

ATG5 介导内皮细胞外泌体调控平滑肌细胞增殖

李征远^{1,2}, 胡 培³, 周 琳², 单勤也², 郭兴荣²

摘要 目的 探究 ATG5 介导人脐静脉内皮细胞外泌体对小鼠胸主动脉平滑肌细胞增殖的影响。方法 利用 0.1% II 型胶原酶灌注消化法获得原代人脐静脉内皮细胞; 利用组织块贴壁法分离原代小鼠胸主动脉平滑肌细胞; 利用超速离心法提取内皮细胞外泌体; 利用共聚焦高内涵成像分析仪示踪平滑肌细胞摄取内皮细胞外泌体; 利用 siRNA 干扰内皮细胞 ATG5 蛋白表达; 利用高内涵 DPC 成像模式分析平滑肌细胞增殖能力。结果 成功得到活性好、纯度高的人脐静脉内皮细胞和小鼠胸主动脉平滑肌细胞。超速离心法获得的内皮细胞外泌体经免疫印迹鉴定, 呈 Hsp70、TSG101、CD9 和 CD63 阳性。高内涵示踪结果显示平滑肌细胞在共培养 30 min 后开始摄取内皮细胞外泌体, 共培养 4 h 后, 平滑肌细胞摄取的外泌体明显增多。高内涵监测结果显示, 与对照组比较, ATG5 干扰组内皮细胞分泌的外泌体在浓度为 200 $\mu\text{g/ml}$ 时能够明显抑制平滑肌细胞的增殖。结论 ATG5 可通过介导内皮细胞外泌体调控平滑肌细胞增殖。

关键词 人脐静脉内皮细胞; 小鼠胸主动脉平滑肌细胞; 外泌体; ATG5

中图分类号 R 34

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)11-1718-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.11.015

心血管疾病是一种严重威胁人类健康的常见病, 具有高患病率、高致残率和高死亡率的特点^[1]。全世界每年死于心血管疾病的人数高达 1 500 万, 居各种死因首位^[2-3]。冠状动脉粥样硬化、高血压等心血管疾病可导致血管重构, 而血管平滑肌细胞增殖和迁移是引起血管重构的重要因素之一, 也是一些心血管疾病发生与发展的关键始动因素之

一^[4-10]。相关研究^[11-13]发现, 血管内皮细胞来源的外泌体水平升高可诱导血管生成。而自噬相关蛋白 ATG5 在外泌体形成中发挥重要作用^[14-15], 但 ATG5、内皮细胞外泌体及平滑肌细胞增殖之间的关系尚不明了。因此, 该研究通过 siRNA 干扰内皮细胞 ATG5 蛋白的合成, 研究其所产生的外泌体对平滑肌细胞增殖的影响, 探讨 ATG5 介导下的内皮细胞与平滑肌细胞之间的信息传递, 并利用共聚焦高内涵成像分析仪示踪平滑肌细胞摄取外泌体的过程。

1 材料与方法

1.1 实验材料 新生儿脐带由湖北医药学院附属太和医院妇产科产妇自愿捐赠, II 型胶原酶、DMEM/F12 培养基以及胎牛血清购自美国 Gibco 公司, 胰蛋白酶、DAPI 以及 cy3/FITC 标记的荧光二抗购自武汉碧云天生物技术有限公司, Factor VIII、CD31、Pan-Cadherin、SM22- α 和 α -actin 抗体购自北京博奥龙免疫技术公司; Hsp70、CD9、CD63、TSG101 抗体购自美国 Proteintech 公司; 外泌体于武汉谷歌生物科技有限公司进行电镜鉴定; PKH67、MINI67-1KT 购自美国 Sigma 公司, siRNA 及转染试剂购自广州锐博生物科技有限公司; CO₂ 培养箱、SORVALL MX150⁺ 超高速离心机购自美国 Thermofisher 公司; 倒置相差显微镜购自日本 Olympus 有限公司, 共聚焦高内涵成像分析仪购自美国 PerkinElmer 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 人脐带静脉内皮细胞的分离 20 cm 健康足月剖腹产新生胎儿脐带收集于湖北医药学院附属太和医院妇产科, 在无菌条件下用 PBS 冲洗干净, 分离脐带中管壁薄、腔略大的脐静脉。用去掉针头的无菌注射器和 PBS 冲洗脐静脉管腔, 直至流出液澄清。用止血钳夹闭脐带一端, 从另一端灌注 0.1% II 型胶原酶至脐静脉充盈, 并用止血钳封闭脐静脉, 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 30 min, 收集消化液至等体积含有 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基中, 混匀后将收集液 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 用含 10%

2020-07-28 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81700769); 湖北医药学院人才启动金资助计划项目(编号: 2018QDJZR30); 湖北医药学院研究生科技创新项目(编号: YC2019024)

作者单位: ¹ 湖北医药学院生物医药研究院胚胎干细胞研究湖北省重点实验室, 十堰 442000

湖北医药学院附属太和医院² 生命科学研究所、³ 检验科, 十堰 442000

作者简介: 李征远, 女, 助理实验师;

