

论著

文章编号:1000-5404(2013)09-0850-04

Tmub1 沉默对大鼠肝部分切除术后肝细胞增殖的影响

马德宾¹, 沈雁兵¹, 王保林², 陈平¹ (400042 重庆, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所肝胆外科¹; 841700 新疆 马兰, 中国人民解放军第546医院外科²)

[摘要] 目的 探讨 Tmub1 蛋白在肝再生过程中的作用及其在肝再生过程中对 Securin 蛋白的影响。方法 54 只大鼠随机分为 3 组即 Tmub1 RNAi 慢病毒组、空载慢病毒组及正常对照组, 其中 Tmub1 RNAi 慢病毒组、空载慢病毒组注射相应病毒颗粒(3×10^7 TU), 对照组未行注射, 2 d 后行肝部分切除术(partial hepatectomy, PH), 每组分为 6 个亚组: PH 术后 0、2、6、12、24、48 h, 每亚组 3 只大鼠, 术后提取原代肝细胞、留取肝脏组织标本, 利用 Real-time PCR 和 Western blot 检测慢病毒干扰效果及 Tmub1 沉默后对 Securin 蛋白的影响。MTT 实验、流式细胞仪检测原代肝细胞的增殖情况。结果 Real-time PCR 和 Western blot 表明实验组 Tmub1 mRNA 和蛋白被有效抑制; Tmub1 沉默后 securin mRNA 表达无明显变化, 而 G₂/M 期 securin 蛋白量明显减少。MTT 实验表明 Tmub1 沉默可明显上调 PH 术后 6~24 h 肝细胞的增殖速率; 流式细胞分析结果显示实验组处于 G₂/M 期的肝细胞比例明显增高。结论 Tmub1 蛋白在肝再生过程中对肝细胞增殖进程发挥负向调控作用, 而该作用可能与其在蛋白质水平影响了 Securin 的表达密切相关。

[关键词] Tmub1; 肝再生; securin; 慢病毒; 体内转染

[中图分类号] R329.28; R394.2; R657.3

[文献标志码] A

Influence of Tmub1 silencing on proliferation of rat hepatocytes after partial hepatectomy

Ma Debin¹, Shen Yanbing¹, Wang Baolin², Chen Ping¹ (¹Department of Hepatobiliary Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; ²Department of Surgery, No. 546 Hospital of PLA, Malan, Xinjiang Uygur Autonomous Region, 841700, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of transmembrane and ubiquitin-like domain-containing protein 1 (Tmub1) protein in the liver regeneration and its impact on the expression of securin in the process. **Methods** A total of 54 adult male SD rats were randomly divided into Tmub1 RNAi lentivirus group, blank lentiviral vector group, and control, and they received an injection of lentivirus (3×10^7 TU) or PBS through ileocaecal vein. In 2 d later, partial hepatectomy (PH) were carried out in all rats. Then the liver tissue was collected in 0, 2, 6, 12, 24 and 48 h after model establishment to extract primary hepatocytes and preserve liver tissue. Effect of Tmub1 RNAi lentivirus interference on rat primary hepatocytes was detected by real-time PCR and Western blotting, respectively. Effect of Tmub1 RNAi lentivirus on the growth and cell cycle in rat primary hepatocytes was detected by MTT assay and flow cytometry, respectively. **Results** Real-time PCR and Western blotting showed that the expression of Tmub1 at mRNA and protein levels was significantly inhibited, and the expression of securin at mRNA level had no change, but the expression of securin at protein level was significantly down-regulated. MTT assay showed that Tmub1 gene silencing significantly improved the proliferation in liver cells in 6 to 24 h after PH. Flow cytometry displayed that the liver cells were arrested in G₂/M phase. **Conclusion** Tmub1 protein plays a negative role in the process of liver cells' proliferation, which may be closely related to its effect on the expression of securin at protein level.

