



过表达vWF对人脐静脉内皮细胞生物学影响的实验研究

张龙飞, 陈世远, 冯奔驰, 刘德朗, 张秀杨, 高涌

引用本文:

张龙飞,陈世远,冯奔驰,刘德朗,张秀杨,高涌. 过表达vWF对人脐静脉内皮细胞生物学影响的实验研究[J]. 蚌埠医学院学报, 2024, 49(3): 281-285,290.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2024.03.001>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

miR-503-5p对IL-1 β 诱导的血管内皮细胞增殖、迁移、凋亡和黏附的影响

Effects of miR-503-5p on the proliferation, migration, apoptosis and adhesion of vascular endothelial cells induced by IL-1 β

蚌埠医学院学报. 2021, 46(12): 1668-1672 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2021.12.006>

PD-L1对肝细胞癌细胞增殖、侵袭及迁移的影响

Effect of PD-L1 on the proliferation, invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells

蚌埠医学院学报. 2020, 45(5): 565-568 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.05.002>

川芎嗪对脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞高通透性的保护作用研究

Protective effect of tetramethylpyrazine on lipopolysaccharide-induced high permeability of human umbilical vein endothelial cells

蚌埠医学院学报. 2021, 46(2): 141-145 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2021.02.001>

过表达Periostin蛋白对内皮前体细胞功能影响的实验研究

Effect of over-expression of Periostin protein on the biological function of endothelial progenitor cells

蚌埠医学院学报. 2019, 44(1): 1-5 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.01.001>

长链非编码RNA LINC00173在紫杉醇耐药乳腺癌细胞中的作用

Role of long non-coding RNA LINC00173 in paclitaxel-resistant breast cancer cells

蚌埠医学院学报. 2020, 45(9): 1153-1158 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.09.003>

过表达 vWF 对人脐静脉内皮细胞生物学影响的实验研究

张龙飞,陈世远,冯奔驰,刘德朗,张秀杨,高涌

(蚌埠医科大学第一附属医院 血管外科,安徽 蚌埠 233004)

[摘要] **目的:**探讨过表达血管性血友病因子(vWF)对人脐静脉内皮细胞(HUVECs)增殖、迁移、侵袭、凋亡及成管能力的影响。**方法:**设计构建 5 种过表达 vWF 的质粒 CRISPRa 载体,将 HUVECs 分为实验组(5 组)与对照组。将 5 种质粒分别转染实验组细胞,Western blotting 检测各组细胞 vWF 的表达效果,选取优势组。通过细胞增殖实验、细胞划痕实验、细胞侵袭实验、细胞凋亡实验、细胞成管实验等,观察过表达 vWF 对 HUVECs 增殖、迁移、侵袭、凋亡及成管能力的影响。Western blotting 检测 5 个常见通路蛋白因子在 2 组细胞中的表达,探测可能相关的机制。**结果:**成功转染后各组 HUVECs 的 vWF 蛋白表达水平均明显升高,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。其中 vWF-OE4 组过表达量最高,故选取该引物序列进行后续实验。与对照组相比,vWF-OE 组细胞增殖减慢,细胞划痕 48 h 迁移率降低,Transwell 细胞侵袭率降低($P < 0.05$),细胞凋亡率、血管形成能力、HUVECs 生成小管的长度均增高($P < 0.05$),JUN、P53 蛋白含量均增高($P < 0.05$)。**结论:**过表达 vWF 对 HUVECs 增殖、迁移、侵袭行为具有显著抑制作用,促进凋亡,成管能力增强。

[关键词] 布加综合征;血管血友病因子;人脐静脉内皮细胞

[中图分类号] R 363.2

[文献标志码] A

DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2024.03.001

Biological effects of overexpression of vWF on human umbilical vein endothelial cells

