

## · 实验研究 ·

## 缺氧诱导下人微血管内皮细胞的活化与腺苷水平的关系

艾李倩玉 黄婵娟 陈琛 林森 叶剑

400042 重庆,第三军医大学大坪医院眼科

通信作者:叶剑,Email:yejian1979@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.01.006

**【摘要】** **背景** 目前普遍认为视网膜局部缺氧状态是诱导视网膜新生血管形成的主要原因之一,其发病机制研究是国内外的研究热点。研究证实缺氧刺激下多种转录因子活性增加可促进微血管内皮细胞活化,导致新生血管形成,其中除血管内皮生长因子外,腺苷促血管生成作用也逐渐受到关注。**目的** 研究缺氧诱导下微血管内皮细胞的活化过程与腺苷水平之间的关系,探讨腺苷微环境对血管生成的促进作用。**方法** 对人微血管内皮细胞株(HMEC-1)进行体外培养,将培养的细胞分为常氧组和缺氧组,常氧组细胞置于5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱内培养,缺氧组细胞置于体积分数1% O<sub>2</sub>、94% N<sub>2</sub>和5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱内培养。采用CCK8法和EDU法检测各组细胞增生的吸光度(A值)和增生比例;采用Transwell小室法检测各组迁移细胞数与侵袭细胞数;采用Western blot法检测细胞中CD39和CD73蛋白的相对表达水平,采用免疫荧光法检测细胞中CD39和CD73的表达;采用高效液相色谱检测各组细胞中的腺苷浓度。**结果** 常氧组和缺氧组培养后12 h细胞增值(A值)分别为0.715±0.067和0.821±0.056,培养后24 h A值分别为0.946±0.028和0.998±0.028,缺氧组12 h组和24 h组细胞增值均高于常氧组,差异有统计学意义( $t_{12h}=3.805$ 、 $t_{24h}=3.222$ ,均 $P<0.01$ );缺氧组细胞培养后24 h细胞增生比例明显高于常氧组,差异均有统计学意义( $t=-6.868$ , $P<0.01$ )。常氧组和缺氧组细胞培养24 h迁移细胞数分别为185.3±10.594和300.7±22.853,侵袭细胞数分别为74.2±10.741和107.5±7.007,缺氧组迁移和侵袭细胞数均明显多于常氧组,差异均有统计学意义( $t=-12.124$ 、 $-6.367$ ,均 $P<0.01$ )。缺氧组细胞培养后12 h和24 h细胞中CD39和CD73蛋白的相对表达水平明显高于常氧组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ )。缺氧组细胞培养后2 h、6 h、12 h、24 h和36 h细胞内腺苷浓度逐渐增加,培养后36 h达峰,此后开始逐渐下降。各时间点缺氧组细胞中腺苷浓度均明显高于常氧组,差异均有统计学意义( $t_{2h}=2.469$ , $P=0.017$ ;  $t_{6h}=5.442$ , $P<0.001$ ;  $t_{12h}=3.841$ , $P<0.001$ ;  $t_{24h}=4.458$ , $P<0.001$ ;  $t_{36h}=2.757$ , $P=0.008$ ;  $t_{48h}=3.319$ , $P=0.002$ )。**结论** 与常氧环境比较,缺氧条件下培养的HMEC-1增生速度更快,迁移和侵袭能力更强,同时细胞中腺苷生成关键酶CD39和CD73蛋白的表达明显上调,腺苷浓度明显升高。提示缺氧条件下腺苷明显促进HMEC的活化过程。

**【关键词】** 新生血管; 视网膜; 微血管内皮细胞; 人; 血管生成; 腺苷**基金项目:** 全军十二五医学发展计划项目(13CXZ051)**Relationship of human microvascular endothelial cell activation and adenosine level under the hypoxia** Ai

Liqianyu, Huang Chanjuan, Chen Chen, Lin Sen, Ye Jian

Department of Ophthalmology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

Corresponding author: Ye Jian, Email: yejian1979@126.com

**【Abstract】** **Background** Retinal hypoxia is one of primary causes of retinal neovascularization, and its mechanism is research hot topic. Studies showed that hypoxia stimulates the activation of many transcription factors and vascular endothelial cells, which leads to angiogenesis. Besides to the vascular endothelial growth factor, the effect of adenosine on angiogenesis is increasingly concerned. **Objective** This study was to investigate the relationship of biological behaviour of human microvascular endothelial cells (HMEC-1) under the hypoxia and adenosine, and to explore the effect of adenosine on angiogenesis under hypoxia. **Methods** HMEC-1 cell line was cultured *in vitro*, and the cells were divided into normoxia group and hypoxia group. The cells in the normoxia group were cultured under the 5% CO<sub>2</sub> environment, and those in the hypoxia group were cultured under the 1% O<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> environment. The proliferation ability and percentage of the cells were assayed by cell counting kit-8 (CCK8) and EDU. The migration number and invasive number of the cells were detected by transwell chamber. The expressions of CD39 and CD73 proteins in the cells were tested by Western blot and immunofluorescence technique, and the level of adenosine was measured by high performance liquid chromatography (HPLC). **Results** The proliferation values (absorbance)

