

三氧化二砷对人脐静脉内皮细胞凋亡及 VCAM-1/ICAM-1 表达的影响

黄杰 宋宇 徐汇川 李凤玲 栾天竹[△] 周立君

(哈尔滨医科大学附属第一医院心内科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的 观察三氧化二砷(As_2O_3)对血管内皮细胞增殖、凋亡及 VCAM-1/ICAM-1 表达的影响,探讨 As_2O_3 对血管内皮细胞增殖生长以及炎症反应的影响。方法:人脐静脉内皮细胞(HUVEC)体外培养,以不同 As_2O_3 浓度及时间对其进行干预。采用 CCK-8 测定细胞增殖活性,流式细胞仪 Annexin /PI 双染法检测细胞的凋亡率,实时荧光定量 PCR 检测 VCAM-1mRNA 表达,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞间黏附分子(VCAM-1)及血管细胞黏附分子(ICAM-1)的表达情况。结果:当 As_2O_3 浓度在 $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 HUVEC 培养 24 h 的的凋亡率为 $(0.134 \pm 0.03)\%$, 48 h 为 $(3.305 \pm 0.53)\%$, 72 h 为 $(3.748 \pm 0.84)\%$ ($P < 0.05$), 凋亡率均在一较低水平。当 As_2O_3 浓度 $> 3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 HUVEC 凋亡率明显增加 ($P < 0.01$)。不同浓度 As_2O_3 作用 HUVEC 48 h 后检测上清液中 ICAM-1 与 VCAM-1 浓度时发现 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 VCAM-1 表达即开始增加 ($123.32 \pm 3.78 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $P < 0.01$), 而 HUVEC 表达 ICAM-1 含量与对照组相比差异并不明显 ($38.94 \pm 2.59 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $P > 0.05$), 随着 As_2O_3 浓度的增加, HUVEC 表达 ICAM-1/VCAM-1 的量均增加但敏感性不同。对照组及 $(1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As_2O_3 作用于 HUVEC 48 h 实时荧光定量 PCR 法检测 VCAM-1mRNA 表达量明显增加, 与对照组相比实验组的表达量分别为 $(1.657 \pm 0.287, 1.858 \pm 0.241, 2.321 \pm 0.280, 3.012 \pm 0.235, 3.508 \pm 0.342)$ ($P < 0.01$)。结论 As_2O_3 可直接降低细胞活性,诱导细胞凋亡,并且呈一定的时间-浓度依赖性。在较低浓度时 VCAM-1/ICAM-1 的表达在一个相对较低的水平,随着 As_2O_3 浓度的逐渐升高,内皮细胞凋亡率增高, VCAM-1/ICAM-1 表达增加,并且 VCAM-1/ICAM-1 对 As_2O_3 的敏感性呈现一定的差异性。

关键词 三氧化二砷;人脐静脉内皮细胞;凋亡;VCAM-1;ICAM-1

中图分类号: Q78, Q813, R318 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)14-2647-04

Influences of Arsenic Trioxide on Proliferation/Apoptosis and Expression of ICAM-1/VCAM-1 of Human Umbilical Vein Endothelial Cells