ZHANG Longfei, CHEN Shiyuan, FENG Benchu, LIU Delang, ZHANG Xiuyang, GAO Yong

(Department of Vascular Surgery, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical University, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of overexpression of von Willebrand factor (vWF) on the proliferation, migration, invasion, apoptosis, and tube formation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods:** Five vWF-overexpressing plasmid CRISPRa vectors were designed and constructed, and HUVECs were divided into the experimental group (5 groups) and control group. Five plasmids were transfected into the experimental group, and the expression effect of vWF in each group was detected by Western blotting, and the dominant group was selected. The effects of vWF overexpression on the proliferation, migration, invasion, apoptosis and tube formation of HUVECs were observed by cell proliferation assay, scratch assay, cell invasion assay, apoptosis assay, and cell tube formation assay. Western blotting was used to detect the expression of 5 common pathway protein factors in the two groups of cells and explore the possible related mechanisms. **Results:** Western blotting showed that the expression level of vWF in HUVECs after successful transfection was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). Among them, the overexpression of vWF in the vWF-OE4 group was significantly higher than that of other groups, so the primer sequence was selected for subsequent experiments. Compared with the control group, the cell proliferation in vWF-OE group was slowed down, the cell scratch 48 h mobility was decreased, the Transwell cell invasion rate was decreased ($P < 0.05$); the apoptosis rate, angiogenesis ability and the length of HUVECs producing tubules were increased ($P < 0.05$); the protein contents of JUN and P53 were increased ($P < 0.05$). **Conclusions:** Overexpression of vWF can significantly inhibit the proliferation, migration and invasion of HUVECs, promote apoptosis and enhance the ability of tube formation.

[Key words] Budd Chiari syndrome; von Willebrand factor; human umbilical vein endothelial cells

布加综合征(BCS)在我国主要以下腔静脉与肝静脉阻塞狭窄为主,且以隔膜型阻塞多见,在亚洲发病为 2.40/百万至 33.10/百万^[1]。BCS 病人下腔静脉增生隔膜主要含有增生的血管内皮细胞和血栓

等,但关于静脉腔内隔膜形成的机制及引起内皮细胞增殖和凋亡的分子机制目前尚未完全阐明。血管性血友病因子(vWF)主要由血管内皮细胞和巨噬细胞分泌,参与凝血机制以及静脉血栓的形成。研

[收稿日期] 2022-05-29 [修回日期] 2023-01-30

[基金项目] 安徽省高校自然科学研究重点项目(KJ2020A0558);安徽省高校科学研究研究生项目(YJS20210538)

[作者简介] 张龙飞(1988-),男,硕士研究生,主治医师。

[通信作者] 高涌,博士研究生导师,主任医师,教授。E-mail:Dr.gaoyong@163.com;陈世远,主任医师,教授。E-mail:51293@bbmc.edu.cn

究^[2]发现,vWF 缺陷小鼠不会因下腔静脉的完全或部分阻塞而出现血流限制所导致的下腔静脉栓塞,50%正常水平的 vWF 同样对下腔静脉血流限制小鼠有引起栓塞的作用。还有研究^[3]通过小分子干扰 RNA (siRNA) 干扰脐静脉内皮细胞 vWF 的表达,发现细胞增殖增强,可促进血管生成。本课题组前期利用同位素标记相对和绝对定量 (iTRAQ) 技术对皖北地区 BCS 病人与下肢静脉曲张病人血清蛋白进行鉴定与生信分析发现,vWF 为其中一种差异明显的蛋白因子^[4]。本研究通过构建过表达 vWF 质粒转染人脐静脉内皮细胞,检测过表达 vWF 对人脐静脉内皮细胞生物学影响,探讨其可能的机制,以期解释 BCS 的发病机制提供新方向。

1 材料与方法

1.1 主要试剂材料

人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 由中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所细胞库提供;vWF 过表达质粒载体由美国 Invitrogen 公司提供;内皮细胞专用培养基 (ECM) 购于美国 Gibco 公司;细胞毒性检测试剂盒 (CCK-8) 购于美国 Biolite 公司;Transwell 试剂盒、侵袭试剂盒、Matrigel 购自 Corning 公司;凋亡试剂盒购自 AAT 公司;内皮细胞生长因子 (ECGS) 购于 ScienCell 公司;Trizol 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;ECL 化学发光试剂盒购自美国 Thermo 公司;RT 逆转录试剂盒购自 MBI 公司;高纯度质粒小提试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司;GAPDH 抗体、vWF 抗体、JUN 抗体、Fas 抗体、P53 抗体购于 Abcam 公司 (杭州);JNK1 抗体、ERK 抗体购于 CST 公司 (美国);山羊抗兔抗体 (二抗) 购自 Thermo Fisher 公司 (美国);SP 试剂盒和 DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物公司。IX71 荧光显微镜购自日本奥林巴斯株式会社;M2009PR 酶标仪购自 Tecan infinite 公司;Guava easyCyte HT 流式细胞仪购自 Millipore 公司;ChemiDoc XRS 化学发光成像系统、icycler 荧光定量 PCR 仪购自美国 BiORAD 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 HUVECs 细胞培养基配制:DMEM 基础培养基 + 10% 胎牛血清 + 1% 青链抗生素。细胞在 37 °C、5% CO₂、湿润的细胞培养箱培养。当细胞增殖铺满 90% 时,0.25% 胰酶消化分散,并传代。

