

# 等离子体激活液对血管瘤内皮细胞增殖与凋亡作用及相关机制

张晨晨 杨兴宇 高 静 王伶俐 赵 军 夏传开 吕永梅 杨春俊

**摘要** 目的 观察等离子体激活液(PAS)对血管瘤内皮细胞(HemECs)的增殖和凋亡作用,并对相关机制进行探讨。方法 低温等离子体(CAP)分别辐照磷酸盐缓冲液(PBS)10、20、30、40、50 s形成PAS,以处理时间为0 s的PBS为对照组。电子pH计和试剂盒分别检测PAS的pH值和活性介质浓度;CCK-8法检测细胞增殖情况;流式细胞术检测细胞凋亡情况;DCFH-DA荧光标记细胞内活性氧(ROS)变化;蛋白免疫印迹检测细胞中蛋白激酶B(AKT)、磷酸化AKT(p-AKT)、磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)、磷酸化PI3K(p-PI3K)蛋白的表达量。结果 与对照组相比,PAS中的pH值呈剂量依赖性降低,而溶液中的活性介质 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和 $\text{O}_3$ 的浓度逐渐升高;与对照组相比,PAS显著提高了HemECs细胞内ROS水平,抑制其增殖,并促进凋亡;与对照组相比,PAS处理10 s时AKT的磷酸化水平变化不明显,但在CAP处理时间增加至20~50 s后,AKT的磷酸化水平迅速降低,而PI3K磷酸化水平变化不明显。结论 PAS对HemECs细胞具有抑制增殖和促进凋亡的作用,这种作用与细胞内ROS的升高和AKT磷酸化水平的下调相关。

**关键词** 低温等离子体;等离子体激活液;HemECs;活性氧  
中图分类号 R 758.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)12-1944-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.12.018

婴儿血管瘤(infantile hemangioma, IH)是婴儿常见的良性肿瘤,由胚胎期血管组织增生形成的,以血管内皮细胞异常增生为特点,发生于皮肤及软组织的良性肿瘤<sup>[1]</sup>。常用的治疗方法有冷冻、激光、口服普萘洛尔、局部注射抗细胞增生性药物等<sup>[2]</sup>,但是这些疗效并不满意,且存在严重不良反应,寻找

新的安全高效的治疗手段仍是IH治疗中需要解决的问题。

等离子体是除固体、液体和气体外物质的第4种状态,是由气体在高电压环境下被离子化后产生的包含分子、原子、离子、电子、光子和活性物质等组成的一种混合存在形式<sup>[3]</sup>。低温等离子体(cold atmospheric plasma, CAP)因其温度接近正常人体温度,有效杀灭病原微生物、促进伤口愈合和抑制体内外癌细胞而受到越来越多的关注<sup>[4]</sup>。尤其是等离子体激活液(plasma-activated solution, PAS)可以选择性抑制癌细胞增生,使得人们对PAS未来应用于恶性肿瘤的治疗充满了期待<sup>[5]</sup>。该研究探讨PAS对体外培养的血管瘤内皮细胞(hemangioma endothelial cells, HemECs)的抑制效应及机制。

## 1 材料与方法

**1.1 主要材料** HemECs细胞(上海青旗公司)。磷酸盐缓冲液(PBS)、高糖DMEM培养基(美国HyClone公司)、胎牛血清(澳大利亚Gibco公司)、AKT抗体、PI3K抗体、p-AKT抗体、p-PI3K抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(美国Affinity公司)、 $\text{NO}_3^-$ 试剂盒、 $\text{O}_3$ 试剂盒、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 试剂盒(德国MERCCK公司)、胰蛋白酶、CCK-8试剂盒、细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)、Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒(上海贝博公司)。流式细胞仪(美国BD Biosciences公司)、荧光酶标仪(美国Molecular Devices公司)。

**1.2 HemECs细胞培养** 将HemECs细胞置于含有10%胎牛血清的高糖DMEM培养基中,在含有5%  $\text{CO}_2$ 、温度为37℃的细胞培养箱中培养。细胞长至70%~80%时传代,用0.25%胰蛋白酶消化,按1:3的比例传代。

