

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.02.002

## 食管间质成纤维细胞与食管癌细胞相互作用的体外研究\*

徐志彬,袁丽,郑秀丽,王士杰,吴明利<sup>△</sup>

(河北医科大学第四医院内镜科,石家庄 050011)

**[摘要]** 目的 体外研究不同类型食管间质成纤维细胞与癌细胞株间接接触后其基因及生物学特性的改变。方法 检测人食管正常间质成纤维细胞(NFs)、不典型增生间质成纤维细胞(AFs)及癌相关纤维母细胞(CAFs)与癌细胞株间接相互接触前后的波形蛋白(Vimentin)、 $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ 1)、人肝细胞生长因子(HGF)、基质金属蛋白酶(MMP)2、MMP9 mRNA 及食管癌细胞株的增殖细胞核抗原(PCNA)mRNA,并与食管癌细胞株进行侵袭实验。结果 从 NFs 到 AFs 再到 CAFs,Vimentin mRNA 的表达无差别, $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1、HGF、MMP2 及 MMP9 mRNA 的表达逐渐增强。在与食管癌细胞株间接接触后,NFs 及 AFs 的  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1、HGF、MMP2 及 MMP9 mRNA 表达均上调,且差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而 CAFs 的相应 mRNA 表达无明显变化。食管癌细胞株的 PCNA mRNA 在与 NFs 接触后,无变化;而与 AFs 和 CAFs 接触后,PCNA mRNA 表达明显上调。结论 食管癌细胞与食管间质成纤维细胞可影响对方的增殖活性及侵袭特性。

[关键词] 成纤维细胞;食管肿瘤;细胞间通讯

[中图分类号] R735.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)02-0149-04

## In vitro study on interaction between esophageal stromal fibroblasts and esophageal carcinoma cells\*

XU Zhibin, YUAN Li, ZHENG Xiuli, WANG Shijie, WU Mingli<sup>△</sup>

(Department of Endoscopy, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050011, China)

**[Abstract]** **Objective** To conduct the in vitro study on the changes of gene and biological characteristics of different esophageal interstitial fibroblasts after their indirect contact with esophageal cancer cell lines. **Methods** The mRNA levels of Vimentin,  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$ 1, HGF, MMP2 and MMP9 in normal esophageal interstitial fibroblasts(NFs), atypical hyperplasia interstitial fibroblasts(AFs) and cancer related fibroblasts(CAFs) and PCNA mRNA in esophageal carcinoma cell line were detected after their indirectly mutual contact. The invasion test of carcinoma cell line was conducted. **Results** From NFs, AFs to CAFs, the expression of Vimentin mRNA had no difference. The mRNA expressions of  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$ 1, HGF, MMP2 and MMP9 were gradually increased. After indirectly mutual contact with esophageal carcinoma cell line, the mRNA expressions of  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$ 1, HGF, MMP2 and MMP9 in NFs and AFs were up-regulated, and the difference was statistically significant( $P < 0.05$ ), while the related mRNA expression in CAFs had no obvious change. The expression of PCNA mRNA in esophageal carcinoma cell line had no change after contact with NFs, but the expression of PCNA mRNA was significantly up-regulated after interaction with AFs contacting with CAFs. **Conclusion** The esophageal carcinoma cells and esophageal interstitial fibroblasts could affect the proliferation activity and invasive characteristics of counterparts.

[Key words] fibroblasts; esophageal neoplasms; cell communication

中晚期食管癌病死率高,无论是手术或是放化疗,疗效差、生存率低,目前仍无有效的药物对其进行防控。研究证实食管癌相关纤维母细胞(cancer associated fibroblasts, CAFs)可分泌多种细胞因子和生长因子,激发多种信号传导通路,肿瘤细胞亦能诱导成纤维细胞表型转变而活化。本研究食管间质内正常间质成纤维细胞(NFs)、不典型增生间质成纤维细胞(AFs)及 CAFs 分别与食管癌细胞株 ECa109 间接共培养后 4 种细胞的生物学特性及部分基因表达的变化,分析食管癌细胞与食管间质成纤维细胞相互作用机制,研究可以阻断传导通路的调节环节,期盼提高实体肿瘤治疗效果。

