

西罗莫司对 TIE2-L914F 突变导致的静脉畸形血管内皮细胞增殖和凋亡的影响及其体外机制探究

施磊¹, 孙圆圆¹, 甘露², 王新婧³, 王海宝¹

摘要 目的 探究西罗莫司(SIR)对 TIE2-L914F 突变导致的静脉畸形(VM)血管内皮细胞增殖和凋亡的影响及其潜在分子机制。方法 干预人脐静脉内皮细胞(HUVEC)中 TEK 受体酪氨酸激酶(TIE2)的表达以构建 VM 血管内皮细胞模型(TIE2-L914F 组)。之后将部分 VM 血管内皮细胞模型暴露于 1 000 ng/ml SIR 48 h(TIE2-L914F + SIR 组),采用 MTT 和流式细胞术检测 VM 血管内皮细胞增殖和凋亡。采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 CXCL1 和 CXCR2 的 mRNA 及蛋白表达。结果 与 TIE2-L914F 组细胞相比,TIE2-L914F + SIR 组细胞增殖活力受到抑制,凋亡率升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。CXCL1 在 TIE2-L914F 细胞中表达升高,在 SIR 处理后降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 TIE2-L914F + pcDNA3.1 组比较,TIE2-L914F + pcDNA-CXCL1 组细胞增殖活力提高,凋亡率降低;而与 TIE2-L914F + pcDNA-CXCL1 组比较,TIE2-L914F + pcDNA-CXCL1 + SIR 组细胞增殖活力被抑制,凋亡率提高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。此外,与 TIE2-L914F 组比较,TIE2-L914F + SIR 组 CXCR2 表达降低($P < 0.05$)。结论

SIR 能够抑制 TIE2-L914F 突变导致的 VM 血管内皮细胞增殖,诱导细胞凋亡,抑制 CXCL1/CXCR2 表达。

关键词 西罗莫司; CXCL1/CXCR2; 静脉畸形; 增殖; 凋亡

中图分类号 R 654.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)04-0561-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.04.007

静脉畸形(venous malformation, VM)主要是由静脉发育异常引起的血管结构畸形^[1]。遗传学和分子生物学研究^[2]表明 VM 中存在广泛的 TEK 受体酪氨酸激酶(TEK receptor tyrosine kinase, TIE2)突变,而这也是导致 VM 发病的重要原因,众多突变中又以 TIE2 的 L914F 体细胞突变最常见。人脐静

脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)中过表达 TIE2-L914F 也成为构建 VM 体外血管内皮细胞模型的可行性方案并被应用^[3-5]。

西罗莫司(silormus, SIR)又称雷帕霉素,是一种新型大环内酯类免疫抑制药物,先前的研究^[2,6]表明 SIR 可改善 TIE2 基因突变导致的 VM,但 SIR 在 VM 中可能的作用靶点尚未得到完全阐明。CXCL1 趋化因子配体(CXC-chemokine ligand, CXCL)1 作为趋化因子家族的一员,通常与 CXCR2 特异性结合进而参与调控血管生成、炎症和肿瘤发生等病理过程^[7],但 CXCL1/CXCR2 是否参与了 VM 进展尚不清楚。相关研究^[8]表明 CXCL1 在脑动静脉畸形中表达增强。本研究通过干预 HUVEC 中 TIE2-L914F 的表达构建 VM 血管内皮细胞模型并分析 SIR 对 VM 血管内皮细胞增殖和凋亡的影响及其潜在分子机制,为 VM 的临床治疗提供更多理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 HUVEC 来自中国科学院(上海)细胞库;内皮细胞培养基(批号:1001)购自上海语纯生物科技有限公司;TIE2-L914F 和 TIE2-WT 慢病毒载体购自云舟生物科技(广州)有限公司;Lipofectamine 3000 试剂(货号:Invitrogen L3000-015)购自赛因百奥(北京)生物技术有限公司;西罗莫司(批准号:H20130698)购自湖南(长沙)泰仁药业有限公司;RIPA 裂解缓冲液(货号:MT0066)和 rhCXCL1(货号:JN0300)、cDNA 链合成试剂盒(货号:BTN63826)购自北京百奥莱博科技有限公司;MTT 细胞增殖分析试剂盒(货号:4890-025-K)购自艾美捷科技有限公司;ANNEXIN V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(货号:CA1020)购自北京索莱宝科技有限公司;TRIzol 试剂(货号:BJ-S964333)购自上海邦景实业有限公司;SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒(货号:RR820A)购自北京智杰方远科技有限公司;BCA 蛋白定量分析试剂盒(货号:23227)购自北京诺博莱德科技有限责任公司;TIE2(货号:ab221154)、CXCL1(货号:ab89318)、CXCR2(货号:ab89254)和

2023-02-24 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1808085MH228)

作者单位:¹ 安徽医科大学第一附属医院放射科,合肥 230022

² 淮南东方医院集团总医院放射科,淮南 232038

³ 安徽省妇幼保健院放射科,合肥 230001

作者简介:施磊,男,本科;

