

# VAI TRÒ CỦA CHẤT ỨC CHẾ NỘI SINH TRONG QUÁ TRÌNH TÁI SINH GAN TỪ TẾ BÀO GỐC

Phạm Văn Trân\*; Trần Ngọc Tuấn\*\*

## TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, để chứng minh vai trò của chất ức chế nội sinh (TIMP-1), chúng tôi sử dụng chuột biến đổi gen không có gen sản xuất TIMP-1. Quá trình tái sinh gan từ tế bào gốc (TB) gốc được thực hiện trên chuột nhắt C57BL bằng dinh dưỡng không có cholin và ngược lại bổ sung thêm ethionine (chế độ ăn CDE). Kết quả: nhóm chứng, chuột được nuôi bằng chế độ ăn CDE, TIMP-1 tăng cao ngày thứ 3, sau đó giảm dần. Chế độ ăn này gây hoại tử TB gan được đánh giá bằng hoạt độ của enzym GPT và bằng hình ảnh thoái hóa mỡ, tập trung TB viêm trên kính hiển vi quang học ở cả hai nhóm TIMP<sup>+/-</sup>. Trong nhóm chứng, TB gốc tăng sinh từ ngày thứ 7, đạt cực đại ngày thứ 21. Ở nhóm đột biến gen TIMP-1<sup>-/-</sup>, cũng quan sát thấy tăng sinh của TB gốc. Tuy nhiên, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. TIMP-1 không đóng vai trò thiết yếu trong quá trình tái sinh gan từ TB gốc.

\* Từ khoá: Tái sinh gan; Tế bào gốc; Ức chế nội sinh.

## TISSUE INHIBITOR OF MATRIX METALLOPROTEINASE-1 DEFICIENCY DOES NOT AFFECT HEPATIC REGENERATION FROM OVAL CELLS

### SUMMARY

To assess the role of tissue inhibitors of matrix metalloproteinase (TIMP-1) in oval cell accumulation, we studied the effect of TIMP-1 deficiency on liver regeneration from precursor cells induced in mice by a choline-deficient diet supplemented with ethionine (CDE). In wild type mice fed a CDE diet, TIMP-1 mRNA expression rose markedly at day 3 and decreased thereafter. The diet induced liver necrosis, measured by serum alanine aminotransferase activity, macrovacuolar steatosis as well as inflammatory cell infiltration to similar extent in both wild type and TIMP-1- mice. In wild type animals, oval cell accumulation started at day 7 and reached a maximum at day 21. In TIMP-1- mice, oval cell accumulation was higher than that observed in wild type animals but the difference was not statistically significant. In conclusion, TIMP-1 does not appear to play an essential role in liver regeneration from oval cells in mice fed a CDE diet, probably due to compensation by other proteinase inhibitors.

\* Key words: Liver regeneration; Precursor cells; Tissue inhibitors of metalloproteinase.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Gan có khả năng tăng sinh vô hạn từ các TB gan trưởng thành. Khi gan bị tổn thương nặng hoặc sau phẫu thuật cắt gan

có kết hợp với dùng các chất ức chế tăng sinh TB gan trong mô hình thực nghiệm, quá trình tái sinh gan được thực hiện từ TB gốc trưởng thành trong gan. Các TB này tồn tại trong những kênh dẫn Hering, tăng sinh ở

\* Bệnh viện 103

\*\* Học viện Quân y

Phản biện khoa học: TS. Lê Văn Đông

khoảng cửa về phía trung tâm tiểu thùy và biệt hóa thành TB gan [1]. Cơ chế của quá trình này vẫn chưa hoàn toàn sáng tỏ. Đường

dẫn mật được bao bọc bởi chất ngoại bào, gọi là màng cơ bản, liên tục ngăn cách giữa TB gốc và các nguyên bào sợi [2]. Màng cơ

bản giữ vai trò quan trọng trong quá trình tăng sinh, di chuyển và biệt hóa của TB gốc [3]. Màng cơ bản sẽ biến mất hoàn toàn khi TB gốc biệt hóa thành TB gan. Điều này gợi ý, màng cơ bản biến mất là điều kiện để TB gốc biệt hóa hoàn toàn thành TB gan [4].

