

网络出版时间: 2019-1-11 14:05 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190109.1117.006.html>

BMP-2 对 ECV304 细胞增殖迁移及血管生成的影响

冯鹏程^{1,2}, 左为汉^{1,2}, 蒋为民^{1,2}, 吴建兵^{1,2}

摘要 目的 研究骨形态发生蛋白 2 (BMP-2) 对人脐静脉内皮细胞 (ECV304 细胞) 增殖迁移及血管生成的影响。方法 构建慢病毒表达载体并转染 ECV304 细胞, 根据 ECV304 细胞中 BMP-2 的表达量不同, 实验分为 Normal 组、LV-SH-BMP-2 组和 Overexpression-LV-BMP-2 组。CCK-8、划痕实验、Western blot 和成管实验检测 ECV304 细胞的增殖能力、迁移能力、血管生成相关蛋白表达量和血管生成能力; 共培养后细胞注入裸鼠右侧腋窝皮下建立皮下移植瘤模型, 观察移植瘤的生长情况及微血管密度 (MVD)。结果 Overexpression-LV-BMP-2 组 ECV304 细胞的增殖能力、迁移能力、血管生成相关蛋白的表达量和血管生成数量显著高于 Normal 组和 LV-SH-BMP-2 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 体内实验显示 Overexpression-LV-BMP-2 组 ECV304 细胞组移植瘤体积、质量和 MVD 较 Normal 组和 LV-SH-BMP-2 组明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 BMP-2 可促进 ECV304 细胞增殖迁移及血管生成。

关键词 BMP-2; ECV304 细胞; 增殖; 迁移; 血管生成

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)02-0192-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.02.006

原发性肝癌, 通常是指肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC), 是世界上由癌症引起的死亡的第二大原因^[1]。血管生成是肝癌的基本特征, 对于肝癌的发生进展是至关重要的。

骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP-2) 是转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 家族中的一员, 在细胞增殖、分化和凋亡中起着重要的作用, 最近研究^[2]显示 BMP-2 与许多恶性肿瘤密切相关, 然而, BMP-2 对人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, ECV304) 增殖迁移和血管生成的影响尚不清楚。因此, 在该研究中, 构建 BMP-2 慢病毒载体并转染

ECV304 细胞, 通过细胞功能实验和裸鼠模型的构建, 从体内外水平观察 BMP-2 对 ECV304 细胞增殖、迁移及血管生成的影响。该研究可为肝癌临床治疗探寻新的治疗靶点和思路提供理论和实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 ECV304 细胞、慢病毒载体和感染增强液 (HitransG P, REVG003) 均购自上海吉凯基因生物技术公司, 裸鼠 (15 只雄性, SPF 级 BALB/c-nu 小鼠; 体质量 17.7 ~ 21.8 g; 室温饲养) 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司; Real-time PCR 试剂盒 (AQ141)、CCK-8 试剂盒 (FC101) 购自北京 TransGen Biotech 公司; Transwell 小室购自美国 Milipore 公司; 凝胶制备试剂盒 (AR0138)、总蛋白提取试剂盒 (P1250)、蛋白定量试剂盒 (P1511)、超敏发光试剂盒 (S6009) 等购自南昌 Cell Scientific 公司; Anti-BMP-2 抗体 (ab14933)、GAPDH 抗体 (AF7021)、Goat Anti-Rabbit IgG ((BA1045) 购自美国 Abcam 公司; 核酸蛋白分析仪购自德国 BioPhotometer 公司; 梯度 PCR 仪 (170-9703) 购自美国 Bio-Rad 公司; 荧光定量 PCR 分析仪 (BJ001266)、多功能酶标仪 (FC) 购自美国 ABI 公司; 半干膜转仪 (TE70XP) 购自美国 Hoefer 公司。

