

# 血管紧张素(1-7) 激活自噬调控口腔黏膜下纤维性变细胞凋亡与血管生成的研究

邱乐宏 邓伟 甘成文 孙莹

**摘要** 目的 体外观察血管紧张素(1-7) [Ang(1-7)] 对口腔黏膜下纤维性变(OSF) 成纤维细胞凋亡与血管生成的影响,并初步探究作用机制。方法 从人类黏膜组织分离培养成纤维细胞,倒置显微镜观察细胞形态,免疫荧光染色检测波形蛋白(Vimentin) 表达;以槟榔提取液(ANE) 诱导人成纤维细胞模拟 OSF 内成纤维细胞体外模型,实验分组包括对照组(正常培养的细胞)、ANE 组[100  $\mu\text{g/ml}$  ANE 培养细胞 48 h]、ANE + 低剂量 Ang(1-7) 组[100  $\mu\text{g/ml}$  ANE +  $10^{-7}$  mol/L Ang(1-7) 培养细胞 48 h]、ANE + 高剂量 Ang(1-7) 组[100  $\mu\text{g/ml}$  ANE +  $10^{-5}$  mol/L Ang(1-7) 培养细胞 48 h],免疫荧光染色检测  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA) 表达,ELISA 法检测细胞培养上清液中 I 型胶原(Collagen I) 和 III 型胶原(Collagen III) 的含量,MTT 法检测细胞增殖活性,流式细胞术检测细胞凋亡,小管形成实验检测人脐静脉内皮细胞(HUVEC) 的血管形成情况,将 mRFP-GFP-LC3 病毒转染至细胞后通过免疫荧光染色检测细胞自噬水平,Western blot 检测自噬相关蛋白 Beclin-1 表达及 LC3-II/LC3-I 比值。结果 分离培养的细胞呈长梭形,Vimentin 呈阳性表达,说明成功分离到成纤维细胞;与 ANE 组比较,ANE + 低剂量 Ang(1-7) 组和 ANE + 高剂量 Ang(1-7) 组的细胞内  $\alpha$ -SMA 蛋白荧光表达明显减弱,培养上清液中 Collagen I 和 Collagen III 的含量减少( $P < 0.05$ ) 细胞增殖活性降低( $P < 0.05$ ) 细胞凋亡率则升高( $P < 0.05$ ),两组的细胞培养上清液均抑制了 HUVEC 的血管形成( $P < 0.05$ ) 细胞内自噬小体减少( $P < 0.05$ ),Beclin-1 蛋白表达降低( $P < 0.05$ ),LC3-II/LC3-I 比值下调( $P < 0.05$ );此外,ANE + 高剂量 Ang(1-7) 组作用效果均强于 ANE + 低剂量 Ang(1-7) 组作用效果( $P < 0.05$ )。结论 Ang(1-7) 能够抑制 ANE 诱导下成纤维细胞的活化,促进细胞凋亡,并降低 HUVEC 的血管形成。该机制可能与调控细胞自噬水平有关。

**关键词** 口腔黏膜下纤维性变;成纤维细胞;血管紧张素(1-

7); 凋亡; 自噬; 血管生成

中图分类号 R 781.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)03-0457-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.03.018

口腔黏膜下纤维性变(oral submucous fibrosis, OSF) 是一种慢性隐匿性的口腔黏膜疾病,常见临床特征包括过度流涎、口干、烧灼感、口腔活动受损及张口受限。OSF 恶变风险较高,7%~30% 的患者可能会转化为口腔鳞状细胞癌<sup>[1]</sup>,这对患者身心健康造成了极大的威胁。OSF 发病机制涉及多种因素,咀嚼槟榔是引发 OSF 的重要病因之一<sup>[2]</sup>。血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II) 作为肾素-血管紧张素系统的主要效应分子,可引起血管收缩、血管损害、炎症反应等诱导的血压升高<sup>[3]</sup>。血管紧张素(1-7) [angiotensin 1-7, Ang(1-7)] 是肾素-血管紧张素系统家族的重要成员,其主要产生血管紧张素转换酶 2,能够以 Ang II 作为底物,通过结合其 G 蛋白偶联受体 Mas 来抵消 Ang II 的作用,对器官损伤及组织纤维化起到保护作用<sup>[4]</sup>。然而,关于 Ang(1-7) 在 OSF 方面的作用及其机制研究却较少。该研究采用槟榔提取液(areca nut extract, ANE) 诱导人成纤维细胞活化后观察 Ang(1-7) 对细胞凋亡及血管形成特性的影响,并初步揭示其作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 主要材料** Ang(1-7) (上海吉尔生化有限公司); ANE(西安天瑞生物技术有限公司); DMEM 培养液、胰蛋白酶和胎牛血清(美国 Gibco 公司); 青链霉素混合液(武汉博士德生物工程公司); 免疫荧光染色试剂(北京百奥莱博科技有限公司); ELISA 检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司); MTT 试剂盒和 Annexin V-FITC/PI 试剂盒(上海前尘生物科技有限公司); BCA 蛋白检测试剂盒和 PVDF 膜(上海碧云天生物研究所); ECL 发光试剂液(美国 Pierce 公司); 鼠抗人 Vimentin 单克隆、鼠抗人  $\alpha$ -SMA 单克隆、兔抗人 Beclin-1 多克隆、兔抗人 LC3-

2023-02-27 接收

基金项目: 海南省自然科学基金高层次人才项目(编号: 821RC681); 海南省自然科学基金面上项目(编号: 821MS132); 海南省卫生健康行业科研项目(编号: 22A200205)

作者单位: 海南省人民医院, 海南医学院附属海南医院口腔科, 海口 570311

作者信息: 邱乐宏 男, 主治医师;

