

# SPINK3 促进体外培养的原代大鼠肝细胞增殖

常翠芳, 罗亚茹, 郝玲玲, 杨婧, 郭建林, 王改平,  
李青青, 王雪, 郭萃, 徐存拴\*

(河南师范大学生命科学学院, 河南省-科技部共建细胞分化调控国家重点实验培育基地, 河南 新乡 453007)

**摘要** 肝病是威胁人类健康的主要疾病之一, 而肝具有强大的再生能力, 因此开发肝再生的药物靶标对肝病防治具有重大意义。本室前期采用大鼠全基因组芯片检测发现, 丝氨酸蛋白酶抑制剂 Kazal 型 III (serine protease inhibitor Kazal type III, SPINK3) 在大鼠肝再生中表达显著改变。研究表明, SPINK3 是一类结构与表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 相似的生长因子, 能够与表皮生长因子受体 (EGFR) 结合促进细胞增殖。本文通过基因过表达和干涉的方法处理原代大鼠肝细胞, 通过 CCK8 法、Ki67 免疫荧光法、PI 单染法和 Annexin V/PI 双染法检测 SPINK3 表达变化对原代大鼠肝细胞活力、增殖、周期和凋亡的影响。结果显示 SPINK3 过表达时能够显著提高原代大鼠肝细胞的细胞活力, 促进其细胞周期和增殖, 并抑制其细胞凋亡, 而干涉 SPINK3 表达则显著降低原代大鼠肝细胞的细胞活力, 抑制其细胞周期和增殖, 并促进其细胞凋亡。以上结果表明, SPINK3 能够促进体外培养的原代大鼠肝细胞的增殖, 并抑制其凋亡。

**关键词** 丝氨酸蛋白酶抑制剂 Kazal 型 III; 原代大鼠肝细胞; 细胞周期; 细胞凋亡

中图分类号 Q28

## SPINK3 Promotes The Proliferation of Primary Rat Hepatocytes *in vitro*

CHANG Cui-Fang, LUO Ya-Ru, XI Ling-Ling, YANG Jing, GUO Jian-Lin,  
WANG Gai-Ping, LI Qing-Qing, WANG Xue, GUO Cui, XU Cun-Shuan\*

(State Key Laboratory Cultivation Base for Cell Differentiation Regulation, College of Life Sciences,  
Henan Normal University, Xinxiang 453007, Henan, China)

**Abstract** Liver disease is one of the major diseases threatening human health nowadays. The liver has a strong ability to regenerate. Therefore, the development of drug target in liver regeneration plays an important role on liver disease prevention and therapy. Previous studies found that serine protease inhibitor Kazal type III (SPINK3) was significantly changed in rat liver regeneration by analysis of gene expression profiles. SPINK3 is not only a trypsin inhibitor, but also a growth factor similar to epidermal growth factor (EGF). SPINK3 can bind to epidermal growth factor receptor (EGFR) and promote cell proliferation. In this study, interference of SPINK3 expression was achieved by transfection of adenovirus vectors with either insertion or deletion of SPINK3 into rat primary hepatocytes. Cell viability was detected by CCK8 and cell proliferation was detected by Ki67 immunofluorescence. In addition, cell cycle was detected by PI single staining and cell apoptosis was detected by Annexin V/PI double staining. The results showed that SPINK3 overexpression increased the cell viability of primary rat

收稿日期: 2017-07-13; 修回日期: 2017-10-23; 接受日期: 2017-10-31

国家自然科学基金 (No. 31201093 和 No. 31601038) 和河南省自然科学基金 (No. 162300410144 和 No. 18B180014) 资助

\* 通讯作者 Tel: 0373-3326001; E-mail: cellkeylab@126.com

Received: July 13, 2017; Revised: October 23, 2017; Accepted: October 31, 2017

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 31201093, No. 31601038) and Natural Science Foundation of Henan Province (No. 162300410144, No. 18B180014)

\* Corresponding author Tel: 0373-3326001; E-mail: cellkeylab@126.com

hepatocytes, promoted cell cycle and inhibited apoptosis of the cells, while knock down of SPINK3 expression reduced the cell viability, inhibited cell cycle and promoted apoptosis of the cells.

**Key words** serine protease inhibitor Kazal type III; primary rat hepatocytes; cell proliferation; apoptosis

肝是由肝细胞、胆管上皮细胞等多种细胞构成的复杂器官。其中,肝细胞是肝中数量最多的细胞,约占肝细胞总数的 65% 和总肝量的 70% ~ 80%<sup>[1]</sup>,承担能量代谢、氨基酸利用、胆汁酸合成与排泄、氨解毒、生物转化和免疫应答等多种生理功能<sup>[2]</sup>。正常情况下,肝细胞处于高度分化状态,几乎不进行分裂<sup>[3]</sup>。部分肝切除后,处于静止状态的残余肝细胞首先被激活,进入细胞周期循环,以补偿丢失的肝组织<sup>[4]</sup>。近年来,科学家积极尝试利用肝再生潜能治疗肝病。因此,在细胞水平对肝再生进行研究,将会极大促进对肝再生分子机制的阐明和理解,具有重要的理论意义和应用价值。

本室建立大鼠 2/3 肝切除 (partial hepatectomy, PH) 模型并分离了再生肝的 8 种细胞,完成大鼠肝细胞、胆管上皮细胞等 8 种肝细胞在肝再生中的功能基因组学研究,发现 9 762 个肝再生相关基因,运用系统生物学方法进行数据挖掘,筛选出参与肝再生调控的重要基因,并且将通过体内实验证实它们对肝再生的调节作用。根据上述基因在再生肝及 8 种细胞中的表达谱变化,选择丝氨酸蛋白酶抑制剂 Kazal III 型 (serine peptidase inhibitor Kazal3, SPINK3) 基因作为重点研究对象<sup>[5]</sup>。

Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂是一种胰蛋白酶抑制剂,又称为胰腺分泌的胰蛋白酶抑制剂 (pancreatic secretory trypsin inhibitor, PSTI) 或肿瘤相关的胰蛋白酶抑制剂 (tumor-associated trypsin inhibitor, TATI)<sup>[6]</sup>。目前,对 SPINK 家族功能的研究主要集中在与胰腺发育和疾病的关系<sup>[7, 8]</sup>。近期的研究表明,SPINK3 还与肝病及肝再生相关。1990 年, Kido 等首次报道 SPINK3 在大鼠的肝细胞和肝中存在<sup>[9]</sup>。在松节油诱导的急性炎症模型中,血清中 SPINK3 在诱导 48 h 后增加约 17 倍,进一步检测发现,SPINK3 只存在于炎症诱导后的肝中<sup>[10]</sup>。研究发现,TATI 的高表达与大肠癌和乳腺癌的肝转移有关,是不良预后的独立预测指标<sup>[11]</sup>。SPINK1 在 HBV 和 HCV 患者中均表达上调,而且包含这 2 种病毒的细胞对丝氨酸蛋白酶引起的细胞凋亡产生抵抗性<sup>[12]</sup>。小鼠中敲除 SPINK3 基因将导致腺泡细胞的自噬性死亡和腺泡细胞再生受损,表明 SPINK3

在保持腺泡细胞的完整性和再生方面发挥了重要作用<sup>[13]</sup>。上述结果表明,SPINK3 与肝病、细胞凋亡及细胞再生密切相关,可能在肝再生中具有重要作用。本室用 Rat Genome 230 2.0 芯片检测部分肝切除后的再生肝和及其分离的 8 种肝细胞的基因表达谱,发现 SPINK3 几乎在整个肝再生中表达上调,在肝细胞、星形细胞、树突状细胞、窦内皮细胞、库普弗细胞、陷窝细胞中上调表达变化至少为对照的 10 倍<sup>[5]</sup>,推测其在肝再生中具有重要的作用,期望通过研究 SPINK3 对肝再生的作用,为揭示肝再生的分子机制提供资料,为肝病药物的研发提供新的靶点。本文通过基因过表达和基因干涉的方法检测 SPINK3 对原代大鼠肝细胞的细胞活力、细胞周期及凋亡的影响,以研究 SPINK3 对原代大鼠肝细胞的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 SPINK3 过表达腺病毒载体构建与 SPINK3 过表达腺病毒制备

用 BamH I 和 EcoR I 限制性核酸内切酶酶切 pHBAd-MCMV-RFP 载体,电泳回收相关条带。根据 SPINK3 ORF 序列设计引物: SPINK3-F: acacggatcc ATGAAGGTAGCAATTATCTTTC, SPINK3-R: acacgaatttcTCAGCAAGTCCCTCTCC; PCR 扩增 SPINK3 ORF 序列,用上述限制性核酸内切酶酶切后电泳回收,将回收的目的片段与载体进行连接,构建 pHBAd-MCMV-RFP-SPINK3 重组载体。转化感受态 DH5 $\alpha$  大肠杆菌,于含有 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素 (Amp<sup>+</sup>) 固体培养基 Luria-Bertani broth (LB) 上 37 $^{\circ}$ C 培养过夜,随机挑取 5 个菌落,经 PCR 鉴定后,将阳性克隆菌液送上海桑尼生物技术有限公司测序。

大量制备以上所得的 SPINK3 重组腺病毒载体质粒,将对数生长期的菌液 2 mL 加入 100 mL LB (Amp<sup>+</sup>) 培养基中,37 $^{\circ}$ C, 300 r/min, 震荡过夜培养,用康为世纪中提质粒试剂盒提取质粒。转染前 1 d, 将人胚肾上皮 HEK293T 细胞接种于含有 10% Hyclon 胎牛血清 DMEM 培养基的 60 mm 培养皿中,置于 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养过夜。待细胞生长至愈合度为 70% ~ 80% 时,取重组腺病毒载体

质粒 SPINK3 及骨架质粒 pHBAd-BHG, 用 Lipofiter™ 转染试剂进行转染。收获病毒, 获得高滴度的 SPINK3 过表达腺病毒。

### 1.2 SPINK3 shRNA 腺病毒干涉载体的构建与 SPINK3 shRNA 腺病毒的制备

根据 GenBank 公布的大鼠 *SPINK3* 基因的 mRNA 序列(登录号 NM\_012674)设计 *SPINK3* 干涉序列 (Table 1), siRNA1: ACCCTCCAGCTGAGGTGAATGAAA; siRNA2: CCTGTGTGTGGGACTAACG

**Table 1 Sequences of SPINK3 shRNAs**

shRNA	Sequence
shRNA1: Top Strand (72 bp)	5'-AATTCGACCCTCCAGCTGAGGTGAATGGAAAttcaagaga TTTCATTACCTCAGCTGGAGGGTtttttg—3'
Bottom Strand (72 bp)	5'-GATCCAAAAAACCCTCCAGCTGAGGTGAATGGAAATctcttgaa TTTCATTACCTCAGCTGGAGGGTCg—3'
shRNA2: Top Strand (72 bp)	5'-AATTCGCCTGTGTGTGGGACTAACGGAATTAtcaagaga TAATTCCGTTAGTCCACACACAGGtttttg—3'
Bottom Strand (72 bp)	5'-GATCCAAAAAACCTGTGTGTGGGACTAACGGAATTATctcttgaa TAATTCCGTTAGTCCACACACAGGCg—3'
shRNA3: Top Strand (63 bp)	5'-AATTCGGGATGTCCAGGATTTATGAttcaagaga TCATAAATCCTGGGACATCCCtttttg—3'
Bottom Strand (63 bp)	5'-GATCCAAAAAAGGGATGTCCAGGATTTATGATctcttgaa TCATAAATCCTGGGACATCCCg—3'

### 1.3 CCK8 法检测细胞活力

按照原位灌注法分离获得原代大鼠肝细胞,调节其浓度至  $1.5 \times 10^4$  个细胞/mL,以 2 000 个/孔的量接种于 96 孔板中,设置 16 组,每组 3 个重复。1~4 组,5~8 组,9~12 组和 13~16 组分别为过表达对照组 Ad-RFP,过表达 *SPINK3* 基因病毒感染组 Ad-SPINK3,干涉对照组 Ad-NC 和干涉 *SPINK3* 基因病毒感染组 Ad-shSPINK3。分别用相应的病毒侵染后放入 37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。并在侵染后的 0、24、48 和 72 h,向每孔加入 10 μL CCK8 溶液,培养箱内孵育 3 h,酶标仪测定 450 nm 处的吸光度。实验重复 3 次。