## 1 材料与方

**1.1 材料** 人食管癌 ECa109 细胞株购于中国科学院细胞中心。收集本院手术后正常食管组织、食管癌前病变及食管癌标本各 10 例,分离、培养、纯化而得食管间质成纤维细胞,细胞均冻存于本院科研中心。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 将组织转移入加好适量 0.1% 胶原酶 II 液的培养瓶,置于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中进行消化,显微镜下见到细胞团或独立的细胞即可终止消化,收集细胞、过滤、离心、洗涤、离心、制备细胞悬液、计数、接种细胞,2~3 d 换液 1 次,待细胞爬满瓶底后,首次细胞传代,再向培养瓶中加入胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA)混合液,消化 1 min,于倒置显微镜下观察可见胞质回缩,细胞间隙增大,加入 2 mL 胎牛血清(FBS)培养基,终止消化,用吸管吹打瓶底,收集细胞、离心、洗涤、离心、细胞悬液、计数、接种培养。经过 3 次传代后,用第 4 代纯化细胞做鉴定。

**1.2.2 细胞免疫化学染色(SP 法)** 于载玻片上固定细胞爬片,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 10 min,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 5 min×3 次,10% FBS 封闭 30 min,弃去封闭液,分别加入一抗[细胞角蛋白(CK)、波形蛋白(Vimentin)、 $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -

\* 基金项目:河北省医学科学研究重点课题计划(20160656);河北省普通高等学校强势特色学科肿瘤学建设经费[冀教高(2005)52号]。

作者简介:徐志彬(1976-),副主任医师,博士,主要从事食管癌诊治研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail: xzblxh@sina.com。

表 1 引物序列和 PCR 扩增产物长度

基因	引物序列	扩增片段长度(bp)
$\beta$ -actin	上游:5'-AAGAGAGGCATCCTCACCT-3'	619
	下游:5'-GGAAGGAAGGCTGGAAG-3'	
$\alpha$ -SMA	上游:5'-AGGAAGGACCTCTATGCTAACAAT-3'	309
	下游:5'-AACACATAGGTAACGAGTCAGAGC-3'	
Vimentin	上游:5'-GGGACCTCTACGAGGAGGAG-3'	200
	下游:5'-CGCATTGTCAACATCCTGTC-3'	
TGF- $\beta$ 1	上游:5'-CCACAGATCCCCTATTCAA-3'	323
	下游:5'-CGTCAGCACCAGTAGCCAC-3'	
HGF	上游:5'-TGCTCCCCATCGCCATCCCCTATG-3'	756
	下游:5'-TATAGCACCATGGCCTCGGCTGG-3'	
MMP2	上游:5'-GTGCTGAAGGACACACTAAAGAAGA-3'	605
	下游:5'-TTGCCATCCTTCTCAAAGTTGTAGG-3'	
MMP9	上游:5'-CGTGGAGAGTCGAAATCTCTGG-3'	438
	下游:5'-ATCGTCGAAATGGGGTCTCCCTG-3'	
PCNA	上游:5'-AAACTAGCTAGACTTTCCTC-3'	274
	下游:5'-TCACGCCATGGCCAGGTTG-3'	

$\beta$ -actin:  $\beta$ -肌动蛋白; TGF- $\beta$ 1: 转化生长因子- $\beta$ 1; HGF: 人肝细胞生长因子; MMP: 基质金属蛋白酶; PCNA: 增殖细胞核抗原

SMA)], 37 °C 孵育 1 h, PBS 漂洗 5 min  $\times$  3 次, 加入二抗, 湿盒中孵育 30 min, PBS 漂洗 5 min  $\times$  3 次, 二氨基联苯胺 (DAB) 显色, 室温下反应 10 min, PBS 漂洗 1 min  $\times$  2 次, 苏木素染色 1 min, 水洗 10 min, 95% 乙醇脱水 1~2 s, 树胶封片, 用已知阳性细胞爬片做阳性对照, 用 PBS 代替一抗做阴性对照, 细胞质出现棕黄色颗粒, 即可判定为阳性染色。