HUANG Jie, SONG Yu, XU Hui-chuan, LI Feng-ling, LUAN Tian-zhu^A, ZHOU Li-jun

(The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of arsenic trioxide (As_2O_3) on the proliferation and apoptosis of endothelial cells and the influences of As_2O_3 on the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in vitro. **Methods:** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were incubated in medium with different concentration of As_2O_3 . The proliferation profile of HUVEC was determined by CCK8 Kit. The apoptosis of HUVEC was detected by microscopy and flow cytometry (FCM). The expression of ICAM-1/VCAM-1 was detected by applying ELISA and Real-time PCR. **Results:** The apoptosis rate of HUVEC was in a low level valued $(0.134 \pm 0.03)\%$, $(3.305 \pm 0.53)\%$, $(3.748 \pm 0.84)\%$ ($P < 0.05$) when incubated in medium with $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of As_2O_3 for 24 h, 48 h and 72 h. When the concentration of As_2O_3 was more than $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, the apoptosis rate of HUVEC promoted significantly ($P < 0.01$). The outcomes of ELISA showed that, compared with that in control group, the expression of VCAM-1 increased significantly (valued $123.32 \pm 3.78 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $P < 0.01$), while the expression of ICAM-1 did not change ($P > 0.05$), when incubated in medium with $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of As_2O_3 . With the increasing of the concentration of As_2O_3 , the reaction of ICAM-1/VCAM-1 to As_2O_3 was different. The expression of VCAM-1 mRNA (fold of change) were $(1.657 \pm 0.287, 1.858 \pm 0.241, 2.321 \pm 0.280, 3.012 \pm 0.235, 3.508 \pm 0.342)$ ($P < 0.01$) in 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ groups, respectively. **Conclusion:** Arsenic trioxide can promote the apoptosis of HUVEC, increase the expression of VCAM-1/ICAM-1 in a dosage and time dependent manner.

Key words: Arsenic trioxide; Human umbilical vein endothelial cells; Apoptosis; Intercellular adhesion molecule-1; Vascular cell adhesion molecule-1

Chinese Library Classification(CLC): Q78, Q813, R318 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2012)14-2647-04

作者简介: 黄杰(1986-) 男 医学硕士 医师, 主要研究方向: 冠心病

的基础与临床 电话: 0451-85555058 E-mail: jesses163@163.com

[△]通讯作者: 栾天竹, E-mail: luantianzhu1997@163.com

(收稿日期: 2011-11-05 接受日期: 2011-11-30)

前言

在冠状动脉介入治疗(PCI)过程中,内皮细胞会受到来自球囊扩张的机械损伤以及药物涂层支架上涂层药物的化学损伤。内皮细胞受损后在多种有害因素的刺激下,释放大量的细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)、组织因子(TF)、vWF(von Willebrand Factor)等炎症相关因子^[1],这些因子的表达增强了内皮细胞黏附白细胞(以单核细胞为主)以及其他炎症反应细胞的能力,单核细胞继之进入内皮下,导致血管成形术局部发生炎症反应,成为术后再狭窄的始动因素^[2]。TF、vWF表达的增加促进了凝血过程,使支架内血栓形成的几率增加。内皮细胞黏附性的变化,尤其是选择性黏附单核细胞作用的黏附分子的异常表达是支架内再狭窄发生发展中的最早期变化,对支架内再狭窄的启动具有决定意义。目前临床上使用的涂层药物多为抗增殖类药物,这些药物对内皮细胞均产生不同程度的损伤,造成局部的炎症反应、再内皮化的延迟或缺失,最终导致支架内再狭窄^[3]。因此遴选出一种对内皮细胞影响相对较小的涂层药物在防止支架内再狭窄的发生中意义重大。

三氧化二砷作为一种抗肿瘤剂其作用机制是通过改变细胞正常染色体结构,抑制细胞所含的巯基酶活性,改变细胞线粒体通透性,干扰细胞代谢,从而诱导肿瘤细胞凋亡^[4,5]。由于它的疗效稳固,副作用少,而广泛应用于临床治疗白血病、胃癌及子宫颈癌等恶性肿瘤。

As₂O₃涂层支架目前已进入动物实验阶段^[6,7],但其对内皮细胞影响的研究尚缺乏。本研究通过体外观察不同浓度As₂O₃对血管内皮细胞增殖、凋亡以及VCAM-1/ICAM-1表达的影响,探讨As₂O₃对血管内皮细胞生长及炎症反应的影响。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

人脐静脉内皮细胞系(美国ATCC-CRL2873),DMEM培养基(美国HYCLONE公司),As₂O₃购自哈尔滨伊达药业有限公司,CCK-8试剂盒、Annexin FITC和PI试剂盒(北京宝赛生物工程有限公司),ICAM-1、VCAM-1酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(武汉博士德生物技术公司),RNA提取试剂盒(北京匹基生物有限公司),Trizol(美国HYCLONE公司),Quant One Step qRt-PCR(SYBK Green 1)试剂盒(北京奥科生物有限公司)。

