

## 肝星状细胞中表皮形态发生素 表达调控机制及其作用研究\*

石磊<sup>1,2)</sup> 秦恩强<sup>2)</sup> 贾雅丽<sup>3)</sup> 吴丹<sup>2)</sup> 金磊<sup>2)</sup> 曾泉<sup>3)</sup>  
姜天俊<sup>2)</sup> 聂为民<sup>2)</sup> 岳文<sup>3)\*\*</sup> 王福生<sup>1,2)\*\*</sup>

<sup>(1)</sup> 解放军医学院, 北京 100853; <sup>(2)</sup> 解放军 302 医院感染性疾病诊疗与研究中心, 北京 100039;

<sup>(3)</sup> 军事医学科学院野战输血研究所干细胞与再生医学研究室, 北京 100850

**摘要** 肝星状细胞是肝脏中重要的间质细胞, 是肝细胞外基质的主要来源。表皮形态发生素(epimorphin、EPM、syntaxin2)在肝脏发育、再生及癌变过程中发挥了重要的作用, 目前其表达变化的调控机制及对肝星状细胞的作用还未有报道。通过对肝组织标本进行检测, 发现肝纤维化过程中肝星状细胞表达 EPM 上调。从表观遗传学的角度对 EPM 表达变化调控机制进行研究, 发现 DNA 去甲基化促进了 EPM 的表达。为了研究 EPM 对肝星状细胞的可能的调节作用, 将 EPM 表达质粒转染肝星状细胞, 之后检测了 EPM 对肝星状细胞增殖及迁移能力的变化。结果证明 EPM 能够促进肝星状细胞的增殖与迁移。本研究发现, 激活的肝星状细胞高表达 EPM 可能是由于 DNA 去甲基化引起的, 同时, 高表达的 EPM 能够促进肝星状细胞的增殖与迁移, 进而促进肝纤维化进展。

**关键词** 人肝星状细胞, 表皮形态发生素, DNA 甲基化, 细胞增殖, 细胞迁移

**学科分类号** R34, R512.6

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2015.0383

肝纤维化(liver fibrosis)是临床常见的慢性肝病, 由各种致病因素(病毒、酒精、免疫紊乱等)长期或反复所致肝损伤后, 肝内结缔组织异常增生、肝小叶结构破坏甚至肝功能失代偿的一种疾病<sup>[1]</sup>。任何肝脏损伤在损伤及修复的过程中都有肝纤维化的过程, 如果损伤因素长期不能去除则进展为肝硬化。肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的激活是肝纤维化进展过程的中心事件之一<sup>[1-2]</sup>。

肝星状细胞又被称为肝贮脂细胞(fat-storing cells, FSC)、维生素 A 贮存细胞(vitamin A-storing cell), 位于 Disse 间隙内, 紧贴着肝窦内皮细胞(sinusoidal endothelial cells, SEC)和肝细胞。其形态不规则, 胞体呈圆形或不规则形, 常伸出数个星状胞突包绕着肝血窦。HSC 对于维持维生素 A 的稳态平衡、肝脏组织再生、抗原提呈、T 淋巴细胞识别、分泌细胞因子及趋化因子等方面发挥着重要的作用<sup>[3-4]</sup>。肝脏受到损伤时, HSC 会发生活化, 其增殖和迁移能力增强, 同时产生大量的细胞外基

质(extracellular matrix, ECM), 这是肝纤维化和肝硬化发生的核心环节<sup>[5-6]</sup>。自 Enzan 等<sup>[7]</sup>通过  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)染色发现肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)基质中有明显的肌纤维母细胞(myofibroblast, MFB)浸润以来, HSC 在肝纤维化及肝癌发展中的作用越来越引起人们的关注<sup>[3, 8-10]</sup>。

人表皮形态发生素(epimorphin、EPM、Syntaxin-2)基因定位在 7 号染色体, 基因编码序列为 911 bp, 编码 290 个氨基酸。EPM 蛋白存在着 3 种亚型: I、II 型为 34 ku, III 型为 31 ku, 这 3 种形式的蛋白是由选择性剪接产生的<sup>[11]</sup>。EPM 高度保守, 主要表达于与表皮组织、肌肉和血管相邻

\* 国家自然科学基金资助项目(81200303, 81470097)。

\*\* 通讯联系人。

王福生. Tel: 010-66933333, E-mail: fswang302@163.com

岳文. Tel: 010-66931949, E-mail: yuewen26@163.com

收稿日期: 2015-12-09, 接受日期: 2016-03-23

近的组织、外分泌和内分泌腺等, 在正常肝脏主要表达于肝窦状隙的肝星状细胞(HSC)、汇管区血管和胆管上. EPM 通过表皮-间质相互作用介导表皮形态发生、腺管状结构或球状类器官体的形成<sup>[12]</sup>. 肝脏发育过程中, HSC 主要通过表面特异性表达的 EPM 与肝干细胞直接接触而促进肝干细胞的功能性分化<sup>[13]</sup>. 在某些疾病中, EPM 也发挥了重要的作用. Bascom 等<sup>[14]</sup>发现未生育和初产雌性 WAP-EPM 小鼠发生肺泡异常增生和高分化腺癌, 表明在乳腺正常的形态发生过程改变会导致肿瘤. EPM 在溃疡性结肠炎病人中的 EPM 阳性细胞数量和表达谱都会发生改变<sup>[15]</sup>. 在非特异性间质性肺炎中, EPM 参与了弥漫间质性肺纤维化的修复<sup>[16]</sup>. 我们前期的研究也发现, EPM 能够通过 MMP-9 促进肝细胞癌的转移与浸润<sup>[8]</sup>.

