doi:10.11659/jjssx.09E019058

·基础研究·

转化生长因子 β1 诱导胃癌细胞 AGS 分泌 VEGF-C 的机制研究

田 音,胡文静,尚杨杨,武 赟,刘 韵 (陆军军医大学第一附属医院消化内科,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 探讨转化生长因子 β1(TGF-β1)诱导胃癌细胞 AGS 分泌血管内皮生长因子 C(VEGF-C)的分子机制。**方法** 体外培养胃癌细胞系 AGS 细胞,将其分为未刺激组、TGF-β1 刺激组、TGF-βR 抑制剂组、DMSO 组、Smad3 抑制剂组、NF-κB 抑制剂组、MEK1/2 抑制剂组、p38/MAPK 抑制剂组以及 JNK 抑制剂组。除未刺激组外,其余各组均用 TGF-β1 刺激细胞,并用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞培养上清液中 VEGF-C 的水平。**结果** TGF-β1 刺激组的 VEGF-C 分泌水平显著高于未刺激组,差异有统计学意义($P<0.05$),TGF-β1 能够诱导 AGS 细胞分泌 VEGF-C,并具有剂量和时间依赖性。在 TGF-β1 刺激的条件下,TGF-βR 抑制剂组及 Smad3 抑制剂组 AGS 细胞分泌的 VEGF-C 水平均显著低于 DMSO 组,差异有统计学意义($P<0.01$);而 NF-κB、MEK1/2、p38/MAPK 和 JNK 抑制剂组中 VEGF-C 水平与 DMSO 组比较差异则无统计学意义($P>0.05$)。**结论** TGF-β1 可通过其受体及下游的 Smad3 信号通路诱导 AGS 细胞分泌 VEGF-C,从而有助于胃癌的淋巴转移。

[关键词] 转化生长因子 β1;血管内皮生长因子 C;Smad3;胃癌;AGS;分子机制

[中图分类号] R446.8 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-09-11

Mechanism of transforming growth factor-β1 induced the secretion of vascular endothelial growth factor C in gastric cancer cell line AGS

TIAN Yin, HU Wen-jing, SHANG Yang-yang, WU Yun, LIU Yun (Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of transforming growth factor-β1 (TGF-β1) induced the secretion of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) in gastric cancer cell line AGS. **Methods** Gastric cancer cell line AGS cells were cultured in vitro and randomly divided into non-stimulated group, TGF-β1-stimulated group, TGF-β receptor inhibitor group, DMSO group, Smad3 inhibitor group, NF-κB inhibitor group, MEK1/2 inhibitor group, p38/MAPK inhibitor group and JNK inhibitor group. TGF-β1 was used to stimulate cells in all groups except the non-stimulated group, and enzyme-linked immunosorbent assay was used to analyze the level of VEGF-C in each group. **Results** Compared with the non-stimulated group, the secretion of VEGF-C in TGF-β1-stimulated group was increased, the difference was significant ($P<0.05$). TGF-β1 induced the secretion of VEGF-C in gastric cancer cell line AGS with a dose and time dependent manner. Additionally, the secretion of VEGF-C induced by TGF-β1 in TGF-β receptor inhibitor group and Smad3 inhibitor group were lower than that in DMSO group, the differences were significant ($P<0.01$), while there was no significant difference in the secretion of VEGF-C between DMSO group and NF-κB inhibitor group, MEK1/2 inhibitor group, p38/MAPK inhibitor group and JNK inhibitor group ($P>0.05$). **Conclusion** TGF-β1 can induce the secretion of VEGF-C in AGS cells via TGF-β receptor and Smad3 signal pathway, which may contribute to tumor progression.

