

· 论 著 ·

丁酸钠体外诱导大鼠肝卵圆细胞系 WB-F344 细胞分化为胆管上皮细胞

唐庆贺¹, 杨文², 谈冶雄², 周伟平^{1*}

(1. 第二军医大学东方肝胆外科医院肝外三科, 上海 200438; 2. 东方肝胆外科研究所国际合作信号转导实验室)

[摘要] **目的:** 观察不同浓度丁酸钠对大鼠肝卵圆细胞系 WB-F344 细胞生长、分化的影响, 探讨丁酸钠体外诱导 WB-F344 细胞分化为胆管上皮细胞的条件及分化规律。 **方法:** 不同浓度丁酸钠(0.75、2.25、3.75、4.5 mmol/L)作用于 WB-F344 细胞(丁酸钠处理组), 观察细胞形态学的变化, MTT 法检测细胞生长情况, 3.75 mmol/L 丁酸钠作用 WB-F344 细胞后, 免疫组化观察细胞角蛋白 19(CK19)蛋白表达的变化; RT-PCR 观察 CK19、 β 4-整合蛋白、 γ -谷氨酰转肽酶(GGT)以及甲胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB) mRNA 表达的变化。以同期常规培养未作处理的 WB-F344 细胞作为空白对照组。 **结果:** 丁酸钠处理后, 各组 WB-F344 细胞生长均受到抑制, 3.75、4.5 mmol/L 丁酸钠处理组光密度值明显低于空白对照组($P < 0.01$), 而 0.75、2.25 mmol/L 组与空白对照组无明显差异; 3.75、4.5 mmol/L 丁酸钠诱导后细胞变大变圆, 细胞核增大, 核质比减小, 而 0.75、2.25 mmol/L 组细胞形态无显著变化。3.75 mmol/L 丁酸钠处理组 WB-F344 细胞 CK19 阳性率为(92.3±1.1)%, 明显高于空白对照组(1.3±0.2)%($P < 0.01$)。3.75 mmol/L 丁酸钠处理组可见 β 4-integrin 表达, 而空白对照组未见表达; GGT、CK19 表达较空白对照组增强; 空白对照组见 AFP 表达, 而 3.75 mmol/L 丁酸钠处理组未见表达; ALB 在两组均未见表达。 **结论:** 3.75 mmol/L 丁酸钠适合体外诱导大鼠肝卵圆细胞系 WB-F344 细胞向胆管上皮细胞分化。

[关键词] WB-F344 细胞; 丁酸钠; 胆管; 上皮细胞; 细胞分化**[中图分类号]** R 329.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)01-0032-04Sodium butyrate induces rat liver oval cells WB-F344 differentiating into biliary epithelium cells *in vitro*TANG Qing-he¹, YANG Wen², TAN Ye-xiong², ZHOU Wei-ping^{1*} (1. Department of Hepatic Surgery III, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China; 2. International Cooperation Laboratory on Signal Transduction, Eastern Hepatobiliary Surgery Institute)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effect of sodium butyrate (different concentrations) on the growth and proliferation of rat liver oval cell line WB-F344, and to discuss the conditions and rules for sodium butyrate-induced WB-F344 cells differentiation into biliary lineage *in vitro*. **Methods:** WB-F344 cells were treated with sodium butyrate (0.75, 2.25, 3.75, 4.5 mmol/L) and the cell growth and morphological changes were observed; routinely cultured WB-F344 cells were taken as control. The changes of CK19 protein expression were examined immunohistochemically after WB-F244 cells were treated with 3.75% sodium butyrate; and the expression of phenotypic markers, such as γ -glutamyltransferase (GGT), β 4-integrin, CK19, AFP and ALB at mRNA level were determined by RT-PCR. Untreated WB-F344 cells were used as blank control. **Results:** We found that sodium butyrate inhibited the growth of WB-F344 cells. The optical densities were significantly decreased in 3.75 and 4.5 mmol/L groups compared with that in control group($P < 0.01$); but no significant difference was found between 0.75, 2.25 mmol/L groups with control group. WB-F344 cells treated with 3.75, 4.5 mmol/L sodium butyrate became larger and round, with increased nuclei and decreased nucleus to cytoplasm ratio; those treated with 0.75, 2.25 mmol/L had no obvious changes. Immunohistochemical results showed that sodium butyrate significantly increased CK19 expression compared with control group([92.3±1.1]% vs [1.3±0.2]%, $P < 0.01$). RT-PCR showed increased expression of β 4-integrin in sodium butyrate treated groups, but not in control group; the expression of GGT and CK19 was higher than that of control group. Alpha-fetoprotein (AFP) expression was observed in blank control group, but not in sodium butyrate treated cells. Albumin expression was not detected in the 2 groups. **Conclusion:** Sodium butyrate at 3.75 mmol/L is suitable for inducing WB-F344 cells differentiate into the biliary lineage *in vitro*.