[Key words] Tmub1; liver regeneration; securin; lentivirus; transfection *in vivo*

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81270523). Corresponding author: Chen Ping, E-mail: chenping@263.net

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81270523)

[通信作者] 陈平, E-mail: chenping@263.net

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130131.1708.013.html> (2013-01-31)

临床上,部分肝切除术(partial hepatectomy, PH)是目前治疗各种肝脏良恶性疾病最有效的方法。然而术后体内残肝是如何增殖补偿机体肝脏功能的呢?目

前普遍认为:①成熟的肝细胞具有无限的增殖能力,肝切除术后仅需1%的肝细胞就能完全恢复至原肝大小^[1];②肝再生是通过残存的成熟肝细胞复制增殖实现的,包括肝实质细胞、窦状内皮细胞、胆管上皮细胞、枯否氏细胞和肝星状细胞等^[2];③肝干细胞仅在肝再生被完全抑制或慢性肝损害时才被激活分化为成熟肝细胞^[3]。肝再生涉及了复杂的分子机制,这引起了广泛的关注。Tmub1 (transmembrane and ubiquitin-like domain-containing protein 1) 蛋白于2005年首次报道,其在肝再生过程中发挥了重要作用^[4]。Tmub1 蛋白是一种核浆穿梭蛋白,全长246个氨基酸,它有几个特别的功能区:1个脯氨酸富集区域;3个亮氨酸富集区形成的 α -螺旋结构;1个位于氨基端的出核信号区(nuclear export-signal, NES);1个类似泛素结构的区域(ubiquitin-like domain, UBL;121-175aa),该区域内包含有与UCH、E₂和CUE的反应位点^[4]。然而,Tmub1 蛋白是如何在肝细胞增殖周期中发挥作用,其分子机制还需进一步研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物与病毒株 Sprague-Dawley 大鼠由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供;Tmub1 RNAi 慢病毒购自上海比昂生物有限公司,滴度为 3×10^8 TU/mL。

1.1.2 实验试剂与仪器 DMEM 培养基、LB 培养基、胎/小牛血清、D-Hanks 液购自 GIBCO 公司;胰蛋白酶、Penicillin/Streptomycin、PBS 购自 Invitrogen 公司;胶原酶购自 Prima Cell 公司;0.4% 台盼蓝染液购自 Solarbio 公司;anti-Tmub1 购自 Santa Cruz 公司;anti-securin 购自 Abcam 公司;dNTPS、Agarose Gel DNA Purification Kit Ver2.0、Total RNA 提取试剂、RT-PCR 反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司;T₄ DNA 连接酶购自 NEB 公司;1 kb/100 bp Ladder 购自 Fermentas 公司;Tripure RNA Isolation Reagent 购自 Roche 公司;MTT 试剂盒购自 Roche 公司;2% 戊巴比妥钠溶液购自北京鼎国昌盛生物公司;肝素钠盐溶液购自北京华迈科生物公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 实验条件:雄性 Sprague-Dawley 大鼠,体质量 200~300 g,置于标准条件下;12 h 白昼交替,保持室温恒定,并能自由接触水和食物,保证各组间大鼠的体质量及生活习惯无明显差别。将 54 只大鼠随机进行分组,其中 Tmub1 RNAi 实验组、空载慢病毒组分别通过盲肠静脉注射相应病毒颗粒(慢病毒每 0.1 mL 为一个注射单位,约 3×10^7 TU 病毒量。每次注射前可用 PBS 稀释至 10 倍,行体内实验时注射稀释液 1 mL 即可),对照组未行注射操作,2 d 后行 PH 术。每组分为 6 个亚组:PH 术后 0、2、6、12、24、48 h,且每亚组含有 3 只大鼠。术后留取肝脏组织标本、利用原位组织消化法提取的原代肝细胞。在实验中我们严格遵守国际通用实验室动物使用指南及第三军医大学动物实验管理使用规定。Tmub1 RNAi 实验组、

空载慢病毒组分别通过盲肠静脉注射 Tmub1 RNAi 慢病毒及其空载体,对照组未行注射操作,2 d 后行 PH 术。

1.2.2 建立大鼠 PH 术动物模型 慢病毒转染 2 d 后将大鼠按分组行 PH 术。实验前大鼠均禁食 4 h 以上。2% 戊巴比妥钠按 45 mg/kg 腹腔内注射麻醉。脱毛剂脱去腹部毛,并用强力碘消毒腹壁,铺自制无菌洞巾。自剑突下纵形剪开腹壁长约 3 cm,用自制的腹部拉钩牵拉腹腔,充分显露大鼠肝脏,并且游离肝脏周围的韧带,轻轻挤压两侧腹壁可使肝叶充分外露,在切口上缘放置 1 号丝线,用棉签向上拨起肝脏,显露左叶根部,用 1 号丝线结扎,同样方法结扎肝脏中叶根部,剪去肝左叶、中叶。将余肝放回腹腔,注意观察有无出血,必要时给予双重结扎,连续缝合腹部切口。术后将大鼠置于灯光下可促其苏醒,并给予自由进食水,必要时还应保暖,观察其生存情况。

