

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.01166

· 论 著 ·

## Wnt3 诱导小鼠肝前体细胞上皮-间质转化

胡代曦<sup>1,2</sup>, 张锡峰<sup>1,2</sup>, 张超<sup>1,2</sup>, 钟沁<sup>1,2</sup>, 冯涛<sup>1,2</sup>, 黄佳祎<sup>1,3\*</sup>

1. 重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016
2. 重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 重庆 400016
3. 重庆医科大学基础医学院病理生理学教研室, 重庆 400016

**[摘要]** **目的** 探讨 wnt3 对小鼠肝前体细胞(14-19)发生上皮-间质转化的影响。**方法** 分别将空载体 Ad-GFP 和表达 wnt3 的腺病毒 Ad-GFP-wnt3 转入小鼠肝前体细胞中, 显微镜下观察细胞形态变化。细胞划痕实验和细胞迁移实验观察 14-19 细胞迁移能力。实时荧光定量 PCR 和蛋白质印迹分析分别检测 14-19 细胞中上皮标记物和间质标记物的表达改变。**结果** 显微镜下可见高表达 wnt3 的 14-19 细胞由不规则多边形变为长梭形。细胞划痕实验和细胞迁移实验结果显示, 高表达 wnt3 的 14-19 细胞迁移能力明显提高, 与空载体转染细胞相比差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。实时荧光定量 PCR 和蛋白质印迹结果显示, 间质标记物 N-cadherin、vimentin 和 twist1 的 mRNA 和蛋白水平表达上调, 相反上皮标记物 E-cadherin 的 mRNA 水平和蛋白水平表达下调, 与空载体转染细胞相比差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。**结论** Wnt3 能够促使小鼠肝前体细胞发生上皮-间质转化, 提示其可能参与了肝纤维化的发展进程。

**[关键词]** wnt3; 肝前体细胞; 上皮-间质转化; 肝硬化

**[中图分类号]** R 329.28; R 575.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)11-1166-05

### Wnt3-induced epithelial-mesenchymal transition in mouse hepatic progenitor cells

HU Dai-xi<sup>1,2</sup>, ZHANG Xi-feng<sup>1,2</sup>, ZHANG Chao<sup>1,2</sup>, ZHONG Qin<sup>1,2</sup>, FENG Tao<sup>1,2</sup>, HUANG Jia-yi<sup>1,3\*</sup>

1. Molecular Medicine and Cancer Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
3. Department of Pathophysiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the impact of wnt3 upon epithelial-mesenchymal transition in mouse hepatic progenitor cells (14-19 cells). **Methods** Ad-GFP-wnt3 virus and blank Ad-GFP were transfected into 14-19 cells; cell morphology was observed under microscope. The migration ability of 14-19 cells was examined by wound-healing assay and transwell assay. The expression of epithelial and mesenchymal markers in 14-19 cells was detected by real-time PCR and Western blotting analysis. **Results** Microscopic observation found that 14-19 cells changed from an epithelial characteristic shape into a spindle-like shape. Wound-healing assay and Transwell assay showed that the migration ability of 14-19 cells highly expressing wnt3 was significantly enhanced compared with the blank control group ( $P < 0.01$ ). Real-time PCR and Western blotting analysis showed that mesenchymal markers N-cadherin, vimentin and twist1 were significantly increased at both mRNA and protein levels in Ad-GFP-wnt3 virus group than the blank control group, while the epithelial marker E-cadherin was significantly decreased at mRNA and protein levels ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Wnt3 can induce epithelial-mesenchymal transition in mouse hepatic progenitor cells, indicating that wnt3 may take part in the progress of hepatic fibrosis.

**[Key words]** wnt3; mouse hepatic progenitor cells; epithelial-mesenchymal transition; liver cirrhosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(11):1166-1170]

**[收稿日期]** 2013-06-22 **[接受日期]** 2013-07-15

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81071770, 81201679). Supported by National Natural Science Foundation of China(81071770, 81201679).

