

最新医学信息文摘(连续型电子期刊), 2019, 19(99): 95-97.

(2) 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (J). 中国实用内科杂志, 2018, 38(4): 328.

(3) 中华医学会妇产科分会产科学组, 中华医学会围产医学分会妊娠合并糖尿病协作组. 妊娠合并糖尿病诊治指南 (2014) (J). 糖尿病临床, 2014, 8(11): 489-498.

(4) 谭红彤, 陈敏枝, 李雪丹, 等. 产后随访管理对妊娠期糖尿病患者人体成分体脂变化的影响 (J). 中国妇幼保健, 2018, 33(8): 1696-1700.

(5) 刘乐融, 欧阳冬生, 周栋, 等. 妊娠期糖尿病的医学营养治疗进展 (J). 中国糖尿病杂志, 2017, 25(4): 376-380.

(6) 李忆琴, 吴礼凤, 余晓君. 妊娠期糖尿病病人产后糖代谢转归及其相关因素分析 (J). 蚌埠医学院学报, 2017, 42(7): 891-893.

(7) 杨幼林, 赵荷兰, 安利红, 等. 妊娠期糖尿病产妇产后糖尿病发生情况及危险因素研究 (J). 实用预防医学, 2017, 24(6): 696-698.

(8) 韩肖燕, 杨惠霞, 杨桦. 妊娠期糖尿病孕妇晚孕期血脂浓度检测的临床意义 (J). 中华妇幼临床医学杂志(电子版), 2019, 15(1): 22-26.

〔文章编号〕 1007-0893(2021)14-0033-03

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2021.14.013

低氧条件下 BMSCs 来源外泌体激活 HIF-1 α /VEGF/JNK 通路促进血管再生的机制研究

陈海燕 张秋菊

(东莞市滨海湾中心医院, 广东 东莞 523900)

〔摘要〕 **目的:** 探讨骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 来源的外泌体在低氧条件下增强血管生成的机制。**方法:** 超速离心法提取常氧和低氧条件 BMSCs 外泌体; 分别处理人脐静脉内皮细胞 (HUVECs), CCK-8 法检测细胞活性, Transwell 检测细胞迁移情况, 成管试验检测 HUVECs 成血管情况, 同时利用 Westernblot 检测血管生成关键蛋白低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达。**结果:** 低氧条件下 BMSCs 释放的外泌体促进 HUVECs 的增殖、迁移和血管生成, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 血管相关蛋白 HIF-1 α 、VEGF 显著上调, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 同时磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶 (p-JNK) 的表达显著增强, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:** 低氧条件下 BMSCs 来源外泌体通过激活 HIF-1 α /VEGF/JNK 通路促进血管生成, 为血管生成相关疾病提供新的治疗方案。

〔关键词〕 血管再生; 骨髓间充质干细胞; 外泌体; 低氧诱导因子-1 α ; 血管内皮生长因子; c-Jun 氨基末端激酶

〔中图分类号〕 R 329 〔文献标识码〕 A

血管生成是一个复杂的过程, 对于各种疾病的治疗十分重要^[1]。研究表明, 间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 分泌的外泌体通过将多种生物活性分子转移到受体细胞, 进而改变它们的表型和功能^[2]。Takeuchi R 等人报道, 骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 的外泌体通过增强血管生成促进骨再生^[3]; Qiu X 等人也表明 MSCs 释放的外泌体通过调节 AKT/内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 通路增强血管生成, 从而加速伤口愈合^[4]。MSCs 外泌体是促进血管生成治疗有希望的靶点。氧含量是控制 MSCs 增殖和分化的关键因素。与体外培养时的常氧条件相比, 体内大

多数 MSCs 是处在低氧环境中。MSCs 在低氧下培养显示更高的细胞增殖活力。同时低氧条件下 MSCs 外泌体显示出更强的促血管生成作用。然而, 其潜在机制尚未完全了解。因此, 在本研究中, 笔者比较低氧和常氧条件下 BMSCs 外泌体对人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 增殖、迁移和血管生成的影响, 并探索其潜在机制。

1 材料与方法

1.1 材料

BMSCs、HUVECs 购自于广州赛业生物, Transwell 小室购自 Corning, 胎牛血清购自 Gibco, CCK8 检测试

〔收稿日期〕 2021-05-25

〔作者简介〕 陈海燕, 女, 副主任医师, 主要从事心内科诊疗工作。

剂盒购自广州水云天生物，低氧诱导因子-1a (hypoxia inducible factor-1a, HIF-1a)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、c-Jun 氨基末端激酶 (c-jun N-terminal kinase, JNK)、p-JNK、CD9、CD63 以及内参抗体均购自于武汉博士德生物科技有限公司。

1.2 主要仪器

二氧化碳细胞培养箱 (Thermo, USA), 酶标仪 (Thermo, USA), 倒置荧光显微镜 (Nikon, Japan), 离心机 (Thermo, USA), 超净工作台 (苏州净化), 蛋白转膜系统 (Bio-rad, USA)