Keywords: TGF-β1; VEGF-C; Smad3; gastric carcinoma; AGS; molecular mechanism

转化生长因子 β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)是一种经典的抗炎免疫因子,可由上皮细胞、成纤维细胞及调节性 T 细胞等多种细胞分泌,在感染性疾病、自身免疫性疾病、特别是肿瘤的发生发展中起着重要作用[1-4]。有文献报道,TGF-β1 在肿瘤细胞中的表达显著增加,并经自分泌的方式作用于肿瘤细胞,直接促进肿瘤的增殖、侵袭和转移,或者通过旁分泌的方式抑制抗肿瘤免疫细胞的功能,有利于肿瘤细胞的免疫逃逸[5-6]。据研究报道,肿瘤中 TGF-β1 的信号与淋巴管的密度以及促淋巴管生成标志物血管内皮生长因子 C(vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C)的表达密切相关,提示肿瘤细胞来源的 TGF-β1 很可能参与调控淋巴管的形成,进而导致肿瘤细胞的淋巴转移[7]。在胃癌微环境中,TGF-β1 以及 VEGF-C 的水平均显著增加,然而,肿瘤来源的 TGF-β1 能否诱导胃癌细胞分泌 VEGF-C 以及相关的分子机制尚不清楚[8-9]。因此,本研究拟体外培养胃癌细胞系 AGS 并利用 TGF-β1 进行刺激,检测 VEGF-C 的分泌水平,进一步阐明其可能的调控机制。

[基金项目] 国家自然基金青年科学基金(81500410)

[通信作者] 刘 韵,E-mail: 214120424@qq.com

1 材料与方法

1.1 材料

重组细胞因子 TGF-β1 购自加拿大 Stem cell 公司,TGF-βR 抑制剂(SB-431542)、Smad3 抑制剂(SIS3)、NF-κB 抑制剂(BAY11-7082)、MEK1/2 抑制剂(U0126)、p38/MAPK 抑制剂(SB203580)和 JNK 抑制剂(SP600125)购自上海碧云天生物科技有限公司,APC 标记的抗人 TGF-β 受体Ⅱ(TGF-β receptor Ⅱ,TGF-βRⅡ)染色抗体、同型对照染色抗体、细胞固定/裂解液、细胞通透/清洗液购自美国 BD 公司。VEGF-C 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)检测试剂盒购自深圳达科为生物技术有限公司,F12 培养基、胎牛血清、胰酶、4% 多聚甲醛及 PBS 均购自美国 Hyclone 公司。人胃癌细胞系 AGS 细胞购自中国科学院。

1.2 细胞培养

AGS 细胞用含 10% 胎牛血清的 F12 培养基置于 37 ℃、5% 的 CO_2 培养箱中进行培养。培养的 AGS 细胞以 2×10^6 个/孔铺于 6 孔板中,然后加入 0、10、100 ng/mL 的 TGF-β1 进行培养,或预先加入浓度均为 10 μmol/LTGF-βR 抑制剂(SB-431542)、Smad3 抑制剂(SIS3)、NF-κB 抑制剂(BAY11-7082)、MEK1/2 抑制剂(U0126)、p38/MAPK 抑制剂(SB203580)和 JNK 抑制剂(SP600125)孵育 1 h,然后清洗孔中的培养基,再加入新的培养基后利用 TGF-β1 刺激 24 h,收集细胞培养上清液并冻存于 -80 ℃,用 ELISA 检测上清液中的 VEGF-C 水平。细胞处理分组如下:未刺激组和 TGF-β1 刺激组用于比较 TGF-β1 对细胞分泌 VEGF-C 的影响;TGF-β1 刺激下的 TGF-βR 抑制剂组用于分析 TGF-β 受体阻断后对 TGF-β1 诱导细胞分泌 VEGF-C 的影响;此外,均有 TGF-β1 刺激的 DMSO 组、Smad3 抑制剂组、NF-κB 抑制剂组、MEK1/2 抑制剂组、p38/MAPK 抑制剂组以及 JNK 抑制剂组用于比较不同信号通路阻断后对 TGF-β1 诱导细胞分泌 VEGF-C 的影响,其中 DMSO 组是其他信号抑制剂组的对照组。

1.3 流式细胞术

AGS 细胞经 TGF-β1 刺激后使用胰酶消化,并用无菌 PBS 清洗 2 次,然后加入 APC 标记的抗人 TGF-βRⅡ染色抗体及相应的同型对照染色抗体,避光染色 30 min 后用 4% 多聚甲醛固定 15 min,随后用 PBS 清洗 2 次,流式细胞仪检测 AGS 细胞表达 TGF-βRⅡ的情况。

1.4 VEGF-C 检测

参照 VEGF-C 的 ELISA 检测试剂盒操作指南,检测不同处理组间 AGS 细胞培养上清液中的 VEGF-C 水平。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件进行数据的统计学处理和分析,所得数据服从正态分布且方差齐性,以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组之间的差异比较采用独立样本 t 检验,多组之间的比较采用单因素方差分析并利用 *Tukey* 检验进行组内比较,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义,$P<0.01$ 表示差异有极显著性统计学意义。

