

· 论 著 ·

白蛋白/细胞角蛋白 19 启动子调控的红绿双色荧光蛋白报告载体的构建及其在肝干细胞分化研究中的应用

李文林¹, 苏娟¹, 陶欣荣¹, Joseph T Lau², 胡以平^{1*}

(1. 第二军医大学基础医学部细胞生物学教研室, 上海 200433; 2. The Department of Molecular and Cellular Biology, Roswell Park Cancer Institute, Elm and Carlton Streets, Buffalo, NY 14263, USA)

[摘要] **目的:** 利用报告基因监测肝干细胞的分化走向。**方法:** 通过 PCR 从小鼠基因组中克隆了细胞角蛋白 19 启动子片段, 构建了细胞角蛋白 19 启动子调控的绿色荧光蛋白(pCK19 EGFP)和白蛋白启动子调控的红色荧光蛋白报告载体(pAlbDsRed), 并利用报告载体标记的肝干细胞(liver epithelial progenitor cells, LEPCs)观察了悬浮培养时 LEPCs 的分化去向。**结果:** 白蛋白/细胞角蛋白 19 启动子调控的红绿双色荧光蛋白报告载体可以实时地显示肝原始细胞在不同的诱导环境下的分化走向。**结论:** 双色荧光蛋白报告载体的成功构建为研究 LEPCs 的分化、筛选可诱导 LEPCs 定向分化的分子提供了便捷的工具。

[关键词] 肝干细胞; 细胞分化; 白蛋白; 细胞角蛋白 19; 启动子; 红色荧光蛋白; 绿色荧光蛋白; 基因, 报告

[中图分类号] Q 782 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)03-0237-03

Construction of DsRed/EGFP expression vectors driven by albumin/cytokeratin 19 promoters and their utilization in monitoring differentiation of liver progenitor cells

LI Wen-lin¹, SU Juan¹, TAO Xin-rong¹, Joseph T Lau², HU Yi-ping* (1. Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. The Department of Molecular and Cellular Biology, Roswell Park Cancer Institute, Elm and Carlton Streets, Buffalo, NY 14263, USA)

[ABSTRACT] **Objective:** To construct the fluorescence protein expression vectors as reporters for the differentiation of liver epithelial progenitor cells(LEPCs). **Methods:** The cytokeratin 19 promoter was amplified by PCR from mouse tail genomic DNA and subcloned into promoter-removed pEGFP C1 vector. Albumin promoter was recovered from pGEMAlbSVPA and cloned into the promoterless vector pDsRed1.1. By using the reporter genes tagging cells, the phenotype variation of LEPCs cultured as aggregates was studied. **Results:** DsRed/EGFP expression vectors driven by albumin/cytokeratin 19 promoters could monitor the differentiation of LEPCs in a real-time manner. **Conclusion:** The reporter vectors are useful for studying the LEPCs differentiation and for evaluating differentiation-promoting agents.

[KEY WORDS] liver epithelial progenitor cells; cell differentiation; albumin; cytokeratin 19; promoters; red fluorescence protein; enhanced green fluorescence protein; gene reporter

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(3): 237-239]

肝脏起源于内胚层的前肠。与胚胎心脏相接触的前肠部分受到来自心脏间充质细胞分泌的成纤维细胞生长因子(FGF)家族细胞因子的作用而形成肝脏的原基。在肝的原基中,存在肝干细胞也称肝母细胞,肝母细胞表达肝细胞特征性的蛋白如:甲胎蛋白和白蛋白(Alb)^[1]。随着发育的进行,侵入间质组织的肝母细胞形成肝内胆管并开始表达胆管细胞特征性的分子标志:γ-谷氨酰转肽酶(γ-GT);在肝内胆管形成的初期,原始胆管细胞只表达细胞角蛋白(CK)8和18;随着管样结构的形成,开始表达胆管特征性的CK7和CK19,同时Alb的表达水平逐渐下降。另一方面不与间质组织接触的肝母细胞分化为肝细胞并形成肝板,肝细胞持续表达Alb、CK8

和CK18,而不会表达CK7和CK19。因此Alb和CK19可以作为成熟肝细胞和胆管上皮细胞的特征性分子^[2]。本实验室建立的肝干细胞系(liver epithelial progenitor cells, LEPCs)来自小鼠Retrorsine损伤后的再生肝脏,具有肝干细胞的特征。LEPCs表达CK19,但不表达Alb(资料待发表)。在本研究中,我们构建了CK19启动子调控的绿色荧光蛋白和Alb启动子调控的红色荧光蛋白报告

