

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001903

过表达 Survivin 通过调控缺氧血管内皮细胞 EPAS1 和 CHOP-10 表达影响细胞增殖、凋亡

钟 巍, 陈思宇, 王学虎, 赵 渝

(重庆医科大学附属第一医院血管外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:目的:研究过表达存活素(Survivin, SVV)基因对缺氧处理的大鼠血管内皮细胞增殖、迁移能力及内皮 PAS1 区域蛋白 1(endothelial PAS domain-containing protein 1, EPAS1)、C/EBP 同源蛋白-10(C/EBP homologous protein-10, CHOP-10)蛋白表达的影响和机制。**方法:**用 500 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴(CoCl_2)缺氧处理大鼠动脉内皮细胞,并分为 SVV 干预组、阴性对照组、空白对照组。SVV 干预组用腺病毒转染 SVV-增强型绿色荧光蛋白(enhance green fluorescent protein, EGFP),阴性对照组转染空病毒,空白对照组不作处理。对细胞进行 Transwell 实验检测细胞迁移能力变化,酵素免疫分析法(enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)检测基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)的含量变化, WST-1 检测细胞增殖能力,流式细胞学检测细胞周期, Western blot 分别检测 SVV、EPAS1、CHOP-10、凋亡蛋白 Caspase-8 表达变化。用 U0126 和 LY294002 分别阻断 EPAS1 上游信号通路 P44/42 丝裂原活化蛋白激酶(P44/42 mitogen-activated protein kinase, P44/42 MAPK)和磷酸肌醇 3-激酶/AKT(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K/AKT)后, Western blot 检测 EPAS1 表达,研究 SVV 影响 EPAS1 的机制。**结果:**过表达 SVV 能促进内皮细胞的细胞迁移能力, MMP-2、MMP-9 分泌水平上升。转染 SVV 后细胞增殖能力增强, S 期细胞增多,转染后 SVV 表达上升($F=326.137, P=0.000$)。过表达组 EPAS1 蛋白相对表达量为 1.29 ± 0.11 , 阴性对照组为 0.97 ± 0.06 , 空白表达组为 0.99 ± 0.06 , SVV 能上调 EPAS1 表达,且有统计学差异($F=17.765, P=0.000$)。过表达 SVV 能抑制 CHOP-10 表达,差异有统计学意义($F=78.908, P=0.000$)。过表达 SVV 后 Caspase-8 相对表达量明显减少($F=53.823, P=0.000$)。而阴性对照组和空白对照组的 3 种蛋白表达量无统计学差异($P=0.841, P=0.891, P=0.955$)。通过阻断 PI3K/AKT 途径能抑制 SVV 引起的 EPAS1 表达上调(0.78 ± 0.04 vs. $1.32 \pm 0.28, P=0.002$), P42/44 MAPK 通路阻断剂 U0126 作用后 EPAS1 表达减少无统计学差异(1.36 ± 0.12 vs. $1.32 \pm 0.28, P=0.451$)。**结论:**缺氧条件下 SVV 过表达促进细胞增殖、促进 MMP-2、MMP-9 分泌和提高细胞迁移能力。SVV 主要通过 PI3K/AKT 途径上调内皮细胞 EPAS1 表达,并抑制 CHOP-10 和 Caspase-8 表达,从而保护细胞适应低氧环境,发挥抗凋亡作用和潜在促血管生成的功能。

【关键词】存活素;增殖;迁移;缺氧**【中图分类号】**R654**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-03-09

Overexpression of survivin affects cell proliferation and apoptosis by regulating the expression of EPAS1 and CHOP-10 in vascular endothelial cells with hypoxic treatment

Zhong Wei, Chen Siyu, Wang Xuehu, Zhao Yu

(Department of Vascular Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of survivin(SVV) gene overexpression on the proliferation and migration of rat vascular endothelial cells with hypoxic treatment and the protein expression of EPAS1 and CHOP-10, as well as the possible mechanisms.