[KEY WORDS] WB-F344 cells; sodium butyrate; bile ducts; epithelial cells; cell differentiation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(1):32-35]

肝卵圆细胞被认为是肝脏中的前体细胞, 大量研究^[1]认为它能够在肝脏严重受损、肝细胞增殖受抑制的情况下被活化, 通过增殖、分化而产生成熟的肝细胞和胆管上皮细胞, 重建受损的肝组织。目前,

关于卵圆细胞分化机制的研究大多依赖于体外分化

[作者简介] 唐庆贺, 博士生. E-mail: peking301@hotmail.com

* Corresponding author. E-mail: ehphwp@126.com

模型。已有研究^[2-4]证实体外肝卵圆细胞可诱导分化为成熟肝细胞,但关于其诱导分化为胆管上皮细胞的报道还较少。丁酸钠是目前干细胞分化过程中广泛使用的一种分化刺激剂,有研究^[5]发现其可以体外诱导大鼠胚胎干细胞表达部分胆管上皮细胞标记物。本研究观察不同浓度丁酸钠对大鼠肝卵圆细胞系 WB-F344 细胞的分化刺激作用,初步探讨具体的诱导条件和分化规律,为后续研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 大鼠 WB-F344 肝卵圆细胞系由中国医学科学院药理所韩锐教授惠赠。TRIzol RNA 抽提试剂盒,RT-PCR 试剂盒购自 Gibco 公司;丁酸钠、DMEM 细胞培养液购自 Sigma 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物公司;0.05%胰蛋白酶-EDTA 购自 Gibco 公司;免疫组化 DAKO EnVision System, 细胞角蛋白 19(CK19)小鼠单克隆抗体购自美国 DAKO 公司;SP-9002 免疫组化试剂盒、DAB 试剂盒及 PBS 缓冲液购于北京中山生物技术有限公司;RT-PCR 所用引物由上海申能博彩公司合成。

1.2 不同浓度丁酸钠对 WB-F344 细胞影响

1.2.1 WB-F344 细胞的形态学观察 按 1×10^3 /孔的密度将 WB 细胞接种于 6 孔板,含 10%胎牛血清的 DMEM,在 37℃,体积分数 5%CO₂ 条件下培养。待细胞贴壁后按梯度分别加入 0.75、2.25、3.75、4.5 mmol/L 丁酸钠,每日在相差显微镜下观察细胞的增殖和形态变化。

1.2.2 WB-F344 细胞生长曲线的绘制 按 5×10^2 /孔的密度将 WB 细胞接种于 96 孔板内。待细胞贴壁后换成正常培养基和分别含 0.75、2.25、3.75、4.5 mmol/L 丁酸钠的培养基,每组细胞做 6 个复孔,培养基体积 200 μ l/孔。分别于 0、1、2、3、4、5 d 取出培养板,每孔加入四甲基偶氮唑盐溶液(MTT,5 mg/ml)20 μ l,37℃,继续孵育 4 h,终止培养,吸取孔中的培养上清液后,向每孔中加入 200 μ l 二甲亚砜,震荡 10 min,于酶联仪 490 nm 波长处测定各孔光密度值(D),计算平均值,以时间为横轴,光密度值为纵轴绘制各组细胞生长曲线。