1.2.2 分组与处理 将 HUVECs 分 6 组,将 5 组过

表达 vWF 质粒载体转染 5 组 HUVECs (过表达 vWF 质粒 + HUVEC),1 组为对照组。通过 Western blotting 试验检测各组过表达 vWF 情况,选取优势组进行后续实验,并设立质粒空载体为阴性对照组。

1.2.3 质粒载体构建 通过斯坦福大学的 sgRNA 设计网站,在人源 vWF 基因的转录起始位点 (TSS) 上游 50 ~ 400 bp 区域内分别设计 5 条 sgRNA 序列,并构建 5 组质粒 CRISPRa 载体 (见表 1)。

表 1 sgRNA 序列与位置

sgRNA 名称	sgRNA 序列	与 TSS 位点距离
vWF-sgRNA1	GGA AGA CCA GGG ATC AAG TGT GG	175 bp
vWF-sgRNA2	GGA TCA ACT GTG GGG GTG TAG GG	165 bp
vWF-sgRNA3	GAC CGG ATC CTT CAT ACC TGG GG	405 bp
vWF-sgRNA4	GAG GGC AAG GCA GTT AAT TAA GG	126 bp
vWF-sgRNA5	GTG TGG GGG TGT ACG GAT AGG GG	158 bp

1.2.4 vWF sgRNA 转染 HUVEC 细胞和 Western blotting 实验检测 vWF 蛋白表达 将 HUVECs 培养到对数生长期时,细胞计数为 4×10^5 cells/well,接种到 6 孔板内,并分组为 ctrl 组、vWF-OE1 组、vWF-OE2 组、vWF-OE3 组、vWF-OE4 组、vWF-OE5 组。用无抗生素培养基培养 24 h,分别用以上构建的 5 种质粒转染细胞,孵育 24 h。收集细胞,RIPA 强细胞裂解液裂解细胞,提取细胞总蛋白,BCA 试剂测定浓度。电泳转致 PVDF 膜上,封闭液室温封闭 1 h,转入抗 vWF 抗体 (1:500 稀释) 与抗 GADPH 抗体 (1:1 000 稀释) 的封闭液中,4 °C、24 h 后同山羊抗兔二抗 (1:5 000 稀释) 共同孵育 (室温) 1.5 h,并与化学发光底物结合 5 min。GADPH 作内参,ChemiDoc XRS 化学发光成像系统查看结果,与内参的灰度比值为目的蛋白的相对表达量。选取质粒过表达优势组行后续实验。

1.2.5 细胞增殖实验 采用 CCK-8 试验检测细胞增殖能力。选取处于对数生长期的 vWF-OE 组与对照组细胞胰酶消化后,完全培养基重悬成细胞悬液,接种于 96 孔板 (细胞密度为 2 000 cells/well,100 μ L/well),每组 3 个复孔,放入 37 °C 细胞培养箱进行培养。分别于 0、24、48、72、96 h 取出,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,再放入细胞培养箱中培养 2 h 后根据试剂盒说明书,用酶标仪检测记录 450 nm 处吸光度 (OD450) 值。

1.2.6 细胞划痕实验 通过细胞划痕试验观察细胞迁移能力。将 vWF-OE 组与对照组细胞接种于

12 孔板中(细胞密度为 2×10^5 cells/well), 每组 3 个复孔。次日细胞汇合度 $> 90\%$, 用 $10 \mu\text{L}$ 无菌移液枪头对直均匀划过细胞, PBS 漂洗 3 遍, 去除漂浮细胞, 加入培养基并拍照(0 h), 置入 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱培养。选择 24、48 h 取出拍照, 测量 24、48 h 细胞划痕宽度, 与 0 h 比较, 计数算出迁移率。

1.2.7 细胞侵袭实验 选取 vWF-OE 组与对照组处于对数期的细胞, 胰酶消化, 制备无血清细胞悬浮液, 并计数。无血清培养基加入上下小室, Matrigel 基质层水化后去除血清。上室加入 $100 \mu\text{L}$ 细胞悬液(6×10^4 cells/well), 下室内加入 $600 \mu\text{L}$ 含 $10\% \text{ FBS}$ 培养基, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱培养 24 h。倒扣小室于吸水纸以去除培养基, 用棉拭子轻轻移去小室内非转移细胞, 用 PBS 洗小室 3 遍, 4% 多聚甲醛固定 30 min。用 0.1% 结晶紫染色 30 min, PBS 清洗后置入新 24 孔板, 倒置显微镜拍照和细胞计数分析。