**1.2.3 反转录 PCR** 提取总的 RNA: 长满细胞的 75 mL 培养瓶弃培养基, PBS 洗 2 次, 加 1 mL Trizol 裂解细胞。将裂解细胞液移入离心管中, 室温静置 5 min, 加入 0.2 mL 氯仿, 剧烈震荡 15 s, 室温静置 2~3 min, 4 °C 12 000 r/min 离心 15 min, 溶液分为 3 层, 最上层无色液体含总 RNA, 移至另一干净的离心管中, 加入等量异丙醇, 颠倒混匀, 冰浴 15 min, 在 4 °C 12 000 r/min 离心 15 min 弃上清, 加入 75% 乙醇 1 mL 震荡混匀后, 在 4 °C 7 500 r/min 离心 5 min 弃上清, 室温干燥 5~10 min, 加入 20~30  $\mu$ L 无 RNA 酶水, 溶解后的 RNA 用紫外分光光度仪测定其 A260/A280 光密度比值 (1.8~2.0 之间较好)。反转录反应体系: 总 RNA 1  $\mu$ g, Oligo(dT)15 Primer 1  $\mu$ L, 5 $\times$  Reaction buffer 4  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 2  $\mu$ L, Ribolock RNase inhibitor 1  $\mu$ L, M-MLV 反转录酶 1  $\mu$ L, 将以上试剂依次加入 200  $\mu$ L 的 PCR 管中, 补足无 RNA 裂解酶水至总体积达 12  $\mu$ L, 以上均于冰上操作。将上述试剂混匀, 置于 PCR 仪上, 42 °C 孵育 60 min, 70 °C 孵育 5 min, 终止反应。合成的 cDNA 可直接用于 PCR 反应。引物序列全长选自 Pubmed 基因库, 引物序列是由上海英俊生物技术有限公司设计及合成, 在 Genebank 上核对证实引物序列和 PCR 扩增产物长度, 见表 1。

**1.2.4 NFs、AFs 和 CAFs 对食管癌细胞株 ECa109 侵袭能力的影响** 采用 24 孔 Transwell 小室 (滤膜孔径 8.0  $\mu$ m, 滤膜直径 6.5 mm) 构建细胞交互作用模型。上室底部滤膜预先铺盖 Matrigel 以模拟基底膜和细胞外基质, 具体步骤为: Matrigel 4 °C 过夜解冻, DMEM 培养基 1:10 稀释后, 迅速加入上室, 每

孔加 100  $\mu$ L, 冰上完成, 所用器具均已经预冷。将铺盖了 Matrigel 的小室放于 37 °C 恒温箱保温 6 h, 将 200  $\mu$ L 食管癌 ECa109 细胞株 (浓度  $1.5 \times 10^5$  个/mL) 等量接种于凝胶上, 下室分为 3 组, 每组等体积 (600  $\mu$ L) 加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基 (对照) 及浓度为  $5 \times 10^4$  个/mL 的 NFs、AFs 和 CAFs, 每组设两复孔, 作用 24 h, 拭去上室的凝胶和细胞, Giemsa 染色, 二甲苯封片。显微镜下计数膜左、右、中、上、下 5 个视野的穿膜细胞数。

**1.2.5 NFs、AFs 和 CAFs 与食管癌 ECa109 细胞株的相互影响** ECa109 细胞  $2 \times 10^5$  个共 600  $\mu$ L 接种于 Transwell 6 孔板的上室, 细胞贴壁后, 将等体积 200  $\mu$ L 的含 10% FBS 的 DMEM 培养基、NFs、AFs 和 CAFs 细胞置入孔径为 0.4  $\mu$ m 直径的 6.5 mm 的 Transwell 小室的下室, 培养 24 h 后, 分离、提取上室的 Eca109 细胞, 以备检测肿瘤标志物 mRNA 及 PCNA mRNA。