目前, 调控 EPM 表达变化的机制及其对于 HSC 的相关作用还未见报道. 为研究 EPM 在肝星状细胞激活过程中表达变化的作用以及相关机制, 我们从表观遗传学的角度进行了考察, 并过表达及抑制表达肝星状细胞中的 EPM, 进一步研究了 EPM 对 HSC 生物学行为的影响.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

肝硬化及正常肝组织来源于解放军 302 医院手术标本. LX-2 细胞与 LX2-shEPM(干扰表达 EPM)细胞由军事医学科学院干细胞与再生医学研究室保存. 限制性内切酶、dNTP、Taq 酶及快速连接试剂盒均购自宝生物公司(Takara); 引物合成及测序由 Invitrogen 公司完成; EPM 过表达质粒由军事医学科学院干细胞与再生医学研究室保存; 高糖培养基、Polybrene、噻唑蓝(MTT)、5-氮杂-2'-脱氧胞嘧啶(5-Aza-dC)购自 Sigma 公司; 胎牛血清购自 Hyclone 公司; Lipofectamine 2000 及 TRIzol 均购自 Invitrogen 公司;  $\alpha$ SMA、EPM 抗体购自 Abcam 公司; HRP-IgG 购自中杉金桥公司; 基因组抽提试剂盒(DNeasy Blood Tissue Kit)购自德国 QIAGEN 公司; EZ DNA Methylation-Gold Kit 购自美国 ZYMO RESEARCH 公司; HotStarTaq DNA Polymerase 购自德国 QIAGEN 公司.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

细胞置于含体积分数为 10%胎牛血清的高糖 DMEM 中, 在 37℃、体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 及饱和

湿度孵箱中培养, 每 2~3 天更换 1 次培养基待细胞生长至 80%~90%融合时, 按照 1:3 传代接种于 T-25 培养瓶中.

#### 1.2.2 实时定量 PCR 检测组织及细胞中 EPM 表达水平

组织剪成 1 mm<sup>3</sup> 小块. 组织与细胞均用 TRIzol 提取总 RNA, 各取 1  $\mu$ g 总 RNA 进行反转录得到 cDNA. 采用 SYBR Green 法实时定量 PCR 检测 EPM 的表达. 所用引物序列为: EPM sense, 5' CCATCTTCACTTCCGACATTAT 3'; EPM antisense, 5' GTGGCATTTCATAACATTTCTT 3'; GAPDH sense, CTGACTTCAACAGCGACACC; GAPDH antisense, TGCTGTAGCCAAATTCGTTGT. 各组 PCR 均重复 3 次.

#### 1.2.3 细胞系 5-Aza-dC 处理

取生长状态良好的 LX-2 细胞按照 30%密度分别接种于 T75 细胞培养瓶中, 每种细胞接种 2 瓶. 12 h 分别用不含或者含终浓度为 10  $\mu$ mol/L 5-Aza-dC 的高糖培养基培养细胞, 每 24 h 换液、96 h 后收取细胞基因组.

#### 1.2.4 细胞基因组 DNA 的提取

细胞加入 protease K 和 4  $\mu$ l RNase A, 混匀, 室温静置 2 min; 加入 200  $\mu$ l buffer AL, 混匀, 56℃ 10min; 加入 200  $\mu$ l 无水乙醇, 充分震动混匀; 将混合液体移至 DNeasy Mini column 中, 并将 DNeasy Mini column 置入 2 ml collection tube, 6 000 g 离心 1 min, 弃滤液; 将 DNeasy Mini column 移至新的 2 ml collection tube 上, 加入 500  $\mu$ l Buffer AW1, 6 000 g 离心 1 min, 弃滤液; 加入 500  $\mu$ l Buffer AW2, 2 000 g 离心 3 min; 将 DNeasy Mini column 置入新的 1.5 ml EP 管中, 加入 100  $\mu$ l buffer AE, 室温静置 1 min, 6 000 g 离心 1 min, 收好 EP 管, 紫外分光光度计测浓度, -70℃ 保存备用.

