

Wnt2/ β -catenin 通路在 C57BL/6 小鼠肝再生修复中的变化

姚路远^{1,2}, 刘云¹, 杨茜^{1,2}, 鲍欣¹, 王琰¹, 赵小英¹, 唐俊明¹

摘要 目的 探讨 Wnt2/ β -catenin 通路在 C57BL/6 小鼠肝再生修复中的变化特征。方法 将 C57BL/6 雄鼠随机分为假手术组 (Sham 组)、术后 1 d 组、术后 2 d 组、术后 4 d 组、术后 6 d 组、术后 8 d 组,手术组小鼠行部分肝切除术 (PHx),分别切除肝左叶和中叶。于术后第 1、2、4、6、8 天收集血浆和肝脏组织,丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 和天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 生化分析试剂盒检测血浆 ALT 和 AST 活力;免疫组化检测各组 Ki67 阳性细胞数目;免疫荧光检测 HNF4- α 和 Ki67 双阳性细胞数、LYVE1 和 Ki67 双阳性细胞数及 β -catenin 入核细胞数;Western blot 检测各组 Wnt2 蛋白的表达,分析其在肝再生过程中表达的时间特征。结果 PHx 后第 6 天肝质量、肝质量/体质量达到高峰,接近 Sham 组水平。PHx 后第 1 天肝损伤严重,第 4 天即可恢复正常。PHx 后第 2 天主要是肝细胞增殖,第 4、6 天主要是肝窦内皮细胞增殖,同时 Wnt2/ β -catenin 通路被激活。结论 肝脏有强大的再生修复功能,与肝实质细胞和肝窦内皮细胞的快速增殖密切相关,Wnt2/ β -catenin 通路在小鼠肝脏再生修复中被激活。

关键词 肝部分切除术;肝再生修复;Wnt2; β -catenin

中图分类号 R 363.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)05-0753-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.009

肝再生是一个复杂的过程,涉及肝脏中的多种细胞类型,包括肝细胞、肝星状细胞、肝窦内皮细胞 (liver sinusoidal endothelial cells, LSEC) 和 Kupffer 细胞等^[1]。肝细胞是主要的实质细胞,占肝功能的很大一部分^[2]。健康的肝脏中细胞有丝分裂是静止的,但在受损伤或切除后,细胞可以迅速进入细胞

周期,恢复肝脏的质量和功能。在肝再生过程中,肝实质细胞和 LSEC 密切配合促进肝脏质量和功能的修复^[1]。Wnt 基因最初来源于小鼠乳腺癌中的整合酶-1 和果蝇的无翅基因,Wnt 通路也被称为 Wnt2/ β -catenin 通路,涉及 β -catenin 的核转位。 β -catenin 进入细胞核与 TCF/LEF 转录因子激活靶基因,该通路主要控制细胞增殖^[3]。既往研究^[4]表明 Wnt2/ β -catenin 通路在肝脏发育、稳态和代谢中起着关键作用,但其在肝脏再生修复中的作用尚不清楚。该研究旨在探讨小鼠部分肝切除术 (partial hepatectomy, PHx) 后,肝再生修复过程中 Wnt2/ β -catenin 的表达特征及作用,为临床中 PHx 后的患者改善肝脏功能,降低术后病死率提供理论基础和新的靶标。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 11 周龄 C57BL/6 小鼠,雄性,体质量 24~30 g,购自湖北医药学院实验动物中心,饲养于 SPF 环境中,动物许可证号 SYXK(鄂)2019-0031,湖北医药学院实验动物伦理委员会批准[批准号:湖北医药学院动(福)第 2021-实 029 号]。

1.1.2 主要试剂 异氟烷购自美国 RWD 公司;TRIzol 购自美国 Ambion 公司;丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 生化分析试剂盒、天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 生化分析试剂盒购自南京建成生物技术研究所以;组织自发荧光淬灭剂 A 液、B 液购自武汉赛维尔生物科技有限公司;防淬灭封片剂购自美国 Southern Biotech 公司;苏木精购自武汉赛维尔生物科技有限公司;Anti-LYVE1 Rabbit pAb、Anti-HNF-4- α Rabbit mAb 购自英国 Abcam 公司;Anti-Ki67 Mouse mAb 购自武汉赛维尔生物科技有限公司;Anti-GAPDH Mouse pAb 购自美国 Bioworld 公司。HRP Goat Anti Rabbit IgG H+L、HRP Goat Anti Mouse IgG H+L 购自武汉安特捷生物技术有限公司;荧光二抗 AlexaFluor[®] 594 Donkey Anti-Mouse IgG H+L、AlexaFluor[®] 488 Donkey Anti-Rabbit IgG H+L 购自美国 Jackson Immuno Research 公司;PMSF 购自大连美仑