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 将调整好状态的 BMSCs 细胞接种到 T25 的细胞瓶, 待细胞贴壁后, 弃去原有培养基, 加入无外泌体血清的完全培养基, 转移到低氧培养箱中 (1% O₂, 5% CO₂ 和 94% N₂) 培养 24 h, 收集细胞上清; 同时, 将 HUVECs 接种到 6 孔板中, 加入 ECM 完全培养基, 转移到二氧化碳培养箱中继续培养, 每隔 3 d 传代 1 次。

1.3.2 外泌体提取以及鉴定 收集低氧和常氧条件下 BMSCs 细胞培养上清, 利用超速离心法提取外泌体, 并利用透射电镜检测外泌体的形态以及 Western-blot 检测外泌体标志性蛋白 CD9、CD63。

1.3.3 CCK8 检测 接种 HUVECs 于 96 孔板中, 10³ 个·孔⁻¹, 培养 24 h, 经低氧和常氧 BMSCs 外泌体处理后, 培养 48 h, 然后根据 CCK8 试剂盒说明书加入 CCK-8 溶液, 室温培养 4 h。在 450 nm 处检测光密度 (optical density, OD) 值。

1.3.4 Transwell 迁移实验 检测外泌体对 HUVECs 迁移的影响。在 Transwells 上室接种 HUVECs 细胞, 10⁵ 个·孔⁻¹, 下室加入含有 10 μg·mL⁻¹ 低氧或常氧 BMSCs 外泌体的培养基 600 μL, 置于二氧化碳培养箱中 37 °C 孵育 24 h, 取出 Transwell 小室, 多聚甲醛固定, 并用 0.1% 结晶紫染色, 放在倒置荧光显微镜上进行拍照观察。

1.3.5 成管试验 HUVECs 接种于预涂有 Matrigel 胶的 24 孔板上, 将低氧和常氧条件 BMSCs 外泌体 (10 μg·mL⁻¹) 添加到 HUVECs 中, 放入培养箱中继续培养 72 h, 显微镜下拍照观察。

1.3.6 Westernblot 收集低氧和常氧 BMSCs 外泌体处理的 HUVECs, 用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, BCA 试剂盒测定各组蛋白浓度后进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 转膜后, 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 孵育一抗, 二抗, 增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 方法进行显影。

1.4 统计学方法

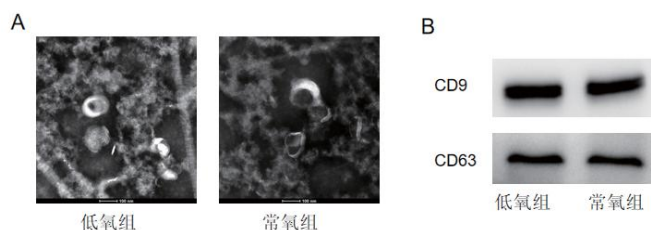
采用 SPSS 18.0 软件进行方差分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表

示, 各组间的比较采用单因素方差分析进行评估, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 外泌体的提取以及鉴定

将收集好的低氧和常氧条件下 BMSCs 培养基, 超速离心后, 利用透射电镜观察到外泌体的形态, 结果见图 1A; 同时利用 Westernblot 检测外泌体中 CD9, CD63 的表达, 结果见图 1B, 这些表明笔者成功提取外泌体。



A: 透射电镜 (×50000); B: Westernblot 检测 CD9、CD63 的表达

图 1 外泌体的提取以及鉴定

2.2 CCK8 检测 HUVECs 的活性

将低氧和常氧条件下 BMSCs 外泌体处理 HUVECs 后, 利用 CCK8 法检测细胞活性, 结果显示低氧外泌体组处理 HUVECs 的细胞活性明显高于常氧外泌体组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2; 提示低氧条件下 BMSCs 外泌体能够增强 HUVECs 活性。

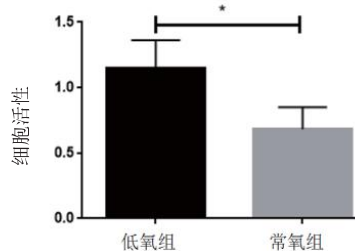


图 2 CCK8 检测细胞活性与常氧组比较, * $P < 0.05$

2.3 Transwell 检测 HUVECs 的迁移情况

收集低氧和常氧条件下 BMSCs 外泌体处理 HUVECs 的 Transwell 小室, 结果显示低氧外泌体组处理 HUVECs 的细胞迁移数明显高于常氧外泌体组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3, 提示低氧条件下的 BMSCs 外泌体能够提高 HUVECs 的迁移能力。

2.4 成管试验检测 HUVECs 的成血管能力

低氧和常氧条件下 BMSCs 外泌体处理 HUVECs 后, 成管试验结果显示低氧外泌体组成血管的长度明显高于常氧组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4, 提示