邓伟 男, 博士, 主任医师, 责任作者, E-mail: 12338933@qq.com

II 多克隆、兔抗人 LC3-I 多克隆等抗体(英国 Abcam 公司)。mRFP-GFP-LC3 自噬双标慢病毒购于上海汉恒生物工程有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 口腔黏膜成纤维细胞的分离与培养** 取 OSF 患者的正常颊黏膜组织(伦理审批号: HN 20211023285,患者均知情同意),用含青链霉素双抗的 PBS 清洗干净,在无菌条件下将组织剪成约  $1\text{ mm}^3$  大小的组织块,并将其均匀铺于培养瓶的底部,加入 4 ml 辅以 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养液,置于  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵育箱培养,每隔 2 d 换液 1 次,培养 5 d 后,通过倒置显微镜观察到组织块周围有长梭形细胞贴壁生长。待生长融合达到约 80% 时,0.25% 胰蛋白酶消化,传代扩大培养,选择第四代细胞用于实验。

**1.2.2 实验分组与处理** 取分离培养的第四代成纤维细胞,按照  $1 \times 10^4$  个/孔的密度接种于 96 孔板内,置于  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵育箱内,过夜培养。将细胞分为 4 组并进行相应处理,具体如下:① 对照组,正常培养的细胞;② ANE 组,使用  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$  ANE 培养细胞 48 h;③ ANE + 低剂量 Ang(1-7) 组,使用  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$  ANE +  $10^{-7}\text{ mol/L}$  Ang(1-7) 培养细胞 48 h;④ ANE + 高剂量 Ang(1-7) 组,使用  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$  ANE +  $10^{-5}\text{ mol/L}$  Ang(1-7) 培养细胞 48 h。处理结束后,收集各组的细胞培养上清液与细胞,进行后续研究。

**1.2.3 免疫细胞荧光染色** 取分离培养的成纤维细胞或者各组成纤维细胞,按照  $1 \times 10^5$  个/皿的密度接种于含爬片的培养皿,置于  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵育箱培养 24 h, PBS 清洗爬片,滴加 4% 多聚甲醛室温固定 30 min,依次使用 0.1% Triton X-100 处理 5 min、5% BSA 封闭 20 min, PBS 清洗,滴加鼠抗人 Vimentin 或  $\alpha$ -SMA 单克隆抗体于玻片上,避光条件下室温染色 20 min, PBS 再次清洗后,以 DAPI 避光复染 15 min,封片,通过荧光显微镜观察染色情况并摄取图像。

**1.2.4 ELISA 法** 取收集的各组细胞培养上清液,按照试剂盒说明书操作,检测培养上清液中 I 型胶原(Collagen I)和 III 型胶原(Collagen III)的含量,在波长 490 nm 的酶标仪处读取各孔的吸光度值,绘制标准曲线,计算样品中 Collagen I 和 Collagen III 的含量。

**1.2.5 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltet-**

razolium bromide, MTT] 法

将成纤维细胞按照 1.2.2 进行分组处理后,置于  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵育箱分别培养到 24、48、72 h 时测定增殖活性,在每孔内加  $500\text{ }\mu\text{l}$  MTT 试剂液,混合均匀,继续孵育培养 4 h,弃去培养液,再加  $600\text{ }\mu\text{l}$  DMSO,放于摇床振荡至结晶物完全溶解,酶标仪检测 490 nm 处吸光度值。

**1.2.6 流式细胞术** 将收集的各组成纤维细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化, PBS 清洗,以  $4\text{ }000\text{ r/min}$  离心 10 min,弃去细胞上清液,添加  $1 \times \text{binding buffer}$  液重悬,调整细胞密度至  $1 \times 10^6$  个/ml,吸取  $100\text{ }\mu\text{l}$  移至无菌离心管,再加  $10\text{ }\mu\text{l}$  Annexin V-FITC 与  $5\text{ }\mu\text{l}$  PI,混合均匀,室温避光孵育 15 min,1 h 内通过流式细胞仪检测凋亡细胞。

**1.2.7 HUVEC 成管实验** Matrigel 基质胶  $4\text{ }^\circ\text{C}$  下过夜溶解,添加适量缓冲液进行稀释后,取  $50\text{ }\mu\text{l}$  均匀铺于 96 孔板中进行包被处理,置于  $37\text{ }^\circ\text{C}$  下待胶凝固。分别使用各组细胞培养上清液处理 HUVEC 24 h,结束后收集 HUVEC,0.25% 胰蛋白酶消化,调整细胞密度,按照  $1 \times 10^4$  个/孔的密度接种 Matrigel 胶的孔内,将培养板置于  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵育箱,培养 12 h 后,倒置显微镜下观察每组细胞成管效果并摄取图像进行分析。

**1.2.8 mRFP-GFP-LC3 病毒转染细胞** 将各组成纤维细胞以  $1 \times 10^4$  个/孔的密度接种于 24 孔板上,置于  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵育箱培养 24 h 后,转染 mRFP-GFP-LC3 病毒至细胞, MOI 为 50,孵育 2 h 后,收集细胞, PBS 清洗,4% 多聚甲醛室温固定 10 min,封片,荧光显微镜下观察细胞自噬情况,并摄取图像进行分析。

**1.2.9 Western blot** 收集各组成纤维细胞,加入 RIPA 裂解液提取蛋白,BCA 法检测浓度。制备 10% SDS-PAGE,取  $50\text{ }\mu\text{g}$  蛋白样品上样,经凝胶电泳分离蛋白,随后电转至 PVDF 膜,利用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, TBST 洗膜,加入一抗工作液(1:1 000)  $4\text{ }^\circ\text{C}$  孵育过夜。次日, TBST 洗膜,在室温下与二抗工作液(1:5 000) 共孵育 2 h。TBST 再次洗膜后,滴加 ECL 试剂液显色,凝胶成像系统曝光, Image J 图像分析软件统计各条带灰度值, GAPDH 作为内参蛋白,以目的蛋白与内参蛋白的灰度值比值作为目的蛋白表达水平。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 23.3 软件进行数据分析, Graphpad prism 8.3 软件绘制统计图。进行方差齐性检验,正态性检验。计量资料实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。单变量两组资料之间的比较采用  $t$  检验;

多组资料之间的比较采用单因素方差分析; 方差不齐则采用非参数检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 成纤维细胞的鉴定** 倒置显微镜观察分离与培养的原代细胞, 培养 5 d 后细胞贴壁生长, 呈放射状; 培养 10 d 后细胞多呈长梭形, 数目较多, 分布均匀, 见图 1A。免疫荧光染色结果显示, 细胞内 Vimentin 呈阳性表达, 见图 1B, 上述结果均符合成纤维