1.2 人脐静脉内皮细胞培养及传代

将HUVEC细胞株常规复苏后悬浮于4 ml DMEM完全培养基中,以 5×10^4 /ml细胞密度接种至含5 ml DMEM完全培养基的12.5 cm²培养瓶中,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养,24 h内换液一次,以后根据培养基颜色及细胞生长情况2-3 d换液一次,当细胞融合80%以上即传代。

1.3 实验分组

本实验分为6组,分别为空白对照组(不加干预因素),以及1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃组(作用于HUVEC的最终浓度为1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。N=3 n=6(N:实验重复次数 n 每个实验组检测次数)

1.4 细胞增殖与毒性实验(CCK-8)

脐静脉内皮细胞以 5×10^3 个/孔接种于96孔板中。培养4-6 h待细胞完全贴壁后轻轻吸走培养液,在各孔中分别加入含浓度为1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃的培养基,培养基总量为200 μl ,设正常培养基组为对照组。培养48小时后弃去原培养液,避光环境中加入100 μl 正常培养基和10 μl cck-8试剂(96孔板左上角第一孔设为调零孔),置于培养箱中反应4小时后,酶标仪450 nm检测每个孔的吸光度(OD)值。每组设6个重复孔。

1.5 细胞凋亡的流式细胞术(FCM)检测

不同浓度As₂O₃对HUVEC凋亡率的影响以流式细胞仪(Beckman Coulter FCM)检测。HUVEC接种于6孔板内,4-6 h待细胞贴壁后,加入不同浓度As₂O₃组进行干预,不加药组设为对照组加维持液,分别作用于24 h、48 h、72 h,细胞消化收集后调整细胞密度为 1×10^6 /ml,将其吹打成单细胞悬液,离心,弃上清,采用Annexin FITC/PI试剂盒进行细胞双染,按试剂盒说明书进行操作。

1.6 实时荧光定量PCR检测VCAM-1 mRNA表达

(1)引物设计与合成:VCAM-1的cDNA序列从GeneBank(GeneBank登录号NM_001078)中获得并参照文献设计,引物由上海生物有限公司合成。VCAM-1上游引物5'-3': CATGACCTGTTCCAGCGAGG,下游引物3'-5': CATTACAGAGGCC-ACCACTC。扩增片段长381bp,采用3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内对照,上游引物5'-3': GTACGTCGTGGAGTCCACTG,下游引物5'-3': TCCACCACCCTGTTGCTGTA,扩增片段长698 bp。

(2)RNA提取与逆转录:用Trizol一步法提取RNA,于6孔板内每孔加入1 ml Trizol,用加样器吹至液体澄清无细胞团块,颠倒混匀,于室温内放置5 min后,加入氯仿0.2 ml,颠倒混匀15 s,4℃离心15 min,取水相加入等体积的异丙醇混匀后于-20℃中1 h,4℃离心10 min,弃上清,加入预冷的75%乙醇1 ml,4℃离心5分钟,弃上清,风干后溶于DEPC水中待用,逆转录按试剂盒说明书操作。

(3)SYBK Green实时定量PCR:按Quant One Step qRt-PCR(SYBK Green 1)试剂盒说明书操作,取各组细胞总mRNA 10 μl 逆转录成cDNA,再取2 μl 逆转录产物进行PCR循环。扩增条件:预变性94℃ 2 min,进入循环,94℃ 15 s,55℃ 15 s,68℃ 31 s,40次循环后延伸72℃ 5 min。在荧光定量PCR分析仪上(美国TE公司TE5700)进行扩增。

1.7 ELISA法检测VCAM-1/ICAM-1的表达

HUVEC以 1×10^6 /ml接种于96孔板内,4-6 h待细胞贴壁后,以不同浓度As₂O₃干预48 h(对照组加维持液),取细胞上清液待用,严格按试剂盒说明操作。分别设空白孔、标准品孔及待测样品孔。在酶标包被板上标准品孔中加入稀释好的标准品50 μl ,在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液40 μl ,然后再加待测样品10 μl ,轻轻晃动混匀,37℃温育30 min。弃去液体,甩干,每孔加满稀释液后洗涤,震荡30 s,甩去洗涤液,用吸水纸拍干,重复5次,拍干后,每孔先加显色剂A 50 μl ,再加入显色剂B 50 μl ,轻轻震荡混匀,37℃避光显色10 min,取出酶标板,每孔加终止液50 μl ,终止反应。测定:以空白孔调