1.3 丁酸钠诱导后 WB-F344 细胞 CK19 蛋白的表达 将高压消毒后的盖玻片置于紫外灯下照射 2 h,置于 6 孔板底,按上述密度接种 WB-F344 细胞于 6 孔板内,加入 3.75 mmol/L 丁酸钠。5 d 后取出盖玻片,以未作处理的同期 WB-F344 细胞作为对照,2 组随机取出 5 张盖玻片,生理盐水漂洗,甲醇/丙酮(1:1)固定过夜,PBS 浸泡、清洗后加抗 CK19 单克

隆抗体(1:100 稀释)放湿盒中 4℃ 冰箱过夜。PBS 清洗后再加 EnVision 标记的二抗,加 DAB 复合物显色,无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。阳性对照为正常大鼠肝脏 CK19 阳性片,阴性对照为 PBS 缓冲液代替一抗。采用双盲法于光学显微镜下观察,每个切片高倍镜下取 5 个视野,共 50 个视野。观察各视野内细胞胞质色泽,阳性判断结果为胞质呈棕褐色,细胞核紫蓝色;阴性判断结果为胞质无着色。分别计算阳性细胞所占各个视野总细胞数目的百分比,取平均值进行比较。

1.4 RT-PCR 检测丁酸钠诱导后 WB-F344 细胞标记物的表达

1.4.1 总 RNA 的抽提 收集诱导培养 5 d 的 WB-F344 细胞,加入 TRIzol 试剂,移入无 RNA 酶的 1.5 ml Eppendorf 管中。RNA 提取方法按说明书进行。提取的 RNA 用 30 μ l DEPC-H₂O 稀释,并用紫外分光光度计测定并计算 D_{260}/D_{280} 值,确定 RNA 纯度及含量。实验重复 3 次,每次做复管。取同期未做处理的 WB-F344 细胞作为空白对照。

1.4.2 引物设计 根据 GenBank 序列设计引物,交由上海申能博彩公司合成。具体序列如下,CK-19:上游 5'-GAG CTG GAG GTG AAG ATT CG-3',下游 5'-GCT AGG TCA ATG CCT GGT GT-3',扩增产物 419 bp; β 4-integrin:上游 5'-GGA AAT ACT GTG CCT GCT GC-3',下游 5'-GTG ATG TTT ACC AGG CGT CG-3',扩增产物 689 bp; γ -谷氨酰转氨酶(GGT):上游 5'-GGC TTG TTG ACC TTG GGC ATC TG-3',下游 5'-CCA GCA CCA GAA ACC GAT TCT TCA T-3',扩增产物 919 bp;白蛋白(ALB):上游 5'-AAG GCA CCC CGA TTA CTC CG-3',下游 5'-GCC ACT ACC CAC TGA AGC GT-3',扩增产物 608 bp;甲胎蛋白(AFP):上游 5'-CAG TGA GGA GAA ACG GTC CG-3',下游 5'-CCG GCT CGG GAT GTC TGG TA-3',扩增产物 252 bp。 β -actin:上游 5'-TGG GCC GCT CTA GGC ACC A-3',下游 5'-TGG CCT TAG GGT TCA GGG G-3',扩增产物 240 bp。

1.4.3 PCR 反应及条件 PCR 的总体积为 50 μ l:10 \times 缓冲液 5 μ l、10 mmol/L dNTP 1 μ l、2 μ l 反转录产物、模板上游引物 1 μ l、下游引物 1 μ l,加水稀释至 50 μ l,Taq 酶 0.5 μ l, β -actin 作内参照。反应条件:94℃变性 1 min,58℃退火 1 min,72℃延伸 1 min;35 个循环终末 72℃延伸 10 min。电泳 PCR 产物用 1.0%琼脂糖胶电泳分析。GDS-8000 凝胶成像系统成像,Gelworks 1D 软件分析。

