

DOI:10.13350/j.cjpb.220410

• 论著 •

# 泡球蚴蛋白促进脂肪间充质干细胞向肝细胞分化的研究\*

刘辉<sup>1,2</sup>,毕晓娟<sup>2</sup>,杨宁<sup>2</sup>,柯颖<sup>2</sup>,孙立<sup>2</sup>,楚璠<sup>2</sup>,孙涛<sup>2</sup>,吕国栋<sup>2</sup>,林仁勇<sup>1,2\*\*</sup>

(1. 新疆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,新疆乌鲁木齐 830011;  
2. 新疆医科大学第一附属医院临床医学研究院省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室)

**【摘要】** 目的 探讨泡球蚴蛋白(*Echinococcus multilocularis* protein, EmP)促脂肪间充质干细胞(Adipose tissue Derived Mesenchymal Stem Cells, ADSCs)向肝细胞分化的作用。方法 体外分离人脂肪组织来源的ADSCs,第三代(P3)ADSCs分为对照组(HDM肝细胞诱导分化组)和EmP处理组(HDM+EmP组),经无血清肝细胞诱导培养基培养7、14和21 d,检测对照组和EmP处理组肝细胞样细胞(iHep)百分比、糖原染色面积、肝细胞标志物白蛋白(Albumin, ALB)的蛋白及基因表达水平。Western-Blot法检测p-GSK-3β的表达情况。结果 P3代ADSCs具有成脂及成骨分化能力并表达干细胞标志物(CD29、CD90和CD105等)。在ADSCs向肝细胞诱导分化14 d,EmP处理组iHep细胞百分比显著高于对照组( $P<0.05$ ),EmP处理组糖原染色面积显著高于对照组( $P<0.05$ )。免疫荧光染色结果显示两组细胞在诱导分化7 d开始表达ALB,荧光强度随诱导时间增加呈增强趋势。qPCR结果显示在诱导分化后第14 d,EmP处理组ALB表达水平显著高于对照组,两组间具有统计学差异( $P<0.05$ )。Western-Blot结果显示,诱导分化第7 d和14 d,EmP处理组p-GSK-3β蛋白表达水平显著高于对照组( $P<0.01$ 和 $P<0.05$ )。结论 EmP可能通过激活GSK-3β而具有促进ADSCs向肝细胞分化的作用,本研究为临床应用ADSCs移植治疗泡型棘球蚴病奠定了基础。

**【关键词】** 泡球蚴蛋白;脂肪间充质干细胞;肝细胞分化;GSK-3β

**【中图分类号】** R383.33

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2022)04-0425-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Apr;17(4):425-429,434.]

## ***Echinococcus multilocularis* protein promotes the differentiation of adipose mesenchymal stem cells into hepatocytes**

LIU Hui<sup>1,2</sup>, BI Xiao-juan<sup>2</sup>, YANG Ning<sup>2</sup>, KE Ying<sup>2</sup>, SUN Li<sup>2</sup>, CHU Jin<sup>2</sup>, SUN Tao<sup>2</sup>, LV Guo-dong<sup>2</sup>, LIN Ren-yong<sup>1,2</sup> (1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Basic Medical College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. State Key Laboratory of Pathogenesis, Prevention, and Treatment of Central Asian High Incidence Diseases, Clinical Medical Research Institute, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University) \*\*\*

**【Abstract】** Objective To investigate the role of *Echinococcus multilocularis* protein (EmP) on the differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) into hepatocytes. Methods ADSCs were isolated from human adipose tissue and expanded *in vitro*. P3 ADSCs were collected and induced into hepatocytes by the hepatocyte differentiation medium (HDM) and HDM plus EmP (HDM+EmP), respectively. The percentage of induced hepatocyte like cells (ihep), glycogen staining area, the gene expression and protein localization of albumin (ALB) and the p-GSK-3β protein of ADSCs of both groups were detected on Day 7, Day 14 and Day 21. Results The P3 ADSCs had adipogenic and osteogenic differentiation potential, and expressed stem cell markers (CD29, CD90 and CD105). On Day 14 of differentiation of ADSCs induced into hepatocytes, the percentage of ihep cells in the HDM+EmP group was significantly higher than that in the HDM group ( $39.06\pm9.8\%$  vs  $25.13\pm2.23\%$ ,  $P<0.05$ ), glycogen staining area in the HDM+EmP group was significantly higher than that in the HDM group ( $63.39\pm15.92 \mu\text{m}^2$  vs  $39.99\pm10.61 \mu\text{m}^2$ ,  $P<0.05$ ). Immunofluorescence staining showed that the induced cells of both groups expressed ALB on Day 7, and the fluorescence intensity of ALB expressed in both groups was increased with induction time. On Day 14 of differentiation of ADSCs induced into hepatocytes, the gene expression of ALB in the HDM+EmP group was significantly higher than that in the HDM group ( $P<0.05$ ). Western blot showed that the level of p-GSK-3β of the HDM+EmP group on Day 7 and Day 14 of differentiation of ADSCs induced into hepatocytes was significantly higher than that in the HDM group ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ). Conclusion EmP may promote the differentiation of ADSCs into hepatocytes through activating GSK-3β.