1.2.8 细胞凋亡实验 采用 Annexin V-APC 单染色法检测 vWF-OE 组与对照组细胞凋亡情况。将 2 组细胞接种于 6 孔板, 细胞融合度达约 85% 时, 胰酶消化细胞, 完全培养基重悬成细胞悬液, 与上清细胞收集于同 5 mL 离心管。1 300 r/min 离心 5 min, 弃上清, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 预冷的 D-Hanks ($\text{pH} = 7.2 \sim 7.4$) 洗涤细胞沉淀。1 \times binding buffer 洗涤细胞沉淀一次, 1 300 r/min 离心 3 min, 收集细胞。200 μL 1 \times binding buffer 重悬细胞沉淀, 加 $10 \mu\text{L}$ Annexin V-APC 染色, 室温避光 10 ~ 15 min。根据细胞量, 补加 400 ~ 800 μL 1 \times binding buffer, 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.2.9 细胞成管实验 取 2 组细胞铺于 6 孔板(约 2×10^5 cells/well), 待贴壁 D-Hanks 洗涤 2 遍, 换无血清培养基培养 24 h, 收集上清。将 96 孔板孔板及枪头 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 预冷。取 Matrigel 胶 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 环境充分融化, 铺于预冷的 96 孔板, 每孔 $70 \mu\text{L}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 凝固 30 min 备用。胰酶消化细胞, 用无血清培养基洗细胞 2 ~ 3 次, 去除血清。用预先收集的目的细胞培养上清重悬为 3×10^4 cells/100 μL , 铺 96 孔板。37 $^\circ\text{C}$ 培养预设时间(2 ~ 4 h)后, 弃去旧液, 每孔加入 $50 \mu\text{L}$ Calcein-AM 浓度为 $0.2 \mu\text{mol/L}$ 的培养基 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 5 ~ 10 min。倒置显微镜下随机选取 3 个视野观察管状结构形成情况, 并测量细胞生成小管的面积和长度。

1.2.10 Western blotting 实验检测通路蛋白表达 收集生长状态良好的 vWF-OE 组和对照组细胞, RIPA 强细胞裂解液裂解细胞, 提取细胞总蛋白,

BCA 试剂测定浓度, 电泳转致 PVDF 膜上, 室温封闭 1 h, 转入对应一抗(1:1 000 稀释)的封闭液中, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、24 h 后与山羊抗兔二抗(1:5 000)共同孵育(室温) 1.5 h, 并与化学发光底物结合 5 min。GADPH 作内参, ChemiDoc XRS 化学发光成像系统查看结果, 与 GADPH 的灰度比值为目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 *t* 检验、方差分析和 *q* 检验。

2 结果

2.1 各组 HUVECs vWF 蛋白表达量比较

通过 Western blotting 实验检测各组细胞 vWF 表达, 分析各组条带灰度比值提示 vWF-OE4 组细胞 vWF 表达量高于其他组, 差异有统计学意义($P < 0.05 \sim P < 0.01$)(见表 2)。

表 2 各组细胞 vWF 灰度比值表($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	vWF 灰度比值(系数为 10 \times)
对照组	3	1.45 \pm 0.32
vWF-OE1 组	3	3.37 \pm 0.64*
vWF-OE2 组	3	4.64 \pm 0.59**
vWF-OE3 组	3	6.06 \pm 0.52*#▲
vWF-OE4 组	3	7.25 \pm 0.51*#▲
vWF-OE5 组	3	3.83 \pm 0.57*■●
<i>F</i>	—	44.11
<i>P</i>	—	< 0.01
<i>MS</i> 组内	—	0.732

q 检验: 与 Ctrl 组比较 * $P < 0.05$; 与 vWF-OE1 组比较 # $P < 0.05$; 与 vWF-OE2 组比较 ▲ $P < 0.05$; 与 vWF-OE3 组比较 ■ $P < 0.05$; 与 vWF-OE4 组比较 ● $P < 0.05$

2.2 vWF-OE 组和对照组细胞 CCK-8 增殖实验结果比较

CCK8 检测显示, vWF-OE 组细胞在 24 ~ 96 h 的比较 OD450 值低于对照组($P < 0.05$)(见表 3)。

2.3 vWF-OE 组和对照组细胞划痕实验迁移率比较

划痕实验结果显示, 24 h 时, 2 组细胞迁移率差异无统计学意义($P > 0.05$)。48 h 时, vWF-OE 组细胞迁移率明显低于对照组($P < 0.01$)(见表 4)。