Methods: Rat arterial endothelial cells were given hypoxic treatment with 500 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 and were then divided into SVV intervention group, negative control group, and blank control group. The cells in the SVV intervention group were transfected with adenovirus SVV-EGFP, those in the negative control group were transfected with empty virus, and those in the blank control group were

not given any treatment. Transwell assay was used to evaluate migration ability; ELISA was used to measure the changes in the levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9); the WST-1 test was used to assess cell proliferation; flow cytometry was used to determine the cell

作者介绍: 钟 巍, Email: 812031193@qq.com,

研究方向: 缺血性血管疾病的防治研究。

通信作者: 王学虎, Email: 184037696@qq.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181105.0838.002.html>

(2018-11-06)

cycle; Western blot was used to measure the changes in the protein expression of survivin, hypoxia-inducible factor EPAS1, endoplasmic reticulum stress protein CHOP-10, and apoptosis protein caspase-8. U0126 and LY294002 were used to block the EPAS1 upstream signaling pathways P44/42 MAPK and P13K/AKT, and then Western blot was used to measure the expression of EPAS1 to investigate the mechanism of the effect of survivin on EPAS1. **Results:** SVV overexpression promoted the migration ability of vascular endothelial cells and increased the secretion of MMP-2 and MMP-9. The proliferation ability of endothelial cells was enhanced after survivin transfection, with an increase in the number of cells in S phase, and there was an increase in the expression of survivin after transfection ($F=326.137, P=0.000$). The relative protein expression of EPAS1 was 1.29 ± 0.11 in the overexpression group, 0.97 ± 0.06 in the negative control group, and 0.99 ± 0.06 in the blank control group, suggesting that survivin significantly upregulated the expression of EPAS1 ($F=17.765, P=0.000$). SVV overexpression significantly inhibited the expression of CHOP-10 ($F=78.908, P=0.000$). There was a significant reduction in the relative expression of caspase-8 after survivin overexpression ($F=53.823, P=0.000$). There were no significant differences in the expression of these three proteins between the negative control group and the blank control group ($P=0.841, 0.891, \text{ and } 0.955$). The upregulated expression of EPAS1 due to survivin was inhibited by blocking the P13K/AKT pathway (0.78 ± 0.04 vs. $1.32 \pm 0.28, P=0.002$), and after U0126 was used to block the P42/44 MAPK pathway, there was a slight reduction in the expression of EPAS1 (1.36 ± 0.12 vs. $1.32 \pm 0.28, P=0.451$). **Conclusion:** Under the hypoxic condition, survivin overexpression can promote cell proliferation and migration abilities and increase the secretion of MMP-2 and MMP-9. SVV exerts an anti-apoptosis effect and promotes angiogenesis by upregulating the expression of EPAS1 in endothelial cells via the P13K/AKT pathway, inhibiting the expression of CHOP-10 and caspase-8, and protecting the cells against the hypoxic environment.

[Key words] survivin; proliferation; migration; hypoxia

缺血性血管病包括下肢动脉硬化闭塞、血栓性脉管炎和糖尿病血管病变,细胞微环境主要表现为组织缺氧。目前随着腔内介入手术的开展,早期肢体动脉硬化闭塞的预后已相对转好,但对于脉管炎和微血管病变治疗效果仍不理想。近年来,干细胞注射治疗微小血管闭塞或狭窄引起的缺血疾病成为热点,但现有的研究发现干细胞治疗有分化率低、成管率低、细胞存活率低的缺点。在血管内皮细胞缺氧过程中,内皮 PAS1 区域蛋白 1 (endothelial PAS domain-containing protein 1, EPAS1) 起到重要作用, EPAS1 又称低氧诱导因子-2 α , 与肿瘤缺氧过程中血管形成密切相关,表达 EPAS1 的细胞体现出干细胞的增殖特性^[1]。另一方面, EPAS1 能作用于 C/EBP 同源蛋白-10 (C/EBP homologous protein-10, CHOP-10), 后者参与缺氧时内质网应激对细胞的损伤^[2]。在肿瘤的众多研究中发现,存活素 (Survivin, SVV) 能促进新生血管形成,并能促进细胞增殖,提高组织细胞对缺血再灌注的耐受,并发挥强大的抗凋亡作用^[3-4]。因此, SVV 可能是联合血管内皮细胞治疗缺血性疾病的潜力基因,本研究旨在研究缺氧条件下过表达 SVV 对血管内皮细胞的促增殖、迁移作用和 EPAS1 和 CHOP-10 表达变化及机制,从而为干细胞的替代治疗提供思路和理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