零,在 450 nm 波长下测定各孔的吸光度值(OD 值)。根据标准品的浓度及对应的 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程,再根据样品的 OD 值在回归方程上计算出对应的样品浓度。

1.8 统计方法

采用 SPSS17.0 统计软件,数据结果以均值 $\pm$ 标准差表示。各组间进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间两两比较用 LSD 法检验。以 $P<0.05$ 为差异标准,以 $P<0.01$ 为差异性显著标准。

2 结果

2.1 细胞生长情况观察

倒置显微镜观察细胞生长形态。对照组细胞培养 2-3 天融

合成单层细胞,密集处呈铺路石样或多角形外观,稀疏处呈圆形或椭圆形,胞核清晰,细胞边缘光整,折光度好,细胞排列紧密。当三氧化二砷浓度为 $4.0, 5.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用于内皮细胞时,逐渐细胞皱缩,变圆浮起,有多数细胞裂解为碎片,三氧化二砷浓度低于 $3.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时则对内皮细胞的形态无明显影响。

2.2 三氧化二砷对 HUVEC 增殖活性的影响(CCK8)

通过观察发现 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{As}_2\text{O}_3$ 与 HUVEC 共同培养 24 h 后即可对 HUVEC 的增殖产生影响($P<0.05$),其余各浓度 As_2O_3 组与对照组间的增殖差异也有统计学意义($P<0.05$)。HUVEC 与 As_2O_3 培养 48 h 后增殖差异更加明显($P<0.01$),并且不同时间组间 HUVEC 增殖差异有统计学意义($P<0.05$), As_2O_3 以时间-剂量依赖方式抑制 HUVEC 的增殖(见表 1)。

表 1 As_2O_3 对 HUVEC 增殖活性的影响(CCK8)(OD 值: $\bar{x}\pm s$)

Table 1 The proliferation profile of HUVEC (CCK8) (OD value: $\bar{x}\pm s$)

Group	24 h	48 h
Control	0.732 $\pm$ 0.006	0.904 $\pm$ 0.020
1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{As}_2\text{O}_3$	0.718 $\pm$ 0.011*	0.693 $\pm$ 0.029 Δ^{Δ}
2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{As}_2\text{O}_3$	0.698 $\pm$ 0.010*	0.687 $\pm$ 0.043 Δ^{Δ}
3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{As}_2\text{O}_3$	0.681 $\pm$ 0.008*	0.650 $\pm$ 0.023 Δ^{Δ}
4.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{As}_2\text{O}_3$	0.672 $\pm$ 0.011*	0.626 $\pm$ 0.050 Δ^{Δ}
5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{As}_2\text{O}_3$	0.661 $\pm$ 0.015*	0.619 $\pm$ 0.021 Δ^{Δ}

注:与对照组比较,* $P<0.05$, Δ $P<0.01$;与 24h 比较, Δ^{Δ} $P<0.05$;

Note: * $P<0.05$, Δ $P<0.01$ compared with control group; Δ^{Δ} $P<0.05$ compared with 24h group.

2.3 不同浓度 As_2O_3 对 HUVEC 凋亡的影响

Annexin-FITC/PI 双染后流式细胞仪检测结果显示,随着 As_2O_3 浓度的增加以及药物干预时间的延长 HUVEC 的凋亡率呈现时间-浓度依赖性(如图)。

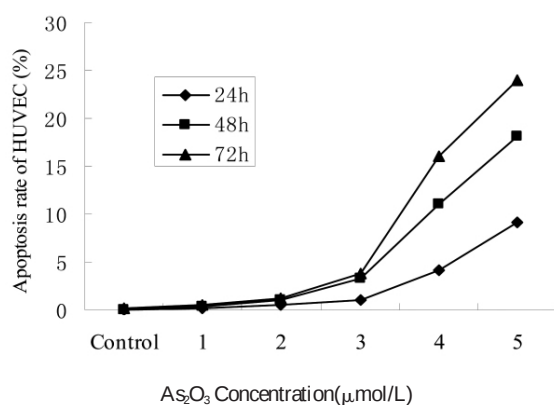


图 1 As_2O_3 对 HUVEC 凋亡率的影响

Fig.1 Apoptosis rate of HUVEC(%)