2 结果

2.1 TGF-β 受体在 AGS 细胞的表达

TGF-β1 的受体由细胞膜表面的 TGF-βRⅡ以及胞内的 TGF-βRⅠ组成。利用荧光标记的 TGF-βRⅡ抗体进行流式细胞术检测,结果显示,与未染色的 AGS 细胞相比,同型对照抗体染色的 AGS 细胞未见峰值的右移,而经 APC 标记的 TGF-βRⅡ阳性抗体染色的细胞峰值则明显右移,由此表明 AGS 细胞可高表达 TGF-β1 的受体 TGF-βR(图 1)。

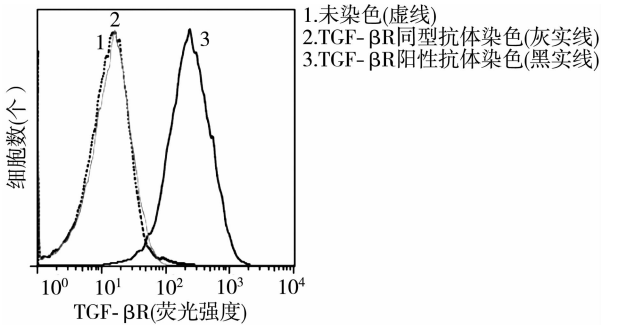
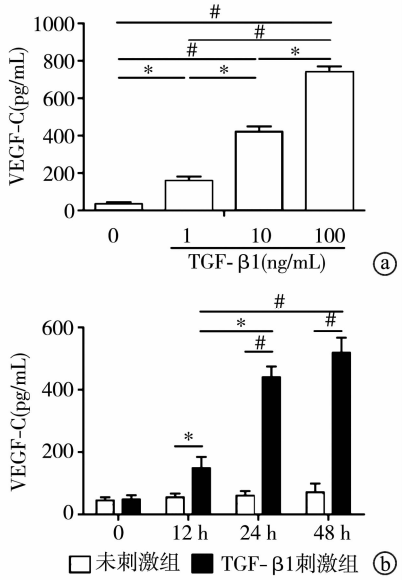


图 1 流式细胞术染色检测 TGF-β1 受体在 AGS 细胞的表达水平

2.2 TGF-β1 诱导 AGS 细胞分泌 VEGF-C

体外培养的 AGS 细胞经 TGF-β1 刺激后,收集细胞培养的上清液进行分析。ELISA 检测结果显示,TGF-β1 刺激组细胞培养上清液中 VEGF-C 的含量显著高于未刺激组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);AGS 细胞经 TGF-β1 以 0、1、10、100 ng/mL的剂量刺激 24 h 后,其上清液中 VEGF-C 水平分别为(34.4 ± 10.4)pg/mL、(138.5 ± 22.7)pg/mL、(421.3 ± 28.2)pg/mL、(735.2 ± 35.1)pg/mL,组间差异均具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);此外,进一步利用 10 ng/mL 的 TGF-β1 刺激 AGS 细胞,并于 12、24、48 h 后分别检测 VEGF-C 的分泌水平,结果显示,随着 TGF-β1

刺激时间的延长,AGS 细胞分泌的 VEGF-C 水平逐渐增加(图 2),由此表明 TGF-β1 能够诱导 AGS 细胞分泌 VEGF-C,并具有剂量和时间依赖性。

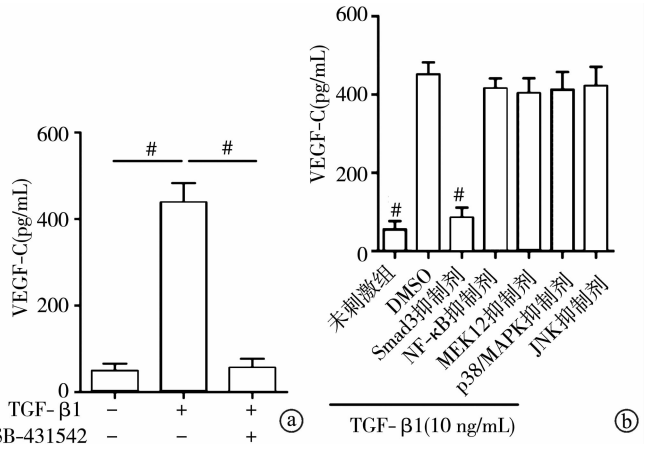


a: TGF-β1 在不同浓度下(0、1、10、100 ng/mL)诱导 AGS 细胞分泌的 VEGF-C 水平;b: TGF-β1(10 ng/mL)在不同时间点诱导 AGS 细胞分泌的 VEGF-C 水平 *:$P<0.05$;#:$P<0.01$