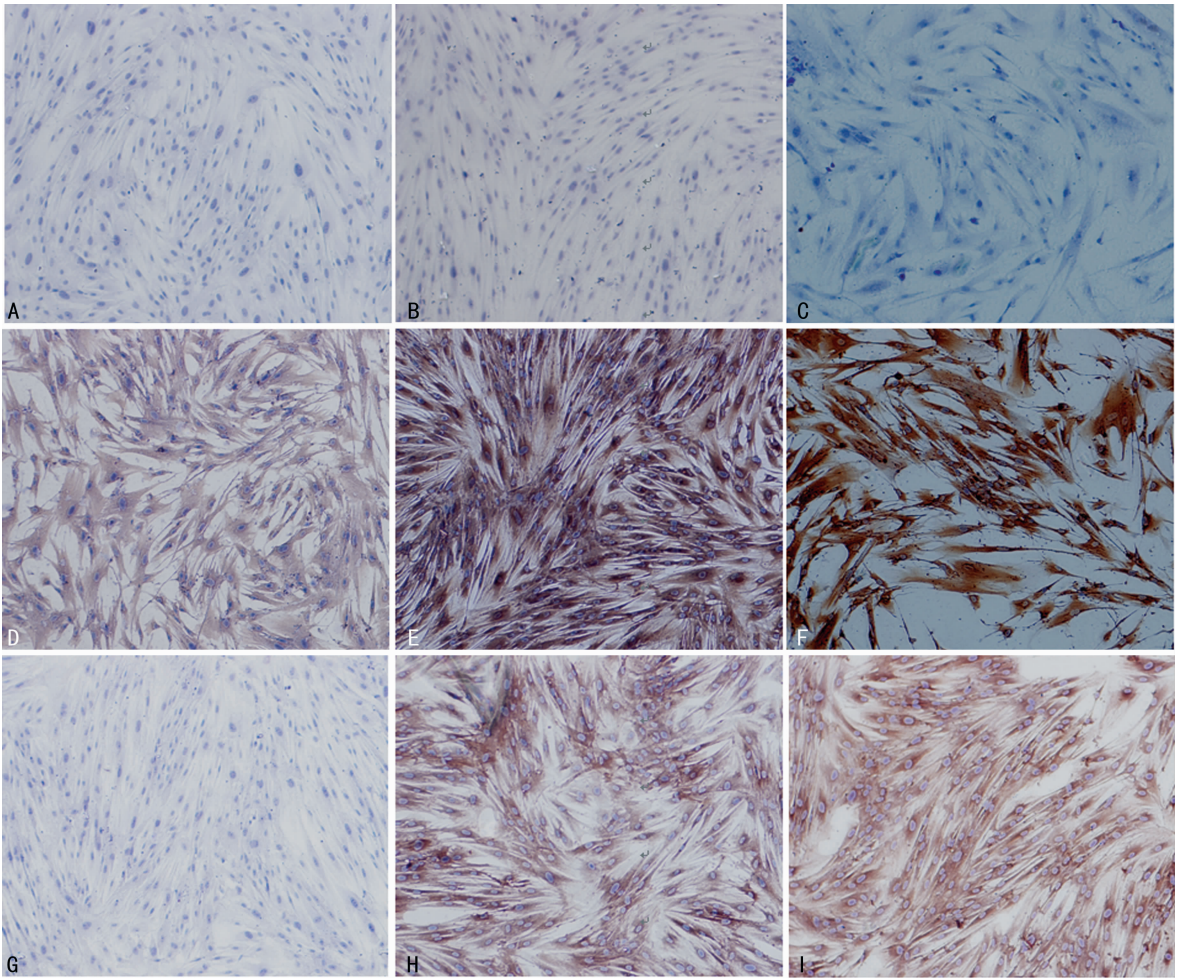
**1.3 统计学处理** 采用 SPSS11.5 软件进行数据分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 比较采用 *t* 检验; 计数资料用率表示, 比较采用  $\chi^2$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 NFs、AFs 和 CAFs 的鉴定** 细胞免疫化学染色: NFs、AFs 和 CAFs 中 CK 均为阴性, Vimentin 为阳性。 $\alpha$ -SMA 在 NFs 中为阴性表达, 在 AFs 和 CAFs 中为阳性表达, 见图 1。

**2.2 NFs、AFs 和 CAFs 的部分标志物 mRNA 测定** 从 NFs 到 AFs 再到 CAFs, Vimentin mRNA 的表达无差别,  $\alpha$ -SMA mRNA 的表达逐渐增强, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); TGF- $\beta$ 1 mRNA、HGF mRNA、MMP2 mRNA 和 MMP9 mRNA 在 NFs、AFs 中弱表达, 在 CAFs 中高表达, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 2。

**2.3 食管癌 ECa109 细胞株对 NFs、AFs 和 CAFs 部分肿瘤标志物 mRNA 的影响** 与食管癌 ECa109 细胞株间接共培养后,



A:CK 在 NFs 中的阴性表达( $\times 100$ );B:Vimentin 在 NFs 中的阳性表达( $\times 400$ );C: $\alpha$ -SMA 在 NFs 中的阴性表达( $\times 400$ );D:CK 在 AFs 中的阴性表达( $\times 100$ );E:Vimentin 在 AFs 中的阳性表达( $\times 400$ );F: $\alpha$ -SMA 在 AFs 中的阳性表达( $\times 400$ );G:CK 在 CAFs 中的阴性表达( $\times 400$ );H:Vimentin 在 CAFs 中的阳性表达( $\times 400$ );I: $\alpha$ -SMA 在 CAFs 中的阳性表达( $\times 400$ )