2.4 不同浓度 As_2O_3 对 HUVEC ICAM-1/VCAM-1 表达的影响(ELISA)

不同浓度 As_2O_3 作用 HUVEC48 h 后检测上清液中 ICAM-1 与 VCAM-1 浓度时发现在正常情况下内皮细胞仅表达少量的

ICAM-1 及 VCAM-1,当 As_2O_3 浓度为 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 VCAM-1 表达即开始增加($123.32\pm 3.78 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $P<0.01$),而 HUVEC 表达 ICAM-1 含量与对照组相比差异并不明显($38.94\pm 2.59 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $P>0.05$)。随着 As_2O_3 浓度的增加 HUVEC 表达 ICAM-1、VCAM-1 的敏感性亦不同(如图 2)。

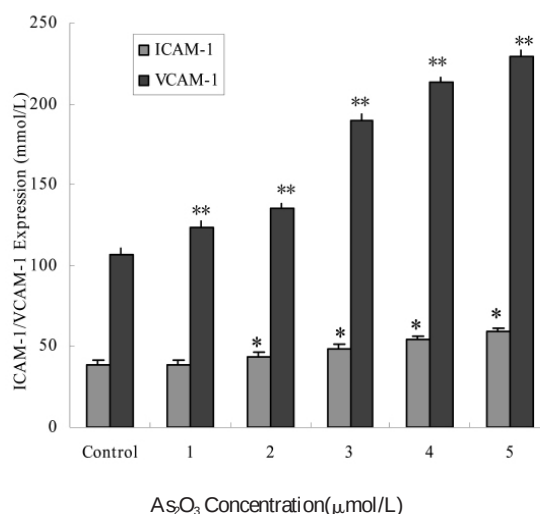


图 2 As_2O_3 作用 48h HUVEC 表达 ICAM-1/VCAM-1(* $P<0.05$,** $P<0.01$)

Fig.2 Expression of ICAM-1/VCAM-1 when incubated with As_2O_3 for 48h (* $P<0.05$,** $P<0.01$)

2.5 As₂O₃ 对 HUVEC VCAM-1 mRNA 表达的影响

不同浓度 As₂O₃ 作用 HUVEC 48h 实时荧光定量 PCR 检测结果显示,与对照组相比各浓度组 VCAM-1 mRNA 表达逐渐增加,差异具有统计学意义($P < 0.01$)(图 3)。

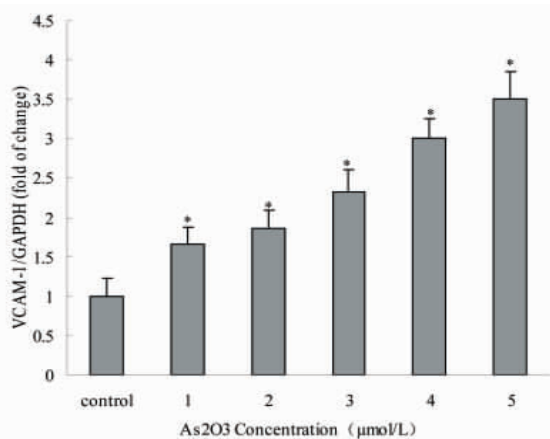


图 3 As₂O₃ 作用 48h HUVEC 表达 VCAM-1 mRNA ($P < 0.01$)

Fig.3 Expression of VCAM-1 mRNA when incubated with As₂O₃ for 48h (fold of change) ($P < 0.01$)

