

Nestin 增强部分肝切除小鼠模型肝再生增殖能力的研究

纪小珍¹, 李振林², 贾俊双¹, 安 靛¹

(1. 南方医科大学肿瘤研究所, 广州 510515; 2. 南方医科大学组织胚胎教研室, 广州 510515)

【摘要】 目的 探讨巢蛋白(nestin)基因过表达对小鼠部分肝切除后肝再生增殖能力的影响及其可能的分子机制。方法 应用荧光定量PCR、Western blot 和免疫组化的方法检测转基因小鼠肝脏中外源基因 nestin 的表达情况。使用 Brdu 标记法比较转基因小鼠和野生型小鼠肝脏在不同状态下(静息状态、肝叶切除后 24 h、肝叶切除后 72 h)肝细胞增殖能力的差异。结果 荧光定量PCR、Western blot 和免疫组化证实转基因小鼠肝脏中存在 nestin 的高表达状态。在静息状态下,野生鼠和 nestin 过表达的转基因鼠肝脏 BrdU 标记率几乎为零,两者无明显差异;但在肝大部切除的情况下,nestin 过表达的转基因鼠有更多的细胞进入增殖状态,增殖能力较野生鼠明显增强,差别具有统计学意义(24 h: $t=2.996, P=0.024$; 72 h: $t=2.915, P=0.027$)。结论 nestin 过表达对静息状态下的肝脏增殖无影响,但可增加损伤修复情况下肝脏的再生增殖能力。表明 nestin 过表达对静止期细胞作用不明显,但在一些病理或刺激状态下 nestin 可以通过促进 DNA 的合成而加速细胞的分裂增殖。

【关键词】 Nestin; 肝大部切除; 肝脏增殖; 小鼠

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 01-0035-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.001.009

The research of nestin increase the regeneration and proliferation capacity in the case of partial hepatectomy in mice

Ji Xiao-zhen¹, Li Zhen-lin², Jia Jun-shuang¹, An Jing¹

(1. Cancer Research Institute, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2. Department of Embryology Histology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

【Abstract】 Objective To study the influence and possible mechanism of nestin overexpression on the partial hepatectomy regeneration and proliferation capacity in mice. **Methods** In order to confirm the overexpression status, the expression levels of nestin in liver was detected by fluorescence quantitative PCR, Western blot and immunohistochemistry. Then, The difference of proliferation index in wild type mice and transgenic mice liver was detected by Brdu label, the mice were divided into 3 groups (in the resting state, 24 hours later of liver subtotal nephrectomy, 72 hours later of liver subtotal nephrectomy). **Results** Fluorescence quantitative PCR, Western blot and immunohistochemistry confirmed overexpression of nestin in the liver of the transgenic mice. In the resting state, Brdu labelling index is almost zero both in the transgenic mice and the wild type mice, showing no difference between them; However, in the case of partial hepatectomy, more cells in the transgenic mice enter into proliferation status, suggesting that overexpression of nestin enhanced the regeneration and proliferation capacity of the liver cells in the transgenic mice when compared to the wild type (24 hours later: $t=2.996, P=0.024$; 72 hours later: $t=2.915, P=0.027$). **Conclusion** Nestin overexpression had no effect on the liver proliferation in

【基金项目】 国家自然科学基金委与广东省政府联合重点基金(U0732006)。

【作者简介】 纪小珍(1987-),女,硕士生,研究方向: nestin 转基因动物体内功能, E-mail: 664127714@qq.com。

【通讯作者】 安靛,女,教授, E-mail: anjing77@163.com。

the resting state, but can increase the proliferative capacity in the case of partial hepatectomy (PH). This indicates that Nestin overexpression had no obvious effect on quiescent cell, but in some pathological changes or stimulus state, nestin can increase the proliferation of cells through promote the formation of DNA.