\* 【基金项目】 国家自然科学基金项目(No. 81860361,32060223);新疆维吾尔自治区天山雪松计划(No. 2019XS13);新疆维吾尔自治区重点实验室开放课题项目(No. 2020D04028);省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室开放课题项目(No. SKL-HIDCA-2020-26, SKL-HIDCA-2019-30);新疆维吾尔自治区研究生创新项目(No. XJ2021G214)。

\*\* 【通讯作者】 林仁勇, E-mail: renyonglin@xjmu.edu.cn

【作者简介】 刘辉(1985-),女,陕西汉中人,在读硕士研究生,主要从事包虫病分子致病机制研究。E-mail: liuhui\_xjmu@163.com

**sion** *E. multilocularis* protein could promote the differentiation of ADSCs into hepatocytes via activate GSK-3 $\beta$ . This study lays a foundation for the clinical application of ADSCs transplantation in the treatment of liver injury of alveolar echinococcosis.

**【Key words】** *Echinococcus multilocularis* protein; Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells (ADSCs); hepatocyte differentiation; GSK-3 $\beta$

肝泡型棘球蚴病(Hepatic Alveolar Echinococcosis, HAE)是由多房棘球绦虫(*Echinococcus multilocularis*, Em)的虫卵感染人体所致的一种严重的寄生虫病,泡球蚴在宿主肝组织内呈侵袭性生长,俗称“虫癌”<sup>[1]</sup>。早期虫体生长缓慢,患者可无症状,就诊时多处于晚期,病灶侵犯肝实质、引起局部肝组织纤维化及坏死、破坏肝内主要血管及胆道,根治性切除、自体肝移植是终末期 HAE 主要治疗方式<sup>[2]</sup>,但因部分患者功能肝质量不足,该术式临床应用受限,因此亟需寻找促进 AE 晚期患者余肝质量的治疗手段。

脂肪间充质干细胞(ADSCs)是一类具有自我复制、多向分化潜能的成体干细胞,体外经不同的诱导方法可分化为肝细胞,是应用于晚期肝病的一种治疗手段<sup>[3-5]</sup>。Feretis 等<sup>[6]</sup>报道 ADSCs 能靶向迁移至受损肝脏组织,通过分化为肝细胞参与急性肝损伤的修复,提示 ADSCs 移植能通过分化为肝细胞从而减轻 Em 感染所致的肝损伤的潜力,但是 Em 虫体蛋白对 ADSCs 的分化是否有影响未见报道。本研究通过运用体外 ADSCs 诱导培养体系,了解 Em 蛋白对 ADSCs 向肝细胞诱导分化的影响及其可能的机制,研究结果将为临床运用 ADSCs 移植治疗 HAE 提供理论依据。

## 材料与方法

### 1 材料

**1.1 人脂肪组织标本的获取** 取自于新疆医科大学第一附属医院整形门诊,选取年龄 25~45 岁吸脂手术患者,术后留取患者废弃皮下脂肪组织无菌保存,本研究经医院伦理委员会批准并与患者签署知情同意书。

**1.2 主要试剂及仪器** DMEM 低糖培养基、青链霉素、0.25%胰酶、胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司;I型胶原酶购自美国 Worthington 公司;成脂及成骨诱导培养基购自伟通生物公司;流式抗体 CD31、CD34、CD45 购自美国 BD 公司;CD29、CD44、CD90 购自美国 eBioscience 公司;肝细胞生长因子(Hepatocyte Growth Factor, HGF)、表皮生长因子(Epidermal Growth Factor, EGF)、成纤维细胞生长因子-4(Fibroblast Growth Factor4, FGF-4)、制瘤素 M(On-costatin M, OSM)购自美国 PeproTech 公司;二甲基亚砜(DMSO)、地塞米松(Dexamethasone)购自美国 Sigma 公司;ALB 鸡抗人第一抗体及 FITC 标记羊抗鸡第二抗体购自美国 Abcam 公司;DAPI 染料购自瑞士 Roche 公司;糖原染色试剂盒购自中国索莱宝公司;GSK-3 $\beta$ 、GAPDH 抗体购自美国 CST 公司;细胞总 RNA 提取试剂盒购自中国福际公司;cDNA 反转录试剂盒、SYBR Premix RT-qPCR 试剂盒购自日本 Takara 公司;四分格玻底共聚焦小皿、6 孔板、6 cm/10 cm 细胞培养皿购自美国 Corning 公司;激光共聚焦显微镜、倒置荧光显微镜购自德国 Leica 公司;细胞培养箱购自美国 Thermo 公司。

