

## 微小 RNA 在丁酸钠诱导胚胎干细胞分化为肝细胞过程中表达差异谱的变化

陈亚进<sup>1</sup>, 闵 军<sup>1</sup>, 商昌珍<sup>1</sup>, 任 萌<sup>2</sup>, 彭孝雄<sup>1</sup>, 曹 君<sup>1</sup>, 陈积圣<sup>1</sup>

中山大学 附属第二医院 <sup>1</sup>肝胆外科 <sup>2</sup>内分泌科, 广州 510120

通信作者: 闵 军 电话: 020-34071165, 电子邮件: drjunmin@yahoo.com.cn

**摘要:** **目的** 探讨微小 RNA (microRNA) 在丁酸钠诱导胚胎干细胞分化为肝细胞过程中表达差异谱的变化, 为进一步研究 microRNA 调控胚胎干细胞向肝细胞分化的分子机制奠定基础。**方法** 分别于丁酸钠诱导小鼠胚胎干细胞向肝细胞分化过程中的第 0、6、9 天提取细胞总 RNA, 并分离获得分化细胞 microRNA。利用 microRNA 芯片技术将细胞 microRNA 与哺乳动物 microRNA 芯片杂交, 采用 LuxScan 3.0 图像分析软件和 SAM (version 2.1) 软件对芯片杂交结果进行数据分析, 筛选出明显差异表达 microRNA 并进行靶基因预测。**结果** 胚胎干细胞向肝细胞方向分化 6 d 时明显差异表达的 microRNA 共 39 个, 其中 17 个表达上调、22 个表达下调; 9 d 时明显差异表达的 microRNA 共 44 个, 其中 17 个表达上调, 27 个表达下调。明显时相差异表达的 36 种 microRNA 中 15 种与组蛋白去乙酰化酶相关联。**结论** 在丁酸钠诱导胚胎干细胞向肝细胞分化过程中, 组蛋白去乙酰化酶及与其相关的 microRNA 很可能具有重要的调控胚胎干细胞生长和分化的作用。

**关键词:** 胚胎干细胞; 肝细胞; 分化; 微小 RNA; 丁酸钠

**中图分类号:** R657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-503X(2008)04-0469-05

**DOI:**10.3881/j.issn.1000-503X.2008.04.022

## MicroRNA Differential Expression Profile during Differentiation of Embryonic Stem Cells towards Hepatocytes Induced by Sodium Butyrate

CHEN Ya-jin<sup>1</sup>, MIN Jun<sup>1</sup>, SHANG Chang-zhen<sup>1</sup>, REN Meng<sup>2</sup>, PENG Xiao-xiong<sup>1</sup>,  
CAO Jun<sup>1</sup>, CHEN Ji-sheng<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Hepatobiliary Surgery, <sup>2</sup>Department of Endocrinology, the Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China

Corresponding author: Min Jun Tel: 020-34071165, E-mail: drjunmin@yahoo.com.cn

**ABSTRACT: Objective** To explore the expression profile of microRNAs during the course of embryonic stem cells differentiation towards hepatocytes induced by sodium butyrate. **Methods** Total RNA was extracted from embryonic stem cells on day 0, 6, and 9 during cell differentiation, and microRNA was isolated from the total RNA. Microarray analysis of microRNA expression was performed to detect the different expression levels of microRNA among the indicated time points (day 0, 6, and 9). **Results** Compared with the microRNA expression level on day 0 of cell differentiation, 17 different microRNAs exhibited higher expressions both on day 6 and day 9. Twenty-two and 27 microRNA demonstrated lower expressions on day 6 and day 9, respectively.

Further analysis revealed that 15 microRNA among the above microRNAs with significant differential expression may keep close interaction with histone deacetylase. **Conclusion** During the course of embryonic stem cells differentiation towards hepatocytes induced by sodium butyrate, histone deacetylase and its relevant microRNAs may play important roles in cell differentiation.