[基金项目] 国家自然科学基金(30470876, 30270668, 30270603, 30200138);上海市科委重大项目(03DJ14020)。

[作者简介] 李文林(1975-),男(汉族),博士,讲师。

* Corresponding author. E-mail: yphu@smmu.edu.cn

载体,报告载体的成功构建将有助于我们实时地研究肝干细胞在不同诱导条件下的分化去向。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 dNTP、*Taq plus* 酶、T 载体购自 Sangon 公司;限制性内切酶和 T_4 DNA 连接酶购自 MBI Fermentas 公司;超纯质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自 V-gene 公司,质粒大抽试剂盒购自 Qiagen 公司;G418、DMEM 高糖培养基均购自 Gibco 公司,胎牛血清购自 Hyclone 公司。

1.2 细胞 LEPCs 由本实验室建立。NIH-3T3 细胞、HeLa 细胞和大肠杆菌 DH5 α 均由本室保存。

1.3 细胞培养 LEPCs、NIH-3T3、HeLa 和原代肝细胞均采用含 10%胎牛血清,50 μ g/ml 庆大霉素 DMEM(高糖)培养基,37 $^{\circ}$ C,5%CO $_2$ 培养。原代肝细胞采用两步胶原酶消化法获得^[3]。诱导 LEPCs 分化时,在培养基中添加 2%DMSO 或者将 LEPCs 接种于细菌培养级的培养皿中,LEPCs 在细菌培养级的培养皿中不贴壁而呈悬浮聚团生长。

1.4 CK19 启动子的克隆 以小鼠尾基因组为模板,用 PCR 方法扩增 CK19 的启动子和 5'UTR 顺序(Accession No. AF237661)^[4],引物为 5'-AAA TTA ATT CTA AGA CCC ACC-3' 和 5'-GAT AGT CTA GAG AAG TCA TGA TG-3'。PCR 反应采用 50 μ l 体系,含上下游引物各 0.5 μ l、dNTP 100 μ mol/L、*Taq plus* 1 μ l,循环条件为 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 3 min。目的片段大约 2.0 kb 并经测序验证。

1.5 Alb/CK19 启动子调控的红绿双色荧光蛋白报告载体的构建 将 pEGFP C1 载体经 *Vsp I* / *Nhe I* 双酶切去除 CMV 启动子后的片段与 *Vsp I* / *Xba I* 酶切后的 CK19 启动子 PCR 片段连接构建 pCK19 EGFP 载体。含 Alb 增强子/启动子的质粒 pGEMAlbSVPA 由美国国立卫生研究院 Derek LeRoith 教授馈赠。pGEMAlbSVPA 经 *Xho I* 酶切、 T_4 DNA 聚合酶补平、*Apa I* 酶切得到 2.3 kb 的 Alb 增强子/启动子片段;pDsRed1 1 载体经 *BamH I* 线性化、 T_4 DNA 聚合酶补平、*Apa I* 酶切后得片段与 Alb 增强子/启动子片段连接得 pAlb DsRed 载体。

1.6 报告载体转染 NIH-3T3、HeLa、原代肝细胞和 LEPCs 细胞利用 Roche 细胞转染试剂 Fungene 6 将 pCK19 EGFP 和 pAlb DsRed 载体瞬时导入 NIH-3T3、HeLa 和原代肝细胞检测启动子的特异性,详细步骤按试剂说明书进行。*ApaL I* 酶切线形

化后的 pCK19 EGFP 和 pAlb DsRed 载体经电穿孔法导入 LEPCs 细胞;采用 0.4 cm 的电击杯,将 3×10^6 个细胞悬浮于 800 μ l 含 20 μ g 线形化质粒的 PBS 缓冲液中;电击条件为 250 V、300 μ F。电击转染后 48 h 在培养基中添加 800 μ g/ml G418 筛选稳定转染的细胞,挑取稳定转染单克隆细胞扩增冻存。

2 结果

2.1 CK19 启动子的克隆和鉴定 以鼠尾基因组为模板,用 PCR 方法扩增 CK19 的启动子,取 10 μ l 扩增产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳(图 1),在 2.0 kb 处有特异性扩增条带。该片段经测序确证为 CK19 启动子序列。