【Key words】 Nestin; Partial hepatectomy; Liver proliferation; Mice

nestin 是大小约 $220 \sim 250 \times 10^3$ 的第六类中间丝蛋白, 通常表达于发育中的神经干/祖细胞。在胚胎发育过程中, 逐渐被其他的组织特异性中间丝所取代, 如神经元中被神经丝取代, 神经胶质细胞中被胶质原纤维酸性蛋白 (GFAP) 所取代^[1-2]。nestin 阳性细胞可参与多种组织的损伤修复, 例如脑损伤后的神经修复, 心肌缺血后修复, 视网膜损伤后修复^[3-6]。参与修复的过程中常增强细胞的增殖能力。在血管中, 表达 nestin 的内皮细胞具有增殖能力, 而不表达 nestin 的内皮细胞不具有增殖能力^[7-8]。但也有实验证明了 nestin 与增殖无直接相关, 如在 nestin 被敲减后, 星型胶质细胞瘤的生长减弱, 但 Ki-67 的表达并不减少^[9]。另外在 nestin 基因敲除的小鼠中神经干细胞的凋亡增加, 增殖并未受到影响^[10]。上述研究结果表明, nestin 与增殖的关系并未得到阐明, 为了明确 nestin 与增殖的关系, 我们通过研究 nestin 过表达后对小鼠肝脏损伤后增殖能力的影响, 以便进一步探讨 nestin 与增殖的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

nestin 过表达转基因小鼠由南方医科大学肿瘤研究所建立并保种, SPF 级 C57BL/6b 小鼠购自南方医科大学实验动物中心【SCXK(粤)2011-0015】。无菌手术在南方医科大学肿瘤研究所屏障动物实验设施内进行【SYXK(粤)2006-0074】。

1.1.2 试剂和仪器

鼠单克隆抗体 nestin (Abcam, 1:400); 鼠单克隆抗体 Brdu (Abcam, 1:20); Brdu, Sigma 产品, 称 50 mg Brdu 加 5 mL 生理盐水, 其浓度相当于 $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 4°C 避光保存; RIPA 蛋白裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、ECL 发光试剂盒购自天根生物公司; 免疫组化试剂盒为北京中杉金桥生物公司产品; RNA 提取试剂盒为 Invitrogen 产品, 荧光定量 PCR 试剂盒购自 Promega 公司; 定量 PCR 仪: ABI PRISM 7500 Sequence Detection System。

1.2 方法

1.2.1 荧光定量 PCR

实验分 2 组: 转基因鼠和野生鼠各 5 只, 性别均

为雄性。8 周大小时取材。肝脏取相同的一叶 (肝中叶), 提取肝脏总 RNA, 逆转录为 cDNA (采用 TaKaRa primescript RT reagent Kit 试剂盒), nestin 引物: 上游: $5' - \text{TACTGAAAAGTTCCAGCTG}$, 下游: $5' - \text{TCTGATCTCTGCATCTACA}$; GAPDH 内参引物: 上游: $5' - \text{GGCCTCCAAGGAGTAAGAAA}$, 下游: $5' - \text{GCCCCTCCTGTTATTATGG}$ 。反应体系: cDNA 1.0 μL , 上游引物 0.5 μL , 下游引物 0.5 μL , 2x SYBR Green PCR Master Mix 10 μL , $\text{d H}_2\text{O}$ 8 μL , 总体积 20 μL 。反应条件: 95°C , 5 min 预变性; 然后 95°C 15 s; 60°C 15 s; 72°C 32 s, 共 40 个循环。每个样品重复 3 次独立实验。采用 ABI PRISM 7500 Sequence Detection System 配套商业分析软件 SDS 2.3 比较分析转基因鼠和野生型鼠 Ct 值。

1.2.2 Western blot

实验分为 2 组: 转基因鼠和野生型鼠。分别称取 100 mg 肝组织, 充分剪碎后加入裂解液 1 mL, 放入玻璃匀浆器内匀浆至组织完全裂解, 提取总蛋白, 通过 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 分别取 40 μg 总蛋白加入 12% 丙烯酰胺凝胶, 经电泳转移到硝酸纤维素膜上。5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1h。鼠单克隆抗体 nestin (Abcam, 1:400) 4°C 孵育过夜。TBST 漂洗 5 min, 三次。HRP 标记的鼠二抗 37°C 孵育 1 h。TBST 洗膜 5 min, 三次。ECL 显色。以 Image-pro plus 6.0 软件进行灰度扫描分析蛋白表达的相对值。