郭兴荣, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: gxrld@126.com

FBS 的 DMEM/F-12 培养基重悬后再次离心,弃上清液,加入完全培养基(10% FBS + DMEM/F-12 + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 青霉素 + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素)制成细胞悬液。将细胞悬液接种至 25 cm^2 的细胞培养瓶中,置于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中静置培养 24 h 后观察细胞贴壁状况并更换培养液,以后每隔 1~2 d 换液。

1.2.2 小鼠胸主动脉平滑肌细胞的分离 将 SD 小鼠断颈处死,在无菌条件下取其胸主动脉,清除结缔组织,完整剥离动脉外膜并纵向剖开血管,将血管内膜向上平铺于细胞培养皿中,刮除内膜并将其剪成约 1 mm^2 的小组织块,以 0.5 cm 的间距将组织块分布于 25 cm^2 细胞培养瓶底部,轻轻翻转培养瓶使瓶底朝上并注入 4 ml 完全培养基(20% FBS + DMEM/F-12 + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 青霉素 + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素),置于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中静置培养 5~6 h,待组织块附着于瓶底,将培养瓶慢慢翻转平放,使组织块完全浸入培养液中,继续置于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 3~5 d,待有细胞从组织块周围扩展出后换液,以后每隔 1~2 d 换液。

1.2.3 细胞鉴定 人脐静脉内皮细胞和小鼠胸主动脉平滑肌细胞的形态学特征通过倒置相差显微镜鉴定,细胞的蛋白标志物通过免疫荧光鉴定。将细胞传至 12 孔细胞培养板中,待细胞融合度达 80%,弃培养上清液;用 PBS 清洗 2 次,免疫荧光固定液室温固定 30 min;用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min;加入免疫荧光封闭液,室温封闭 30 min;弃封闭液,用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min;分别加入内皮细胞特异性蛋白标志物(Factor VIII、CD31、Pan-Cadherin)、平滑肌细胞特异性蛋白标志物(SM22- α 和 α -actin)一抗 4 $^\circ\text{C}$ 过夜孵育;用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min;加入二抗摇床避光孵育 2 h;用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min;加入 DAPI 室温孵育 10 min,用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min;用荧光显微镜对细胞进行成像。

1.2.4 细胞培养和传代 人脐静脉内皮细胞采用含有 10% FBS、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素的 DMEM/F-12 培养基于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中培养,每 1~2 d 换液。小鼠胸主动脉平滑肌细胞采用含有 20% FBS、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素的 DMEM/F-12 培养基于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中培养,每 2~3 d 换液。两种细胞的传代均待细胞融合至 85% 后,用 PBS 清洗 3 次,加入含有 0.02% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,当细胞皱缩成圆形时,立即加入等体积完全培养基终止消化,收集细胞于离心管中,1 500 r/min 离心 3 min,

弃上清液,加入完全培养基,按 1:2 的比例接种于培养瓶中培养。

1.2.5 人脐静脉内皮细胞外泌体的提取与鉴定 Gibco 小牛血清 41 100 r/min 4 $^\circ\text{C}$ 离心 10 h,取上层澄清液体即为无外泌体血清。用无外泌体血清配置的无外泌体完全培养基培养人脐静脉内皮细胞,收集 48 h 细胞培养上清液 60 ml,在 4 $^\circ\text{C}$ 环境下,于高速离心机中分别以 1 200 r/min 离心 10 min,3 100 r/min 离心 10 min 以及 16 600 r/min 离心 30 min 连续离心的方法去除上清液中的悬浮细胞、死细胞、细胞碎片、microvesicle 及凋亡小体等杂质;用 0.22 μm 滤膜过滤离心后上清液;41 100 r/min 超速离心 70 min 后弃上清液;用 1 ml PBS 重悬底部沉淀即为外泌体悬液。外泌体鉴定利用 Western blot 检测蛋白标志物 Hsp70、CD9、CD63、TSG101。同时,利用电子显微镜对所提取的外泌体进行大小和完整性鉴定。

1.2.6 高内涵示踪平滑肌细胞摄取外泌体 外泌体的荧光标记利用 PKH67 试剂盒,实验按照试剂盒操作说明进行。超速离心后得到的人脐静脉内皮细胞外泌体弃上清液,用 250 μl Diluent C 重悬外泌体;同时,取 1 μl PKH67 稀释于 750 μl Diluent C 中;将重悬后的外泌体和稀释后的 PKH67 混匀室温静置 10 min;加入 1 ml 0.5% 的 BSA 以结合过量的染料;41 100 r/min 超速离心 70 min 后弃上清液,并重悬于平滑肌细胞完全培养基中,即得到 PKH67 标记的外泌体。将标记后的人脐静脉内皮细胞外泌体与已贴壁生长的小鼠胸主动脉平滑肌细胞共同培养,利用共聚焦高内涵成像分析仪的 40 倍镜和共聚焦模式对其进行成像,分析小鼠胸主动脉平滑肌细胞对人脐静脉内皮细胞外泌体的摄取情况。