2022-12-01 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82270299);湖北省科技计划项目(编号:2021DFE026)

作者单位:¹ 湖北医药学院基础医学院,湖北省胚胎干细胞重点实验室,十堰 442000

² 十堰市太和医院(湖北医药学院附属医院)麻醉科,十堰 442000

作者简介:姚路远,男,硕士研究生;

唐俊明,男,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: tangjm416@163.com

生物技术有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;ECL 试剂盒购自美国 Millipore 公司;RIPA 购自大连美仑生物技术有限公司;DAPI 购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠肝切除再生模型构建 11 周龄 C57BL/6 雄鼠随机分为 6 组,Sham 组、术后 1 d 组、术后 2 d 组、术后 4 d 组、术后 6 d 组、术后 8 d 组,手术均在 SPF 环境中操作。术前称体质量,用异氟烷麻醉后,将小鼠置于保温垫上,胶带固定四肢。用碘伏消毒腹部 3 遍,横切口打开腹腔,分别用棉签暴露出肝左叶和中叶,用棉线结扎肝左叶和中叶根部并切除。检查残端无出血后,用 4# 手术缝合线迅速缝合伤口,Sham 组仅腹腔切开后缝合处理。

1.2.2 肝功能检测 行 PHx 后,于术后 1、2、4、6、8 d 取材,小鼠经吸入异氟烷麻醉后,心尖取血,经 4 ℃,3 500 r/min 离心 10 min 后,收取血浆,利用南京建成公司 AST、ALT 试剂盒检测血浆中肝功能指标 AST、ALT 水平变化,分析术后小鼠肝功能情况。

1.2.3 免疫组化染色 组织依次固定、脱水、透明、浸蜡、包埋,组织切片 5 μm。将切片脱蜡、复水后置于 pH6.0 枸橼酸钠中,放入微波炉抗原修复。PAP 阻水笔画圈后每个组织加 30 μl 3% 过氧化氢去除内源性过氧化物酶,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。含 0.3% Triton X-100 的 5% 山羊血清封闭液室温封闭 1 h,去除封闭液后,于每组切片分别滴加 30 μl 一抗 Anti-Ki67(1:600),湿盒内 4 ℃ 孵育过夜。放入室温复温 30 min 后用含 0.1% 吐温-20 的 PBS 溶液洗涤 3 次,每次 5 min。用山羊抗小鼠二抗(1:600)室温孵育 1 h,PBST 洗涤 3 次,每次 5 min。DAB 染色后超纯水冲洗 5 min,苏木精复染核 1.5 min,超纯水冲洗 10 min。1% 盐酸乙醇分化 5 s 后超纯水洗,PBS 返蓝后梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.2.4 免疫荧光染色 将上述组织抗原修复后,用组织自发荧光淬灭剂 A 液 30 μl 室温孵育 30 min,超纯水冲洗 5 min。用 5% 驴血清室温封闭 1 h,一抗 Anti-Ki67(1:600)、Anti-HNF-4-α,(1:2 000)、Anti-LYVE1(1:1 000)、Anti-β-catenin(1:100),4 ℃ 孵育过夜。放入室温复温 30 min 后用 PBST 溶液洗涤 3 次,每次 5 min。加入荧光二抗(1:500)室温孵育 1 h,PBST 洗 3 次,每次 5 min,DAPI(1:2 000)复染细胞核 5 min。PBST 洗 3 次,每次 5 min,滴加

组织自发荧光淬灭剂 B 液 30 μl 室温避光孵育 5 min,超纯水冲洗 5 min,PBS 中洗涤 3 次,每次 5 min,切片稍甩干后滴加防淬灭封片剂封片。