1.5 统计学处理 实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS 软件包进行 t 检验。

2 结果

2.1 不同浓度丁酸钠对 WB-F344 细胞形态学及增殖的影响

2.1.1 不同浓度丁酸钠作用后 WB-F344 细胞形态的变化

与空白对照组(图 1A)相比,处理组中 0.75、2.25 mmol/L 丁酸钠处理后细胞表型变化不明显(图 1B);3.75、4.5 mmol/L 的丁酸钠可诱导 WB-F344 细胞出现明显的表型改变,处理 1 d 后相差显微镜显示 WB-F344 细胞形态变平,铺展面积增大,生长减慢,细胞核变大,核质比减小,5 d 基本上见不到原始状态的 WB-F344 细胞(图 1C);但 4.5 mmol/L 丁酸钠处理组细胞生长状况不佳,折光性弱,边界模糊,较多细胞脱壁死亡(图 1D)。

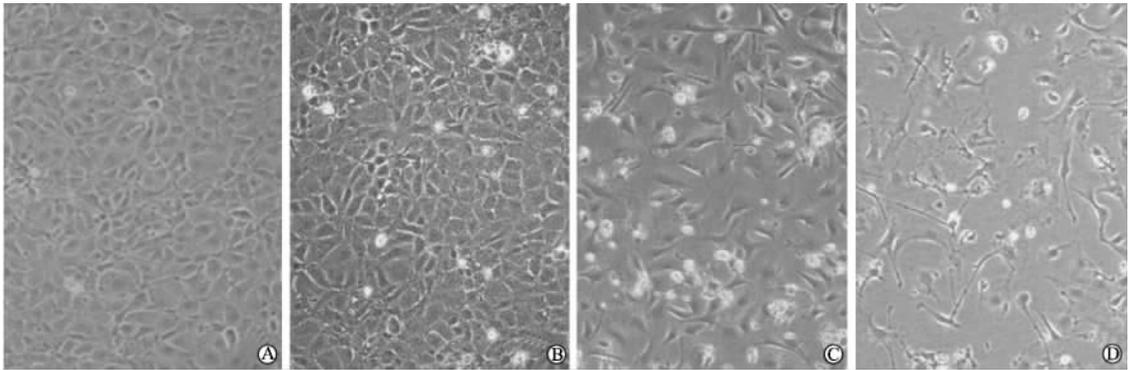


图 1 不同浓度丁酸钠对 WB-F344 细胞形态学的影响

Fig 1 Influence of sodium butyrate on morphology of WB-F344 cells (×200)

A:Control; B:2.25 mmol/L sodium butyrate-treated for 5 d;C:3.75 mmol/L sodium butyrate-treated for 5 d;D:4.5 mmol/L sodium butyrate-treated for 5 d

2.1.2 不同浓度丁酸钠对 WB-F344 细胞增殖的影响 由图 2 可见,丁酸钠处理 WB-F344 细胞 1 d 后,各组细胞生长开始受到抑制,3.75、4.5 mmol/L 丁酸钠处理组 D_{490} 明显低于空白对照组($P < 0.01$),而 0.75、2.25 mmol/L 组与空白对照组无明显差异。这表明丁酸钠对 WB-F344 细胞的增殖有抑制作用,并且其抑制作用随浓度增高、时间延长而增强。

色阳性细胞胞质呈淡黄色(图 3A),阳性率为(1.3 ± 0.2)%;丁酸钠诱导组(3.75 mmol/L)WB-F344 细胞被诱导 5 d 后 CK19 表达显著增强,阳性区域集中于胞质,呈深黄色(图 3B),阳性率为(92.3 ± 1.1)% ,二者有显著差异($P < 0.01$)。

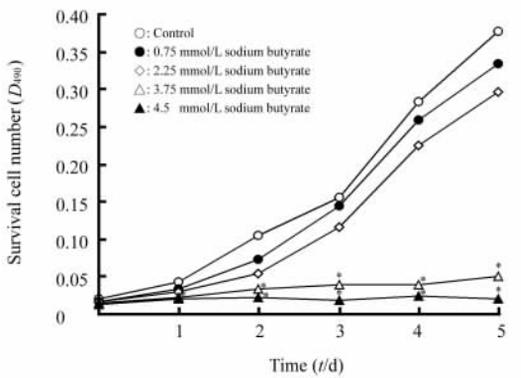


图 2 不同浓度丁酸钠作用后 WB-F344 细胞的生长曲线

Fig 2 Growth curve of WB-F344 cells after treatment with different concentrations of sodium butyrate