**1.3 PAS的制备** 该研究中使用的DBD等离子体发生装置由中国科学院等离子体物理研究所开发和设计。该DBD装置主要包括3部分:交流电源,面

2021-08-31 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81201226);安徽医科大学第二附属医院临床研究培育计划项目(编号:2020LCZD21);安徽医科大学校级科研基金项目(编号:2018xkj040)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院皮肤科,合肥 230601

作者简介:张晨晨,男,硕士研究生;

吕永梅,女,副主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: yongmei\_lv830@163.com;

杨春俊,男,副教授,博士生导师,责任作者,E-mail: yangchunjun9@163.com

式正极和接地负极。吸取 4.0 ml PBS 于小培养皿 ( $\phi$  35 mm) 中,水平放置在正负极中间。调整正极高度,距液面 5 mm。开启 DBD 装置电源,调整输入电压电流参数(45.0 V, 2.0 A),进行辐照处理,同时使用计时器记录暴露时间。使用 CAP 设备对 PBS 分别进行 10、20、30、40、50 s 的处理。等离子体活化液的剂量定义为在相同的放电参数下不同的处理时间。将制备好的活化溶液放入冰水浴或在 4 °C 存放。

#### 1.4 PAS 中 pH 值及 ROS 和活性氮(reactive nitrogen species, RNS) 物质浓度的测定

**1.4.1 pH 值** 取制备好的 PAS 溶液 2 ml 置于试管中,将校准好的电子 pH 计探针完全浸入液面以下,静置 10 min 后,待屏幕读数稳定后读取并记录。重复 3 次取均值。

**1.4.2  $\text{NO}_3^-$  浓度** 按照说明书,从  $\text{NO}_3^-$  检测试剂盒中,取 4.0 ml 的 1 号液放入试管中。然后吸取 0.50 ml 制备好的 PAS 加入试管中,不混匀。再吸取试剂盒中的 2 号液 0.50 ml 加入试管中,混匀。混匀后静置 10 min,取混合液于检测管中,于分光光度计中检测,读取结果并记录。重复 3 次取均值。

**1.4.3  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度** 按照说明书,从  $\text{H}_2\text{O}_2$  检测试剂盒中取 0.50 ml 的 1 号液加入试管中,然后吸取 8.0 ml 制备好的 PAS 加入试管中,混匀。再加入 2 号液 0.50 ml,混匀后静置 10 min。取混合液于检测管中,于分光光度计中检测,读取结果并记录。重复 3 次取均值。

**1.4.4  $\text{O}_3$  浓度** 按照说明书,取 10 ml 制备好的 PAS 加入试管中,向试管中加入 2 滴  $\text{O}_3$  检测试剂盒的 1 号液,混匀。加入 2 号粉末试剂 1 勺(试剂盒自带小勺)。摇匀后静置 3 min。取混合液于检测管中,于分光光度计中检测,读取结果并记录。重复 3 次取均值。

**1.5 CCK-8 法检测细胞增殖能力** 将 HemECs 细胞以每孔 8 000 个细胞的密度接种于 96 孔微量培养板中,并在含有 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基中培养至贴壁,PAS 处理 HemECs 细胞 1 h 后,弃去 PAS。加入培养基继续培养 24 h 后,每孔中加入 10  $\mu\text{l}$  的 CCK-8 试剂,1 h 后分光光度计在 450 nm 处测定吸光度(optical density, OD) 值。

**1.6 流式细胞术检测细胞凋亡** 将 HemECs 细胞接种于 6 孔板中,培养至贴壁,PAS 孵育 1 h。弃去 PAS,替换新鲜培养基继续培养 24 h。收集细胞用于染色。将细胞悬浮在 Annexin V 结合液中。随

后,加入 5  $\mu\text{l}$  Annexin V-FITC 染色液,混匀后避光孵育 15 min,然后加入 10  $\mu\text{l}$  PI 染色液,28 °C 避光孵育 5 min。流式细胞仪上机检测,使用 FlowJo-V10 软件用于数据的分析及作图。