图 2 TGF-β1 诱导 AGS 细胞分泌 VEGF-C 的水平比较

2.3 TGF-β1 通过 TGF-βR-Smad3 信号诱导 VEGF-C 的分泌

鉴于 TGF-β1 可诱导 AGS 细胞分泌 VEGF-C,本本研究进一步探讨其可能的分子调控机制,结果显示,在 TGF-β1 刺激 24 h 的前提下,AGS 细胞分泌的 VEGF-C 水平为(438.3 ± 25.1)pg/mL,但是当利用 TGF-β 受体的抑制剂 SB-431542 阻断 TGF-β1 与受体的结合后,VEGF-C 水平仅为(49.4 ± 16.3)pg/mL,二者差异具有显著统计学意义($P<0.01$)。此外,利用 Smad3 抑制剂(SIS3)、NF-κB 抑制剂(BAY11-7082)、MEK1/2 抑制剂(U0126)、p38/MAPK 抑制剂(SB203580)和 JNK 抑制剂(SP600125)预处理 1 h,随后再利用 TGF-β1 进行刺激,结果显示,与 TGF-β1 刺激下的 DMSO 组相比,TGF-β1 刺激下的 Smad3 抑制剂组中 VEGF-C 的水平显著下降,差异有极显著性统计学意义($P<0.01$),见图 3。在 TGF-β1 刺激下,NF-κB 抑制剂组、MEK1/2 抑制剂组、p38/MAPK 抑制剂组及 JNK 抑制剂组中 AGS 细胞分泌的 VEGF-C 水平与 DMSO 组比较差异无统计学意义($P>0.05$),提示 TGF-β1 通过 TGF-β 受体及下游 Smad3 信号途径诱导 AGS 细胞分泌 VEGF-C。



a:TGF-βR 抑制剂 SB-431542 对 TGF-β1 诱导 AGS 分泌 VEGF-C 的影响;b:不同信号通路抑制剂对 TGF-β1 诱导 AGS 分泌 VEGF-C 的影响 #:$P<0.01$

图 3 不同信号抑制剂对 TGF-β1 诱导 AGS 细胞分泌 VEGF-C 的影响

3 讨论

胃癌作为最常见的恶性肿瘤之一,具有较高的发病率和致死率[10]。尽管手术切除、放疗、化疗以及靶向免疫治疗在早期胃癌患者中取得了较好的效果,但对晚期胃癌转移患者的疗效仍十分有限[11]。现有的研究证据显示,不健康饮食、细菌感染以及基因等是胃癌的致病因素,而肿瘤微环境中的免疫抑制,特别是调节性细胞因子介导的免疫应答则在胃癌的转移过程中发挥了关键作用[[12-14]]。因此,深入阐明肿瘤微环境中促胃癌转移的免疫学机制可为疾病的治疗提供理论依据。

已有多个研究证实调节性细胞因子 TGF-β1 是肿瘤进展的关键因素之一。有文献报道,患者的肿瘤细胞及肿瘤相关的成纤维细胞高表达 TGF-β1,并证实 TGF-β1 的表达水平与患者的疾病进展和不良预后呈显著正相关[15]。肿瘤微环境中 TGF-β1 的功能实现依赖于其相应的受体 TGF-βR。早期研究证实,胃癌原代细胞可高表达 TGF-βR,继而调控 TGF-β1 的下游级联信号[16];然而胃癌组织中的原代细胞常难以分离纯化及大规模体外培养,极大地限制了 TGF-β1 的生物学功能研究。为了探讨 TGF-β1 对胃癌细胞的影响,本研究首先分析了体外培养的胃癌细胞系 AGS 细胞是否表达其相应的受体。流式细胞术显示,经抗体染色的 AGS 细胞显示出强的荧光,表明大量的荧光标记抗体在 AGS 细胞表面结合,有效证实了 AGS 细胞高表达 TGF-βR,并提示 AGS 细胞可作为体外研究 TGF-β1 功能的靶细胞。