王海宝,男,主任医师,博士,责任作者,E-mail: Wanghaibao_@163.com

GAPDH(货号: ab8245) 抗体购自英国 Abcam 公司; p-CXCR2(货号: YM-CV12257R) 购自上海延慕实业有限公司; p-TIE2(货号: 4221) 购自美国 CST 公司; 辣根过氧化物酶结合的山羊抗兔 IgG(货号: A0208) 购自上海碧云天生物技术有限公司; Cy3 标记的荧光二抗(货号: GMS40076) 购自深圳子科生物科技有限公司; 高灵敏 ECL 发光检测试剂盒(货号: BH-S63610) 购自上海博湖生物科技有限公司。实时荧光定量 PCR 系统(型号: ABI 7500) 购自上海实维实验仪器技术有限公司。流式细胞仪(型号: FACS-Via) 购自上海三崑医疗设备有限公司; 倒置荧光显微镜(型号: XDY-400) 购自上海寰熙医疗器械有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞模型的建立 HUVEC 在内皮细胞培养基中培养, 培养箱条件为 37 °C、5% CO₂。之后将处于对数生长期的 1 × 10⁵ 个细胞接种至 96 孔板中, 消化、离心后重悬, 将含有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP) 和 TIE2-L914F、TIE2-WT 的慢病毒载体处理细胞 72 h, 建立 TIE2-L914F 和 TIE2-WT 细胞模型, 未处理的 HUVEC 被设为 Control 组。

1.2.2 细胞模型鉴定 TIE2-L914F 或 TIE2-WT 转染 72 h 后, 使用倒置荧光显微镜观察 HUVEC 细胞内的 GFP 表达情况以确定转染效率。收集各组细胞总 RNA, 使用 qRT-PCR 检测 TIE2 的 mRNA 表达水平。收集各组细胞总蛋白, 使用 Western blot 检测 TIE2 和 p-TIE2 的蛋白表达水平, MTT 测定细胞增殖活力。

1.2.3 SIR 处理 将 TIE2-L914F 细胞设为对照组, 实验组 TIE2-L914F 细胞在含有 1 000 ng/ml SIR 的培养基中培养^[4]。48 h 后进行后续分析。

1.2.4 细胞转染 采用 PCR 扩增 CXCL1 的 cDNA, 构建 CXCL1 的过表达载体 pcDNA3.1-CXCL1, 以 pcDNA3.1 为对照。使用 Lipofectamine 3000 试剂将 pcDNA3.1-CXCL1 或 pcDNA3.1 转染各组细胞, 48 h 后进行后续操作。

1.2.5 qRT-PCR 检测 mRNA 表达 使用 TRIzol 试剂提取细胞中的总 RNA, 并使用 cDNA 链合成试剂盒合成 cDNA。使用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒在 ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 系统上进行 qRT-PCR。选择 GAPDH 作为内参。使用 2^{-ΔΔCt} 法计算 CXCL1 和 CXCR2 的相对表达水平。PCR 引物序列为: CXCL1 forward 5'-GGCAGGGATTCACTTCAAGA-3'; CXCL1 reverse 5'-ATCTTGAGCTCGGCAGTGT-3'; CXCR2 forward 5'-CGTTCTGGTGACTTTGCTGA-3'; CXCR2 reverse 5'-ACAGAGCAGGTGCTTCGATT-3'; GAPDH forward 5'-CGTTCTGGTGACTTTGCTGA-3'; GAPDH reverse 5'-ACAGAGCAGGTGCTTCGATT-3'。

1.2.6 Western blot 检测蛋白表达 使用 RIPA 裂解缓冲液裂解细胞。刮取细胞裂解物并在冰上培养 30 min, 以 13 000 r/min 的转速离心 10 min, 将上清液转移到透明管中。采用 BCA 蛋白定量分析试剂盒测量蛋白浓度, 蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳分离, 并转移至 PVDF 膜上。在室温下将膜在 5% 脱脂牛奶中封闭 1 h, 加入 TIE2 (1 : 1 000)、p-TIE2 (1 : 1 000)、CXCL1 (1 : 1 000)、CXCR2 (1 : 1 000)、p-CXCR2 (1 : 1 000) 和 GAPDH (1 : 1 000) 抗体在 4 °C 孵育过夜。用 TBST 清洗后, 将膜与辣根过氧化物酶结合的山羊抗兔 IgG (1 : 2 000) 孵育 1 h, TBST 清洗后使用高灵敏 ECL 发光检测试剂盒对膜进行显色, 并使用 Image J 6.0 软件进行分析。

1.2.7 MTT 检测细胞活力 将细胞以 5 × 10⁴ 个细胞/孔的密度接种在 96 孔板中, 在培养后 24、48 和 72 h 测量各组细胞的细胞活力。添加 20 μl MTT 溶液, 并在 37 °C 下培养 4 h。每孔补充 150 μl 二甲基亚砜。振荡混匀 10 min 后, 使用酶标仪在 570 nm 处测定吸光度值。

1.2.8 流式细胞术检测细胞凋亡 使用 ANNEXIN V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡率, 细胞计数后取 5 × 10⁶ 个细胞, 1 000 r/min 4 °C 离心 10 min, 弃上清液。加入 1 ml 预冷 PBS, 震荡使细胞悬浮, 1 000 r/min 4 °C 离心 10 min, 弃上清液(重复 3 次)。将细胞重悬于 200 μl Bindig Buffer, 加入 5 μl Annexin V-FITC 轻轻混匀, 避光反应 15 min, 加入 5 μl PI 和 400 μl PBS, 使用流式细胞仪进行检测。