#### 1.4 Ki67 免疫荧光法检测细胞增殖

将分离获得原代大鼠肝细胞调节至浓度为  $5 \times 10^4$  个细胞/mL,以 1 mL/孔的量接种于 24 孔板中。设置 4 组,分别为 Ad-RFP 组、Ad-SPINK3 组、Ad-NC 组和 Ad-shSPINK3 组,每组设置 3 个重复。分别用相应的病毒侵染。于侵染后 48 h,按照如下方法进行免疫荧光处理:移去培养基,用 PBS 在室温下清洗细胞 2 次,4% 多聚甲醛在室温固定 15 min, PBS 在室温下漂洗 3 次,每次 5 min,用含 0.1% Triton-X-100 的 PBS 在室温通透化处理 15 min, PBS 在室温漂洗 3 次,每次 5 min,含 3% BSA 的 PBS 在室温

GAATTA; siRNA3: GGGATGTCCCAGGATTTATGA。由上海桑尼生物合成 PAGE 胶纯化的 oligo 序列,分别稀释至 100  $\mu\text{mol/L}$  后,利用 3'和 5'的单链退火获得 SPINK3 shRNA 片段,并与酶切后的 pHBAU-U6-RFP 干扰载体连接。按照上述方法转化并获得表达 SPINK3 shRNA 的阳性单克隆大肠杆菌。

大量提取构建成功的 SPINK3 shRNA 重组干涉质粒,按照上述方法构建和收集 SPINK3 shRNA 腺病毒。

封闭 1 h, PBST 室温漂洗 3 次, 每次 5 min, 加入一抗 (1% BSA-PBST 稀释) 在湿盒内 4℃ 孵育过夜 (ki67 1:100), PBST 在室温漂洗 3 次, 每次 5 min, 加入荧光二抗 (1:1 000) 在室温下避光孵育 1 h, 用 PBST 在室温下漂洗 3 次, 每次 5 min, 用抗荧光淬灭封片剂封片, 激光共聚焦显微镜拍摄照片。实验重复 3 次。

### 1.5 PI 单染法检测细胞周期

将分离获得原代大鼠肝细胞调节至浓度为  $8 \times 10^4$  个细胞/mL, 以 3 mL/孔的量接种于 6 孔板中。设置 4 组, 分别为 Ad-RFP 组、Ad-SPINK3 组、Ad-NC 组和 Ad-shSPINK3 组, 每组设置 3 个重复。分别用相应的病毒侵染。侵染 48 h, 用 PBS 洗细胞培养板 2 次, 胰酶消化, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去培养液, 各管加入 10 mL PBS, 轻柔地悬浮细胞, PBS 洗细胞 2 次, 用 300  $\mu$ L PBS 轻柔悬浮细胞, 得到单个的细胞悬液, 不得有细胞聚集物。一边振荡细胞, 一边快速加入预冷的无水乙醇 700  $\mu$ L, 4 $^{\circ}$ C 冰浴过夜。1 000 r/min 离心 5 min, 弃去固定液, PBS 洗细胞 2 次, 1 000 r/min 离心 5 min。弃去 PBS, 用 0.5 mL 含有 RNase A (10 mg 溶解于 10 mL PBS, 过滤除菌) 的 PBS 悬浮细胞, 在 37 $^{\circ}$ C 消化 1 h。加入用 10  $\mu$ L 1 mg/mL 的 PI 染液混匀细胞, 4 $^{\circ}$ C 避光 15 min, 用



300 目细胞筛过滤,流式细胞仪分析细胞周期分布情况。

1.6 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡

按照 1.5 的方法处理细胞 48 h,胰酶消化,1 000 r/min离心 5 min,弃去培养液,各管加入 10 mL PBS,轻柔地悬浮细胞,洗细胞 2 次,取  $1 \times 10^5$  细胞加入 100  $\mu$ L  $1 \times$  结合缓冲液,加 5  $\mu$ L Annexin V 和 5  $\mu$ L PI,室温避光孵育 15 min,加入 400  $\mu$ L 结合缓冲液,流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.7 qRT-PCR 检测 SPINK3 相关通路基因的表达

按照 1.5 的方法处理细胞 48 h,胰酶消化,收集材料,冻存备用。按本室先前报道的方法分离、纯化各处理组细胞的 RNA<sup>[14]</sup>。用纯化的 2  $\mu$ g RNA 为模板,按照 AMV 反转录试剂盒 (Promega 公司, USA) 操作说明,进行反转录获得 cDNA 第 1 链。根据 TOYOBO 的 Real-time PCR Master Mix (SYBR Green) 试剂盒的操作指南,在 Rotor Gene 3000 A 上分别对 SPINK3 过表达组和干涉组细胞的 SPINK3 信号通路的活化、增殖相关基因以及内参基因  $\beta$ -肌动蛋白分别进行 Real-time PCR 检测,计算靶基因在不同处理组中的相对含量。每个样品设置 3 个复孔,实验重复 3 次。

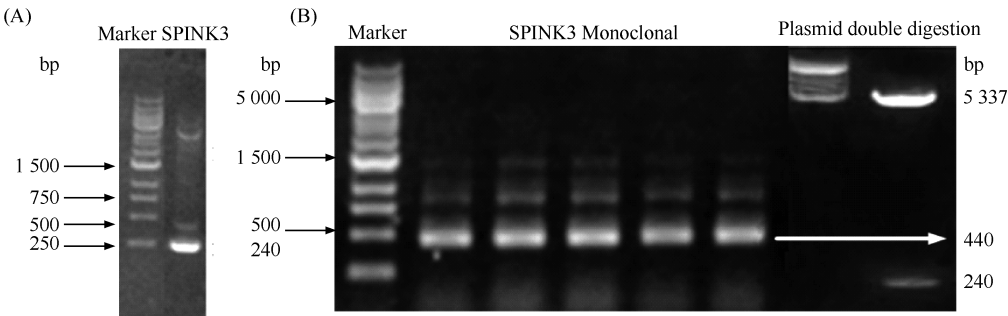


Fig. 1 Construction and identification of pHBA-MCMV-RFP-SPINK3 (A) Identification of the amplification of SPINK3 ORF by PCR; (B) Identification of SPINK3 monoclonal products by PCR and double digestion of pHBA-MCMV-RFP-SPINK3

2.2 SPINK3 过表达及干扰效率鉴定

荧光显微镜观察 Ad-RFP、Ad-SPINK3、Ad-NC、Ad-shSPINK3 各组细胞病毒感染后荧光,发现各组细胞中荧光蛋白的表达率较高,表明上述载体已成功转入相应的细胞 (Fig. 2),可以进行后续实验。