士 Roche 公司;糖原染色试剂盒购自中国索莱宝公司;GSK-3 $\beta$ 、GAPDH 抗体购自美国 CST 公司;细胞总 RNA 提取试剂盒购自中国福际公司;cDNA 反转录试剂盒、SYBR Premix RT-qPCR 试剂盒购自日本 Takara 公司;四分格玻底共聚焦小皿、6 孔板、6 cm/10 cm 细胞培养皿购自美国 Corning 公司;激光共聚焦显微镜、倒置荧光显微镜购自德国 Leica 公司;细胞培养箱购自美国 Thermo 公司。

### 2 方法

**2.1 人脂肪间充质干细胞的分离培养及干性鉴定** 取无菌人脂肪组织用含 1% 青链霉素的 PBS 液冲洗 3 次,每次 5 min,用无菌手术剪将脂肪组织剪碎呈匀浆状,加入含有 1 mg/ml I 型胶原酶的 PBS 液混匀后置于 37 °C 恒温摇床震荡 30 min,期间手动上下颠倒混匀 2 次,用 15 ml 含 10% FBS 的 DMEM 低糖培养基终止消化,1 500 r/min 离心 10 min,弃去脂肪层上清,将细胞沉淀接种于 10cm 细胞培养皿置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱,之后隔天换液 1 次,细胞生长达 80% 融合采用 0.25% 胰酶消化后按 1:3 传代培养,首次传代标记为 P1。

取 P3 代细胞进行成脂成骨及流式鉴定。成脂、成骨诱导鉴定:按照试剂盒说明书将细胞进行诱导分化,诱导培养基 2~3 d,换液 1 次,成脂分化 10 d,后进行油红 O 染色,成骨分化 18 d,后进行茜素红染色,相差显微镜拍照记录细胞形态变化。流式鉴定:P3 代细胞传代后收集细胞分 3 管,用 100  $\mu$ l 预冷的 PBS 重悬细胞,每管细胞按照荧光标记分别加入 2.5  $\mu$ l CD31-FITC 和 CD34-PE、CD90-PE 和 CD45-FITC、CD29-PE 和 CD44-FITC 抗体后置于 4 °C 冰箱避光孵育 30 min,每管加 400  $\mu$ l PBS 液终止反应后上流式细胞仪检测。

**2.2 Em 蛋白的提取及定量** 泡球蚴感染沙鼠腹腔内原头蚴取出后立即置于液氮中冷冻并研磨成粉,加入 1 ml PBS 溶液混匀后转入 1.5 ml 离心管,4 °C 摆床震荡过夜,次日 1 500 r/min 离心 10 min,取上清用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。

### 2.3 脂肪间充质干细胞向肝细胞分化实验

**2.3.1 肝细胞诱导分化实验** 取 P3 代 ADSCs 用 0.25% 胰酶消化后按培养皿底面积接种于 6 孔板(4×10<sup>4</sup> 细胞/孔,用于 RNA 提取及常规形态学观察)、24 孔板(1×10<sup>4</sup> 细胞/孔,用于 PAS 染色及细胞免疫荧

光染色)、6cm 细胞培养皿( $1 \times 10^5$  细胞/孔,用于蛋白提取)置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养,细胞生长至 50% 融合后进行肝细胞诱导分化,诱导方法参考文献[7],采用无血清添加细胞因子进行培养,肝细胞诱导培养基按诱导时间顺序添加各类细胞因子,初级诱导阶段(1~3 d)添加 FGF-4(20 ng/ml)和 EGF(20 ng/ml),诱导分化阶段(4~7 d)添加 FGF-4(20 ng/ml)和 HGF(20 ng/ml),分化成熟阶段(7~21 d)添加 FGF-4(20 ng/ml)、HGF(20 ng/ml)、OSM(40 ng/ml)、地塞米松(1 μmol/L)及 1% DMSO,诱导分化期间每 3 d,换液 1 次。

**2.3.2 实验分组** 本研究分组为对照组(HDM 肝细胞诱导分化培养组,采用添加生长因子分化培养基培养)和 Em 蛋白处理组(HDM+EmP 组,在 HDM 组基础上给予 10 μg/ml Em 蛋白进行共培养)。

**2.4 高碘酸-雪夫(PAS)染色** 诱导后 7、14 及 21 d,不同分组的细胞弃去培养基,PBS 洗涤 2 遍,用 4% 多聚甲醛固定 30 min,采用高碘酸-雪夫染色(PAS 染色)试剂盒进行糖原染色,按试剂盒说明书操作,各组细胞糖原染色面积采用 Image Pro Plus6 软件分析。

**2.5 细胞免疫荧光染色检测** 诱导后 7、14 及 21 d,不同分组的 12 孔培养皿细胞弃去培养基,预冷的 PBS 洗涤 2 遍,用 4% 多聚甲醛固定 30 min,预冷的 PBS 洗涤 2 遍后用 4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 洗涤 2 遍,0.1% TritonX-100 室温孵育 15 min,PBS 洗涤 3 遍,5% 羊血清室温封闭 30 min,按 1:500 加入鸡抗人 ALB 抗体并 4 °C 过夜,同上洗涤,加入 FITC 标记的羊抗鸡二抗(1:250)室温反应 30 min,同上洗涤,DAPI 染液复染 10 min 后荧光倒置显微镜观察并拍照。