大鼠动脉血管内皮细胞 (rat arterial endothelial cells, RAEC, 中科院上海细胞所), 氯化钴 CoCl_2 (Sigma), GFP-SVV 重组腺病毒 (上海诺赛), Matrigel 基质胶 (BD), LY294002 P13K 抑制剂 (CST), MEK1/2 抑制剂 U0126 (CST), Oxyrase 去氧酶培养皿 (Oxyrase), Transwell 侵袭小室 (Corning 公司), 兔抗大鼠 SVV、EPAS1 抗体 (Abcam), 兔抗大鼠 CHOP-10、Caspase-8 抗体 (Cell Signaling), QPCR 试剂盒 (大连宝生物), WST-1 试剂盒 (碧云天生物公司), MMP-2、MMP-9 ELISA Kit (Millipore 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养、腺病毒转染和化学性缺氧 在 37°C 、5% CO_2 、100% 饱和湿度条件下,用 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI-1640 培养液对 RAEC 细胞进行培养。待细胞生长至底面积的 80%~90% 后按最佳感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 值: 0、50、100、150、200、250、300 转染,48 h 后采用荧光显微镜观察并用流式细胞学检测转染率,选择 MOI。将细胞分为 SVV 干预组、阴性对照组和空白对照组,SVV 干预组采用上述最佳 MOI 转染,阴性对照组采用空白腺病毒转染。转染 12 h 后,用 $500 \mu\text{mol/L}$ 的 CoCl_2 进行缺氧处理 24 h,再更换为正常培养基用于实验。特殊处理的是三维培养实验和 WST-1 实验,因需更换培养器皿并培养细胞超过 24 h,采用接种后 8 h 再进行化学缺氧干预。

1.2.2 Transwell 侵袭实验 取 3 组细胞以无血清培养液悬

浮为 2×10^6 个/mL 细胞浓度,在冰浴条件下接种在预铺胶的 Transwell 小室,放入完全培养基条件的 24 孔板培养, 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 孵育 8 h 后甲醛固定并 HE 染色^[9],在倒置显微镜下观察并计数细胞。

1.2.3 ELISA 检测分泌性 MMP-2、MMP-9 水平 收集 3 组细胞培养液上清,按试剂盒说明书操作分别进行反应,用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的吸光度(absorbance, A)值,根据标准曲线查出 MMP-2 和 MMP-9 的浓度。

1.2.4 WST-1 法检测细胞增殖能力 把 5 mL 电子耦合试剂加入 WST-1 粉末中,完全溶解即成 WST-1 溶液。收集对数生长期的 RAEC,接种至 96 孔板,每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 2 000 个细胞和 $10\ \mu\text{L}$ WST-1 溶液。空白对照孔加入相等量无细胞培养液和 WST-1 溶液,混匀 1 min,分别于 24、48、72 h 后利用酶标仪在 450 nm 测定 A 值。

1.2.5 流式细胞学检测细胞周期的变化 收集并洗涤细胞, 4°C 乙醇过夜。PI/Triton X-100 染色细胞。应用流式细胞仪测定细胞周期。

1.2.6 Western blot 检测细胞 SVV、EPAS1、CHOP-10、Caspase-8 蛋白的变化 提取各组细胞蛋白,经电泳,转膜至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF),用 5% 脱脂蛋白封闭,加入兔抗大鼠 SVV、EPAS1、CHOP-10、Caspase-8 一抗(均为 1:1 000) 4°C 过夜孵育,次日加入山羊抗兔二抗(1:3 000)于 37°C 孵育 1 h, ECL 发光液显影,观察结果,采用 Quantity one 软件进行目的条带灰度值和积分光密度(integrated option density, IOD)分析。

1.2.7 检测 P13K 抑制剂 LY294002 和 MEK1/2 抑制剂 U0126 对转染后细胞 EPAS1 表达影响 按说明书配制 2 种试剂溶液分别加入不含血清培养基,在 Oxyrase 去氧酶培养皿替代 CoCl_2 做缺氧处理培养转染组和阴性对照组细胞,2 d 后提取细胞蛋白采用前述相同方法检测 EPAS1 蛋白表达变化。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,所有数据采用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。WST-1 实验结果采用重复测量方差分析,多组间采用单因素方差分析,方差齐性时组间使用 LSD-*t* 法,方差不齐时组间用 Tamhane 检验。检测水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 最佳转染率 MOI 的选用

转染后 48 h,在荧光显微镜下可见 50 MOI 时已有绿色荧光,随着 MOI 值增加绿色荧光增强,当 $\text{MOI} > 150$ 时绿色荧光最强(图 1)。转染后 48 h,通过流式细胞仪对绿色荧光细胞含量百分比进行计数,结果显示当 $\text{MOI}=150$ 时,绿色荧光 RAEC 率为 $(97.12 \pm 1.45)\%$,故选取 $\text{MOI}=150$ 为最佳 MOI。