1.2.3 免疫组化

按免疫组化试剂盒说明书进行。简述如下: 石蜡切片常规脱蜡至水, 3% 过氧化氢孵育 20 min, 以灭活内源性过氧化物酶活性, PBS 洗, 3 min \times 3 次; 抗原修复: 121°C , 3 min, 自然冷却, 然后 PBS 洗, 3 min \times 3 次; 山羊血清封闭 30 min, 不洗, 滴加一抗, 4°C 过夜。PBS 洗, 5 min \times 3 次。滴加 HRP 标记羊抗小鼠 IgG 多聚体, 37°C 孵育 60 min; PBS 洗, 3 min \times 3 次, DAB 显色剂显色 10 min。自来水充分冲洗, 苏木精复染, 脱水, 透明, 封片。

1.2.4 Brdu 标记肝脏增殖的细胞

将实验动物分 4 组: 第一、第二组为转基因鼠和野生型鼠在静息状态下; 第三、第四组为转基因鼠

和野生型鼠肝叶切除术后, 每组各 8 只小鼠, 5~8 周大小, 均为雄性。第一、第二组腹腔注射 BrdU (按 120 mg/kg), 于 2 h 后麻醉下灌注取材; 第三、四组分别于肝叶切除术后 24 h, 72 h 腹腔注射 BrdU (按 120 mg/kg), 注射后 2 h 灌注取材。4% 多聚甲醛固定过夜, 然后常规脱水, 透明, 包埋, 切片。

1.2.5 肝大部分切除 (partial hepatectomy, PH) 模型制备

参照 Higgins 等^[11] 经典方法行肝脏切除术, 方法简介如下: 术前动物禁食 12 h 但不限水, 手术时以 1% 戊巴比妥钠 (按 30 mg/kg) 腹腔麻醉, 之后小鼠仰卧, 四肢固定, 皮肤消毒后, 在剑突下取正中切口, 轻轻挤出肝脏左叶, 于肝蒂部结扎后切除; 然后从剑突右下方轻轻挤出右叶和后叶, 并把右叶和后叶一起结扎切除。切除范围为肝脏 2、3、4 叶, 保留 1、5、6 叶, 分别为肝中叶、肝尾叶及胆囊。整个手术过程为无菌操作, 术后保温并自由进食及饮水。分别于切除后 24 h、72 h 腹腔注射 BrdU, 注射 2 h 后在麻醉下取剩余的肝中叶, 4% 多聚甲醛固定过夜, 然后常规脱水, 透明, 制作肝石蜡切片。

1.2.6 统计学分析

数据分析采用 SPSS13.0 统计软件, 两组间比较采用 *t* 检验, 结果以均数 ± 标准差表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外源基因 nestin 在转基因小鼠肝脏中高表达

2.1.1 荧光定量 PCR 结果

在 mRNA 水平, 转基因小鼠肝脏中 nestin 表达较野生型小鼠明显增高 (图 1)。

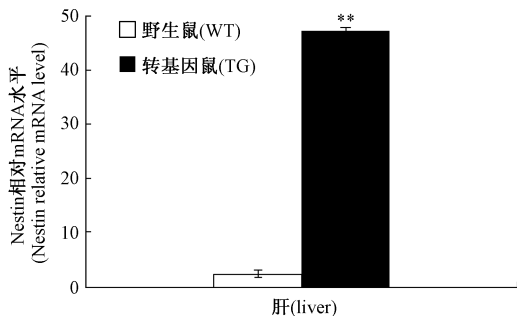


图 1 Q-PCR 检测小鼠肝脏中 nestin mRNA 水平

Fig. 1 Q-PCR analysis of nestin mRNA expression in the liver of TG and WT mice

2.1.2 Western blot 结果

在剔除了内参灰度值 GAPDH 影响后, 对两组 nestin 灰度值进行协方差分析 *F* 值和 *P* 值, 两独立样本 *t* 检验均满足方差齐性。在转基因小鼠肝脏中 nestin 的表达较野生鼠明显增高 ($n = 3$, $F = 923.313$, $P < 0.001$, 图 2)。转基因鼠和野生型鼠肝脏中 nestin 灰度扫描相对值比较及统计分析见 (表 1)。