**Key words:** embryonic stem cell; hepatocyte; differentiation; microRNA; sodium butyrate

*Acta Acad Med Sin*, 2008, 30(4):469-473

尽管目前已有较多体外诱导胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ES 细胞) 分化为肝细胞的报道<sup>[1-3]</sup>, 但由于对 ES 细胞分化的分子调控机制了解较少, 尚难以全面、有序地掌控 ES 细胞向肝细胞分化的方向和进程, 所获取的目的细胞在分化效率、均质性和功能等方面离临床应用尚较远。有研究表明微小 RNA (microRNA) 与干细胞的自我更新、多能性维持、分化和分裂增殖等有关<sup>[4, 5]</sup>。本研究采用哺乳动物 microRNA 表达谱芯片技术检测丁酸钠诱导 ES 细胞分化为肝细胞过程中 microRNA 的差异表达变化, 以发现可能参与调控 ES 细胞分化为肝细胞的相关 microRNA, 从而为阐明并掌控 ES 细胞向肝细胞分化的 microRNA 调控机制奠定基础。

## 材料和方法

**材料** E14 小鼠 ES 细胞由中山大学附属第二医院医学研究中心提供。细胞总 RNA 抽提试剂 Trizol 为 Invitrogen 公司产品; microRNA 探针构建试剂盒与 microRNA 分离试剂盒为 Ambion 公司产品; 荧光标记、芯片杂交及扫描由北京奥博生物有限公司协助完成; LuxScan 10K/A 双通道激光扫描仪、LuxScan 3.0 图像分析软件均为 CapitalBio 公司产品。

**ES 细胞诱导分化及总 RNA 提取** 丁酸钠诱导 E14 小鼠 ES 细胞分化为肝细胞参考文献 [6, 7]。选择 ES 细胞分化第 0、6、9 天 3 个时间点, 采用 Trizol 一步法提取分化细胞中的总 RNA, 通过异丙醇沉淀法浓缩 RNA, 用分光光度计定量, 甲醛变性胶电泳质检总 RNA 的质量。

**microRNA 的分离、荧光标记及芯片杂交** 取 50~100 g 总 RNA 用聚乙二醇沉淀方法分离 microRNA。然后利用 T4 RNA 连接酶标记方法进行荧光标记, 再用无水乙醇沉淀, 吹干后用于芯片杂交, 具体步骤为将 RNA 溶于 16  $\mu$ l 杂交液中 (15% 甲酰胺; 0.2% 十二烷基硫酸钠; 3  $\times$  氯化钠/柠檬酸钠缓冲液; 50  $\times$  Denhardt's), 于 42 $^{\circ}$ C 杂交过夜。杂交结束

后, 先在 42 $^{\circ}$ C 左右含 0.2% 十二烷基硫酸钠、2  $\times$  氯化钠/柠檬酸钠缓冲液的液体中洗 4 min, 然后在 0.2  $\times$  氯化钠/柠檬酸钠缓冲液中室温洗 4 min。玻片甩干后即可用于扫描。

**芯片扫描及数据分析** 芯片用 LuxScan 10K/A 双通道激光扫描仪进行扫描, 然后采用 LuxScan 3.0 图像分析软件对芯片图像进行分析, 把图像信号转化为数字信号。用 Significance Analysis of Microarrays (SAM, version 2.1) 进行数据分析, 筛选出明显差异表达基因, 并在 Sanger 公司 (<http://microRNA.sanger.ac.uk/>) microRNA DataBase 中选取 miRBase Targets, 搜索明显差异表达基因 microRNA 预测的作用靶基因, 对靶序列进行综合分析。

## 结果

**SAM 数据分析结果** ES 细胞向肝细胞方向分化 6 d 时明显差异表达的 microRNA 共有 39 个, 其中 17 个表达上调、22 个表达下调; 9 d 时明显差异表达的 microRNA 共有 44 个, 其中 17 个表达上调, 27 个表达下调。经过初步分析, 去除预测的 microRNA、变化不太显著以及生物信息学分析未发现显著意义的 microRNA, 共挑选出 36 个 microRNA 进行生物信息学分析 (图 1, 2)。