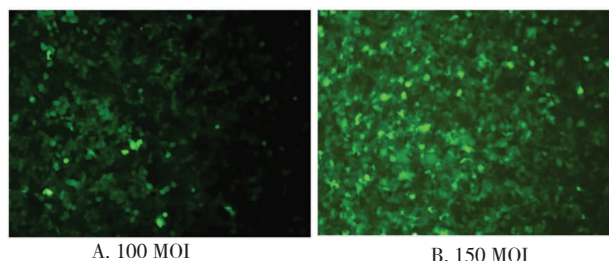


图 1 倒置荧光显微镜观察转染后细胞结果(100 $\times$)

2.2 Transwell 侵袭实验结果

小孔培养 3 h 后 SVV 干预组迁移的细胞数为 (190.1 ± 12.0) 个,阴性对照组为 (77.5 ± 10.5) 个,空白对照组为 (82.5 ± 12.8) 个,3 组之间存在统计学差异($F=71.749, P=0.000$)。SVV 干预组与阴性对照组和空白对照组相比有统计学差异($P=0.000, P=0.000$)。如图 2 所示。

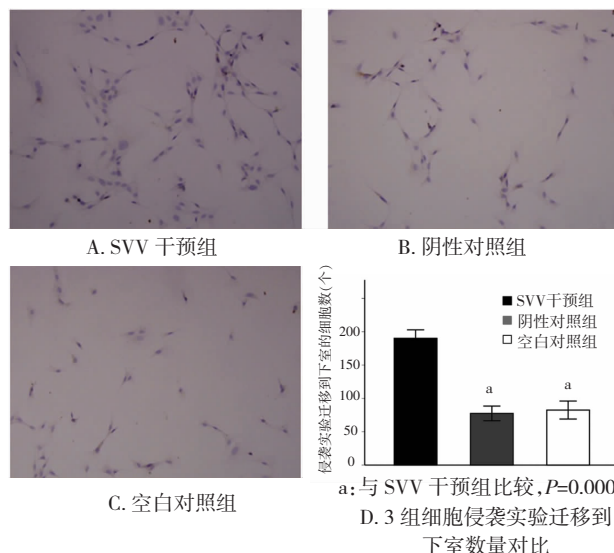


图 2 Transwell 侵袭实验迁移到下室的细胞数(HE, 100 $\times$)

2.3 ELISA 法检测 MMP-2、MMP-9 结果

ELISA 结果提示,转染 48 h 后,SVV 干预组细胞上清液中 MMP-2 含量为 (1.320 ± 0.124) ng/mL,阴性对照组为 (0.935 ± 0.049) ng/mL,空白对照组为 (0.927 ± 0.036) ng/mL。3 组之间存在统计学差异($F=139.316, P=0.000$)。SVV 干预组与两对照组都有统计学差异($P=0.000, P=0.000$),空白对照组和阴性对照组相比差异无统计学意义($P=0.725$)。SVV 干预组细胞上清液 MMP-9 含量为 (0.232 ± 0.018) ng/mL,阴性对照组为 (0.097 ± 0.006) ng/mL,空白对照组为 (0.103 ± 0.013) ng/mL,3 组之间存在统计学差异($F=258.074, P=0.000$)。SVV 干预组与两对照组差异有统计学意义($P=0.000, P=0.000$),而空白对照组与阴性对照组无统计学差异($P=0.277$) (图 3)。

2.4 WST-1 法检测细胞增殖能力结果

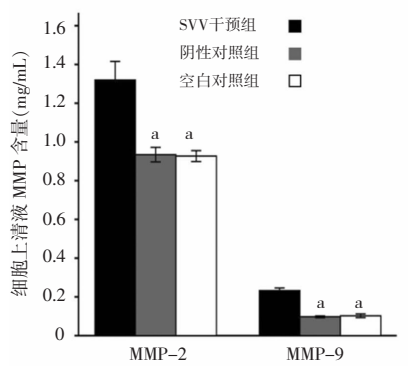
使用酶标仪在 450 nm 处读取吸光度值。并将吸光度转化为起始吸光度的相对值,以代表细胞增长比率(表 1)。重复测量方差统计分析结果提示,球形度检验 $\chi^2=1.461, P=0.482$,不需结果校正。不同时间细胞增殖有统计学差异($F=14.199$,