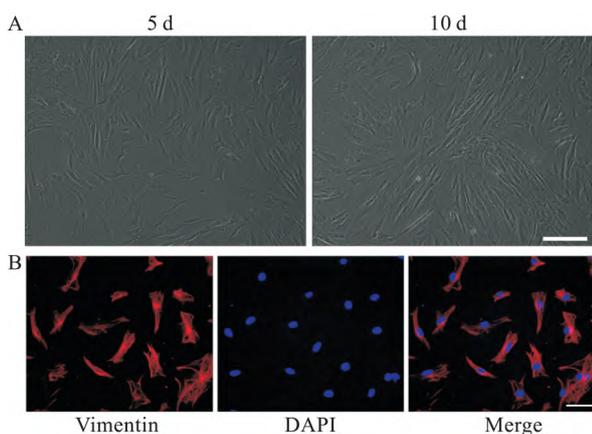


图 1 成纤维细胞的鉴定

A: 成纤维细胞形态观察倒置显微镜  $\times 40$ ; B: 成纤维细胞内 Vimentin 表达检测免疫荧光染色  $\times 100$

细胞的特征。

**2.2 Ang(1-7) 对 OSF-FB 内  $\alpha$ -SMA 表达的影响** 通过免疫荧光染色结果观察到对照组成纤维细胞绿色荧光弱,  $\alpha$ -SMA 蛋白呈少量表达; 相较于对照组, ANE 组细胞绿色荧光增强,  $\alpha$ -SMA 蛋白表达较多; 与 ANE 组比较, ANE + 低剂量 Ang(1-7) 组和 ANE + 高剂量 Ang(1-7) 组的细胞内绿色荧光均减弱,  $\alpha$ -SMA 蛋白表达减少; 同时, ANE + 高剂量 Ang(1-7) 组细胞内绿色荧光还要低于 ANE + 低剂量 Ang(1-7) 组,  $\alpha$ -SMA 蛋白表达更少。见图 2。

**2.3 Ang(1-7) 对 OSF-FB 上清液中胶原表达的影响** ELISA 实验检测结果显示, 各组成纤维细胞培养上清液中 Collagen I ( $F = 642.687$ ) 和 Collagen III ( $F = 586.012$ ) 含量差异具有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。与对照组比较, ANE 组细胞培养上清液中 Collagen I 和 Collagen III 含量增高 ( $P < 0.05$ ); 与 ANE 组比较, ANE + 低剂量 Ang(1-7) 组和 ANE + 高剂量 Ang(1-7) 组的细胞培养上清液中 Collagen I 和 Collagen III 的含量均降低 ( $P < 0.05$ ); 与 ANE + 低剂量 Ang(1-7) 组比较, ANE + 高剂量 Ang(1-7) 组的细胞培养上清液中 Collagen I 和 Collagen III 含量降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。