2.4 vWF-OE 组和对照组细胞侵袭实验结果比较

细胞侵袭实验显示, vWF-OE 组在 Transwell 小室内孵育 24 h 后侵袭的细胞数明显低于对照组($P < 0.01$)(见表 5)。

表3 vWF-OE 组和对照组细胞 CCK-8 增殖实验结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	OD450 值					F	P	MS _{组内}
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h			
vWF-OE 组	3	0.277 ± 0.004	0.309 ± 0.009	0.400 ± 0.008 **	0.602 ± 0.022 **▲	0.967 ± 0.052 **▲■	357.91	<0.01	0.001
对照组	3	0.268 ± 0.019	0.436 ± 0.013 *	0.649 ± 0.021 **	1.193 ± 0.011 **▲	1.891 ± 0.022 **▲■	4229.89	<0.01	0.000
t	—	0.82	14.05	19.43	41.41	28.16	—	—	—
P	—	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	—	—	—

q 检验:与 0 h 比较 *P<0.05;与 24 h 比较#P<0.05;与 48 h 比较▲P<0.05;与 72 h 比较■P<0.05

表4 vWF-OE 组和对照组细胞划痕实验迁移率比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	24 h	48 h	t	P
vWF-OE 组	3	0.43 ± 0.07	0.60 ± 0.11	1.62	>0.05
对照组	3	0.56 ± 0.08	1.00 ± 0.09	18.07	<0.01
t	—	2.05	4.87	—	—
P	—	>0.05	<0.01	—	—

表5 vWF-OE 组和对照组细胞侵袭实验结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	侵袭细胞数	侵袭细胞数/ 对照组侵袭细胞数
vWF-OE 组	3	94.00 ± 14.50	0.39 ± 0.06
对照组	3	245.00 ± 24.79	1.01 ± 0.12
t	—	9.07	7.88
P	—	<0.01	<0.01

2.5 vWF-OE 组和对照组细胞凋亡率比较

2 组细胞进行凋亡实验检测得出,vWF-OE 组细胞的凋亡率(10.27 ± 0.73)%,明显高于对照组(5.24 ± 0.18)%(t = 11.57, P < 0.01)。

2.6 vWF-OE 组和对照组细胞成管实验结果比较

结果提示,vWF-OE 组细胞生成小管的长度(94 104 ± 9 017) μm 均高于对照组(63 904 ± 7 236) μm(t = 4.52, P < 0.05)。

2.7 vWF-OE 组和对照组细胞通路因子蛋白表达量比较

采用 Western blotting 实验检测 2 组细胞 JUN、p53、ERK、JNK1、Fas 5 个通路蛋白表达量。结果显示,vWF-OE 组 JUN、p53 蛋白表达量高于对照组(P < 0.05),而 2 组 Fas、ERK、JNK1 细胞表达量差异无统计学意义(P > 0.05)(见表 6)。

3 讨论

BCS 是肝静脉或下腔静脉阻塞继而引起的一种以淤血性门静脉或下腔静脉高压为主要临床表现的疾病,其发病机制目前仍未有完全清楚的阐述,但已知受多种致病因素的影响。全球 BCS 的发病率约

为 1/10 万;在我国 BCS 病人主要分布在黄河中下游以及皖北^[5]、苏北地区的淮河流域,具有显著地域特征。我国和西方国家 BCS 病人的病因和临床特征存在很大差异,国外 BCS 病人主要是血栓形成有关的疾病,而我国 BCS 病人主要表现为肝静脉、下腔静脉膜型混合型阻塞,还有相当一部分病人表现为血管节段性下腔静脉狭窄,均可合并血栓形成。有学者^[6]推测,BCS 一部分可能因反复呼吸运动可导致下腔静脉膈部静脉内皮细胞活化和损伤,而受损的内皮细胞会分泌大量的 vWF,使血浆的 vWF 水平大幅增高,因此 vWF 也可以作为血管损伤的诊断指标。本课题组前期研究发现皖北地区 BCS 病人血清中 vWF 为差异蛋白,且通过蛋白互作分析为有意义因子^[4]。