以 GAPDH 为内参,qRT-PCR、Western 印迹检测各组细胞 SPINK3 的表达情况 (Fig. 3),鉴定过表达及干涉组腺病毒的转染效率,筛选出最佳干涉片段。qRT-PCR 结果显示,病毒感染效果良好,过表达效果非常明显,shRNA3 干扰效果最强。Western 印迹结果与 qRT-PCR 结果一致。因此,选择 shRNA3 对

1.8 统计学方法

使用 IBM SPSS Statistics 20 软件进行统计学分析,单因素方差分析组间差异, $P < 0.05$  表示有显著性差异, $P < 0.01$  表示差异极显著。以上所有实验均设置 3 次重复。

2 结果

2.1 SPINK3 过表达腺病毒载体和 shRNA 腺病毒载体的构建与制备

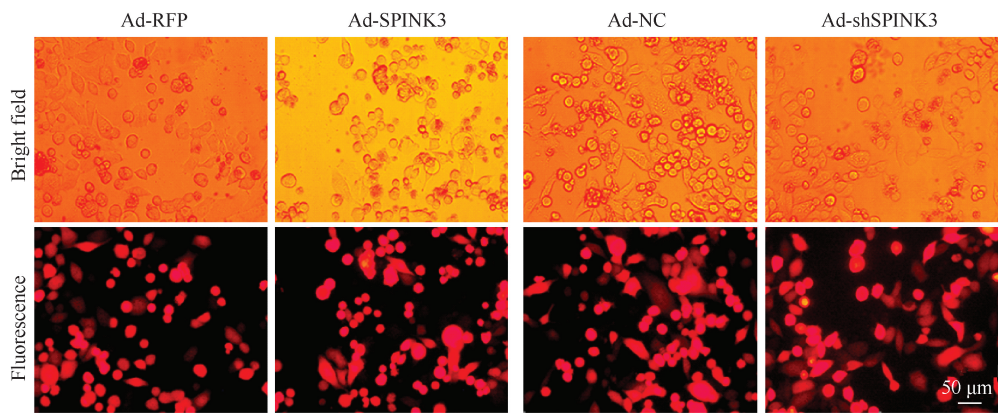
PCR 扩增 SPINK3 ORF 序列时条带大小为 240 bp。单克隆 PCR 鉴定时,由于 PCR 使用的为载体通用引物,所以条带大小会比基因片段大 200 bp 左右。电泳结果显示,SPINK3 过表达腺病毒载体构建成功 (Fig. 1)。感染性滴度检测 Ad-RFP:  $T = 2 \times 10^{10}$  PFU/mL; Ad-SPINK3:  $T = 1 \times 10^{10}$  PFU/mL。将合成的 SPINK3 shRNA 片段连接到 pHBA-U6-RFP 干扰载体后,筛选 SPINK3 shRNA 的阳性单克隆大肠杆菌,收集 SPINK3 shRNA 腺病毒并进行病毒滴度检测,检测结果为 Ad-RFP:  $T = 2 \times 10^{10}$  PFU/mL; Ad-SPINK3 shRNA1:  $T = 1 \times 10^{10}$  PFU/mL; Ad-SPINK3 shRNA2:  $T = 1.26 \times 10^{10}$  PFU/mL; Ad-SPINK3 shRNA3:  $T = 1.58 \times 10^{10}$  PFU/mL。

应的腺病毒用于后续检测实验。

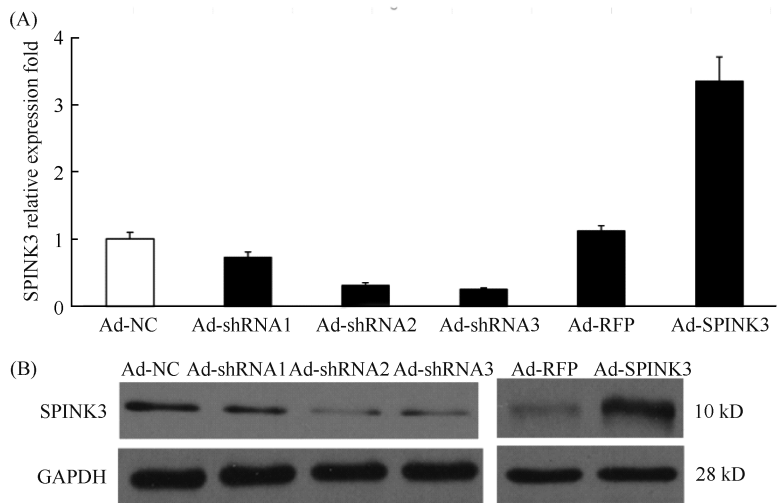
2.3 SPINK3 过表达增强原代大鼠肝细胞的细胞活力

为研究 SPINK3 过表达和干涉对原代大鼠肝细胞活力的影响,用 CCK8 检测各组细胞的细胞活力变化。结果显示,实验组 Ad-SPINK3 细胞的活力明显高于对照组 Ad-RFP ( $P < 0.01$ ),而干涉组 Ad-shSPINK3 细胞活力明显低于对照组 Ad-NC ( $P < 0.01$ ) (Fig. 4)。因此,过表达 SPINK3 可以提高原代大鼠肝细胞的细胞活力,而干涉该基因表达则降低原代大鼠肝细胞的细胞活力。





**Fig.2** Fluorescence microscopy was used to observe the expression levels of SPINK3 after infection The infection efficiency was detected in the adenovirus infected cells of SPINK3 overexpression group or knock down group



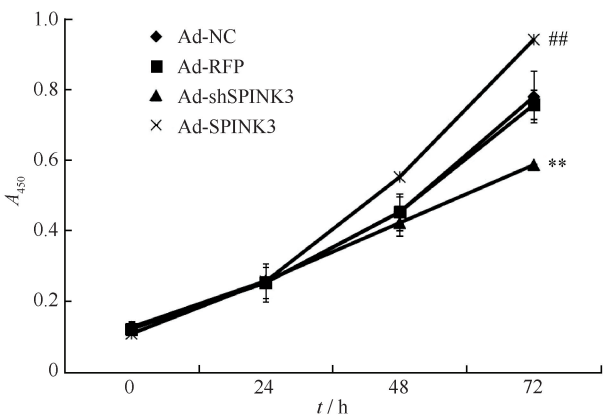
**Fig.3** The efficiency of overexpression or knock down of SPINK3 in primary rat hepatocytes (A) Relative mRNA level of SPINK3 overexpression group and shRNA interfering group were detected by real-time quantitative PCR. (B) SPINK3 protein expression was detected by Western blotting. GAPDH was used as a loading control