1.2.9 p-CXCR2 免疫荧光细胞化学染色 SIR 作用 TIE2-L914F 细胞 48 h 后, 添加 rhCXCL1 作用 1 h, 加入 p-CXCR2 抗体和 Cy3 标记的荧光二抗进行标记, 4 °C 孵育过夜。使用荧光显微镜下观察并拍照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 21.0 进行统计学分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间数据的比较采用 *t* 检验, 多组间数据的比较采用单因素方差分析法, 进一步组内两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VM 血管内皮细胞模型的鉴定 与 Control 组相比, TIE2-L914F 组与 TIE2-WT 组细胞具有较高的 GFP 荧光强度和数量, 提示转染成功, 见图 1A。此外, qRT-PCR 检测结果(图 1B)显示 3 组细胞 TIE2 mRNA 表达存在差异($F = 165.4$, $P < 0.0001$)。相比于 Control 组, TIE2-WT 组和 TIE2-L914F 组中 TIE2 mRNA 水平增加($P = 0.0001$, $P < 0.0001$)。Western blot 检测结果(图 1C、D)显示, p-TIE2 在 3 组间的表达存在统计学差异($F = 75.00$, $P < 0.0001$)。与 Control 组比较, TIE2-WT 组、TIE2-L914F 组细胞中的 p-TIE2 蛋白表达水平增加($P = 0.0299$, $P < 0.0001$)且 TIE2-L914F 组 p-TIE2 水平最高。而

TIE2 在各组细胞中的蛋白表达水平无统计学差异($F = 0.026$, $P = 0.9743$)。与 Control 组比较, TIE2-L914F 组细胞在 72 h 时的细胞增殖活力增强($P = 0.0263$), 见图 1E。

2.2 SIR 对 VM 血管内皮细胞增殖、凋亡的影响 MTT 实验检测数据显示 TIE2-L914F 细胞活力在 SIR 处理后受到抑制($P < 0.05$) (图 2A)。流式细胞术检测数据表明, 与 TIE2-L914F 组相比, TIE2-L914F + SIR 组细胞的凋亡率升高($t = 13.11$, $P = 0.0002$) (图 2B、C)。

2.3 SIR 对 CXCL1 表达的影响 qRT-PCR 检测结果显示, 与 TIE2-L914F 组相比, CXCL1 在 TIE2-L914F + SIR 组细胞中的 mRNA 表达水平降低($t = 4.813$, $P = 0.0086$) (图 3A)。Western blot 检测数

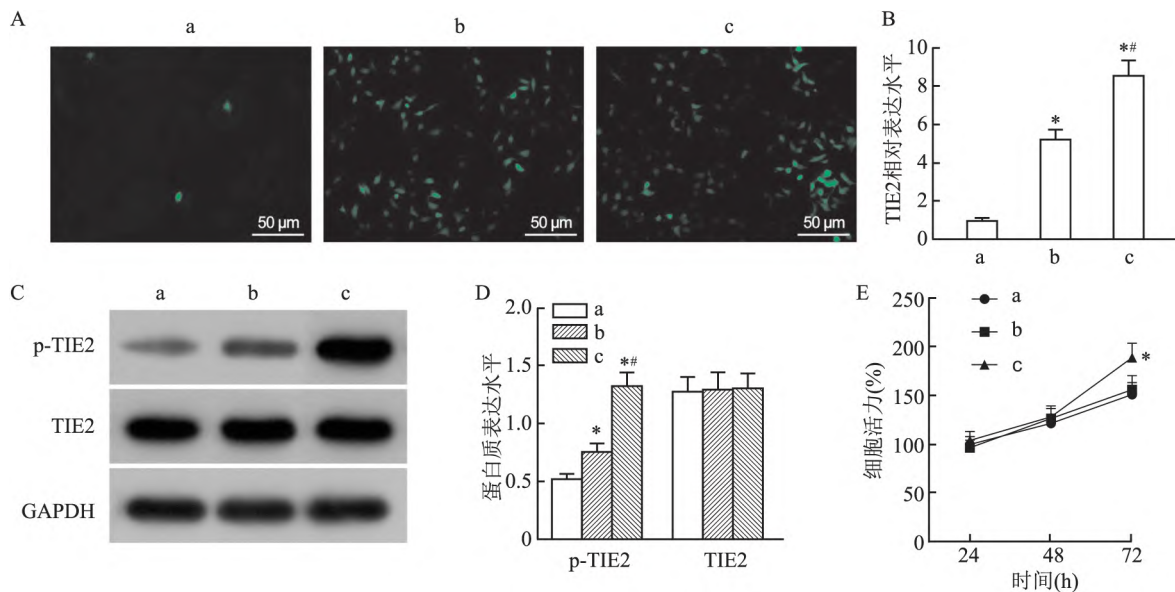


图1 VM 血管内皮细胞模型的鉴定

A: GFP 荧光检测图 $\times 200$; B: qRT-PCR 检测 TIE2 的 mRNA 在各组细胞中的表达水平; C: Western blot 检测蛋白表达水平灰带图; D: Western blot 检测蛋白表达水平直方图; E: MTT 检测结果; a: Control 组; b: TIE2-WT 组; c: TIE2-L914F 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 TIE2-WT 组比较: # $P < 0.05$