1.2.5 Western blot 检测 Wnt2 的表达变化特征 取各时间点肝脏组织 50 mg 于 EP 管中,加入 RIPA 和 PMSF 混合物 500 μl(RIPA:PMSF=100:1),多通道组织匀浆机匀浆。冰上静置 30 min 后,4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min,离心后取上清液即为肝组织总蛋白。采用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒对各组肝组织蛋白样品进行 BCA 定量分析后,加入 1/4 体积的 5× 上样缓冲液煮沸 5 min 使蛋白变性。行 SDS-PAGE 凝胶电泳进行蛋白分离;220 mA、60 min 的条件下转至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 PVDF 膜 1 h;一抗 Anti-Wnt2(1:1 000)、Anti-GAPDH(1:10 000)4 ℃ 孵育过夜,TBST 漂洗 3 次;二抗(1:10 000)室温孵育 1 h,TBST 漂洗 3 次。使用 ECL 试剂盒显影成像,使用 Image J 软件测量 Wnt2 和 GAPDH 灰度值,并用 Wnt2/GAPDH 进行半定量分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,作图软件为 GraphPad Prism 8.0。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PHx 后肝质量变化的时间动力学特征 为了观察 PHx 后不同时间点小鼠肝质量变化的特征,分别于 PHx 后 1、2、4、6、8 d 称取小鼠体质量和肝质量。与 Sham 组比较,术后第 1 天肝体积最小,第 2 天体积开始变大,到术后第 6 天达到高峰(图 1)。肝切后第 1 天肝质量、肝质量/体质量最低($P < 0.000 1$),第 6 天就恢复到接近 Sham 组水平(表 1)。经统计学分析,各组肝质量和肝质量/体质量结果差异有统计学意义(肝质量: $F = 26.317, P < 0.000 1$;肝质量/体质量: $F = 47.527, P < 0.000 1$)。结果表明,小鼠 PHx 后肝脏具有强大的再生修复能力,能快速使肝质量恢复至相对正常水平。

2.2 PHx 后肝功能变化的时间动力学特征 为了观察 PHx 后肝脏质量变化过程中肝脏功能变化的特征,于 PHx 后 1、2、4、6、8 d 收集血浆,用 ALT、AST 试剂盒检测血浆中肝功能指标 ALT 和 AST 的水平。结果显示肝切后 ALT、AST 水平均于第 1 天显著升高(ALT: $P < 0.01$;AST: $P < 0.001$),第 2 天迅速恢复至接近正常水平,到第 4 天完全恢复到 Sham

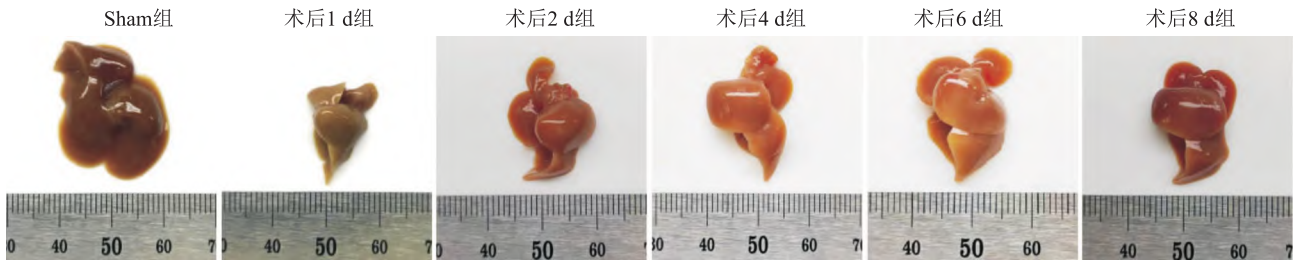


图1 PHx后各组肝组织形态变化

表1 PHx后肝质量变化的时间动力学特征($\bar{x} \pm s$)

组别	肝质量(g)	肝质量/体质量(%)
Sham	1.22 ± 0.239	4.69 ± 0.579
术后1 d	0.52 ± 0.113****	2.20 ± 0.330****
术后2 d	0.67 ± 0.101****	2.73 ± 0.219****
术后4 d	0.85 ± 0.075**	3.43 ± 0.202***
术后6 d	1.00 ± 0.086	4.17 ± 0.301
术后8 d	0.97 ± 0.127	4.01 ± 0.462
F值	26.317	47.527
P值	<0.000 1	<0.000 1

与Sham组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.000 1$

组水平(图2)。经统计学分析,各手术组和Sham组之间的肝功能水平差异有统计学意义(ALT: $F = 33.916$, $P < 0.000 1$; AST: $F = 62.559$, $P < 0.000 1$)。这一结果提示PHx后肝脏再生修复过程中,肝脏的功能迅速从损伤状态恢复到正常水平。