2.4 SPINK3 过表达增强原代大鼠肝细胞的增殖能力

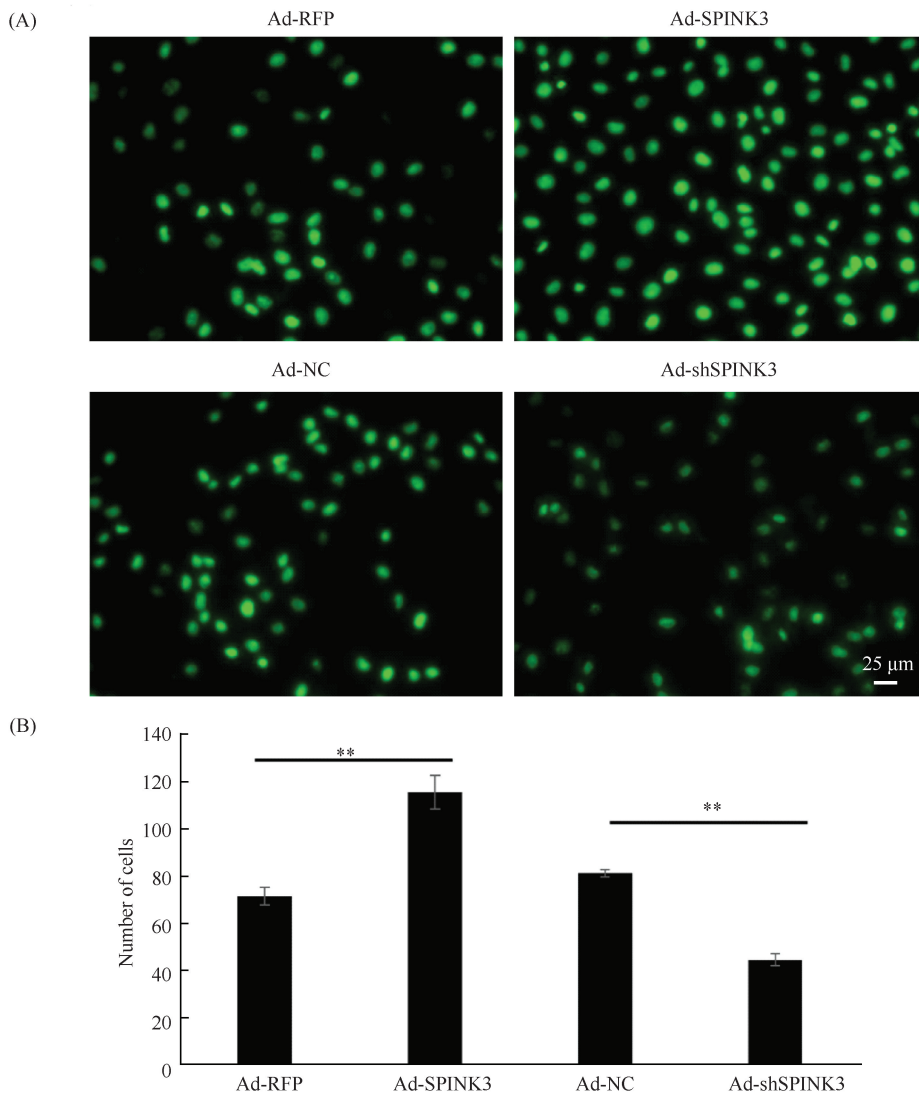
为研究 SPINK3 对原代大鼠肝细胞增殖能力的影响,用 Ki67 免疫荧光法检测 SPINK3 过表达组和干涉组细胞增殖情况。结果显示,Ad-SPINK3 组与 Ad-RFP 组相比增殖细胞显著增加 ( $P < 0.01$ ), Ad-shSPINK3 组与 Ad-NC 组相比增殖细胞显著减少 ( $P < 0.01$ ) (Fig. 5),表明 SPINK3 过表达促进原代大鼠肝细胞增殖,而干涉该基因表达则抑制原代大鼠肝细胞的增殖。

2.5 SPINK3 过表达促进原代大鼠肝细胞的细胞周期

PI 为插入性核酸荧光染料,能选择性的嵌入核酸 DNA 和 RNA 双链螺旋的碱基之间与之结合。为探讨 SPINK3 与原代大鼠肝细胞周期之间的相互作用,用 PI 检测 SPINK3 过表达组和干涉组细胞周期



**Fig.4** The expression of SPINK3 could promote the viability of primary rat hepatocytes The  $A$  value of the cells of the SPINK3 overexpression group or knock down group was detected by CCK8 at 0, 24, 48 and 72 hours. ## $P < 0.01$ , Ad-SPINK3 compared with Ad-RFP; \*\* $P < 0.01$ , Ad-shSPINK3 compared with Ad-NC



**Fig. 5 SPINK3 enhanced the proliferation of primary rat hepatocytes** Effects of SPINK3 overexpression or knock down on the proliferation of primary hepatocytes were detected by Ki67 immunofluorescence assay. \*\*  $P < 0.01$ , Ad-SPINK3 compared with Ad-RFP, Ad-shSPINK3 compared with Ad-NC

的变化。结果显示,Ad-SPINK3 组与 Ad-RFP 组相比,处于  $G_2/M$  期的细胞比例明显增加( $P < 0.01$ )。Ad-shSPINK3 组与 Ad-NC 组相比,处于  $G_2/M$  期的细胞比例明显下降( $P < 0.01$ ) (Fig. 6)。结果表明,过表达 SPINK3 极显著增加原代大鼠肝细胞在  $G_2/M$  期的比例,而干涉该基因表达则极显著减少原代大鼠肝细胞在  $G_2/M$  期的比例。表明 SPINK3 促进原代大鼠肝细胞的细胞周期,而干涉该基因表达则抑制原代大鼠肝细胞的周期。

