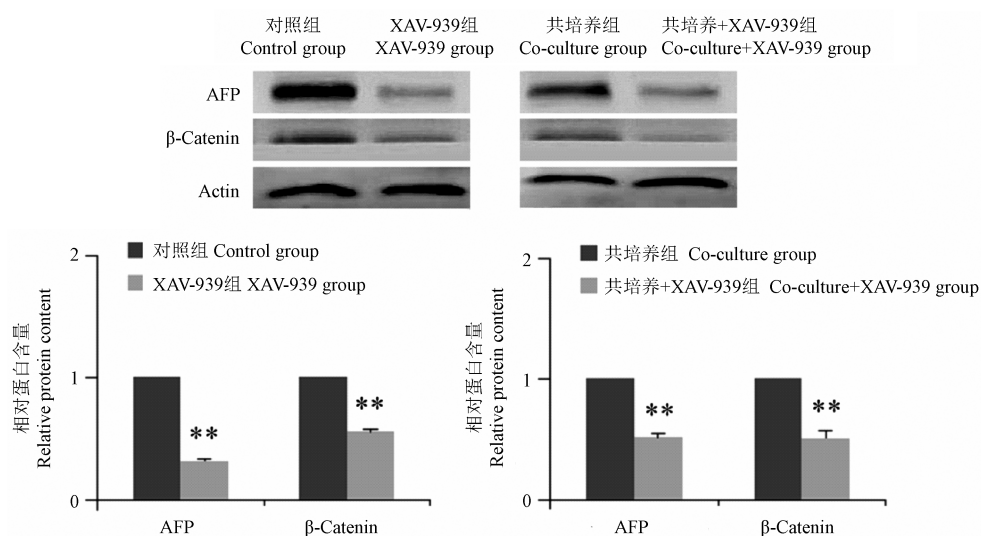


注: a: 对照组; b: XAV-939 组; c: 共培养组; d: 共培养+ XAV-939 组。

图 6 抑制 β -Catenin 引起 HepG2 细胞株的形态变化

Note. a, Control group. b, XAV-939 group. c, Co-culture group. d, Co-culture+XAV-939 group.

Figure 6 Morphology of HepG2 cells induced by inhibition β -Catenin



注: 与对照组和共培养组比较, $**P < 0.01$ 。

图 7 抑制 β -Catenin 减少 AFP 的蛋白含量

Note. Compared with the control group and the co-culture group, $**P < 0.01$.

Figure 7 Reduced AFP protein content induced by inhibition β -Catenin

3 讨论

目前,针对杀死肿瘤细胞的治疗策略,不能达到完全治愈肿瘤的目的,反而会产生严重的毒副作用。因此,我们必须改变思路。胚胎微环境是诱导肿瘤细胞分化的天然而有效的治疗良方^[4,9],然而,并不是所有的胚胎诱导肿瘤细胞分化的实验都能取得成功^[10],因此有必要探寻其内在的诱导机制。

根据肿瘤细胞和胚胎干细胞之间的相似性^[11-12],齐锦生教授提出“同源同步诱导分化”理论^[5-6]。有证据表明,HCC 细胞表达胚胎抗原、具有无限增殖等胚胎细胞的特性^[12-13]。在“同源同步诱导分化”理论的指导下,我们前期的实验证实,特定发育阶段的鸡胚或小鼠胚肝细胞可诱导 HepG2 细胞株分化^[6]。

鉴于小鼠胚肝细胞是在胚胎发育第 12~15 天

分化成熟^[14],我们用小鼠第 13.5~14.5 天胚肝细胞与 HepG2 细胞株共培养,能抑制 HepG2 细胞株增殖,促进其分化成熟^[5-6]。HNF-4 α 在肝发育和肝细胞功能形成中,发挥着不可或缺的关键作用,也是控制肝细胞分化的关键因子^[15-16]。

本实验用免疫荧光法检测小鼠第 13.5 天胚肝细胞中肝细胞标记分子 ALB 蛋白表达,结果显示绝大部分细胞的 ALB 荧光染色阳性,说明小鼠第 13.5 天胚肝细胞成功分离培养。HepG2 细胞株与小鼠第 13.5 天胚肝细胞共培养后,肝癌标记分子 AFP 相对 mRNA 表达量降低,而肝细胞分化调控因子 HNF-4 α ,成熟肝细胞标记分子 CYP1B1、ADH1C 基因相对 mRNA 表达量升高。并且与小鼠 13.5 天胚肝细胞共培养可诱导 HepG2 细胞株的形态趋于正常肝细胞样。Western blot 结果显示 HepG2 细胞株中 AFP、HNF-4 α 蛋白在共培养后表达变化与相对 mRNA 表达变化相一致。这表明,小鼠第 13.5 天胚

肝细胞共培养可抑制 HepG2 细胞株中 AFP 表达,上调 HNF-4 α 表达,诱导 HepG2 细胞株分化。而 HNF-4 α 还调控很多成熟肝细胞特异酶的表达,如 *CYP1B1* 和 *ADH1C* 等。本实验也证实,与小鼠第 13.5 天胚肝细胞共培养,可上调 HepG2 细胞株中 *CYP1B1* 和 *ADH1C* 的表达。然而,小鼠第 13.5 天胚肝细胞是通过什么信号通路,诱导 HepG2 细胞株分化成熟呢?