**2.4 Ang(1-7) 对 OSF-FB 增殖活性的影响** MTT

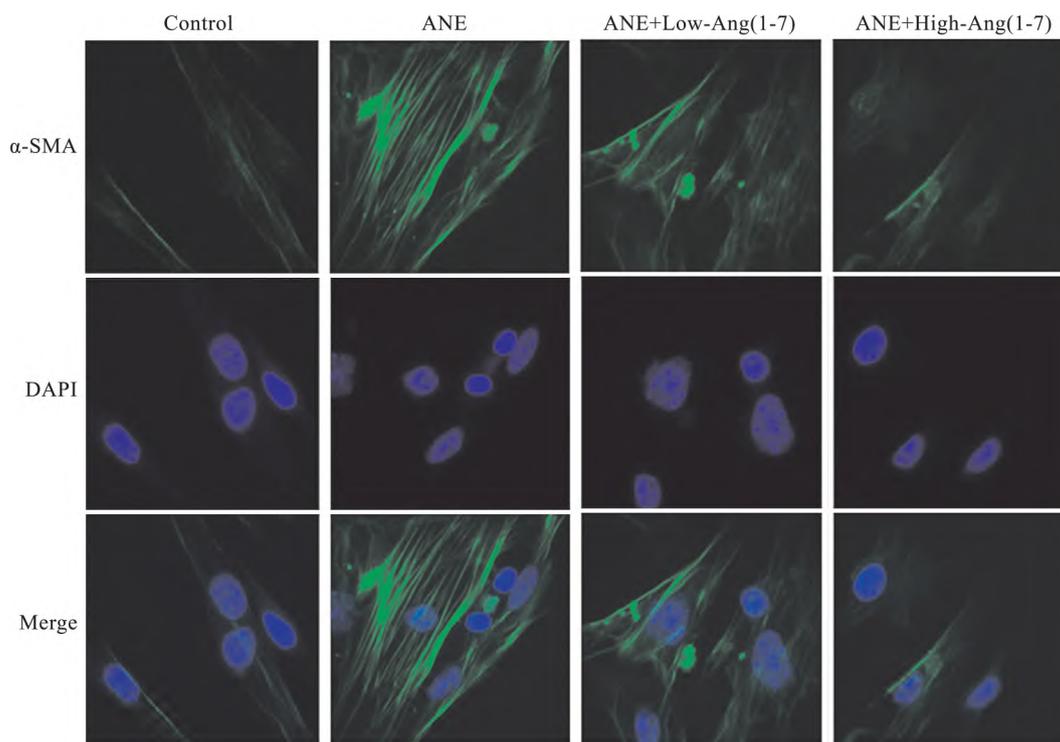


图 2 各处理组成纤维细胞内  $\alpha$ -SMA 表达检测免疫荧光染色  $\times 200$

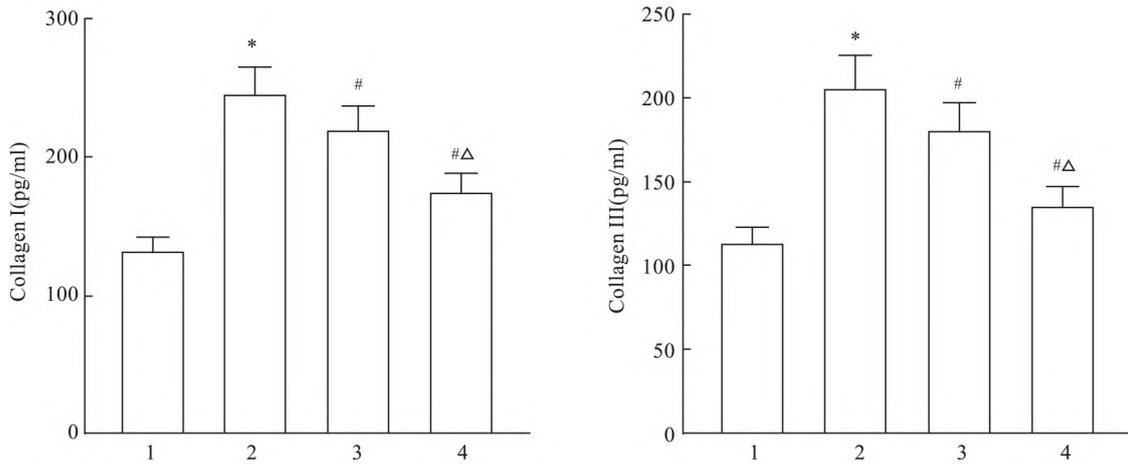


图3 各处理组成纤维细胞培养上清液中 Collagen I 和 Collagen III 的含量比较

1: 对照组; 2: ANE 组; 3: ANE + 低剂量 Ang(1-7) 组; 4: ANE + 高剂量 Ang(1-7) 组; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 ANE 组比较: #  $P < 0.05$ ; 与 ANE + 低剂量 Ang(1-7) 组比较: Δ  $P < 0.05$

法检测结果显示, ANE 组成纤维细胞的增殖活性高于对照组 ( $P < 0.05$ ); ANE + 低剂量 Ang(1-7) 组和 ANE + 高剂量 Ang(1-7) 组的细胞增殖活性低于 ANE 组 ( $P < 0.05$ ); 同时, ANE + 高剂量 Ang(1-7) 组的细胞增殖活性低于 ANE + 低剂量 Ang(1-7) 组 ( $P < 0.05$ ), 见图 4。

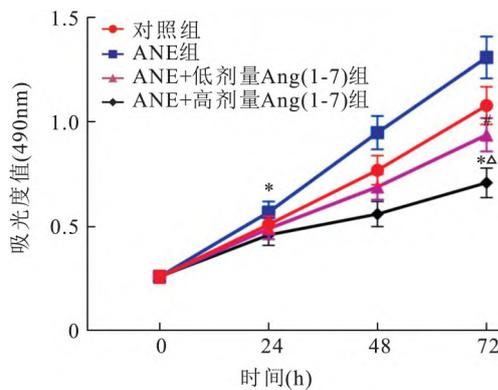


图4 各处理组成纤维细胞增殖活性比较

与对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 ANE 组比较: #  $P < 0.05$ ; 与 ANE + 低剂量 Ang(1-7) 组比较: Δ  $P < 0.05$

2.5 Ang(1-7) 对 OSF-FB 凋亡的影响 流式细胞术检测结果显示, 各组成纤维细胞凋亡率差异具有统计学意义 ( $F = 245.518, P < 0.001$ )。ANE 组细胞凋亡率为 ( $6.10 \pm 0.52$ )%, 低于对照组 ( $8.20 \pm 0.67$ )% ( $P < 0.05$ ); ANE + 低剂量 Ang(1-7) 组和 ANE + 高剂量 Ang(1-7) 组的细胞凋亡率分别为 ( $17.60 \pm 1.54$ )%、( $21.60 \pm 1.98$ )%, 均高于 ANE 组 ( $P < 0.05$ ); 相较于 ANE + 低剂量 Ang(1-7) 组, ANE + 高剂量 Ang(1-7) 组细胞凋亡率进一步升高 ( $P < 0.05$ ), 见图 5。

2.6 Ang(1-7) 对 OSF-FB 与 HUVEC 共培养下 HUVEC 成管的影响 体外 HUVEC 成管实验结果显示, 各组 HUVEC 管形结构形成数目差异具有统计学意义 ( $F = 516.224, P < 0.001$ )。ANE 组 HUVEC 管形结构为 ( $125.45 \pm 10.34$ ), 较对照组 ( $48.56 \pm 4.35$ ) 增加, 说明 ANE 组成纤维细胞的培养上清液促进了 HUVEC 管形结构的形成 ( $P < 0.05$ ); ANE + 低剂量 Ang(1-7) 组和 ANE + 高剂量

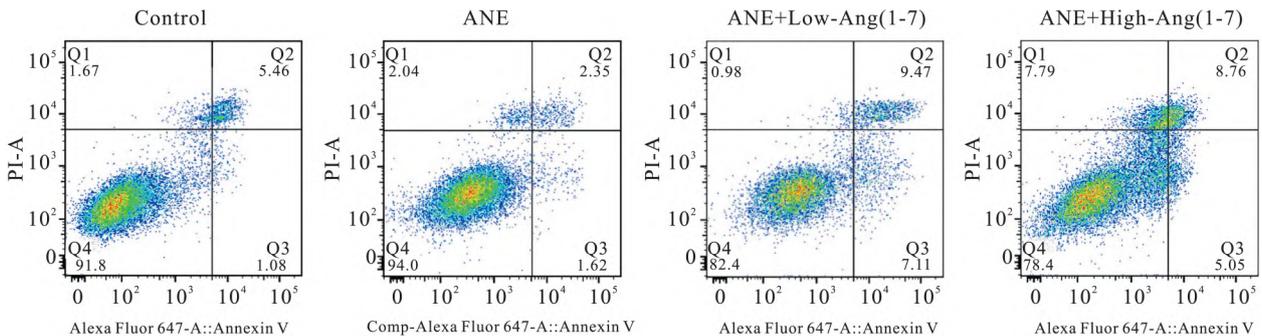


图5 各处理组成纤维细胞凋亡率比较

Ang(1-7) 组 HUVEC 管形结构分别为 ( $67.56 \pm 6.54$ )、( $50.45 \pm 4.97$ ), 均低于 ANE 组, 说明两组培养上清液均抑制了 HUVEC 管形结构的形成 ( $P < 0.05$ ); 与 ANE + 低剂量 Ang(1-7) 组比较, ANE + 高剂量 Ang(1-7) 组的培养上清液进一步抑制了 HUVEC 管形结构的形成 ( $P < 0.05$ ), 见图 6。