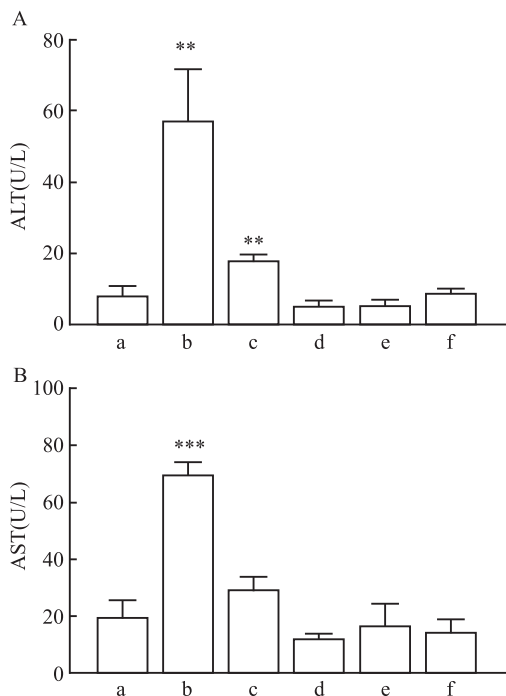


图2 PHx后肝功能变化的时间动力学特征

A: PHx后各组ALT水平统计分析; B: PHx后各组AST水平统计分析; a: Sham组; b: 术后1 d组; c: 术后2 d组; d: 术后4 d组; e: 术后6 d组; f: 术后8 d组; 与Sham组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.3 PHx后肝脏细胞增殖能力变化特征 为了探索PHx后肝脏再生修复与细胞增殖变化的关系,行Ki67免疫组化染色。与Sham组比较,PHx后肝脏Ki67阳性细胞数于第1天开始增多,于第2天达到高峰($P < 0.000 1$),从第4天开始逐渐下降,第8天恢复到接近正常水平。经统计学分析,各手术组和Sham组之间的Ki67阳性细胞数差异有统计学意义($F = 214.981$, $P < 0.000 1$)。为了探明Ki67阳性细胞的种类,本研究分别用肝实质细胞的特异标志物HNF4- α 和LSEC的特异标志物LYVE1与Ki67做免疫荧光共定位,结果显示HNF4- α 和Ki67双阳性细胞数于第1天开始增多,第2天达到高峰($P < 0.000 1$),然后逐渐下降,第6天恢复到接近正常水平。经统计学分析,手术组和Sham组之间的HNF4- α 、Ki67双阳性细胞数差异有统计学意义($F = 100.037$, $P < 0.000 1$)。LYVE1和Ki67双阳性细胞数在术后第1天降低,第4天升高达到峰值($P < 0.000 1$),第6天开始降低,于第8天恢复至Sham组水平。经统计学分析,各手术组和Sham组之间的LYVE1、Ki67双阳性细胞数差异有统计学意义($F = 31.13$, $P < 0.000 1$)。结果表明,PHx后第2天主要是肝细胞增殖,第4、6天主要是LSEC增殖。见图3。

2.4 PHx后小鼠肝组织Wnt2/ β -catenin表达变化情况 为研究Wnt2/ β -catenin通路与肝再生的关系,先检测了PHx后肝脏中Wnt2蛋白的表达。Western blot结果显示,与Sham组比较,术后第1天和第4天Wnt2蛋白表达达到峰值($P < 0.000 1$, $P < 0.001$),见图4。经统计学分析,手术组和Sham组之间的Wnt2蛋白表达差异有统计学意义($F = 43.89$, $P < 0.000 1$)。表明Wnt2通路可能参与了肝再生修复过程;进一步检测了 β -catenin被激活转入核内的情况, β -catenin免疫荧光定位结果显示,术后第1、2、6、8天 β -catenin入细胞核数显著增多($P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.05$),见图5。经