1.2.3 原位肝细胞分离与原代肝细胞培养 按实验分组于 PH 术后 0、2、6、12、24、48 h 分别留取大鼠 10 g 左右肝脏组织,原位消化肝脏,提取原代肝细胞,台盼蓝染色测定细胞总数及细胞活力,并将肝细胞培养于培养瓶中,以便后期 MTT 实验及流式细胞术分析细胞增殖周期。

1.2.4 RT-PCR 法检测 Tmub1 mRNA、securin mRNA 水平 根据 GenBank 数据库提供的 Tmub1、securin 编码氨基酸的 cDNA 序列,用 Primer Premier 5.0 软件设计 Tmub1、securin 特异的 PCR 引物及 β -actin 特异性引物,将引物交由上海 Sanger 生物公司合成。Tmub1 特异性 PCR 引物上游:5'-TCTGTCG-GAGAACTTAGGA-3';下游:5'-TCTGGAGGTGTGATGCTG-3'。 β -actin 特异性引物上游:5'-CGTTGACATCCGTTAAAGACC-3';下游:5'-AACAGTCCGCTAGAAGCAC-3'。securin 特异性 PCR 引物上游:5'-GCTGCGCCTGCCCTGTGATG-3';下游:5'-TGTG-GCGTCTGGAGCGCGTTGA-3'。 β -actin 特异性引物与 Tmub1 检测时所使用的一致。按 Trizol 试剂盒说明书提取细胞 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 含量和纯度。按照逆转录试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA。用 SYBR[®] Green I 嵌合荧光法进行 PCR 扩增。

1.2.5 Western blot 法检测 Tmub1 蛋白、securin 蛋白表达情况

采用 PH 术后 2、12、24 h 组肝脏组织标本。RIPA 裂解液裂解细胞提取细胞内蛋白,BCA 法进行蛋白质定量,用 SDS-PAGE 进行电泳分离,转 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,分别加 Tmub1 和 securin 蛋白一抗(1:500),4 °C 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,加辣根过氧化物酶标记二抗(1:2000),室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次,用 ECL 显色并曝光显影。

1.2.6 噻唑蓝(MTT)试验检测各组肝细胞增殖情况 将 1.2.3 方法提取的原代肝细胞分别进行 MTT 实验。结果分析以大鼠 PH 术后提取肝细胞的时间为横坐标(X 轴),经修正的吸光值为纵坐标(Y 轴)绘制细胞增殖生长曲线图。

1.2.7 用流式细胞仪观察各组细胞周期 将 1.2.3 方法中 24 h 组提取的原代肝细胞进行固定处理(4 °C 预冷的 70% 乙醇固定后加入 RNA 酶和 PI)后上机检测(重庆医科大学分子生物学实验中心流式细胞室)。上机前标本 4 °C 保存。

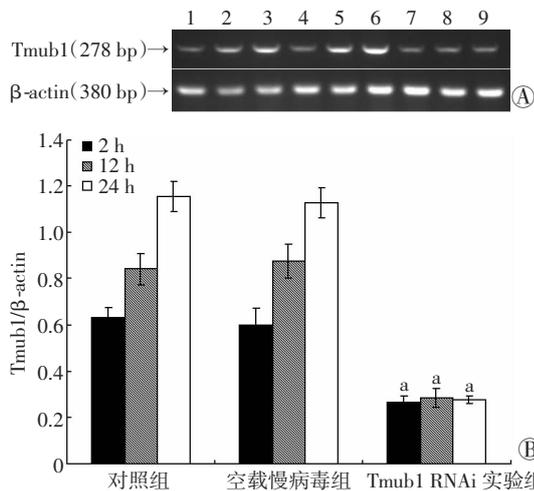
1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 Tmub1 RNAi 干扰效果