were  $0.715 \pm 0.067$  and  $0.821 \pm 0.056$  in the normoxia group and the hypoxia group in 12 hours after culture, and those in 24 hours were  $0.946 \pm 0.028$  and  $0.998 \pm 0.028$ , showing significant increase in the hypoxia group compared with the normoxia group ( $t_{12h} = 3.805$ ,  $t_{24h} = 3.222$ , all at  $P < 0.01$ ). The percentage of the proliferation in the hypoxia group was evidently higher than that in the normoxia group ( $t = -6.868$ ,  $P < 0.01$ ). The number of the cell migration and invasion in 24 hours after culture was  $185.3 \pm 10.594$  and  $74.2 \pm 10.741$  respectively in the normoxia group, and that in the hypoxia group was  $300.7 \pm 22.853$  and  $107.5 \pm 7.007$ , with significant differences between the two groups ( $t = -12.124$ ,  $-6.367$ , both at  $P < 0.01$ ). The expression levels of CD39 and CD73 proteins in the hypoxia group were significantly higher than those in the normoxia group in both 12 hours and 24 hours after culture (all at  $P < 0.05$ ), and the adenosine content in the cells is gradually increased in 2, 6, 12, 24 and 36 hours after culture, with the highest content in 36 hours. The adenosine content was significantly higher in the hypoxia group than in the normoxia group at various time points ( $t_{2h} = 2.469$ ,  $P = 0.017$ ;  $t_{6h} = 5.442$ ,  $P < 0.001$ ;  $t_{12h} = 3.841$ ,  $P < 0.001$ ;  $t_{24h} = 4.458$ ,  $P < 0.001$ ;  $t_{36h} = 2.757$ ,  $P = 0.008$ ;  $t_{48h} = 3.319$ ,  $P = 0.002$ ). **Conclusions** Compared with the normoxia group, the proliferation, migration and invasion abilities of HMEC-1 are stronger, meanwhile, the expression of CD39 and CD73 as well as the adenosine level in the cells are all increased under the hypoxic condition. It is suggested that the activation of human microvascular endothelial cells might be significantly related to the level of adenosine and its key enzymes.

**[Key words]** Neovascularization; Retina; Microvascular endothelial cells; Human; Angiogenesis; adenosine

**Fund program:** General Program of the Twelfth Five-Year Plan for Medical Science Development of PLA (13CXZ051)

视网膜新生血管性疾病是严重危害视力的眼病之一。视网膜为高耗氧组织,眼外伤、炎症等因素造成视网膜局部缺氧状态,由此诱导新生血管形成。此类疾病的预防和治疗是国内外研究的热点和难点,目前常用的方法中包括抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)疗法,但临床上发现该疗法对部分患者也存在不足。研究表明,VEGF并不是唯一的促血管生成因子<sup>[1]</sup>,阻断VEGF不能完全抑制或消除引起眼底新生血管形成的各种因素,且阻断VEGF后可代偿性地使其他促血管生成因子的表达上调<sup>[2]</sup>。目前认为对于视网膜新生血管性疾病的治疗,除了需提高抗VEGF药物的特异性之外,更重要的是寻找灵敏性与特异性均较好的新方法。我们前期的研究发现,腺苷在血管生成的过程中发挥重要作用,视网膜新生血管患者玻璃体液中腺苷的质量浓度和腺苷生成的关键核苷酸酶CD39和CD73含量均明显升高<sup>[3]</sup>。我们推测组织在缺血、缺氧、损伤和炎症反应等应激状态下,ATP在三磷酸腺苷酶和5'核苷酸酶作用下过度代谢而产生腺苷,导致组织中腺苷积聚<sup>[4]</sup>。研究表明,调节组织中腺苷含量能够为肿瘤和心血管性疾病提供新的治疗途径<sup>[5-6]</sup>,但关于腺苷含量的调控与视网膜新生血管性疾病治疗的关系的研究较少。本研究模拟体外缺氧环境,观察腺苷在缺氧诱导的新生血管形成中的作用及其机制,为腺苷作为视网膜新生血管性疾病的治疗靶点提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验细胞 人微血管内皮细胞株-1 (human

microvascular endothelial cell-1, HMEC-1) 购于美国 ATCC 细胞库。

**1.1.2 主要试剂** DMEM 高糖培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK8)(日本同仁化学研究所);EDU 试剂盒(广州锐博公司);质量分数 1% 结晶紫染色液(北京索莱宝公司);DAPI 染色液、辣根酶标记羊抗鼠 IgG (H+L)(ZB-2305)、辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L)(ZB-2301)(北京中杉金桥生物技术公司);抗 CD39 (ab97552)、抗 CD73 (ab81720)、羊抗鼠 IgG H&L (Cy3) (ab97035)、羊抗兔 IgG H&L (Cy3) (ab6939)(英国 Abcam 公司); $\beta$ -actin(4D3)单克隆抗体 (BS6007M)(美国 Bioworld 公司); $10 \mu\text{mol/L}$  已酮可可碱(5'-核苷酸酶抑制剂)、 $100 \mu\text{mol/L}$  双嘧达莫(腺苷重摄取抑制剂)(美国 MCE 公司)、 $1 \mu\text{mol/L}$  腺苷脱氨酶抑制剂(EHNA)(美国 Sigma-Aldrich 公司);Transwell (3422)、(354480)(美国康宁公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 HMEC-1 的培养及分组** HMEC-1 细胞培养于含 10% FBS、1% 双抗(含链霉素  $0.1 \text{ mg/ml}$  和青霉素  $100 \text{ U/ml}$ (商品单位)的 DMEM 培养基。常氧组细胞置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  的细胞培养箱内培养;缺氧组细胞置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、体积分数 1%  $\text{O}_2$ 、94%  $\text{N}_2$  和 5%  $\text{CO}_2$  的细胞培养箱内培养,并保持 90% 的湿度。