1.2.7 ATG5-siRNA 转染 将处于对数期生长的第 8 代人脐静脉内皮细胞均匀接种于 6 孔板,培养 24 h 后细胞密度达 40%,实验组同时加入 ATG5-siRNA1(靶序列: 5'-GATTCATGGAATTGAGCCA-3') 和 ATG5-siRNA2(靶序列: 5'-GAAGTTTGTCTTCTGCTA-3') 共转染,阴性对照组加入 NC-siRNA 转染,转染步骤参照广州锐博生物科技有限公司 siRNA 产品使用说明。转染 48 h 后分别收集细胞总蛋白,利用蛋白质印迹法检测 ATG5 蛋白表达情况。

1.2.8 高内涵检测内皮细胞外泌体影响平滑肌细胞增殖 siRNA 转染第 8 代人脐静脉内皮细胞 48 h 后换无外泌体完全培养基继续培养 48 h,分别收集实验组和对照组外泌体。将处于对数期生长的第 12 代小鼠胸主动脉平滑肌细胞接种于 24 孔板中,

过夜培养后换无外泌体完全培养基,并按 0、100、200 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度分别加入实验组和对照组外泌体。利用高内涵明场成像和 DPC 模式实时动态监测平滑肌细胞增殖情况。

1.3 统计学处理 所有结果以及图形分别利用 PowerPoint、ImageJ、Harmony4.8、GraphPad Prism 6 软件处理和统计分析。组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人脐静脉内皮细胞的形态学和免疫荧光鉴定

原代分离的人脐静脉内皮细胞在培养 2 d 后呈现明显地贴壁生长。通过倒置相差显微镜观察,单个细胞在形态上呈长梭形、多角形或椭圆形,是典型的鹅卵石样形态(图 1A1)。原代细胞在培养 7 d 后融合度达 85%(图 1A2)。血管内皮细胞表面标志物 Pan-Cadherin 和 CD31,以及血管内皮细胞内标志物 Factor VIII 的免疫荧光结果(图 1B)显示,96% 的细胞呈 Cy3 阳性。Pan-Cadherin 和 CD31 阳性细胞的

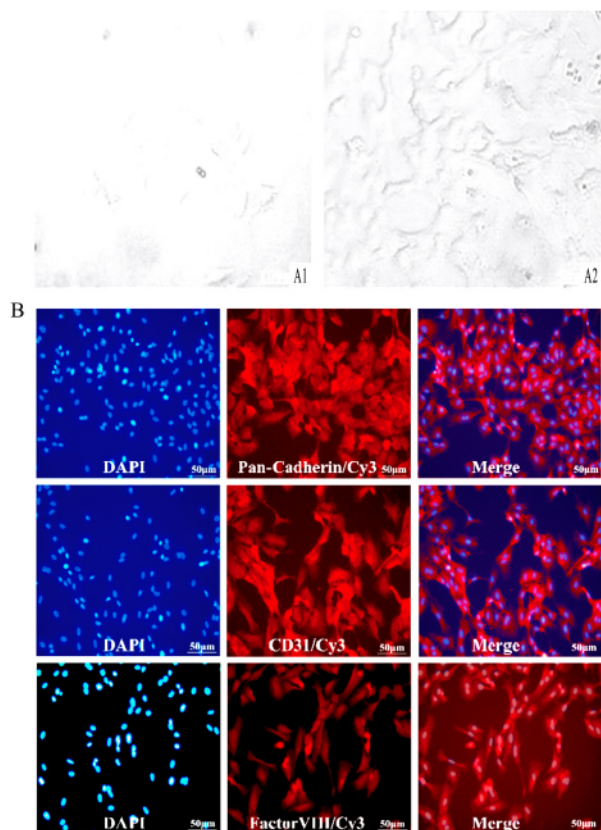


图1 人脐静脉内皮细胞的形态学鉴定和免疫荧光结果

A: 倒置相差显微镜下分别观察培养的原代人脐静脉内皮细胞形态 1: 原代培养 2 d $\times 100$ 2: 原代培养 7 d $\times 200$; B: 免疫荧光法检测内皮细胞标志物 Pan-Cadherin、CD31、Factor VIII $\times 200$

Cy3 荧光主要分布在细胞膜和细胞间的连接处上,符合 Pan-Cadherin 和 CD31 的膜蛋白的定位。Factor VIII 阳性细胞的 Cy3 荧光主要集中在细胞质中,荧光染色范围明显小于 CD31 和 Pan-Cadherin 阳性细胞。

2.2 小鼠胸主动脉平滑肌细胞的形态学和免疫荧光鉴定 在倒置相差显微镜下,小鼠胸主动脉组织块贴壁培养 3 d 可明显观察到有细胞(即为 P0 代平滑肌细胞)从组织块边缘游离出来;培养 5 d,游离细胞融合度达 75%;培养 7 d,游离细胞融合度达 90%。经过传代培养,在倒置相差显微镜下观察 P1 代平滑肌细胞,细胞大多呈长梭形,少数呈多角形(图 2A)。血管平滑肌细胞表型标志蛋白 SM22- α 和 α -actin 的免疫荧光结果显示,95% 的细胞呈 Cy3 阳性(图 2B)。