**2.6 实时荧光定量 PCR 检测** 诱导后各时间点(7、14、21 d)收集各组细胞,按照 RNA 提取试剂盒说明书操作提取细胞总 RNA,Nanodrop2000 核酸定量仪检测 RNA 浓度和纯度,取 1 μg 总 RNA,按照说明书流程反转录合成第一链 cDNA。使用 SYBR Premix RT-qPCR 试剂盒检测 ALB 的表达,采用 GAPDH 作为内参基因。ALB 上游引物:5'-GCCTTGCTCAG-TATCTT-3',下游引物:5'-AGGTTGGGTTGT-CATCT-3'。GAPDH 上游引物:5'-CCACCTTGACGCTGGG-3',下游引物:5'-CATACCAG-GAAATGAGCTTGACA-3'。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算 mRNA 的相对表达量,引物由上海生工合成。

**2.7 Western Blot 实验** 诱导后各时间点(7、14、21 d)收集各组细胞,提取细胞总蛋白,采用 BCA 法进行定量,蛋白变性后取 20 μg 蛋白样本经 10% SDS-PAGE 电泳后,将蛋白转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入兔抗人 GSK-3β、GAPDH 第一抗体

(浓度分别为 1:2000,1:5000)4 °C 摆床震荡过夜,PBST 洗膜 4 次,加入羊抗兔第二抗体(浓度为 1:5000)室温孵育 1 h,PBST 洗膜 4 次,使用 ECL 化学发光试剂盒显色,凝胶成像仪拍照,ImageJ 软件扫描分析蛋白条带灰度。

**2.8 统计学分析** 采用 SPSS 20.0 软件进行数据统计分析,实验数据采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1 人脂肪间充质干细胞的干性鉴定结果

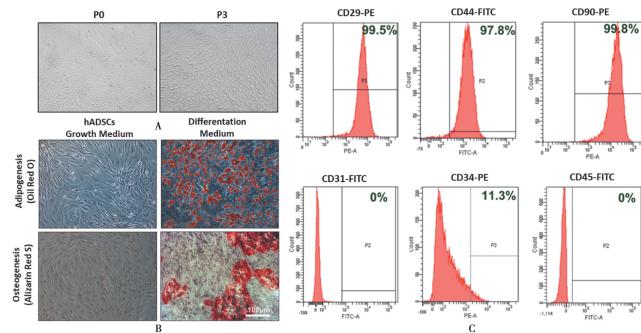
原代 ADSCs 培养 24 h 后可见少量细胞贴壁,换液后贴壁细胞逐渐增多呈集落样生长,7 d 左右细胞融合达 80%,细胞进行传代纯化至 P3,镜下 ADSCs 呈长梭形漩涡状生长,符合间充质干细胞的形态学特点(图 1A)。P3 代 ADSCs 经成脂、成骨诱导后,油红 O 染色镜下显示细胞内可见大小不等的红色脂滴,茜素红染色显示镜下细胞生长密集,可见片状橙红色钙结节颗粒(图 1B)。流式细胞术鉴定结果显示分离的 ADSCs 表达干细胞标记物 CD29(阳性率 99.5%)、CD44(阳性率 97.8%)、CD90(阳性率 99.8%),CD31 阴性(阳性率 0%)、弱表达 CD34(阳性率 11.3%)、CD45 阴性(阳性率 0%)(图 C)。

### 2 Em 蛋白对 ADSC 向肝细胞分化的影响

正常肝细胞形态呈上皮细胞样多边形及类圆形,ADSCs 经分化培养基诱导后转变为肝细胞样细胞,形态由长梭形逐渐转变为不规则圆形及类圆形(图 2 A)。为了记录 ADSCs 成肝细胞分化过程中形态学变化,计数了两组细胞诱导后不同时间(7、14、21 d)肝细胞样细胞(iHep)数量百分比,结果显示随诱导时间的增加,iHep 逐渐增多,在 ADSCs 成肝细胞诱导分化 14 d,EmP 处理组 iHep 细胞百分比(39.06±9.8%)显著高于对照组(25.13±2.23%)(图 2 B),两组比较差异有统计学意义( $t=3.110, P < 0.05$ )。

### 3 Em 蛋白对诱导后肝细胞样细胞储存糖原能力的影响

采用高碘酸-雪夫染色(PAS 染色)对两组细胞诱导前及诱导后不同阶段的肝细胞样细胞进行糖原染色,结果显示两组细胞成肝细胞分化后 7 d,可见细胞内紫红色颗粒沉积,随诱导时间的增加,紫红色糖原颗粒逐渐增多(图 3A),而诱导前 ADSCs 细胞内未见糖原颗粒(图 3B)。糖原染色面积结果显示两组细胞诱导分化后 14 d 时,EmP 处理组糖原染色面积(63.39±15.92 μm<sup>2</sup>)显著高于对照组(39.99±10.61 μm<sup>2</sup>)(图 3C),两组比较差异有统计学意义( $t=2.735, P < 0.05$ )。