1.2 慢病毒转染及引物设计 将对数生长期的细胞消化重悬后, 按 1×10^5 /L 密度接种于 24 孔板, 生长过夜, 等 24 孔板铺满 30% ~ 40% 时, 吸除培养液, 换新鲜的培养液, 根据细胞数加入复感染指数 (multiplicity of infection, MOI) 为 20 的病毒量, 混合均匀后即可放入孵箱培养, 24 h 左右可换液, 于 37 °C、5% CO₂ 环境下贴壁培养、传代, 并筛选稳定株, 备后续实验使用。BMP-2 引物序列: F: 5'-GGAACGGA CATTGCGTCCTT-3', R: 5'-CACCATGGTTCGACCTTGA GGA-3'; β -actin F: 5'-AAAGACCTGTACGCCAACA CA-3', R: 5'-CGATCCACACGGAGTACTTGC-3'。

1.3 Real-time PCR 实验 根据总 RNA 抽提试剂盒 (ET111) 说明书提取总 RNA, 然后用核酸蛋白分析仪对 RNA 浓度和纯度测定, 在梯度 PCR 仪逆转录合成 cDNA, 反应条件: 42 °C、15 min, 85 °C、5 s,

2018-08-31 接收

基金项目: 江西省自然科学基金 (编号: 81460375)

作者单位: ¹ 南昌大学第二附属医院肿瘤科, 南昌 330006

² 江西省肿瘤临床转化研究重点实验室, 南昌 330006

作者简介: 冯鹏程, 男, 硕士研究生;

吴建兵, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: hhgwjb@

163.com

参考 Real-time PCR 试剂盒(AQ141)说明书加样,反应条件:94 ℃、30s,94 ℃、5s,60 ℃、30s,40 个循环,内参为 β -actin,于荧光定量 PCR 分析仪进行分析,根据循环阈值(cycle threshold,Ct)值计算相对表达量,实验重复 3 次。

1.4 Western blot 实验 按照总蛋白提取试剂盒说明书提取蛋白,检测蛋白浓度后加入 Loading Buffer 缓冲液,经 100 ℃ 煮沸 15 min,变性后上样,进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后,采用半干膜转仪将电泳产物转移至 PVDF 膜上,转膜后用 5% 的脱脂奶粉封闭 2 h,通过 TBST 漂洗(3 次 $\times$ 10 min)后,加入 Anti-BMP-2 抗体(稀释浓度 1 : 500)、GAPDH 抗体(稀释浓度 1 : 500)4 ℃ 孵育过夜,TBST 漂洗(3 次 $\times$ 10 min)后,Goat Anti-Rabbit IgG(稀释浓度 1 : 10 000)室温孵育 1 h,TBST 洗过(3 次 $\times$ 10 min)后,最后浸入超敏发光试剂(S6009)中约 1 min,显影成像,使用 Image J 进行灰度值分析比较,实验重复 3 次。

1.5 细胞培养与实验分组 ECV304 细胞在含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 于 37 ℃、5% CO₂ 环境下贴壁培养、传代,备后续实验使用。实验分为:① Normal 组(BMP-2 表达正常的 ECV304 细胞);② LV-SH-BMP-2 组(BMP-2 表达下调的 ECV304 细胞);③ Overexpression-LV-BMP-2 组(BMP-2 表达上调的 ECV304 细胞)。

1.6 CCK-8 实验 胰蛋白酶消化 3 组对数期细胞,离心并制成细胞悬液,通过细胞计数调整浓度至 6×10^4 /ml,取 3 种细胞悬液分别加入到 96 孔板中,100 μ l/孔,每组分别设计 6 个复孔,培养 24 h(37 ℃、5% CO₂ 的条件下培养),分别在第 24、48、72 小时的时候,每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液(不要产生气泡),在多功能酶标仪选择 450 nm 波长测定各组细胞吸光度(optical density,OD)值,最后统计数据和绘制增殖曲线,实验重复 3 次。

1.7 划痕实验 将 3 组处于对数期的细胞,接种于 6 孔板,当细胞生长至 90% 左右时,弃去培养液,用 10 μ l 移液器的枪头沿培养板底部做“—”字划痕,划痕要垂直、均衡、相同。用 PBS 洗涤脱落的细胞,重新加入无血清的培养基,放入 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养,于 0 h 和 24 h 倒置显微镜观察并拍照,Image J 计算划痕愈合率,实验重复 3 次。