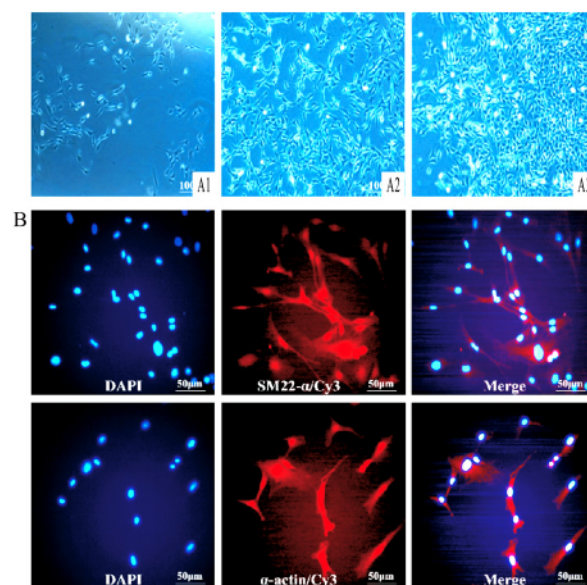


图2 小鼠胸主动脉平滑肌细胞的形态学鉴定和免疫荧光结果

A: 倒置相差显微镜下分别观察 P1 代平滑肌细胞 $\times 100$ 1: 培养 3 d 的 P1 代细胞 2: 培养 5 d 的 P1 代细胞 3: 培养 7 d 的 P1 代细胞; B: 免疫荧光法检测平滑肌细胞标志物 SM22- α 和 α -actin $\times 200$

2.3 人脐静脉内皮细胞外泌体的鉴定 蛋白免疫印迹结果显示,超速离心法提取的人脐静脉内皮细胞外泌体含有外泌体标志蛋白 Hsp70、TSG101、CD9 和 CD63(图 3A)。电子显微镜下观察所提取的外泌体双层膜结构完整,直径为 50 ~ 150 nm(图 3B)。

2.4 平滑肌细胞摄取内皮细胞外泌体的荧光示踪

在共聚焦高内涵成像分析系统(HCS)40 倍共聚焦成像模式下,利用 DAPI(蓝色)染色追踪小鼠胸

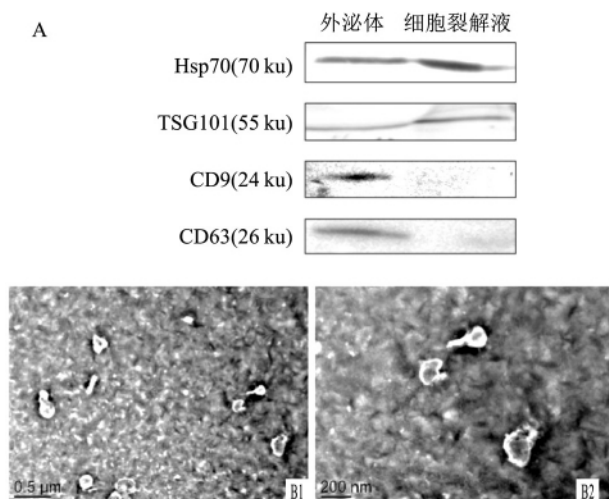


图3 外泌体的鉴定

A: 蛋白免疫印迹鉴定外泌体标志抗原; B: 电镜下观察外泌体的完整性和大小, 1: $\times 20\,000$ 2: $\times 50\,000$

主动脉平滑肌细胞, 利用 PKH67(绿色)染色追踪外泌体。高内涵记录共培养 0、30、60、120、240 min 时平滑肌细胞对外泌体的摄取情况。结果显示小鼠胸主动脉平滑肌细胞在共培养 30 min 后开始摄取 PKH67 标记的人脐静脉内皮细胞外泌体, 共培养 4 h 后, 平滑肌细胞摄取的外泌体明显增多(图 4)。

2.5 人脐静脉内皮细胞 siRNA 干扰组的 ATG5 蛋白合成明显降低 实验组和对照组 Western blot 检测结果(图 5)显示在 siRNA 转染细胞 48 h 后, 实验组 ATG5 蛋白表达明显降低。

2.6 高内涵揭示 ATG5 介导内皮细胞外泌体调控平滑肌细胞增殖 本研究利用高内涵 DPC 模式对随机视野中的细胞数量进行 96 h 的不间断统计得到平滑肌细胞的增殖曲线(图 6), 表明 siRNA 干扰人脐静脉内皮细胞 ATG5 表达后分泌的外泌体在浓度达到 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时能够明显抑制小鼠胸主动脉平滑肌细胞的增殖(图 6)。通过组间分析, 与对照组比较, 外泌体浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 平滑肌细胞的增殖曲线存在显著差异($P < 0.01$)。

