

黄芪注射液对脑缺血再灌注损伤大鼠脑内血管新生及 HIF-1 α /VEGF 信号转导通路的影响

余晴晴¹, 柏建峰², 王江军¹

[摘要] 目的:探究黄芪注射液对脑缺血再灌注损伤大鼠脑内血管新生及缺氧诱导生长因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)/血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)信号转导通路的影响。方法:72 只大鼠随机分为对照组、模型组和黄芪注射液组,每组 24 只,线栓法复制脑缺血再灌注损伤大鼠模型,评价术前、术后、给药 7 d 后的神经功能评分,免疫组化法检测脑缺血再灌注损伤皮质微血管密度,RT-PCR 法检测脑缺血再灌注损伤皮质 HIF-1 α mRNA 和 VEGF mRNA,Western Blotting 法检测脑缺血再灌注损伤皮质 HIF-1 α 和 VEGF 的蛋白表达。结果:给药 7d 后黄芪注射液组神经功能评分明显低于模型组($P < 0.01$),微血管密度、HIF-1 α mRNA 和 VEGF mRNA 表达水平、HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达水平均高于模型组($P < 0.01$)。结论:黄芪注射液促进脑缺血再灌注损伤大鼠脑内血管新生,其作用机制可能为激活 HIF-1 α /VEGF 信号转导通路。

[关键词] 黄芪注射液;脑缺血;再灌注损伤;血管新生;血管内皮细胞生长因子;缺氧诱导生长因子-1 α

[中图分类号] R 285.5;R 743.31 **[文献标志码]** A **DOI:**10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.10.005

Effect of astragalus injection on the angiogenesis and HIF-1 α /VEGF signal pathway in brain tissue of rats with cerebral ischemia reperfusion injury

YU Qing-qing¹, BAI Jian-feng², WANG Jiang-jun¹

(1. Department of Pharmacy, 2. Department of Neurosurgery, The Central Hospital of Weihai, Weihai Shandong 264200, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of astragalus injection on the angiogenesis and HIF-1 α /VEGF (hypoxia inducible factors-1 α /vascular endothelial growth factor) signal pathway in brain tissue of rats with cerebral ischemia reperfusion injury. **Methods:** Seventy-two rats were randomly divided into the control group, model group and astragalus injection group (24 rats each group). The rat model of cerebral ischemia reperfusion injury models were established by nylon monofilament induced method. Before operation, after operation and after 7 days of administration, the neurological scores in all rats were evaluated, and the expression levels of microvessel density (MVD) in brain tissue of rats were detected by immunohistochemical method, the mRNA and protein expression levels of HIF-1 α and VEGF in brain tissue of rats were detected by RT-PCR and Western Blotting, respectively. **Results:** After 7 days of administration, the neurological score in astragalus injection group was significantly higher than that in model group ($P < 0.01$), and the level of MVD, mRNA and protein expression levels of HIF-1 α and VEGF in astragalus injection group were significantly higher than those in model group ($P < 0.01$). **Conclusions:** Astragalus injection can promote the angiogenesis in brain tissue of rats with cerebral ischemia reperfusion injury, the mechanism of which maybe activate the pathway of HIF-1 α /VEGF.

[Key words] astragalus injection; cerebral ischemia; reperfusion injury; angiogenesis; vascular endothelial growth factor; hypoxia inducible factors-1 α

脑缺血再灌注损伤是指缺血脑组织再次恢复血液供应后,脑组织中的神经功能损伤及形态学改变的严重程度高于恢复血液供应前^[1]。但如能在最短的时间内恢复缺血脑组织的血液供应,则可最大程度地恢复缺血脑组织的神经功能。血液在全身运输通道是血管,血管新生则是恢复缺血脑组织血液供应的最有效的途径^[2]。因此,在临床中对于脑