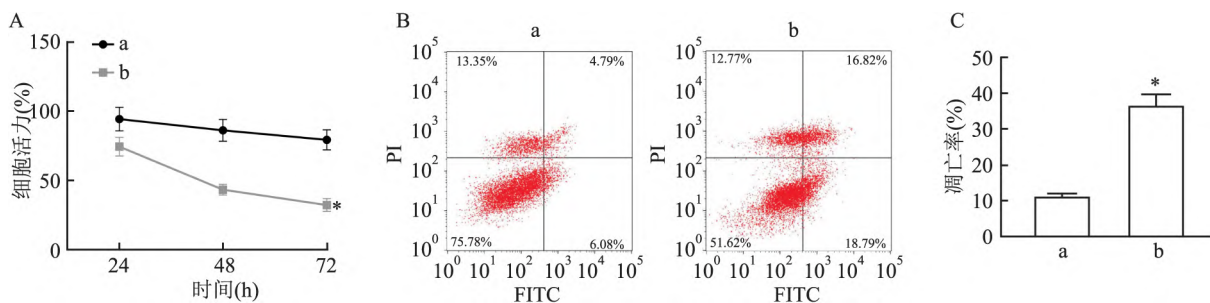


图2 SIR 对 VM 血管内皮细胞增殖和凋亡的影响

A: MTT 法检测细胞增殖活力; B: 流式细胞术检测细胞凋亡率; C: 各组细胞凋亡率直方图; a: TIE2-L914F 组; b: TIE2-L914F + SIR 组; 与 TIE2-L914F 组比较: * $P < 0.05$

据表明, CXCL1 在 TIE2-L914F + SIR 组细胞中的蛋白表达水平低于 TIE2-L914F 组 ($t = 6.788$, $P = 0.0025$) (图 3B、C)。

2.4 SIR 可逆转 CXCL1 对 VM 血管内皮细胞增殖和凋亡的影响 qRT-PCR 数据显示, 与 TIE2-L914F + pcDNA3.1 组比较, TIE2-L914F + pcDNA3.1-CXCL1 组细胞中的 CXCL1 表达升高, 加入 SIR 后 CXCL1 的 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$) (图 4A)。MTT 和流式细胞术实验结果显示, 与 TIE2-L914F + pcDNA3.1 组比较, TIE2-L914F + pcDNA3.1-CXCL1 组细胞增殖活力提高, 凋亡率降低, 而相比于 TIE2-L914F + pcDNA3.1-CXCL1 组, TIE2-L914F + pcDNA3.1-CXCL1 + SIR 组细胞增殖活力降低, 凋亡率增强 ($P < 0.05$) (图 4B ~ D)。

2.5 SIR 对 VM 血管内皮细胞中 CXCR2 mRNA 和蛋白表达的影响 qRT-PCR 检测数据显示, 与 TIE2-L914F 组比较, TIE2-L914F + SIR 组细胞 CXCR2 的 mRNA 表达降低 ($t = 5.248$, $P = 0.0063$) (图 5A)。此外, 对 SIR 单独处理和 SIR 与 rhCXCL1 联合处理的 TIE2-L914F 细胞进行 p-CXCR2 的免疫荧光染色, 结果显示 rhCXCL1 的加入不能完全逆转 SIR 对 CXCR2 的抑制 ($P < 0.05$) (图 5B)。Western blot 检测数据显示, p-CXCR2 的蛋白表达水平, TIE2-L914F + SIR 组低于 TIE2-L914F 组 ($P < 0.05$), TIE2-L914F + SIR + rhCXCL1 组高于 TIE2-L914F + SIR 组 ($P < 0.05$), 而各组 CXCR2 的总蛋白表达水平无统计学差异 (图 5C、D)。

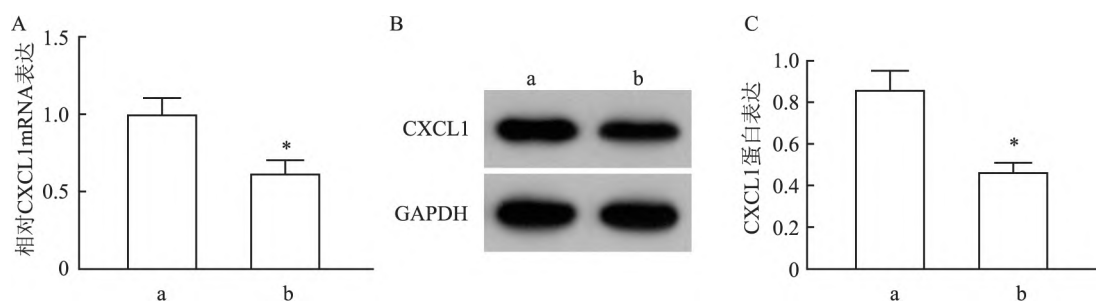


图3 SIR对CXCL1表达的影响

A: qRT-PCR 检测 TIE2 在各组细胞中的表达水平; B: Western blot 检测 CXCL1 的蛋白表达水平; C: Western blot 检测 CXCL1 蛋白表达的直方图; a: TIE2-L914F 组; b: TIE2-L914F + SIR 组; 与 TIE2-L914F 组比较: * $P < 0.05$