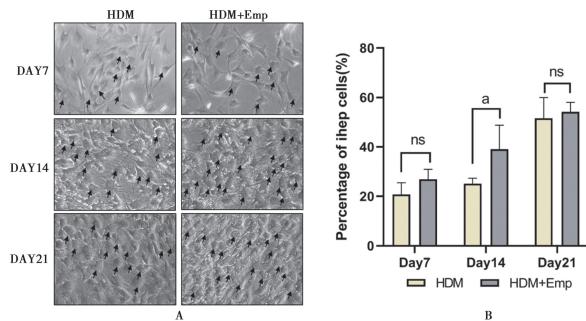


A 原代及第3代人ADSCs形态学特征(40×) B ADSCs诱导前及成脂、成骨诱导后的油红O染色和茜素红染色(200×) C 第3代ADSCs流式细胞鉴定结果(CD29、CD44、CD90、CD31、CD34、CD45)

图1 ADSCs的形态学及干性鉴定

A Morphological characteristics of primary and third generation human ADSCs (40×) B Oil red O and Alizarin red staining before ADSCs induction and after adipogenesis and osteogenesis differentiation (200×) C Flow cytometry identification results of third generation ADSCs (CD29, CD44, CD90, CD31, CD34, CD45)

Fig. 1 Morphology and stem cell identification of ADSCs



A 两组细胞成肝细胞分化后不同时间形态学变化(200×) B 两组细胞诱导后不同时间肝细胞样细胞数量百分比(a与Day14HDM组比较,P<0.05)

图2 Em蛋白促进ADSCs向肝细胞分化结果

A Morphological changes of induced hepatocytes(ihep)after hepatocytes differentiation of ADSCs in HDM and HDM+EmP group at different times (200×) B Percentage of induced hepatocytes(ihep)after hepatocytes differentiation of ADSCs in HDM and HDM + EmP group at different times (a represents the comparison with day14 HDM group,  $P < 0.05$ )

Fig. 2 Results of EmP promoting the differentiation of ADSCs into hepatocytes

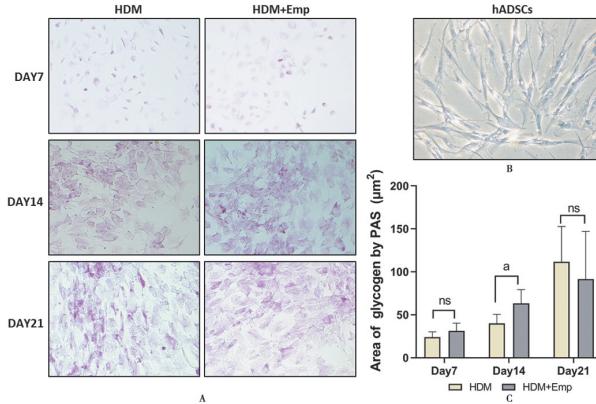
#### 4 Em蛋白对诱导后肝细胞样细胞表达ALB的影响

检测ALB免疫荧光染色及荧光定量PCR,免疫荧光结果显示,两组细胞在向肝细胞诱导分化7 d时开始表达ALB,荧光强度随诱导时间增加呈增强趋势(图4A)。qPCR结果显示,诱导7 d时两组细胞均开始表达ALB,14 d时表达显著增加,21 d时ALB表达量降低。在诱导分化14 d时EmP处理组的ALB相对表达水平显著高于对照组,两组比较差异有统计学意义( $t = 2.508, P < 0.05$ )(图4B)。

#### 5 p-GSK-3β在Em蛋白诱导ADSCs向肝细胞分化过程中的表达情况

GSK-3β是糖原合成酶激酶-3β,也是Wnt信号破

坏复合物关键成员之一,检测GSK-3β在ADSCs成肝细胞分化不同阶段的蛋白表达水平Western blot结果显示,在成肝细胞诱导7 d和14 d时,EmP处理组p-GSK-3β蛋白表达水平显著高于对照组,两组比较差异有统计学意义( $t = 3.535, P < 0.01, P < 0.05$ )(图5A,B)。

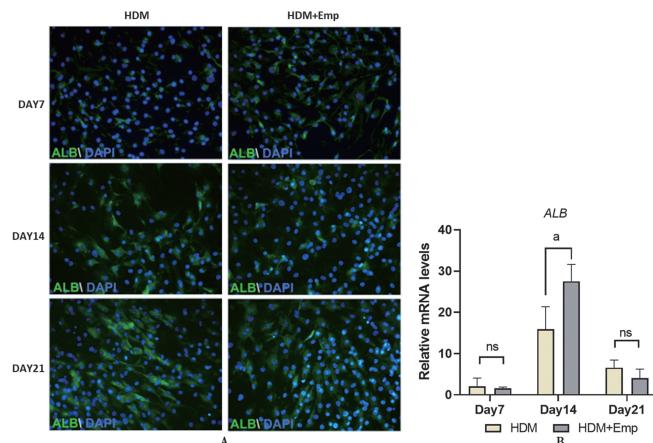


A 两组细胞成肝细胞分化后不同时间糖原染色(200×) B 诱导前ADSCs糖原染色(200×) C 两组细胞成肝细胞分化后不同时间糖原染色面积统计(a与Day14 HDM组比较  $P < 0.05$ )