**[作者简介]** 胡代曦, 硕士生. E-mail: hudaixi123@163.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 023-68485479, E-mail: e738741@126.com

肝纤维化是肝脏对各种原因所致慢性肝损伤的创伤愈合反应, 是最终导致肝硬化及其严重并发症(门脉高压、肝脏衰竭以及肝细胞肝癌)的必经过程<sup>[1-2]</sup>。鉴于肝纤维化的进行性发展特性及其严重后果, 如何对其进行有效的干预, 是目前研究的一个热点问题。上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在纤维化的过程中发挥着重要的作用。EMT 是指在特定的生理和病理情况下, 具有极性的上皮细胞向间质细胞转化的现象。在此过程中, 细胞形态发生变化, 转移能力大大提高<sup>[3]</sup>。阻断甚至逆转 EMT 的发生, 可能是治疗肝纤维化的新途径。肝前体细胞具有分化为肝细胞和胆管上皮细胞的双分化潜能。在 EMT 过程中, 肝前体细胞通过细胞骨架重排和基因改变, 逐渐丧失上皮表型和免疫表型<sup>[4]</sup>。

Wnt 信号通路参与多种器官纤维化和 EMT 的发生发展过程<sup>[5-7]</sup>, 已有研究证明 wnt 信号通路参与了肝纤维化的发展过程<sup>[8-9]</sup>。Wnt 蛋白表达是 wnt 信号通路活化的重要起始信号。Wnt 蛋白分为两类: wnt1 类和 wnt5a 类, wnt3 属于 wnt1 类蛋白, 参与经典途径(即 wnt/ $\beta$ -catenin 通路)的信号转导。本研究以腺病毒为载体, 初步探讨 wnt3 对小鼠肝前体细胞发生 EMT 的影响。

## 1 材料和方法

1.1 主要试剂 DMEM 培养基及胎牛血清均购自 Hyclone。总 RNA 提取试剂盒、实时荧光定量试剂盒 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (Tli RNaseH Plus) 均购自宝生物工程(大连)有限公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 兔抗小鼠  $\beta$ -actin 抗体、兔抗小鼠 E-cadherin 抗体和兔抗小鼠 N-cadherin 抗体、兔抗小鼠 vimentin 抗体均购自 Bioworld 公司, 兔抗小鼠 twist1 抗体购自 ProteinTech 公司, 兔抗小鼠 wnt3 抗体购自 Abcam 公司。

1.2 细胞与腺病毒 小鼠肝前体细胞 14-19 由美国芝加哥大学肿瘤研究中心赠送, HEK293 细胞由本实验室保存。HEK293 和 14-19 复苏后用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液在 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中培养, 当细胞融合度达到 70%~80% 时, 用 0.25% 的胰酶消化传代。Ad-GFP-wnt3、Ad-

GFP 腺病毒由本课题组冯涛教授构建并保存, 扩增腺病毒时, 将 HEK293 按照 70%~80% 的密度接种于底面积为 100 cm<sup>2</sup> 的玻璃培养瓶中, 当细胞贴壁并有形态时, 加入 1  $\mu$ L Ad-GFP 或 Ad-GFP-wnt3, 分别于 24、48、72 h 观察细胞感染率, 当细胞感染率达到 95% 以上时, 收集细胞并离心(300 $\times$ g, 10 min), 加入适量 PBS, 反复冻融细胞 4 次, 1 380 $\times$ g 离心 4 min 收集上清, 即得病毒液。测得病毒滴度为 8 $\times$ 10<sup>7</sup> pfu/mL, 于-80℃保存备用。

1.3 腺病毒感染 14-19 细胞 将 14-19 细胞分为两组: Ad-GFP 组(空白对照组)和 Ad-GFP-wnt3 组(实验组)。按照 0.5 $\times$ 10<sup>4</sup> 个/孔接种于 24 孔板中, 待细胞贴壁并有形态时, 分别加入 2、4、8、16  $\mu$ L Ad-GFP-wnt3 或 Ad-GFP 病毒液, 观察 24、48、72 h 细胞的感染率, 荧光显微镜下计数阳性细胞, 并观察细胞的生长情况。感染病毒 48 h 后收集细胞提取蛋白, 采用蛋白质印迹分析检测 wnt3 的表达情况。