#### 1.2.5 基因组 DNA 用 DNA Methylation Kit 处理

将 2  $\mu$ g 基因组 DNA 吸入 200  $\mu$ l EP 管中, 加入 130  $\mu$ l CT conversion Reagent; 将第一步 EP 管予如下处理: 98℃ 10 min, 64℃ 2.5 h, 4℃ 20 h, 避光; 在 IC Column 中加入 600  $\mu$ l M-binding buffer, 并置于 Collection Tube 中; 10 000 g 离心 30 s, 弃滤液; 加入 100  $\mu$ l M-wash buffer 到 IC Column 中, 10 000 g 离心 30 s; 加入 200  $\mu$ l M-Desulphonation Buffer, 室温(20℃~30℃)静置 20 min, 10 000 g 离心 30 s; 加入 200  $\mu$ l M-wash

Buffer, 10 000 *g* 离心 30 s; 再加入 200  $\mu$ l M-wash Buffer, 10 000 *g* 离心 30 s; 将 IC Column 置于 1.5 ml EP 管中, 加入 10  $\mu$ l M-Elution Buffer, 10 000 *g* 离心 30 s, -70°C 保存备用.

### 1.2.6 甲基化特异性 PCR 检测(methylmion specific PCR)

MSP 引物由 Invitrogen 公司合成(表 1). 甲基

化引物(M)反应条件: 98°C 10 min; 95°C 30 s, 50°C 30 s, 72°C 30 s, 35 个循环; 72°C 5 min; 4°C 持续保温. 非甲基化引物(U)反应条件: 98°C 10 min; 95°C 30 s, 42°C 30 s, 72°C 30 s, 35 个循环; 72°C 5 min; 4°C 持续保温.

**Table 1 Methylated and non-methylated primer sequences**

|                          | Forward primer (5'→3') | Reverse primer (5'→3') |
|--------------------------|------------------------|------------------------|
| Methylation primer(M)    | TCGGGTATGCGTAGAGCGCGC  | CCGCCGACCGAACAACGCG    |
| Un-methylation primer(U) | TTGGGTATGTGTAGAGTGTGT  | CCACCAACCAACAACACA     |

### 1.2.7 获得稳定过表达 EPM 的 LX-2 细胞

选取生长状态良好的 LX-2, 加入携带 IL2-EPM 基因的慢病毒毒液或空载体对照的毒液, 同时加入 8 mg/L 的 Polybrene, 置于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱. 培养 24~48 h 后去除毒液, 添加完全培养基, 待细胞生长 80%~90%汇合时, 传代扩增培养. 由于 pBPLV-GFP 慢病毒载体带有 EGFP 标签, 病毒攻击后的细胞通过流式进行分选, 得到纯化的携带有 IL2-EPM 的 LX-2 细胞系.

### 1.2.8 Western blotting

用 RIPA 提取细胞蛋白, 两种细胞蛋白各取 100  $\mu$ g, 加入 5 $\times$ 上样缓冲液, 煮沸 5 min, 进行 SDS-PAGE, 电泳完毕, 用 iblot(Invitrogen)进行转膜, 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h 后, 加入兔抗人 EPM 抗体(1:2 000), 4°C 过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入 HRP 偶联山羊抗兔二抗(1:1 000), 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 4 次, 每次 15 min, ECL 显影. 以  $\beta$ -actin 为内参照.

### 1.2.9 MTT 检测细胞增殖

细胞接种于 96 孔板, 细胞约 60%~70%融合后, 每孔加 MTT 溶液(5 g/L, 用 PBS 配)20  $\mu$ l. 孵育 4 h, 终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液, 每孔加 150  $\mu$ l DMSO, 振荡 10 min, 使结晶物充分融解. 选择 490 nm 波长, 在酶联免疫监测仪上测定各孔光吸收值.

### 1.2.10 Transwell 实验

-20°C 保存的 Matrigel, 4°C 过夜融化. 用无血清培养基 1:6 稀释 Matrigel, 充分混均. 取稀释的 Matrigel 400  $\mu$ l 加入 transwell 板上室, 覆盖整个聚碳酸酯膜, 37°C、30 min, 使 Matrigel 聚合成胶.

细胞用 PBS 漂洗 3 次, 用无血清培养基制备单细胞悬液, 每个小室加入  $5 \times 10^5$  个细胞, 小室置于 6 孔版中, 下层为细胞培养基.

### 1.2.11 统计学处理

定量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析. 本研究采用单因素两水平成组设计, 用 *t* 检验对平均值进行两两比较,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义.