表 1 在不同时间 WST-1 法测相对吸光度

时间 (h)	0	24	48	72	$F_{\text{时间}}$ 值	$P_{\text{时间}}$ 值
SVV 干预组	1	2.307 ± 0.619	2.263 ± 0.267	2.252 ± 0.466	14.199	0.000
阴性对照组	1	1.348 ± 0.195^a	1.612 ± 0.397^b	1.893 ± 0.308		
空白对照组	1	1.325 ± 0.110^c	1.633 ± 0.305^d	2.000 ± 0.376		
$F_{\text{组别}}$ 值	8.499				$F_{\text{组别} \times \text{时间}}$ 值 = 7.886	
$P_{\text{组别}}$ 值	0.003				$P_{\text{组别} \times \text{时间}}$ 值 = 0.005	

注:与 SVV 干预组比较;a, $P=0.001$;b, $P=0.004$;c, $P=0.000$;d, $P=0.005$

$P=0.000$),组间存在明显差异($F=8.499$, $P=0.003$),组间和时间点有交互作用($F=7.886$, $P=0.005$)。从各个时间点来看,24 h 时 3 组的细胞增殖率有统计学差异($F=13.068$, $P=0.001$),SVV 干预组相对阴性对照组和空白对照组增殖明显($P=0.001$, $P=0.000$),阴性对照组和空白对照组增殖率无统计学差异($P=0.918$)。48 h 后 3 组增殖率存在统计学差异($F=7.648$, $P=0.005$),SVV 干预组细胞增殖率升高较阴性对照组和空白对照组有统计学差异($P=0.004$, $P=0.005$)。而 72 h 时,3 组间细胞增殖率差异无统计学意义($F=1.518$, $P=0.251$)。



a:与 SVV 干预组比较, $P=0.000$

图 3 ELISA 法检测 SVV 过表达对 MMP-2 和 MMP-9 的分泌量影响

2.5 流式细胞学检测细胞周期的变化

经流式细胞仪分析细胞周期。实验结果提示 SVV 干预组细胞周期发生明显变化,表现为与空白对照组相比 S 期细胞明显增多($F=7.385$, $P=0.008$), G_1 期细胞减少($F=4.197$, $P=0.041$)。提示过表达 SVV 能提高 S 期细胞比率(S-phase fraction,SPF),其差异有统计学意义($P=0.010$, $P=0.004$),而阴性对照组和空白对照组 S 期细胞无统计学差异($P=0.659$) (表 2)。

表 2 流式细胞仪检测过表达 SVV 后细胞周期变化 (%)

组别	G_1 期	S 期
SVV 干预组	15.16 ± 3.43	35.50 ± 8.56
阴性对照组	20.92 ± 7.74	22.16 ± 3.62^a
空白对照组	20.11 ± 6.05	23.86 ± 4.56^b
F 值	4.197	7.385
P 值	0.041	0.008

注:a,与 SVV 干预组比较, $P=0.010$;b,与 SVV 干预组比较, $P=0.004$

2.6 过表达 SVV 对 EPAS1、CHOP-10、Caspase-8 的影响

Western blot 结果显示,转染后 SVV 表达上升($F=326.137$, $P=0.000$)。过表达组 EPAS1 蛋白相对表达量为 1.29 ± 0.11 ,阴性对照组为 0.97 ± 0.06 ,空白表达组为 0.99 ± 0.06 ,SVV 能上调 EPAS1 表达,且有统计学差异($F=17.765$, $P=0.000$)。过表达 SVV 能抑制 CHOP-10 表达,差异有统计学意义($F=78.908$, $P=0.000$)。过表达 SVV 后 Caspase-8 相对表达量明显减少($F=53.823$, $P=0.000$)。而阴性对照组和空白对照组的 3 种蛋白表达量无统计学差异($P=0.841$, $P=0.891$, $P=0.955$) (图 4、表 3)。