TGF-β1 结合受体后,可诱导肿瘤细胞分泌促转移相关的因子,从而增强肿瘤细胞的远端转移能力[17]。本研究发现,经 TGF-β1 刺激的 AGS 细胞可大量分泌促淋巴管生成因子 VEGF-C;随着 TGF-β1 刺激剂量或者刺激时间的增加,其诱导 AGS 细胞分泌 VEGF-C 的水平也逐渐增加。当加入 TGF-βR 抑制剂阻断 TGF-β1 与其受体的相互作用后,AGS 细胞分泌的 VEGF-C 水平明显下降,由此提示 TGF-β1 通过其受体调控了 VEGF-C 的体外分泌。据文献报道,TGF-β1 刺激组细胞表达的 VEGF-C mRNA 水平显著高于未刺激组,而经 TGF-βR 受体抑制剂阻断后,TGF-β1 诱导的 VEGF-C mRNA 水平则显著下降[18],由此提示 TGF-β1 很可能通过调控 VEGF-C 的转录水平,进而影响其在体外的分泌。

TGF-β1 与 TGF-βR 结合后,需要激活下游的级联信号,才能诱导 VEGF-C 的有效分泌。目前,已有研究报道 Smad3、NF-κB 和 MAPK 等多条信号通路参与介导 TGF-β1 的生物学功能[19-20]。因此,本研究加入多个信号通路抑制剂,以期探讨 TGF-β1 诱导 AGS 细胞分泌 VEGF-C 的分子机制。结果发现在均有 TGF-β1 作用的条件下,预先加入 Smad3 抑制剂(SIS3)的 AGS 细胞培养上清液中 VEGF-C 水平显著低于加入 DMSO 的 AGS 细胞培养上清液中 VEGF-C 的水平,而 NF-κB 抑制剂 BAY11-7082、MEK1/2 抑制剂(U0126)、p38/MAPK 抑制剂(SB203580)和 JNK 抑制剂(SP600125)处理的 AGS 细胞培养上清液中 VEGF-C 的水平与 DMSO 组中 VEGF-C 的水平相当,由此表明在体外培养的 AGS 细胞中,TGF-β1 经 TGF-βR-Smad3 信号通路诱导 VEGF-C 的分泌。基于 VEGF-C 参与诱导新生淋巴管的形成并介导肿瘤细胞的淋巴转移,由此提示在胃癌微环境中,TGF-β1 可能通过增加 VEGF-C 的分泌参与调控肿瘤淋巴管的形成,进而促进胃癌细胞的淋巴转移。

综上所述,本研究通过体外实验证实了 TGF-β1 可通过 TGF-βR 及其下游 Smad3 信号诱导胃癌细胞分泌 VEGF-C,进而有助于胃癌研究的不断进展,是探讨 TGF-β1 在胃癌生物学作用中的有力补充,揭示了 TGF-β1 不仅能够直接促进胃癌细胞上皮间质化后的远端播散,而且还可以通过诱导胃癌细胞分泌促淋巴管生成因子 VEGF-C,协助胃癌细胞的淋巴转移。因此,进一步通过体内研究阐明 TGF-β1 调控 VEGF-C 分泌的促瘤机制,将为临床胃癌患者靶向设计阻断 TGF-β1 及其下游信号的免疫治疗方案提供新的理论依据。

[参考文献]

[1] Fujio K, Komai T, Inoue M, et al. Revisiting the regulatory roles of the TGF-β family of cytokines[J]. Autoimmun Rev, 2016, 15(9): 917 - 922. doi: 10.1016/j.autrev.2016.07.007.

[2] Qiao YC, Chen YL, Pan YH, et al. Changes of transforming growth factor beta 1 in patients with type 2 diabetes and diabetic nephropathy: a PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis[J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(15): e6583. doi: 10.1097/MD.0000000000006583.

[3] Tang J, Gifford CC, Samarakoon R, et al. Deregulation of negative controls on TGF-β1 signaling in tumor progression[J]. Cancers (Basel), 2018, 10(6): E159. doi: 10.3390/cancers10060159.