图3 成肝细胞诱导后糖原染色结果

A PAS staining of induced hepatocytes in the two groups at different times after hepatocyte differentiation of ADSCs (200×) B PAS staining of uninduced ADSCs (200×) C Statistics of glycogen area of induced hepatocytes in the two groups after hepatocyte differentiation of ADSCs at different times (a represents the comparison with day14 HDM group,  $P < 0.05$ )

Fig. 3 PAS staining results of induced hepatocytes in the two groups



A ALB免疫荧光染色(200×) B ALB的mRNA相对表达水平(a与Day14 HDM组比较,P<0.05)

图4 ALB的免疫荧光染色及qPCR结果

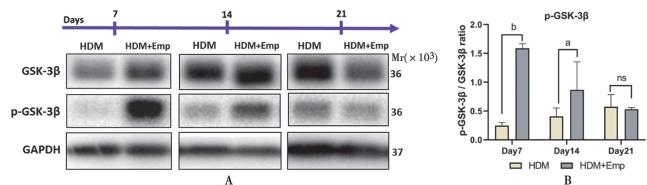
A Immunofluorescence staining of ALB (200×) B Relative mRNA expression levels of ALB (a represents the comparison with day14 HDM group,  $P < 0.05$ )

Fig. 4 Immunofluorescence staining and qPCR results of ALB

## 讨 论

泡球蚴感染人体后主要寄生于肝脏,病灶组织内有无数泡性包囊,囊壁为薄厚不均的角质层,囊腔内含有胶状囊液,大体观察一般呈单个巨块型囊泡,质地较

硬,与宿主肝组织界限不清,病灶以深入宿主肝组织从而形成慢性浸润的炎性环境<sup>[8]</sup>。ADSCs 是治疗慢性肝损伤有潜力的细胞类型之一。ADSCs 可以有效改善 CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠急性肝衰竭<sup>[9]</sup>,在急性肝衰竭小鼠模型中 ADSCs 条件培养基促进肝细胞增殖并改善肝功能<sup>[10]</sup>,ADSCs 能靶向迁移至受损肝脏组织,通过分化为肝细胞参与急性肝损伤的修复<sup>[6]</sup>。本研究通过体外 Em 蛋白处理 ADSCs 经肝细胞诱导培养基培养 7、14 和 21 d,通过检测 ihep 百分比、糖原染色、ALB 的表达及有关信号分子的激活情况,探讨了 Em 蛋白对 ADSCs 向肝细胞样细胞分化的作用,研究发现 Em 蛋白能通过磷酸化糖原合成酶激酶 3β(GSK-3β),促进 ADSCs 向肝细胞样细胞的分化。



A 两组细胞不同分化时间 GSK-3β 蛋白免疫印迹结果 B 两组细胞不同分化时间磷酸化 GSK-3β 相对表达水平(a 与 Day14 HDM 组比较,  $P < 0.05$ ; b 与 Day7 HDM 组比较  $P < 0.01$ )

图 5 p-GSK-3β 的蛋白表达水平

A Western blot results of cells in two groups at different times  
B Statistics of GSK-3β expression in two groups at different times(a represents the comparison with day14 HDM group  $P < 0.05$ , b represents the comparison with day7 HDM group,  $P < 0.01$ )

Fig. 5 p-GSK-3β Protein expression

ADSCs 具有向内胚层、中胚层和外胚层细胞分化的能力,人 ADSCs 在含有 HGF、bFGF、烟酰胺、ITS 和抑瘤素 M 的特异性肝分化培养基中培养后细胞形态发生了显著变化,肝脏特异性标记物呈阳性反应,且基因表达水平随诱导时间延长而逐渐升高<sup>[11]</sup>。本研究结果表明,在肝细胞诱导分化的 7、14、21 d,糖原染色逐渐增强,表明了诱导后的细胞具有了肝细胞特异的储存糖原的能力,细胞形态也逐渐从 ADSCs 的长梭形转变为肝细胞上皮样细胞形态,同时肝细胞特异性标记物 ALB 的蛋白及基因水平也呈升高趋势。ADSCs 增殖与分化的平衡可受局部微环境中的信号分子,细胞外基质及细胞间相互作用的调节<sup>[12]</sup>。低氧环境可以刺激 ADSCs 分泌 VEGFA 而影响血管的生成<sup>[13]</sup>,Em 蛋白能激活肝星状细胞 TGF-β/Smad 信号通路诱导肝纤维化<sup>[14]</sup>,Em 蛋白处理能显著增强 ADSCs 的迁移及向血管内皮细胞的分化能力<sup>[15]</sup>,Em 病灶近端肝脏组织 PCNA 表达增多并通过 MAPK 信号通路促进大鼠肝细胞的增殖<sup>[16-17]</sup>。本研究发现 Em 蛋白处理组 ADSCs 在分化后第 14 d,ihep 百分比、糖原染色面积及 ALB 的基因表达水平显著高于对照组,提示 Em 蛋白能在分化的早中期促进 ADSCs 向肝细