**1.7 DCFH-DA 荧光标记细胞内 ROS 水平** 将处于对数生长期的 HemECs 细胞接种在 96 孔培养板上,每孔 10 000 个细胞,培养至贴壁。将细胞装载荧光探针 DCFH-DA, PAS 孵育 1 h 后,荧光酶标仪在激发波长为 488 nm 和发射波长为 525 nm 下检测荧光,计算细胞内 ROS 水平。

**1.8 蛋白免疫印迹法检测凋亡蛋白** 收集细胞,加入 RIPA 裂解液提取细胞中的蛋白,BCA 试剂盒检测提取的蛋白浓度。选择 8% 分离胶和 5% 浓缩胶进行电泳,蛋白转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉中室温封闭 1.5 h 后, TBST 溶液洗膜,与 AKT(1 : 1 000)、PI3K(1 : 1 000)、p-Akt(1 : 1 000) 和 p-PI3K(1 : 1 000) 单克隆抗体 4 °C 孵育过夜,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 溶液(1 : 5 000) 室温孵育 60 min,底物化学发光法显影。

**1.9 统计学处理** 采用 GraphPad Prism 6.0 统计软件进行数据分析。所有实验重复 3 次以上,数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。组间两两比较用单因素方差分析(One-way ANOVA),以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 PBS 在 DBD 的作用下 pH 值以及主要活性物质的变化** CAP 分别处理 PBS 10、20、30、40、50 s 后,与对照组相比,PAS 的 pH 值呈下降趋势,具有剂量依赖性,差异均有统计学意义( $F = 29.79$ ,  $P < 0.05$ )。在实验选择的处理时间内,pH 值均在 6 以上,见图 1。随着 DBD 处理时间的增加,PBS 中  $\text{NO}_3^-$ 、

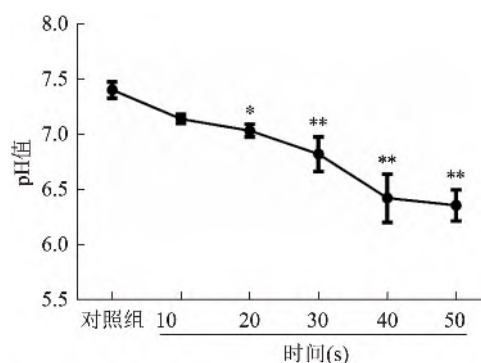


图1 PAS 中 pH 值的变化  
与对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 O<sub>3</sub> 这 3 种主要活性物质浓度均呈剂量依赖性上升,差异均有统计学意义( $F = 130.7、153.4、26.77 P < 0.05$ ),其中,当 DBD 处理时间为 50 s 时,溶液中 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 O<sub>3</sub> 的浓度最高,分别为 (12.13 ± 0.40)、(13.50 ± 1.21)、(0.21 ± 0.02) mg/L。见图 2~4。

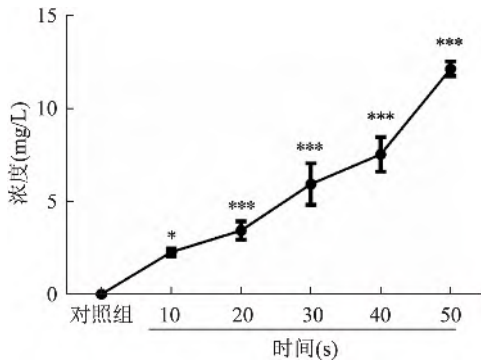


图 2 PAS 中 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的浓度变化  
与对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$

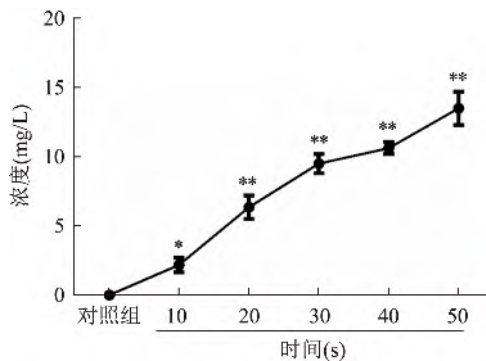


图 3 PAS 中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的浓度变化  
与对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