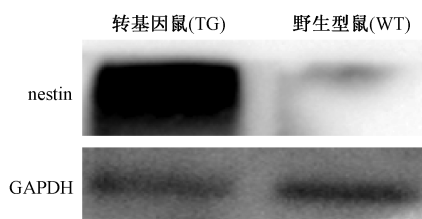


图 2 Western Blot 检测 nestin 在转基因小鼠肝脏中的表达

Fig. 2 The expression levels of nestin in transgenic mice liver by western blot

2.1.3 免疫组化结果

在 nestin 转基因小鼠肝脏中, 可见 nestin 在肝脏细胞核和细胞质内都有较高水平表达, 而野生型小鼠肝脏中极少见到 nestin 阳性信号 (彩插 9 图 3), 图中 A 为野生鼠肝脏, B、C 为转基因小鼠的肝脏。

2.2 nestin 增加肝损伤修复过程中肝细胞的增殖能力

将实验动物分组 (转基因鼠和野生型鼠), 分别于静息状态下, 肝大部分切除后 24 h, 肝大部分切除后 72 h 腹腔注射 BrdU, 注射后 2 h 在麻醉下灌注取材。每组各 8 只小鼠, 5~8 周, 均为雄性。每个标本做 5 张切片, 选取 5 个高倍视野计数 BrdU 阳性细胞占细胞总数的百分比。BrdU 标记法显示: 在静息状态下, nestin 过表达的转基因小鼠和野生小鼠肝脏中都极少见到 BrdU 标记的细胞 (记为 0), 两者无差别 (彩插 9 图 4 A 和 D); 而在肝大部分切除的情况下, nestin 过表达的转基因小鼠肝脏增殖能力明显增强 (彩插 9 图 4 - B、C、E、F), 肝大部分切除后 24 h 转基因鼠 BrdU 标记率为: 0.376 ± 0.091 , 野生鼠 BrdU 标记率为: 0.188 ± 0.087 ($P < 0.05$); 肝叶大部分切除后 72 h 转基因鼠 BrdU 标记率为: 1.969 ± 0.646 , 野生鼠 BrdU 标记率为: 0.848 ± 0.417 ($P < 0.05$)。转基因鼠和野生型鼠肝脏 BrdU 标记率统计分析见 (表 2)。

表 1 转基因鼠和野生鼠肝脏中 nestin 灰度值的比较

Tab. 1 Comparison of nestin gray value in the liver between transgenic mice and wild type mice

分组 (Groups)	例数 (N)	GAPDH	Nestin	差值 (Difference Value)	<i>t</i>	<i>P</i>
转基因鼠 (TG)	3	2637.734 ± 194.846	1247.950 ± 48.411	-1389.780 ± 164.585	-14.626	0.005
野生鼠 (WT)	3	2667.083 ± 223.129	129.878 ± 26.289	-2537.210 ± 248.818	-17.662	0.003
<i>t</i>		-0.172	35.153	6.662	<i>F</i> = 923.313	
<i>P</i>		0.872	<0.001	0.003	<i>P</i> < 0.001	

表 2 转基因鼠和野生鼠肝脏 BrdU 的标记率

Tab. 2 The results of BrdU labelling index statistical analysis of liver between transgenic mice and wild type mice

分组 (Groups)	例数 (N)	BrdU (24h)	BrdU (72h)
转基因鼠 (TG)	4	0.376 ± 0.091	1.969 ± 0.646
野生鼠 (WT)	4	0.188 ± 0.087	0.848 ± 0.417
<i>t</i>		2.996	2.915
<i>P</i>		0.024	0.027