表6 vWF-OE 组和对照组细胞通路因子蛋白表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	目的条带灰度值和内参条带灰度值比值(系数为 10 ×)				
		p53	JUN	Fas	ERK	JNK1
对照组	3	6.04 ± 1.98	11.26 ± 2.29	8.74 ± 2.20	15.98 ± 1.92	20.15 ± 5.21
vWF-OE 组	3	9.97 ± 2.13	18.14 ± 3.26	9.95 ± 3.27	16.57 ± 1.48	22.91 ± 6.07
t	—	2.34	2.99	0.53	0.42	0.60
P	—	<0.05	<0.05	>0.05	>0.05	>0.05

vWF 又称因子 VIII 相关抗原,是由内皮细胞及巨噬细胞分泌的一种大分子量糖蛋白,具有较强的黏附功能,是血浆的重要成分^[7]。作为一种多结构域、多功能的蛋白质,vWF 的功能和其蛋白质结构域密切相关,在人体中发挥着重要作用:vWF 主要血小板膜糖蛋白 I b(GP I b)-IX 复合物及内皮下胶原结合,介导血小板在血管损伤部位的黏附起到修复损伤血管以起到止血作用;除此以外,vWF 可介导血小板在损伤内皮细胞暴露的胶原表面黏附,协助血小板血栓形成;vWF 与 FVIII 结合形成复合物,使后者的半衰期延长,活性也更稳定^[8-9]。另外,vWF 的合成、分泌和功能还受到体内肝素、硫苷脂类物质的影响,其还能与蛇毒蛋白结合调控 vWF 和膜受体

蛋白之间的相互作用^[10]。ISHIHARA 等^[11]实验发现,缺乏 vWF 的小鼠,血管生成生长因子减少,血管生成减少致局部伤口延迟愈合。有研究^[2]通过 siRNA 干扰内皮细胞下调 vWF 基因表达发现细胞增殖能力和迁移能力表现都明显增强,而且内皮细胞外的 vWF 对内皮细胞同样有生理作用。血液中外源的 vWF 对血管内皮细胞仍有生物学影响^[12]。

本研究采用质粒转染技术上调 HUVECs vWF 的表达,Western blotting 结果显示各组 vWF 相比对照组的 vWF 蛋白表达水平明显上调,说明该质粒有效。之后通过细胞增殖实验、细胞划痕实验、细胞侵袭实验、细胞凋亡实验、细胞成管实验等,观察过表达 vWF 对 HUVEC 增殖、迁移、侵袭、迁徙成管能力的影响,结果显示 vWF 表达上调后明显抑制了 HUVEC 细胞的增殖能力、迁移能力和转移能力。血管内皮细胞迁移是新生血管形成的基础和关键^[13],而本研究也提示 vWF 表达对 HUVEC 细胞的增殖、迁移和转移能力有调控作用。细胞凋亡实验结果显示,vWF-OE 组细胞凋亡率明显高于对照组,提示 vWF 表达上调能诱导 HUVEC 细胞凋亡。作为一种代谢活跃的细胞,血管内皮细胞可在体内外多种刺激因素的影响下发生凋亡。在新血管生成、分化连通和退化过程中都可见内皮细胞凋亡,新生血管内皮细胞凋亡被认为与血管退化有关,此外其还被认为在局部新生血管的发育和血管连通中发挥着至关重要的作用^[14]。细胞成管实验结果显示,vWF 表达上调后显著增强了 HUVEC 细胞管状结构形成能力,管状结构的数量明显增多,单视野平均管状结构的面积和长度都明显增加,这说明内皮细胞过表达 vWF 后会明显促进内皮细胞的血管新生。

血管新生和血栓形成是极为复杂的过程,其主要可分为 3 个阶段,分别为血流阻断和缺氧、血管内皮细胞活化、炎症细胞募集。目前研究更多关注在机体慢性炎症过程以及其中炎症信号传导的作用^[15-16]。vWF 过表达通过何种机制影响血管内皮细胞的增殖、运动、凋亡和血管生成目前未有相关报道。本课题组进一步对转染质粒后的 vWF-OE 组和对照组细胞表达可能的相关通路因子蛋白进行检测,观察到 vWF 过表达可上调丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路中 p53、c-JUN 蛋白的表达。MAPK 信号通路是目前研究最多且最为广泛的一种对细胞周期运行和基因表达有重要调控作用的信号转导途径,控制着细胞的生长、增殖、存活、分化和死亡等过程,同时也参与血管新生和血栓形成^[17]。目