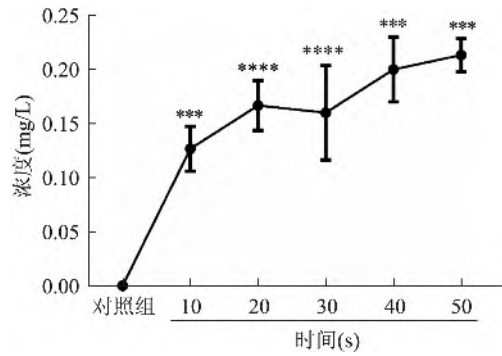


图 4 PAS 中 O<sub>3</sub> 的浓度变化  
与对照组比较: \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$

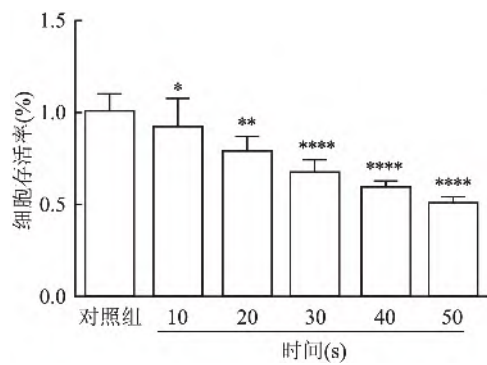


图 5 PAS 对 HemECs 细胞增殖的影响  
与对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$

**2.2 PAS 抑制 HemECs 细胞增殖** CCK-8 法检测结果显示,与对照组相比,不同 DBD 处理时间的 PAS 溶液对 HemECs 细胞均具有一定细胞毒性作用。CAP 处理 10 s 时 HemECs 细胞的抑制率仅为 (92.08 ± 0.15)%,CAP 处理 50 s 时 HemECs 细胞的抑制率为(50.10 ± 0.04)%。随着 CAP 处理时间的增加,对 HemECs 细胞增殖的抑制作用逐渐增强,并且具有剂量依赖性,差异均有统计学意义( $F = 25.41 P < 0.05$ )。见图 5。

**2.3 PAS 促进 HemECs 细胞凋亡** 流式细胞仪分析每组细胞凋亡率 结果显示,DBD 处理时间为 10、20、30、40、50 s 的 PAS 对 HemECs 细胞的凋亡率分别为(9.28 ± 2.75)%、(28.79 ± 6.88)%、(64.67 ± 10.44)%、(72.53 ± 4.69)%和(86.93 ± 3.23)%，

而对照组凋亡率为(4.56 ± 2.52)%。与对照组相比,CAP 处理时间为 10 s 时,对 HemECs 细胞有促进凋亡作用,但差异无统计学意义( $P = 0.9112$ );其余实验组对 HemECs 细胞均具有促进凋亡的作用,且具有剂量依赖性,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 6。

**2.4 PAS 以剂量依赖的方式升高细胞内 ROS 水平** 与对照组相比,不同 DBD 处理时间的 PAS 均能提升 HemECs 细胞中 ROS 水平,且具有剂量依赖性。CAP 处理 10 s 时 HemECs 细胞的 ROS 相对表达水平变化不大,仅为(136.9 ± 1.3)%( $P = 0.76$ );CAP 处理时间从 20 s 提升至 50 s 时,HemECs 细胞中 ROS 相对表达水平提升明显,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 7。

**2.5 PAS 对 HemECs 细胞中 PI3K/AKT 通路的影响** Western blot 结果显示,与对照组相比,CAP 处理 10 s 时,HemECs 细胞中 AKT 的磷酸化水平变化不明显,处理时间增加至 20、30、40、50 s 后,AKT 的磷酸化水平迅速降低;另一方面,PI3K 的磷酸化水平变化则不显著。见图 8。