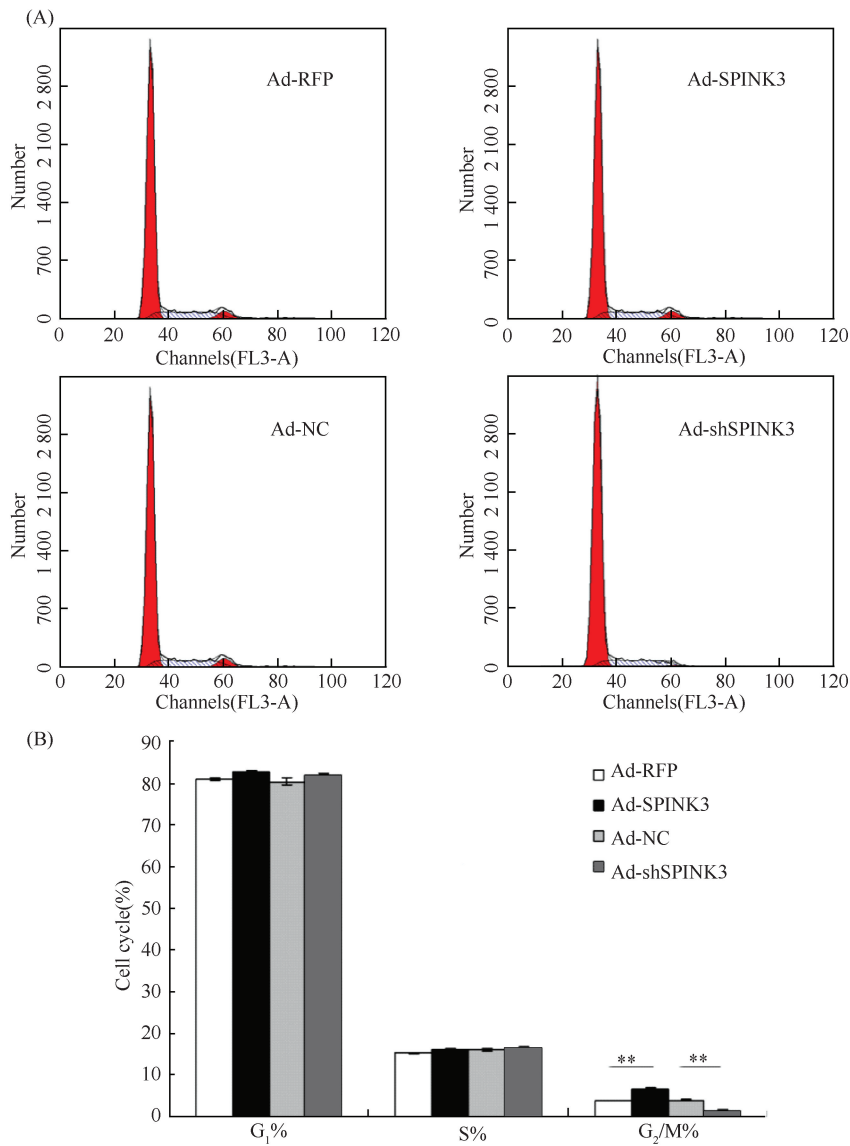
**2.6 SPINK3 过表达降低原代大鼠肝细胞的细胞凋亡率**

为进一步探讨 SPINK3 与原代大鼠肝细胞凋亡的相互关系,用 Annexin V/PI 测定 SPINK3 过表达组以及干涉组对原代大鼠肝细胞凋亡的影响。

结果显示,Ad-SPINK3 组与 Ad-RFP 组相比,细胞凋亡率极显著降低( $P < 0.01$ ),Ad-shSPINK3 组与 Ad-NC 组相比,细胞凋亡率极显著升高( $P < 0.01$ ) (Fig. 7)。结果表明,SPINK3 过表达抑制原代大鼠肝细胞凋亡,干涉其表达则促进原代大鼠肝细胞凋亡。

**2.7 SPINK3 表达变化影响原代大鼠肝细胞中 SPINK3 信号通路相关基因的表达**

检测 SPINK3 表达变化对原代大鼠肝细胞中 SPINK3 信号通路相关基因表达的影响。结果显示,Ad-SPINK3 组与 Ad-RFP 组相比,SPINK3 相关信号通路基因 *AKT1*、*STAT3*、*SRC* 表达显著上调( $P < 0.01$ )。Ad-shSPINK3 组与 Ad-NC 组相比,*AKT1*、*STAT3*、*SRC* 表达显著下调( $P < 0.01$ ) (Fig. 8)。上



**Fig.6 Effects of SPINK3 expression on cell cycle of primary rat hepatocytes** (A) The cell cycle of SPINK3 overexpression group or knock down group were detected by PI single staining; (B) Analysis of cell cycle in each group. \*\*  $P < 0.01$ , Ad-SPINK3 compared with Ad-RFP, Ad-shSPINK3 compared with Ad-NC