缺血的治疗的有效方法之一即为促进血管的新生。黄芪为临床常用中药,常用于心脑血管疾病^[3]。现代研究^[4-5]表明黄芪中有多种活性成分作用于心脑血管,可以有效的恢复神经功能损伤,但鲜有关于从血管新生角度研究黄芪注射液对脑缺血再灌注损伤作用的文献报道。

血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前发现促进血管新生活性最强的活性因子,可以促进血管内皮细胞分裂、增殖、迁移、增加血管通透性等^[6]。VEGF 是缺氧诱导生长因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)

[收稿日期] 2016-09-30

[作者单位] 山东省威海市中心医院 1. 药理学, 2. 神经外科, 264200

[作者简介] 余晴晴(1986-),女,药师。

的靶基因。在缺血、缺氧的条件下, HIF-1 α 可激活 VEGF 基因的转录, 增加 VEGF 的水平^[7]。因此, 本研究通过复制脑缺血再灌注损伤大鼠模型, 研究黄芪注射液对脑缺血再灌注损伤时脑组织血管新生及 HIF-1 α /VEGF 信号转导通路的影响。现作报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 健康的 SPF 级 SD 大鼠 72 只, 体质量为 200 ~ 220 g, 雌雄不限, 购自山东大学实验动物中心, 合格证编号: SCXK (鲁) 2012-0013。购买后在实验室适应性喂养 1 周。72 只大鼠随机分为对照组、模型组和黄芪注射液组, 每组 24 只。

1.1.2 主要试剂及仪器 黄芪注射液(成都地奥九泓制药厂, 国药准字 Z51021776, 批号 20150304), CD34 抗体、VEGF 抗体、HIF-1 α 抗体(均购自于武汉博士德生物工程有限公司, 批号分别为 20150804、20151012、201511013), TRIzol(美国 Invitrogen 公司, 批号 015234), RT-PCR 试剂盒(美国 MBI 公司, 批号 015725), 蛋白提取试剂盒(上海贝博生物科技有限公司, 批号 20151203)。

倒置显微镜(日本奥林巴斯, 型号 CX23), 电泳仪(北京六一仪器厂, 型号 DYCZ30D), 凝胶成像系统(上海培清科技有限公司, 型号 JS-786), Image-pro-plus 6.0 图像分析软件。

1.2 方法

1.2.1 脑缺血再灌注损伤模型复制及给药 采用线栓法复制脑缺血再灌注损伤大鼠模型^[8]。主要步骤: 模型组和黄芪注射液组大鼠腹腔注射水合氯醛麻醉, 仰卧位, 固定, 颈部备皮, 颈正中部位切开皮肤, 分离肌肉、筋膜等组织, 分离右侧颈内动脉和颈总动脉, 两个微动脉夹分别夹住闭颈总动脉和颈内动脉主干远心端, 用消毒后的线结扎近心端颈内动脉, 在结扎后的颈内动脉开一小切口, 同时在颈内动脉下放置 1 条线备用, 将栓线插入切口, 拉紧松结, 除去颈内动脉的微动脉夹, 线栓沿着颈内动脉插入 18 mm 或者出现阻力时停止插入, 保持插入位置不动 45 min, 抽出栓线, 除去微动脉夹再通 45 min, 再次插入栓线阻塞 45 min, 反复 3 次, 缝合伤口, 消毒。模型组和黄芪注射液组大鼠术后 24 h 出现左侧前肢内收、提尾悬空时不能伸展左侧前爪、行走向左侧转圈, 可判定造模成功。对照组大鼠不做任何处理。黄芪注射液组在模型复制成功后腹腔注射 10

mL/kg 黄芪注射液, 每天 1 次, 连续 7 d。对照组和模型组腹腔注射 0.9% 氯化钠注射液。

1.2.2 观察指标

1.2.2.1 神经功能评分 术前、术后、连续给药 7 d 后对 3 组大鼠采用 Longal 评分标准进行神经功能评分。Longal 评分标准: 动物没有神经缺损症状, 0 分; 前爪不能充分伸展, 1 分; 沿外侧转圈行走, 2 分; 行走时出现对侧倾斜, 3 分; 丧失意识, 不能爬行 4 分。评分越高受损越严重。