3 讨论

众所周知, 除了毛细血管和毛细淋巴管外, 血管壁主要由三层膜结构组成, 内膜由内皮细胞构成, 中膜(中动脉)主要由平滑肌细胞参与构成, 外膜由疏松结缔组织组成。血管平滑肌细胞在构成血管壁、维持血管张力上发挥着重要作用, 而它的异常增殖和迁移在高血压、动脉粥样硬化等疾病的发生发展

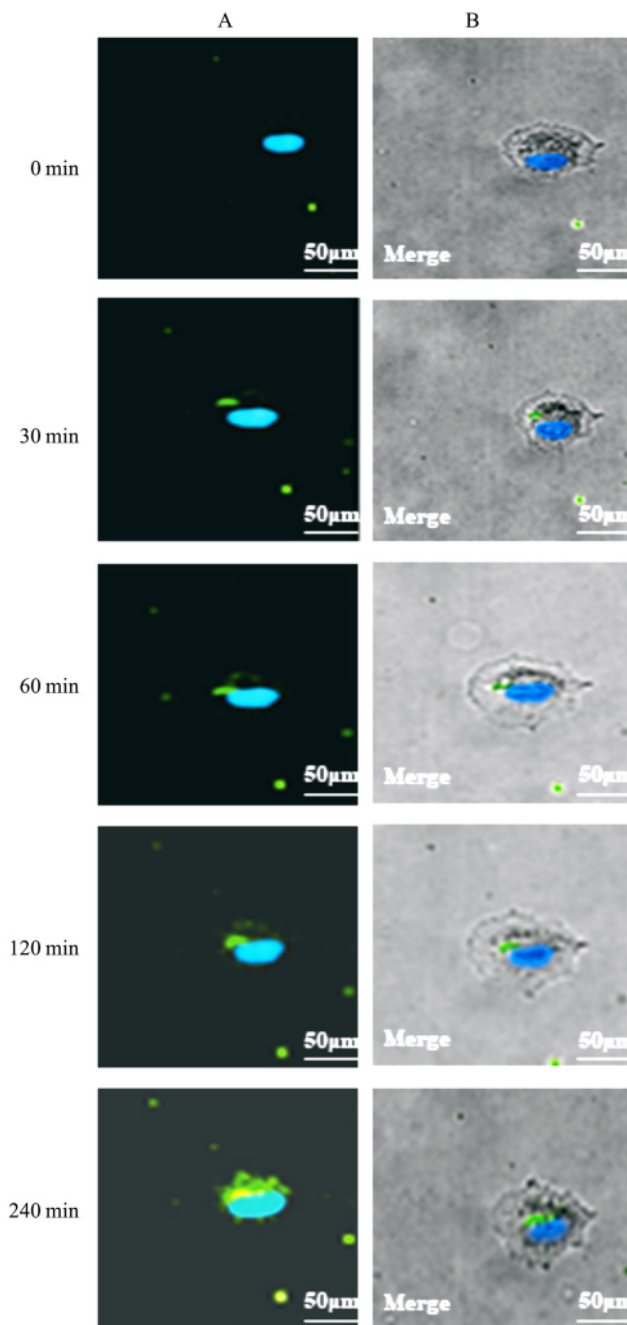


图4 HCS 示踪平滑肌细胞摄取 PKH67 标记的外泌体

A: 外泌体摄取实验 $\times 400$; 蓝色: DAPI; 绿色: PKH67; B: 相同空气镜下小鼠胸主动脉平滑肌细胞的明场成像和 DAPI、PKH67 荧光成像的合并图 $\times 400$