* $P < 0.05$ vs control group

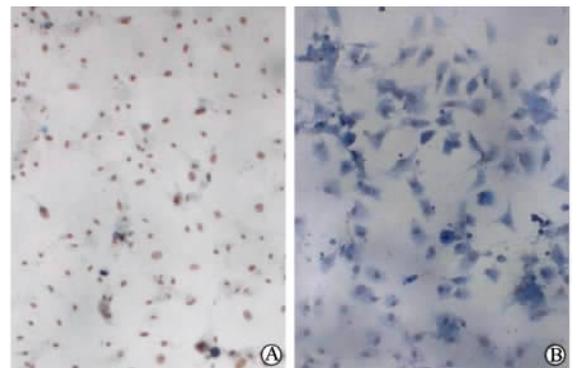


图 3 空白对照组(A)及丁酸钠诱导组(B) WB-F344 细胞 CK19 免疫组化染色

Fig 3 CK19 expression in sodium butyrate-treated and control WB-F344 cells (×200)

A: Slight CK19 expression in control group; B: Strong CK19 expression in sodium butyrate-treated(3.75 mmol/L,5 d) group

2.2 丁酸钠诱导后 WB-F344 细胞 CK19 蛋白表达

2.3 丁酸钠对 WB-F344 细胞标记物基因表达的影响

免疫组化结果发现,空白对照组 CK19 蛋白染

WB-F344 细胞经过 3.75 mmol/L 丁酸钠处理

5 d后可检测到 $\beta 4$ -integrin表达,空白对照组未见表达(图4A);丁酸钠处理5 d后GGT及CK19 mRNA的表达均较同期空白对照组细胞增强(图4A);AFP在空白对照组WB-F344细胞中有表达,但在丁酸钠处理5 d后未检测到表达(图4B);ALB在丁酸钠处理组及空白对照组均未见表达(图4B)。

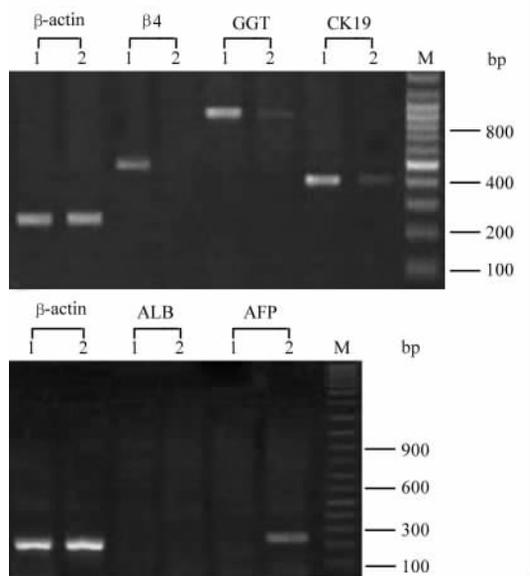


图4 空白对照组及丁酸钠处理组WB-F344细胞标记物基因的表达

Fig 4 Effect of sodium butyrate on mRNA

expression of cell marker genes in WB-F344 cells

M: Marker; 1: Sodium butyrate-treated (3.75 mmol/L, 5 d) group; 2: Control group

3 讨论

丁酸钠是在卵圆细胞及胚胎干细胞分化过程中广泛使用的一种刺激剂,但因为实验细胞及实验浓度的不同,诱导结果存在差异^[5-8]。WB-F344细胞系是目前普遍公认的大鼠肝卵圆细胞系^[9],相对于由传统动物模型中分离出的肝卵圆细胞具有生物学特性稳定、易于体外培养等优点,同时也利于进一步进行体内实验。本研究选用不同浓度的丁酸钠作用于WB-F344细胞,发现3.75 mmol/L的丁酸钠能诱导出明显的细胞表型改变;3.75 mmol/L以上的丁酸钠对细胞增殖的抑制作用较强,细胞生长状况不佳;3.75 mmol/L以下的丁酸钠处理组未明确检测出胆管细胞特异性标记物 $\beta 4$ -integrin和GGT的表达(结果未列出)。免疫组化结果表明3.75 mmol/L丁酸钠可以明显增加处理组胆管细胞标记物CK19蛋白的表达;在mRNA水平丁酸钠处理组细胞检测出胆管上皮细胞特异性标记物 $\beta 4$ -integrin的表达,而在空白对照组未见表达,CK19、GGT表