1.2.2.2 脑缺血再灌注损伤皮质微血管密度 (MVD) 的检测 每组取 8 只大鼠于最后一次灌胃后 1 h, 腹腔注射水合氯醛麻醉, 取出脑组织, 10% 甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, 脱蜡, 热修复, H₂O₂ 封闭, 滴加 CD34 抗体 (1: 800)、VEGF 抗体 (1: 800) 和 HIF-1 α (1: 800) 抗体, 4 °C 孵育过夜, 二抗常温孵育 30 min, 显色, 复染, 返蓝, 脱水, 封片, 拍片。参照 WEIDNER 方法^[6]对右侧前动脉和中动脉支配的皮质区 MVD 进行计数。

1.2.2.3 VEGF mRNA 和 HIF-1 α mRNA 的检测 每组取 8 只大鼠于最后一次灌胃 1 h 后腹腔注射水合氯醛麻醉, 提取脑缺血再灌注损伤脑组织中的总 RNA, 将提取的总 RNA 逆转录成互补的 cDNA, 以 cDNA 为模板进行扩增。一个反应循环为: 95 °C 变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 56 ~ 60 °C 梯度退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s。按照上述的一个反应循环的反应条件, 连续反应 35 个循环。将反应所得的产物在琼脂糖凝胶中电泳分离, 扫描分离的凝胶条带的吸光度, 通过对比吸光度值比较各目的 mRNA 的相对含量。在扩增的过程中 HIF-1 α 的上游引物: 5' AAC AAA CAG AAT CTG TCC TCA AAC C-3', 下游引物: 5'-CAG GTA ATG GAG ACA TTG CCA G-3', 片段长度 296 bp; VEGF 的上游引物: 5'-GGC CTC TGA AAC CAT GAA CT-3', 下游引物: 5'-ATG CTG CAG GAA GCT CAT CT-3', 片段长度 385 bp; β -actin-1 的上游引物: 5'-AGT GTG ACG TGG ACA TCC GCA AAG-3', 下游引物: 5'-ACT CAC ATC TGC TGG AAG GTG GAC-3', 片段长度 390 bp; β -actin-2 的上游引物: 5'-TCAG-GTC ATC ACT ATC GGC AAT-3', 下游引物: 5'-AAA GAA AGG GTG TAA AACGCA-3', 片段长度 431 bp。

1.2.2.4 VEGF 和 HIF-1 α 蛋白的检测 每组取 8 只大鼠于最后一次灌胃 1 h 后腹腔注射水合氯醛麻醉, 取出脑组织, 匀浆, 提取脑组织总蛋白, 取 40 μ g 的蛋白加入到上样缓冲液中水煮变性, 将变性后的

蛋白样品加入到 SDS-PAGE 胶中,电泳(浓缩胶 100 V、分离胶 120 V),转膜(200 mA,80 min)至醋酸纤维素膜上,封闭 2 h,VEGF 和 HIF-1 α 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗常温孵育 60 min,涂 ECL 发光试剂,暗室中曝光胶片,暗室中胶片浸泡于显影液和定影液。对条带的吸光度进行扫描,通过吸光度值对比各目的蛋白的相对含量。

1.3 统计学方法 采用方差分析和 *q* 检验。

2 结果

2.1 3 组大鼠神经功能评分比较 术前 3 组大鼠神经功能评分差异均无统计学意义 ($P > 0.05$);术后模型组和黄芪注射液组的神经功能评分差异无统计学意义 ($P > 0.05$),但 2 组均明显高于对照组 ($P < 0.01$);给药 7 d 后,模型组和黄芪注射液组的神经功能评分均明显高于对照组 ($P < 0.01$),模型组神经功能评分明显高于黄芪注射液组 ($P < 0.01$) (见表 1)。