1.8 成管实验 Matrigel 基质胶 4 ℃ 过夜溶解,次日在冰盒上进行铺胶,先用血清 DMEM 培养基 1 : 1

稀释 Matrigel 基质胶,混匀后,50 μ l/孔加入 96 孔板,37 ℃ 孵箱放置 1 h;将 ECV304 细胞(1×10^5 /孔)接种在 Matrigel 层上,并在 CO₂ 培养箱(37 ℃、5% CO₂)中培养,12 h 后观察,并用相差显微镜捕获图片,通过使用 Image Pro Plus 软件的计算机辅助图像分析确定每孔的总管长度。

1.9 裸鼠移植瘤 0.25% 胰蛋白酶消化,用 PBS 混合制成单细胞悬液,取对数生长期的 ECV304 细胞 1×10^7 个,注入裸鼠右侧翼皮下,负瘤小鼠 4 周后麻醉下处死,无菌条件下去除表面的纤维包膜、血管,剥离瘤体,测量瘤体的体积和质量。

1.10 微血管密度(microvessel density,MVD)

将组织切片用二甲苯脱蜡,然后将玻片浸入梯度浓度的酒精(100%、95%、85%、70%)中 5 min,用苏木精染色 3 min 和伊红染色 1 min。使用 EnVision 检测试剂盒,用 CD34 标记血管内皮细胞,选择色素最强的区域作为“热点”,在显微镜下成像并计数微血管。对于一个切片,计数 3 个“热点”中的微血管并将它们的平均值用作切片 MVD。

1.11 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计量资料经检验符合正态分布,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示;三组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ECV304 细胞中 BMP-2 mRNA 的表达 Real-time PCR 结果:Normal 组、Overexpression-LV-BMP-2 组、LV-SH-BMP-2 组 ECV304 细胞 BMP-2 mRNA 表达量分别为(0.98 ± 0.02)、(2.28 ± 0.87)、(0.35 ± 0.03),三组间差异有统计学意义($F = 177.2, P < 0.01$)。与 Normal 组比较,Overexpression-LV-BMP-2 组 ECV304 细胞 BMP-2 mRNA 的相对表达增高($P < 0.01$),LV-SH-BMP-2 的相对表达量降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 1A。

2.2 ECV304 细胞中 BMP-2 蛋白的表达 Western blot 结果显示:Normal 组、Overexpression-LV-BMP-2 组、LV-SH-BMP-2 组 ECV304 细胞 BMP-2 蛋白表达量为(0.89 ± 0.11)、(1.49 ± 0.05)、(0.43 ± 0.09),3 组间差异有统计学意义($F = 89.83, P < 0.01$)。与 Normal 组比较,Overexpression-LV-BMP-2 组 ECV304 细胞 BMP-2 蛋白的相对表达量增高($P < 0.01$),LV-SH-BMP-2 组相对表达量降低($P < 0.01$),差异有统计学意义。见图 1B。

2.3 ECV304 细胞增殖能力 CCK-8 实验结果:与

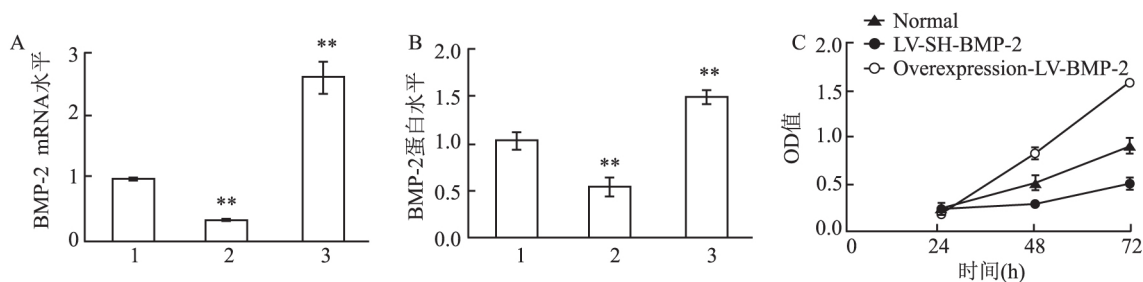


图1 ECV304 细胞中 BMP-2 mRNA 与蛋白的表达及 ECV304 细胞的增殖能力

A、B: ECV304 细胞中 BMP-2 mRNA 与蛋白的表达; C: 各组 ECV304 细胞的增殖能力; 1: Normal 组; 2: LV-SH-BMP-2 组; 3: Overexpression-LV-BMP-2 组; 与 Normal 组比较: ** $P < 0.01$