图 1 NFs、AFs 和 CAFs 3 种细胞关于 CK、Vimentin、 $\alpha$ -SMA 的免疫细胞化学结果

NFs、AFs 中 TGF- $\beta$ 1 mRNA、HGF mRNA、MMP2 mRNA、MMP9 mRNA 表达增强,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而 CAFs 在作用前后的表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 3。

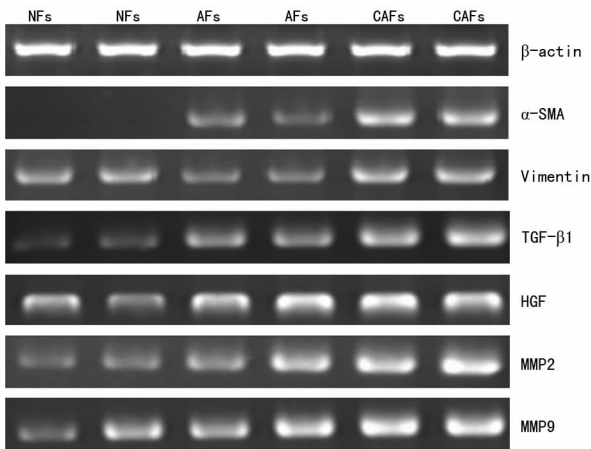
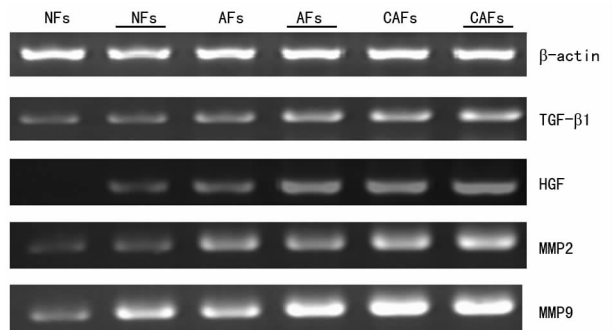


图 2  $\alpha$ -SMA、Vimentin、TGF- $\beta$ 1、HGF、MMP2、MMP9 mRNA 在 NFs、AFs 和 CAFs 中的表达

2.4 NFs、AFs 和 CAFs 对食管癌 ECa109 细胞株增殖的影响 NFs、AFs 和 CAFs 分别与食管癌 ECa109 细胞间接培养后,经检测发现食管癌 ECa109 细胞内 PCNA 表达量显著增

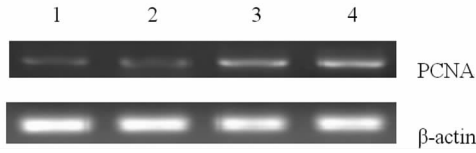
加,AFs、CAFs 能够促进 ECa109 细胞的增殖,与对照组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );而 NFs 对 ECa109 无明显促增殖作用,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 4。



NFs、AFs、CAFs;与食管癌 ECa109 细胞株间接共培养后  
图 3 与食管癌 ECa109 作用后,NFs、AFs 和 CAFs 中的 TGF- $\beta$ 1、HGF、MMP2、MMP9 mRNA 的表达

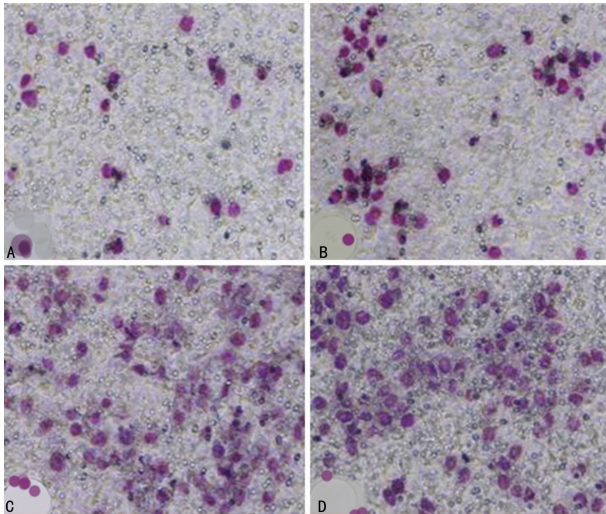
2.5 NFs、AFs 和 CAFs 对食管癌 ECa109 细胞株侵袭能力的影响 对照组见食管癌 ECa109 细胞株仅有少量细胞穿透 Matrigel 基膜,细胞数为  $(18.0 \pm 5.4)$  个,NFs 作用下 ECa109 侵袭能力有所增强,到达滤膜下方的细胞数为  $(35.0 \pm 4.0)$  个,与对照组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。AFs 和 CAFs 作用下 ECa109 细胞株侵袭能力明显增强,穿透 Matrigel 细胞