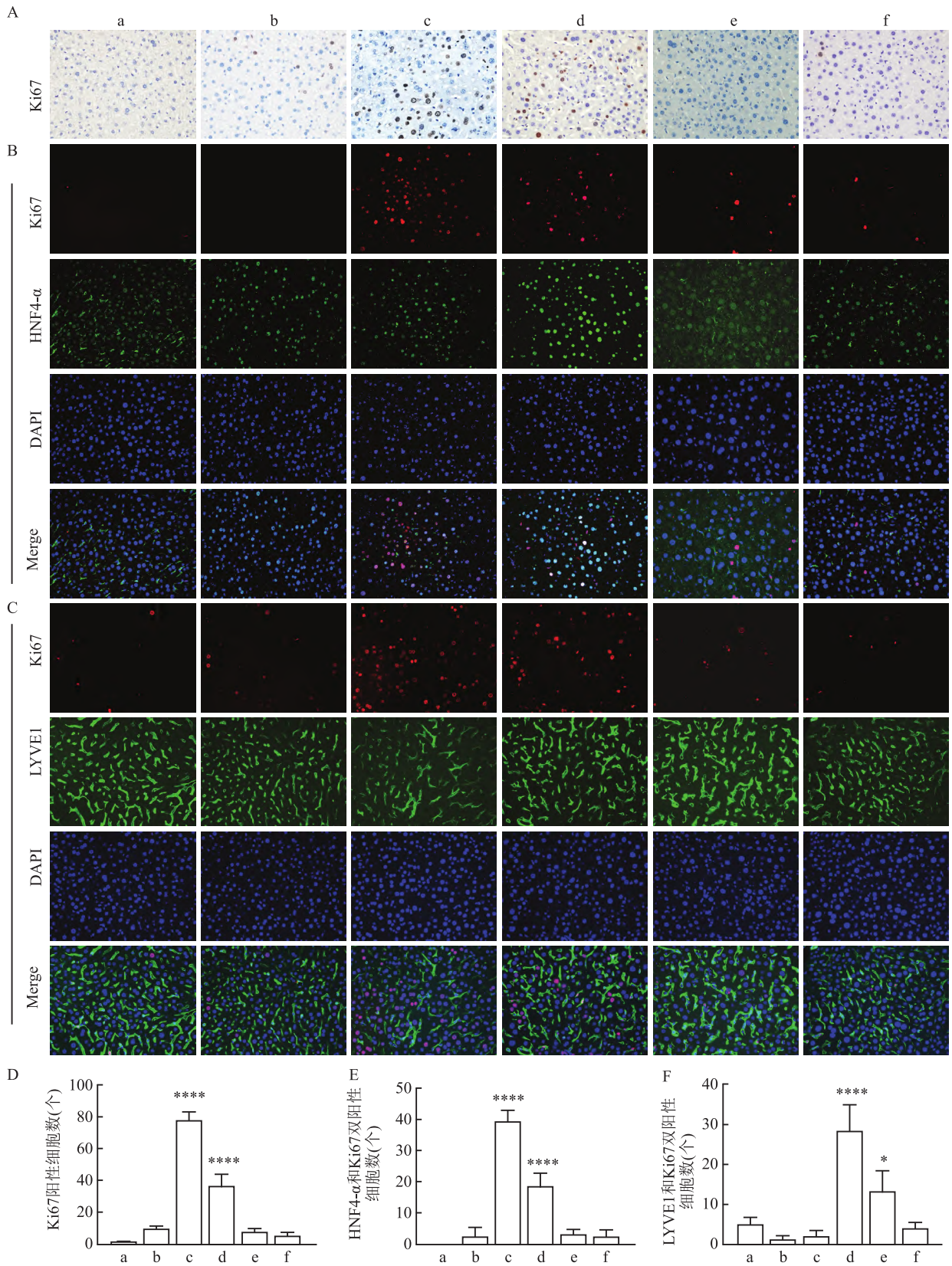


图3 PHx后肝脏细胞增殖能力变化特征

A: PHx后各组 Ki67 阳性细胞的免疫组化代表图(棕色细胞核) ×40; B: PHx后各组 HNF4-α 和 Ki67 双阳性细胞的免疫荧光代表图 ×40; C: PHx后各组 LYVE1 和 Ki67 双阳性细胞的免疫荧光代表图 ×40; D: PHx后各组 Ki67 阳性细胞的统计图; E: PHx后各组 HNF4-α 和 Ki67 双阳性细胞统计图; F: PHx后各组 LYVE1 和 Ki67 双阳性细胞统计图; a: Sham 组; b: 术后 1 d 组; c: 术后 2 d 组; d: 术后 4 d 组; e: 术后 6 d 组; f: 术后 8 d 组; 与 Sham 组比较: * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$

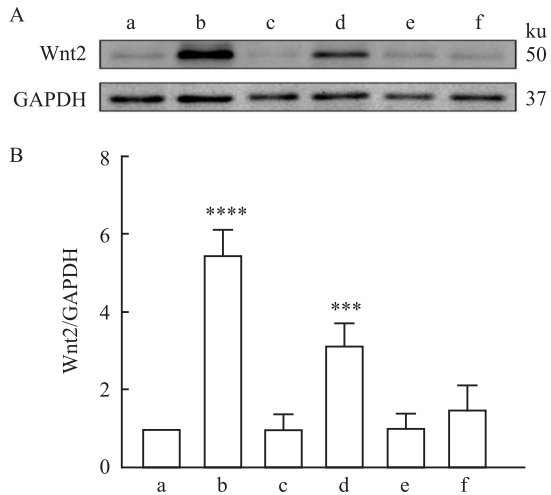


图4 PHx后肝组织中Wnt2蛋白表达的变化特征

A: Western blot 法分析 PHx 后各组 Wnt2 蛋白表达的代表图; B: Wnt2 蛋白表达的统计图; a: Sham 组; b: 术后 1 d 组; c: 术后 2 d 组; d: 术后 4 d 组; e: 术后 6 d 组; f: 术后 8 d 组; 与 Sham 组比较: **** $P < 0.001$, ***** $P < 0.0001$

