

细胞角蛋白 19 启动子调控的双报告载体的构建及其在肝干/祖细胞分化研究中的应用*

张衡 贾雅丽 岳文 陈琳 谢小燕 南雪 何丽娟 裴海云** 裴雪涛**

(军事医学科学院输血医学研究所干细胞与再生医学研究室, 北京 100850)

摘要 肝干/祖细胞是肝细胞和胆管上皮细胞(biliary epithelial cells, BECs)共同的前体细胞, 为了对这一前体细胞的分化情况进行研究, 利用报告基因来监测肝干/祖细胞的分化走向。首先, 通过 PCR 方法从肝癌细胞系 HepG2 的全基因组中克隆了细胞角蛋白 19(CK19)启动子片段, 构建了 CK19 启动子调控的海肾荧光素酶和红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)双报告载体(pSicoR-CK19-hrl-mrfp)。其次, 将上述慢病毒载体转染肝干/祖细胞后, 通过流式细胞分选获得稳定转染的细胞株。再次, 将上述细胞株与表达“上皮形态发生素”(Epimorphin, EPM)的 PT67 细胞共培养后, 整合有 pSicoR-CK19-hrl-mrfp 表达载体的肝干/祖细胞不仅形态发生了变化, 而且排列为二维环状结构, 另外还检测到由 CK19 启动子启动表达的海肾荧光素酶和 RFP, 细胞形态和基因型都证明肝干/祖细胞经诱导已经分化成为 BECs。与此形成对照的是肝干/祖细胞与不表达 EPM 的 PT67 细胞共培养后, 没有观测到上述的变化。所以, CK19 启动子调控的双报告载体不仅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, 而且还可以定量地检测 CK19 启动子活性的变化情况。总之, 这一载体的成功构建将为研究肝干/祖细胞的分化提供了便捷的工具, 同时也有助于筛选可诱导肝干/祖细胞定向分化的分子。

关键词 细胞角蛋白, 海肾荧光素酶, 红色荧光蛋白, 肝干/祖细胞, 分化

学科分类号 Q291

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00034

肝脏中的上皮细胞除了占绝对主体的肝细胞外, 还存在着胆管上皮细胞(BECs), 这两类细胞在发育上是同源的, 具有共同的前体细胞 - 胚肝细胞(hepatoblast)^[1]。虽然 BECs 在肝脏全部细胞中的比例较低, 但它对于肝脏代谢功能的发挥尤其是胆汁的输送和浓度的调节起着至关重要的作用。因此, BECs 的分化及其机制研究对于肝胆相关疾病的治疗及“组织工程化肝单元”的构建都具有十分重要意义。但是在目前的干细胞肝组织工程研究中, 主要集中在向肝细胞的诱导分化上, 对于胆管细胞的研究甚少。

WB-F344(简称 WB)细胞是从正常成年雄性 Fisher 大鼠肝脏中分离出的一类二倍体上皮干/祖细胞系^[2-3], 非致瘤性, 表达部分肝细胞和 BECs 的标志^[4-5], 因此在表型上具有胚肝细胞的特征。WB 细胞体内可以分化为肝细胞^[6]和 BECs^[7], 在体外也是研究向肝细胞^[8]和 BECs^[9]分化的一个良好的肝干/祖细胞模型。

细胞角蛋白(cytokeratins, CKs)是上皮类细胞重要的标志, 它属于中间纤维家族, 与细胞分化和细胞骨架的组织有关^[10]。在肝脏中 CKs 有着广泛的表达, 肝细胞表达 CK8 和 CK18, 同时 BECs 表达 CK7 和 CK19, 也表达 CK8 和 CK18, 其中 CK19 是 BECs 特异性的基因^[10]。

EPM 蛋白最初发现于 1992 年, 随后发现这个分子属于一个高度保守的 syntaxin 蛋白家族, 因而又被命名为 syntaxin2。EPM/syntaxin2 基因定位在大鼠 12 号染色体长臂 16 区(人和小鼠的分别定位在 7 号和 5 号染色体), 基因编码序列为 911 bp,

* 国家高技术研究发展计划(863)(2006AA02A107), 国家重点基础研究发展规划(973)(2005CB522702)和国家自然科学基金(30901441)资助项目。

** 通讯联系人。Tel: 010-66931974, 010-66932240

裴海云。E-mail: peihy@hotmail.com

裴雪涛。E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2010-01-14, 接受日期: 2010-05-04

编码 290 个氨基酸. EPM 蛋白存在着三种亚型: I、II 型为 34 ku(在 C 端有跨膜区, N 端位于细胞外), III 型为 31 ku(无跨膜区, 存在于细胞质中), 这三种形式的蛋白质是由选择性剪接产生的^[11]. 前人^[12-16]的工作证明, EPM 作为一个上皮形态发生素广泛参与各种器官中的管腔形态发生过程, 而我们研究室近期的工作也进一步表明, 不可溶性 EPM(insoluble epimorphin, i-EPM)蛋白可以诱导 WB 细胞产生胆管样形态发生.

在本研究中, 我们选取 WB 细胞作为种子细胞, 以表达 EPM 的 PT67(EPM-PT67)细胞作为滋养层细胞, 观察 CK19 启动子调控的海肾荧光素酶和 RFP 这一载体对于肝前体细胞向胆管细胞方向分化的报告作用, 检测肝前体细胞向胆管细胞分化的情况. 这一载体的成功应用将为研究肝干/祖细胞的分化、筛选可诱导肝干/祖细胞定向分化的分子提供便捷的工具.