**1.2.2 CCK8 法测 HMEC-1 增殖值** 分别将常氧组细胞和缺氧组细胞以 5 000 个/孔接种于 96 孔板中培养 12 h 和 24 h,每孔加入混有 CCK8 试剂的 DMEM 培养基(1:10)  $100 \mu\text{l}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 1 h,用酶联免疫检测仪上测定波长为  $450 \text{ nm}$  的吸光度( $A_{450}$ ),计算每孔的

$A_{450}$  值,每次测 5 个副孔,实验重复 3 次,细胞增值值 ( $A$ ) =  $A_{\text{常氧}} - A_{\text{空白}}$  或  $A_{\text{缺氧}} - A_{\text{空白}}$ 。

**1.2.3 EDU 法检测 HMEC-1 的增生比例** 分别将常氧组细胞和缺氧组细胞以 5 000 个/孔接种于 96 孔板培养 24 h,每孔加入混有 EDU 溶液的 DMEM 培养基 (1:1 000) 100  $\mu$ l, 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h,质量分数 4% 多聚甲醛固定 30 min, 2 mg/ml 甘氨酸脱色摇床 5 min, PBS 清洗 3 次; 0.5% Triton 打孔 20 min; 每孔 100  $\mu$ l 染色反应液,室温避光孵育 30 min, PBS 清洗 3 次; DNA 染色,室温避光孵育 30 min, PBS 清洗 3 次; 荧光显微镜下观察具有增生活性的细胞个数,每孔取 3 个固定视野,计算每个视野内的细胞个数,实验重复 3 次,取平均值。细胞增生比例 (%) =  $(A_{\text{EDU}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{常氧}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$  或  $(A_{\text{EDU}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{缺氧}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

**1.2.4 Transwell 小室法检测 HMEC-1 的迁移个数和侵袭个数** 分别将常氧组细胞和缺氧组细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于普通 24 孔板培养 24 h,收集细胞培养液;以 5 000 个/孔接种于 8  $\mu$ m 孔径 Transwell 小室普通型 24 孔板上室 (迁移试验) 或含基质胶的 24 孔板小室 (侵袭试验),将下室培养基换成之前收集的细胞培养液,分别置于常氧和缺氧培养箱中再培养 24 h; 取上室,用棉签擦去上室内侧细胞,并用 4% 多聚甲醛固定上室外侧细胞 30 min, PBS 洗 2 次, 0.5% triton 打孔 30 min, 结晶紫染色 30 min, PBS 洗涤至小室外侧无明显染料,置于倒置显微镜下观察,每孔取 3 个固定视野,计算每个视野内的细胞个数,取平均值,实验重复 3 次。细胞迁移或侵袭的个数即结晶紫染色的细胞个数。

**1.2.5 Western blot 法检测 HMEC-1 中 CD39、CD73 蛋白的表达** 分别将常氧组和缺氧组细胞以  $1 \times 10^5$  /ml 接种于 6 孔板培养 12 h 和 24 h; 每孔加入 100  $\mu$ l 裂解液,用力刮取 30 min,收集样本,超声 1 min,离心半径为 13.5 cm, 4  $^{\circ}$ C 离心 15 min; 100  $^{\circ}$ C 水浴加热,蛋白变性 5 min; 凝胶电泳,转膜,奶粉室温封闭 4 h,加入相应一抗 (1:1 000), 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜; 滴加相应二抗 (1:5 000), 室温孵育 1.5 h。Vilber-Lourmat 曝光仪曝光 30~60 s, 并处理图片。实验重复 5 次,用 Lab works 数码成像分析系统进行结果分析。用  $\beta$ -actin 作为内参照,以目的蛋白 CD39 和 CD73/ $\beta$ -actin 的 A 值比值作为所测细胞中 CD39 和 CD73 的表达量。

**1.2.6 免疫组织化学法检测细胞中 CD39 和 CD73 的表达情况** 分别将常氧组和缺氧组细胞以  $0.5 \times 10^5$  /ml 接种于 24 孔板培养 24 h; 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 清洗 3 次; 0.3% Triton 打孔 20 min, 加入相应一抗 (1:200), 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜; 滴加相应二抗 (1:200), 37  $^{\circ}$ C

避光孵育 2 h, PBS 洗 3 次, DAPI 孵育 5 min, PBS 清洗; 荧光显微镜下观察各目的蛋白在细胞中的表达情况。实验重复 3 次,用 IPP 6.0 软件处理图片,计算单位面积的平均荧光强度 (A 值),作为蛋白的表达量。