**2.7 Ang(1-7) 对 OSF-FB 自噬水平的影响** 通过荧光显微镜观察各组细胞自噬, 结果显示各组细胞内自噬小体数目差异有统计学意义 ( $F = 229.851$ ,  $P < 0.001$ )。与对照组比较, ANE 组自噬小体增加 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, ANE + 低剂量 Ang(1-7) 组和 ANE + 高剂量 Ang(1-7) 组的自噬小体减少 ( $P < 0.05$ ); ANE + 高剂量 Ang(1-7) 组自噬小体少于 ANE + 低剂量 Ang(1-7) 组 ( $P < 0.05$ ), 见图 7。

Western blot 检测结果显示, 各组细胞内 Beclin-1 蛋白表达与 LC3-II/LC3-I 比值的差异均有统计学意义 ( $F = 78.401$ ,  $F = 90.126$ ,  $P < 0.001$ )。与对照组比较, ANE 组成纤维细胞 Beclin-1 蛋白表达升高, LC3-II/LC3-I 比值上调 ( $P < 0.05$ ); 与 ANE 组比较, ANE + 低剂量 Ang(1-7) 组和 ANE + 高剂量 Ang(1-7) 组的 Beclin-1 蛋白表达均下降, LC3-II /

LC3-I 比值也下调 ( $P < 0.05$ ); 同时, ANE + 高剂量 Ang(1-7) 组的 Beclin-1 蛋白表达和 LC3-II/LC3-I 比值均低于 ANE + 低剂量 Ang(1-7) 组 ( $P < 0.05$ ), 见图 8。

### 3 讨论

OSF 作为一种口腔癌前病变, 其特征是慢性炎症和胶原蛋白在口腔中的进行性积累, 目前尚无完全治愈该疾病的方法, OSF 一旦发展为口腔癌, 患者的死亡率也会大大增加。因此, 探索减缓 OSF 进展及其潜在治疗方法至关重要。研究<sup>[5]</sup>表明, ANE 处理颊黏膜成纤维细胞后可以增加胶原蛋白合成和细胞外基质相关基因的表达, 成纤维细胞出现功能障碍和纤维化后, 可导致血管不足、口腔黏膜变白以及牙关紧闭等现象。此外, OSF 组织内炎症细胞产生的细胞因子和生长因子可能通过诱导成纤维细胞增殖、促进胶原合成和抑制胶原酶产生来促进 OSF<sup>[6]</sup>。由此可见, 成纤维细胞是 OSF 发展中的重要参与者。

本研究通过 ANE 诱导分离的人类黏膜成纤维细胞后发现, 细胞增殖活性升高而凋亡率降低, 同

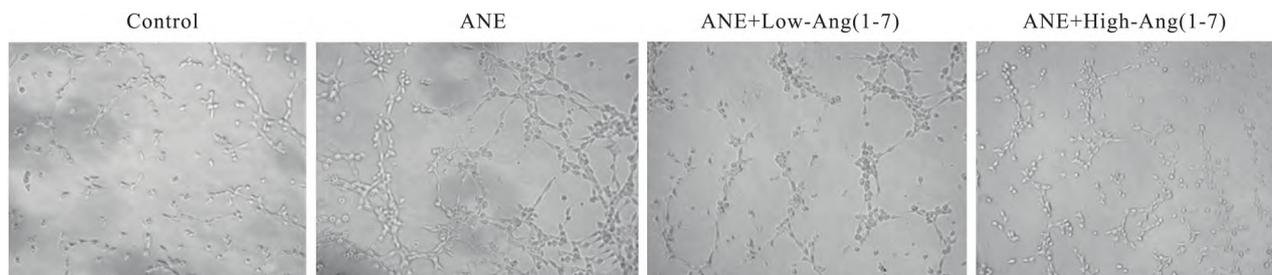


图 6 各处理组细胞血管生成能力比较

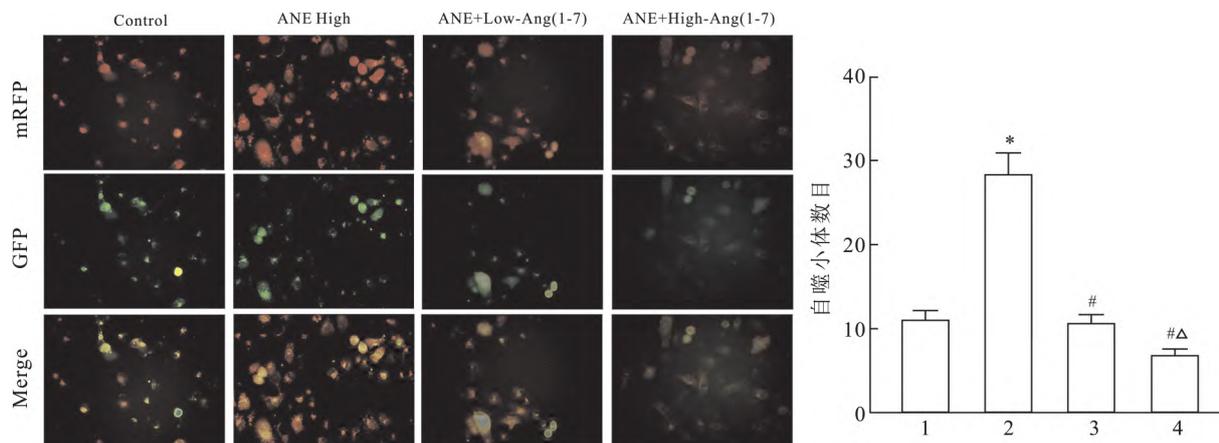


图 7 各处理组成纤维细胞自噬情况 免疫荧光染色  $\times 100$

红色 (mRFP) 为自噬溶酶体, 黄色 (mRFP 和 GFP 重叠) 为自噬小体; 1: 对照组; 2: ANE 组; 3: ANE + 低剂量 Ang(1-7) 组; 4: ANE + 高剂量 Ang(1-7) 组; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 ANE 组比较: #  $P < 0.05$ ; 与 ANE + 低剂量 Ang(1-7) 组比较: Δ  $P < 0.05$