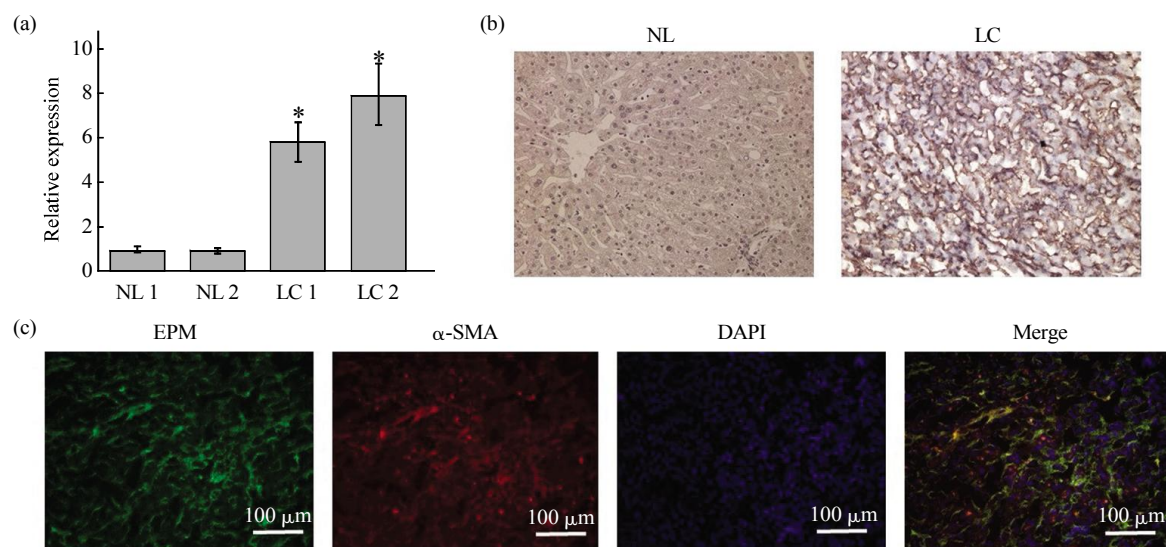
## 2 结 果

### 2.1 肝硬化组织中 EPM 表达升高

使用 Realtime-PCR 方法检测 2 例肝硬化组织(LC)及两例正常肝组织(NL)EPM 的表达变化. 结果发现肝硬化组织中 EPM 表达均明显上调(图 1a). 我们对肝组织进行免疫组化(图 1b)染色, 结果发现 EPM 表达明显增多. 通过免疫荧光(图 1c)染色进一步证明肝硬化组织中高表达 EPM 的细胞不是肝细胞, 而是同时高表达  $\alpha$ -SMA 的激活的肝星状细胞.

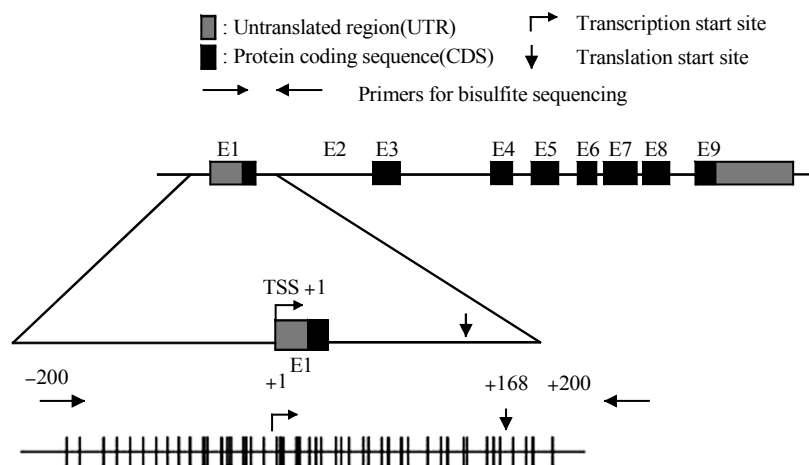
### 2.2 EPM 基因转录起始位点富含 CpG 岛

为了研究 EPM 表达上调的机制, 我们对人 EPM 基因进行了分析. 人 EPM 基因 STX2 位于 12q24.33, (Gene ID: 2054)包含 9 个外显子, 在转录起始位点附近(-200~+200)具有富含 CpG 的区域, 即 CpG 岛(图 2). 该基因转录的长度为 3 343 bp, 编码 287 个氨基酸. 其蛋白参与上皮-间质之间的相互作用, 并在上皮细胞形态发生、激活方面发挥着重要作用. 在 CpG 岛上下游分别设计了甲基化和非甲基化引物(表 1), 进行甲基化特异性 PCR 检测, 以明确启动子 CpG 岛的甲基化状态.



**Fig. 1 EPM expression in liver cirrhosis tissues and normal liver tissues**

The expression of EPM was up-regulated in activated hepatic stellate cells in the process of hepatic fibrosis. (a) Real-time PCR demonstrated mRNA expression levels of EPM were significantly upregulated in liver cirrhosis tissues than normal tissues. (b) Immunohistochemistry showed that the expression of EPM was significantly increased in liver cirrhosis tissues compared to the HIV or HCV group. (c) Immunofluorescence for EPM protein in liver cirrhosis and matched normal adjacent tissues. EPM (green) was expressed at a much higher level in the liver cirrhosis tissues than in normal liver tissues; strong staining of EPM was seen in the  $\alpha$ -SMA (red)-positive cells. NL: Normal liver, LC: Liver cirrhosis. (\* $P < 0.05$  compared to control)