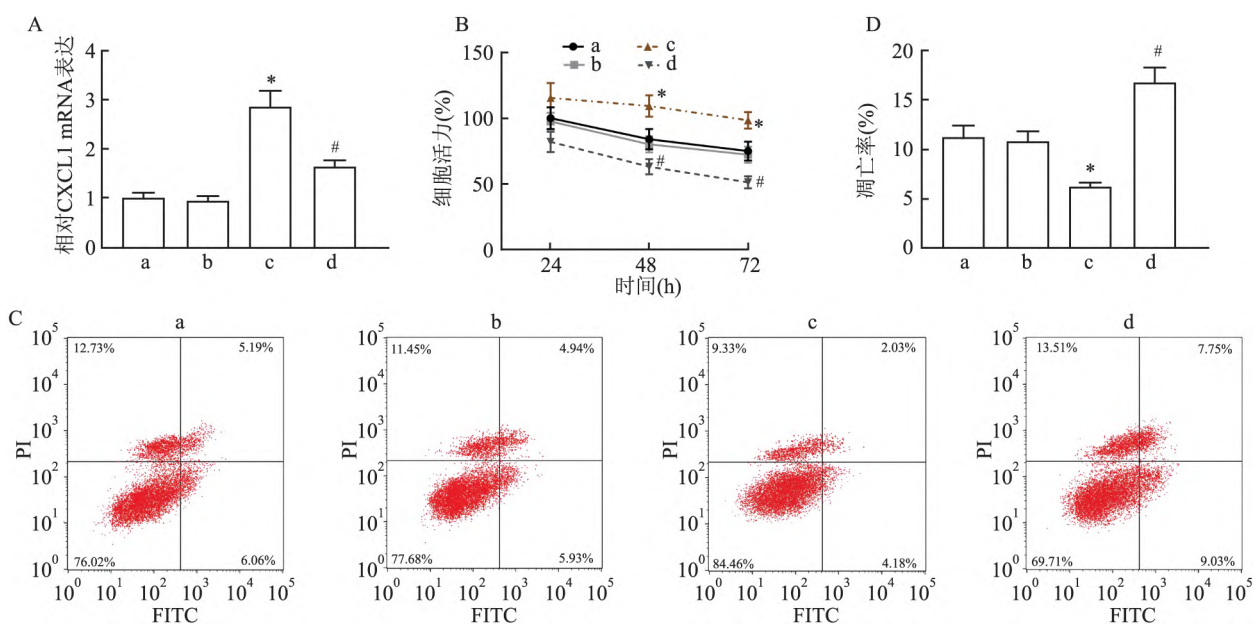


图4 SIR可逆转CXCL1对VM血管内皮细胞增殖和凋亡的调控作用

A: qRT-PCR 检测 CXCL1 在各组细胞中的表达水平; B: MTT 法检测细胞增殖活力; C: 流式细胞术检测各组细胞凋亡; D: 各组细胞凋亡率直方图; a: TIE2-L914F 组; b: TIE2-L914F + pcDNA3.1 组; c: TIE2-L914F + pcDNA3.1-CXCL1 组; d: TIE2-L914F + pcDNA3.1-CXCL1 + SIR 组; 与 TIE2-L914F 组比较: * $P < 0.05$; 与 TIE2-L914F + pcDNA3.1-CXCL1 组比较: # $P < 0.05$