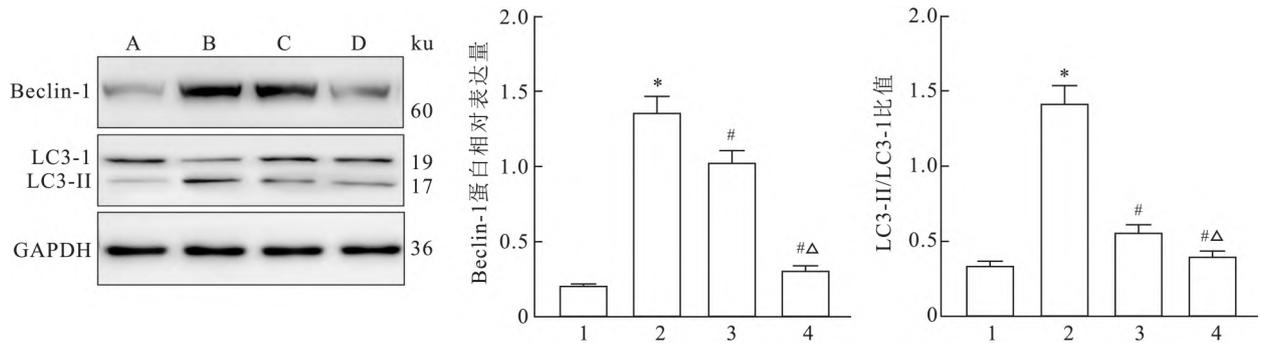


图8 各处理组成纤维细胞自噬相关蛋白表达

A: 对照组; B: ANE 组; C: ANE + 低剂量 Ang(1-7) 组; D: ANE + 高剂量 Ang(1-7) 组; 1: 对照组; 2: ANE 组; 3: ANE + 低剂量 Ang(1-7) 组; 4: ANE + 高剂量 Ang(1-7) 组; 与对照组比较: \* P < 0.05; 与 ANE 组比较: # P < 0.05; 与 ANE + 低剂量 Ang(1-7) 组比较: Δ P < 0.05

时, 细胞内 α-SMA 表达增加, 培养上清液中 Collagen I 和 Collagen III 含量均增高。活化的成纤维细胞能够产生 α-SMA 并结合到细胞内应力纤维中, 在收缩时产生强大的力, 以控制细胞的形状和运动、ECM 重塑以及组织收缩过程<sup>[7]</sup>。胶原是细胞外基质和结缔组织的主要成分, 已知 OSF 成纤维细胞能够产生结构较为稳定的胶原蛋白, 以 Collagen I 和 Collagen III 为主, 并分泌更多的赖氨酰氧化酶, 导致胶原蛋白交联增加<sup>[8]</sup>。胶原蛋白的表达增高与多种纤维化疾病的发生发展及恶化过程密切相关。

目前已报道 Ang(1-7) 在动脉粥样硬化、关节炎和哮喘等多种疾病过程中发挥抗炎作用。例如, Ang(1-7) 减少了 LPS 刺激的小鼠腹膜巨噬细胞中促炎细胞因子的释放<sup>[9]</sup>, 并通过其 Mas 受体缓解或预防 LPS 诱导的内毒素血症小鼠的体温过低、肌肉萎缩以及死亡等现象<sup>[10]</sup>。Ang(1-7) 在组织纤维化中也起到积极作用, Zhang et al<sup>[11]</sup> 研究发现 Ang(1-7) 降低了 Ang II 刺激的矽肺组织和成纤维细胞中 Collagen I 和 α-SMA 的表达, 从而对大鼠矽肺纤维化以及肌成纤维细胞分化起到了保护作用; Meng et al<sup>[12]</sup> 研究表明 Ang(1-7) 通过抑制 MAPK 磷酸化和 NF-κB 信号级联反应来预防博来霉素诱导的肺纤维化和 Ang II 诱导的肺部炎症反应。由此可见, Ang(1-7) 对炎症性疾病和纤维化过程均有益。本研究通过体外以 ANE 诱导人成纤维细胞活化过程中施以 Ang(1-7) 干预, 实验检测结果显示出 Ang(1-7) 作用下不仅能够抑制 ANE 诱导的人成纤维细胞增殖, 而且降低了 α-SMA 蛋白表达和细胞培养上清液中 Collagen I 和 Collagen III 的含量, 这提示 Ang(1-7) 可能在 OSF 中也发挥抑制组织纤维化的作用。

新血管生成是一个多步骤过程, 其中涉及内皮细胞迁移、增殖、管形成和存活等步骤。在 OSF 过程中存在炎症诱导的血管相关反应, OSF 环境下血管生成对该疾病的发生发展及恶性转化起着重要作用。Sabarinath et al<sup>[13]</sup> 研究发现, 与正常口腔黏膜相比, OSF 过程的所有阶段均存在血管生成升高的现象; Tekade et al<sup>[14]</sup> 报道指出 OSF 早期可见血管生成增加, 而晚期则呈下降趋势, 晚期阶段血管面积减少可能是由于血管周围的纤维化增加所导致的。目前, 多数研究认为在炎症状态下能够诱发局部血管生成, 血管内皮细胞的增加促进了细胞黏附分子的分泌, 这使得大量的炎症细胞趋于炎症区域, 进一步加剧了炎症反应<sup>[15]</sup>。本研究结果显示, 经过 ANE 诱导的人成纤维细胞上清液促进了 HUVEC 管形结构的形成, 而在 Ang(1-7) 作用下却抑制了 HUVEC 管形结构的形成, 这一结果表明了 Ang(1-7) 可能对于 OSF 过程中的血管生成过程起到调控作用。