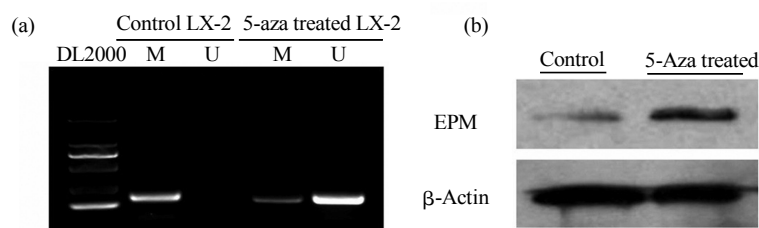
**Fig. 2 Gene promoter region structure map of STX2**

STX2 gene contains 9 exons. There is a rich CpG region near the transcription start site ( $-200 \sim +200$ ) which is called CpG island.

### 2.3 启动子区甲基化水平可调控 EPM 表达

我们提取了 5-Aza-dC 处理的 LX-2 及对照细胞基因组 DNA, 并用 DNA Methylation Kit 处理后进行甲基化特异性 PCR 检测. 结果发现未经 5-Aza-dC 处理的星状细胞, 只有甲基化引物能获得条带(M), 证明 EPM 基因启动子区的 CG 富含区域是高度甲基化的. 而在经过 5-Aza-dC 处理后, LX-2 细胞启动子区甲基化水平降低, 使用非甲基

化引物(U)也可以获得明确的条带(图 3a). 这证明经 5-Aza-dC 处理, EPM 基因启动子区甲基化程度明显降低. 进一步通过 Western blot 检测了两组 LX-2 细胞表达 EPM 的变化, 发现 EPM 启动子区甲基化程度降低后, LX-2 细胞的 EPM 蛋白表达明显增高(图 3b). 这说明启动子区甲基化程度可以调控 LX-2 细胞 EPM 表达的变化.



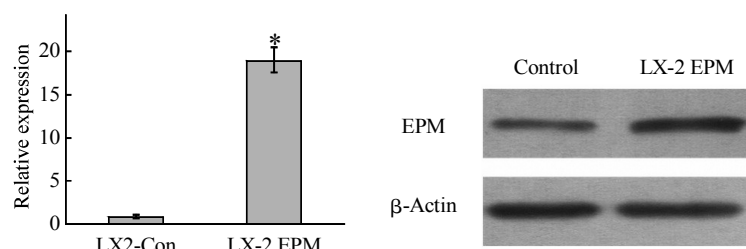
**Fig. 3 The methylation level(a) and expression of EPM(b) after 5-Aza-dC treatment**

The demethylation of promoter region promoted the expression of EPM.

## 2.4 构建过表达 EPM 的 LX-2 细胞株及鉴定

我们利用慢病毒转染的方法收集较高滴度的毒液。通过荧光显微镜观察慢病毒转染的 293FT 细胞。收集毒液上清，经过超速离心浓缩后，选取生长状态良好的 LX-2 细胞直接攻击细胞，加入携带 IL2-EPM 基因的慢病毒毒液或空载体对照的毒液，同时加入 8 mg/L 的 Polybrene，置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱。培养 24~48 h 后去除毒液，添加完全培养基，待细胞生长 80%~90% 汇合时，传代扩增培养。通过流式细胞仪进行分选

pBPLV-GFP 慢病毒载体中自带的 EGFP 标签，得到纯化的过表达 EPM 的 LX-2 细胞，命名为 LX-2 EPM。为鉴定 LX-2 EPM 细胞中外源基因 EPM 的表达效率，分别通过 RT-PCR 和 Western blot 方法进行基因和蛋白质水平的检测。同对照细胞 LX2-Con 相比，从 RNA 水平(图 4a)和蛋白质水平(图 4b)均能说明 EPM 表达明显提高。但由于基因表达在转录与翻译水平均会受到调节，EPM 表达在 RNA 水平与蛋白质水平升高的程度不同。

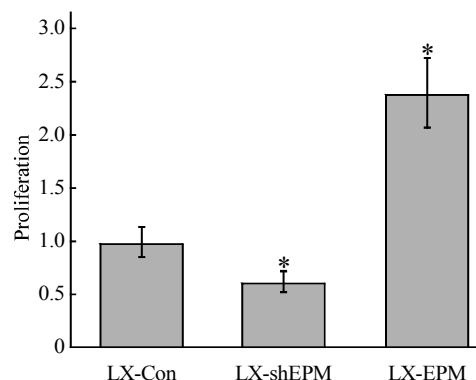


**Fig. 4 EPM mRNA and protein levels in LX-2 after stable transfection with EPM overexpression plasmids**

The results of Q-PCR and Western blot demonstrated that the EPM vectors caused overexpression of EPM prominently in comparison with the control. (\* $P < 0.05$  compared to control).