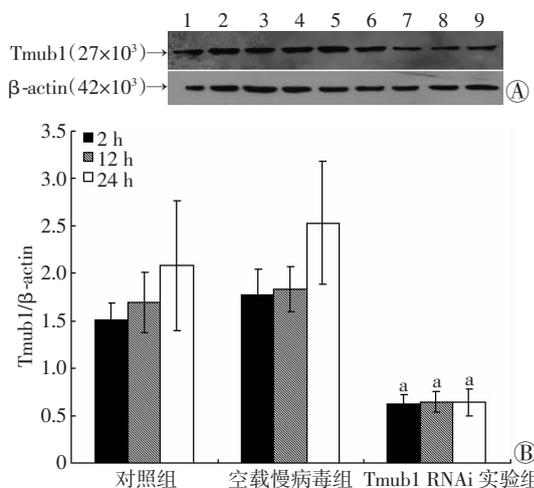
在预实验中我们使用带 GFP 荧光探针的 Tmub1 RNAi 慢病毒经大鼠盲肠静脉肝脏转染,经激光共聚焦显示转染效果良好。在本实验中,我们首先检测了提取的各个实验组细胞中 Tmub1 的 RNA 干扰效果。结果表明,实验组 Tmub1 mRNA 和蛋白表达均被有效抑制(图 1、2),统计分析结果显示, Tmub1 RNAi 实验组与对照组和空载慢病毒组相比 Tmub1 表达显著降低 ($P < 0.05$),实验结果与预实验中的激光共聚焦结果基本一致。



A: RT-PCR 结果 1~3: 对照组 2、12、24 h; 4~6: 空载慢病毒组 2、12、24 h; 7~9: Tmub1 RNAi 实验组 2、12、24 h

B: Tmub1 mRNA 相对表达量 a: $P < 0.05$, 与对照组同时时间点比较

图 1 RT-PCR 鉴定 Tmub1 RNAi 慢病毒大鼠体内肝脏转染后 Tmub1 mRNA 的表达



A: Western blot 结果 1~3: 对照组 2、12、24 h; 4~6: 空载慢病毒组 2、12、24 h; 7~9: Tmub1 RNAi 实验组 2、12、24 h

B: Tmub1 蛋白相对表达量 a: $P < 0.05$, 与对照组同时时间点比较

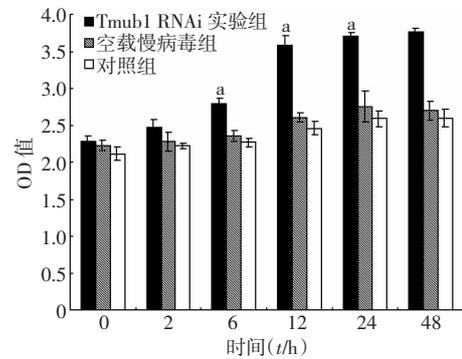
图 2 Western blot 检测 Tmub1 RNAi 慢病毒大鼠体内肝脏转染后 Tmub1 蛋白相对表达

2.2 Tmub1 沉默后对肝细胞增殖的影响

平均每克鼠肝可获取 8.3×10^6 个肝细胞,平均活率 91.3%。接种 24 h 后(绝大多数肝细胞贴壁),收集肝细胞,用

于后续实验。

MTT 实验结果显示(图 3),于 PH 术后 6、12、24 h 提取的肝细胞经过相同培养时间后, Tmub1 RNAi 实验组细胞明显较另两组细胞量多,间接反映增殖速率快。上述结果证明, Tmub1 沉默后可明显上调 PH 术后 6~24 h 肝细胞的增殖速率。流式细胞分析结果(表 1)表明实验组处于 G_2/M 期的肝细胞比例明显高于对照组。