1.4 细胞迁移能力观察 (1) 细胞划痕实验: 取对数生长期的 14-19 细胞以 4 $\times$ 10<sup>5</sup> 个/孔接种于 6 孔板, 分别用 Ad-GFP-wnt3 和 Ad-GFP 病毒感染 24 h 后, 单层细胞铺满。用 200  $\mu$ L 移液器的枪头笔直画一条线, PBS 洗去漂浮的细胞, 两组细胞分别加入 500  $\mu$ L 含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养液。分别于 0、48 h 时在倒置显微镜下观察并拍照, 测量细胞迁移距离, 取 3 组随机数据计数。实验重复 3 次。(2) Transwell 迁移实验: 将经 Ad-GFP-wnt3 和 Ad-GFP 病毒感染 24 h 后的 14-19 细胞消化下来, 制成细胞悬液, 以 2 $\times$ 10<sup>4</sup> 个/孔接种于小室内, 下室加入 500  $\mu$ L 含 10% 胎牛血清的 DMEM, 置 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中培养。孵育 12 h 后, PBS 清洗 2 次, 甲醇室温固定 30 min, 自然风干, 每孔加入 0.25% 结晶紫溶液染色 10~15 min, PBS 清洗 3 次, 用棉球小心将上层小室内细胞擦净, 置于显微镜下观察迁移的细胞, 取 5 个视野计数。实验重复 3 次。

1.5 上皮标记物和间质标记物的检测 (1) 实时荧光定量 PCR: 分别收集 Ad-GFP 和 Ad-GFP-wnt3 感染后 72 h 细胞, 提取总 RNA, 反转录制备 cDNA。引物由上海生物技术有限公司合成。荧光定量 PCR 体系: SYBR Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 2.5  $\mu$ L, 模板 cDNA 2  $\mu$ L, 上、下游引物各 0.5  $\mu$ L(10  $\mu$ mol/L), 灭菌

双蒸水 10  $\mu$ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 15 s,65 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环;95 $^{\circ}$ C 保温 1 min 后制作熔解曲线,检测引物的特异性。相对基因表达分析采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法。实验重复 3 次。(2)蛋白质印迹分析:分别收集各组感染 72 h 后的细胞,用预冷的 RIPA 蛋白裂解液与 PMSF 混合液(比例为 100 : 1)4 $^{\circ}$ C 裂解 30 min,1 380 $\times g$  4 $^{\circ}$ C 离心 5 min。取上清液用 BCA 法测定蛋白浓度,待蛋白浓度调整至一致时,加入 SDS 上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 变性 6 min。取 30  $\mu$ g 总蛋白,经电泳分离后,电转移至硝酸纤维素膜上。将膜置于含 5% 脱脂奶粉的 TBST 中室温封闭 1 h,随后加入相应的一抗 37 $^{\circ}$ C 摇床孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次 $\times$ 8 min,加入相应二抗室温孵育 1 h,TBST 洗涤 3 次 $\times$ 8 min,ECL 发光检测。实验重复 3 次。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件分析数据,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异的比较采用 *t* 检验。检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 Wnt3 高效感染 14-19 细胞 Ad-GFP 和 Ad-GFP-wnt3 腺病毒能高效感染 14-19 细胞,当病毒滴度为  $8 \times 10^7$  pfu/mL 时,细胞感染 48 h 后,荧光表达达 90% 以上(图 1);病毒感染 48 h 后收集细胞提取蛋白进行蛋白质印迹分析,可见目的蛋白 wnt3 表达明显上调(图 2)。

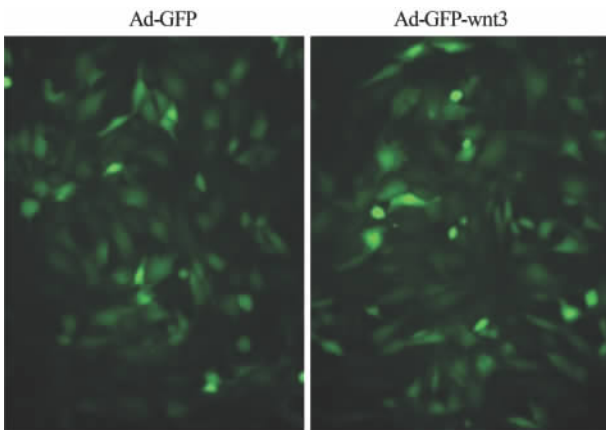


图 1 荧光显微镜检测重组腺病毒

Ad-GFP-wnt3 对 14-19 细胞的感染效率

Fig 1 Infection efficiency of 14-19 cells by Ad-GFP-wnt3 observed by fluorescence microscopy