达均较空白对照组增高;同时也检测了肝细胞系的几个主要标记物,原始肝细胞标记物AFP在空白对照组可见表达,丁酸钠诱导5 d后未检测出表达,而肝细胞特异性标记物ALB在处理及空白对照组始终未见表达。综合以上形态学、蛋白及mRNA水平的检测结果表明:3.75 mmol/L的丁酸钠可能会特异性地诱导WB-F344细胞向胆管上皮细胞分化。此为卵圆细胞向胆系分化提供了稳定、简便的细胞模型,但本研究仅仅是初步观察,具体结论还有待后续研究进一步证实、验证。

目前尚不清楚丁酸钠诱导WB-F344细胞向胆管细胞分化的具体机制。以往研究^[10]提示肝前体细胞向肝细胞分化的过程中受HNF-3 α 和HNF-3 β 及HNF-4等转录因子调控。有研究^[6]表明WB-F344细胞在丁酸钠作用下,HNF-3 α 和HNF-3 β 的mRNA转录水平会明显降低。因此,可以推测丁酸钠在抑制WB-F344细胞增殖的同时也抑制了某些有利于向肝细胞转录因子的表达,导致WB-F344细胞停止向肝细胞分化,从而使其转向胆管上皮细胞分化,这有待以后进一步的研究加以证实。

[参考文献]

- [1] Oh SH, Hatch HM, Petersen BE. Hepatic oval "stem" cell in liver regeneration[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2002,13: 405-409.
- [2] Okaya A, Kitanaka J, Kitanaka N, et al. Oncostatin M inhibits proliferation of rat oval cells, OC15-5, inducing differentiation into hepatocytes[J]. *Am J Pathol*, 2005,166: 709-719.
- [3] Miura K, Nagai H, Ueno Y, et al. Epimorphin is involved in differentiation of rat hepatic stem-like cells through cell-cell contact [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003,311: 415-423.
- [4] 胡安斌,蔡继业,郑启昌,等. 胚胎干细胞向肝细胞定向诱导分化的体外实验研究[J]. *中华医学杂志*, 2003,83: 1592-1596.
- [5] Spagnoli FM, Amicone L, Tripodi M, et al. Identification of a bipotential precursor cell in hepatic cell lines derived from transgenic mice expressing cyto-Met in the liver[J]. *J Cell Biol*, 1998,143: 1101-1112.
- [6] Couchie D, Holic N, Chobert MN, et al. *In vitro* differentiation of WB-F344 rat liver epithelial cells into the biliary lineage [J]. *Differentiation*, 2002, 69(4-5): 209-215.
- [7] Blouin MJ, Lamy I, Loranger A, et al. Specialization switch in differentiating embryonic rat liver progenitor cells in response to sodium butyrate[J]. *Exp Cell Res*, 1995,217: 22-30.
- [8] 王萍,贾继东,唐淑珍,等. 丁酸钠诱导体外培养的大鼠肝卵圆细胞分化为成熟肝细胞[J]. *中华肝脏病杂志*, 2004,12: 718-721.
- [9] Coleman WB, McCullough KD, Esch GL, et al. Evaluation of the differentiation potential of WB-F344 rat liver epithelial stem-like cells *in vivo*. Differentiation to hepatocytes after transplantation into dipeptidylpeptidase-IV-deficient rat liver [J]. *Am J Pathol*, 1997,151: 353-359.
- [10] Darlington GJ. Molecular mechanisms of liver development and differentiation[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1999,11: 678-682.

[收稿日期] 2006-12-04

[修回日期] 2006-12-19

[本文编辑] 贾泽军,尹茶