表 1 3 组大鼠神经功能评分比较 ($\bar{x} \pm s$;分)

分组	<i>n</i>	术前	术后	给药 7 d 后
对照组	8	0.00 \pm 1.00	0.00 \pm 1.00	0.00 \pm 1.00
模型组	8	0.00 \pm 1.00	2.12 \pm 0.13 **	2.98 \pm 0.56 **
黄芪注射液组	8	0.00 \pm 1.00	2.15 \pm 0.11 **	1.24 \pm 0.20 ** $\Delta\Delta$
<i>F</i>	—	0.00	35.44	39.73
<i>P</i>	—	>0.05	<0.01	<0.01
<i>MS</i> _{组内}	—	1.000	0.343	0.451

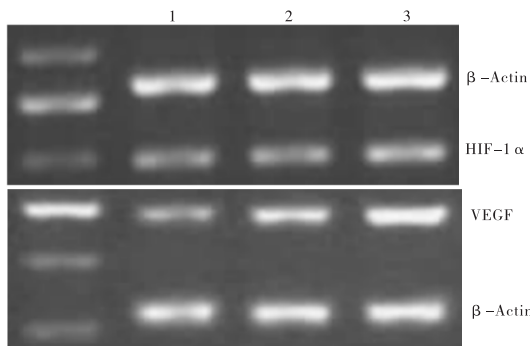
q 检验:与对照组比较 ** $P < 0.01$;与模型组比较 $\Delta\Delta P < 0.01$

2.2 3 组大鼠脑缺血再灌注皮质区 MVD 比较 连续给药 7 d 后,黄芪注射液组和模型组脑缺血再灌注皮质区 MVD 均明显大于对照组 ($P < 0.01$),且黄芪注射液组脑缺血再灌注皮质区 MVD 明显大于模型组 ($P < 0.01$) (见表 2)。

2.3 3 组大鼠脑缺血再灌注皮质区 VEGF mRNA 和 HIF-1 α mRNA 表达水平比较 连续给药 7 d 后,黄芪注射液组和模型组脑缺血再灌注皮质区 VEGF mRNA 和 HIF-1 α mRNA 表达水平均高于对照组 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$);黄芪注射液组脑缺血再灌注皮质区 VEGF mRNA 和 HIF-1 α mRNA 表达水平均明显高于模型组 ($P < 0.01$) (见图 1、表 2)。

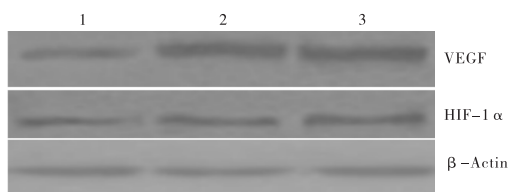
2.4 3 组大鼠脑缺血再灌注皮质区 VEGF 和 HIF-1 α 蛋白表达水平比较 连续给药 7 d 后,黄芪注射液组和模型组脑缺血再灌注皮质区 VEGF 和 HIF-1 α 蛋白表达水平均明显高于对照组 ($P < 0.01$);黄芪注射液组脑缺血再灌注皮质区 VEGF 和 HIF-1 α