Original magnification:  $\times 200$

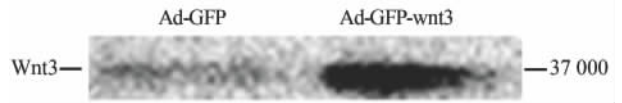


图 2 蛋白质印迹法检测重组腺病毒

Ad-GFP-wnt3 感染后 14-19 细胞的 wnt3 蛋白表达

Fig 2 Wnt3 protein expression in 14-19 cells infected with Ad-GFP-wnt3 by Western blotting analysis

2.2 Wnt3 促进 14-19 细胞转化为间质细胞形态 Ad-GFP 感染的 14-19 细胞为上皮形态,呈多边形、卵圆形生长,且细胞之间连接紧密;Ad-GFP-wnt3 感染的 14-19 细胞 48 h 后,细胞形态发生了改变,由上皮样形态向长梭形转变,且细胞之间变得松散,间隔增大(图 3)。由此可见,wnt3 可使 14-19 细胞失去极性,由上皮细胞转化为间质细胞形态,提示 wnt3 可能促进 14-19 细胞发生 EMT 改变。

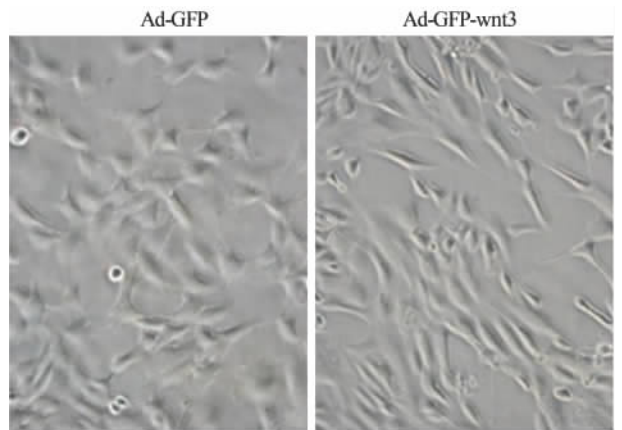


图 3 倒置显微镜下观察重组腺病毒

Ad-GFP-wnt3 对 14-19 形态变化的影响

Fig 3 Morphology changes of 14-19 cells infected with Ad-GFP-wnt3 under inverted microscope

Original magnification:  $\times 200$

2.3 Wnt3 提高 14-19 细胞迁移能力 细胞划痕实验结果显示,Ad-GFP-wnt3 组细胞展示出强大的移动运动能力(图 4)。为排除细胞增殖对实验可能出现的干扰,划痕后使用含 1% 胎牛血清的培养液培养观察 48 h。结果显示,Ad-GFP 组细胞 48 h 迁移距离为  $(0.203 \pm 0.035)$  mm,而 Ad-GFP-wnt3 组细胞 48 h 迁移距离为  $(0.500 \pm 0.036)$  mm,两组迁移距离差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。Transwell 迁移实验(图 5)结果显示,Ad-GFP 组 24 h 穿过小孔的细胞数为  $(26.3 \pm 5.5)$  个,而 Ad-GFP-wnt3 组穿过

的细胞数为(145.0±9.5)个,两组穿过小孔的细胞数量差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。

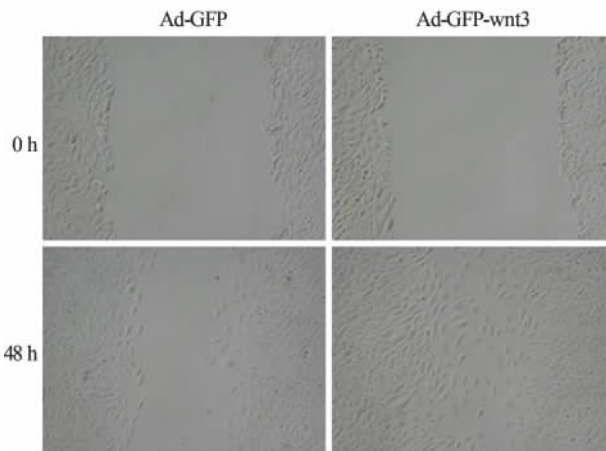


图 4 细胞划痕实验检测 Ad-GFP-wnt3 感染后 14-19 细胞迁移情况(倒置显微镜)  
**Fig 4 Migration of 14-19 cells infeced with Ad-GFP-wnt3 by wound-healing assay under inverted microscope**  
 Original magnification: ×100