1 材料与方法

1.1 材料

293FT 细胞购自 Invitrogen 公司; WB 细胞、HepG2 细胞、胆管上皮细胞系(PLC/RF/5)、PT67 细胞由本室保存; EPM-PT67 细胞由本室构建并保存. 高糖 DMEM 培养基、RPMI1640 细胞培养基、丙酮酸钠、 β -巯基乙醇(β -mercaptoethanol, β -ME)、非必需氨基酸(non-essential amino acids, NEAA)、L-谷氨酰胺均购自 Sigma 公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、细胞因子 B27 为 Gibco 公司产品; 慢病毒干涉载体 pSicoR-GFP 由 Tyler Jacks 教授馈赠; 重组 EPM 蛋白由日本京都大学尖端医学研究所(Institute for Frontier Medical Sciences)的 Yohei Hirai 教授馈赠; 慢病毒包装质粒 pLP1、pLP2 和包膜质粒 pLP/VSVG 购自 Invitrogen 公司; T 载体购自 Promega 公司; PCR 试剂盒、高保真 DNA 聚合酶(Pyrobest DNA polymerase)、*Xba* I、*Hpa* I、*Bam*H I、*Not* I 限制性内切酶、DNA 连接酶、Klenow 片段购自 TaKaRa 公司; 胶回收试剂盒和小量质粒提取试剂盒购自北京道普公司; 转染级质粒抽提试剂盒购自 Qiagen 公司; 转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; 感受态细胞 DH5 α 购自北京博迈德公司; 海肾荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司; 丝裂霉素 C 购自 Roche 公司; CK19 和 GGT 的抗体购自 Santa Cruz 公司; 细胞培养瓶、24 孔细胞培养板购自 Corning 公司;

荧光显微镜购自 Olympus 公司; 流式细胞分选仪为 Cytomation 公司产品; CCD 相机为 XENGEN Imaging Technologies IVISTM 50.

1.2 方法

1.2.1 质粒构建.

a. CK19 启动子调控的海肾荧光素酶和 RFP 双报告载体的构建. 从 HepG2 的全基因组中利用高保真 DNA 聚合酶扩增 CK19 启动子序列(human cytokeatin promoter, HCP), 在 PCR 引物前后分别加上 *Xba* I、*Hpa* I 酶切位点, 引物序列为: HCP 正向引物: 5' TCTAGAAATCCCAGCACTTTGGG-CGGC 3', HCP 反向引物: 5' GTTAACGGCGAG-GCGGAGCACGGAC 3'. 从 pcDNA3.1-hrl-mrpf-ttk 载体^[17]中用高保真 DNA 聚合酶扩增海肾荧光素酶和 RFP 融合基因(renilla luciferase and monomeric red fluorescence protein, hrl-mrpf), 在 PCR 引物前后分别加上 *Hpa* I、*Bam*H I 酶切位点, 引物序列为: 正向引物: 5' GTTAACATGGCTTCCAAGG-TGT ACGACCCC 3', 反向引物: 5' GGATCC-CAGACATGATAAGATACATTGATGA 3'. 用高保真 DNA 聚合酶从 pcDNA3.1 质粒中扩增 poly A 序列, 在 PCR 引物前后分别加上 *Bam*H I、*Not* I 酶切位点, 引物序列为: 正向引物: 5' CGC-GGATCCCTGTGCCTTCTAGTTGC 3', 反向引物: 5' ATAAGAATGCGCCGCTCAGAAGCCATAGA 3'. 上述 3 种 PCR 产物回收后, 分别连接到 T 载体, 转化 DH5 α 感受态细胞后经蓝白斑筛选得到阳性克隆, 提取质粒经双酶切和测序鉴定正确后待用. 用 *Xba* I、*Hpa* I 双酶切连接在 T 载体上的 CK19 启动子, 回收这一启动子序列片段, 同时用 *Xba* I、*Hpa* I 双酶切 pSicoR 载体, 回收大片段, 将回收的 2 个片段连接后, 转化 DH5 α 感受态细胞, 提取质粒, *Xba* I、*Hpa* I 双酶切验证后经 *Hpa* I、*Bam*H I 双酶切后回收大片段, 同时用 *Hpa* I、*Bam*H I 双酶切并回收连接在 T 载体上的 hrl-mrpf 片段, 连接 2 个片段后, 转化 DH5 α 感受态细胞, 提取质粒, *Xba* I、*Hpa* I、*Bam*H I 三酶切验证后经 *Bam*H I、*Not* I 双酶切回收大片段, 同时用 *Bam*H I、*Not* I 双酶切 T 载体上的 poly A 片段, 将回收的 2 个片段连接, 转化 DH5 α 感受态细胞, 提取质粒经 *Xba* I、*Hpa* I、*Bam*H I、*Not* I 四酶切后测序鉴定. 最终获得 pSicoR-CK19-hrl-mrpf 质粒.

b. 对照载体的构建. 用 *Xba* I、*Hpa* I 双酶切

pSicoR-CK19-hrl-mrfp 质粒, 切除 CK19 启动子片段, 然后回收载体大片段, 用 Klenow 片段将 *Xba* I 切开的粘性末端补平, 然后用 DNA 连接酶将两端连接后, 转化 DH5 α 感受态细胞, 提取质粒, *Eco*R I 双酶切鉴定正确后测序鉴定, 最终获得 pSicoR-hrl-mrfp 质粒。

1.2.2 包装病毒. 293-FT 细胞培养条件为: 高糖 DMEM 培养基添加 10%FBS、0.1 mmol/L NEAA、2 mmol/L L-谷氨酰胺、500 mg/L G418. 转染前撤除 G418. 表达载体 pSicoR-CK19-hrl-mrfp 或对照载体 pSicoR-hrl-mrfp 及包装质粒 pLP1、pLP2、pLP/VSVG 质粒用 Lipofectamine 2000 共转染 293FT 细胞. 10 h 后更换含 1 mmol/L 丙酮酸钠的完全培养基(培养基中不能含有抗生素). 转染 48~72 h 后收集上清于 15 ml 的无菌离心管中. 用 0.45 μ m 的滤膜过滤以去除细胞碎片, 将病毒上清液用 40% PEG 沉淀, 4℃、4 000 r/min 离心 45 min 浓缩毒液, 然后直接感染靶细胞或分装冻存于 -70℃ 备用。