自噬是真核细胞中高度进化保守和遗传控制的途径, 在维持细胞内稳态和保持细胞功能方面起着关键作用。正常情况下细胞自噬活性较低, 但在细胞饥饿、缺氧、生长因子缺乏等应激条件下, 可诱导自噬水平的增加, 从而导细胞内内容物降解。研究表明, 与正常口腔黏膜组织相比, 随着 OSF 的发展, 其上皮组织中自噬水平显著增加<sup>[16]</sup>。本研究结果显示, 经过 ANE 诱导的人成纤维细胞内自噬小体增加, 自噬相关蛋白 Beclin-1 蛋白表达升高, LC3-II / LC3-I 比值也上调, 通过 Ang(1-7) 作用对自噬增加起到了一定的抑制作用, 由此推测 Ang(1-7) 通过调控自噬减少了 ANE 诱导的人成纤维细胞活化, 影响了细胞凋亡及血管形成等相关过程。

综上所述, Ang(1-7) 能够在体外抑制 OSF 内成

纤维细胞增殖,促进细胞凋亡并减少血管生成,该作用可能与其调控自噬水平相关,这可能是逆转 OSF 成纤维细胞活化的机制之一。但本研究仅从体外实验证明了 Ang(1-7) 对 ANE 诱导人成纤维细胞活化的作用,然而 OSF 涉及一系列复杂作用,后续还需构建动物模型从体内进一步明确相关作用效果。

### 参考文献

- [1] Shetty S S, Sharma M, Fonseca F P, et al. Signaling pathways promoting epithelial mesenchymal transition in oral submucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma[J]. *Jpn Dent Sci Rev*, 2020, 56(1): 97-108.
- [2] Al-Tayar B A, Ahmad A, Yusoff M E, et al. Cytotoxic effects of betel quid and areca nut aqueous extracts on mouse fibroblast, human mouth-ordinary-epithelium I and human oral squamous cell carcinoma cell lines[J]. *Asian Pac J Cancer Prev* 2020, 21(4): 1005-9.
- [3] Santos R A S, Sampaio W O, Alzamora A C, et al. The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS axis of the renin-angiotensin system: focus on Angiotensin-(1-7) [J]. *Physiol Rev* 2018, 98(1): 505-53.
- [4] Tsai H J, Liao M H, Shih C C, et al. Angiotensin-(1-7) attenuates organ injury and mortality in rats with polymicrobial sepsis [J]. *Crit Care* 2018, 22(1): 269.
- [5] Adtani P, Narasimhan M, Ranganathan K, et al. Characterization of oral fibroblasts: An *in vitro* model for oral fibrosis [J]. *J Oral Maxillofac Pathol* 2019, 23(2): 198-202.
- [6] Wadhwan V, Venkatesh A, Reddy V, et al. The role of myofibroblasts in the progression of oral submucous fibrosis: A systematic review [J]. *J Oral Maxillofac Pathol* 2019, 23(2): 257-66.
- [7] 宋剑南,陶辉,丁季飞,等. IGFBP-3 在大鼠心肌纤维化和心肌成纤维细胞活化增殖中的表达 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(2): 263-8.
- [8] Wake M, Takeda N, Isagawa T, et al. Cell cycle perturbation induces collagen production in fibroblasts [J]. *Int Heart J* 2019, 60(4): 958-63.
- [9] Souza L L, Costa-Neto C M. Angiotensin-(1-7) decreases LPS-induced inflammatory response in macrophages [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227: 2117-22.
- [10] Souza L L, Duchene J, Todiras M, et al. Receptor MAS protects mice against hypothermia and mortality induced by endotoxemia [J]. *Shock* 2014, 41(4): 331-6.
- [11] Zhang B N, Xu H, Gao X M, et al. Protective effect of angiotensin (1-7) on silicotic fibrosis in rats [J]. *Biomed Environ Sci*, 2019, 32(6): 419-26.
- [12] Meng Y, Yu H, Li W, et al. Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/Mas axis protects against lung fibrosis by inhibiting the MAPK/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2014, 50(4): 723-36.
- [13] Sabarinath B, Sriram G, Saraswathi T R, et al. Immunohistochemical evaluation of mast cells and vascular endothelial proliferation in oral submucous fibrosis [J]. *Indian J Dent Res*, 2011, 22(1): 116-21.
- [14] Tekade S A, Chaudhary M S, Tekade S S, et al. Early stage oral submucous fibrosis is characterized by increased vascularity as opposed to advanced stages [J]. *J Clin Diagn Res*, 2017, 11(5): ZC92-6.
- [15] 蔡佳伦,刘双全. 内质网应激与病理性血管生成相关疾病 [J]. *中国动脉硬化杂志* 2021, 29(4): 342-8.
- [16] Zhu B, Jiang Q, Que G, et al. Role of autophagy and apoptosis in atrophic epithelium in oral submucous fibrosis [J]. *J Oral Sci*, 2020, 62(2): 184-8.

## Angiotensin (1-7) activates autophagy to regulates apoptosis and angiogenesis of oral submucosal fibroblasts

Qiu Lehong, Deng Wei, Gan Chengwen, Sun Ying

(Dept of Stomatology, Hainan General Hospital,

Hainan Hospital Affiliated to Hainan Medical College, Haikou 570311)