统计学分析, 手术组和 Sham 组之间的 β -catenin 入核细胞数差异有统计学意义 ($F = 66.465, P < 0.0001$)。上述结果表明肝再生修复过程中 Wnt2/ β -cate-

nin 通路被激活。

3 讨论

肝脏是一种具有丰富的再生能力的独特器官。因此, PHx 或部分肝移植可以安全进行^[5]。PHx 后门静脉血流或压力的剧烈变化、组织缺血/缺氧可能是肝再生的主要触发因素和驱动力^[6]。肝脏是唯一一个利用再生机制来确保肝质量/体质量始终达到体内平衡所需质量的 100% 的实体器官^[7]。本研究发现, PHx 后小鼠肝质量、肝质量/体质量逐渐升高, 第 6 天达到高峰, 接近 Sham 组水平。PHx 后受损、坏死的肝细胞释放 ALT、AST 入血, 同时门静脉血流或压力的剧烈变化、肝组织缺血、缺氧触发肝再生修复。本研究结果显示, 在术后第 1 天 ALT、AST 水平显著升高, 第 2 天迅速恢复至接近正常水平。小鼠肝功能恢复的峰值和 Ki67 阳性细胞数峰值一致, 提示 PHx 后肝脏中的细胞快速增殖促进了肝功能的恢复。因此, 在肝损伤修复的早期, 提高患者肝脏中细胞的增殖能力, 是减少肝切除术后肝功能衰竭可能的策略。

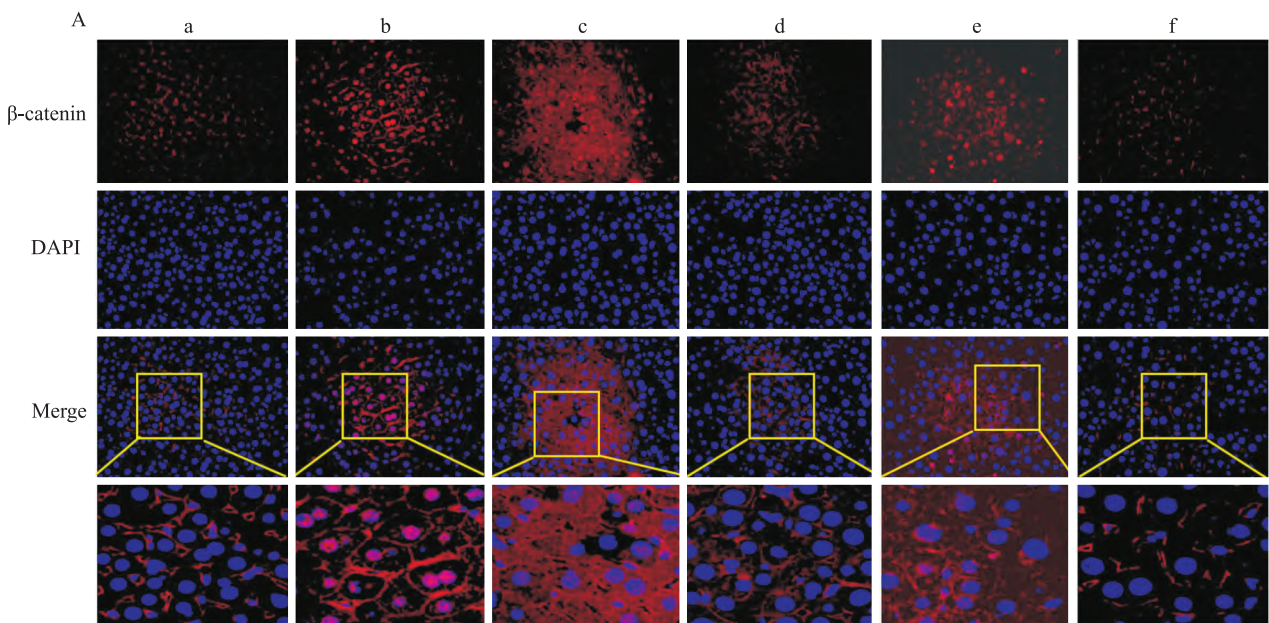


图5 PHx后肝组织中beta-catenin激活的变化特征

A: PHx 后各组 β -catenin 激活入核的代表图; B: PHx 后各组 β -catenin 激活入核的统计图; a: Sham 组; b: 术后 1 d 组; c: 术后 2 d 组; d: 术后 4 d 组; e: 术后 6 d 组; f: 术后 8 d 组; 与 Sham 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