**生物信息学分析结果** 组蛋白去乙酰化酶抑制剂丁酸钠在诱导 ES 细胞向肝细胞分化过程中, 明显时相性差异表达的 36 种 microRNA 中 15 种与组蛋白去乙酰化酶相关联 (表 1)。

## 讨论

丁酸钠是由结肠共生细菌发酵食物纤维产生的一种四碳短链脂肪酸 - 丁酸的盐类, 是一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂。丁酸钠能引起细胞核内多种变化, 包括组蛋白的超乙酰化、DNA 的甲基化及非组蛋白的修饰, 其中以组蛋白的超乙酰化最重要, 与

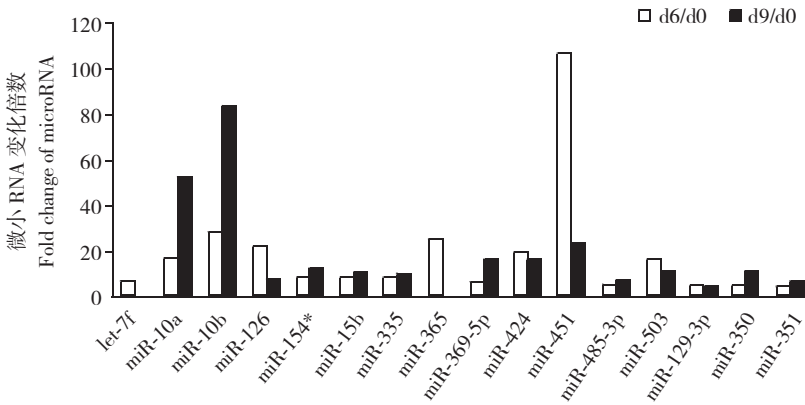


图 1 丁酸钠诱导胚胎干细胞分化过程中表达上调的微小 RNA

Fig 1 microRNAs that exhibited higher expression during the course of embryonic stem cells differentiation towards hepatocytes induced by sodium butyrate

d0、d6、d9 分别代表胚胎干细胞分化第 0、6、9 天时的微小 RNA 表达水平

d0, d6, d9 represent the microRNA expression level at day 0, 6, and 9 during the course of cell differentiation, respectively

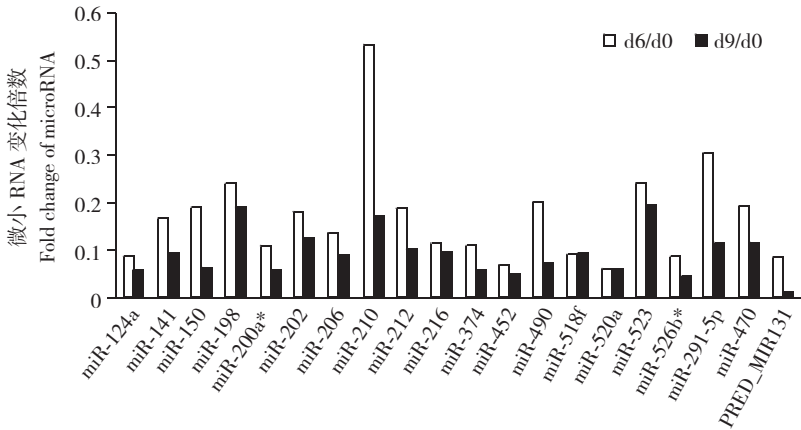


图 2 丁酸钠诱导胚胎干细胞分化过程中表达下调的微小 RNA

Fig 2 microRNAs that exhibited lower expression during the course of embryonic stem cells differentiation towards hepatocytes induced by sodium butyrate

表 1 胚胎干细胞向肝细胞分化过程中明显差异表达微小 RNA 预测的作用靶基因

Table 1 microRNAs that exhibited significant changes during embryonic stem cell differentiation towards hepatocytes and their possible target genes

微小 RNA microRNA	变化倍数 Fold change		靶基因 (组蛋白去乙酰化酶) Target genes (histone deacetylase)
	d6/d0	d9/d0	
miR-10a	16.7529	52.3677	HDAC8
miR-10b	27.7220	82.7559	HDAC4, HDAC8
miR-126	21.0120	7.1217	HDAC6, HDAC4
miR-369-5p	6.3064	15.9630	HDAC10
let-7f	6.8756	0.0000	HDAC2
miR-365	25.6303	0.0000	HDAC9, HDAC4
miR-350	4.7860	11.1038	HDAC8, HDAC2, HDAC1
miR-526b *	0.0852	0.0443	HDAC10
miR-374	0.1065	0.0560	HDAC2
miR-141	0.1667	0.0958	HDAC2
miR-518f	0.0884	0.0934	HDAC6
miR-520a	0.0591	0.0593	HDAC10
miR-210	0.5349	0.1710	HDAC2
miR-523	0.2407	0.1950	HDAC8
miR-150	0.1872	0.0613	HDAC6, HDAC11