3 讨论

PCI 术后支架内再狭窄的发生是一多因素、多基因调控的复杂过程,其本质是机体对损伤的过度愈合反应。研究证实再狭窄的病理基础为血管壁受到机械性扩张,以及涂层药物的化学刺激,内皮受损继而大量炎性因子、黏附因子等物质释放,从而引起血管平滑肌细胞的迁移和增殖、细胞外基质的增生,促进再狭窄的发生和发展^[8-10]。本课题组在先前的研究中发现论三氧化二砷能够在体外促进人冠状动脉平滑肌(HCASM)的凋亡,降低 HCASM 转录因子 E2F-1 mRNA 及基质 EMAP-的表达,从而抑制 HCASM 的过度增殖、迁移和黏附^[11-13]。目前 PCI 术后血管内皮细胞的损伤、修复及功能改变在支架内再狭窄形成过程中的作用受到越来越多的重视。多数学者认为再狭窄的初始过程是内皮细胞受到支架的机械及化学刺激后而产生的炎症反应^[14]。

内皮细胞黏附分子在内皮细胞受损过程中起重要作用。在正常情况下内皮细胞表面黏附分子呈现低表达或不表达,在某些病理因素下如心脏缺血再灌注、心脏移植术后,以及 IL-8、IL-6 等炎性因子刺激下,内皮细胞黏附分子表达量可成倍增加,他的高表达可引起一系列与心血管疾病相关的细胞因子的释放,在再狭窄早期形成过程中有重要意义。

ICAM-1、VCAM-1 属于免疫球蛋白超家族类,他们作为白细胞表面黏附分子-整合素的配体,在白细胞与内皮细胞的后期牢固性黏附及穿越内皮细胞迁移的过程中起关键性作用^[15]。因此研究如何干预黏附分子 ICAM-1、VCAM-1 的表达,及其与炎症反应和组织器官功能之间的相互关系,并通过减轻或避免内皮细胞损伤来改善局部炎症反应具有重要意义。

本实验观察了不同浓度及时间下 As₂O₃ 对内皮细胞增殖与凋亡,ICAM-1、VCAM-1 表达的影响,结果发现脐静脉内皮细胞对三氧化二砷的反应呈现一种剂量—时间依赖性。当三氧

化二砷浓度较低时(1,2,3 μmol·L⁻¹)对脐静脉内皮细胞增殖及凋亡的影响即有统计学意义,但是停留在一个较低的水平,ICAM-1、VCAM-1 的表达亦在一较低的水平。随着药物浓度的加大以及作用时间的延长,脐静脉内皮细胞的凋亡率增加,ICAM-1、VCAM-1 的表达亦增加。从中我们也发现当 As₂O₃ 浓度为 1 μmol·L⁻¹ 时 ICAM-1 的表达差异并无统计学意义,对 ICAM-1 表达的影响不明显,其原因可能为 As₂O₃ 与 ICAM-1 之间的结合位点不明确,从而对负性调节因素变的不敏感,妨碍了其作用效果,也可能与 ICAM-1 在 As₂O₃ 刺激 48 h 时表达不明显,未被上调到最大浓度有关。

三氧化二砷的药用价值正逐步得到开发,研究者正逐步将其引入到心血管支架的应用领域,但其基础研究支持相对较为薄弱,本研究为三氧化二砷支架的研发在一定程度上提供基础理论支持。

参考文献(References)