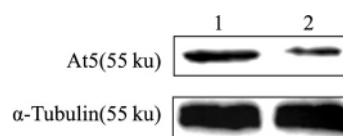


图5 SiRNA 干扰 HUVEC ATG5 表达的 Western blot 鉴定

1: 对照组; 2: 实验组

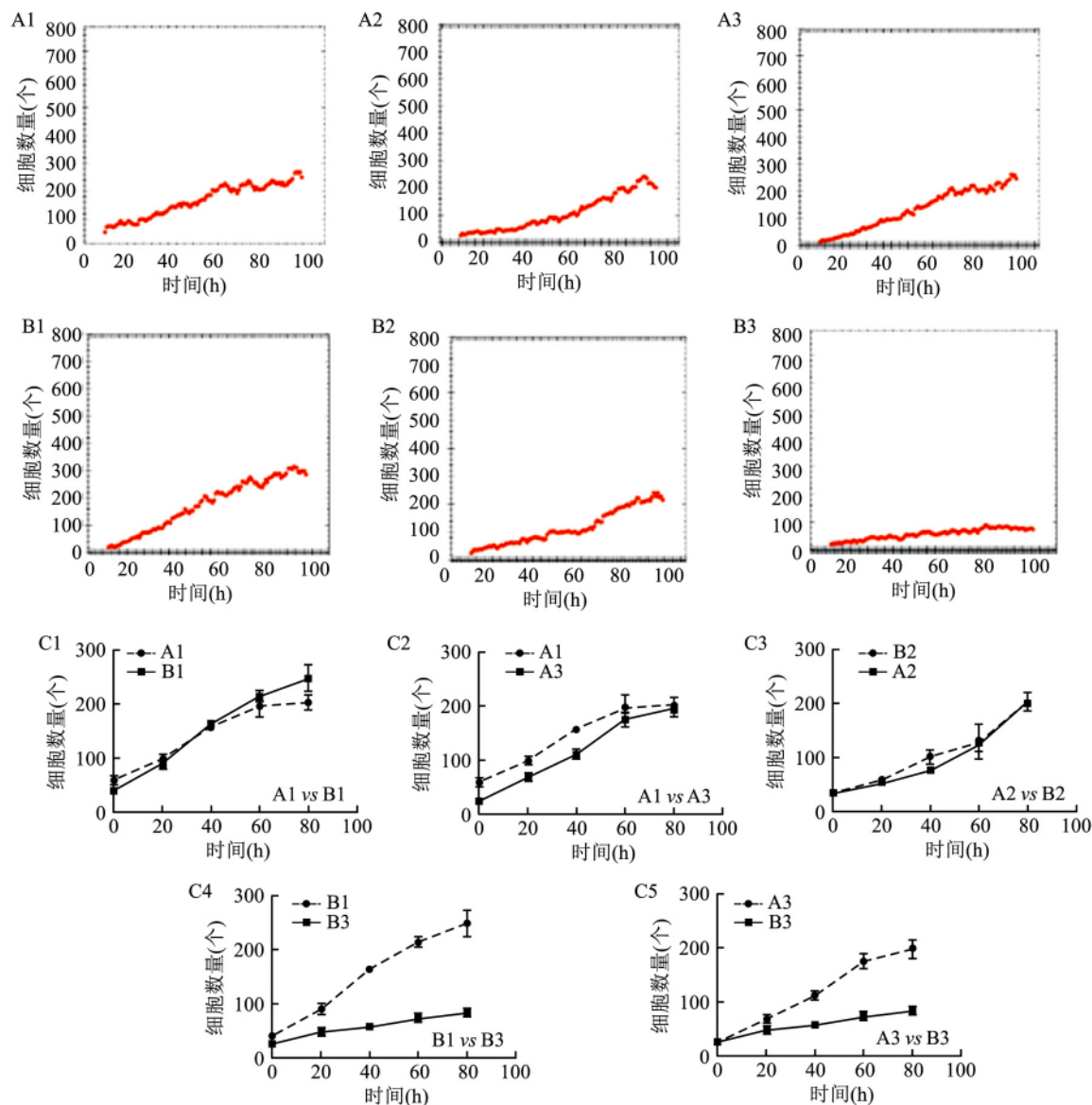


图6 高内涵 DPC 模式监测 VSMC 增殖曲线

A: VSMC 与 NC 组外泌体共培养的增殖曲线; B: VSMC 与实验组外泌体共培养的增殖曲线; 1: 外泌体浓度为 0 $\mu\text{g/ml}$; 2: 外泌体浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$; 3: 外泌体浓度为 200 $\mu\text{g/ml}$; C: 增殖曲线的组间比较; C1: 外泌体浓度为 0 $\mu\text{g/ml}$ 时, 对照组与实验组间比较; C2: 对照组在外泌体浓度分别为 0 $\mu\text{g/ml}$ 与 200 $\mu\text{g/ml}$ 时的组间比较; C3: 外泌体浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$ 时, 对照组与实验组间比较; C4: 干扰组在外泌体浓度分别为 0 $\mu\text{g/ml}$ 与 200 $\mu\text{g/ml}$ 时的组间比较; C5: 外泌体浓度为 200 $\mu\text{g/ml}$ 时, 对照组与实验组间比较

过程中发挥重要作用。内皮细胞是血液与组织之间的一道具有半透膜性质的屏障, 能够分泌多种活性因子, 其内皮细胞损伤或功能障碍可引发系列心血管疾病。例如, 内皮细胞损伤后释放的细胞因子使血液中白细胞贴壁引发炎症反应, 诱导中层血管平滑肌细胞的增殖和迁移, 并伴随细胞外基质的分泌和沉积, 造成粥样硬化等。由此可见, 内皮细胞与平滑肌细胞之间存在信息交流, 相互影响, 共同维持着内环境的稳定, 但是其作用机制目前尚不明了。

外泌体是包含了核酸、蛋白质等生物活性物质

的小囊泡, 广泛存在于血液、尿液、脑脊液、乳汁等体液之中。外泌体可通过与受体细胞的细胞膜融合或与细胞膜上特异性受体结合释放活性内容物, 从而介导细胞间的信息传递, 调控机体的生命活动, 也与多种疾病的发生与进程密切相关。

在乳腺癌细胞的研究中发现, 自噬相关蛋白 ATG5 通过调节乳腺癌细胞多囊泡体的 pH 来影响外泌体的形成, 和参与微管相关蛋白的酶促级联修饰并将催化产物转移至外泌体, 介导外泌体促进临近乳腺癌细胞的迁移和侵袭。敲除 ATG5 基因的乳