肝再生是一个复杂的过程,涉及多种细胞类型的对话,包括肝细胞、肝星状细胞、内皮细胞和炎症细胞。健康的肝脏细胞有丝分裂是静止的,但在毒性损伤或切除后,细胞可以迅速进入细胞周期,恢复肝脏的质量和功能。在这个再生过程中,实质细胞和非实质细胞以一种紧密协调的方式进行反应^[8-9]。本研究发现在 PHx 后第 2 天肝实质细胞增殖达到高峰,从第 4 天开始逐渐降低;而 LSEC 增殖在 PHx 后第 1、2 天降低,第 4 天达到增殖高峰,第 6 天开始降低。这一结果说明了 PHx 后 2~4 d 是肝再生修复的关键阶段,肝实质细胞和 LSEC 分别起着重要作用,共同促进肝脏再生修复。

Wnt2/ β -catenin 信号通路对胚胎发育和肿瘤的发生发展起着重要作用^[10]。研究^[11-12]表明该通路在肝脏的发育、成熟和分化中也扮演着重要角色。在无 Wnt 配体的情况下,破坏复合物(CK1 α 、GSK3 β 、Axin、APC 蛋白形成的复合物)可磷酸化 β -catenin, 靶向其进行泛素依赖性蛋白酶体降解。当配体 Wnt 结合其同源受体 Frizzled 和共受体 LRP5/6 时,破坏复合物被招募到细胞膜上,从而减少破坏复合物对 β -catenin 的降解。 β -catenin 在细胞质中积累,并转入细胞核激活下游靶基因^[13-14]。在成熟的健康肝脏中,Wnt2/ β -catenin 通路大多不活跃,但在细胞更新或再生过程中,以及在某些病理条件,如疾病、恶性肿瘤中会重新激活。本研究发现,PHx 后第 1 天和第 4 天 Wnt2 表达增加; β -catenin 在第 1 天入核增加,第 2 天肝实质细胞增殖就达到峰值;术后第 2 天 β -catenin 入核增加,第 4 天 LSEC 增殖达到峰值。该结果预示了 Wnt2/ β -catenin 通路的激活,直接或者间接参与了肝脏再生修复。

β -catenin 被激活入核主要出现在 PHx 后第 1、2、6 和 8 天,而 Wnt2 蛋白表达的峰值在第 1 天和第 4 天,即第 4 天 Wnt2 蛋白表达峰值的时间在第 2 天 β -catenin 入核之后,提示 β -catenin 受 Wnt2 激活入核,并正反馈促进 Wnt2 的表达,下一步课题组将对该现象的机制进行研究。

综上所述,小鼠 PHx 后,肝脏有强大的再生修复能力,能使肝脏功能快速恢复至正常水平。本研究证实了肝实质细胞和 LSEC 增殖的同时 Wnt2/ β -

catenin 通路被激活,说明该通路在小鼠肝脏再生修复中有重要作用,具体的作用与机制需要进一步研究。该课题为临床患者 PHx 后肝功能的恢复,防治肝功能衰竭提供了新的靶标和理论基础。

参考文献

- [1] Campana L, Esser H, Huch M, et al. Liver regeneration and inflammation: from fundamental science to clinical applications [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(9): 608-24.
- [2] Trefts E, Gannon M, Wasserman D H. The liver [J]. *Curr Biol*, 2017, 27(21): R1147-51.
- [3] Liu J, Xiao Q, Xiao J, et al. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 3.
- [4] Annunziato S, Sun T, Tchorz J S. The RSPO-LGR4/5-ZNRF3/RNF43 module in liver homeostasis, regeneration, and disease [J]. *Hepatology*, 2022, 76(3): 888-99.
- [5] Starlinger P, Luyendyk J P, Groeneveld D J. Hemostasis and liver regeneration [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2020, 46(6): 735-42.
- [6] Yagi S, Hirata M, Miyachi Y, et al. Liver regeneration after hepatectomy and partial liver transplantation [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 8414.
- [7] Michalopoulos G K. Hepatostat: liver regeneration and normal liver tissue maintenance [J]. *Hepatology*, 2017, 65(4): 1384-92.
- [8] Campana L, Esser H, Huch M, et al. Liver regeneration and inflammation: from fundamental science to clinical applications [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(9): 608-24.
- [9] De Rudder M, Dili A, Stärkel P, et al. Critical role of LSEC in post-hepatectomy liver regeneration and failure [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 8053.
- [10] He S, Tang S. Wnt/ β -catenin signaling in the development of liver cancers [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 132: 110851.
- [11] Annunziato S, Sun T, Tchorz J S. The RSPO-LGR4/5-ZNRF3/RNF43 module in liver homeostasis, regeneration, and disease [J]. *Hepatology*, 2022, 76(3): 888-99.
- [12] Perugorria M J, Olaizola P, Labiano I, et al. Wnt- β -catenin signaling in liver development, health and disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(2): 121-36.
- [13] Muñoz-Castañeda J R, Rodelo-Haad C, Pendón-Ruiz D M M, et al. Klotho/FGF23 and Wnt signaling as important players in the comorbidities associated with chronic kidney disease [J]. *Toxins (Basel)*, 2020, 12(3): 185.
- [14] Reyes M, Flores T, Betancur D, et al. Wnt/ β -Catenin Signaling in oral carcinogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(13): 4682.