**1.2.7 高效液相紫外检测器检测 HMEC-1 中腺苷的表达** 分别将常氧组和缺氧组细胞以  $1 \times 10^5$  /ml 接种于 6 孔板培养 2、6、12、24、36 和 48 h; 消化离心,离心半径为 13.5 cm, 1 000 r/min 离心 5 min 并收集细胞,立即加入预混的腺苷抑制剂 (5' -核苷酸酶抑制剂、腺苷重摄取抑制剂、腺苷脱氨酶抑制剂), 超声 2 min, 样本中加入高氯酸和碳酸钾 ( $V_{\text{样本}}:V_{\text{高氯酸钾}}:V_{\text{碳酸钾}} = 10:2:1$ ) 混匀, 13 000 r/min 离心 2 min, 取上清。采用高效液相紫外检测器 (Waters e2695 Separations Module, 美国 WATERS 公司) 进行检测, 色谱柱为 Waters-C18, 进样量为 20  $\mu$ l, 流速为 1.0 ml/min, 流动相: A 甲醇 (25%), B: 10 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH = 4.0); 温度设定为 25  $^{\circ}$ C, 灵敏度 2.000 Aups, 波长 260 nm。

### 1.3 统计学方法

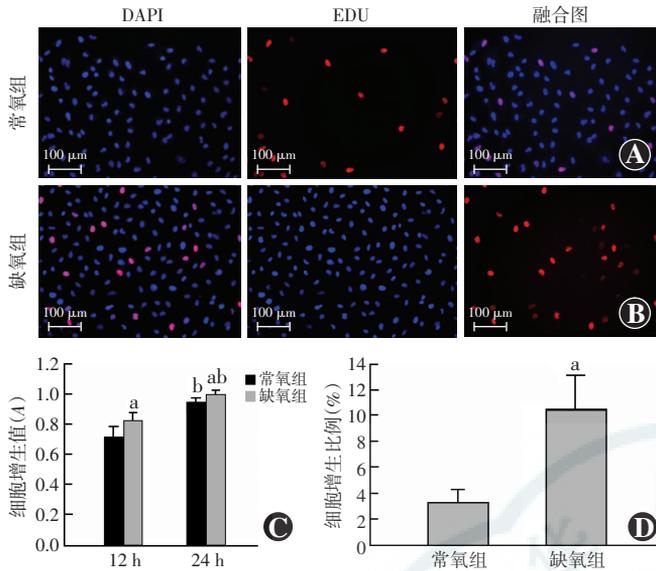
采用 SPSS 18.0 统计学软件进行统计分析。本研究中测量指标的计量资料经 W 检验呈正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示。常氧组与缺氧组间 HMEC-1 增生比例、细胞迁移数和侵袭数目及 CD39 和 CD73 的差异比较采用独立样本  $t$  检验; 常氧组与缺氧组分别培养 12 h 和 24 h 细胞增值、细胞中 CD39 和 CD73 表达量差异的总体比较采用两因素方差分析,多重比较采用 LSD- $t$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 常氧组与缺氧组 HMEC-1 增值值的比较

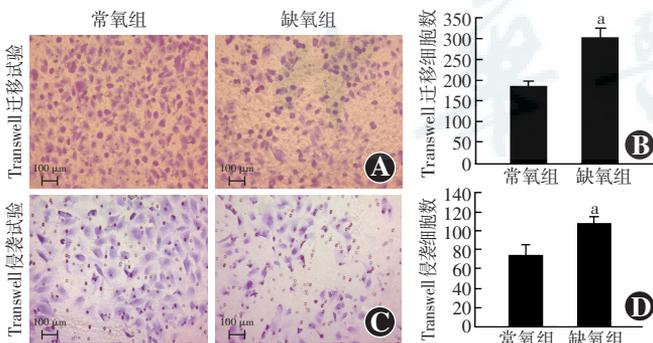
EDU 检测的荧光图显示,常氧组及腺苷个数较少,呈红色荧光,而缺氧组 HMEC-1 数明显多于常氧组 (图 1A, B)。CCK8 检测显示常氧组和缺氧组细胞培养 12 h 及 24 h, 细胞增值值 (A 值) 分别为  $0.715 \pm 0.067$ 、 $0.821 \pm 0.056$  及  $0.946 \pm 0.028$ 、 $0.998 \pm 0.028$ , 组间总体比较差异均有统计学意义 ( $F_{\text{组间}} = 16.400, P < 0.001$ ;  $F_{\text{时间}} = 108.263, P < 0.001$ ), 缺氧 12 h 组和 24 h 组细胞水平高于常氧组,差异有统计学意义 ( $t_{12\text{h}} = 3.805, ^a P = 0.001$ ;  $t_{24\text{h}} = 3.222, ^a P = 0.009$ ) (图 1C)。EDU 检测显示,常氧组和缺氧组细胞培养 24 h 细胞增生比例分别为  $(3.3 \pm 1.0)\%$  和  $(10.4 \pm 2.8)\%$ , 缺氧组细胞增生比例高于常氧组,差异有统计学意义 ( $t = -6.868, P < 0.001$ ) (图 1D)。