1.2.3 获得稳定转染 pSicoR-CK19-hrl-mrfp 或 pSicoR-hrl-mrfp 的 PLC/RF/5. PLC/RF/5. 培养条件为: 高糖 DMEM 添加 10% FBS. 去除 PLC/RF/5 细胞的培养基, 加入含有 pSicoR-CK19-hrl-mrfp 的慢病毒毒液或对照载体 pSicoR-hrl-mrfp 的慢病毒毒液及终浓度为 8 mg/L 的聚凝胺(Polybrene), 置 37℃、5%CO₂ 的孵箱中培养过夜. 次日, 去除毒液, 添加完全培养基, 待细胞生长至 80%~90%汇合时, 按 1:3 传代, 流式细胞术分选表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的细胞, 得到稳定转染 pSicoR-CK19-hrl-mrfp 或 pSicoR-hrl-mrfp 的 PLC/RF/5 细胞株。

1.2.4 海肾荧光素酶活性的检测. 将上述稳定转染 pSicoR-CK19-hrl-mrfp 或 pSicoR-hrl-mrfp 的 PLC/RF/5 细胞株接种在 24 孔板和 96 孔板中, 待生长至 90%的汇合度时, 观察 RFP 的表达情况. 同时用海肾荧光素酶检测试剂盒将培养在 96 孔板中的细胞裂解 10 min, 然后将海肾荧光素酶底物稀释 50 倍后加入孔板中, 用 CCD 相机拍照。

1.2.5 获得稳定转染 pSicoR-CK19-hrl-mrfp 的 WB 细胞株. WB 细胞的培养基为: RPMI1640 培养基添加 10% FBS. 去除 WB 细胞的培养基, 加入含有 pSicoR-CK19-hrl-mrfp 的慢病毒毒液及终浓度为 8 mg/L 的 Polybrene, 置 37℃、5%CO₂ 的孵箱中培养过夜. 次日, 去除毒液, 添加完全培养基, 传代

保种. 待细胞生长至 80%~90%汇合时, 按 1:3 传代, 流式细胞术分选表达 GFP 的细胞, 得到稳定转染 pSicoR-CK19-hrl-mrfp 的 WB 细胞株。

1.2.6 WB 细胞向 BECs 的分化. 稳定转染 pSicoR-CK19-hrl-mrfp 的 WB 细胞株与 EPM-PT67 细胞共培养诱导前者分化为 BECs. EPM-PT67 和 PT67 的培养基为高糖 DMEM 添加 10% FBS. 将这 EPM-PT67 和 PT67 细胞制成单细胞悬液, 在 37℃ 用 15 mg/L 丝裂霉素 C 处理细胞 40 min, 以阻断其分裂增殖能力, 然后将 3 $\times$ 10⁴ 细胞接种到 24 孔板的一个孔中. 次日, 将 3 $\times$ 10⁴ WB 细胞接种到铺有 EPM-PT67 细胞或 PT-67 细胞的孔内, 共培养体系为 RPMI1640 培养基添加 3% FBS 和 2% B27, 共培养 5 天后观测 RFP 的表达情况, 同时细胞裂解处理 10 min, 然后将海肾荧光素酶底物稀释 50 倍后加入孔板中, 立即用 CCD 相机拍照。

1.2.7 RT-PCR 分析与 EPM-PT67 细胞或 PT67 细胞共培养后 WB 细胞相关基因的表达. 用 TRIzol 试剂提取与 EPM-PT67 细胞或 PT67 细胞共培养后 WB 细胞总 mRNA. 然后采用 AMV 反转录酶进行 cDNA 的合成, 接下来以 β -actin 为内参, 采用 PCR 方法检测两种共培养体系中肝胆相关基因 mRNA 表达量的变化情况. RT-PCR 所用引物如下: GGT 正向引物, 5' GTCACCAACTCA - ACTCTGC 3', GGT 反向引物, 5' CCTTATCACTGTTTACCTCGG 3'; Yp 正向引物, 5' TGGAAGGAGGAGGTGGTTAC 3', Yp 反向引物, 5' TGTCCTTCGTCCACTACTG 3'; ALB 正向引物, 5' GACAAGTTATGCGCCATTCC 3', ALB 反向引物, 5' ACTGGGTCAGAACCTCATTG 3'; AFP 正向引物, 5' TGAAATTTGCCACGAGACGG 3', AFP 反向引物, 5' TGTCATACTGAGCGGCTAAG 3'; CK19 正向引物, 5' TTGCGCGACAAGATTCTTGG 3', CK19 反向引物, 5' CATCTCACTCAGGATCTTGG 3'; CK18 正向引物, 5' CACCACCTTCTCCACCAACT 3', CK18 反向引物, 5' TCGGTTTCCAGGTTCTTCAC 3'; beta-actin 正向引物, 5' GTTGTCCCTGTATGCCTCTG 3', beta-Actin 反向引物, 5' GAGCCAGGGCA-GTAATCTC 3'. β -actin 为 PCR 的内参, 反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 53℃ 30 s, 72℃ 30 s, 25 个循环; 72℃ 7 min。

1.2.8 Western blotting 分析诱导细胞的 CK19 蛋白和 GGT 蛋白表达. 取与 EPM-PT67 细胞或 PT67 细胞共培养 5 天后的 WB 细胞进行 CK19 蛋白和

GGT 蛋白质 Western blotting 分析.