- [1] Walpole PL, Gotlieb AI, Cybulsky MI, et al. Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15(1): 2-10
- [2] Goldberg SL, Loussarian A, De Gregorio J, et al. Predictors of diffuse and aggressive intra-stent restenosis[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2001, 37(4): 1019-1025
- [3] Sprague EA. In vivo cardiovascular assays for drug discovery: Evolution of the drug-eluting stent [J]. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 2007, 8(3): 219-225
- [4] Dai J, Weinberg RS, Waxman S, et al. Malignant cells Can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic through modulation of the glutathione[J]. *Blood*, 1999, 93(2): 268-277
- [5] Chen ZX, Chen GQ, Ni JH, et al. Use of arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients [J]. *Blood*, 1997, 89(12): 3354-3360
- [6] 田文杰, 杨巍, 葛均波, 等. 三氧化二砷洗脱支架抑制猪损伤冠状动脉局部炎性因子的表达 [J]. *中华老年医学杂志*, 2009, 28(2): 152-155
Tian Wen-jie, Yang Wei, Ge Jun-bo, et al. The effects of arsenic trioxide eluting stents on expression of inflammatory factors in injured coronary arteries in pigs [J]. *Chinese Journal of Geriatrics*, 2009, 28(2): 152-155
- [7] 杨巍, 葛均波, 刘红玲, 等. 三氧化二砷洗脱支架防治兔血管损伤后再狭窄的实验研究[J]. *中华心血管病杂志*, 2006, 34(1): 14-17
Yang Wei, Ge Jun-bo, Liu Hong-ling, et al. Arsenic trioxide eluting stents to prevent restenosis of injured iliac arteries in rabbits[J]. *Chinese Journal of Cardiology*, 2006, 34(1): 14-17
- [8] Reidy MA. A reassessment of endothelial injury and arterial lesion formation[J]. *Lab Invest*, 1985, 53(5): 513-520
- [9] Clowes AW, Clowes MM, Reidy MA. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. III. Endothelial and smooth muscle growth in chronically denuded vessels[J]. *Lab Invest*, 1986, 54(3): 295-303
- [10] Nobuyoshi M, Kimura T, Ohishi H, et al. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: pathologic observations in 20 patients[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1991, 17(2): 433-439

(下转第 2646 页)

和 3 个内含子组成,编码 305 个氨基酸,是维持干细胞自我增殖和多向分化的关键性基因。Nanog 除了在胚胎发育早期和胚胎干细胞表达外,有研究表明 Nanog 基因在睾丸原位癌、胚胎性癌和精原细胞瘤等^[9]生殖细胞肿瘤中特异性表达,随后研究表明 Nanog 基因在乳腺癌、神经胶质瘤、膀胱癌等^[10]实体肿瘤中也可以表达,肿瘤级别越高,Nanog 基因的表达越强,临床预后越差,并且高级别肿瘤具有胚胎干细胞的特性。这与我们的研究结果相符。因此探讨 Nanog 在卵巢癌组织、普通的卵巢癌细胞及卵巢癌干细胞中的表达与卵巢癌的发生、发展有重要的意义。

目前研究^[9]发现 Nanog 基因具有 11 个假基因,与 Nanog 基因的 mRNA 序列同源性很高,假基因是不转录的。本研究设计的 Nanog 基因及 hGAPDH 引物均跨越内含子,但实验过程中发现组织提取 RNA 如不经过 DNA 酶处理,PCR 扩增结果均为阳性表达,原因在于假基因的存在。因此实验中我们同时应用 DNA 酶处理,可以保证反转录不受基因组 DNA 的干扰,即不受假基因的干扰,保证结果的准确性。

本研究结果显示 Nanog mRNA 和蛋白的表达在卵巢癌的阳性表达率明显高于正常卵巢组织和良性卵巢肿瘤,并且其表达强度随着临床分期和病理分级的增高而升高,分期越晚、级别越高表达水平越强,表明 Nanog 基因与卵巢癌的发生有关,且在一定程度上影响着分化程度。同时 Nanog 基因在卵巢癌组织中的返祖性表达,表明其可能是与分化相关的重要调节因子,可能引起正常细胞向相反方向演变,使肿瘤细胞维持低分化或者未分化状态,为卵巢癌组织中肿瘤干细胞的存在提供理论依据。

先期实验^[9]已通过无血清培养法从卵巢癌细胞系 SKOV-3 中成功分离出悬浮生长的肿瘤细胞球,并且高表达 CD117 的肿瘤干细胞球较贴壁的 SKOV-3 肿瘤细胞具有强侵袭力、耐药性等多种肿瘤干细胞的特性,因此本研究采用流式细胞仪检测悬浮细胞球中 CD117 表达情况对肿瘤干细胞进行鉴定,对鉴定后的细胞球和肿瘤细胞进行 Nanog 基因的检测,结果显示 Nanog mRNA 和蛋白在卵巢癌细胞系 SKOV-3 和高表达 CD117 的卵巢癌干细胞中均表达,且在悬浮细胞干细胞球中的表达水平明显高于贴壁生长的 SKOV-3 细胞。表明卵巢癌干