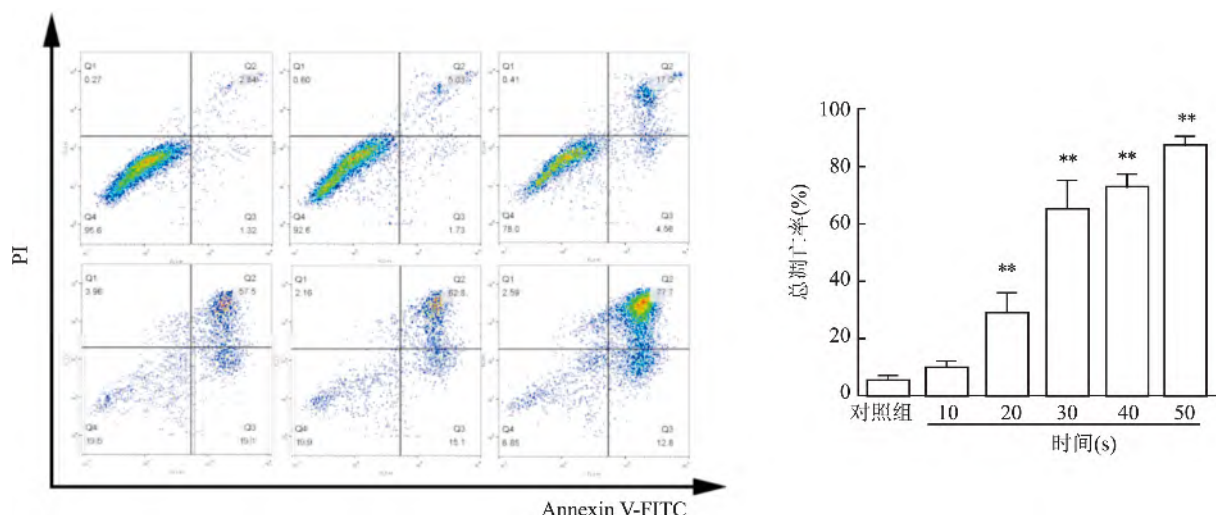


图6 PAS对HemECs细胞总凋亡率的影响  
与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

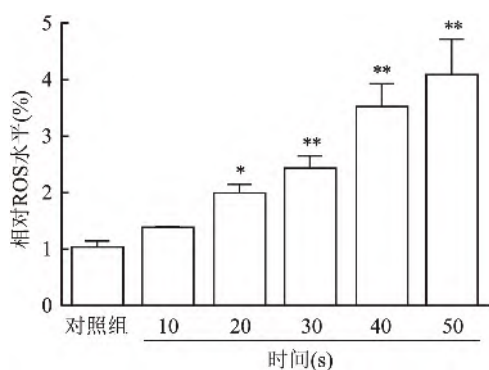


图7 PAS对HemECs细胞中相对ROS水平影响  
与对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

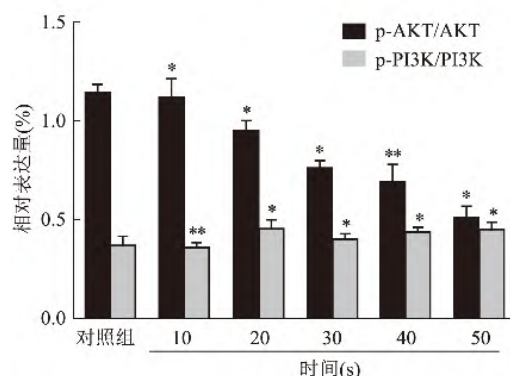
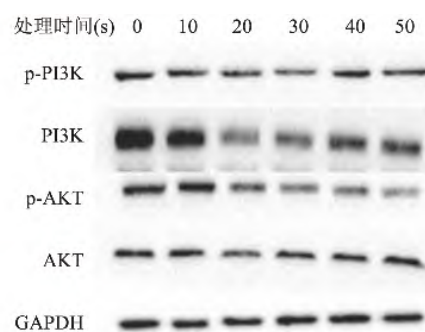


图8 PAS处理后HemECs细胞中AKT、p-AKT、PI3K和p-PI3K的相对表达量  
与对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