2 结 果

2.1 成功构建 CK19 启动子调控的海肾荧光素酶和 RFP 双报告载体

我们通过 PCR 方法成功地克隆产生人 CK19 基因启动子序列(HCP, -732~1, 图 1a), 该序列经凝胶回收后连接入 T 载体, 测序鉴定正确后, 将其替换掉 pSicoR 载体的 U6 启动子. 同时也克隆了 hrl-mrffp 和 poly A 序列, 将其也分别连接入 T 载体, 经测序鉴定正确. 随后用 *Hpa* I 和 *Bam* H I 双酶切连接在 T 载体上的 hrl-mrffp 序列, 将其插入到 CK19 启动子下游. 最后在 hrl-mrffp 的下游 *Bam* H I 和 *Not* I 两位点之间插入 poly A 序列, 以稳定这一载体的表达. *Xba* I、*Hpa* I、*Bam* H I、*Not* I 四酶切鉴定正确(图 1b), 表明成功构建 pSicoR-CK19-hrl-mrffp 质粒. 另外, 在上述质粒 *Xba* I 和 *Hpa* I 两位点之间切除 CK19 启动子(图 1c), 用 Klenow 片段将粘性末端补平后, 再将两平端连接得到对照载体 pSicoR-hrl-mrffp, 双酶切鉴定正确(图 1d).

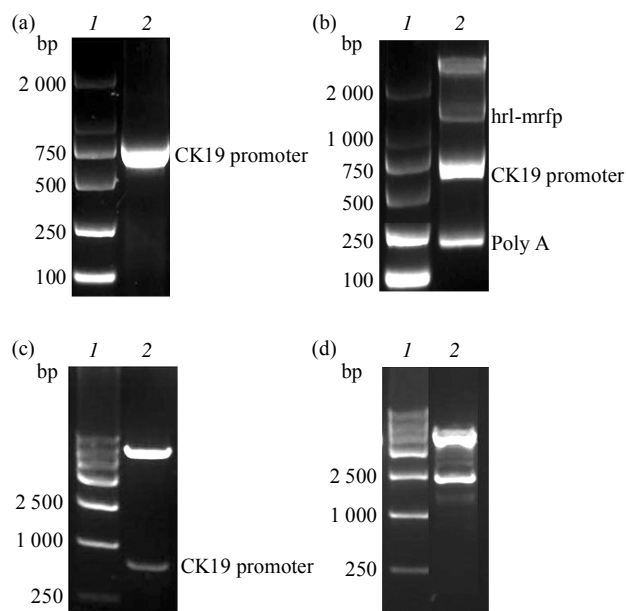


Fig. 1 Construct of vector with Renilla luciferase and RFP under the control of the CK19 promoter and contrast vector

(a) Cloning human cytokeratin 19 promoter (CK19 promoter) by PCR. 1: Marker; 2: PCR products of CK19 promoter fragment. (b) pSicoR-CK19 promoter-hrl-mrffp plasmid digested by *Xba* I/*Hpa* I/*Bam* H I/*Not* I. 1: Marker; 2: Digested fragments. (c) pSicoR-CK19 promoter-hrl-mrffp plasmid digested by *Xba* I/*Hpa* I. 1: Marker; 2: Digested fragments. (d) pSicoR-hrl-mrffp plasmid digested by *Eco* R I. 1: Marker; 2: Digested fragments.

2.2 慢病毒毒液的产生

将表达载体 pSicoR-CK19-hrl-mrffp 或对照载体 pSicoR-hrl-mrffp 及包装质粒 pLP1、pLP2、pLP/VSVG 用 Lipofectamine 2000 共转染 293FT 细胞 48 h 后于荧光显微镜下观察: 大部分细胞强表达 GFP(图 2a), 并形成大量合胞体(图 2b), 病毒已开始进行包装. 转染 72 h 后收集细胞上清液并离心去除细胞碎片. 将病毒上清液用 40%PEG 沉淀, 4℃、4 000 r/min 离心 45 min 浓缩毒液, 然后直接感染靶细胞或分装冻存于-70℃备用.

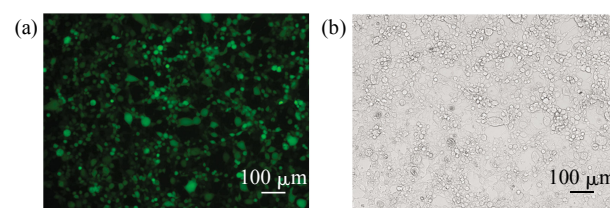


Fig. 2 Producing lentivirus in 293FT cells

(a) The EGFP expression of 293FT cells after transfection with lentiviral vectors. (b) The appearance of multinucleated syncytia in 293FT cells by the expression of the pLP/VSVG glycoprotein.

2.3 感染并获得稳定转染 pSicoR-CK19-hrl-mrffp 载体及对照载体 pSicoR-hrl-mrffp 的 PLC/RF/5 细胞株

由于 PLC/RF/5 细胞高表达 CK19, 因此我们选择 PLC/RF/5 细胞作为表达载体功能验证的靶细胞. 感染前一天在 6 孔板的每一孔中接种 2×10^5 数量的 PLC/RF/5 细胞, 感染时用添加有 8 mg/L Polybrene 的 1 ml pSicoR-CK19-hrl-mrffp 的慢病毒毒液或对照载体 pSicoR-hrl-mrffp 的慢病毒毒液更换 PLC/RF/5 细胞培养基, 次日更换为生长培养基培养. 2 天后荧光显微镜下观察, 可见大约 70% 的细胞表达 GFP 和 RFP, 表明慢病毒已经整合到细胞基因组. 经流式细胞术分选后, 所有 PLC/RF/5 细胞均表达 GFP(图 3a, 图 3c). 此外, 转染对照载体 pSicoR-hrl-mrffp 的 PLC/RF/5 细胞高效表达 GFP, 不表达 RFP(图 3b). 转染载体 pSicoR-CK19-hrl-mrffp 的 PLC/RF/5 细胞高效表达 GFP 的同时也表达 RFP(图 3d), 这说明 RFP 的表达确实是由其上游的 CK19 启动子启动的.