PH 术后 6~24 h 肝细胞的增殖速率明显上调, a: $P < 0.05$, 与同时时间点对照组比较

图 3 MTT 实验检测 Tmub1 沉默后肝细胞增殖速率

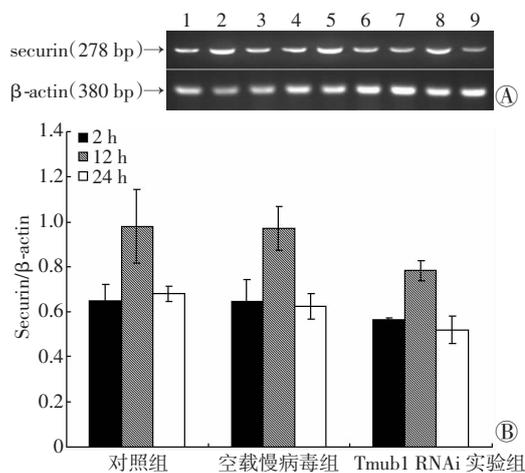
表 1 各组 PH 术后 24 h 原代肝细胞细胞周期分布 (% $\bar{x} \pm s$)

组别	G_1 期	S 期	G_2/M 期
对照组	72.65 \pm 2.87	24.59 \pm 2.53	2.77 \pm 0.35
实验组	79.91 \pm 1.38	8.21 \pm 2.08	11.88 \pm 1.66 ^a

a: $P < 0.05$, 与对照组比较

2.3 Tmub1 沉默后对 securin mRNA 及其蛋白表达的影响

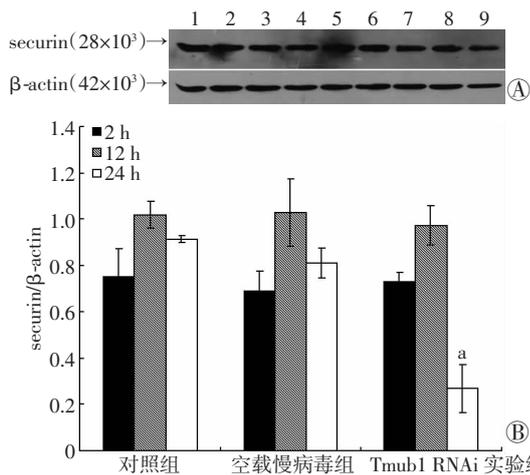
为了探讨出现上述结果的原因,我们查阅相关文献,肝细胞增殖 G_2/M 期主要事件是染色体分离,其主要调控蛋白之一是 securin 蛋白。因此,我们检测了 Tmub1 RNAi 实验组、空载慢病毒组及对照组的 securin 表达情况(图 4、5)。结果发现,在 Tmub1 沉默后, securin mRNA 表达无明显变化,而 G_2/M 期 securin 蛋白量明显降低。这说明 Tmub1 的沉默未影响 securin 蛋白的基因转录(即未影响 securin 蛋白的合成),而是加速了 securin 蛋白的降解。



A: RT-PCR 结果 1~3: 对照组 2、12、24 h; 4~6: 空载慢病毒组 2、12、24 h; 7~9: Tmub1 RNAi 实验组 2、12、24 h

B: securin mRNA 相对表达量

图 4 RT-PCR 检测再生肝细胞中 securin mRNA 表达



A: Western blot 结果 1~3:对照组 2、12、24 h;4~6:空载慢病毒组 2、12、24 h;7~9:Tmub1 RNAi 实验组 2、12、24 h
B: securin 蛋白相对表达量 a: $P < 0.05$, 与对照组 24 h 时间点比较

图5 Western blot 检测再生肝细胞中 securin 蛋白相对表达

3 讨论

3.1 Tmub1 蛋白可能在肝细胞增殖周期 G₂/M 期发挥重要作用

Tmub1 蛋白是一种含有泛素样结构域的核-胞浆穿梭蛋白。正常情况下,它微量存于细胞核中,而在肝再生过程中则会大量表达,并于胞核-胞质之间穿梭^[4-9]。Tmub1 蛋白在细胞核中的量会随着肝细胞增殖周期的进展而变化,特别在肝细胞增殖后期,Tmub1 蛋白几乎全部聚集于细胞核内^[4],这提示 Tmub1 蛋白可能参与调控肝细胞增殖的有丝分裂进程。Tmub1 沉默后会导致异常中心体、异常纺锤体及多核细胞形成^[5],这提示 Tmub1 蛋白可能与 G₂/M 期的染色体分离事件有关。而我们的 MTT 实验及流式细胞分析结果提示 Tmub1 沉默后肝细胞增殖加速且主要发生于 G₂/M 期。综上,Tmub1 蛋白在细胞核内可能参与调控肝细胞有丝分裂进程。该作用主要发生于 G₂/M 期,通过影响染色体分离抑制肝再生。然而 Tmub1 蛋白在肝再生过程中却是高表达,所以 Tmub1 蛋白在细胞核内的功能可能是在肝再生过程中抑制肝细胞过度、过度增殖,使肝再生过程有序有控。甚至,该功能的失常与肝脏肿瘤的发生有关^[8]。