**2.2 常氧组与缺氧组 HMEC-1 细胞迁移与侵袭能力的比较**



**图 1 常氧组和缺氧组细胞增殖能力的比较** A: 荧光显微镜下可见常氧组有增殖活性的细胞数较少, 为红色荧光 (标尺 = 100  $\mu\text{m}$ ) B: 荧光显微镜下可见缺氧组有增殖活性的细胞数较常氧组增多, 为红色荧光 (标尺 = 100  $\mu\text{m}$ ) C: CCK8 检测的细胞增殖值(A 值) 量化分析  $F_{\text{组间}} = 16.400, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 108.263, P < 0.001$ . 与各自时间点的常氧组比较,  $^a P < 0.01$ ; 与各自组内 12 h 值比较,  $^b P < 0.01$  (两因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 10$ ) D: 细胞在 24 h EDU 检测的细胞增殖比例量化分析 与常氧组比较,  $^a P < 0.001$  (独立样本  $t$  检验,  $n = 9$ )

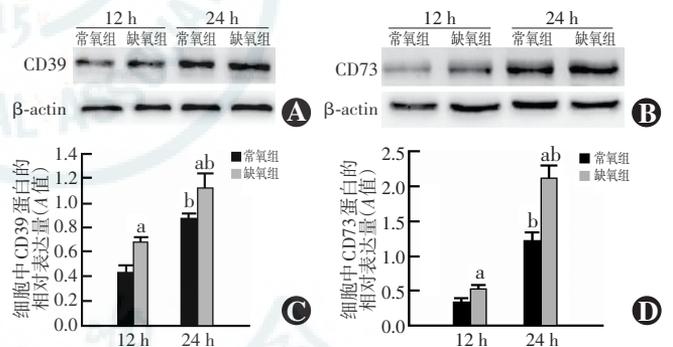
常氧组和缺氧组细胞培养 24 h 细胞迁移个数分别为  $185.3 \pm 10.594$  和  $300.7 \pm 22.853$ , 缺氧组迁移的细胞数明显多于常氧组, 差异有统计学意义 ( $t = -12.124, P < 0.001$ ) (图 2A、B)。常氧组和缺氧组细胞培养 24 h 细胞侵袭个数分别为  $74.2 \pm 10.741$  和  $107.5 \pm 7.007$ , 缺氧组侵袭个数明显多于常氧组, 差异有统计学意义 ( $t = -6.367, P < 0.001$ ) (图 2C、D)。



**图 2 常氧组和缺氧组细胞迁移与侵袭能力的比较** A: 倒置显微镜下可见培养 24 h 后缺氧组细胞迁移个数明显多于常氧组 (结晶紫 标尺 = 100  $\mu\text{m}$ ) B: 常氧组与缺氧组细胞迁移能力的量化比较,  $^a P < 0.01$  (独立样本  $t$  检验,  $n = 7$ ) C: 倒置显微镜下可见培养 24 h 后缺氧组细胞迁移个数明显多于常氧组 (结晶紫 标尺 = 100  $\mu\text{m}$ ) D: 常氧组与缺氧组细胞侵袭能力的量化比较,  $^a P < 0.01$  (独立样本  $t$  检验,  $n = 7$ )

### 2.3 常氧组与缺氧组 HMEC-1 中 CD39 和 CD73 蛋白的表达情况

Western blot 检测显示, 常氧组和缺氧组 HMEC-1 培养 12 h 和 24 h 可见 CD39 和 CD73 均呈阳性表达, 培养后 24 h CD39 和 CD73 的表达条带强于培养后 12 h, 缺氧组表达条带强于常氧组 (图 3A、B)。常氧组和缺氧组细胞培养后 12 h 和 24 h CD39 的相对表达量分别为  $0.430 \pm 0.066$  和  $0.677 \pm 0.045$  及  $0.873 \pm 0.053$  和  $1.124 \pm 0.111$ , 组间及不同时间点间细胞中 CD39 相对表达量的总体比较差异有统计学意义 ( $F_{\text{组间}} = 57.872, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 184.033, P < 0.001$ ), 其中缺氧组细胞中 CD39 相对表达量均明显高于常氧组, 差异有统计学意义 ( $t_{12\text{h}} = 5.339, t_{24\text{h}} = 5.419$ , 均  $P < 0.001$ ) (图 3C); 常氧组和缺氧组细胞培养 12 h 和 24 h 细胞中 CD73 相对表达量分别为  $0.340 \pm 0.062$ 、 $0.532 \pm 0.027$  和  $1.216 \pm 0.122$ 、 $2.106 \pm 0.189$ , 组间及不同时间点间细胞中 CD73 相对表达量的总体比较差异有统计学意义 ( $F_{\text{组间}} = 105.660, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 541.905, P < 0.001$ ), 其中缺氧组 CD73 相对表达量明显高于常氧组, 差异有统计学意义 ( $t_{12\text{h}} = 2.578, P = 0.020; t_{24\text{h}} = 11.959, P < 0.001$ ) (图 3D)。