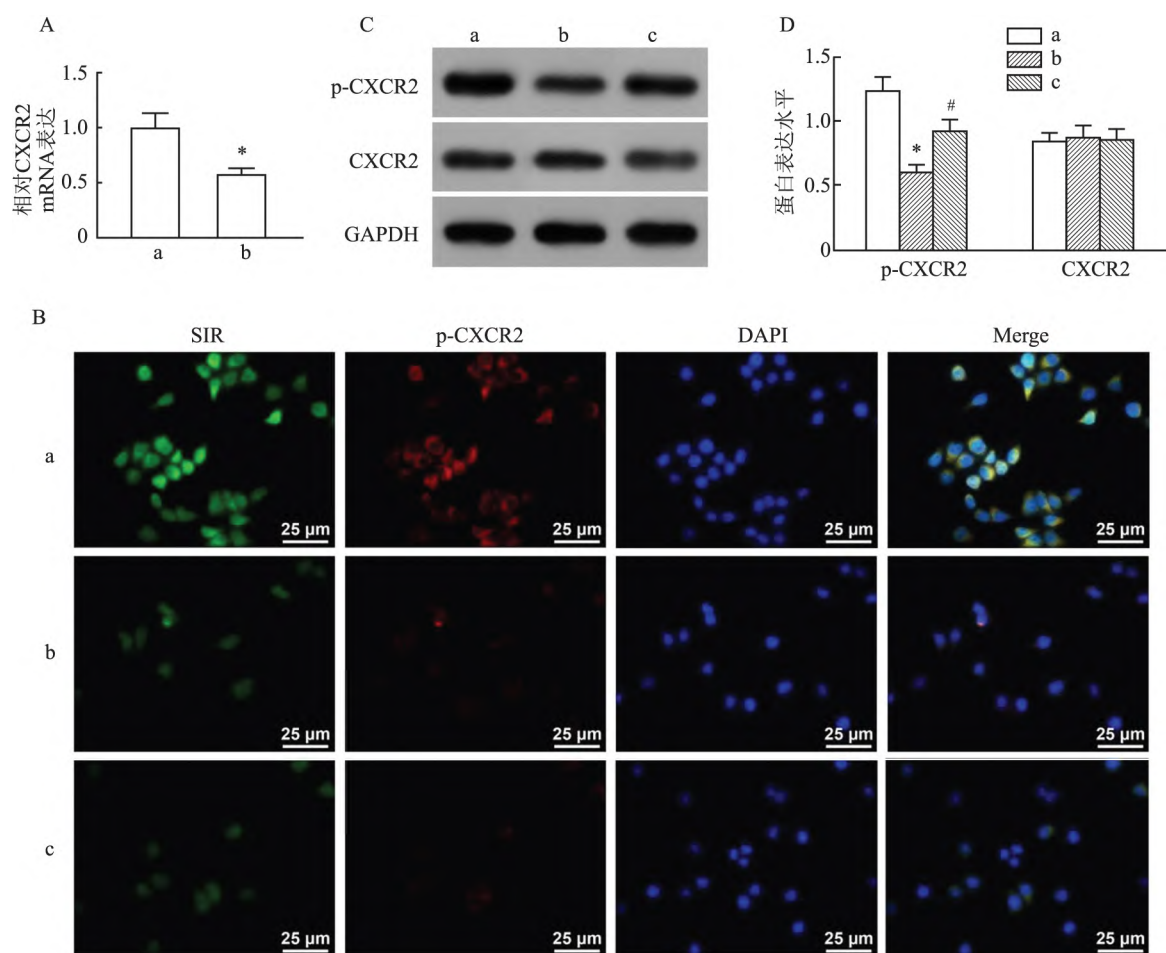


图5 SIR对VM血管内皮细胞中CXCR2表达的影响

A: qRT-PCR 检测 CXCR2 在各组细胞中的表达水平; B: 免疫荧光化学染色法检测各组细胞 p-CXCR2 的表达 $\times 400$; C: Western blot 检测各组细胞 p-CXCR2 的表达的灰带图; D: Western blot 检测各组细胞 p-CXCR2 蛋白表达的直方图; a: TIE2-L914F 组; b: TIE2-L914F + SIR 组; c: TIE2-L914F + SIR + rhCXCL1 组; 与 TIE2-L914F 组比较: * $P < 0.05$; 与 TIE2-L914F + SIR 组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

本研究结果显示 SIR 在 TIE2-L914F 突变导致的 VM 中发挥保护作用, CXCL1 能够促进 VM 血管内皮细胞增殖, 抑制细胞凋亡但该作用被 SIR 逆转, 此外 SIR 能够抑制 CXCL1 及其同源配体 CXCR2 的表达, 本研究为 VM 的发病机制和治疗提供了新的思路。

既往研究^[9]表明, 大多数 VM 与内皮细胞酪氨酸激酶受体 TIE2 的激活突变 L914F 有关, TIE2 基因突变导致非配体依赖性的 TIE2 受体过度磷酸化加速了 VM 的发生。而通过 p-TIE2 鉴定 VM 血管内皮细胞模型已被应用于众多研究中^[3, 5]。此外, TIE2 突变导致的 VM 其内皮细胞存在局部增生, 表现在细胞模型上细胞活力增加, 在以往的研究中有体现^[10]。本研究通过 Western blot 检测显示 TIE2-L914F 细胞中 p-TIE2 的表达较 Control 组增强,

TIE2-L914F 组细胞活力也增加, 提示 VM 体外细胞模型构建成功。

SIR 在临床试验中被报道为一种有效治疗癌症、血管再狭窄和器官移植后免疫排斥反应的药物^[11]。此外, SIR 对 VM 的治疗也取得了初步进展^[12]。MTT 和流式细胞术实验结果显示, TIE2-L914F 细胞活力在 SIR 处理后受到抑制, 凋亡增加, 这表明 SIR 对 VM 血管内皮细胞的恶性行为具有抑制作用。

CXCL1 属于趋化因子家族, 以往研究^[13]表明其在肿瘤的生长、增殖、血管生成等过程中发挥重要作用。也有研究^[8]表明 CXCL1 在脑动静脉畸形患者临床标本中表达增强。此外关于血管瘤的研究^[14]表明, CXCL1 在婴幼儿血管瘤组织中表达增强, 且 CXCL1 过表达能够促进血管瘤干细胞增殖。本研究通过干预 VM 血管内皮细胞模型中 CXCL1 的表达显示, 过表达 CXCL1 能够促进 TIE2-L914F 突变