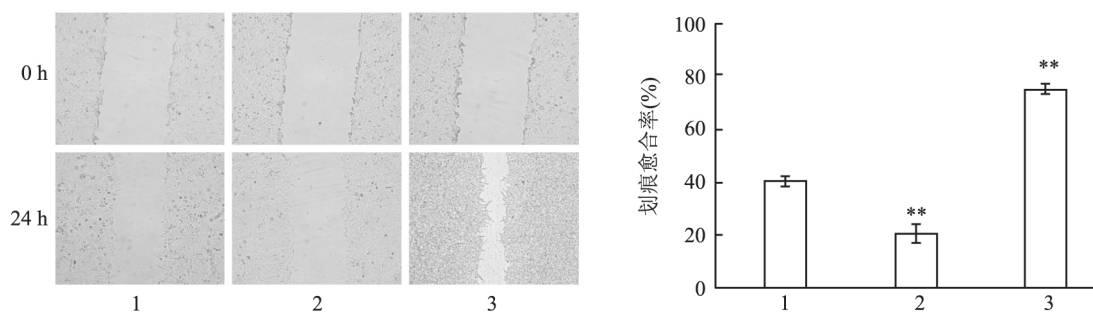


图2 ECV304 细胞的迁移能力 ×100

1: Normal 组; 2: LV-SH-BMP-2 组; 3: Overexpression-LV-BMP-2 组; 与 Normal 组比较: ** $P < 0.01$

Normal 组 (0.76 ± 0.11) 比较, Overexpression-LV-BMP-2 组 ECV304 细胞在 72 h 的增殖能力 (1.43 ± 0.19) 增高 ($P < 0.05$), LV-SH-BMP-2 组 ECV304 细胞在 72 h 的增殖能力 (0.49 ± 0.10) 降低 ($P < 0.05$), 3 组间差异有统计学意义 ($F = 326.5, P < 0.05$)。见图 1C。

2.4 ECV304 细胞迁移能力 划痕实验结果: Normal 组、Overexpression-LV-BMP-2 组、LV-SH-BMP-2 组 ECV304 细胞划痕愈合率为 (40 ± 4)%、(74 ± 4)%、(11 ± 7)%, 3 组间差异有统计学意义 ($F = 119.1, P < 0.01$)。与 Normal 组比较, Overexpression-LV-BMP-2 组 ECV304 细胞迁移能力增高 ($P < 0.01$), LV-SH-BMP-2 组 ECV304 细胞迁移能力降低 ($P < 0.01$), 差异有统计学意义。见图 2。

2.5 血管生成 Normal 组、Overexpression-LV-BMP-2 组和 LV-SH-BMP-2 组 ECV304 细胞血管数量分别为 (9.32 ± 0.97)、(19.37 ± 0.9)、(1.66 ± 1.73), 3 组间差异有统计学意义 ($F = 70.88, P < 0.01$)。与 Normal 组比较: LV-SH-BMP-2 组及 Overexpression-LV-BMP-2 组差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 3A。

2.6 微血管密度 与 Normal 组 MVD (31.28 ± 1.95) 相比, Overexpression-LV-BMP-2 组小鼠肿瘤组织中的 MVD (57.20 ± 2.01) 增加 ($P < 0.01$), LV-

SH-BMP-2 组小鼠肿瘤组织中的 MVD (15.53 ± 3.82) 降低 ($P < 0.01$), 3 组间差异有统计学意义 ($F = 361.5, P < 0.01$)。见图 3B。