## 2.5 EPM 促进 LX-2 细胞增殖

为了考察 EPM 对于星状细胞增殖的影响，分别对 LX2-EPM、LX2-shEPM、LX2-Con 进行 MTT 实验。将 3 种细胞分别种植于 96 孔板后，48 h 检测细胞的增殖情况。结果发现，过表达 EPM 的 LX-2 同对照组相比增殖明显加快，而干扰表达 EPM 的 LX-2 增殖能力较对照组下降，其差异有统计学意义(图 5)。因此证明，EPM 对于肝星状细胞有促进增殖的作用，而 HSC 增殖与肝纤维化进展密切相关，EPM 可能具有促进肝纤维化的作用。

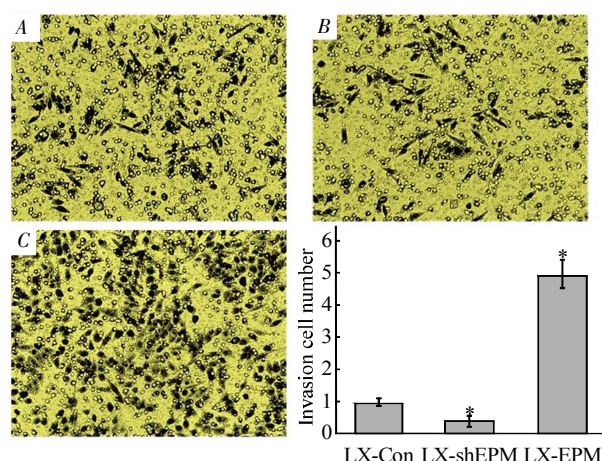


**Fig. 5 EPM promoted LX-2 proliferation**

MTT assay was performed to confirm the influence of EPM to the proliferation of HSC(\* $P < 0.05$  compared to control).

## 2.6 EPM 促进肝星状细胞迁移

为了研究 EPM 对肝星状细胞迁移能力的变化, 我们对于 3 种细胞系进行了 Transwell 实验, 72 h 之后观测. 结果证明, EPM 被干涉之后, 肝星状细胞的迁移能力下降, 而过表达 EPM 的肝星状细胞迁移能力提高, 这证明 EPM 能够促进肝星状细胞迁移(图 6).



**Fig. 6 Migratory potential of LX-2 were induced by EPM**  
A transwell motility assay using LX-2 cells was performed on inserts pre-coated with Matrigel. Images were representative of the migration in three separate experiments. (A: LX-2-control; B: LX-2 shEPM; C: LX-2-EPM)(\*  $P < 0.05$  compared to control).

## 3 讨 论

肝纤维化是多种病因导致的一种进行性的肝损伤, 肝星状细胞的激活是肝纤维化进展的中心事件. 正常状态下肝星状细胞处于静止状态, 主要作为储脂细胞参与体内维生素 A 的代谢, 并合成 IV 型胶原<sup>[5-6]</sup>. 当肝脏在损伤因素(如 HBV、HCV、酒精)的损伤作用之下, HSC 可被激活, 贮存的脂质逐渐消失, 转化为肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB). 肝星状细胞活化的主要表现为细胞增殖、细胞迁移能力明显增强, 同时可以表达多种趋化因子、异常表达金属基质蛋白酶以及分泌 I 型胶原等 ECM 蛋白, 结果造成肝脏纤维化并进一步发展为肝硬化<sup>[5]</sup>. 在损伤因素的作用下, 肝脏微环境中的肝星状细胞、淋巴细胞、内皮细胞、细胞外基质等组成一个整体, 通过细胞黏附、旁分泌或自分泌的方式共同决定肝脏炎症及纤维化的进程.

EPM 自 1992 年被发现以来, 对它的研究越来越

深入. EPM/syntaxin2 蛋白以一种非经典方式跨膜(不涉及从内质网到高尔基体的转运), 胞质内 EPM 通过蛋白质分子内部的一种未知的相互作用导致 N 端的三维构象改变, 因而一部分 EPM 被输送到膜外作为 EPM 发挥作用<sup>[17]</sup>. Zhou 等<sup>[18]</sup>研究在肝脏发育过程中, 发现 EPM 蛋白通过影响胆管干细胞的有丝分裂方向调控肝脏前体细胞向胆管细胞的分化. Shaker 等<sup>[19]</sup>通过应用 EPM 基因缺失小鼠, 研究慢性肠炎相关性结肠癌发现, EPM 缺失后能够通过减少 IL-6 的分泌及其介导的炎症反应降低结肠癌的发生, 揭示了 MFB 在结肠损伤、修复和癌变过程中的角色, 也证明了结肠癌微环境中多种细胞因子参与此过程. 我们前期的研究发现, 肝癌组织中成纤维细胞大量表达的 EPM 能够促进裸鼠肝癌细胞向远处转移, 并且这一过程是通过调控基质金属蛋白酶而实现的<sup>[8]</sup>. 目前, 对于 EPM 在肝纤维化过程中的变化与影响以及相关调控机制还未做深入的研究.