Khi nghiên cứu về TIMP-1 trên mô hình cắt gan kết hợp với cho chuột ăn thức ăn có chất acetylaminofluorene, chúng tôi thấy tăng nồng độ TIMP-1 song song đồng thời với tăng sinh các TB gốc. Vì vậy, giả thiết rằng khi thiếu TIMP-1, TB gốc tăng sinh sẽ bị ảnh hưởng. Để làm sáng tỏ giả thiết này, chúng tôi sử dụng chuột biến đổi gen không có gen sản xuất TIMP-1. Tái sinh gan từ TB gốc thực hiện trên mô hình cho chuột ăn thức ăn không có cholin và giàu chất ethionine [9].

## **ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **1. Mô hình thực nghiệm.**

Nghiên cứu thực hiện trên chuột nhất 7 tuần tuổi, không có gen TIMP-1<sup>-/-</sup> [10] và chuột nhất bình thường đối chứng (WT: wild type) C57BL. Gen *TIMP-1* nằm trên nhiễm sắc thể X. Cho chuột bình thường và chuột biến đổi gen ăn chế độ ăn bình thường (nhóm chứng), hoặc 100% chế độ ăn không có cholin và uống bổ sung nước 0,15% ethionine (chế độ ăn CDE) [9]. Mổ chuột lấy bệnh phẩm sau 3 - 21 ngày của chế độ ăn.

### **2. Đánh giá tổn thương gan.**

Đánh giá tổn thương gan dựa trên hoạt độ GPT trong huyết thanh. Bán định lượng thoái hóa mỡ trên tiêu bản gan nhuộm hematoxylin và eosin bằng tỷ lệ % các TB

gan bị thoái hóa mỡ so với tổng số các TB gan bình thường.

### **3. Hóa mô miễn dịch.**

Nhuộm hóa mô miễn dịch cytokeratin 19 (CK-19, là dấu ấn của TB biểu mô đường mật và của TB gốc) cùng với lát cắt mô đông lạnh dày 4  $\mu$ m. Ủ tiêu bản với kháng thể chuột chống kháng CK-19 của chuột nhất (60 phút). Xác định kháng thể thứ nhất bằng kháng thể kháng IgG chuột chống gắn với chất huỳnh quang (Serotec). Tính số lượng TB dương tính với CK-19 được tính toán sử dụng phần mềm Image-Pro® Plus.

### **4. Kỹ thuật RT-PCR.**

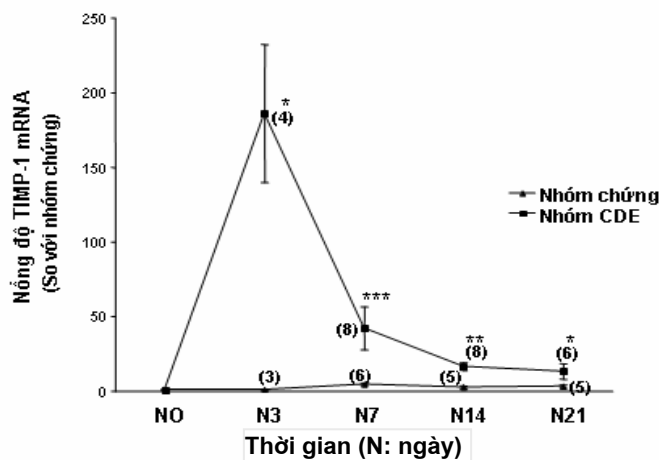
Tách ARN tổng số từ gan đông lạnh, sử dụng kit của hãng QIAGEN và quy trình kỹ thuật theo khuyến cáo của nhà cung cấp. Tổng hợp cADN theo kit của hãng Invitrogen. Chất môi được sử dụng cho TIMP-1 và F4/80 là: TIMP-1 (5'-ACTCTTCACTGCGGTTCTGGGAC-3' và 5'-GTCATAAGGGCTAAATTCATGGG-3'); F4/80 (5'-TTTCCTCGCCTGCTTCTTC-3' và 5'-GGTTGAATACAGAGACGGGG-3'). Lượng giá kết quả so với mRNA của 18S rARN.