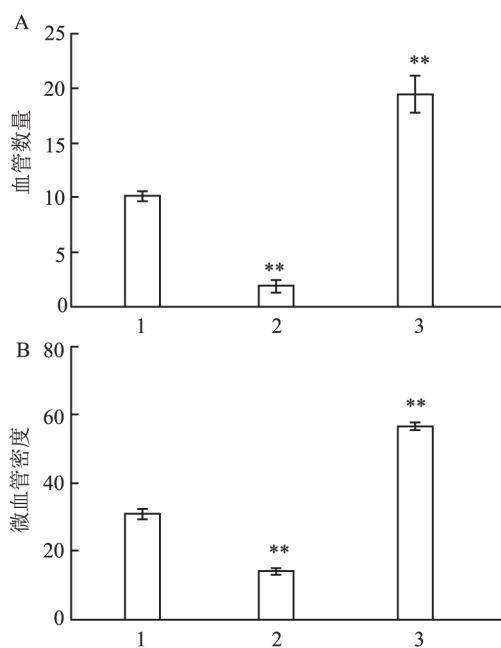


图3 三组 ECV304 细胞血管数量及 MVD

1: Normal 组; 2: LV-SH-BMP-2 组; 3: Overexpression-LV-BMP-2 组; 与 Normal 组比较: ** $P < 0.01$

2.7 血管生成相关蛋白的表达 Western blot 结果显示: Overexpression-LV-BMP-2 组 ECV304 细胞内

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8)、金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、MMP-9 蛋白的表达水平明显高于 Normal 组和 LV-SH-BMP-2 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4。

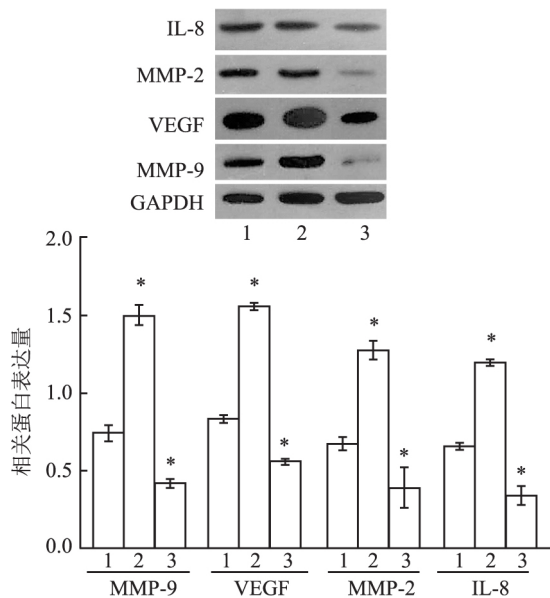


图4 血管生成相关蛋白的表达水平

1: Normal 组; 2: LV-SH-BMP-2 组; 3: Overexpression-LV-BMP-2 组; 与 Normal 组比较: * $P < 0.05$

2.8 体内移植瘤的体积与质量 LV-SH-BMP-2 组 ECV304 细胞的体内移植瘤的体积与质量显著小于 Normal 组 ECV304 细胞 ($P < 0.05$); 然而, Overexpression-LV-BMP-2 组 ECV304 细胞的体内移植瘤的体积与质量大于 Normal 组 ($P < 0.05$), 见图 5。

3 讨论

骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMPs) 是一种多功能分泌细胞因子。最初发现这些 BMPs 能够诱导骨和软骨的形成和发育^[3], 近年发现 BMPs 在多种癌细胞 (前列腺癌、肺癌、乳腺癌、胃癌、肝癌和卵巢癌等) 中异常表达^[4-5]。如 BMP-2 在肺癌组织中的 mRNA 表达明显高于相应的正常组织, 下调 BMP-2 表达可显著抑制 A549 和 H460 细胞的增殖和迁移^[6]。使用慢病毒或 BMP-2 抗体抑制 BMP-2 的活性可导致肺肿瘤生长速度下降^[7]。用 DMH1 (BMP-2 抑制剂) 阻断 BMP 信号传导可抑制非小细胞肺癌的增殖、迁移和侵袭能力, 促进细胞死亡。有研究^[8]通过 qRT-PCR 检测鼻咽癌和对应癌旁组织中 BMP-2 的表达水平, 结果显示 BMP-2