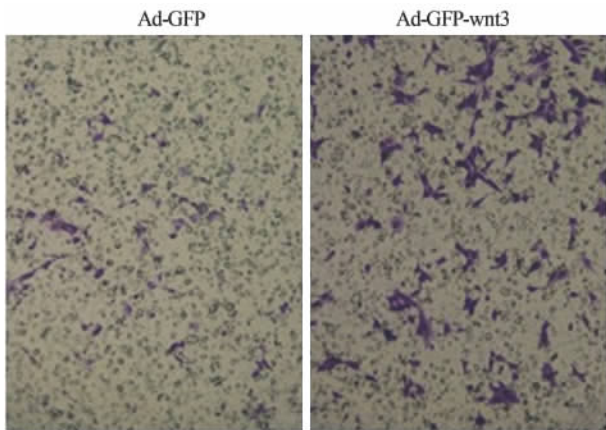


图 5 Transwell 小室迁移实验检测 Ad-GFP-wnt3 感染后 14-19 细胞穿过小孔的细胞数(光镜)  
**Fig 5 Migration of 14-19 cells infeced with Ad-GFP-wnt3 by transwell assay analysis under microscope**  
 Original magnification: ×200

2.4 Wnt3 降低 14-19 细胞上皮标记物的表达,同时促进间质标记物的表达 运用实时荧光定量 PCR 法和免疫印迹法分别检测 wnt3 对 14-19 细胞 EMT 相关标记物 mRNA 水平和蛋白水平的表达,结果显示,与 Ad-GFP 组相比,Ad-GFP-wnt3 感染 14-19 细胞 72 h 后,上皮标记物 E-cadherin 表达明显下降,间质标记物 N-cadherin、vimentin、twist1 明显上调( $P<0.05$ ,图 6)。

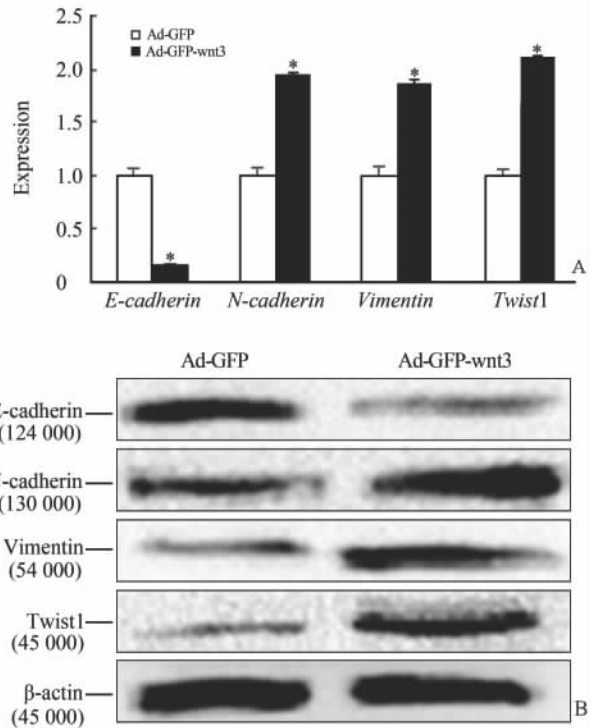


图 6 实时定量 PCR(A)和蛋白质印迹分析(B)检测 Ad-GFP-wnt3 感染后 14-19 细胞 EMT 相关标记物的表达  
**Fig 6 Real-time PCR (A) and Western blotting analysis (B) of expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers in 14-19 cells infeced with Ad-GFP-wnt3**  
 \*  $P<0.05$  vs Ad-GFP group.  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$