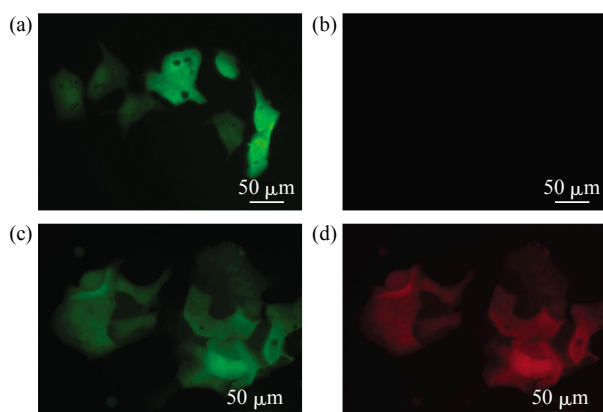


Fig. 3 The GFP and RFP expression of after infection with lentivirus

(a, b) PLC/RF/5 cells infected with lentivirus containing contrast vector. (c, d) PLC/RF/5 cells infected with lentivirus containing pSicoR-CK19-hrl-mrpf.

2.4 PLC/RF/5 稳定株的海肾荧光素酶表达的检测

转染 pSicoR-CK19-hrl-mrpf 和对照载体 pSicoR-hrl-mrpf 的 PLC/RF/5 稳定株表达海肾荧光素酶的情况。CK19 启动子启动表达的海肾荧光素

酶的活性增强(图 4a), 当 CK19 启动子被切除后没有海肾荧光素酶的表达(图 4b)。

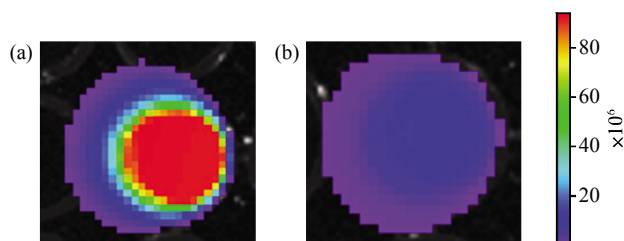


Fig. 4 The renilla luciferase expression after infection with lentivirus in PLC/RF/5

Luc imaging of (a) reporter vector pSicoR-CK19-hrl-mrpf showed high renilla luciferase activity compared to (b) contrast vector.

2.5 感染并获得稳定转染 pSicoR-CK19-hrl-mrpf 的 WB 细胞株

去除 WB 细胞的培养基, 加入含有 pSicoR-CK19-hrl-mrpf 的慢病毒毒液及终浓度为 8 mg/L 的 Polybrene 进行转染, 转染后阳性率为 80%(图 5a)。流式细胞术分选表达 GFP 的细胞, 扩大培养后光镜下观察细胞呈“铺路石”状(图 5b), 荧光显微镜下可见全部细胞均表达 GFP (图 5c)。

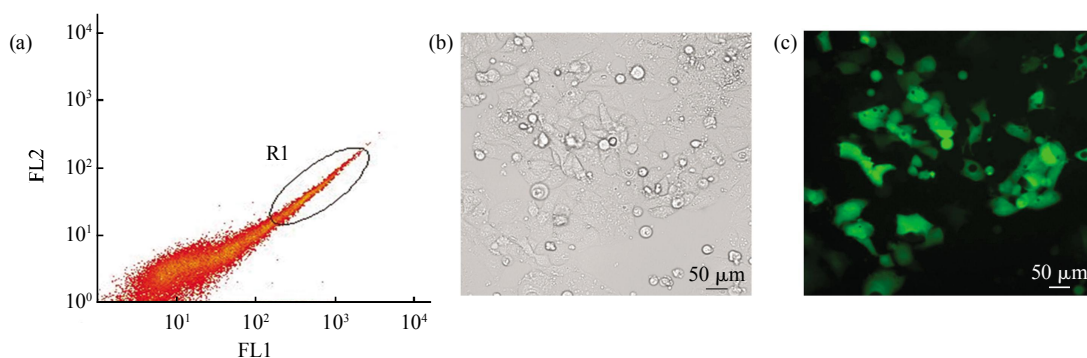


Fig. 5 The EGFP expression of WB cells sorted by FACS

(a) WB cells/pSicoR-CK19-hrl-mrpf sorted by FACS. EGFP expression of sorted transfected-WB cells imaged by light microscope (b) and fluorescence microscope (c) (in same area).