\* *Xử lý số liệu:*

Tất cả các dữ liệu được tính trị số trung bình  $\pm$  1 SE. Thống kê theo phần mềm PRISM (GraphPad) phương pháp Mann-Whitney U-test.

## **KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN**

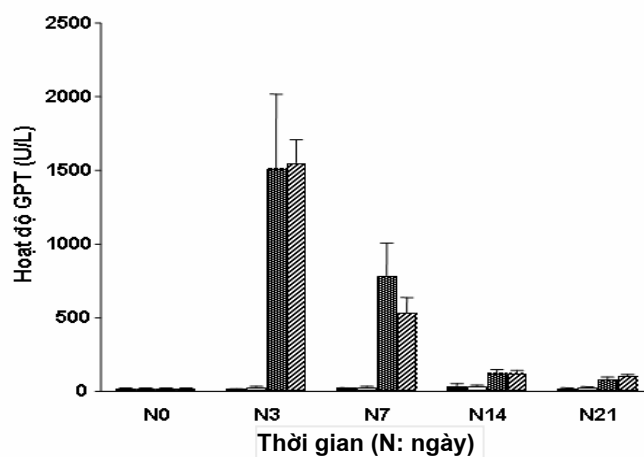
## 1. Chế độ ăn CDE gây tăng nồng độ TIMP-1 trên chuột C57BL.



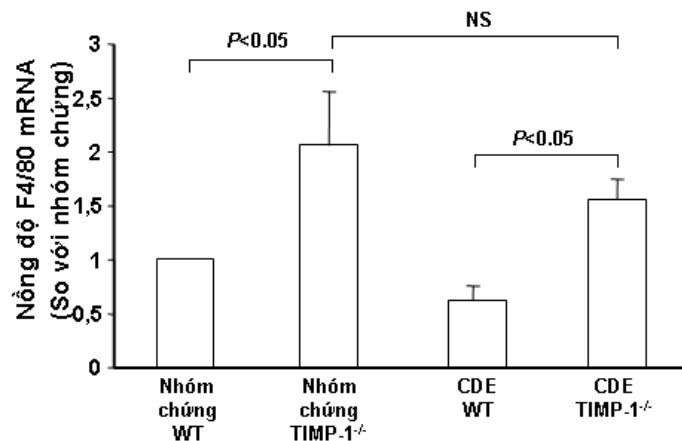
Hình 1: Biểu hiện của TIMP-1 mRNA trong quá trình tái sinh gan từ TB gốc. Nồng độ TIMP-1 mRNA được so sánh với ngày 0. Kết quả được biểu diễn bằng trị số trung bình  $\pm$  1 SE. Số trong ngoặc chỉ số lượng chuột. \* $p < 0,5$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Nồng độ mRNA TIMP-1 trong gan tăng cao nhất ngày thứ 3 của chế độ ăn (tăng > 150 lần so với nhóm chứng) và giảm dần sau đó (hình 1). Tại tất cả các thời điểm, nồng độ TIMP-1 luôn cao hơn so với nhóm chứng. Như vậy, quá trình tái sinh gan từ TB gốc bằng chế độ ăn CDE làm tăng tổng hợp TIMP-1. Kết quả phù hợp với các tác giả khác khi thực hiện mô hình tái sinh gan từ TB gốc trên chuột cống.

## 2. Chế độ ăn CDE gây hủy hoại TB gan.



Hình 2: Hoạt độ GPT. Mỗi cột biểu diễn trị số trung bình  $\pm$  1 SE. Không có sự khác biệt giữa nhóm chuột bình thường và nhóm chuột biến đổi gen ở cùng chế độ ăn CDE.