[4] de Araújo Farias V, Carrillo-Gálvez AB, Martín F, et al. TGF-β and mesenchymal stromal cells in regenerative medicine, autoimmunity and cancer[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2018, 43: 25 - 37. doi: 10.1016/j.cytogfr.2018.06.002.

[5] Bellomo C, Caja L, Moustakas A. Transforming growth factor β as regulator of cancer stemness and metastasis[J]. Br J Cancer, 2016, 115(7): 761 - 769. doi: 10.1038/bjc.2016.255.

[6] Chen S, Fan J, Zhang M, et al. CD73 expression on effector T cells sustained by TGF-β facilitates tumor resistance to anti-4-1BB/CD137 therapy[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 150. doi: 10.1038/s41467 - 018 - 08123 - 8.

[7] Su F, Li X, You K, et al. Expression of VEGF-D, SMAD4, and SMAD7 and their relationship with lymphangiogenesis and prognosis in colon cancer[J]. J Gastrointest Surg, 2016, 20(12): 2074 - 2082. doi: 10.1007/s11605 - 016 - 3294 - 9.

[8] Zhu L, Cheng X, Shi J, et al. Crosstalk between bone marrow-derived myofibroblasts and gastric cancer cells regulates cancer stemness and promotes tumorigenesis[J]. Oncogene, 2016, 35(41): 5388 - 5399. doi: 10.1038/onc.2016.76.

[9] Ma C, Luo C, Yin H, et al. Kallistatin inhibits lymphangiogenesis and lymphatic metastasis of gastric cancer by downregulating VEGF-C expression and secretion[J]. Gastric Cancer, 2018, 21(4): 617 - 631. doi: 10.1007/s10120 - 017 - 0787 - 5.

[10] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394 - 424. doi: 10.3322/caac.21492.

[11] Van Cutsem E, Sagaert X, Topal B, et al. Gastric cancer[J]. Lancet, 2016, 388(10060): 2654 - 2664. doi: 10.1016/S0140 - 6736(16)30354 - 3.

[12] Lyons K, Le LC, Pham YT, et al. Gastric cancer: epidemiology, biology, and prevention: a mini review[J]. Eur J Cancer Prev, 2019, 28(5): 397 - 412. doi: 10.1097/CEJ.0000000000000480.

[13] Kim N. Chemoprevention of gastric cancer by Helicobacter pylori eradication and its underlying mechanism[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2019, 34(8): 1287 - 1295. doi: 10.1111/jgh.14646.

[14] Liu X, Zhang Z, Zhao G. Recent advances in the study of regulatory T cells in gastric cancer[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 73: 560 - 567. doi: 10.1016/j.intimp.2019.05.009.

[15] Ananiev J, Manolova I, Aleksandrova E, et al. Impact of TGF-β1 expression and −509C > T polymorphism in the TGF-β1 gene on the progression and survival of gastric cancer[J]. Pol J Pathol, 2017, 68(3): 234 - 240. doi: 10.5114/pjp.2017.71530.

doi:10.11659/jjssx.08E019052

·基础研究·

miR-17-5p 调控 PTEN 对大鼠中动脉阻塞的神经保护作用研究

韩 凌,范 倩,徐婉茹,宗碧云 (菏泽市立医院神经内科,山东 菏泽 274000)

[摘 要] **目的** 探究 microRNA-17-5p(miR-17-5p)在中动脉阻塞(MCAO)中的神经保护作用及其可能机制。**方法** 将 60 只清洁级雄性 SD 大鼠随机分为假手术组(Sham 组)、模型组(MCAO 组)、MCAO + mimic 组、MCAO + inhibitor 组和 MCAO + BPV 组,每组 12 只。采用线栓法建立 MCAO 大鼠模型。建模 24 h 后,检测大鼠神经功能和脑组织含水量;HE 染色观察大鼠脑组织病理学损伤;TUNEL 染色检测大鼠脑组织神经元细胞凋亡情况;RT-PCR 检测 miR-17-5p 和第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源蛋白(PTEN)的 mRNA 表达水平,预测两者是否存在连续的结合位点;Western blot 检测脑组织通路蛋白磷酸化水平。**结果** MCAO + mimic 组和 MCAO + BPV 组大鼠神经功能评分、脑组织含水量、神经细胞凋亡率、PTEN 的 mRNA 和蛋白表达水平均低于 MCAO 组,差异有统计学意义($P<0.05$);MCAO + mimic 组和 MCAO + BPV 组脑组织病理学损伤明显改善,miR-17-5p 和 PTEN 存在连续结合位点,而这 2 组的 miR-17-5p 表达水平、AKT 和 mTOR 磷酸化水平高于 MCAO 组,差异有统计学意义($P<0.05$);MCAO + inhibitor 组神经功能评分、脑组织含水量、神经细胞凋亡率、PTEN 的 mRNA 和蛋白表达水平高于 MCAO 组,差异有统计学意义($P<0.05$);MCAO + inhibitor 组脑组织病理学损伤加重,同时 AKT 和 mTOR 磷酸化水平低于 MCAO 组。**结论** miR-17-5p 表达上调对 MCAO 大鼠神经具有保护作用,其功能发挥可能与介导调控 PTEN 信号通路相关。