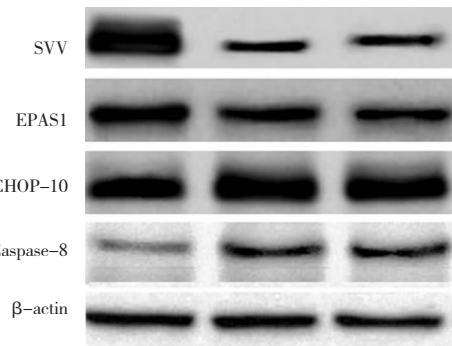


图 4 SVV、EPAS1、CHOP-10、Caspase-8 在过表达 SVV 的 RAEC 中相对表达含量变化

表 3 SVV、EPAS1、CHOP-10、Caspase-8 在过表达 SVV 的 RAEC 中相对表达含量变化

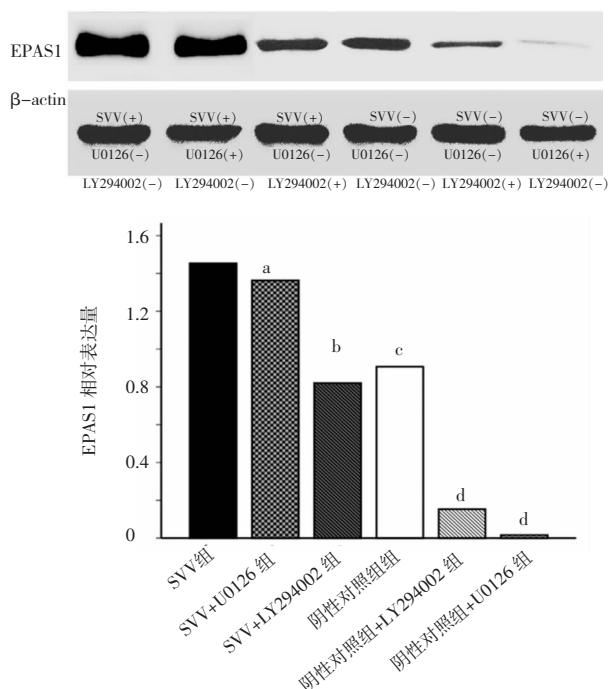
组别	SVV	EPAS1	CHOP-10	Caspase-8
SVV 干预组	3.01 ± 0.37	1.29 ± 0.109	1.50 ± 0.17	0.26 ± 0.02
阴性对照组	0.69 ± 0.02^a	0.97 ± 0.06^b	2.84 ± 0.27^c	0.69 ± 0.04^d
空白对照组	0.56 ± 0.02^a	0.99 ± 0.17^b	2.82 ± 0.27^c	0.69 ± 0.09^d
F 值	326.507	17.765	78.908	53.823
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 SVV 过表达组相比;a, $P=0.000$;b, $P=0.000$;c, $P=0.000$;d, $P=0.000$

2.7 P42/44 MAPK 抑制剂和 P13K/akt 抑制剂对血管内皮细胞 EPAS1 表达影响

比较 6 组 EPAS1 相对表达量有统计学差异($F=116.479$, $P=0.000$)。转染 SVV 的 3 组中,P13K/AKT 阻断剂信号通路阻断剂 LY294002 作用于细胞后,EPAS1 相对表达量较阻断前受抑制[(0.78 ± 0.04) vs. (1.32 ± 0.28), $P=0.002$],P42/44

MAPK通路阻断剂 U0126 作用后 EPAS1 表达减少无显著性差异 $[(1.36 \pm 0.12) \text{ vs. } (1.32 \pm 0.28), P=0.451]$ 。而未转染 SVV 的 3 组中,LY294002 处理后较处理前 EPAS1 表达抑制有统计学差异 $[(0.15 \pm 0.07) \text{ vs. } (0.90 \pm 0.12), P=0.001]$,U0126 的同样抑制 EPAS1 表达 $[(0.02 \pm 0.02) \text{ vs. } (0.90 \pm 0.12), P=0.000]$,转染组通过 LY294002 处理后与阴性对照组未做处理时 EPAS1 表达量无统计学差异 $(P=0.296)$,提示 SVV 主要通过 P13K/AKT 途径上调 EPAS1 表达(图 5)。



与转染组相比, a: $P=0.000$, b: $P=0.451$; 与阴性对照组相比, c: $P=0.296$, d: $P=0.000$

图 5 Western blot 检测阻断剂 LY294002 和 U0126 对 2 组细胞 EPAS1 影响

3 讨论

慢性下肢缺血性疾病主要表现为组织缺氧,而引起血管内皮细胞凋亡和损伤。此时,血管新生对恢复血供起重要作用。血管新生的过程包括 MMP 分泌降解血管外基质,内皮细胞增殖及迁移,血管管腔的形成,最后形成毛细血管。其中内皮细胞的增殖、迁移以及血管外基质的降解是血管新生的基础。本研究通过 CoCl_2 处理细胞模拟缺氧环境,转染带 SVV 基因的腺病毒,发现过表达 SVV 能促使内皮细胞增殖、迁移,提高 MMP-2、MMP-9 分泌。众所周知,SVV 是目前作用最强的抗凋亡因子之一,并