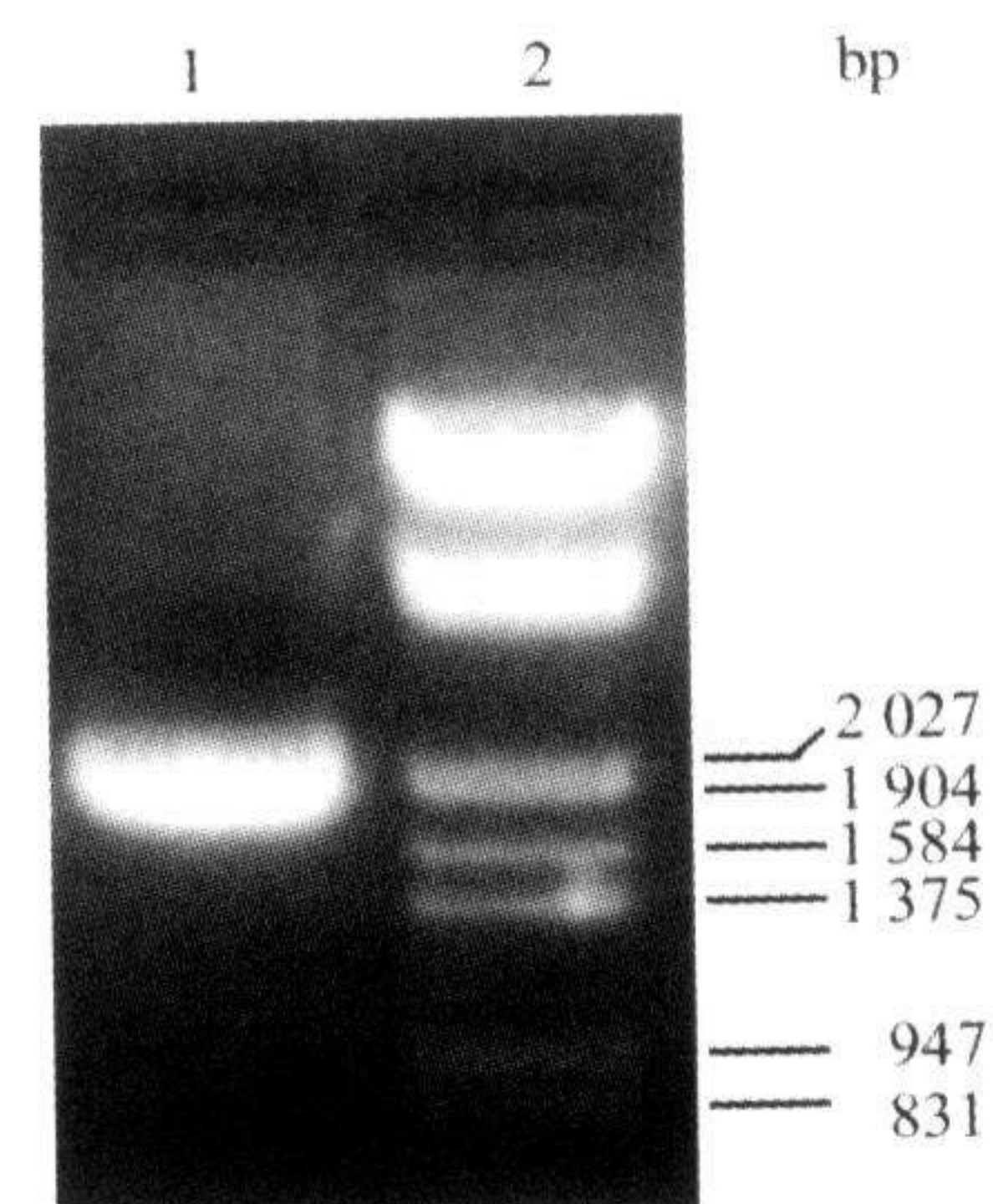


图 1 以鼠尾基因组为模板克隆的 CK19 启动子序列鉴定

Fig 1 CK19 promoter was amplified by PCR from mouse tail genomic DNA

1: 2.0 kb CK19 promoter; 2: DNA marker (λ DNA / *EcoR I* + *Hind III* marker)

2.2 pAlb DsRed 和 pCK19 EGFP 的鉴定 经测序证实 Alb 和 CK19 的启动子都与目标载体正确连接。将 pAlb DsRed 瞬时转染 HeLa、NIH-3T3 和原代肝细胞后,仅在原代肝细胞中检测到红色荧光,表明 Alb 启动子在肝细胞中特异性表达;将 pCK19 EGFP 转染 HeLa、NIH-3T3 和原代肝细胞后,仅在 HeLa 细胞中检测到绿色荧光,表明 CK19 启动子具有细胞特异性(结果未显示)。