基因表达有关。丁酸钠使组蛋白超乙酰化后, 激活一些转录因子, 使其结合并激活某些基因, 从而诱导细胞分化。有文献报道丁酸钠可诱导 ES 细胞分化为肝细胞<sup>[6-9]</sup>, 分化后获得的 ES 源性肝细胞具备正常肝细胞的典型形态, 表达正常肝细胞的特异性基因、蛋白和功能。但丁酸钠诱导 ES 细胞向肝细胞分化的具体机制尚不清楚。

MicroRNA 是一种小的内源性非编码 RNA 分子, 由 21~25 个核苷酸组成, 这些小的 miRNA 通常靶向一个或多个 mRNA, 通过翻译水平的抑制或断裂靶标 mRNA 调节基因的表达。近年研究表明在 ES 细胞分化过程中, 一些 microRNA 是未分化 ES 细胞所特有的, 并随着细胞分化而逐渐下调, 提示 microRNA 可能在维持 ES 细胞全能性和自我更新能力中起重要作用, 而这类 microRNA 也可作为 ES 细胞的分子标志<sup>[10, 11]</sup>。此外, 在造血细胞、脂肪、神经、肌肉和心肌细胞分化过程中也发现 microRNA 的参与并发挥着关键作用<sup>[12-16]</sup>。如发现肌肉特异性 miR-206 是调控肌细胞和心肌细胞发育的关键分子<sup>[12, 13]</sup>; 在造血干细胞分化过程中, 沿不同谱系发育受不同的 microRNA 调控, miR-146 调控淋巴系前体向 T 细胞、NK 细胞和 B 细胞分化, miR-155/24a/17 则调控髓系前体向粒细胞、巨噬细胞和红细胞发育<sup>[14]</sup>。

miR-122 是第一个被鉴定的肝特异性 microRNA, 它在胆固醇与脂肪酸的代谢过程中起着关键调节作用<sup>[17, 18]</sup>。本研究利用生物芯片技术初步探讨了 microRNA 在丁酸钠诱导 ES 细胞分化为肝细胞过程中可能的作用靶基因, 在 ES 细胞分化 0、6 (肝脏特异性蛋白甲胎蛋白和甲状腺素运载蛋白表达, 提示内胚层开始向肝系细胞分化) 和 9 d (肝脏特异性蛋白白蛋白表达, 表明细胞沿肝谱系发育) 3 个时相点进行了 microRNA 芯片扫描, 结果显示 6 d 时分别检出 17 个表达上调、22 个表达下调的 microRNA; 9 d 时检出 17 个表达上调、27 个表达下调的 microRNA。通过生物信息学分析显示, 其中 15 个 microRNA 与组蛋白去乙酰化酶关系密切。提示在 ES 细胞分化过程中, 组蛋白去乙酰化酶及其相关的 microRNA 很可能具有重要的调控 ES 细胞生长和分化的作用, 组蛋白去乙酰化酶抑制剂丁酸钠可以抑制组蛋白去乙酰化酶的表达并对与其相关 microRNA 的表达产生影响, 从而促进 ES 细胞向肝细胞方向分化。这为初步研究组蛋白去乙酰化酶参与 ES 细胞向肝细胞分化的机制奠定了实验基础。