述结果表明,SPINK3 可能通过 SRC/P38、JAK/STAT 和 PI3K/AKT 信号通路来调节原代大鼠肝细胞增殖。

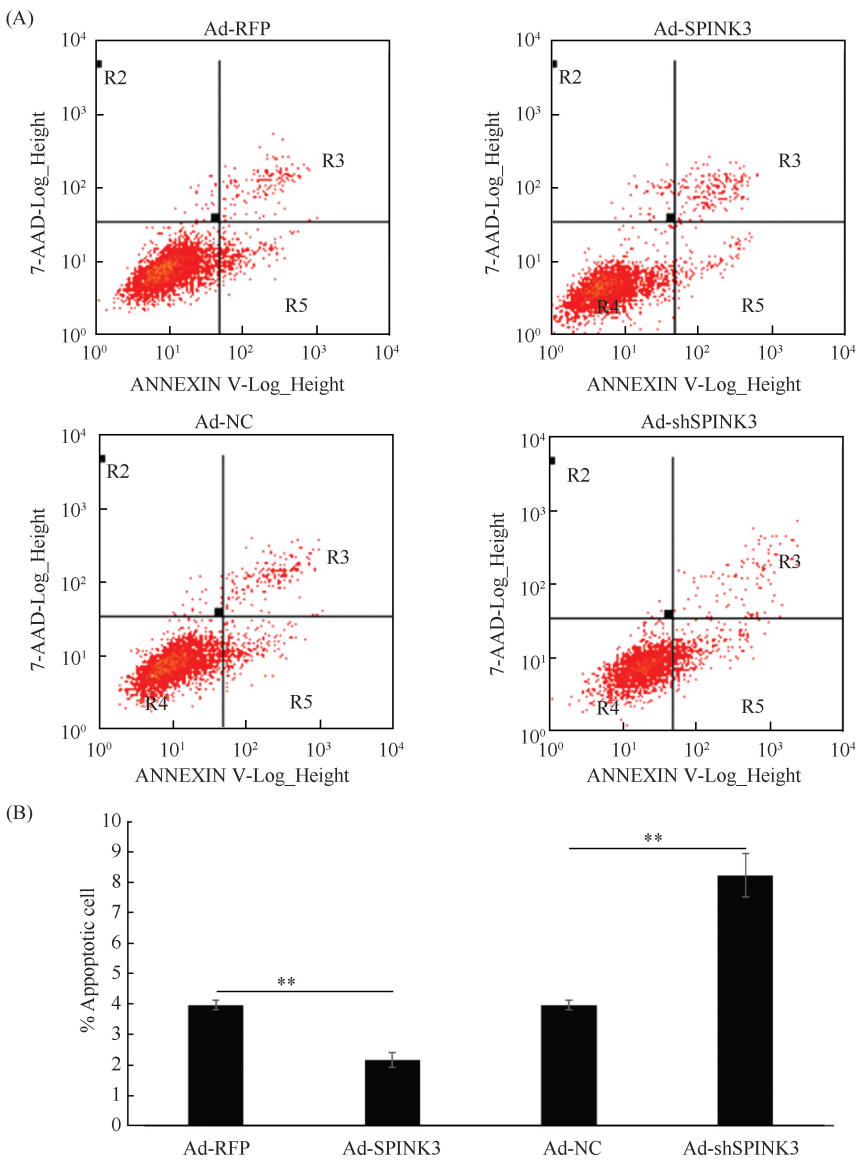
3 讨论

SPINK3 作为一种与表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 结构相似的生长因子,能够与表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 结合来促进细胞增殖<sup>[5]</sup>。Wang 等<sup>[15]</sup> 经过一系列的研究发现,SPINK3 在小鼠胚胎发育过程中的细胞增殖和各种细胞的分化等方面发挥重要作用。Räsänen 等<sup>[16]</sup> 研究表明,在卵巢癌症中 SPINK1 抑制细胞凋亡。由此可见,SPINK3 在细胞增殖和细胞

凋亡中发挥重要的作用。本文研究 SPINK3 对原代大鼠肝细胞的细胞周期和细胞凋亡的影响,发现 SPINK3 可促进原代大鼠肝细胞的细胞增殖与抑制细胞凋亡。

Tiwari 等<sup>[17]</sup> 经研究也表明,SPINK3 促进结直肠癌细胞增殖。Ohmuraya 等<sup>[18]</sup> 通过对 SPINK3 缺乏小鼠的研究发现,小鼠在出生后的几天内,其胰腺和十二指肠的细胞频繁出现细胞死亡,小鼠缺乏 SPINK3 后表现出过度的自噬<sup>[7]</sup>。Romac 等<sup>[19]</sup> 也发现,敲除 SPINK3 基因的小鼠其存活不会超过 15 d,并且敲除小鼠也因为胰腺细胞的自噬而缺乏正常结构的胰腺。由此可见,SPINK3 在细胞的正常死亡即细胞凋亡中发挥重要作用。本文通过过表达



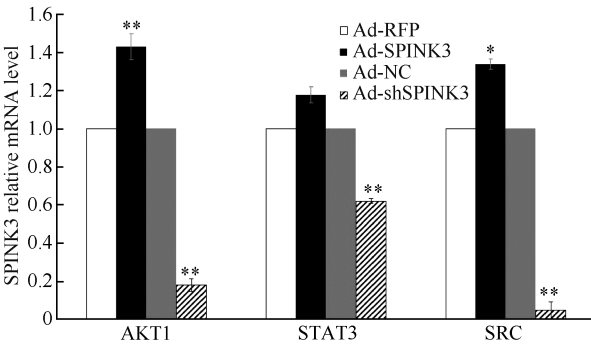


**Fig.7 Effects of SPINK3 expression on apoptosis of primary rat hepatocytes** (A) The cell apoptosis of Ad-SPINK3 group and Ad-shSPINK3 group was detected by Annexin V/PI; (B) Analysis of apoptosis in each group. \*\*  $P < 0.01$ , Ad-SPINK3 compared with Ad-RFP, Ad-shSPINK3 compared with Ad-NC

SPINK3 发现,原代大鼠肝细胞的细胞活性增强, $G_2/M$  期细胞增多以及细胞凋亡率下降,而干涉 SPINK3 表达后,原代大鼠肝细胞的细胞活性减弱, $G_2/M$  期细胞相对减少以及细胞凋亡率上升。

Ida 等<sup>[20]</sup> 通过研究发现,SPINK3 与 EGF 受体 (EGFR) 结合能激活其下游信号通路,从而促进结肠癌细胞增殖。EGFR 下游信号通路包括 PI3K/AKT/mTOR, SRC, JAK/STAT, NF- $\kappa$ B 以及 RAS/RAF/MEK1/ERK1/2 等<sup>[21]</sup>。Shostak 等<sup>[21]</sup> 研究表明,EGFR 磷酸化后活化其下游信号通路 SRC/P38,从而促进细胞的存活、增殖。本文研究发现。SPINK3 过表达后细胞中 SRC 表达上调,而干涉 SPINK3 时细胞 SRC 表达下调。Shostak 等还指出,

EGFR 可以通过 JAK 活化 STAT 家族,从而促进细胞增殖<sup>[21]</sup>。本文研究发现,SPINK3 过表达后细胞中 STAT3 表达上调,而干涉 SPINK3 时细胞内 STAT3 表达下调。Dowlati 等<sup>[22]</sup> 通过抑制细胞内 EGFR 的活性后发现,JAK/STAT 信号通路的活性及细胞的增殖均受到影响。本文研究发现,SPINK3 过表达后细胞中 AKT1 表达上调,而干涉 SPINK3 细胞时 AKT1 表达下调。研究表明,EGFR 能够通过 PI3K 活化蛋白激酶 AKT<sup>[23]</sup>,促进细胞增殖基因表达上调,从而促进细胞增殖与生长。Mao 等<sup>[24]</sup> 研究表明,Afatinib 通过抑制 EGFR 诱导的 PI3K/AKT 信号通路,促进细胞的凋亡。除了对上述几个通路中的基因表达检测外,我们也对 SPINK3 其他信号通