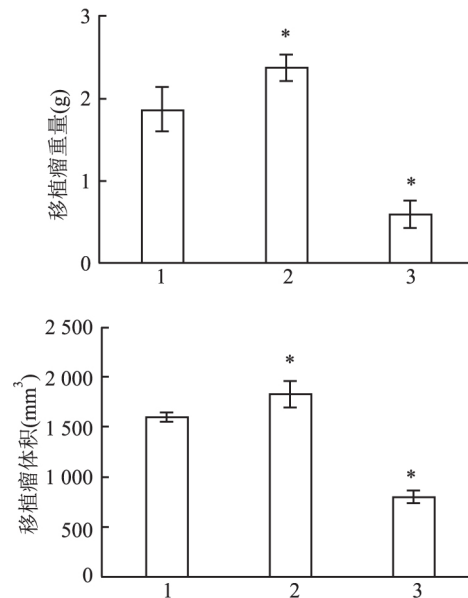
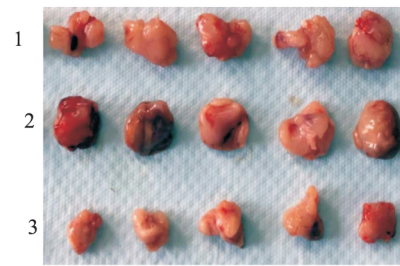


图5 体内移植瘤的体积与重量

1: Normal 组; 2: Overexpression-LV-BMP-2 组; 3: LV-SH-BMP-2 组; 与 Normal 组比较: * $P < 0.05$

mRNA 在癌组织中高于癌旁组织。体外过表达 BMP2 可促进鼻咽癌细胞增殖和侵袭性, 内源性敲低 BMP-2 后, 结果与之相反。BMP-2 也可通过激活 PI3K/AKT 和 MEK/ERK 通路促进胃癌细胞的迁移与侵袭^[9]。Kim et al^[10]研究表明 BMP-2 通过促进肿瘤干细胞增殖, 来增强结肠癌细胞的运动性和侵袭性, 在结肠癌转移中发挥重要作用。BMP-2 沉默可以通过 MAPK/ERK 通路下调 MMP-2 和 MMP-9 来抑制肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[11]。众所周知, 血管生成在恶性肿瘤的发生发展、侵袭和转移中起着重要的作用。VEGF 是最强的促血管生成因子, VEGF 沉默后可通过 PI3K/AKT (phosphatidylinositol 3-kinase, Serine/threonine kinase) 信号通路抑制 HCC 进展和促进细胞凋亡并减少骨肉瘤中的血管发生^[9-11]。据文献^[12]报道, BMP-2 通过刺激 VEGF 分泌来促进血管生成。BMP-2 也可通过刺激分化抑制因子和促分裂素原活化蛋白激酶途径参与肿瘤血管生成^[12]。敲低 BMP-2 后可抑制 MAPK/p38 和 MAPK/ERK1/2 途径导致 VEGF-C 的表达降低^[13]。

两种血管生成因子 VEGF 和 BMP-2 在肺恶性肿瘤的生物学评估中起重要作用, BMP-2 可以增强进展性肺肿瘤的血管生成能力^[4]。BMP-2 可以增强 VEGF 和成纤维细胞生长因子-2 对血管生成活性的作用。组织或者肿瘤发生发展的过程都需要足够多的必需物质, 这些物质的持续输入需要一个快速有效的运输系统, 最重要的就是血管的发生^[5]。

因此, 在本研究中, 用慢病毒在 ECV304 细胞中下调和上调 BMP-2 的表达, Real-time PCR 和 Western blot 结果显示 BMP-2 mRNA 与蛋白表达增高或降低(转染成功), 然后采用 CCK-8、划痕实验、成管实验和 Western blot 检测 ECV304 细胞的增殖、迁移、成管数量和 VEGF、IL-8、MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达量, 结果显示, 与 Normal 组比较, Overexpression-LV-BMP-2 组 ECV304 细胞的增殖能力、迁移能力、生成小管的数量和 VEGF、IL-8、MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达量都增加, LV-SH-BMP-2 组结果与之相反, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 同时体内实验结果显示 Overexpression-LV-BMP-2 组 ECV304 细胞的移植瘤的体积、质量和 MVD 较 Normal 组和 LV-SH-BMP-2 组多, 且差异有统计学意义($P < 0.05$), 体内外实验结果与上述观点一致, 所以 BMP-2 可促进 ECV304 细胞的增殖、迁移和血管生成。因此, BMP-2 将来有可能用于 HCC 的新型抗血管生成的治疗。