已知 Wnt/ β -Catenin 信号通路是一个高度保守的,调控胚胎发育、细胞增殖和分化的重要信号通路^[17]。肝细胞分化过程中,Wnt/ β -Catenin 信号通路起关键调控作用,而其紊乱或过度激活,则导致 HCC 的发生发展^[7-8]。Western blot 和免疫荧光结果均显示与小鼠 13.5 天胚肝共培养后,HepG2 细胞株中 β -Catenin 蛋白含量下降。这说明与小鼠第 13.5 天胚肝细胞共培养可显著抑制 HepG2 细胞株中 β -Catenin 的含量和分布。加入 β -Catenin 抑制剂后,HepG2 细胞株出现明显的形态变化,细胞趋于死亡,采用 Western blot 方法检测蛋白表达,发现抑制 β -Catenin 可减少 HepG2 细胞株以及共培养的 HepG2 细胞株中 AFP 蛋白含量。这说明抑制 β -Catenin 可引起对照组及共培养组 HepG2 细胞株明显的形态变化,减少 AFP 蛋白含量。但是,抑制 β -Catenin 并不能完全模拟小鼠第 13.5 天胚肝细胞共培养的效果。总之,这说明,小鼠第 13.5 天胚肝细胞共培养很可能是主要通过抑制 Wnt/ β -Catenin 信号通路,促使 HepG2 细胞株分化成熟的。

然而,小鼠第 13.5 天胚肝细胞还通过哪些信号通路,及怎样抑制 β -Catenin,诱导 HepG2 细胞株分化成熟,还需进一步的深入探讨。此外,胚胎发育和免疫形成之间亦是存在紧密的联系^[10]。因此,胚胎诱导分化与免疫治疗之间内在的联系和机制,也需不断探讨揭示^[18]。

总之,本研究揭示,小鼠第 13.5 天胚肝细胞共培养可能主要通过抑制 β -Catenin,诱导 HepG2 细胞株分化成熟。

参考文献:

- [1] Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7(1): 7.
- [2] Zhang W, Zhang B, Chen XP. Adjuvant treatment strategy after curative resection for hepatocellular carcinoma [J]. Front Med, 2021, 15(2): 155-169.
- [3] 白芸,李永臻,祁艳娟,等. 黄芪多糖联合 5-FU 对肝癌 HepG2 细胞 EMT 转化的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(2): 8-15.
- [4] Hendrix MJ, Sefior EA, Sefior RE, et al. Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments [J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(4): 246-255.
- [5] Li Y, Liu D, Zong Y, et al. Developmental stage-specific hepatocytes induce maturation of HepG2 cells by rebuilding the regulatory circuit [J]. Mol Med, 2015, 21(1): 285-295.
- [6] Li Y, Zong Y, Xiao Z, et al. Developmental stage-specific embryonic induction of HepG2 cell differentiation [J]. Dig Dis Sci, 2016, 61(4): 1098-1106.
- [7] He S, Tang S. WNT/ β -catenin signaling in the development of liver cancers [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 132: 110851.
- [8] Li Q, Sun M, Wang M, et al. Dysregulation of Wnt/ β -catenin signaling by protein kinases in hepatocellular carcinoma and its therapeutic application [J]. Cancer Sci, 2021, 112(5): 1695-1706.
- [9] Yang E, Wang X, Gong Z, et al. Exosome-mediated metabolic reprogramming: the emerging role in tumor microenvironment remodeling and its influence on cancer progression [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 242.
- [10] Sharma A, Seow JJW, Dutertre CA, et al. Onco-fetal reprogramming of endothelial cells drives immunosuppressive macrophages in hepatocellular carcinoma [J]. Cell, 2020, 183(2): 377-394.
- [11] Rezaiofi A, Vrynias AV, Dehghanian M, et al. Lessons from the embryo: an unrejected transplant and a benign tumor [J]. Stem Cell Rev Rep, 2020, 17(3): 850-861.
- [12] Ngo MT, Jeng HY, Kuo YC, et al. The role of IGF/IGF-1R signaling in hepatocellular carcinomas: stemness-related properties and drug resistance [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(4): 1931.
- [13] Wang X, Wang J, Tsui YM, et al. RALYL increases hepatocellular carcinoma stemness by sustaining the mRNA stability of TGF- β 2 [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 1518.
- [14] Gong T, Zhang C, Ni X, et al. A time-resolved multi-omic atlas of the developing mouse liver [J]. Genome Res, 2020, 30(2): 263-275.
- [15] Wang P, Cong M, Liu T et al. Inhibitory effects of HNF4 α on migration/maltransformation of hepatic progenitors: HNF4 α -overexpressing hepatic progenitors for liver repopulation [J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1): 183.
- [16] Yang G, Zhang M, Zhao Y, et al. HNF-4 α inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation through mir-122-adam17 pathway [J]. PLoS One, 2020, 15(3): e0230450.
- [17] Sferazza G, Corti M, Brusotti G, et al. Nature-derived compounds modulating Wnt/ β -catenin pathway: a preventive and therapeutic opportunity in neoplastic diseases [J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10(10): 1814-1834.
- [18] Weinmann A, Galle PR. Role of immunotherapy in the management of hepatocellular carcinoma: current standards and future directions [J]. Curr Oncol, 2020, 27(3): S152-S164.

[收稿日期]2021-06-15