表观遗传(epigenetics)是指在基因组序列不变的情况下, 通过 DNA 修饰(如甲基化修饰)、组蛋白修饰等方式调控基因表达<sup>[20]</sup>. 目前表观遗传学的研究范畴包括 DNA 甲基化组蛋白修饰非编码 RNA 调控等, 这些改变包括 DNA 的修饰(如甲基化修饰)、组蛋白的各种修饰等<sup>[21]</sup>. DNA 甲基化是发生在 CpG 二核苷酸的化学修饰, S-腺普氨酸作为甲基供体在 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT)的作用下转甲基于胞嘧啶形成 5-甲基胞嘧啶<sup>[22-25]</sup>. 近年来, 随着 MSP 技术<sup>[26]</sup>发明和推广, 表观遗传学得到了快速发展.

在本研究中, 我们首先对肝硬化组织与正常肝组织的 EPM 表达情况进行了分析. 对组织进行实时定量 PCR 检测证明, 肝硬化组织表达 EPM 明显升高. 使用免疫组化及免疫荧光分析进一步发现, 高表达的 EPM 是由激活的肝星状细胞分泌的. 我们为了研究 EPM 高表达可能的机制, 经过生物信息学分析发现 EPM 基因启动子区有一富含 CpG 的区域即 CpG 岛, 具备 DNA 甲基化调控基因表达的条件. 将星状细胞经过 5-Aza 处理, 使用甲基化特异性 PCR 检测 EPM 启动子区甲基化程度明显降低, 与此同时 EPM 表达在 mRNA 水平及蛋白质水平明显发生了上调. 这提示, EPM 的上调表达可以通过其启动子区富含 CG 区域的去甲基化而引起的. 为了进一步研究 EPM 对肝星状细胞的作用, 使用 EPM 过表达质粒转染了 LX-2 细胞

LX2-EPM, 经检测证明, 此细胞 EPM 表达水平明显上调, 成功获得了过表达 EPM 的肝星状细胞系. 在肝硬化过程中, 肝星状细胞的增殖和迁移能力明显增强. 联合前期试验已经稳定干涉 EPM 的 LX2-shEPM, 分别考察了 EPM 过表达及低表达对于肝星状细胞增殖与迁移能力的影响. 结果证明 EPM 具有促进肝星状细胞增殖和迁移的能力, 从而 EPM 能够促进肝纤维化的进展.

综上所述, 我们首先发现肝纤维化过程中肝星状细胞大量表达 EPM, 同时发现启动子区 DNA 甲基化调控该基因表达, 并进一步证明 EPM 影响肝星状细胞的增殖与迁移从而参与肝纤维化的过程, 这为深入研究 EPM 在肝脏疾病中的作用奠定了较好的基础. 肝纤维化过程中肝星状细胞的作用是多方面的, 此后我们将进一步研究肝脏微环境中 EPM 在肝细胞、肝星状细胞、免疫细胞等细胞间相互作用中的关系, 并考察 EPM 作为肝纤维化诊断与治疗靶点及标志物的可能性, 推进肝纤维化的诊治研究.