**图 3 常氧组与缺氧组细胞中 CD39 和 CD73 蛋白表达的比较** A: Western blot 结果显示常氧组和缺氧组细胞培养 24 h HMEC-1 细胞中 CD39 表达条带明显强于培养后 12 h B: Western blot 结果显示常氧组和缺氧组细胞培养 24 h HMEC-1 细胞中 CD73 表达条带明显强于培养后 12 h C: 常氧组和缺氧组细胞培养不同时间 HMEC-1 细胞中 CD39 蛋白相对表达量的量化比较  $F_{\text{组间}} = 57.872, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 184.033, P < 0.001$ . 与各自时间点常氧组比较,  $^a P < 0.001$ ; 与各自组间培养 12 h 值比较,  $^b P < 0.001$  (两因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 5$ ) D: 常氧组和缺氧组细胞培养不同时间 HMEC-1 细胞中 CD73 蛋白相对表达量的量化比较  $F_{\text{组间}} = 105.660, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 541.905, P < 0.001$ . 与各自时间点常氧组比较,  $^a P < 0.05$ ; 与各自组间培养 12 h 值比较,  $^b P < 0.001$  (两因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 5$ )

### 2.4 各组细胞中 CD39 和 CD73 表达的免疫荧光法检测结果

免疫荧光法检测显示, 常氧组和缺氧组细胞培养

24 h CD39 和 CD73 均阳性表达,呈红色荧光,且缺氧组细胞中 CD39 和 CD73 的表达均强于常氧组(图 4A)。常氧和缺氧条件下培养 24 h CD39 表达的强度(A 值)分别为  $8.283 \pm 1.318$  和  $17.016 \pm 0.742$ , CD73 表达的 A 值分别为  $13.236 \pm 1.791$  和  $20.525 \pm 1.301$ , 缺氧组细胞中 CD39 和 CD73 的表达强度均明显高于常氧组,差异均有统计学意义( $t_{cd39} = -9.995, P < 0.001; t_{cd73} = -5.699, P < 0.001$ )(图 4B, C)。

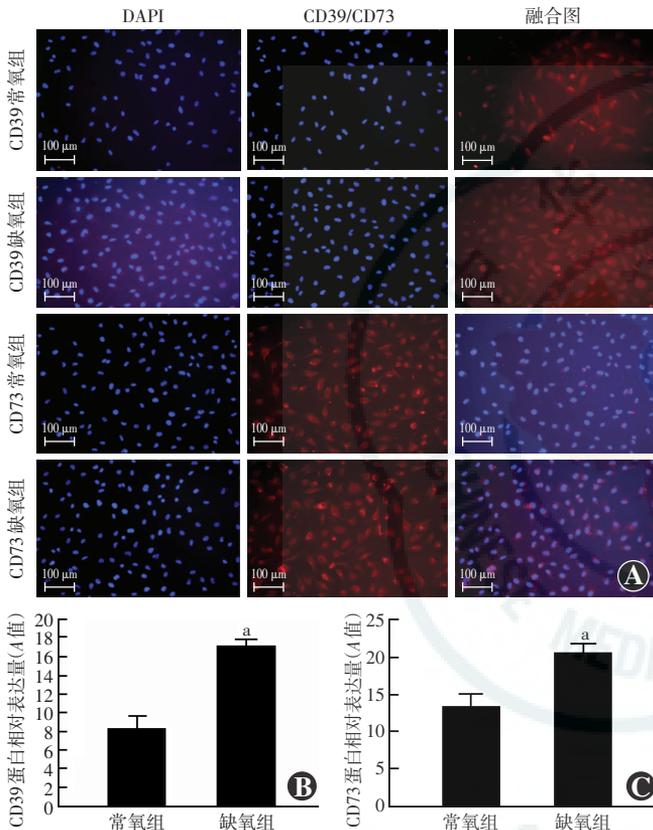


图 4 免疫荧光法检测 CD39 和 CD73 在常氧组与缺氧组的表达情况 A:常氧组培养 24 h 细胞中 CD39 和 CD73 蛋白的表达强度均较弱,缺氧组培养 24 h 细胞中 CD39 和 CD73 蛋白的表达均强于常氧组(Cy3 标尺=100 μm) B:常氧组与缺氧组细胞中 CD39 表达强度的量化比较 与常氧组比较,<sup>a</sup> $P < 0.001$ (独立样本 t 检验,  $n = 5$ ) C:常氧组与缺氧组细胞中 CD73 表达强度的量化比较 与常氧组比较,<sup>a</sup> $P < 0.001$ (独立样本 t 检验,  $n = 5$ )

### 2.5 常氧组与缺氧组细胞内腺苷浓度的比较

常氧组与缺氧组细胞培养 2 h 腺苷浓度分别为  $(12.488 \pm 4.269)$  和  $(8.030 \pm 1.698) \mu\text{mol/L}$ , 培养 6 h 为  $(15.054 \pm 3.718)$  和  $(24.881 \pm 3.093) \mu\text{mol/L}$ , 培养 12 h 为  $(30.457 \pm 2.933)$  和  $(37.393 \pm 2.577) \mu\text{mol/L}$ , 培养 24 h 为  $(35.642 \pm 2.760)$  和  $(43.693 \pm 2.445) \mu\text{mol/L}$ , 培养 36 h 为  $(41.698 \pm 2.509)$  和  $(46.677 \pm 1.652) \mu\text{mol/L}$ , 培养 48 h 为  $(32.088 \pm 3.694)$  和  $(38.081 \pm 1.345) \mu\text{mol/L}$ , 2 个组细胞培养不同时间点腺苷浓度的总体比较差异有统计