2.3 LEPCs 悬浮聚团生长时分化为肝细胞 通过电穿孔法将 pAlb DsRed 和 pCK19 EGFP 报告载体分别导入 LEPCs 后,通过筛选和单克隆培养得到稳定转染的细胞系。其中转染 pCK19 EGFP 的 LEPCs 都均一地显示绿色荧光(图 2A、2B),但是转染 pAlb DsRed 的 LEPCs 则检测不到 DsRed 的表达。将 10^6 个 pCK19 EGFP 稳定转染的 LEPCs 和 10^6 个 pAlb DsRed 稳定转染的 LEPCs 混合后接种于细菌培养级培养皿后,细胞无法贴壁铺展,并在 2 h 内聚集成悬浮或者半附着的细胞团(图 2C)。刚

形成的细胞团仅显示绿色荧光(图2D);24 h后可以检测到微弱的红色荧光;3 d后细胞团显示明显的

红色荧光,而绿色荧光减弱(图2E、2F)。这表明LEPCs在聚团生长时向肝细胞方向分化。

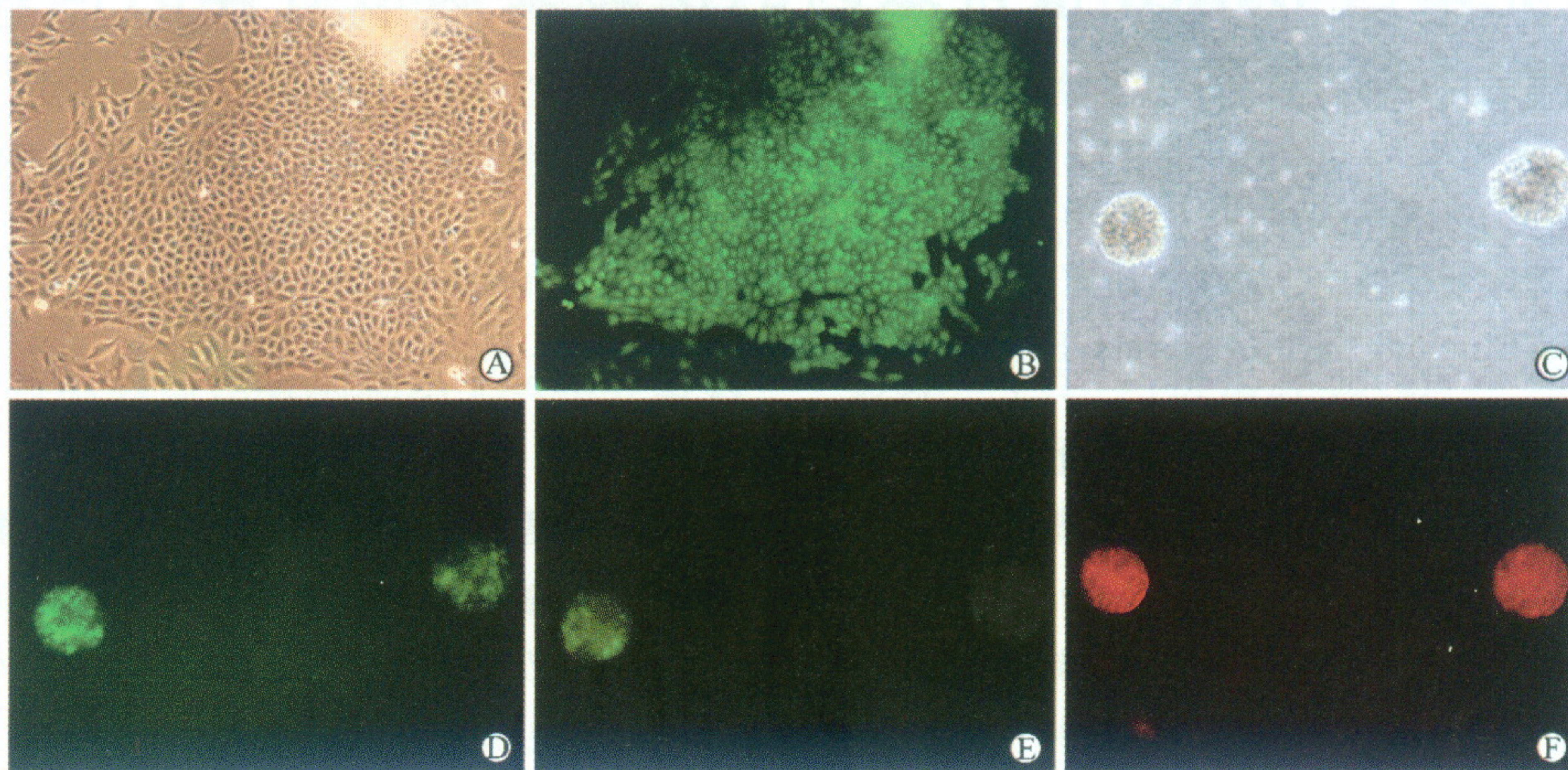


图2 LEPCs在悬浮聚团生长时向肝细胞方向分化

Fig 2 LEPCs acquired hepatocyte phenotype when cultured as aggregates

The pCK19 EGFP transfected LEPCs showed homogeneous green fluorescence(A, B);the cells gathered into aggregates(C) after plating in petri dish and showed green fluorescence(D). Three days after plating, the green fluorescence of the same cell aggregate diminished(E) and the red fluorescence was induced(F)

3 讨论

肝干细胞应具有两方面的基本特征:首先可以旺盛地增殖和自我更新,其次必须具有向肝细胞和胆管上皮细胞分化的双向潜能。本研究选用了肝细胞特征性的 Alb 启动子和胆管细胞特征性的 CK19 启动子分别构建了红绿双色荧光蛋白报告载体。用这两种载体标记肝干细胞后,通过观察荧光的方式可以方便、实时地跟踪在不同的培养条件下肝干细胞的分化去向。在本研究中,我们将报告基因标记的细胞接种于细菌培养皿,观察了 LEPCs 在无法贴壁条件下的分化情况,也检验了报告载体在监测肝干细胞分化方面的有效性。有研究报道^[5],肝干细胞在无法贴壁时聚团生长并分化为肝细胞。实验结果表明当 LEPCs 在细菌培养皿中聚团生长时,细胞团逐渐由呈绿色荧光(表达 CK19)转变为呈红色荧光(表达 Alb)。即 LEPCs 在细菌培养皿中聚团生长时倾向于分化为成熟肝细胞,与文献报道一致。诱导肝干细胞的定向分化是肝干细胞研究中的重要领域。建立特异性的定向分化诱导条件是阐明定向分化过程分子机制的基础,同时也有助于认识肝脏发育过程的调控机制。Plescia 等^[6]对他们所建立的 HBC-3 细胞系的研究表明,DMSO 可诱导该细胞系向成熟肝细胞方向分化;HBC-3 细胞在 DMSO 作用下 cyclin I 和 p18 基因的表达上调,而 cyclin B1 和 D 的表达受到抑制,从而抑制细胞分