### 3 讨论

近年来由于CAP强大的抑制恶性肿瘤细胞增殖能力而受到广泛重视,已经在体外对包括骨肉瘤<sup>[6]</sup>、胰腺癌<sup>[7]</sup>和恶性黑素瘤<sup>[8]</sup>等多种肿瘤细胞进行了研究,均提示有良好的抑制效果。该团队早期对皮肤基底细胞癌和鳞状细胞癌进行了直接CAP和PAS的体外处理,也显示出良好的抑制效应<sup>[3,9]</sup>。增殖期血管瘤内皮细胞与肿瘤细胞有类似的生物学活性,因此,猜测PAS对增殖期血管瘤内皮细胞具有同样的抑制效果。

该研究选择PBS作为底物,采用DBD装置处理PBS获得不同处理时间的PAS作为不同的剂量,在体外进行HemECs细胞作用研究。结果提示PBS中的pH值随着CAP处理时间的增加不断下降,50s时pH值下降至6左右,而此时的pH值仍然是可接受的变化。随着CAP处理时间的增加,溶液中 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和 $\text{O}_3$ 活性介质的浓度也在提高,对细

胞的抑制作用也在增强,这可能与溶液中ROS和RNS的浓度有关。有研究<sup>[10]</sup>表明,等离子体激活的长寿命活性物质 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{NO}_3^-$ 和 $\text{NO}_2^-$ 等是发挥抑制效应的主要物质,可以破坏细胞膜和线粒体等。ROS是正常生理条件下重要的细胞内次级信使,但在病理条件下,当细胞内ROS积累过多或细胞内ROS清除系统受损,可能导致氧化或硝化应激以及

细胞成分的损伤,包括核酸、膜脂和蛋白质,继而可影响各种生理和病理过程,包括代谢、炎症、细胞信号转导、免疫、转录调控和凋亡<sup>[11]</sup>。

磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B(PI3K/AKT) 信号通路在细胞生长、发育、凋亡等生理过程中起重要的调节作用<sup>[12]</sup>。该信号通路中,PI3K 激活的结果是在质膜上产生第二信使 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇(PIP3),当 PI3K 被磷酸化激活后,其合成的 PIP3 与细胞中 AKT 和磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1(PDK1) 结合,促使 PDK1 磷酸化 AKT 蛋白的 Ser308 导致 AKT 活化<sup>[13]</sup>。研究<sup>[14]</sup>显示激活的 PI3K 磷酸化 AKT, p-AKT 移动到胞质及胞核,结合其下游靶蛋白 Bad、Caspase9、NF- $\kappa$ B、Bcl-2 和 mTOR 等,调控炎症细胞活化和炎症介质释放,故 p-AKT 可作为 PI3K/AKT 信号通路活化的标志物。

该研究在体外采用 PAS 处理 HemECs 细胞,以观察 PAS 对 HemECs 细胞增殖及凋亡水平的作用。结果显示,CAP 辐照时间 10、20、30、40、50 s 的 PBS 处理 HemECs 细胞,与对照组相比,PAS 可显著抑制 HemECs 细胞的增殖,也能显著促进其凋亡,且具有剂量依赖性。并且,这种作用效果与细胞内 ROS 水平的上升具有相关性。初步对 PI3K/AKT 信号通路在 CAP 影响 HemECs 细胞增殖和凋亡中的作用研究表明,CAP 处理 10 s 以上的激活液可以显著抑制 HemECs 细胞的磷酸化 AKT 水平,但对 PI3K 的磷酸化水平没有明显抑制作用。因此,CAP 来源的活性氧类物质通过直接影响细胞内 ROS 水平,下调 AKT 磷酸化的表达,进一步表现出对 HemECs 细胞的增殖抑制及促进凋亡的效果。

综上所述,该研究从细胞和蛋白水平上表明了 CAP 激活液对 HemECs 细胞的增殖具有抑制作用,并通过细胞内 ROS 下调 p-AKT 表达促进凋亡,为今后婴儿血管瘤的靶向治疗研究提供了方向。

#### 参考文献

[1] Darrow D H, Greene A K, Mancini A J, et al. Diagnosis and

management of infantile hemangioma: executive summary[J]. *Pediatrics*, 2015, 136(4): 786-91.