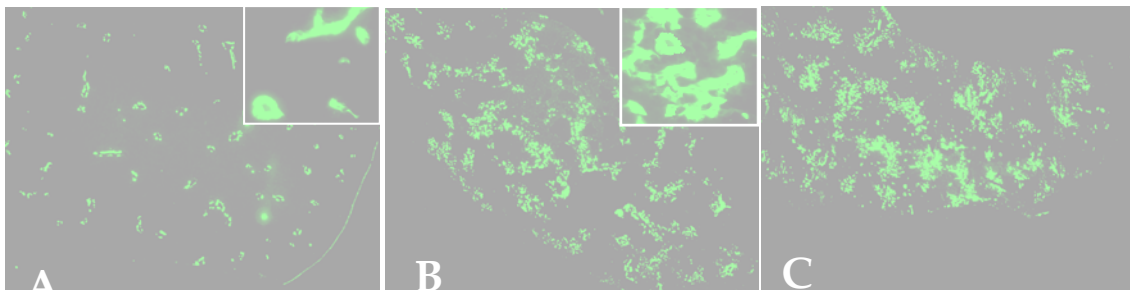


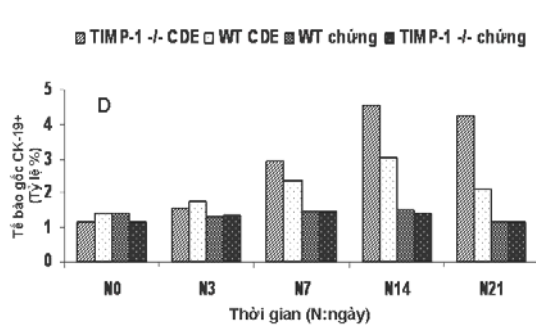
Hình 3: Nồng độ F4/80 mRNA ở chuột bình thường WT (wild type) và chuột biến đổi gen TIMP-1<sup>-/-</sup> được nuôi dưỡng bằng chế độ ăn CDE và chế độ ăn bình thường ngày thứ 7 (trung bình  $\pm$  1 SE). NS: không có ý nghĩa.

Chế độ ăn CDE gây thoái hóa mỡ, viêm gan và hoại tử TB gan trên chuột. Hoạt độ enzyme GPT tăng cao đạt cực đại ngày thứ 3 trên cả 2 nhóm chuột bình thường và chuột biến đổi gen (hình 2). Ở nhóm chuột bình thường, hoạt độ GPT tăng đồng thời với nồng độ mRNA TIMP-1 cho thấy TB gan hủy hoại gây tăng tổng hợp TIMP-1. Chế độ ăn CDE gây thoái hóa mỡ ở gan. Viêm gan cấp gặp ở hầu hết chuột nuôi theo chế độ ăn này, tuy nhiên không thấy sự khác biệt có ý nghĩa giữa chuột bình thường và chuột

biến đổi gen. Để định lượng đại thực bào, chúng tôi định lượng nồng độ F4/80 mRNA, một dấu ấn của TB monocyct/đại thực bào, ở ngày thứ 7 của chế độ ăn (hình 3). Dấu ấn này tăng có ý nghĩa trên chuột được nuôi bằng chế độ ăn CDE, nhưng không khác biệt giữa 2 nhóm chuột bình thường và chuột biến đổi gen. Kết quả phù hợp với nghiên cứu hình thái học trên tiêu bản gan nhuộm hematoxylin-eosin, cho thấy thiếu TIMP-1 không gây ảnh hưởng tới hủy hoại TB gan gây ra bởi chế độ ăn CDE.

### 3. Thiếu TIMP-1 không gây ảnh hưởng tới tăng sinh TB gốc.





**Hình 4:** Nhuộm hóa miễn dịch cytokeratin 19 tiêu bản gan chuột bình thường (WT) và chuột biến đổi gen TIMP-1<sup>-/-</sup> chế độ dinh dưỡng thông thường và CDE. (A) Gan chuột bình thường ngày 0. (B) Gan chuột bình thường chế độ dinh dưỡng CDE trong 3 tuần. (C) Gan chuột biến đổi gen chế độ dinh dưỡng CDE trong 3 tuần. (D) Tỷ lệ % TB gốc trong gan (trung bình  $\pm$  1 SE). Không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa chuột bình thường và chuột biến đổi gen cùng chế độ dinh dưỡng CDE.