数分别为(125.2±7.1)、(135.5±8.0)个。AFs 和 CAFs 组细胞侵袭能力与其他两组相比,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 5。



1: Eca109; 2: Eca109+NFs; 3: Eca109+AFs; 4: Eca109+CAFs

图 4 PCNA mRNA 在 Eca109 细胞株及与 NFs、AFs 和 CAFs 作用后的 Eca109 细胞株中的表达



A: 对照组; B: NFs 组; C: AFs 组; D: CAFs 组

图 5 侵袭实验结果(×400)

### 3 讨 论

肿瘤的生物学特性不仅受癌基因和抑癌基因的调控,还受间质微环境的巨大影响。CAFs 是肿瘤间质微环境的主要细胞成分,在不同的组织器官,可以表达  $\alpha$ -SMA<sup>[1-3]</sup>、成纤维细胞活化蛋白(FAP)<sup>[4-6]</sup> 等不同的特征性分子标志。目前大多数观点认为,CAFs 是由正常的成纤维细胞分化而来。已有研究证实,乳腺 CAFs 是由 NFs 转化而来<sup>[7]</sup>,食管 CAFs 是否由 NFs 发展而来,两者间是否存在过渡阶段——AFs,食管癌细胞分别与 NFs、AFs 及 CAFs 相互作用后,双方的生物学特性会发生怎样的变化尚未见报道。

本研究发现 NFs、AFs 和 CAFs 的表型有差异,Vimentin 表达均为阳性,NFs 中  $\alpha$ -SMA 表达为阴性,而在 AFs 与 CAFs 中  $\alpha$ -SMA 表达均为阳性,研究同时发现,三者  $\alpha$ -SMA mRNA 测定值间差异也有统计学意义( $P < 0.05$ ),NFs 基本不表达,AFs 与 CAFs 均有表达,CAFs 的  $\alpha$ -SMA mRNA 表达明显强于 AFs。三者的分泌表达能力也存在着差异,TGF- $\beta$ 1、HGF、MMP2 和 MMP9 mRNA 的测定值呈现一个逐渐增高的趋势,推测 NFs 活化成 CAFs 是一个渐进的过程,AFs 可能是一个过渡阶段,活化的 AFs 与 CAFs 的蛋白分泌功能更为活跃。

癌细胞基因表型和生物学特性均可受到 CAFs 的影响。前列腺癌来源的 CAFs 和乳腺 CAFs 均能促进具有癌变潜能的上皮细胞的恶变、增殖<sup>[8-9]</sup>。本研究显示,食管 NFs、AFs 及 CAFs 均可促进食管癌细胞株 Eca109 迁移和侵袭,AFs 与 CAFs 还可促使该细胞株的 PCNA 表达明显增强。可见活化后的间质成纤维细胞可明显促进癌细胞的增殖,而 NFs 并未

表现出抑制癌细胞的作用,反而是微弱刺激了癌细胞增殖,具体机制不明,推测可能与其表达少量 TGF- $\beta$ 1 或 HGF 有关。

癌细胞与成纤维细胞间的作用是交互的<sup>[10]</sup>,本研究显示在与癌细胞 Eca109 非直接接触后,NFs、AFs 及 CAFs 的 TGF- $\beta$ 1、HGF、MMP2 和 MMP9 mRNA 表达均明显增强,可见食管癌细胞可以诱导食管间质成纤维细胞的分泌功能变得活跃。过度表达 TGF- $\beta$ 1 或 HGF 的鼠纤维母细胞能够诱导正常人乳腺上皮癌变<sup>[11]</sup>,虽然过度表达 TGF- $\beta$ 1 或 HGF 的人食管间质成纤维细胞可否诱导正常食管上皮细胞恶变尚无研究报道,但大量研究证实,CAFs 可明显促进其他部位肿瘤的进展和转移<sup>[12-14]</sup>。