诱导的 VM 血管内皮细胞模型的增殖,抑制 VM 血管内皮细胞模型凋亡,但加入 SIR 后上述情况被逆转。qRT-PCR 和 Western blot 检测结果显示 SIR 能够抑制 CXCL1 的表达,这也进一步揭示了 SIR 在 VM 血管内皮细胞模型中的保护作用与抑制 CXCL1 的表达有关。CXCR2 是 CXCL1 的同源受体, CXCL1/CXCR2 被证实参与了多种疾病进程,如其在脑损伤后的促炎小胶质细胞中活化^[15]。另外也有研究表明 SIR 可降低 CXCL1/CXCR2 在人角质形成细胞和皮肤鳞状细胞癌中的表达^[16]。本研究数据显示, CXCR2 在 VM 血管内皮细胞中的表达经 SIR 处理后降低, rhCXCL1 并不能逆转 SIR 对 CXCR2 表达的抑制作用。提示 SIR 能够直接抑制 CXCL1/CXCR2 的表达。

参考文献

- [1] 宋佩键, 张 华. 头颈部静脉畸形研究进展[J]. 国际耳鼻咽喉头颈外科杂志 2022 46(1): 49-53.
- [2] Boscolo E, Limaye N, Huang L, et al. Rapamycin improves TIE2-mutated venous malformation in murine model and human subjects[J]. J Clin Invest, 2015, 125(9): 3491-504.
- [3] Li X, Cai Y, Goines J, et al. Ponatinib combined with rapamycin causes regression of murine venous malformation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019, 39(3): 496-512.
- [4] Si Y, Chu H, Zhu W, et al. Concentration-dependent effects of rapamycin on proliferation, migration and apoptosis of endothelial cells in human venous malformation[J]. Exp Ther Med, 2018, 16(6): 4595-601.
- [5] 周婷茹, 杨 静, 段 瑞, 等. 平阳霉素对静脉畸形细胞增殖及凋亡的作用研究[J]. 临床口腔医学杂志 2020 36(9): 527-32.
- [6] 郑家伟. 西罗莫司治疗静脉畸形研究现状[J]. 中国口腔颌面外科杂志 2020 18(6): 553-8.
- [7] Silva R L, Lopes A H, Guimarães R M, et al. CXCL1/CXCR2 signaling in pathological pain: role in peripheral and central sensitization[J]. Neurobiol Dis, 2017, 105: 109-16.
- [8] Takagi Y, Aoki T, Takahashi J C, et al. Differential gene expression in relation to the clinical characteristics of human brain arteriovenous malformations[J]. Neurol Med Chir (Tokyo), 2014, 54(3): 163-75.
- [9] Kennedy M A, Xu Z, Wu Y, et al. A Tie2 kinase mutation causing venous malformations increases phosphorylation rates and enhances cooperativity[J]. BiochemBiophys Res Commun, 2019, 509(4): 898-902.
- [10] Si Y, Huang J, Li X, et al. AKT/FOXO1 axis links cross-talking of endothelial cell and pericyte in TIE2-mutated venous malformations[J]. Cell Commun Signal, 2020, 18(1): 139.
- [11] Dasari T W, Patel B, Saucedo J F. Systematic review of effectiveness of oral sirolimus after bare-metal stenting of coronary arteries for prevention of in-stent restenosis[J]. Am J Cardiol, 2013, 112(9): 1322-7.
- [12] Rössler J, Baselga E, Davila V, et al. Severe adverse events during sirolimus "off-label" therapy for vascular anomalies[J]. Pediatr Blood Cancer, 2021, 68(8): e28936.
- [13] Zhuo C, Ruan Q, Zhao X, et al. CXCL1 promotes colon cancer progression through activation of NF- κ B/P300 signaling pathway[J]. Biol Direct, 2022, 17(1): 34.
- [14] 翟晓玥, 吴 瑶, 娄 寅, 等. 趋化因子 CXCL1 在增殖期婴幼儿血管瘤组织中表达研究及外源性 CXCL1 对血管瘤干细胞的影响[J]. 安徽医科大学学报 2022 57(9): 1385-8.
- [15] Serdar M, Kempe K, Herrmann R, et al. Involvement of CXCL1/CXCR2 during microglia activation following inflammation-sensitized hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats[J]. Front Neurol, 2020, 11: 540878.
- [16] Schaper-Gerhardt K, Hansel A, Walter A, et al. Sirolimus diminishes the expression of GRO- α (CXCL1)/CXCR2 axis in human keratinocytes and cutaneous squamous cell carcinoma cells[J]. J Dermatol Sci, 2021, 104(1): 30-8.