[关键词] 中脑动脉闭塞;miR-17-5p;张力蛋白同源蛋白;大鼠;缺血性脑卒中

[中图分类号] R743.31 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-08-09

Neuroprotective effects of microRNA-17-5p on MCAO rats by regulating PTEN

HAN Ling,FAN Qian,XU Wan-ru,ZONG Bi-yun (Department of Neurology,Heze Municipal Hospital,Heze Shandong 274000,China)

Abstract: Objective To study the neuroprotective effect of microRNA-17-5p(miR-17-5p) on the middle cerebral artery occlusion (MCAO) and its possible mechanism. **Methods** Sixty male SD rats were randomly divided into sham operation group (Sham group),model group (MCAO group),MCAO + mimic group,MCAO + inhibitor group and MCAO + BPV group,with 12 rats in each group. Thread embolism method was used to establish MCAO rat model,brain water content and neurological function were detected after 24 hours;HE staining was used to observe the pathological changes of rat brain;TUNEL staining was used to detect neuronal apoptosis in brain tissue of rats. Predicting the existence of continuous binding sites of miR-17-5p and PTEN;RT-PCR was used to detect the expression level of miR-17-5p and the mRNA level of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN);Western blot was used to detect the phosphorylation level of pathway protein in brain tissue. **Results** Compared with the MCAO group,the neurological function score,brain water content,neuronal apoptosis rate,the mRNA and protein levels of PTEN were significantly decreased in MCAO + mimic group and MCAO + BPV group,the differences were significant($P<0.05$),and the brain histopathological damage was significantly improved. There were continuous binding sites between miR-17-5p and PTEN,while the expression levels of miR-17-5p,and the phosphorylation levels of pathway protein in MCAO + mimic group and MCAO + BPV group were significantly increased,the differences were significant($P<0.05$). The neurological function score,brain water content,neuronal apoptosis rate,the mRNA and protein levels of PTEN in MCAO + inhibitor group were all higher than those in the

[基金项目] 山东省菏泽市科学技术研究与发展计划项目任务书(2017071)

[通信作者] 徐婉茹,E-mail:n4unfac@sina.com

[16] Wu TT,Lu J,Zheng PQ,et al. Yiqi Huayu Jiedu decoction inhibits the invasion and metastasis of gastric cancer cells through TGF-β/Smad pathway[J]. Evid Based Complement Alternat Med,2017,2017:1871298. doi:10.1155/2017/1871298.

[17] Pak KH,Park KC,Cheong JH. VEGF-C induced by TGF-β1 signaling in gastric cancer enhances tumor-induced lymphangiogenesis[J]. BMC Cancer,2019,19(1):799. doi:10.1186/s12885-019-5972-y.

[18] Duan L,Ye L,Zhuang L,et al. VEGFC/VEGFR3 axis mediates TGFβ1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer cells[J]. PLoS One,2018,13(7):e0200452. doi:10.1371/journal.pone.0200452.

[19] Gasior K,Wagner NJ,Cores J,et al. The role of cellular contact and TGF-beta signaling in the activation of the epithelial mesenchymal transition (EMT)[J]. Cell Adh Migr,2019,13(1):63-75. doi:10.1080/19336918.2018.1526597.

[20] Xie F,Ling L,van Dam H,et al. TGF-β signaling in cancer metastasis[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai),2018,50(1):121-132. doi:10.1093/abbs/gmx123.

(编辑:魏 源)