裂;在诱导分化过程中 DMSO 抑制 Wnt/ β -catenin 信号转导通路,显著下调 fibronectin 和 laminin 等胞外基质蛋白受体的表达;而肝细胞功能性的分子如:载脂蛋白 C-IV、乙醇脱氢酶等表达上调^[6]。肝干细胞聚团生长时也向肝细胞分化,其分化过程是否有类似的分子机制还有待进一步研究。

(致谢:感谢美国国立卫生研究院 Derek LeRoith 教授馈赠质粒 pGEMAlbSVPA)

[参考文献]

- [1] Shiojiri N, Lemire JM, Fausto N. Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development[J]. *Cancer Res*, 1991, 51(10):2611-2620.
- [2] Moll R, Franke WW, Schiller DL, et al. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells[J]. *Cell*, 1982, 31(1):11-24.
- [3] Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells[J]. *Methods Cell Biol*, 1976, 13:29-83.
- [4] Brembeck FH, Rustgi AK. The tissue-dependent keratin 19 gene transcription is regulated by GKLf/KLF4 and Sp1[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(36):28230-28239.
- [5] Marchand HS, Weiss MC. Inducible differentiation and morphogenesis of bipotential liver cell lines from wild-type mouse embryos[J]. *Hepatology*, 2002, 36(4 Pt 1):794-804.
- [6] Plescia C, Rogler C, Rogler L. Genomic expression analysis implicates Wnt signaling pathway and extracellular matrix alterations in hepatic specification and differentiation of murine hepatic stem cells[J]. *Differentiation*, 2001, 68(4-5):254-269.

[收稿日期] 2004-10-27

[修回日期] 2004-12-12

[本文编辑] 邓晓群