2.6 稳定转染 pSicoR-CK19-hrl-mrpf 的 WB 细胞株与 EPM-PT67 细胞共培养诱导前者分化为 BECs

用丝裂霉素 C 处理 EPM-PT67 和 PT67 细胞 40 min, 阻断其分裂增殖能力, 然后将 3×10^4 细胞接种到 24 孔板的一个孔中。次日, 将 3×10^4 WB 细胞接种到铺有 EPM-PT67 细胞和 PT67 细胞的孔中, 共培养体系为 RPMI1640 培养基添加 3%FBS 和 2% B27。共培养 5 天后, 发现 WB 细胞的生长开始停滞, 核质比变大, 细胞开始收缩并拉伸成长

梭形, 最终排列成二维环状结构(图 6d), 此外, 还观测到 CK19 启动子活性上调后 RFP 开始表达(图 6e), 这些结果表明在 EPM 诱导下 WB 细胞分化成了 BECs, 两张图片叠加显示原位关系(图 6f)。与此形成对照的是培养在 PT67 细胞表面的 WB 细胞仍为多角形细胞, 排列也无特定形状(图 6a), 而且也没有出现 CK19 启动子活性上调的情况(图 6b), 将两张图片叠加显示其原位关系(图 6c)。

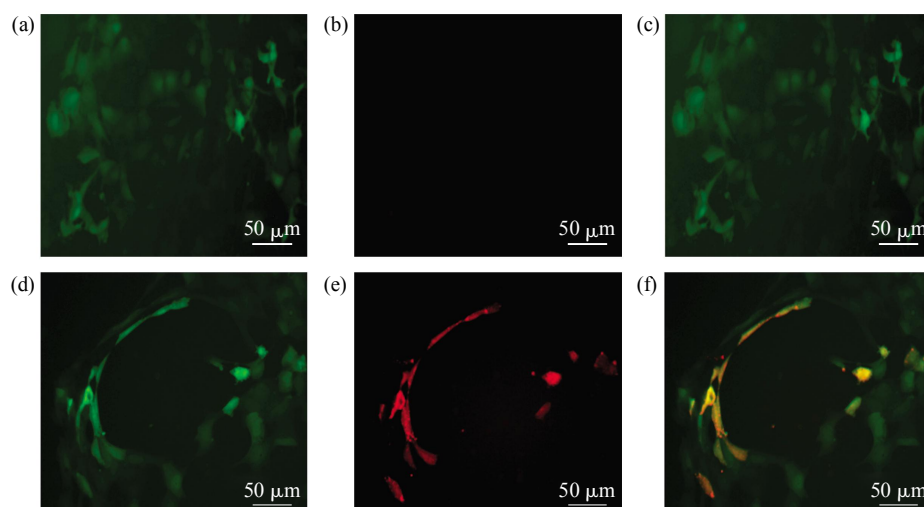


Fig. 6 The comparison of RFP expression promoted by CK19 after co-culture with PT67 cells and EPM-PT67 cells

After enriched stable transduction of WB cells with reporter vector pSicoR-CK19-hrl-mrfp, EGFP imaging of co-culture with PT67 cells (a) and EPM-PT67 cells (d) for 5 days was detected and RFP imaging (b) and (e) was gained respectively. Merge imaging (c) and (f).

共培养 5 天后的细胞裂解 10 min, 然后将海肾荧光素酶底物稀释 50 倍后加入孔板中, 立即用 CCD 相机拍照. WB 细胞株与 PT67 细胞共培养后没有海肾荧光素酶的表达(图 7a), 而 WB 细胞株在 EPM 的诱导下, CK19 启动子启动了其后海肾荧光

素酶的表达, 检测后发现此酶的活性大大增强(图 7b). 经定量检测上述共培养体系中的海肾荧光素酶的表达式, 发现两者相差 13.6 倍(图 7c).

2.7 RT-PCR 分析与 EPM-PT67 细胞或 PT67 细胞共培养后 WB 细胞相关基因的表达

随后, 我们在 mRNA 水平上分析了与 EPM-PT67 细胞或 PT67 细胞共培养 5 天后 WB 细胞肝胆相关基因的表达情况. 在与不分泌 EPM 的 PT67 细胞共培养 5 天后, WB 细胞 ALB、AFP、CK18 为阴性, GGT、Yp、CK19 为弱阳性, 而与 EPM-PT67 细胞共培养 5 天后, WB 细胞 ALB、AFP、CK18 仍然为阴性, 但是 GGT、Yp 表达水平均有上调, CK19 的表达上调很明显(图 8).

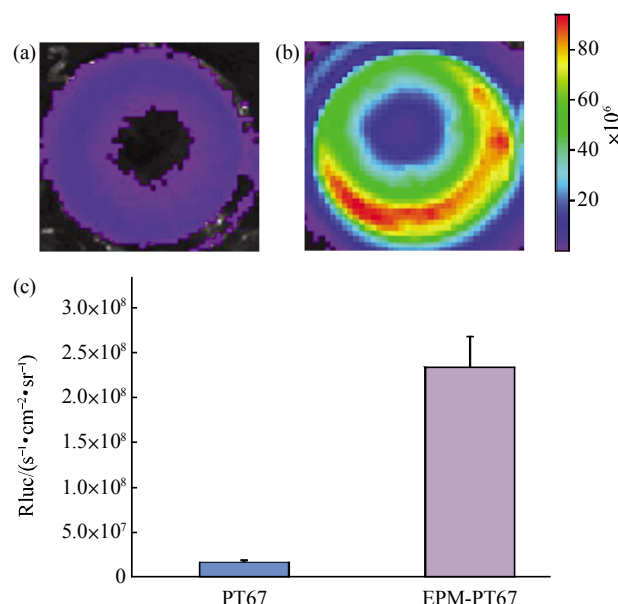


Fig. 7 The comparison of renilla luciferase expression promoted by CK19 after co-culture with PT67 cells and EPM-PT67 cells

After WB cells co-cultured with EPM-PT67 cells for 5 days, RLuc imaging (b) was gained, (a) shows imaging co-cultured with PT67 cells. (c) shows the difference in the amount of RLuc activity. The RLuc activity of induced WB cells which co-cultured with EPM-PT67 cells is 13.6 times stronger than with PT67 cells.