参考文献

- [1] Wallace M C, Preen D, Jeffrey G P, et al. The evolving epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global perspective [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, 9(6): 765-79.
- [2] Chu H, Luo H, Wang H, et al. Silencing BMP-2 expression inhibits A549 and H460 cell proliferation and migration [J]. *Diagn Pathol*, 2014, 9:123.
- [3] Wang M H, Zhou X M, Zhang M Y, et al. BMP2 promotes proliferation and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells via mTORC1 pathway [J]. *Aging*, 2017, 9(4):1326-40.
- [4] Katsuno Y, Hanyu A, Kanda H, et al. Bone morphogenetic protein signaling enhances invasion and bone metastasis of breast cancer cells through Smad pathway [J]. *Oncogene*, 2008, 27(49): 6322-33.
- [5] Alarino E L, Kallioniemi A. Bone morphogenetic proteins in breast cancer: dual role in tumorigenesis? [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2010, 17(2):123-39.
- [6] Liao A, Wang W, Sun D, et al. Bone morphogenetic protein 2 mediates epithelial-mesenchymal transition via AKT and ERK signaling pathways in gastric cancer [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(4):2773-78.
- [7] Kim B R, Oh S C, Lee D H, et al. BMP-2 induces motility and invasiveness by promoting colon cancer stemness through STAT3 activation [J]. *Tumor Biol*, 2015, 36(12):9475-86.
- [8] Wu J B, Fu H Q, Huang L Z, et al. Effects of siRNA-targeting BMP-2 on the abilities of migration and invasion of human liver cancer SMMC7721 cells and its mechanism [J]. *Cancer Gene Ther*, 2011, 18(1):20-5.
- [9] Zou Y, Guo C G, Zhang M M. Inhibition of human hepatocellular carcinoma tumor angiogenesis by siRNA silencing of VEGF via hepatic artery perfusion [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(24):4751-61.
- [10] Zhao J, Zhang Z R, Zhao N, et al. Retracted article: VEGF silencing inhibits human osteosarcoma angiogenesis and promotes cell apoptosis via PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 73(2):519-25.
- [11] Deckers M M, van Bezooijen R L, Van d H G, et al. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A [J]. *Endocrinology*, 2002, 143(4): 1545-53.
- [12] Raida M, Clement J H, Leek R D, et al. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and induction of tumor angiogenesis [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2005, 131(11):741-50.
- [13] Zeng P, Cai S, Zhang J N, et al. Effects of siRNA targeting BMP-2 on the biological activities of human liver cancer cells and its mechanism [J]. *Cancer Cell Int*, 2014, 14:55.
- [14] Langenfeld E M, Langenfeld J. Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors [J]. *Mol Cancer Res*, 2004, 2(3):141-9.
- [15] Weigand A, Beier J P, Hess A, et al. Acceleration of vascularized bone tissue-engineered constructs in a large animal model combining intrinsic and extrinsic vascularization [J]. *Tissue Eng Part A*, 2015, 21(9-10):1680-94.

Effects of BMP-2 on proliferation, migration and angiogenesis of ECV304 cells

Feng Pengcheng^{1,2}, Zuo Weiha^{1,2}, Jiang Weimin^{1,2}, et al

(¹ Dept of Oncology, The Affiliated Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006;

² Jiangxi Key Laboratory of Clinical and Translational Cancer Research, Nanchang 330006)

Abstract Objective To investigate the effects of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) on the proliferation,

网络出版时间: 2019-1-11 14:05 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190109.1117.007.html>

缺血预处理诱导的外泌体对心肌细胞低氧/复氧损伤及 Bcl-2、Bax 表达的影响

刘中, 产进中, 黄俊, 张丽, 张野, 何淑芳

摘要 目的 探讨缺血预处理(IPC)诱导的外泌体(exosome)对心肌细胞低氧/复氧(H/R)损伤及凋亡蛋白B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关x蛋白(Bax)表达的影响。方法