目前 microRNA 数据库 (2007 年 2 月, 9.1 版) (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) 中登载的序列已达 4 449 条, 其中人类为 474 条, 小鼠为 382 条, 仅少数 microRNA 的部分功能被鉴定, 绝大多数 microRNA 的功能尚有待研究。本研究初步表明在组蛋白去乙酰化酶抑制剂丁酸钠诱导 ES 细胞分化过程中, microRNA 与组蛋白去乙酰化酶有相关性, 但其中 microRNA 究竟发挥何种功能、具体调控机制如何, 尚需要更深入且持久的研究, 后继研究应包括: (1) microRNA 在不同诱导时相表达水平变化的验证; (2) 根据 microRNA 与组蛋白去乙酰化酶相关性结果, 进行增强 (抑制) 和回复性实验, 观察 microRNA 表达水平变化时靶基因表达的变化, 以明确二者表达的依从关系; (3) 在对感兴趣的 microRNA 进行增强 (抑制) 和回复性实验时, 检测 ES 源性分化细胞肝脏特异性标志物表达的变化, 观察 microRNA 表达变化对 ES 细胞向肝细胞分化的影响。

综上, 本研究从细胞分化调控基因 microRNA 的角度出发, 初步探讨了组蛋白修饰在诱导 ES 细胞向肝细胞分化时的作用机制, 为更深入的开展 ES 细胞向肝细胞分化的分子机制研究奠定了实验基础。

## 参 考 文 献

- [1] Chinzei R, Tanaka Y, Shimizu-Saito K, *et al.* Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes [J]. *Hepatology*, 2002, 36(1):22-29.
- [2] Yamamoto H, Quinn G, Asari A, *et al.* Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes: biological functions and therapeutic application [J]. *Hepatology*, 2003, 37(5):983-993.
- [3] Soto-Gutierrez A, Kobayashi N, Rivas-Carrillo JD, *et al.* Reversal of mouse hepatic failure using an implanted liver-assist device containing ES cell-derived hepatocytes [J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(11):1412-1419.
- [4] Croce CM, Calin GA. MicroRNAs, cancer, and stem cell division [J]. *Cell*, 2005, 122(1):6-7.
- [5] Zhang B, Pan X, Anderson TA. MicroRNA: a new player in stem cells [J]. *J Cell Physiol*, 2006, 209(2):266-269.
- [6] Min J, Shang CZ, Chen YJ, *et al.* Selective enrichment of hepatocytes from embryonic stem cells with a culture system containing cholestatic serum [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2007, 28(12):1903-1909.
- [7] 商昌珍, 闵 军, 张 磊, 等. 丁酸钠体外诱导小鼠胚

- 胎干细胞分化为肝细胞 [J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22 (12):2424-2428.
- [8] Rambhatla L, Chiu CP, Kundu P, *et al.* Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells [J]. Cell Transplant, 2003, 12(1):1-11.
- [9] Zhou QJ, Xiang LX, Shao JZ, *et al.* *In vitro* differentiation of hepatic progenitor cells from mouse embryonic stem cells induced by sodium butyrate [J]. J Cell Biochem, 2007, 100(1):29-42.
- [10] Houbaviv HB, Murray MF, Sharp PA. Embryonic stem cell-specific microRNAs [J]. Dev Cell, 2003, 5(2):351-358.
- [11] Suh MR, Lee Y, Kim JY, *et al.* Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs [J]. Dev Biol, 2004, 270(2):488-498.
- [12] Kim HK, Lee YS, Sivaprasad U, *et al.* Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation [J]. J Cell Biol, 2006, 174(5):677-687.
- [13] Politz JC, Zhang F, Pederson T. MicroRNA-206 colocalizes with ribosome-rich regions in both the nucleolus and cytoplasm of rat myogenic cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(50):18957-18962.
- [14] Georgantas RW, Hildreth R, Morisot S, *et al.* CD34 + hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(8):2750-2755.
- [15] Wulczyn FG, Smirnova L, Rybak A, *et al.* Post-transcriptional regulation of the let-7 microRNA during neural cell specification [J]. Faseb J, 2007, 21(2):415-426.
- [16] Boutz PL, Chawla G, Stoilov P, *et al.* MicroRNAs regulate the expression of the alternative splicing factor nPTB during muscle development [J]. Genes Dev, 2007, 21(1):71-84.
- [17] Chang J, Nicolas E, Marks D, *et al.* miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1 [J]. RNA Biol, 2004, 1(2):106-113.
- [18] Esau C, Davis S, Murray SF, *et al.* miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by *in vivo* antisense targeting [J]. Cell Metab, 2006, 3(2):87-98.

(2008-05-29 收稿)