综上所述,食管 CAFs 可能是由 NFs 逐步发展而来,二者间的信号传导通路复杂,切断食管间质成纤维细胞的促癌作用应该是抑制食管癌进展的重要环节。

### 参考文献

- [1] 刘念,彭艳,郑金华. 口腔鳞癌侵袭方式与  $\alpha$ -SMA、胶原纤维表达的相关性对预后的影响[J]. 肿瘤学杂志,2016,22(9):727-732.
- [2] 郭业兵,张廷国.  $\alpha$ -SMA、MMP-2、bFGF 在宫颈早期浸润癌间质中的表达及鉴别意义[J]. 现代妇产科进展,2016,25(12):945-947.
- [3] 赵晶洁,李建华,王洪,等. 乳腺癌中  $\alpha$ -SMA 蛋白与 MMP-3 蛋白的表达及其生物学行为[J]. 临床与实验病理学杂志,2015,31(5):584-586.
- [4] 李长平,盖晓东. 子宫颈浸润性癌组织中  $\alpha$ -SMA 和 FAP 表达及临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志,2015,31(11):1248-1252.
- [5] 崔演,刘胜男,孙凤丹,等. 食管鳞癌间质组织中 FAP、CD68 的表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志,2014,30(1):82-84.
- [6] 郑芳,刘洪羽,李春红,等. FAP、整合素  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 和 uPAR 在上皮性卵巢癌中的表达及与肿瘤转移的关系[J]. 哈尔滨医科大学学报,2012,46(6):546-549.
- [7] POLYAK K, KALLURI R. The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol,2010,2(11):a003244.
- [8] OLUMI A F, GROSSFELD G D, HAYWARD S W, et al. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium[J]. Cancer Res, 1999,59(19):5002-5011.
- [9] 蔡伟,康骅,刘晨,等. CAFs 对乳腺癌细胞生物学特性的影响及机制探讨[J]. 现代肿瘤医学,2014,22(6):1249-1253.
- [10] REN J, GUO H, WU H L, et al. GPER in CAFs regulates hypoxia-driven breast cancer invasion in a CTGF-dependent manner[J]. Oncol Rep,2015,33(4):1929-1937.
- [11] KUPERWASSER C, CHAVARRIA T, WU M, et al. Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004,101(14):4966-4971.
- [12] 鲍健,吴正升,齐越,等. 乳腺癌组织中 TGF- $\beta$ 1 的表达及其介导乳腺癌侵袭和转移的机制[J]. 中华肿瘤杂志,2009,31(9):679-682.

对 I/R 大鼠心肌 Bax、Caspase-3 和 Bcl-2 的改善效果。见表 4。

表 4 各组大鼠心肌凋亡相关基因的表达情况( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	Bax	Bcl-2	Caspase-3
Sham 组	0.08±0.02	0.46±0.05	0.16±0.07
I/R 组	0.52±0.04 <sup>a</sup>	0.11±0.03 <sup>a</sup>	0.73±0.06 <sup>a</sup>
DEX 组	0.13±0.03 <sup>ab</sup>	0.38±0.06 <sup>ab</sup>	0.21±0.08 <sup>ab</sup>
miR-208b-3p+DEX 组	0.64±0.06 <sup>ac</sup>	0.09±0.05 <sup>ac</sup>	0.65±0.05 <sup>ac</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与 Sham 组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 I/R 组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与 DEX 组比较

### 3 讨 论

MIRI 是指在心肌缺血基础上恢复血流后组织细胞功能代谢障碍及结构功能破坏反而加重,甚至发生不可逆性损伤的现象<sup>[5]</sup>。近年来,MIRI 的发生机制已得到深入研究。目前公认的是细胞凋亡与 MIRI 及 I/R 过程密切相关<sup>[6]</sup>。大量证据显示,在许多器官和组织中抗凋亡的调节与许多基因的调节有关,包括 Bcl-2 家族、Caspase 家族、p53 和核因子- $\kappa$ B。心肌细胞的凋亡是 MIRI 的关键细胞事件<sup>[7-8]</sup>,越来越多的研究都集中在如何减轻心肌细胞凋亡。

多项研究的结果表明,给予 DEX 处理对发生 I/R 损伤的心肌细胞有较好的保护作用。秦智刚等<sup>[9]</sup>发现 DEX 能在一定程度上减轻体外循环下的 MIRI,其机制可能与其抗氧化应激作用有关。吴志林等<sup>[10]</sup>发现 DEX 定可通过抗氧化应激,降低炎症反应而减轻大鼠 MIRI。但 DEX 改善 MIRI 的机制目前尚不清楚。

microRNAs 对发生 IRI 心肌细胞的凋亡有较好的调控作用。其中 miR-208b-3p 具有促凋亡作用<sup>[4]</sup>,且研究发现下调其水平可减轻 IRI。本研究发现 I/R 组出现心功能异常,而给予 DEX 处理后以上指标获改善,以上结果表明 I/R 模型制备成功,且 DEX 具有较好的心肌 I/R 损伤保护作用。