[2] Chen Z Y, Wang Q N, Zhu Y H, et al. Progress in the treatment of infantile hemangioma[J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7(22): 692.

[3] Wang L, Yang X, Yang C, et al. The inhibition effect of cold atmospheric plasma-activated media in cutaneous squamous carcinoma cells[J]. *Future Oncol*, 2019, 15(5): 495-505.

[4] Bernhardt T, Semmler M L, Schafer M, et al. Plasma medicine: applications of cold atmospheric pressure plasma in dermatology[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 3873928.

[5] Yan D, Sherman J H, Keidar M. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(9): 15977-95.

[6] Haralambiev L, Wien L, Gelbrich N, et al. Cold atmospheric plasma inhibits the growth of osteosarcoma cells by inducing apoptosis, independent of the device used[J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(1): 283-90.

[7] Van Loenhout J, Flieswasser T, Freire Boulosa L, et al. Cold atmospheric plasma-treated PBS eliminates immunosuppressive pancreatic stellate cells and induces immunogenic cell death of pancreatic cancer cells[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(10): 1597.

[8] Xia J, Zeng W, Xia Y, et al. Cold atmospheric plasma induces apoptosis of melanoma cells via sestrin2-mediated nitric oxide synthase signaling[J]. *J Biophotonics*, 2019, 12(1): e201800046.

[9] Yang X, Yang C, Wang L, et al. Inhibition of basal cell carcinoma cells by cold atmospheric plasma-activated solution and differential gene expression analysis[J]. *Int J Oncol*, 2020, 56(5): 1262-73.

[10] Bauer G. The synergistic effect between hydrogen peroxide and nitrite, two long-lived molecular species from cold atmospheric plasma, triggers tumor cells to induce their own cell death[J]. *Redox Biol*, 2019, 26: 101291.

[11] Zhao S, Xiong Z, Mao X, et al. Atmospheric pressure room temperature plasma jets facilitate oxidative and nitrative stress and lead to endoplasmic reticulum stress dependent apoptosis in HepG2 cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e73665.

[12] 李琴, 谢莹莹. 胰岛素生长因子 2 甲基化对高糖诱导滋养层细胞凋亡及 PI3K/Akt 通路的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(5): 665-70.

[13] 金波, 邱慧玲, 李玉萍. 芹菜素通过 PI3K/Akt 信号通路诱导 Hela 细胞凋亡[J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(3): 367-71.

[14] Harikrishnan H, Jantan I, Haque M A, et al. Phyllanthin from *Phyllanthus amarus* inhibits LPS-induced proinflammatory responses in U937 macrophages via downregulation of NF- $\kappa$ B/MAPK/PI3K-Akt signaling pathways[J]. *Phytother Res*, 2018, 32(12): 2510-9.

## Effects and related mechanisms of plasma-activated solution on the proliferation and apoptosis of hemangioma endothelial cells

Zhang Chenchen, Yang Xingyu, Gao Jing, et al

(Dept of Dermatology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

**Abstract Objective** To observe the effects and mechanisms of plasma-activated solution(PAS) on the proliferation and apoptosis of hemangioma endothelial cells (HemECs). **Methods** Phosphate buffer saline (PBS) was

网络出版时间: 2021-11-25 8:30 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20211124.1048.019.html>

# miR-223-3p 通过抑制 VHL 促进牙髓干细胞成骨分化的研究

陆蓓蓓 朱友明

**摘要** 目的 探讨 miR-223-3p 通过抑制希佩尔林道(VHL)基因促进人牙髓干细胞(hDPSCs)成骨分化中的研究。方法 低氧诱导 DPSCs 细胞 24 h(氧浓度 1%)。通过 MTT 实验观察细胞增殖的变化。生物信息学预测 miR-223-3p 的 miRNA 通过 luciferase 验证 miR-223-3p 与 VHL 的关系。合成的 miR-223-3p 模拟物或 miR-223-3p 抑制剂转染至 DPSCs 细胞 通过 qRT-PCR 和 Western blot 法检测 miR-223-3p、VHL、HIF-1 $\alpha$ 、Runx2、BMP2 信使 RNA(mRNA) 和 VHL、HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达。结果 miR-223-3p 在低氧诱导的 DPSCs 细胞中表达增多( $P < 0.05$ )。MTT 结果表明 miR-223-3p mimics 对 DPSCs 细胞的增殖有促进作用( $P < 0.05$ )。且 miR-223-3p 通过靶向 VHL 3'-UTR 调控 VHL 的表达水平。qRT-PCR 和 Western blot 法检测 miR-223-3p 成功转染,显著促进 HIF-1 $\alpha$ 、Runx2、BMP2 基因的表达( $P < 0.05$ )。结论 miR-223-3p 通过抑制 VHL 基因促进牙髓干细胞成骨分化。