有促细胞增殖、迁移作用^[6],在体内和体外都和血管新生密切相关^[7]。有文献报道,缺氧组织中 SVV 的表达对细胞保护和血管新生起到重要作用^[8-9],这与本研究的实验结果相互佐证。

缺氧时血管新生的主要机制是 EPAS1 表达增加。EPAS1 与促细胞迁移作用^[10]、抗细胞凋亡、血管生成等多种功能相关,其表达上调能促进血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)分泌增多^[11-12],而 VEGF 通过活化受体 KDR 为 KDR/Flt-1 二聚体,从而调节转录因子 ets 并上调 MMP 表达,进而增加组织新生微血管密度^[15]。EPAS1 可通过由低氧分压诱导的 P44/42 MAPK 信号通路和细胞因子等诱导的次要途径 P13K/AKT-mTORC2 信号通路调控激活^[13-14]。本研究证实缺氧状态下过表达 SVV 能上调 EPAS1 表达。进一步用 P13K/AKT 特异性抑制剂和 P44/42 MAPK 特异性抑制剂分别处理细胞发现,阻断 P13K/AKT 通路后可抑制 EPAS1 表达,其表达水平和对照组未做处理时一致,而阻断 P44/42 MAPK 通路后 SVV 转染组的 EPAS1 表达不受影响。相反,对照组阻断 P44/42 MAPK 通路后 EPAS1 表达受到大幅抑制。其机制可能与 SVV 和其下游调控的生长因子激活 P13K/AKT 有关^[15]。以上结果提示,SVV 主要通过 P13K/AKT 途径介导 EPAS1 表达上调,EPAS1 上调后细胞增殖能力、迁移能力增强,MMP 分泌增加。此外,本课题组猜测肿瘤中由 SVV 介导的 VEGF 分泌促进新生血管形成过程中^[16],可能就有 EPAS1 的参与。有研究表明,许多肿瘤组织中,SVV 和 EPAS1 高表达表现出一致性^[17],这与本研究实验结果相符。有学者发现利用 shRNA-HIF2 α 下调 SGC7009 细胞系 EPAS1 表达会使 SVV 表达降低^[18],说明 EPAS1 也能调控 SVV 表达,但 EPAS1 对 SVV 的具体作用机制需要进一步实验探究。

另一方面,EPAS1 可能参与了 CHOP-10 表达调控,其降低会导致 CHOP-10 表达增加,从而引起凋亡^[19]。本研究证实缺氧后过表达 SVV 的内皮细胞 CHOP-10 和其下游蛋白 Caspase-8 的含量下降,说明 SVV 的抗凋亡及促增殖作用的另一途径可能是抑制 CHOP-10 表达。CHOP-10 是缺氧时细胞内质网应激后特异性蛋白之一,参与调控多种炎症因子的释放,并导致细胞凋亡。缺氧后 CHOP-10 表达增加能抑制细胞增殖并通过 TLR4 途径参与 Caspase

的非典型激活导致细胞凋亡^[20-21]。SVV 上调 EPAS1 可能是抑制 CHOP-10 表达的一个机制,EPAS1 表达增加和 CHOP-10 表达减少进一步影响 MMP、VEGF 和 Caspase 蛋白的表达,以发挥促进内皮细胞增殖、迁移和抗凋亡作用。

综上所述,过表达 SVV 的缺氧血管内皮细胞凋亡蛋白表达下降,具有良好的增殖特性和迁移特性,部分机制可能是通过 P13K/AKT 途径上调内皮细胞 EPAS1 蛋白表达和抑制 CHOP-10 表达实现的。本研究在细胞水平验证了过表达 Survivin 的血管内皮细胞在体外具有形成新生血管的潜力,为缺血性疾病的细胞治疗提供了理论基础,不过也有待动物实验进一步探讨其应用前景和安全性问题。