本研究进一步采用过表达 miR-208b-3p 发现 DEX 对 MIRI 的改善效果被逆转,表明 DEX 可通过下调 miR-208b-3p 水平来发挥对 MIRI 的保护作用。miR-208b-3p 是一种促凋亡蛋白,本研究发现过表达 miR-208b-3p 处理后导致 Bax 和 Caspase-3 水平升高,Bcl-2 水平降低,提示 miR-208b-3p 可能通过促进凋亡相关蛋白表达来逆转 DEX 对 MIRI 的改善效果。多项研究指出氧化应激也是导致 MIRI 的原因之一<sup>[11-12]</sup>,本研究发现过表达 miR-208b-3p 后可导致 GSH-Px、T-AOC 及 SOD 活性均降低,MDA 水平升高,表明 miR-208b-3p 可影响 DEX 对氧化应激的改善效果。

综上所述,过表达 miR-208b-3p 可消除 DEX 对心肌 I/R 损伤的保护作用,提示 miR-208b-3p 可能参与了 I/R 损伤的发生、发展。

### 参考文献

[1] OKADA H, KURITA T, MOCHIZUKI T, et al. The cardioprotective effect of dexmedetomidine on global ischaemia in isolated rat heartsick[J]. Resuscitation, 2007, 74

(3):538-545.

[2] GENCER B, KARACA T, TUFAN H A, et al. The protective effects of dexmedetomidine against apoptosis in retinal ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Cutan Ocul Toxicol, 2014, 33(4):283-288.

[3] WANG H, ZHANG S, XU S, et al. The efficacy and mechanism of dexmedetomidine in myocardial apoptosis via the renin-angiotensin-aldosterone system[J]. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2015, 16(4):1274-80.

[4] BIAN C, XU T D, ZHU H, et al. Luteolin inhibits ischemia/Reperfusion-Induced myocardial injury in rats via downregulation of microRNA-208b-3p[J]. PLoS One, 2015, 10(12):e0144877.

[5] MIMURO S, KATOH T, SUZUKI A, et al. Deterioration of myocardial injury due to dexmedetomidine administration after myocardial ischaemia[J]. Resuscitation, 2010, 81(12):1714-1717.

[6] TAKYAR S, VASAVADA H, ZHANG J G, et al. VEGF controls lung Th2 inflammation via the miR-1-Mpl(myeloproliferative leukemia virus oncogene)-P-selectin axis[J]. J Exp Med, 2013, 210(10):1993-2010.

[7] WEI G, SRINIVASAN R, CANTEMIR-STONE C Z, et al. Ets1 and Ets2 are required for endothelial cell survival during embryonic angiogenesis[J]. Blood, 2009, 114(5):1123-1130.

[8] LI M Y, ZHU M, FENG F, et al. Long interspersed nucleotide acid element-1 ORF-1 protein promotes proliferation and invasion of human colorectal cancer LoVo cells through enhancing ETS-1 activity[J]. Genet Mol Res, 2014, 13(3):6981-6994.

[9] 秦智刚, 艾玲, 罗爱林, 等. 右美托咪定对体外循环下心肌缺血再灌注损伤的保护效应[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2013, 42(5):551-554.

[10] 吴志林, 褚淑娟, 姚尚龙, 等. 不同剂量右美托咪定预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤以及炎症反应的影响[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2015, 44(4):445-447.

[11] LV P, ZHOU M X, HE J, et al. Circulating miR-208b and miR-34a are associated with left ventricular remodeling after acute myocardial infarction[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(4):5774-5788.

[12] JAYAWARDENA T M, EGEMNAZAROV B, FINCH E A, et al. MicroRNA-Mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes[J]. Circ Res, 2012, 110(11):1465-1473.

(收稿日期:2017-06-18 修回日期:2017-08-26)

(上接第 152 页)

[13] WANG J, CHEN J, ZHANG K L, et al. TGF- $\beta$ 1 regulates the invasive and metastatic potential of mucoepidermoid carcinoma cells[J]. J Oral Pathol Med, 2011, 40(10):762-768.

[14] GONZALEZ-ZUBELDIA I, DOTOR J, REDRADO M, et

al. Co-migration of colon cancer cells and CAFs induced by TGF $\beta$  enhances liver metastasis[J]. Cell Tissue Res, 2015, 359(3):829-839.

(收稿日期:2017-07-10 修回日期:2017-09-16)