### 3 讨论

肝脏发生纤维化改变时,大量的肝前体细胞和肝星状细胞积聚,肝组织能检测到 EMT 标记物,说明 EMT 被激活<sup>[10]</sup>。肝前体细胞同时表达上皮和间质标记物,其分化和肝脏发育的过程均伴随着间质上皮转化的发生<sup>[11]</sup>。因此,我们推测在肝纤维化时发生 EMT 的靶细胞很有可能是肝前体细胞。Wnt 信号途径在肝前体细胞的分化过程中发挥着重要作用<sup>[12]</sup>,但其诱导肝前体细胞发生 EMT 的具体机制尚不明确。本课题组在前期工作中分离鉴定了小鼠肝前体细胞,并在此基础上导入含 LoxP 位点特异修饰的 SV40 大 T 抗原,构建了可逆性永生化肝前体细胞株 14-19 细胞<sup>[13]</sup>。本实验通过 Ad-GFP-wnt3 感染诱导 14-19 细胞高表达 wnt3,来探讨 wnt3 对 14-19 细胞发生 EMT 的具体机制。在形态学上,高表达 wnt3 的 14-19 细胞由纺锤体形态转变为长梭形,细胞间隙增大。细胞划痕实验和细胞迁移实验表明,高表达 wnt3 的 14-19 细胞迁移能力大

大提高;同时实时定量 PCR 和蛋白质印迹分析证实了高表达 wnt3 下调 14-19 细胞中上皮标记物 E-cadherin 的表达,上调间质标记物 N-cadherin、vimentin 和 twist1 的表达,提示 wnt3 能诱导 14-19 细胞发生 EMT 现象。

以上结果表明,wnt 信号途径参与了小鼠肝前体细胞 EMT 的发生发展过程,其中 wnt 经典蛋白 wnt3 被证实能够诱导小鼠肝前体细胞发生 EMT,这为我们进一步研究肝纤维化的发生机制提供了可靠的证据。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Lotersztajn S, Julien B, Teixeira-Clerc F, Grenard P, Mallat A. Hepatic fibrosis: molecular mechanisms and drug targets[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005, 45: 605-628.
- [2] Nevzorova Y A, Hu W, Cubero F J, Haas U, Freimuth J, Tacke F, et al. Overexpression of c-myc in hepatocytes promotes activation of hepatic stellate cells and facilitates the onset of liver fibrosis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1832:1765-1775.
- [3] Thiery J P, Acloque H, Huang R Y, Nieto M A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. *Cell*, 2009, 139:871-890.
- [4] Deng H, Wang H F, Gao Y B, Jin X L, Xiao J C. Hepatic progenitor cell represents a transitioning cell population between liver epithelium and stroma[J]. *Med Hypotheses*, 2011, 76:809-812.
- [5] Villar J, Cabrera N E, Valladares F, Casula M, Flores C, Blanch L, et al. Activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway by mechanical ventilation is associated with ventilator-induced pulmonary fibrosis in healthy lungs[J]. *PLoS One*, 2011, 6:e23914.
- [6] Mesar I, Kes P, Juki N B. [A role of WNT in kidney development and function] [J]. *Acta Med Croatica*, 2012, 66 Suppl 2:56-58.
- [7] Tian X, Liu Z, Niu B, Zhang J, Tan T K, Lee S R, et al. E-cadherin/ $\beta$ -catenin complex and the epithelial barrier[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011:567305.
- [8] Tsukada S, Parsons C J, Rippe R A. Mechanisms of liver fibrosis[J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 364(1-2):33-60.
- [9] Guo Y, Xiao L, Sun L, Liu F. Wnt/beta-catenin signaling: a promising new target for fibrosis diseases[J]. *Physiol Res*, 2012, 61:337-346.
- [10] Mederacke I. Liver fibrosis-mouse models and relevance in human liver diseases[J]. *Z Gastroenterol*, 2013, 51:55-62.
- [11] Li B, Zheng Y W, Sano Y, Taniguchi H. Evidence for mesenchymal-epithelial transition associated with mouse hepatic stem cell differentiation[J]. *PLoS One*, 2011, 6:e17092.
- [12] Bi Y, Huang J, He Y, Zhu G H, Su Y, He B C, et al. Wnt antagonist SFRP3 inhibits the differentiation of mouse hepatic progenitor cells [J]. *J Cell Biochem*, 2009, 108:295-303.
- [13] Huang J, Bi Y, Zhu G H, He Y, Su Y, He B C, et al. Retinoic acid signalling induces the differentiation of mouse fetal liver-derived hepatic progenitor cells[J]. *Liver Int*, 2009, 29:1569-1581.

[本文编辑] 孙岩