胞的分化,这可能是泡球蚴感染所致部分患者肝脏代偿性增殖的原因之一。

GSK-3β 是 Wnt 信号破坏复合物蛋白之一,可以磷酸化 Wnt 下游 β-catenin 的丝氨酸 33、37 和苏氨酸 41 位点,从而引发 β-catenin 蛋白酶体降解<sup>[18]</sup>,胰高血糖素样肽-1 通过 Wnt/GSK-3β/β-catenin 途径促进 hADSCs 的成骨分化<sup>[19]</sup>。本研究结果显示在 ADSCs 成肝细胞分化的 7 和 14 d,Em 蛋白显著促进 GSK-3β 的磷酸化,提示 GSK-3β 可能参与了 ADSCs 向肝细胞的分化。

#### 【参考文献】

- [1] Wen H, Vuitton L, Tuxun T, et al. Echinococcosis: advances in the 21st century[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(2):e75.
- [2] Shen S, Kong J, Qiu Y, et al. Ex vivo liver resection and autotransplantation versus allograft transplantation for end-stage hepatic alveolar echinococcosis[J]. Int J Infect Dis, 2019(79):87-93.
- [3] Xu LJ, Wang SF, Wang DQ, et al. Adipose-derived stromal cells resemble bone marrow stromal cells in hepatocyte differentiation potential in vitro and in vivo[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(38):6973-6982.
- [4] Coronado RE, Somaraki-Cormier M, Ong JL, et al. Hepatocyte-like cells derived from human amniotic epithelial, bone marrow, and adipose stromal cells display enhanced functionality when cultured on decellularized liver substrate[J]. Stem Cell Res, 2019(38):101471.
- [5] Alfaifi M, Eom YW, Newsome PN, et al. Mesenchymal stromal cell therapy for liver diseases[J]. J Hepatol, 2018, 68(6):1272-1285.
- [6] Feretis T, Katselis C, Papanikolaou IG, et al. ATSC transplantation contributes to liver regeneration following paracetamol-induced acute liver injury through differentiation into hepatic-like cells[J]. Am J Stem Cells, 2020, 9(3):36-56.
- [7] Yin L, Zhu Y, Yang J, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiated into hepatocyte-like cells in vivo and in vitro[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(3):1722-1732.
- [8] Graeter T, Eberhardt N, Shi R, et al. Hepatic alveolar echinococcosis: correlation between computed tomography morphology and inflammatory activity in positron emission tomography[J]. Sci Rep, 2020, 10(1):11808.
- [9] Liu S, Guo R, Hou X, et al. Adipose-tissue derived porcine mesenchymal stem cells efficiently ameliorate CCl<sub>4</sub>-induced acute liver failure in mice[J]. Cytotechnology, 2020, 72(3):327-341.
- [10] Nahar S, Nakashima Y, Miyagi-Shiohira C, et al. Cytokines in adipose-derived mesenchymal stem cells promote the healing of liver disease[J]. World J Stem Cells, 2018, 10(11):146-159.
- [11] Guo DL, Wang ZG, Xiong LK, et al. Hepatogenic differentiation from human adipose-derived stem cells and application for mouse acute liver injury[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2017, 45(2):224-232.
- [12] Lee CC, Kim KD. Stem cell microenvironment as a potential therapeutic target[J]. Regen Med, 2012, 7(1):3-5.

(下转 434 页)