参 考 文 献

- [1] Wang X,Dong J,Jia L,et al. HIF-2-dependent expression of stem cell factor promotes metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Lett*,2017,393:113-124.
- [2] Wang Y,Zhu J,Zhang L,et al. Role of C/EBP homologous protein (CHOP) and endoplasmic reticulum in asthma exacerbation by regulating the IL-4/STAT6/Tfrc/IL-4R α positive feedback loop in M2 macrophages[J]. *Journal of Allergy & Clinical Immunology*,2017,140(6):1550-1561.
- [3] Shamsabadi FT,Eidgahi MR,Mehrbod P,et al. Survivin,a promising gene for targeted cancer treatment[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*,2016,17(8):3711-3719.
- [4] Conway EM,Zwerts F,Van Eygen V,et al. Survivin-dependent angiogenesis in ischemic brain:molecular mechanisms of hypoxia-induced up-regulation[J]. *Am J Pathol*,2003,163(3):935-946.
- [5] Connolly L,Maxwell P. Image analysis of Transwell assays in the assessment of invasion by malignant cell lines[J]. *Br J Biomed Sci*,2002,59(1):11-14.
- [6] Altieri DC. Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms[J]. *Biochem J*,2010,430(2):199-205.
- [7] Li Z,Ren W,Zeng Q,et al. Effects of survivin on angiogenesis in vivo and in vitro[J]. *Am J Transl Res*,2016,8(2):270-283.
- [8] Mormile R. Antenatal dexamethasone for women at risk of preterm birth and intraventricular haemorrhage:what is the truth?[J]. *Iran J Pharm Res*,2016,15(2):679-680.
- [9] Cao M,Gao J,Zhou H,et al. HIF-2 α regulates CDCP1 to promote PKC δ -mediated migration in hepatocellular carcinoma[J]. *Tumor Biol*,2016,37(2):1651-1662.
- [10] Espinoza JR,Alvarez G,Leónvelarde F,et al. Vascular endothelial growth factor-A is associated with chronic mountain sickness in the andean population[J]. *High Alt Med Biol*,2014,15(2):146-154.
- [11] Blancher C,Moore JW,Talks KL,et al. Relationship of hypoxia-inducible factor(HIF)-1 α and HIF-2 α expression to vascular endothelial growth factor induction and hypoxia survival in human breast cancer cell lines[J]. *Cancer Res*,2001,60(24):7106-7113.
- [12] Nagakawa Y,Aoki T,Kasuya K,et al. Histologic features of venous invasion,expression of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9,and the relation with liver metastasis in pancreatic cancer[J]. *Pancreas*,2002,24(2):169-178.
- [13] Conrad PW,Freeman TL,Beitner-Johnson D,et al. EPAS1 trans-activation during hypoxia requires p42/p44 MAPK[J]. *J Biol Chem*,1999,274(47):33709-33713.
- [14] Mohlin S,Hamidian A,von Stedingk K,et al. PI3K-mTORC2 but not PI3K-mTORC1 regulates transcription of HIF2A/EPAS1 and vascularization in neuroblastoma[J]. *Cancer Res*,2015,75(21):4617-4128.
- [15] Fernández JG,Rodríguez DA,Valenzuela M,et al. Survivin expression promotes VEGF-induced tumor angiogenesis via PI3K/Akt enhanced β -catenin/Tcf-Lef dependent transcription[J]. *Mol Cancer*,2014,13(1):209.
- [16] Wang P,Zhen H,Zhang J,et al. Survivin promotes glioma angiogenesis through vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in vitro and in vivo[J]. *Mol Carcinog*,2012,51(7):586-595.
- [17] Li Q,Chen ZG,Wang XL. Expression of HIF-2 α in gastric cancer and its relationship with apoptosis of cancer cells[J]. *Hebei Medical Journal*,2013,35(15):2250-2252.
- [18] Tong WW,Tong GH,Chen XX,et al. HIF2 α is associated with poor prognosis and affects the expression levels of survivin and cyclin D1 in gastric carcinoma[J]. *Int J Oncol*,2015,46(1):233-242.
- [19] Rouault-Pierre K,Lopez-Onieva L,Foster K,et al. HIF-2 α protects human hematopoietic stem/progenitors and acute myeloid leukemic cells from apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress[J]. *Cell Stem Cell*,2013,13(5):549-563.
- [20] Shenderov K,Riteau N,Yip R,et al. ER stress licenses macrophages to produce mature IL-1 β in response to TLR4 stimulation through a caspase-8- and TRIF-dependent pathway[J]. *J Immunol*,2014,192(5):2029-2033.
- [21] Yang JR,Yao FH,Zhang JG,et al. Ischemia-reperfusion induces renal tubule pyroptosis via the CHOP-caspase-11 pathway[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*,2014,306(1):F75-84.

(责任编辑:冉明会)