3 讨论

nestin 主要被用作神经祖细胞/干细胞的标记,但也会表达于增殖活跃的细胞,包括成体干细胞和多种组织来源的肿瘤细胞^[12-17]。但 nestin 的功能仍未得到阐明, nestin 是促进细胞增殖还是抑制凋亡,不同实验得到不同的结果。例如,有研究发现 nestin 可以和 Cdk/P35 复合物结合,调节它们在细胞内的定位,从而达到抗凋亡的作用^[18]。也有研究表明, nestin 可能和糖皮质激素受体 (GR) 结合后使 PI3K 的活性增强,从而促进细胞进入增殖周期^[19]。另外,在发育和细胞的损伤修复过程中,可以观察到 nestin 被 cdc2 激酶磷酸化,并可作为直接或间接参与增殖相关蛋白的支架^[20]。nestin 阳性细胞可参与多种组织的损伤修复,如脑损伤后的神经修复,心肌缺血后修复,视网膜损伤后修复^[3-6]。参与修复的过程中常增强细胞的增殖能力。在胚胎肝脏和成体肝脏, nestin 阳性细胞是卵圆细胞中的一个亚群, nestin 能在肝组织部分切除后重新表达,参与肝组织的再生修复^[21-22]。然而,在 nestin 过表达的小鼠体内, nestin 是否可以增强肝脏损伤后的增殖修复能力目前尚未见报道。

为了阐明 nestin 与增殖的关系,以及 nestin 是否可以增强肝脏损伤后的再生修复能力。我们利用本课题组前期已成功构建的 nestin 过表达转基因小鼠^[23]。研究过表达转基因小鼠肝脏在不同状态下, nestin 对肝细胞的增殖修复能力。肝脏在静息状态下属于静止器官,通常仅有不到 0.01% 肝细胞在进行分裂活动,但在重大创伤或中毒情况下肝脏可表现出强大的再生能力^[24]。动物实验结果显示,肝部分切除后 30 min 内就有早期反应基因的诱导表达,细胞 DNA 的合成增加,但要数天后才能到达

高峰。这些研究成果表明,肝脏容易形成 2 种“极端”的细胞增殖情况:极少增殖或者活跃增殖。因此,在肝脏过表达 nestin 的情况下,如果 nestin 过表达对肝脏增殖有影响,都可表达出来。

在我们的实验中,通过 Q-PCR、Western blot 和免疫组化方法证实了转基因小鼠肝脏中外源基因 nestin 在 mRNA 及蛋白水平表达均比野生鼠增高,表明转基因小鼠肝脏中外源基因 nestin 可稳定存在并可对肝脏发挥某种作用。通过 BrdU 标记实验发现,在静息状态下,肝脏增殖能力低, nestin 过表达对肝脏增殖无影响。但在肝大部分切除后, nestin 过表达的转基因小鼠有更多的细胞进入增殖状态,增殖能力较野生小鼠明显增强。我们的实验结果表明, nestin 过表达对静止期细胞作用不明显,但在一些病理或刺激状态下 nestin 可以通过促进 DNA 的合成而加速细胞的分裂增殖。说明了 nestin 的功能似乎和细胞当时的状态相关, nestin 在不同状态下可能被不同的细胞因子调节,通过不同的信号通路发挥不同的功能。

有研究发现,肝脏在增生修复过程中, Wnt/ β -catenin 信号通路参与其中并发挥重要作用^[25]。在小鼠嗅神经的发育过程中, Wnt/ β -catenin 信号通路的激活和 nestin 的表达相一致^[26]。本实验发现 nestin 过表达可增强肝脏损伤后的再生增殖能力,可能就是通过 Wnt/ β -catenin 信号途径发挥作用, nestin 究竟是通过什么样的方式影响损伤后肝脏的增殖能力,是否存在其特异的调节机制,还有待进一步探讨和研究。

参考文献:

- [1] Dahlstrand J, Zimmerman LB, McKay RD, et al. Characterization of the human nestin gene reveals a close