- 2019,35(11):178.
- [2] Gellatly SL, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses[J]. *Pathog Dis*, 2013, 67(3): 159-173.
- [3] Maurice NM, Bedi B, Sadikot RT. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: host response and clinical implications in lung infections [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2018, 58(4): 428-439.
- [4] Malone JG. Role of small colony variants in persistence of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis lungs[J]. *Infect Drug Resist*, 2015, 8(2): 237-247.
- [5] Pang Z, Raudonis R, Glick BR, et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies[J]. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(1): 177-192.
- [6] Restrepo MI, Babu BL, Reyes LF, et al. Burden and risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* community-acquired pneumonia: a multinational point prevalence study of hospitalised patients[J]. *Eur Respir J*, 2018, 52(2): 1701190.
- [7] Raman G, Avendano EE, Chan J, et al. Risk factors for hospitalized patients with resistant or multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis[J]. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2018(7): 79.
- [8] Horcajada JP, Montero M, Oliver A, et al. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2019, 32(4): e00031-19.
- [9] Rossi E, La Rosa R, Bartell JA, et al. *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(5): 331-342.
- [10] Baker SM, McLachlan JB, Morici LA. Immunological considerations in the development of *Pseudomonas aeruginosa* vaccines [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2020, 16(2): 412-418.
- [11] Mojgani N, Shahali Y, Dadar M. Immune modulatory capacity of probiotic lactic acid bacteria and applications in vaccine development[J]. *Benef Microbes*, 2020, 11(3): 213-226.
- [12] 欧兴坤,李文桂.铜绿假单胞菌Ef-LasR疫苗的构建、鉴定及表达[J].中国病原生物学杂志,2021,16(6):630-633,638.
- [13] 张丽,李文桂,谭建蓉.日本血吸虫重组Bb(pGEX-Sj26GST)疫苗免疫BALB/c小鼠脾细胞动态观察[J].中国人兽共患病学报,2014,30(10):1028-1032,1038.
- [14] Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Protein Cell*, 2015, 6(1): 26-41.
- [15] Pesci EC, Pearson JP, Seed PC, et al. Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Bacteriol*, 1997, 179(10): 3127-3132.
- [16] Duan K, Surette MG. Environmental regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Las and Rhl quorum-sensing systems[J]. *J Bacteriol*, 2007, 189(13): 4827-4836.
- [17] 欧兴坤,李文桂.铜绿假单胞菌群体感应系统las/rhl蛋白的研制现状[J].中国病原生物学杂志,2021,16(8):988-992.
- [18] Castro MS, Molina MA, Azpiroz MB, et al. Probiotic activity of *Enterococcus faecalis* CECT7121: effects on mucosal immunity and intestinal epithelial cells[J]. *J Appl Microbiol*, 2016, 121(4): 1117-1129.
- [19] Diaz AM, Almogni B, Molina MA, et al. Potentiation of the humoral immune response elicited by a commercial vaccine against bovine respiratory disease by *Enterococcus faecalis* CECT7121 [J]. *Benef Microbes*, 2018, 9(4): 553-562.
- [20] Chen W, Ma C, Wang D, et al. Immune response and protective efficacy of recombinant *Enterococcus faecalis* displaying dendritic cell-targeting peptide fused with *Eimeria tenella* 3-1E protein [J]. *Poult Sci*, 2020, 99(6): 2967-2975.
- [21] Kamei A, Wu W, Traficante DC, et al. Collaboration between macrophages and vaccine-induced CD4+ T cells confers protection against lethal *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia during neutropenia[J]. *J Infect Dis*, 2013, 207(1): 39-49.
- [22] Hector A, Schafer H, Poschel S, et al. Regulatory T-cell impairment in cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas* infection[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015, 191(8): 914-923.
- [23] 丁凤鸣,张杏怡.铜绿假单胞菌Las系统的免疫干预机制研究进展[J].中国呼吸与危重监护杂志,2017,16(5):529-532.
- [24] Schreiber T, Swanson PE, Chang KC, et al. Both gram-negative and gram-positive experimental pneumonia induce profound lymphocyte but not respiratory epithelial cell apoptosis[J]. *Shock*, 2006, 26(3): 271-276.
- 【收稿日期】 2021-12-28 【修回日期】 2022-02-16
- terol, 2009, 15(17): 2116-2124.
- [17] Lin R, Lu G, Wang J, et al. Time course of gene expression profiling in the liver of experimental mice infected with *Echinococcus multilocularis*[J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e14557.
- [18] Clevers H, Loh KM, Nusse R. Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control[J]. *Science*, 2014, 346(6205): 1248012.
- [19] Li Y, Fu H, Wang H, et al. GLP-1 promotes osteogenic differentiation of human ADSCs via the Wnt/GSK-3beta/beta-catenin pathway[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2020(515): 110921.
- 【收稿日期】 2021-12-22 【修回日期】 2022-02-01

(上接 429 页)

- [13] Sun Y, Xiong X, Wang X. The miR-590-3p/VEGFA axis modulates secretion of VEGFA from adipose-derived stem cells, which acts as a paracrine regulator of human dermal microvascular endothelial cell angiogenesis[J]. *Hum Cell*, 2020, 33(3): 479-489.
- [14] 毕晓娟,张传山,李亮,等.泡球蚴组织蛋白处理对人肝星状细胞 $\alpha$ -SMA和COL1A1表达及TGF- $\beta$ /Smad信号通路的影响[J].中国病原生物学杂志,2017,12(10):956-960.
- [15] 马文梅,毕晓娟,杨宁,等.泡球蚴蛋白对脂肪间充质干细胞迁移和分化的影响[J].中国病原生物学杂志,2021,16(3):282-286.
- [16] Lin RY, Wang JH, Lu XM, et al. Components of the mitogen-activated protein kinase cascade are activated in hepatic cells by *Echinococcus multilocularis* metacestode[J]. *World J Gastroenterol*,