学意义( $F_{\text{组间}} = 50.160, ^b P < 0.001; F_{\text{时间}} = 202.334, ^b P < 0.001$ ),细胞培养后 36 h 内腺苷浓度逐渐增高,且培养后 6 h、12 h、24 h、36 h 缺氧组细胞中腺苷浓度明显高于常氧组,差异均有统计学意义( $t_{2h} = 2.469, P = 0.017; t_{6h} = 5.442, P < 0.001; t_{12h} = 3.841, P < 0.001; t_{24h} = 4.458, P < 0.001; t_{36h} = 2.757, P = 0.008; t_{48h} = 3.319; P = 0.002$ )(图 5)。

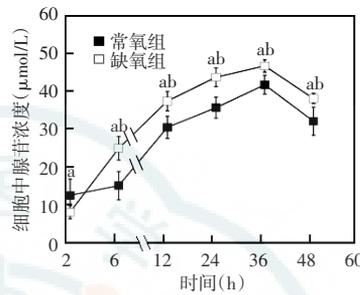


图 5 高效液相仪检测常氧组与缺氧组细胞培养后不同时间点腺苷浓度的变化趋势 常氧组和缺氧组细胞培养后 36 h 内腺苷浓度逐渐升高,培养后 36 h 达峰值,之后逐渐下降。细胞培养后 6、12、24、36 和 48 h 缺氧组腺苷浓度均明显高于常氧组(与各自的缺氧组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 6 h 腺苷浓度比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ )(两因素方差分析, LSD-t 检验,  $n = 5$ )

### 3 讨论

视网膜受损或炎症时组织氧供减少是新生血管形成的主要原因之一,视网膜缺氧可刺激多种转录因子的表达上调,从而导致微血管内皮细胞活化,这些因子包括低氧诱导因子(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)、VEGF、促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)等表达增加<sup>[1]</sup>,从而导致微血管内皮细胞活化。血管新生是血管内皮细胞增生、迁移及侵袭等导致内皮细胞活化,并最终形成管腔的过程,多种促进或抑制血管生成的因子参与此过程,肿瘤、缺血性疾病、眼底血管性疾病等均有新生血管形成<sup>[7-8]</sup>。研究表明,人视网膜新生血管与微血管内皮细胞增生和迁移等生物学行为有关<sup>[9]</sup>,因此本研究建立了体外缺氧模型以诱导人微血管内皮细胞处于缺氧状态,发现血管内皮细胞在短期缺氧环境下有促细胞增生、迁移及侵袭等生物学行为。

除各种促血管生成因子对微血管内皮细胞在缺氧环境下增生活化等的显著作用<sup>[10]</sup>外,腺苷作为一种生物体的内源性核苷酸,广泛存在于各种细胞内液和外液中,其在机体病理性应激状态下发挥的促血管生成作用值得我们进一步研究探讨。腺苷的形成途径为 ATP 的逐步去磷酸化过程,即胞内 ATP 通过 CD39 酶的催化生成 AMP,而 AMP 又在 CD73 酶的作用下生成腺苷;同时胞内外腺苷还可通过核苷转运载体进行交换<sup>[11]</sup>。研究证实,高代谢组织如心肌细胞、骨骼肌细胞等常有较高的腺苷浓度,这是因为长期缺血缺氧刺激高代谢组织可造成 ATP 急剧增加,进而分解形成腺

苷,导致腺苷浓度升高<sup>[12-14]</sup>。本研究首次观察了微血管内皮细胞常氧和缺氧状态下细胞内腺苷浓度的变化梯度,发现缺氧 36 h 内细胞中腺苷浓度逐渐升高之后逐渐降低,与本研究组预试验中发现的缺氧 36 h 细胞融合度可达 90% 以上,而之后细胞增生速度逐渐减慢的现象吻合,推测细胞缺氧 36 h 以后腺苷浓度的降低可能是由于细胞密度过大导致细胞增生速度减慢所致。这一现象也为下一步观察腺苷的分解或降解过程提供了实验依据。

Meininger 等<sup>[15]</sup>发现,组织缺氧导致腺苷浓度增加,从而刺激主动脉内皮细胞和冠状动脉内皮细胞增生并加速迁移;Ethier 等<sup>[16]</sup>也发现,腺苷浓度增加可导致人脐静脉内皮细胞增生。此外还有研究表明腺苷可调节肿瘤组织中的血管增生及肿瘤细胞本身的增生和迁移<sup>[17-18]</sup>,但缺氧诱导 ATP 分解加快,并通过 CD39 和 CD73 造成腺苷浓度增加,从而对 HMEC-1 活化的改变的研究少有报道。我们前期的研究发现,有视网膜新生血管患者的玻璃体中腺苷浓度和腺苷生成的关键核苷酸酶 CD73 明显升高<sup>[3]</sup>,本研究也发现,在体外缺氧诱导下微血管内皮细胞活化的同时,腺苷生成关键酶 CD39 和 CD73 表达明显上调,腺苷浓度也显著升高,说明腺苷或可成为缺氧组织中微血管内皮细胞增生活化并促血管生成的重要因素。