3.2 Tmub1 蛋白在肝再生过程中发挥重要作用可能与其在蛋白质水平影响了 securin 的表达密切相关

securin 蛋白是调控细胞增殖周期中 M 期染色体分离的重要因子,该蛋白的降解方式是在胞核内经泛素-蛋白酶体通路降解,其过程受到类泛素化分子的调控^[10-12]。Tmub1 蛋白含有一种特殊的 UBL 结构域,而我们的实验结果表明 Tmub1 的沉默在蛋白水平使 securin 蛋白的表达量降低。因此,Tmub1 蛋白在肝再

生过程中可能影响了 securin 蛋白经泛素-蛋白酶体通路降解过程中的某一环节,这种影响可能是通过与 securin 蛋白直接作用产生,亦可能是通过与该过程的某一关键酶相互作用而产生(其作用机制可能与 UBL 结构域相关),从而影响染色体分离,对肝细胞增殖进程发挥负向调控作用,使肝再生过程有序有控。

总之,本研究探讨了 Tmub1 蛋白沉默后对大鼠肝部分切除术后肝细胞增殖的影响,希望通过对 Tmub1 蛋白的研究,阐明肝细胞增殖及肝再生分子调控的新机制,为研究肝细胞增殖的自身调控机制提供一条新思路,从而为临床上治疗肝功能衰竭、促进残肝再生提供新方法。

参考文献:

- [1] Michalopoulos G K, DeFrances M. Liver regeneration[J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2005, 93: 101 - 134.
- [2] Michalopoulos G K. Liver regeneration[J]. *J Cell Physiol*, 2007, 213 (2): 286 - 300.
- [3] Fausto N, Campbell J S, Riehle K J. Liver regeneration[J]. *Hepatology*, 2006, 43(2 Suppl 1): S45 - S53.
- [4] Della-Fazia M A, Castelli M, Bartoli D, et al. HOPS: a novel cAMP-dependent shuttling protein involved in protein synthesis regulation[J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(Pt 14): 3185 - 3194.
- [5] Pieroni S, Della-Fazia M A, Castelli M, et al. HOPS is an essential constituent of centrosome assembly[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(10): 1462 - 1466.
- [6] Yang H, Takagi H, Konishi Y, et al. Transmembrane and ubiquitin-like domain-containing protein 1 (Tmub1/HOPS) facilitates surface expression of GluR2-containing AMPA receptors [J]. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2809.
- [7] Zhang W, Savelieva K V, Suwanichkul A, et al. Transmembrane and ubiquitin-like domain containing 1 (Tmub1) regulates locomotor activity and wakefulness in mice and interacts with CAMLG[J]. *PLoS One*, 2010, 5(6): e11261.
- [8] Castelli M, Pieroni S, Brunacci C, et al. Hepatocyte odd protein shuttling (HOPS) is a bridging protein in the nucleophosmin-p19 (Arf) network[J]. *Oncogene*, 2012, [Epub ahead of print].
- [9] Liu M, Liu H, Wang X, et al. IL-6 induction of hepatocyte proliferation through the Tmub1-regulated gene pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 29(6): 1106 - 1112.
- [10] Hlubek F, Pfeiffer S, Budczies J, et al. Securin (hPTTG1) expression is regulated by beta-catenin/TCF in human colorectal carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2006, 94(11): 1672 - 1677.
- [11] Marangos P, Carroll J. Securin regulates entry into M-phase by modulating the stability of cyclin B[J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(4): 445 - 451.
- [12] Mora-Santos M, Castilla C, Herrero-Ruiz J, et al. A single mutation in Securin induces chromosomal instability and enhances cell invasion [J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(2): 500 - 5010.

(收稿:2012-11-12;修回:2013-01-10)

(编辑 邓强庭)