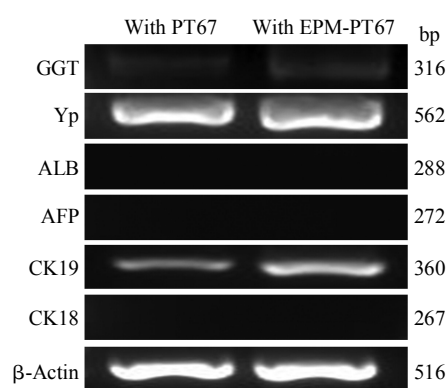


Fig. 8 The differentiation of WB cells after co-cultured with EPM-PT67 cells

RT-PCR showed the increase of the mRNA expression of CK19, Yp and GGT, which are markers of bile duct, after WB cells co-culture with EPM-PT67 cells.

2.8 Western blotting 分析与 EPM-PT67 细胞或 PT67 细胞共培养后 WB 细胞中 CK19 蛋白和 GGT 蛋白的表达

通过 Western blotting 分析进一步确证了与 EPM-PT67 细胞共培养后在蛋白质水平上也上调了 WB 细胞的 CK19 和 GGT 的表达(图 9).

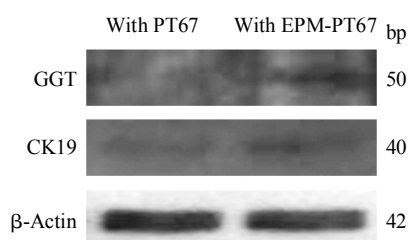


Fig. 9 Up-regulation of GGT and CK19 expression after co-cultured with EPM-PT67 cells

Western blotting showed the increase of the protein level of GGT and CK19 after WB cells co-culture with EPM-PT67 cells.

3 讨 论

我们曾经报道, 胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES cells)在体外经诱导分化后能形成肝干/祖细胞, 并且能够进一步分化为肝细胞^[18]. 在前期工作的基础上, 本文首次通过海肾荧光素酶和 RFP 双报告载体实时、定量监测 WB 细胞在体外分化为 BECs 的过程, 此工作有助于我们进一步深入开展对 ES 细胞经肝干/祖细胞向 BECs 分化机制的研究.

目前对于肝干/祖细胞分化的研究主要集中在肝向分化上, 对于胆管的研究较少. 现有的研究策略主要是将 WB 细胞接种培养于模拟体内基质微环境的 Matrigel 上^[9]. 在本研究中, 我们尝试通过 WB 细胞与 EPM-PT67 细胞共培养促进 WB 细胞向胆管样细胞分化. 为了实时、定量检测 CK19 表达情况, 构建了由人 CK19 启动子启动的双报告系统, 以显示与 EPM-PT67 细胞共培养后 WB 细胞中 CK19 启动子活性的变化情况. 该双报告系统是由海肾荧光素酶和 RFP 共同构成. 在表达载体中, 紧接启动子后面的报告因子是海肾荧光素酶, 它是自然界中能够催化底物产生生物荧光的一种酶类. 此酶在与其底物相互作用后, 随着萤光素的氧化而发出荧光, 这一反应非常节省能量, 几乎所有输入

反应的能量都被转化为光^[19]. 除上述高效性之外, 荧光素酶报告系统还具有检测方便、发光强度高、灵敏度高、能进行定量检测等优点. 实验结果表明, 同与 PT67 细胞共培养的 WB 细胞相比, 与 EPM-PT67 细胞共培养 5 天后的 WB 细胞荧光素酶活性增强了 13.6 倍, 这说明 WB 细胞在 EPM 的诱导下已经向 BECs 进行分化. 除细胞水平上的应用之外, 荧光素酶报告系统在动物整体水平上的应用更具有优越性, 它可以在不伤害到动物本身的前提下, 对同一组实验对象在不同时间点进行连续的观测和记录, 还能够跟踪同一观测目标(标记的细胞及基因)的移动及其变化. 因此, 这一载体的构建将有利于我们日后进一步在活体动物水平上开展干细胞向 BECs 分化的研究.

实验中用到的另一报告因子是 RFP, 它通过一个 12 肽的连接子与前面的海肾荧光素酶共同构成融合蛋白^[17]. RFP 最大吸收和发射波长分别为 558 nm 和 583 nm^[20], 可以应用于启动子分析、转基因、蛋白质和细胞定位、药物筛选等方面. 本研究的结果表明, RFP 在细胞诱导分化后高表达, 在荧光显微镜下可以很方便地观测到诱导分化的细胞形态收缩并沿管腔结构方向拉伸. 此外, 根据表达的红色荧光还可以对其进行分选纯化, 为进一步深入研究 BECs 的分化机制奠定基础.

综上所述, 我们通过构建 CK19 启动子调控的 RFP 报告系统可以实时地研究肝干/祖细胞在不同诱导条件下的分化去向, 同时通过 CK19 启动子-荧光素酶报告系统能够定量地检测 CK19 启动子活性的变化情况, 这一工作将有利于我们进一步开展肝干/祖细胞向 BEC 发育成熟过程中调控机制的研究.