腺苷受体种类很多,如 A1、A2A、A2B 和 A3<sup>[18-21]</sup>,各受体对于血管生成的作用尚不十分明确,加入腺苷受体类抑制剂,对缺氧诱导下微血管内皮细胞活化是否有抑制作用,有待进一步研究。总之,本研究为缺氧诱导的视网膜新生血管形成提供了新的研究思路,即体外缺氧诱导下,HMEC-1 活化的同时,腺苷生成关键酶 CD39 和 CD73 的蛋白表达增加,并且腺苷浓度显著增加。微血管内皮细胞活性增加,极有可能是缺氧下腺苷积聚所致。腺苷可能为诱发新生血管形成的重要微环境,并且实验成功通过高效液相仪测得体外缺氧刺激后的细胞内腺苷浓度,为后续实验提供了新的研究方法。

## 参考文献

- Caprara C, Grimm C. From oxygen to erythropoietin: relevance of hypoxia for retinal development, health and disease [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2012, 31(1): 89-119. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2011.11.003.
- Dorrell MI, Aguilar E, Scheppke L, et al. Combination angiostatic therapy completely inhibits ocular and tumor angiogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(3): 967-972. DOI: 10.1073/pnas.0607542104.
- 郎敏,袁容娣,陈春林,等.增殖性糖尿病视网膜病变患者玻璃体腺苷浓度和增殖膜中 CD73 表达的研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2013, 35(10): 985-987.
- Lang M, Yuan RD, Chen CL, et al. Vitreous level of adenosine and proliferative membrane expression of CD73 in patients with proliferative diabetic retinopathy [J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2013, 35(10): 985-987.
- Adair TH. Growth regulation of the vascular system; an emerging role for adenosine [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005, 289(2): R283-R296. DOI: 10.1152/ajpregu.00840.2004.
- Vaupel P, Mayer A. Hypoxia-driven adenosine accumulation: a crucial microenvironmental factor promoting tumor progression [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 876: 177-183. DOI: 10.1007/978-1-4939-3023-4\_22.
- Akhtar M, Ordovas K, Martin A, et al. Effect of chronic sustained-release dipyridamole on myocardial blood flow and left ventricular function in patients with ischemic cardiomyopathy [J]. *Congest Heart Fail*, 2007, 13(3): 130-135.
- Pandya NM, Dhalla NS, Santani DD. Angiogenesis—a new target for future therapy [J]. *Vascul Pharmacol*, 2006, 44(5): 265-274. DOI: 10.1016/j.vph.2006.01.005.
- Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(10): 3967-3979. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2427.
- Tian R, Liu Z, Zhang H, et al. Investigation of the regulation of roundabout4 by hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in microvascular endothelial cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(4): 2586-2594. DOI: 10.1167/iovs.14-14409.
- Xue LX, Jiang M, Xie LQ, et al. Effect of bortezomib on VEGF gene expression of endothelial cell line HMEC-1 and its possible mechanisms [J]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2010, 18(3): 744-748.
- Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, et al. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29 [J]. *Pflugers Arch*, 2004, 447(5): 735-743. DOI: 10.1007/s00424-003-1103-2.
- Kroll K, Decking UK, Dreikorn K, et al. Rapid turnover of the AMP-adenosine metabolic cycle in the guinea pig heart [J]. *Circ Res*, 1993, 73(5): 846-856.
- Mo FM, Ballard HJ. The effect of systemic hypoxia on interstitial and blood adenosine, AMP, ADP and ATP in dog skeletal muscle [J]. *J Physiol*, 2001, 536(Pt 2): 593-603.
- Rivkees SA, Zhao Z, Porter G, et al. Influences of adenosine on the fetus and newborn [J]. *Mol Genet Metab*, 2001, 74(1-2): 160-171. DOI: 10.1006/mgme.2001.3217.
- Meininger CJ, Schelling ME, Granger HJ. Adenosine and hypoxia stimulate proliferation and migration of endothelial cells [J]. *Am J Physiol*, 1988, 255(3 Pt 2): H554-562.
- Ethier MF, Chander V, Dobson JG. Adenosine stimulates proliferation of human endothelial cells in culture [J]. *Am J Physiol*, 1993, 265(1 Pt 2): H131-138.
- Panjehpour M, Karami-Tehrani F. Adenosine modulates cell growth in the human breast cancer cells via adenosine receptors [J]. *Oncol Res*, 2007, 16(12): 575-585.
- Merighi S, Mirandola P, Milani D, et al. Adenosine receptors as mediators of both cell proliferation and cell death of cultured human melanoma cells [J]. *J Invest Dermatol*, 2002, 119(4): 923-933. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2002.00111.x.
- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, et al. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors [J]. *Pharmacol Rev*, 2001, 53(4): 527-552.
- Montesinos MC, Shaw JP, Yee H, et al. Adenosine A (2A) receptor activation promotes wound neovascularization by stimulating angiogenesis and vasculogenesis [J]. *Am J Pathol*, 2004, 164(6): 1887-1892. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63749-2.
- Zhang S, Li H, Li B, et al. Adenosine A1 receptors selectively modulate oxygen-induced retinopathy at the hyperoxic and hypoxic phases by distinct cellular mechanisms [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(13): 8108-8119. DOI: 10.1167/iovs.15-17202.

(收稿日期: 2016-09-04)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)