SD大鼠进行IPC或对照处理后,提取血清中的外泌体,标记为IPC-Exo、CON-Exo。采用BCA蛋白定量法测定外泌体浓度。H9c2心肌细胞随机分为Control组、H/R组、H/R+IPC-Exo组和H/R+CON-Exo组。除Control组细胞常规培养外,其余各组细胞均给予5h低氧和1h复氧处理,H/R+IPC-Exo组和H/R+CON-Exo组细胞在H/R损伤前分别与相应外泌体共孵育12h。处理结束后,分别检测各组细胞活力、乳酸脱氢酶活性、细胞凋亡和Bcl-2、Bax蛋白表达情况。结果 IPC明显增加血清外泌体释放。与H/R组比较,IPC-Exo与H9c2心肌细胞共孵育,可以增加细胞活力、减少乳酸脱氢酶释放、抑制心肌细胞凋亡,减轻心肌细胞H/R损伤;且能上调Bcl-2表达,下调Bax表达。而CON-Exo与心肌细胞共孵育后,对H/R损伤无明显影响。结论 缺血预处理

诱导的外泌体可以减轻H9c2心肌细胞H/R损伤,其机制可能是通过上调Bcl-2、下调Bax表达,从而发挥心肌保护作用。

关键词 缺血预处理;外泌体;心肌细胞;低氧/复氧损伤;Bcl-2;Bax

中图分类号 R 322.11; R 364.12; R 845.22

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)02-0197-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.02.007

心肌在缺血基础上血流再灌注后损伤反而加重,称为心肌缺血再灌注损伤(ischemic reperfusion injury, IRI)。在急性心肌梗死溶栓治疗、介入治疗以及心脏外科中常常发生再灌注损伤,导致心肌损伤加重,严重影响心功能恢复。Murry et al^[1]首次提出缺血预处理(ischemic preconditioning, IPC)的概念,证实IPC可以减轻IRI,是目前已知最强的内源性心肌保护方法,但至今具体的作用机制仍未完全明确。

外泌体是一种囊泡样小体,其中包含了丰富的蛋白质、核酸,可传输多种信号分子,是介导细胞间通讯的重要物质^[2]。大量研究^[3-4]显示,干细胞来源的外泌体,可作用于受损的心肌组织,抑制心肌细胞凋亡,减少梗死面积,发挥心肌保护作用。然而,外泌体是否参与介导了IPC的心肌保护作用,尚未

2018-09-12 接收

基金项目:安徽省高等学校自然科学研究项目重点项目(编号:KJ2017A172)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院麻醉与围术期医学科,合肥230601

作者简介:刘中,男,硕士研究生;

何淑芳,女,博士,副研究员,硕士生导师,责任作者, E-mail: hsf77@163.com

migration and angiogenesis of ECV304 cells (human umbilical vein endothelial cells). **Methods** The lentiviral expression vector was constructed and transfected into ECV304 cells. The expression of BMP-2 was different in ECV304 cells. The experiment was divided into Normal group, LV-SH-BMP-2 group and Overexpression-LV-BMP-2 group. CCK-8, scratch assay, Western blot, and tube formation assay were used to detect the proliferation, migration, angiogenesis-related protein expression and angiogenesis of ECV304 cells. After co-culture, the subcutaneously transplanted tumor model was injected subcutaneously into the right armpit of nude mice to observe the growth and microvessel density (MVD) of the transplanted tumor. **Results** The proliferation, migration, angiogenesis-related protein expression and angiogenesis of ECV304 cells in Overexpression-LV-BMP-2 group were significantly higher than those in Normal group and LV-SH-BMP-2 group. The difference was statistically significant ($P < 0.05$); *In vivo* experiments showed that the volume, weight and microvessel density in ECV304 cells in Overexpression-LV-BMP-2 group were significantly higher than those in Normal group and LV-SH-BMP-2 group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** BMP-2 can promote ECV304 cell proliferation, migration and angiogenesis.

Key words bone morphogenetic protein 2; ECV304 cells; proliferation; migration; angiogenesis