低氧条件下的外泌体能够提高 HUVECs 的成血管能力。

2.5 Westernblot 检测相关蛋白的变化

收集低氧和常氧条件下 BMSCs 外泌体处理的 HUVECs, Western-blot 检测结果显示, 低氧外泌体组 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达明显上调, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 5; 同时 p-JNK 的蛋白表达量也明显上调, 提示低氧条件下 BMSCs 外泌体通过 HIF-1 α /VEGF/JNK 通路促进血管生成。

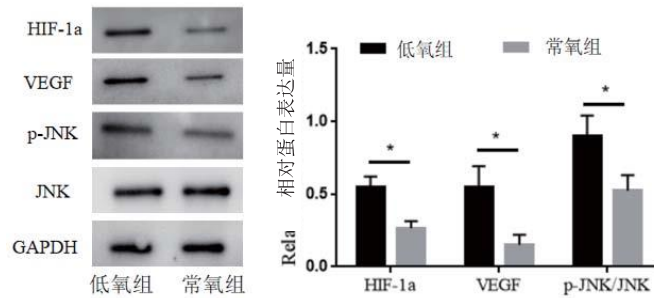


图 5 Westernblot 检测相关蛋白的变化与常氧组比较, * $P < 0.05$

3 讨论

血管生成与各种生物学过程有关, 如组织发育、缺血、炎症和组织修复。越来越多的证据表明 MSCs 来源的外泌体在血管生成中起着重要的作用, 特别是在低氧条件下, 目前分子机制尚不清楚。本研究通过一系列实验验证了骨髓间充质干细胞在缺氧条件下释放的外泌体通过 HIF-1 α /VEGF/JNK 通路来增强血管生成。

VEGF 被认为是最重要的血管生成诱导剂。HIF-1 α 是参与细胞氧稳态和促进对缺氧适应的关键调节因子^[5]。HIF-1 α 与血管生成密切相关, 是 VEGF 的上游转录调控因子。有研究报道, 低氧条件下, HIF-1 α 和 VEGF 表达水平升高, 导致细胞增殖、迁移和血管生成增强^[6]。先前有研究报道发现高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box protein 1, HMGB1) 通过调控 HIF-1 α /VEGF 通路增强血管生成^[7]。笔者的研究数据显示, 与常氧组相比, 低氧组的 HIF-1 α 蛋白水平显著升高, VEGF 表达增加。表明低氧条件下 BMSCs 外泌体通过 HIF-1 α /VEGF 诱导血管生成。

JNK 信号通路在细胞增殖、分化、存活、迁移等多种生物过程中起着重要作用。此外, JNK 通路是血管生成的重要

因素。有报道称 HMGB1 通过 JNK 通路诱导细胞分化、凋亡和迁移^[8]。在本研究中, 笔者发现低氧组中 JNK 的磷酸化水平升高, 证实了 JNK 信号参与了外泌体介导的血管生成。

综上所述, 笔者的研究结果显示, 低氧条件下 BMSCs 释放的外泌体促进 HUVECs 的增殖、迁移和血管生成, 激活 JNK 通路, 诱导 HIF-1 α /VEGF 表达, 从而促进 HUVECs 血管生成。基于此, 低氧 MSCs 来源的外泌体可以作为一种治疗血管生成相关疾病的潜在方案。

[参考文献]

- (1) Min G, Yu B, Wang J, et al. Mesenchymal stem cells release exosomes that transfer miRNAs to endothelial cells and promote angiogenesis (J) . *Oncotarget*, 2017, 8(28): 45200-45212.
- (2) Cobelli NJ, Leong DJ, Sun HB. Exosomes: biology, therapeutic potential, and emerging role in musculoskeletal repair and regeneration (J) . *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2017, 1410(1): 57-67.
- (3) Takeuchi R, Katagiri W, Endo S, et al. Exosomes from conditioned media of bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote bone regeneration by enhancing angiogenesis (J) . *PloS one*, 2019, 14(11): e0225472.
- (4) Qiu X, Liu J, Zheng C, et al. Exosomes released from educated mesenchymal stem cells accelerate cutaneous wound healing via promoting angiogenesis (J) . *Cell Proliferation*, 2020, 53(8): e12830.
- (5) Beltramo E, Lopatina T, Berrone E, et al. Extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells induce features of diabetic retinopathy in vitro (J) . *Acta Diabetologica*, 2014, 51(6): 1055-1064.
- (6) Tzouvelekis A, Ntoliou P, Karameris A, et al. Expression of Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 α -Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Inhibitory Growth Factor (ING)-4- axis in sarcoidosis patients (J) . *Bmc Res Notes*, 2012, 5(1): 1-9.
- (7) Mi L, Zhang Y, Xu YG, et al. HMGB1/RAGE pro-inflammatory axis promotes vascular endothelial cell apoptosis in limb ischemia/ reperfusion injury (J) . *Biomed Pharmacother*, 2019, 116(8): 109005.
- (8) Qiu Y, Chen Y, Zeng T, et al. High-mobility group box -B1 (HMGB1) mediates the hypoxia-induced mesenchymal transition of osteoblast cells via activating ERK/JNK signaling (J) . *Cell Biology International*, 2016, 40(11): 1152-1161.