Effects of sirolimus on cell proliferation and apoptosis of vascular endothelial cells of venous malformation induced by TIE2-L914F mutation and its mechanism *in vitro*

Shi Lei¹, Sun Yuanyuan¹, Gan Lu², Wang Xinjing³, Wang Haibao¹

(¹Dept of Radiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Radiology, Huainan Oriental Hospital Group General Hospital, Huainan 232038;

³Dept of Radiology, Anhui Maternal and Child Health Hospital, Hefei 230001)

Abstract Objective The purpose of this study was to investigate the effects of sirolimus (SIR) on proliferation and apoptosis of vascular endothelial cells of venous malformation (VM) caused by mutations in TIE2-L914F and its potential molecular mechanism. **Methods** The expression of TEK receptor tyrosine kinase (TIE2) in human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) was interfered to construct vascular endothelial cells of VM model (TIE2-

网络出版时间: 2023-03-28 15:09:57 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20230328.1031.007.html>

ASIC1 基因敲除对佐剂性关节炎小鼠关节软骨损伤的影响

代贝贝¹, 祖胜芹², 周仁鹏², 陈飞虎²

摘要 目的 利用 ASIC1 基因敲除小鼠构建佐剂性关节炎(AA)模型,探讨敲除 ASIC1 对关节炎发病程度及关节软骨损伤的影响。方法 将野生型小鼠和基因敲除小鼠分别分为:正常组、模型组。通过观察足爪炎症情况进行关节炎评分,并测定继发侧足爪肿胀度;通过 HE 染色、免疫组化、TUNEL 法、ELISA 法检测关节软骨损伤及关节炎炎症情况。结果 基因敲除小鼠模型组的关节炎评分及足爪肿胀度低于野生型小鼠模型组;HE 结果显示敲除 ASIC1 可减轻 AA 小鼠关节软骨的破坏情况;免疫组化结果显示敲除 ASIC1 可提高 AA 小鼠关节软骨中 II 型胶原的表达;TUNEL 法结果显示基因敲除小鼠模型组中软骨细胞的凋亡水平低于野生型小鼠模型组;ELISA 法结果表明,敲除 ASIC1 可下调 AA 小鼠血清中高表达的促炎细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 的水平。结论 敲除 ASIC1 可降低佐剂性关节炎发病程度及关节软骨的破坏水平。

关键词 ASIC1; 佐剂性关节炎; 关节软骨; 类风湿性关节炎中图分类号 R-332

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)04-0567-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.04.008

2023-02-13 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81672127)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院药剂科, 国家中医药管理局

中药化学三级实验室, 合肥 230022

² 安徽医科大学药学院, 合肥 230032

作者简介: 代贝贝, 女, 硕士研究生;

陈飞虎, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: cffchina@sohu.com

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种系统性自身免疫性疾病,主要病理特点为滑膜增生、炎性细胞浸润、血管翳的形成,进而引起关节软骨、周围韧带及骨组织的破坏^[1]。酸敏感离子通道(acid-sensing ion channels, ASICs)是一类由胞外酸化所激活的阳离子通道,属于上皮钠通道 ENaC/退化因子基因 DEG 通道家族成员之一,目前为止已克隆出了由 4 个基因编码的 7 个 ASICs 亚基^[2],它广泛地存在于中枢和外周感觉神经系统。据文献^[3]报道,RA 患者的关节滑液中的 pH 值最低可降至 5.5,酸性的环境对关节软骨的代谢和损伤具有重要影响。课题组前期研究^[4]表明,在佐剂性关节炎(adjutant arthritis, AA)大鼠关节软骨中 ASIC1a 表达增强,抑制 ASIC1a 的表达能明显升高软骨细胞外基质成分 II 型胶原和蛋白多糖表达量。

为进一步探讨 ASICs 在关节炎发生发展中的作用,该研究利用基因敲除小鼠建立 AA 动物模型,观察体内敲除 ASIC1 对关节炎发病程度及关节软骨破坏的影响,增加对 ASICs 的认识。

1 材料与方法

1.1 动物 ASIC1 基因敲除小鼠购自上海吉凯基因化学技术有限公司,利用 CRISPR (clusters of regularly interspaced short palindromic repeats) / Cas9 技术获得,许可证号: SCXK (沪) 011-0031,无特定病原

L914F group)。Subsequently part of vascular endothelial cells of VM was exposed to 1 000 ng/ml SIR for 48 h (TIE2-L914F + SIR group), and the proliferation and apoptosis of vascular endothelial cells of VM were detected by MTT and flow cytometry. The mRNA and protein expressions of CXCL1 and CXCR2 were detected by qRT-PCR and Western blot. **Results** Compared with the cells in TIE2-L914F group, the proliferation activity of the cells in TIE2-L914F + SIR group was inhibited, and the apoptosis rate increased ($P < 0.05$). The expression of CXCL1 increased in TIE2-L914F cells but decreased after SIR treatment ($P < 0.05$). Compared with TIE2-L914F + pcDNA3.1 group, the cell proliferation activity increased but apoptosis rate decreased in TIE2-L914F + pcDNA-CXCL1 group. Compared with TIE2-L914F + pcDNA-CXCL1 group, cell proliferation activity was inhibited but apoptosis rate increased in TIE2-L914F + pcDNA-CXCL1 + SIR Group ($P < 0.05$). In addition, compared with TIE2-L914F group, CXCR2 expression decreased in TIE2-L914F + SIR group ($P < 0.05$). **Conclusion** SIR inhibits VM cell proliferation, induces cell apoptosis of vascular endothelial cells of VM, and inhibits the expression of CXCL1/CXCR2.

Key words sirolimus; CXCL1/CXCR2; venous malformation; proliferation; apoptosis