细胞中高表达 Nanog 基因,且具有强侵袭力及耐药性。因此 Nanog 可能是卵巢癌干细胞的表面标志物,但尚不能说 Nanog 阳性细胞一定为肿瘤干细胞,尚需要进一步研究。

综上所述,Nanog 基因在卵巢癌组织和 SKOV-3 中均高表达,且通过无血清悬浮培养富集的肿瘤干细胞表达水平显著高于 SKOV-3 肿瘤细胞,表明 Nanog 基因在卵巢癌的发生和进展中起到重要的作用,有望成为判定卵巢上皮性癌恶性程度的参考指标,为研究卵巢癌的起源及生物学行为提供新途径。但是 Nanog 基因如何决定肿瘤细胞的干细胞特性,其在卵巢癌组织中的作用机制、分子信号传导通路等问题均未解决,尚需要进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells [J]. Cell, 2003, 113(5):643-655
- [2] Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and cells [J]. Cell, 2003, 113(5):631-642
- [3] Huntly BJ, Gilliland DG. Cancer biology: summing up cancer stem cells [J]. Nature, 2005, 435(7046):1169-1170
- [4] AL-HAJJ M, CLARKE MF. Self-renewal and solid tumor stem cells [J]. Oncogene, 2004, 23(43):7274-7282
- [5] Yamaguchi S, Kimura H, Tada M, et al. Nanog expression in mouse germ cell development [J]. Gene Expr Patterns, 2005, 5(5):639-646
- [6] Hart AH, Hartley L, Parker K, et al. The pluripotency homeobox gene NANOG is expressed in human germ cell tumors [J]. Cancer, 2005, 104(10):2092-2098
- [7] Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, et al. An embryonic stem Cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors [J]. Nat Genet, 2008, 40(5):499-507
- [8] Booth HA & Holland PW. Eleven daughters of NANOG [M]. Genomics, 2004, 84(2):229-238
- [9] 武加利, 纪新强, 刘佳, 等. 人卵巢癌干细胞的分离培养和初步鉴定 [J]. 现代妇产科进展, 2010, 19(12):893-896
Wu Jia-li, Ji Xin-qiang, Liu Jia, et al. Isolation and initial identification of human ovarian cancer stem cells [J]. Prog Obstet Gynecol, 2010, 19(12):893-896
- [10] 2010, 19(3):253-246
- [11] 栾天竹, 梅宇, 许冬秀, 等. 三氧化二砷对球囊拉伤后兔血管平滑肌细胞作用的实验研究 [J]. 中华医学杂志, 2003, 83(10): 859-861
Luan Tian-zhu, Mei Yu, Xu Dong-xiu, et al. Effect of arsenic trioxide on rabbit vascular smooth muscle cells after balloon angioplasty [J]. National Medical Journal of China, 2003, 83(10): 859-861
- [12] 栾天竹, 季洪亮, 傅松滨, 等. 三氧化二砷对人冠状动脉平滑肌细胞及基质作用的实验研究 [J]. 中华急诊医学杂志, 2010, 19(3): 253-246
Luan Tian-zhu, Ji Hong-liang, Fu Song-bin, et al. Effects of arsenic trioxide on E2F-1 and EMAP- of smooth muscle cells of human coronary artery in vitro [J]. Chinese Journal of Emergency Medicine, 2010, 19(3):253-246
- [13] 栾天竹, 傅松滨, 周立君, 等. 三氧化二砷对人冠状动脉平滑肌细胞作用的体外观察 [J]. 中华医学杂志, 2009, 89(2): 133-137
Luan Tian-zhu, Fu Song-bin, Zhou Li-jun, et al. Effects of arsenic trioxide on human coronary smooth muscle cells: experiment in vitro [J]. National Medical Journal of China, 2009, 89(2):133-137
- [14] Komatsu R, Ueda M, Naruko T, et al. Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans: macroscopic, histological, and immunohistochemical analyses [J]. Circulation, 1998, 98(3): 224-233
- [15] Nakae H, Endo S, Yamada Y, et al. Bound and soluble adhesion molecule and cytokine levels in patients with severe burns [J]. Burns, 2000, 26(2): 139-144