前研究发现 3 条并行的 MPAKs 信号通路,分别是 ERK/c-JUN/p53 信号通路、p38MAPK 通路和 JNK/SAPK γ 通路,这三条通路均产生于胞质,被激活后进入细胞核而发挥作用。ERK/c-JUN/p53 通路可使上皮细胞生长和增殖明显加快,从而可引起上皮细胞增生过度;其可调节血小板中线粒体通透性转换孔开放,使血小板活化和聚集;其还会促进组织因子释放,激活凝血级联瀑布反应,引发凝血酶的释放和活化,促进血栓形成和稳定^[18-20]。

综上所述,过表达 vWF 对静脉内皮细胞增殖、迁移、侵袭行为具有显著抑制作用,成管能力增强,证实了 vWF 对血管内皮细胞的生物学作用,vWF 可能成为血管内皮损伤修复的新的诊断治疗指标,也为解释 BCS 中发病机制中内皮细胞的功能异常提供新的方向。但是,血管新生和血栓形成的过程是极其复杂的,其中涉及了大量的信号通路和调节因子,要完全阐明 vWF 高表达在其中的具体作用和机制还需要后续实验研究来证实。

[参 考 文 献]

- [1] YINGYING L, VALERIO DS, HONGYU L, *et al.* Epidemiology of Budd-Chiari syndrome: a systematic review and meta-analysis [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2019, 43(4):468.
- [2] 郑洋, 王佳慧, 彭岳, 等. 莪术醇对小鼠肝窦内皮细胞结构的影响及其对肝内血管新生的抑制作用[J]. *吉林大学学报:医学版*, 2021, 47(5):1124.
- [3] STARKE RD, FERRARO F, PASCHALAKI KE, *et al.* Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis[J]. *Blood*, 2011, 117(3):1071.
- [4] 刘亚, 高涌, 余朝文, 等. 布加综合征患者血清差异蛋白分析[J]. *中华实验外科杂志*, 2020, 37(5):840.
- [5] 高涌, 余朝文, 陈世远, 等. 皖北地区布加综合征的流行病学及临床特征分析[J]. *中华血管外科杂志*, 2016, 1(3):164.
- [6] RANDI AM, SMITH KE, CASTAMAN G. von Willebrand factor regulation of blood vessel formation[J]. *Blood*, 2018, 132(2):132.
- [7] 王琦, 校建波, 李海荣, 等. 不稳定性心绞痛患者急性血管闭塞与血管性血友病因子和一氧化氮水平相关性以及阿托伐他汀干预效果临床研究[J]. *陕西医学杂志*, 2019, 48(7):834.
- [8] PROCHAZKA V, JONSZTA T, CZERNY D, *et al.* The role of von willebrand factor, adamts13, and cerebral artery thrombus composition in patient outcome following mechanical thrombectomy for acute ischemic stroke [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24:3929.
- [9] YAOI H, SHIDA Y, KITAZAWA T, *et al.* Activated factor VIII-mimicking effect by emicizumab on thrombus formation in type 2N von Willebrand disease under high shear flow conditions [J]. *Thromb Res*, 2021, 198:7.

较短, 禾肾丸治疗剂量未区分不同剂量组等; 此外禾肾丸通过何种信号通路对 ANGPTL3 进行调控, 是否对肾小球足细胞 ANGPTL3 表达水平产生直接作用等问题仍需以后进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] KOPP JB. Global glomerulosclerosis in primary nephrotic syndrome; including age as a variable to predict renal outcomes [J]. *Kidney Int*, 2018, 93(5):1043.
- [2] HUANG WJ, YANG T, LIU CJ, *et al.* Traditional Chinese medicine based on zheng differentiation versus angiotensin receptor blocker/angiotensin converting enzyme antagonist in efficacy of treating diabetic kidney disease; a meta-analysis of randomized clinical trials[J]. *World J Tradit Chin Med*, 2019, 5(1):18.
- [3] 李艳君. 肾病方联合西药治疗原发肾病综合征脾肾两虚证临床观察[J]. *深圳中西医结合杂志*, 2017, 27(23):25.
- [4] 蒋玉红, 卢岚, 马嘉黛, 等. 禾肾丸联合加味防己黄芪汤治疗肾病综合征疗效及对血清 IL-8 和 IL-13 的影响研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2017, 26(10):1100.
- [5] 孙瑶. 禾肾丸治疗原发性肾病综合征的临床效果分析[J]. *中国医药指南*, 2019, 17(24):193.
- [6] 李鑫, 吕慧妍, 郝丽荣. 血管生成素样蛋白 3 在肾病综合征中的研究进展[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(5):1104.
- [7] 王娥, 赵唐明, 郑辉, 等. tRF-003634 对阿霉素肾病小鼠足细胞凋亡的作用和机制研究[J]. *徐州医科大学学报*, 2022, 42(12):866.
- [8] YANG XJ, WU Y, LI QQ, *et al.* CD36 promotes podocyte apoptosis by activating the pyrin domain-containing-3 (NLRP3)

inflammasome in primary nephrotic syndrome[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24(9):6832.