Nghiên cứu vai trò của TIMP-1 trong quá trình tái sinh gan từ TB gốc trên mô hình CDE. Nhận dạng TB gốc bằng CK-19, đồng thời cũng là dấu ấn của TB biểu mô đường mật. Số lượng TB dương tính với CK-19 được tính toán dựa trên diện tích bề mặt mà TB chiếm chỗ trên tiêu bản. Số lượng TB dương tính với CK-19 rất thấp ở chế độ ăn thông thường (*hình 4A, 4D*). Ngược lại, chuột được nuôi bằng chế độ CDE TB dương tính với CK-19 tăng sinh mạnh ở vùng khoảng cửa và vùng liên tiểu thùy (*hình 4B*). Các TB này được nhận dạng là TB gốc nhờ vào vị trí của TB và khả năng sắp xếp, tổ chức thành vi quản mật. Ở nhóm chuột bình thường, tăng sinh TB gốc đạt cực đại vào ngày thứ 7 và tồn tại tới 2 - 3 tuần sau đó (*hình 4D*). Kết quả phù hợp với các tác giả trước [10]. Chuột biến đổi gen không có TIMP-1, số lượng TB gốc tăng cao, nhưng không khác biệt có ý nghĩa so với chuột bình thường (*hình 4C, 4D*). Kết luận, TIMP-1 ảnh hưởng không có ý nghĩa tới tăng sinh TB gốc trên mô hình tái sinh gan từ TB gốc. Kết quả này ngược lại với kết quả của Mohammed và CS: chất ức chế MMP làm giảm tăng sinh TB gan sau phẫu thuật cắt gan [7]. Chúng tôi giả định, thiếu TIMP-1 trên chuột biến đổi gen có thể được bù đắp bởi các thành phần khác trong nhóm TIMP như TIMP-2, -3 và -4 hoặc  $\alpha_2$ -macroglobulin. Cơ chế bổ sung này được chứng minh trong bệnh xơ gan do *S. mansoni* hoặc xơ thận do tắc đường dẫn niệu.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology*. 2004, 39, pp.1477-1487.
2. Hu Z, Everts R.P, Fujio K, Marsden E.R, and Thorgeirsson, S.S. Expression of hepatocyte growth factor and c-met genes during hepatic differentiation and liver development in the rat. *Am J Pathol*. 1993, 142, pp.1823-1830.
3. Paku S, Schnur J, Nagy P, and Thorgeirsson S.S. Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver. *Am J Pathol*. 2001, Vol 158, pp.1313-1323.

4. *Paku S, Nagy P, Kopper L, and Thorgeirsson S.S.* 2-acetylaminofluorene dose-dependent differentiation of rat oval cells into hepatocytes: confocal and electron microscopic studies. *Hepatology*. 2004, 39, pp.1353-1361.
5. *Sternlicht M.D, Werb Z.* How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001, 17, pp.463-516.
6. *Hojilla C.V, Mohammed F.F, and Khokha, R.* Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. *Br J Cancer*. 2003, 89, pp.1817-1821.
7. *Mohammed F.F, Pennington C.J, Kassiri Z, Rubin, J.S, Soloway, P.D, Ruther, U, Edwards, D.R, and Khokha, R.* Metalloproteinase inhibitor TIMP-1 affects hepatocyte cell cycle via HGF activation in murine liver regeneration. *Hepatology*. 2005, 41, pp.857-867.
8. *Liu X.W, Bernardo M.M, Fridman R, and Kim H.* Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects human breast epithelial cells against intrinsic apoptotic cell death via the focal adhesion kinase/phosphatidylinositol 3-kinase and MAPK signaling pathway. *J Biol Chem*. 2003. 278, pp.40364-40372.
9. *Knight B, Yeoh G.C, Husk K.L, Ly T, Abraham L.J, Yu C, Rhim J.A, and Fausto N.* Impaired preneoplastic changes and liver tumor formation in tumor necrosis factor receptor type 1 knockout mice. *J Exp Med*. 2000, 192, pp.1809-1818.
10. *Soloway P.D, Alexander C.M, Werb Z, and Jaenisch R.* Targeted mutagenesis of Timp-1 reveals that lung tumor invasion is influenced by Timp-1 genotype of the tumor but not by that of the host. *Oncogene*. 1996, 13, pp.2307-2314.