Research on Wnt2/ β -catenin pathway changes in liver regeneration and repair in C57BL/6 mice

Yao Luyuan^{1,2}, Liu Yun¹, Yang Qian^{1,2}, Bao Xin¹, Wang Yan¹, Zhao Xiaoying¹, Tang Junming¹

(¹Hubei Key Laboratory of Embryonic Stem Cell Research, Faculty of Basic Medical Sciences, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000; ²Dept of Anesthesiology, Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000)

Abstract Objective To explore the changing characteristics of Wnt2/ β -catenin pathway in liver regeneration and repair in C57BL/6 mice. **Methods** Male C57BL/6 mice were randomly divided into a sham-operated group (Sham group), 1 d post-operative group, 2 d post-operative group, 4 d post-operative group, 6 d post-operative group, and 8 d post-operative group. Mice in the operated group underwent partial hepatectomy (PHx) to remove the left and middle lobes of the liver, respectively. Plasma and liver tissues were collected on postoperative days 1, 2, 4, 6, and 8, and plasma ALT and AST activity was measured by ALT(alanine aminotransferase) and AST(aspartate aminotransferase) biochemical analysis kits; Ki67-positive cells were identified by immunohistochemistry in each group; the number of HNF4- α and Ki67 double positive cells, the number of LYVE1 and Ki67 double positive cells, and the number of β -catenin transferred into the nucleus were determined by immunofluorescence method. The expression of Wnt2 protein in each group was detected by Western blot, and the time characteristics of its expression during liver regeneration were analyzed. **Results** Liver weight and liver/body weight ratio peaked on day 6 after PHx and approached the level of the Sham group. After PHx, there was severe liver damage on day 1, but it had normalized by day 4. On day 2 after PHx, mainly hepatocytes proliferated; and on days 4 and 6, mainly liver sinusoidal endothelial cells proliferated, while the Wnt2/ β -catenin pathway was activated. **Conclusion** The liver has a powerful regenerative repair ability, which is closely related to the rapid proliferation of hepatocytes and liver sinusoidal endothelial cells, and the activation of the Wnt2/ β -catenin pathway is activated in the regenerative repair of the mouse liver.

Key words partial hepatectomy; liver regeneration and repair; Wnt2; β -catenin

(上接第 752 页)

cell lines were identified by DNA sequencing and divided into control group, MLCK KO 1 group and MLCK KO 2 group. The knockout efficiency of MLCK was assessed by RT-qPCR and Western blot, and the effect of MLCK knockout on cell cycle and apoptosis was detected by flow cytometry while Western blot was conducted to detect the effect of MLCK knockout on cell apoptosis. **Results** DNA sequencing showed that MLCK base sequences were missing or substituted at the sgRNA sequence recognition, and RT-qPCR and Western blot showed lower mRNA and protein levels in MLCK knockout cell lines than those in the control group ($P < 0.0001$). Furthermore, the flow cytometry assay showed that MLCK knockout did not significantly change the cycle of FaDu cells, but the rate of apoptosis increased ($P < 0.0001$). Western blot showed that Bax/Bcl-2 ($P < 0.0001$) and Cleaved Caspase-3/Caspase-3 ($P = 0.0007$) ratios raised in the MLCK knockout group. **Conclusion** The knockout of MLCK induced apoptosis in FaDu cells, but the exact mechanism needs further study.

Key words hypopharyngeal carcinoma; myosin light chain kinase; proliferation; apoptosis