- evolutionary relationship to neurofilaments[J]. *J Cell Sci*,1992, 103(2):589-97.
- [2] Lobo MV, Arenas MI, Alonso FJ, *et al.* Nestin, a neuroectodermal stem cell marker molecule, is expressed in Leydig cells of the human testis and in some specific cell types from human testicular tumours[J]. *Cell Tissue Res*,2004,316(3):369-76.
- [3] Tamagno I, Schiffer D. Nestin expression in reactive astrocytes of human pathology[J]. *J Neurooncol*,2006,80(3):227-33.
- [4] Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, *et al.* Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury[J]. *J Neurosci*,2004,24(9):2143-55.
- [5] Mokry J, Pudil R, Ehrmann J, *et al.* Re-expression of nestin in the myocardium of postinfarcted Patients[J]. *Vichows Arh*,2008, 453(1):33-41.
- [6] Xue L, Ding P, Xiao L, *et al.* Nestin, a new marker, expressed in Muller cells following retinal injury[J]. *Can J Neurol Sci*, 2010,37(5):643-49.
- [7] Suqawara K, Kurihara H, Negishi M, *et al.* Nestin as a marker for proliferative endothelium in gliomas[J]. *Lab Invest*, 2002,82(3):345-51.
- [8] Suzuki S, Namiki J, Shibata S, *et al.* The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature[J]. *J Histochem Cytochem*,2010,58(8):721-30.
- [9] Wei LC, Shi M, Cao R, *et al.* Nestin small interfering RNA (siRNA) reduces cell growth in cultured astrocytoma cells[J]. *Brain Res*,2008,1196:103-12.
- [10] Park D, Xiang AP, Mao FF, *et al.* Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells[J]. *Stem Cells*,2010,28(12):2162-71.
- [11] Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal[J]. *Arch Pathol Lab Med*,1931,12:186-202.
- [12] Dahlstrand J, Collins VP, Lendahl U. Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors[J]. *Cancer Res*,1992,52(19):5334-41.
- [13] Li H, Cherukuri P, Li N, *et al.* Nestin is expressed in the basal/myoepithelial layer of the mammary gland and is a selective marker of basal epithelial breast tumors[J]. *Cancer Res*,2007,67(2):501-10.
- [14] Kleeberger W, Bova GS, Nielsen ME, *et al.* Roles for the stem cell-associated intermediate filament nestin in prostate cancer migration and metastasis[J]. *Cancer Res*,2007,67(19):9199-206.
- [15] Yamada H, Takano T, Ito Y, *et al.* Expression of nestin mRNA is a differentiation marker in thyroid tumors[J]. *Cancer Lett*, 2009,280(1):61-4.
- [16] Lachaenmayer A, Lichtenauer UD, Cox T, *et al.* Nestin as a marker in the classification of adrenocortical tumors[J]. *Horm Metab Res*,2009,41(5):397-401.
- [17] Kawamoto M, Ishiwata T, Cho K, *et al.* Nestin expression correlates with nerve and retroperitoneal tissue invasion in pancreatic cancer[J]. *Hun Pathol*,2009,40(2):189-98.
- [18] Cecilia M, Sahlgen, Andrey Mikhailov, *et al.* Cdk5 Regulates the Organization of Nestin and its association with P35[J]. *Mol Cell Biol*,2003,23(14):5090-106.
- [19] Xue XJ, Yuan XB. Nestin is essential for mitogen-stimulated proliferation of neural progenitor cells[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2010,45(1):26-36.
- [20] Sahlgren CM, Mikhailov A, Hellman J, *et al.* Mitotic reorganization of the intermediate filament protein nestin involves phosphorylation by cdc2 Kinase[J]. *J Biol Chem*,2001,276(19):16456-63.
- [21] Koenig S, Probst I, Becker H, *et al.* Zonal hierarchy of differentiation markers and nestin expression during oval cell mediated rat liver Regeneration[J]. *Histochem Cell Biol*,2006, 126(6):723-34.
- [22] Reister S, Kordes C, Sawitza I, *et al.* The Epigenetic Regulation of Stem Cell Factors in Hepatic Stellate Cells[J]. *Stem Cells Dev*,2011,20(10):1687-99.
- [23] 郑文宏,李振林,安靓,等. Nestin 转基因小鼠模型的建立及 nestin 基因在器官中的表达[J]. *南方医科大学学报*,2013,33(8):1155-1159.
- [24] Koniaris LG, McKillop IH, Schwartz SI, *et al.* Liver regeneration[J]. *J Am Coll Surg*,2003,197(4):634-59.
- [25] Ober EA, Verkade H, Field HA, *et al.* Mesodermal Wnt2b signalling positively regulates liver specification[J]. *Nature*, 2006,442(7103):688-691.
- [26] Wang YZ, Molotkov A, Song L, *et al.* Activation of the Wnt/beta-catenin signaling reporter in developing mouse olfactory nerve layer marks a specialized subgroup of olfactory ensheathing cells[J]. *Dev Dyn*,2008,237(11):3157-68.

[修回日期] 2013-11-15