### 参 考 文 献

- [1] Popov Y, Schuppan D. Targeting liver fibrosis: strategies for development and validation of antifibrotic therapies. *Hepatology*, 2009, **50**(4): 1294-1306
- [2] Seki E, Schwabe R F. Hepatic inflammation and fibrosis: functional links and key pathways. *Hepatology*, 2015, **61**(3): 1066-1079
- [3] Barcena C, Stefanovic M, Tutusaus A, *et al.* Gas6/Axl pathway is activated in chronic liver disease and its targeting reduces fibrosis *via* hepatic stellate cell inactivation. *Journal of Hepatology*, 2015, **63**(3): 670-678
- [4] Mann D A, Smart D E. Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation. *Gut*, 2002, **50**(6): 891-896
- [5] Guo J, Friedman S L. Hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis*, 2007, **27**(4): 413-426
- [6] Friedman S L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological Reviews*, 2008, **88**(1): 125-172
- [7] Enzan H, Himeno H, Iwamura S, *et al.* Alpha-smooth muscle actin-positive perisinusoidal stromal cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 1994, **19**(4): 895-903
- [8] Jia Y L, Shi L, Zhou J N, *et al.* Epimorphin promotes human hepatocellular carcinoma invasion and metastasis through activation of focal adhesion kinase/extracellular signal-regulated kinase/matrix metalloproteinase-9 axis. *Hepatology*, 2011, **54**(5): 1808-1818
- [9] Amann T, Bataille F, Spruss T, *et al.* Activated hepatic stellate cells promote tumorigenicity of hepatocellular carcinoma. *Cancer Science*, 2009, **100**(4): 646-653
- [10] Theret N, Musso O, Turlin B, *et al.* Increased extracellular matrix remodeling is associated with tumor progression in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology*, 2001, **34**(1): 82-88
- [11] Lehnert L, Lerch M M, Hirai Y, *et al.* Autocrine stimulation of human pancreatic duct-like development by soluble isoforms of epimorphin *in vitro*. *The Journal of Cell Biology*, 2001, **152**(5): 911-922
- [12] Hirai Y, Lochter A, Galosy S, *et al.* Epimorphin functions as a key morphoregulator for mammary epithelial cells. *The Journal of Cell Biology*, 1998, **140**(1): 159-169
- [13] Miura K, Nagai H, Ueno Y, *et al.* Epimorphin is involved in differentiation of rat hepatic stem-like cells through cell-cell contact. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, **311**(2): 415-423
- [14] Bascom J L, Fata J E, Hirai Y, *et al.* Epimorphin overexpression in the mouse mammary gland promotes alveolar hyperplasia and mammary adenocarcinoma. *Cancer Research*, 2005, **65**(19): 8617-8621
- [15] Shirasaka T, Iizuka M, Yukawa M, *et al.* Altered expression of epimorphin in ulcerative colitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2003, **18**(5): 570-577
- [16] Terasaki Y, Fukuda Y, Suga M, *et al.* Epimorphin expression in interstitial pneumonia. *Respiratory research*, 2005, **6**: 6
- [17] Hirai Y. Epimorphin as a morphogen: Does a protein for intracellular vesicular targeting act as an extracellular signaling molecule? *Cell Biology International*, 2001, **25**(3): 193-195
- [18] Zhou J, Zhao L, Qin L, *et al.* Epimorphin regulates bile duct formation *via* effects on mitosis orientation in rat liver epithelial stem-like cells. *PloS One*, 2010, **5**(3): e9732
- [19] Shaker A, Swietlicki E A, Wang L, *et al.* Epimorphin deletion protects mice from inflammation-induced colon carcinogenesis and alters stem cell niche myofibroblast secretion. *The Journal of Clinical Investigation*, 2010, **120**(6): 2081-2093
- [20] Waddington C H. Preliminary notes on the development of the wings in normal and mutant strains of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1939, **25**(7): 299-307
- [21] Holliday R. The inheritance of epigenetic defects. *Science*, 1987, **238**(4824): 163-170
- [22] Holliday R. DNA methylation and epigenetic inheritance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1990, **326**(1235): 329-338
- [23] Holliday R. DNA methylation and epigenetic mechanisms. *Cell Biophys*, 1989, **15**(1-2): 15-20
- [24] Jablonka E, Lamb M J. The inheritance of acquired epigenetic variations. *J Theor Biol*, 1989, **139**(1): 69-83
- [25] Feinberg A P, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, 1983, **301**(5895): 89-92
- [26] Herman J G, Graff J R, Myohanen S, *et al.* Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(18): 9821-9826

## Regulation Mechanism and Function of Epimorphin in Hepatic Stellate Cell\*

SHI Lei<sup>1,2)</sup>, QIN En-Qiang<sup>2)</sup>, JIA Ya-Li<sup>3)</sup>, WU Dan<sup>2)</sup>, JIN Lei<sup>2)</sup>, ZENG Quan<sup>3)</sup>, JIANG Tian-Jun<sup>2)</sup>,  
NIE Wei-Min<sup>2)</sup>, YUE Wen<sup>3)\*\*</sup>, WANG Fu-Sheng<sup>1,2)\*\*</sup>

<sup>1)</sup> Medical School of Chinese PLA, Beijing 100853, China;

<sup>2)</sup> Treatment and Research Center of Infectious Diseases, Beijing 302 Hospital, Beijing 100039 China;

<sup>3)</sup> Stem Cell and Regenerative Medicine Lab, Beijing Institute of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China)

**Abstract** Hepatic stellate cell(HSC), an important interstitial cell in the liver, is the main source of extracellular matrix. Epimorphin (EPM, also called syntaxin2), a mesenchymal cell surface-associated molecule expressed in HSC, has been reported that the dysfunction is related to the development, regeneration and carcinogenesis of the liver. We found that the expression of EPM was up-regulated in hepatic stellate cells in the process of hepatic fibrosis. We studied the mechanism of EPM expression changes, found that the demethylation of promoter region promoted the expression of EPM. Stable EPM-overexpression transgenic cell lines were generated by transfecting human hepatic stellate cells with plasmids. Reverse transcriptase polymerase chain reaction(PCR) analyses and Western blot indicated that the mRNA and protein levels of EPM in the transgenic cell lines were significantly up-regulated than that in control. By MTT assay and transwell motility assay, we further confirmed that EPM induced HSC proliferation and invasion. In conclusion, the high expression of EPM in activated hepatic stellate cells is caused by DNA demethylation, and EPM can promote the proliferation and migration of hepatic stellate cells, it may be involved in hepatic fibrogenesis.

**Key words** human hepatic stellate cell, epimorphin, methylation, cell proliferation, cell invasion

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2015.0383

---

\*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (81200303, 81470097).

\*\*Corresponding author.

WANG Fu-Sheng. Tel: 86-10-66933333, E-mail: fswang302@163.com

YUE Wen. Tel: 86-10-66931949, E-mail: wenyue26@163.com

Received: December 9, 2015 Accepted: March 23, 2016