**Fig.8 Effects of SPINK3 expression on related gene expression of SPINK3 signaling pathway** The expression changes of gene of SPINK3 signaling pathway were detected by real time quantitative PCR. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , Ad-SPINK3 compared with Ad-RFP, Ad-shSPINK3 compared with Ad-NC

路的主要基因表达情况进行了检测,但与本实验主旨不符。综上所述,SPINK3 可能通过 SRC/P38、JAK/STAT 和 PI3K/AKT 等 3 条信号通路促进原代大鼠肝细胞增殖。在后续的研究中,我们将通过基因敲除等方法进一步研究 SPINK3 在原代大鼠肝细胞中的作用机制。

参考文献 (References)

[ 1 ] Landemore G, Debout C, Quillec M, *et al.* Isolation of Kurloff cells by Percoll density gradient centrifugation. Protein labeling with 35S-methionine of these cells[J]. *Biol Cell*, 1984, **50**(2): 121-126

[ 2 ] Hamel F, Grondin M, Denizeau F, *et al.* Wheat extracts as an efficient cryoprotective agent for primary cultures of rat hepatocytes[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2006, **95**(4): 661-670

[ 3 ] Khan AZ, Mudan SS. Liver regeneration: mechanisms, mysteries and more[J]. *ANZ J Surg*, 2007, **77**(1-2): 9-14

[ 4 ] Guo F, Nian H, Zhang H, *et al.* Proteomic analysis of the transition from quiescent to proliferating stages in rat liver hepatectomy model[J]. *Proteomics*, 2006, **6**(10): 3075-3086

[ 5 ] Chang CF, Yang J, Li XF, *et al.* [ SPINK3: A novel growth factor that promotes rat liver regeneration ] [ J ]. *Mol Biol (Mosk)*, 2016, **50**(3): 457-465

[ 6 ] Paju A, Stenman UH. Biochemistry and clinical role of trypsinogens and pancreatic secretory trypsin inhibitor[J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2006, **43**(2): 103-142

[ 7 ] Ohmuraya M, Yamamura K. Roles of serine protease inhibitor Kazal type 1 (SPINK1) in pancreatic diseases[J]. *Exp Anim*, 2011, **60**(5): 433-444

[ 8 ] Wang GP, Xu CS. Pancreatic secretory trypsin inhibitor: More than a trypsin inhibitor[J]. *World J Gastrointest Pathophysiol*, 2010, **1**(2): 85-90

[ 9 ] Kido H, Yokogoshi Y, Katunuma N. A low-molecular-mass Kazal-type protease inhibitor isolated from rat hepatocytes is identical to rat pancreatic secretory trypsin inhibitor II. Purification and amino acid sequence[J]. *Eur J Biochem*, 1990, **188**(3): 501-506

[ 10 ] Uda K, Murata A, Nishijima J, *et al.* Elevation of circulating monitor peptide/pancreatic secretory trypsin inhibitor-I ( PSTI-61 ) after turpentine-induced inflammation in rats; hepatocytes produce it as an acute phase reactant[J]. *J Surg Res*, 1994, **57**(5): 563-568

[ 11 ] Gaber A, Stene C, Hotakainen K, *et al.* Effects of radiation therapy on tissue and serum concentrations of tumour associated trypsin inhibitor and their prognostic significance in rectal cancer patients[J]. *Radiat Oncol*, 2011, **6**: 100

[ 12 ] Lamontagne J, Pinkerton M, Block TM, *et al.* Hepatitis B and hepatitis C virus replication upregulates serine protease inhibitor Kazal, resulting in cellular resistance to serine protease-dependent apoptosis[J]. *J Virol*, 2010, **84**(2): 907-917

[ 13 ] Ohmuraya M, Hirota M, Araki K, *et al.* Enhanced trypsin activity in pancreatic acinar cells deficient for serine protease inhibitor kazal type 3[J]. *Pancreas*, 2006, **33**(1): 104-106

[ 14 ] Wang GP, Xu CS. Reference gene selection for real-time RT-PCR in eight kinds of rat regenerating hepatic cells [ J ]. *Mol Biotechnol*, 2010, **46**(1): 49-57

[ 15 ] Wang J, Ohmuraya M, Hirota M, *et al.* Expression pattern of serine protease inhibitor kazal type 3 ( Spink3 ) during mouse embryonic development [ J ]. *Histochem Cell Biol*, 2008, **130**(2): 387-397

[ 16 ] Rasanen K, Itkonen O, Koistinen H, *et al.* Emerging roles of SPINK1 in cancer[J]. *Clin Chem*, 2016, **62**(3): 449-457

[ 17 ] Tiwari R, Pandey SK, Goel S, *et al.* SPINK1 promotes colorectal cancer progression by downregulating Metallothioneins expression [ J ]. *Oncogenesis*, 2015, **4**: e162

[ 18 ] Ohmuraya M, Hirota M, Araki M, *et al.* Autophagic cell death of pancreatic acinar cells in serine protease inhibitor Kazal type 3-deficient mice[J]. *Gastroenterology*, 2005, **129**(2): 696-705

[ 19 ] Romac JM, Ohmuraya M, Bittner C, *et al.* Transgenic expression of pancreatic secretory trypsin inhibitor-1 rescues SPINK3-deficient mice and restores a normal pancreatic phenotype [ J ]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010, **298**(4): G518-524

[ 20 ] Ida S, Ozaki N, Araki K, *et al.* SPINK1 status in colorectal cancer, impact on proliferation, and role in colitis-associated cancer[J]. *Mol Cancer Res*, 2015, **13**(7): 1130-1138

[ 21 ] Shostak K, Chariot A. EGFR and NF-kappaB: partners in cancer[J]. *Trends Mol Med*, 2015, **21**(6): 385-393

[ 22 ] Dowlati A, Nethery D, Kern JA. Combined inhibition of epidermal growth factor receptor and JAK/STAT pathways results in greater growth inhibition in vitro than single agent therapy[J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, **3**(4): 459-463

[ 23 ] Banerjee K, Das S, Sarkar A, *et al.* A copper chelate induces apoptosis and overcomes multidrug resistance in T-cell acute lymphoblastic leukemia through redox imbalance and inhibition of EGFR/PI3K/Akt expression[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, **84**: 71-92

[ 24 ] Mao X, Chen Z, Zhao Y, *et al.* Novel multi-targeted ErbB family inhibitor afatinib blocks EGF-induced signaling and induces apoptosis in neuroblastoma [ J ]. *Oncotarget*, 2017, **8**(1): 1555-1568