**关键词** 人牙髓干细胞; 低氧诱导因子-1 $\alpha$ ; VHL; miR-223-3p; 成骨

中图分类号 R 782

2021-10-03 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31970677)

作者单位: 安徽医科大学口腔医学院, 安徽省口腔疾病研究中心实验室, 合肥 230032

作者简介: 陆蓓蓓, 女, 硕士研究生;

朱友明, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 95640021@qq.com

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)12-1949-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.12.019

人牙髓干细胞(human dental pulp stem cells, hDPSCs)是人牙髓组织中具有自我更新功能的多能细胞,可诱导分化为成骨细胞、神经细胞、成软骨细胞和脂肪细胞<sup>[1]</sup>。微小 RNA(microRNA, miR)是在真核生物中内源性表达长度为 18~25 个核苷酸的单链非编码 RNA。有研究<sup>[2]</sup>表明,miR-223-3p 上调碱性磷酸酶(ALP)活性,扩增矿化结节数量,上调牙本质涎磷蛋白(DSPP)和牙本质基质蛋白 1(DMP-1)的蛋白水平,促进 DPSCs 成牙本质分化。低氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )是 HIF-1 的活性单位,其调节数百个参与骨髓血管生成、血管反应和动脉血管生成的基因的转录活性<sup>[3]</sup>。HIF-1 $\alpha$  和希佩尔林道(Von Hippel-Lindau, VHL)基因是肿瘤低氧反应的关键调控因子,在肿瘤血管生成和肿瘤侵袭中发挥重要作用。目前尚无文献报道 HIF-1 $\alpha$ 、VHL 与 miR-223-3p 表达的关系。在这项研究中检测 miR-223-3p 在低氧诱导 DPSCs 细胞中的表达,研究其对牙髓干细胞增殖能力的影响,预测 miR-223-3p 的结合靶点,并研究其与 miR-223-3p 的关系,检测 VHL 及 HIF-1 $\alpha$  基因在 DPSCs 细胞中的表达,探究 HIF-1 $\alpha$ 、VHL 与 miR-223-3p 的

treated by cold atmospheric plasma(CAP) for 10 s, 20 s, 30 s, 40 s and 50 s to form PAS. The PBS with 0 s CAP treatment was taken as the control group. The pH value and active medium concentration of PAS was detected by electronic pH meter and kit respectively. CCK-8 kit was used to detect cell proliferation. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis. Western blot was used to detect the expression of kinase B(AKT), phosphorylated AKT(p-AKT), phosphatidylinositol-3 kinase(PI3K) and phosphorylated PI3K(p-PI3K) protein in the HemECs. **Results**

Compared with the control group, the pH value of PAS gradually decreased in a dose-dependent manner. And the concentration of active mediums such as NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> in PAS increased in a dose-dependent manner. Compared with the control group, PAS significantly increased the level of ROS in HemECs, inhibited the proliferation and promoted the apoptosis. Compared with the control group, the expression of p-PI3K had no significant change, and the expression of p-AKT had no significant change at 10 s. However, the expression of p-AKT decreased rapidly, when the processing time increased to 20 s, 30 s, 40 s, and 50 s. **Conclusion** PAS can inhibit proliferation and promote apoptosis of HemECs. This effect is related to the increase of intracellular ROS level and the down-regulation of AKT phosphorylation level.

**Key words** cold atmospheric plasma; plasma-activated solution; HemECs; activated oxygen species