参 考 文 献

- [1] Kubota H, Reid L M. Clonogenic hepatoblasts, common precursors for hepatocytic and biliary lineages, are lacking classical major histocompatibility complex class I antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(22): 12132-12137
- [2] Tsao M S, Smith J D, Nelson K G, *et al.* A diploid epithelial cell line from normal adult rat liver with phenotypic properties of "oval" cells. *Exp Cell Res*, 1984, **154**(1): 38-52
- [3] Coleman W B, Grisham J W. Epithelial stem-like cells of the rodent liver. Strain A J, Diehl A M, ed. *Liver Growth and Repair: From Basic Science to Clinical Practice*. New York: Chapman and Hall, 1998: 50-59
- [4] Grisham J W, Coleman W B, Smith G J. Isolation, culture, and transplantation of rat hepatocytic precursor (stem-like) cells. *Proc*

- Soc Exp Biol Med, 1993, **204**(3): 270-279
- [5] Zvibel I, Fiorino A S, Brill S, *et al.* Phenotypic characterization of rat hepatoma cell lines and lineage-specific regulation of gene expression by differentiation agents. *Differentiation*, 1998, **63**(4): 215-223
- [6] Coleman W B, Wennerberg A E, Smith G J, *et al.* Regulation of the differentiation of diploid and some aneuploid rat liver epithelial (stemlike) cells by the hepatic microenvironment. *Am J Pathol*, 1993, **142**(5): 1373-1382
- [7] Tsao M S, Grisham J W. Hepatocarcinomas, cholangiocarcinomas, and hepatoblastomas produced by chemically transformed cultured rat liver epithelial cells. A light-and electron-microscopic analysis. *Am J Pathol*, 1987, **127**(1): 168-181
- [8] Fan J, Shen H, Dai Q, *et al.* Bone morphogenetic protein-4 induced rat hepatic progenitor cell (WB-F344 cell) differentiation toward hepatocyte lineage. *J Cell Physiol*, 2009, **220**(1): 72-81
- [9] Couchie D, Holic N, Chobert M N, *et al.* *In vitro* differentiation of WB-F344 rat liver epithelial cells into the biliary lineage. *Differentiation*, 2002, **69**(4-5): 209-215
- [10] Kagaya M, Kaneko S, Ohno H, *et al.* Cloning and characterization of the 5'-flanking region of human cytokeratin 19 gene in human cholangiocarcinoma cell line. *J Hepatol*, 2001, **35**(4): 504-511
- [11] Hirai Y. Molecular cloning of human epimorphin: identification of isoforms and their unique properties. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, **191**(3): 1332-1337
- [12] Hirai Y, Lochter A, Galosy S, *et al.* Epimorphin functions as a key morphoregulator for mammary epithelial cells. *J Cell Biol*, 1998, **140**(1): 159-169
- [13] Lehnert L, Lerch M M, Hirai Y, *et al.* Autocrine stimulation of human pancreatic duct-like development by soluble isoforms of epimorphin *in vitro*. *J Cell Biol*, 2001, **152**(5): 911-922
- [14] Mori M, Miyazaki K. Factors affecting morphogenesis of rabbit gallbladder epithelial cells cultured in collagen gels. *Cell Tissue Res*, 2000, **300**(2): 331-344
- [15] Takebe K, Oka Y, Radisky D, *et al.* Epimorphin acts to induce hair follicle anagen in C57BL/6 mice. *FASEB J*, 2003, **17**(14): 2037-2047
- [16] Fritsch C, Swietlicki E A, Lefebvre O, *et al.* Epimorphin expression in intestinal myofibroblasts induces epithelial morphogenesis. *J Clin Invest*, 2002, **110**(11): 1629-1624
- [17] Xie X, Chan K S, Cao F, *et al.* Imaging of STAT3 signaling pathway during mouse embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells Dev*, 2009, **18**(2): 205-214
- [18] Pei H, Yang Y, Xi J, *et al.* Lineage restriction and differentiation of human embryonic stem cells into hepatic progenitors and zone 1 hepatocytes. *Tissue Eng Part C Methods*, 2009, **15**(1): 95-104
- [19] Inouye S. Expression, purification and characterization of calcium-triggered luciferin-binding protein of *Renilla reniformis*. *Protein Expr Purify*, 2007, **52**(1): 66-73
- [20] Yarbrough D, Wachter R M, Kallio K, *et al.* Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(2): 462-467

Construct Double Reporter Vector Enhanced by CK19 Promoter and Its Application in Differentiation of Hepatic Progenitor Cells*

ZHANG Heng, JIA Ya-Li, YUE Wen, CHEN Lin, XIE Xiao-Yan,

NAN Xue, HE Li-Juan, PEI Hai-Yun**, PEI Xue-Tao**

(Stem Cell and Regenerative Medicine Laboratory, Beijing Institute of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract Liver progenitor cells are co-precursor cells of hepatic cells and bile duct epithelial cells, a reporter gene was used to research the differentiation of liver progenitor cells. First of all, the cytokeratin 19 promoter segment was cloned from hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and then following the promoter a renilla luciferase and a red fluorescence protein's fusion gene were inserted to finish the double report lentiviral vector. Second, the liver progenitor cells were transduced with lentivirus, and then GFP positive cells were enriched by flow cytometry sorting. Third, the GFP positive liver progenitor cells were co-cultured with PT67 cells which could express the molecule-epimorphin for 5 days. Then, it was found that the stable transduced liver progenitor cells' shape were not only transformed and arranged as cord like structure, but also renilla luciferase and red fluorescence protein which enhanced by CK19 promoter were detected. So, these results proved that the liver progenitor cells had been induced to bile duct epithelial cells. The vector enhanced by CK19 promoter can monitor the differentiation of liver progenitor cells in different environment. In a word, this lentivirus vector can help us study the differentiation mechanism of liver progenitor cells, and scan the molecules which can do a help in differentiation.

Key words cytokeratin, renilla luciferase, red fluorescence protein, hepatic oval cells, differentiation

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00034

*This work was supported by grants from Hi-Tech Research and Development Program of China (2006AA02A107), National Basic Research Program of China (2005CB522702) and The National Natural Science Foundation of China (30901441).

**Corresponding author. Tel: 86-10-66931974, 86-10-66932240

PEI Hai-Yun. E-mail: peihy@hotmail.com

PEI Xue-Tao. E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

Received: January 14, 2010 Accepted: May 4, 2010