腺癌细胞产生外泌体的量显著下降且外泌体内不含微管相关蛋白相关催化产物。在肺动脉血管内皮细胞的研究中发现,缺氧和炎症可诱导肺动脉内皮细胞外泌体的释放,并引起肺动脉平滑肌细胞的过度增殖和迁移。

血管平滑肌细胞的异常增殖、迁移及表型转化是心血管病,如动脉粥样硬化,发生与发展的关键始动因素之一。本研究以人脐静脉内皮细胞和小鼠胸主动脉平滑肌细胞为材料,研究 siRNA 干扰 ATG5 蛋白合成的内皮细胞所产生的外泌体对平滑肌细胞增殖的影响,同时利用共聚焦高内涵成像分析系统跟踪平滑肌细胞摄取内皮细胞外泌体的过程,为探索调控平滑肌细胞异常增殖提供新的思路。

本研究结果显示,小鼠主动脉平滑肌细胞在体外培养 30 min 后开始摄取内皮细胞外泌体;通过 siRNA 干扰 ATG5 蛋白合成的内皮细胞所产生的外泌体在 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度时可以显著抑制平滑肌细胞的增殖。但 ATG5 如何影响内皮细胞外泌体的产生,是否依赖于自噬,还是直接作用于外泌体形成的相关蛋白尚有待研究。另外,在 siRNA 干扰内皮细胞 ATG5 蛋白合成后,所产生的外泌体中组分是否发生质和量的改变,外泌体进入平滑肌细胞后是通过何种信号通路来调控增殖尚有待考察。

综上所述,本研究揭示了 ATG5 能够介导内皮细胞外泌体来调控平滑肌细胞增殖,为平滑肌细胞功能异常而导致的心血管疾病的防治提供了新的思路,但调控的具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2017》概要[J]. 中国循环杂志, 2018, 33(1): 1-8.
- [2] 温翠平. 心血管疾病治疗药物临床应用分析[J/CD]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2018, 6(18): 100.
- [3] 欧丽. 中国心血管疾病防治的成果及展望[J]. 中国实用医药, 2019, 14(23): 199-202.
- [4] Dai Z, Zhu M M, Peng Y, et al. Endothelial and smooth muscle cell interaction via foxM1 signaling mediates vascular remodeling and pulmonary hypertension [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018, 198(6): 788-802.
- [5] Fang Y C, Yeh C H. Role of microRNAs in vascular remodeling [J]. *Curr Mol Med*, 2015, 15(8): 684-96.
- [6] Wang X, Khalil R A. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease [J]. *Adv Pharmacol*, 2018, 81: 241-330.
- [7] Smith S A, Newby A C, Bond M. Ending restenosis: inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by cAMP [J]. *Cells*, 2019, 8(11): 1447.
- [8] Kasaai B, Caolo V, Peacock H M, et al. Erythro-myeloid progenitors can differentiate from endothelial cells and modulate embryonic vascular remodeling [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43817.
- [9] Gorabi A M, Hajighasemi S, Tafti H A, et al. Gene therapy in cardiovascular diseases: A review of recent updates [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(12): 9645-54.
- [10] Menghini R, Casagrande V, Marino A, et al. MiR-216a: a link between endothelial dysfunction and autophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(1): e1029.
- [11] Zhao L, Luo H, Li X, et al. Exosomes derived from human pulmonary artery endothelial cells shift the balance between proliferation and apoptosis of smooth muscle cells [J]. *Cardiology*, 2017, 137(1): 43-53.
- [12] Dai Z, Li M, Wharton J, et al. Prolyl-4 hydroxylase 2 (PHD2) deficiency in endothelial cells and hematopoietic cells induces obliterative vascular remodeling and severe pulmonary arterial hypertension in mice and humans through hypoxia-inducible factor-2 α [J]. *Circulation*, 2016, 133(24): 2447-58.
- [13] Lee K Y, Lee D H, Choi H C. Mesoglycan attenuates VSMC proliferation through activation of AMP-activated protein kinase and mTOR [J]. *Clin Hypertens*, 2015, 22: 2.
- [14] Guo H, Chitiprolu M, Roncovic L, et al. Atg5 disassociates the V1V0-ATPase to promote exosome production and tumor metastasis independent of canonical macroautophagy [J]. *Dev Cell*, 2017, 43(6): 716-30.
- [15] Guo H, Sadoul R, Gibbings D. Autophagy-independent effects of autophagy-related-5 (Atg5) on exosome production and metastasis [J]. *Mol Cell Oncol*, 2018, 5(3): e1445941.