**Abstract Objective** To observe the effect of angiotensin (1-7) [Ang(1-7)] on the apoptosis and angiogenesis of fibroblasts in the oral submucosal fibrosis (OSF), and to explore the effect preliminarily mechanism. **Methods** Fibroblasts were isolated and cultured from human buccal mucosal tissue, the cell morphology was observed by inverted microscope, and the expression of vimentin was detected by immunofluorescence staining; areca nut extract (ANE) was used to induce human fibroblasts to simulate the *in vitro* model of fibroblasts in OSF, the experimental groups included control group (normally cultured cells), ANE group (100  $\mu$ g/ml ANE cultured cells for 48 hours), ANE + low-dose Ang(1-7) group (100  $\mu$ g/ml ANE + 10<sup>-7</sup> mol/L Ang(1-7) cultured cells for 48 h), ANE + high-dose Ang(1-7) group (100  $\mu$ g/ml ANE + 10<sup>-5</sup> mol/L Ang(1-7) cultured cells for 48 h), immunofluorescence staining detected the expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), ELISA method detected the content of Collagen I and Collagen III in the cell culture supernatant, MTT method detected cell proliferation activity, flow cytometry detected cell apoptosis, the tubule formation experiment detected the vascularization of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC); After the mRFP-GFP-LC3 virus was transferred to the cells, the level of

## MSI2 对 DHT 诱导的 KGN 细胞增殖凋亡失衡的影响

杜悠雯<sup>1</sup>, 石海涛<sup>1</sup>, 韩帅龙<sup>1</sup>, 张淑敏<sup>1</sup>, 管超奇<sup>1</sup>, 王田娟<sup>2</sup>, 潘林鑫<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探究 Musashi-2 (MSI2) 过表达对二氢睾酮 (DHT) 诱导的人卵巢颗粒细胞系 (KGN) 细胞增殖和凋亡失衡的影响。方法 对人卵巢颗粒细胞 (GCs) 原代培养进程中的基因表达谱进行统计分析, 筛选其中的差异表达基因。构建 pcDNA3.1-MSI2 真核表达质粒, 瞬时转染至 KGN 细胞中, 并利用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 和 Western blot 技术检测 MSI2 的过表达效果。在 DHT 诱导的 KGN 细胞中过表达 MSI2 后, 然后分别利用四唑盐 (MTT) 比色法和 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (EdU) 染色法检测各组细胞的增殖情况, 并进一步利用流式细胞术 (FCM) 检测各组细胞的凋亡情况。结果 MSI2 的 mRNA 表达水平在人卵巢 GCs 原代培养过程中逐渐下降。成功构建 pcDNA3.1-MSI2 真核表达质粒, 转染至 KGN 细胞中能够提高 MSI2 的 mRNA 和蛋白表达水平。MTT、EdU 和 FCM 结果显示与空白组相比, DHT 诱导能够明显降低 KGN 细胞的增殖率, 同时提高其凋亡率 ( $P < 0.05$ ), 而在 MSI2 过表达后, KGN 细胞增殖率又有所提高, 且凋亡率也有所降低 ( $P < 0.05$ ), 均接近于空白组。结论

MSI2 过表达能够有效缓解 DHT 诱导的 KGN 细胞增殖凋亡失衡现象, 表明其在 GCs 生长和卵泡发育过程中发挥着重要作用。

**关键词** 二氢睾酮; 颗粒细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡

**中图分类号** R 34; Q 28

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2023)03-0464-07

**doi:** 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.03.019

多囊卵巢综合征 (polycystic ovarian syndrome, PCOS) 是一种生殖功能障碍与代谢异常并存的内分泌紊乱综合征, 是导致女性不孕不育的重要原因<sup>[1-2]</sup>, 卵巢颗粒细胞 (granulosa cells, GCs) 的增殖凋亡功能异常是 PCOS 的重要发病机制<sup>[3]</sup>。此外, 雄激素过多是导致 PCOS 的主要原因, 因此二氢睾酮 (dihydrotestosterone, DHT) 广泛用于诱导大鼠 PCOS 动物模型和 GCs 模型<sup>[4-5]</sup>。该研究首先对基因芯片 GSE129919 进行了分析, 显示 Musashi-2 (MSI2) 在人卵巢 GCs 的体外培养过程中表达降低, 提示其很可能在 GCs 的生长过程中扮演着重要角色。MSI2 作为 MSI 家族的重要成员, 是一类进化保守的 RNA 结合蛋白, 在造血系统发育、细胞增殖分化以及干细胞功能维持等过程中发挥着关键作用<sup>[6-7]</sup>, 但其对 GCs 增殖和凋亡功能的影响尚未见报道。该文旨在研究 MSI2 过表达对 DHT 诱导的 KGN 细胞增殖和凋亡失衡的影响, 为进一步探索其

2022-08-08 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 2008085QH365、2108085QH309)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学生命科学院, 合肥 230032

<sup>2</sup>安徽医科大学第一附属医院妇产科生殖医学中心, 合肥 230022

作者简介: 杜悠雯, 女, 助理实验师;

王田娟, 女, 主治医师, 责任作者, E-mail: wangtj6@126.com;

潘林鑫, 男, 实验师, 责任作者, E-mail: panlinxin@126.com

autophagy was detected by immunofluorescence staining, Western blot detected the expression of autophagy-related protein Beclin-1 and the ratio of LC3-II/LC3-I. **Results** The isolated and cultured cells were in a long spindle shape, and Vimentin was positively expressed, indicating that fibroblasts were successfully isolated; Compared with the ANE group, the fluorescence expression of  $\alpha$ -SMA protein in ANE low dose Ang(1-7) group and ANE + high dose Ang(1-7) group significantly decreased, the contents of Collagen I and Collagen III in the culture supernatant were reduced ( $P < 0.05$ ), cell proliferation activity decreased ( $P < 0.05$ ), and cell apoptosis rate increased ( $P < 0.05$ ), the cell culture supernatants of the two groups inhibited the angiogenesis of HUVEC ( $P < 0.05$ ), endophagosomes were reduced ( $P < 0.05$ ), Beclin-1 protein expression was reduced ( $P < 0.05$ ), and the ratio of LC3-II/LC3-I was down-regulated ( $P < 0.05$ ); in addition, the effect of ANE + high-dose Ang(1-7) group was stronger than that of ANE + low-dose Ang(1-7) group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Ang(1-7) can inhibit the activation of fibroblasts induced by ANE, promote cell apoptosis, and reduce the angiogenesis of HUVEC, this mechanism may be related to the regulation of cell autophagy.

**Key words** sororal submucosal fibrosis; fibroblasts; angiotensin (1-7); apoptosis; autophagy; angiogenesis