- [9] 安梦丽, 何平. 足细胞损伤的机制及与肾小球疾病的关系研究进展[J]. *中国临床研究*, 2018, 31(10):1427.
- [10] 苗杰, 陈雅斌, 王鑫. 原发性肾病综合征高脂血症与肾功能的相关性研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2020, 41(7):846.
- [11] KERSTEN S. Angiotensin-like 3 in lipoprotein metabolism[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2017, 13(12):731.
- [12] GRAHAM MJ, LEE RG, BRANDT TA, *et al.* Cardiovascular and metabolic effects of ANGPTL3 antisense oligonucleotides[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(3):222.
- [13] XU YX, REDON V, YU H, *et al.* Role of angiotensin-like 3 (ANGPTL3) in regulating plasma level of low-density lipoprotein cholesterol[J]. *Atherosclerosis*, 2018, 58(268):196.
- [14] GAO X, XU H, LIU H, *et al.* Angiotensin-like protein 3 regulates the motility and permeability of podocytes by altering nephrin expression in vitro[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 399(1):31.
- [15] 刘娇娇, 徐虹, 戴如凤, 等. 血管生成素样蛋白 3 参与肾病综合征高脂血症发生的初步探索[J]. *中华肾脏病杂志*, 2015, 31(9):669.
- [16] 杨芳, 何泽云. 禾肾丸对阿霉素肾病大鼠蛋白尿及肾组织 nephrin 蛋白表达影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(9):158.
- [17] 李旭华, 何泽云, 彭亚军, 等. 禾肾丸对阿霉素肾病大鼠肾组织 PI3K 及 PENT 蛋白表达的影响[J]. *上海中医药大学学报*, 2016, 30(6):69.

(本 文 编 辑 刘 畅)

(上 接 第 285 页)

- [10] ZHU S, GILBERT JC, HATALA P, *et al.* The development and characterization of a long acting anti-thrombotic von Willebrand factor (vWF) aptamer[J]. *J Thromb Haemost*, 2020, 18(5):1113.
- [11] ISHIHARA J, ISHIHARA A, STARKE RD, *et al.* The heparin binding domain of von Willebrand factor binds to growth factors and promotes angiogenesis in wound healing[J]. *Blood*, 2019, 133(24):2559.
- [12] 努尔巴哈尔·热木图拉, 彭辉. 血管性血友病因子在心血管相关疾病中的研究进展[J]. *新疆医学*, 2018, 48(11):1234.
- [13] 王静, 吴婵, 周睿, 等. 乙酰肝素酶对血管内皮细胞增殖、迁移及血管活性因子表达的影响[J]. *中国医药生物技术*, 2018, 13(3):213.
- [14] 阳喜喜, 陈庆伟, 叶力文, 等. microRNA-145 通过靶向抑制 CREB 调节内皮细胞增殖和血管新生[J]. *第三军医大学学报*, 2018, 40(13):1213.

- [15] 宋凯瑞, 李霞. 炎症与动脉粥样硬化关系的研究进展[J]. *医学综述*, 2021, 27(24):4789.
- [16] 林婷庭, 司徒炜宸. 急性脑梗死患者 MRI 表现与炎症、凝血及血管新生因子的关系研究[J]. *海南医学*, 2021, 32(4):430.
- [17] 陈德才, 王雅, 马从乾, 等. miR-23b 通过 MAPK 信号通路对 H2O2 诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(1):136.
- [18] 朱沈辉, 郇俊. 过表达 HMGAI 影响动脉粥样硬化血管内皮细胞凋亡和 p38MAPK 信号通路[J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(24):5718.
- [19] XU S, YANG BB, TAO TT, *et al.* Activation of alpha 7-nAChRs protects SH-SY5Y cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptotic cell death via ERK/p53 signaling pathway[J]. *J cell physiol*, 2019, 234(10 Pt. 2):18480.
- [20] 安丽平, 于琨, 耿海波, 等. 丹酚酸 B 抗氧化应激损伤机制的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(22):227.

(本 文 编 辑 刘 畅)