ATG5 regulates VSMC proliferation by mediating endothelial exosomes

Li Zhengyuan^{1,2}, Hu Pei³, Zhou Lin², et al

(¹Biomedical Research Institute of Hubei University of Medicine, Hubei Key Laboratory of Embryonic Stem Cell Research, Shiyan 442000; ²Life Science Institute, ³Dept of Clinical Laboratory, Affiliated Taihe Hospital of Hubei University of Medicine, Shiyan 442000)

Abstract Objective To investigate ATG5 regulates VSMC proliferation by mediating endothelial exosomes. **Methods** HUVECs were separated by type II collagenase digestion at 37°C and then cultivated in DMEM/F-12

网络出版时间: 2020-9-24 13:13 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200923.1150.016.html>

利拉鲁肽通过自噬及改善氧化应激缓解大鼠糖皮质激素性骨质疏松

杨婧 杨丽娜 丁庭庭 钟兴 潘天荣

摘要 目的 探讨利拉鲁肽对大鼠糖皮质激素性骨质疏松的作用及其可能机制。方法 将30只健康8周龄雄性SD大鼠随机分为正常对照组、地塞米松组以及地塞米松+利拉鲁肽干预组,干预12周后通过Micro-CT检测骨密度及骨微结构,试剂盒检测骨组织内活性氧(ROS)、超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)含量,Western blot检测自噬特异性蛋白Beclin-1、Atg5、p62/SQSTM1及Map1-LC3-II的表达水平。结果 地塞米松组股骨远端干骺端的骨密度(BMD)、骨小梁体积比率(BV/TV)、骨小梁数量(Tb.N)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁间距(Tb.Sp)及骨小梁连接密度(Conn.D)均较正常对照组降低,骨组织内氧化应激产物ROS及MDA含量升高,抗氧化酶SOD活性降低,自噬相关蛋白Beclin-1、Atg5及Map1-LC3-II表达水平均升高,p62/SQSTM1蛋白表达水平下降(均 $P < 0.05$)。利拉鲁肽干预组大鼠的骨密度、骨微结构得到改善,骨组织内ROS及MDA含量降低,抗氧化酶SOD活性升高,自噬相关蛋白Beclin-1、Atg5及Map1-

LC3-II的表达水平下降,p62/SQSTM1蛋白表达水平上升(均 $P < 0.05$)。结论 利拉鲁肽能改善糖皮质激素造成的骨质疏松,其机制可能与调整自噬及改善氧化应激有关。

关键词 糖皮质激素性骨质疏松;利拉鲁肽;自噬;氧化应激

中图分类号 R 589.5; R 97
文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)11-1724-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.11.016

糖皮质激素性骨质疏松(glucocorticoid-induced osteoporosis, GIOP)作为最常见的继发性骨质疏松类型,在长期接受糖皮质激素(glucocorticoid, GC)治疗的患者中发病率高达30%~50%,已成为一个十分严峻的全球健康问题^[1]。胰高血糖素样肽-1(GLP-1)是肠促胰岛素的一种,近年来一些研究显示,它不但能够作用于胰腺,与骨代谢也密切相关^[2]。其类似物利拉鲁肽对骨骼有正性作用,但是具体机制尚不明确^[3]。该研究建立GIOP大鼠模型,使用利拉鲁肽进行干预,通过分析骨密度(bone mineral density, BMD)、骨微结构、自噬(auto-phagy)及氧化应激(oxidative stress, OS)水平的变化,探讨利拉鲁肽对GIOP的影响,并初步讨论其机制。

2020-08-03 接收

基金项目: 安徽省高等学校自然科学研究重点项目(编号: KJ2017A174、KJ2018A0202)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院内分泌科,合肥 230601

作者简介: 杨婧,女,硕士研究生;

潘天荣,男,副教授,主任医师,博士生导师,责任作者,
E-mail: ptr1968@163.com

culture containing 10% FBS. Tissue explants adherent method was applied to obtain VSMCs. VSMCs was cultivated in DMEM/F-12 culture containing 20% FBS. The uptake of endothelial exosomes by VSMCs was tracked by high-content cell imaging system. SiRNA was used to knock down the expression of ATG5. **Results** HUVECs with high purity and good viability were isolated successfully by 0.1% type II collagenase digestion. The cell displayed typical cobblestone-like morphology under the inverted phase-contrast microscope. Immunofluorescence technique validated that the isolated cells with CD31/Pan-Cadherin/ Factor VIII-positive phenotype account for 96%. VSMCs were observed on the 3rd day of the culture. The cells showed long shuttle and polygonal morphology. Immunofluorescence technique identified that the expression frequency of SM22- α and α -actin was about 95%. Endothelial exosomes obtained by ultracentrifugation displayed Hsp70/TSG101/CD9/CD63 positive phenotype. VSMCs started to uptake endothelial exosomes after 30 minutes co-culture showed by high-content cell imaging system. After 4 hours, the numbers of endothelial exosomes uptake by VSMCs increased significantly. Cell growth and proliferation curve showed that, at the concentration of 200 $\mu\text{g/ml}$, the exosomes secreted by HUVEC in which ATG5 decreased could inhibit the proliferation of VSMC. **Conclusion** ATG5 regulates VSMC proliferation by mediating endothelial exosomes.

Key words HUVEC; VSMC; exosome; ATG5