蛋白表达水平均明显高于模型组 ($P < 0.01$) (见图 2、表 3)。



1:对照组; 2:模型组; 3:黄芪注射液组

图 1 3 组大鼠脑缺血再灌注皮质区 VEGF mRNA 和 HIF-1 α mRNA 表达水平比较



1:对照组; 2:模型组; 3:黄芪注射液组

图 2 3 组大鼠脑缺血再灌注皮质区 VEGF 和 HIF-1 α 蛋白表达水平比较

表 2 3 组大鼠再灌注皮质区 MVD、VEGF mRNA 和 HIF-1 α mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	MVD/个	VEGF mRNA	HIF-1 α mRNA
对照组	8	7.03 \pm 0.89	0.298 \pm 0.04	0.198 \pm 0.03
模型组	8	10.53 \pm 1.88 **	0.385 \pm 0.09 *	0.299 \pm 0.05 **
黄芪注射液组	8	15.63 \pm 2.41 ** $\Delta\Delta$	0.591 \pm 0.07 ** $\Delta\Delta$	0.423 \pm 0.08 ** $\Delta\Delta$
<i>F</i>	—	44.29	41.75	31.10
<i>P</i>	—	<0.01	<0.01	<0.01
<i>MS</i> _{组内}	—	3.378	0.004	0.003

q 检验:与对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较 $\Delta\Delta P < 0.01$

表 3 3 组大鼠脑缺血再灌注皮质区 VEGF 和 HIF-1 α 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	VEGF	HIF-1 α
对照组	8	0.221 \pm 0.05	0.202 \pm 0.04
模型组	8	0.368 \pm 0.07 **	0.319 \pm 0.06 **
黄芪注射液组	8	0.562 \pm 0.09 ** $\Delta\Delta$	0.478 \pm 0.07 ** $\Delta\Delta$
<i>F</i>	—	45.30	45.60
<i>P</i>	—	<0.01	<0.01
<i>MS</i> _{组内}	—	0.005	0.003

q 检验:与对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较 $\Delta\Delta P < 0.01$

3 讨论

脑缺血后,脑组织中的神经细胞会因为缺血缺

氧而出现变性、坏死和凋亡,导致严重损伤神经功能。而如果能尽快恢复脑缺血部位脑组织的血液供应,则可以在很大程度上恢复受损的脑神经功能^[9]。脑缺血部位血管新生可在很大程度上恢复脑缺血部位的血液供应,改善脑缺血部位的缺血、缺氧状况。脑缺血后缺血部位会自我出现血管的新生,但缺血部位自我血管新生的能力较小,不足恢复脑缺血部位的血液供应^[10]。在临床中能通过外部因素刺激脑缺血部位的血管新生,则可以有效恢复缺血部位的供血^[11]。因此,促进脑缺血部位的血管新生成为近年来治疗脑缺血的研究热点。

血管的新生过程主要是由血管内皮细胞的增殖、迁移、黏附、腔样结构形成等过程组成。机体中血管内皮细胞的上述过程是在多种活性因子的作用下完成的。VEGF是目前发现的最强的一种促进血管新生的活性因子,VEGF与VEGF受体相结合后会刺激血管内皮细胞的前体分化和成熟,促进血管内皮细胞迁移和黏附^[12]。陈懿等^[13]研究发现脑泰方可以通过升高脑缺血部位的VEGF蛋白表达水平,促进脑缺血部位的血管新生,有效恢复脑缺血再灌注损伤大鼠的脑神经功能。机体中VEGF基因的表达与所在的微环境变化有关,当微环境出现缺血、缺氧时,VEGF基因的表达水平就会增加。HIF-1 α 是调节机体氧稳态的关键的核心转录因子,在机体中的各种细胞中均有存在。HIF-1 α 是在机体缺氧的条件下转录而成的活性核蛋白,其与炎症、血管收缩、血管新生、血液新生等有着密切关系。VEGF基因的启动子区域有一个结合位点供HIF-1 α 结合,在机体缺血、缺氧的条件下HIF-1 α 与VEGF基因的启动子结合,促进VEGF基因的表达^[14]。

黄芪作为传统中药材,具有扶正补气之功效。现代研究表明,黄芪含有多种活性成分,包括黄芪多糖、黄芪皂苷、黄酮类成分等^[15]。黄芪多糖促进血管新生,并通过诱导Akt磷酸化,保护内皮细胞,减少内皮细胞凋亡^[16]。黄芪甲苷可以促进人脐静脉内皮细胞增殖和迁移,升高人脐静脉内皮细胞在Matrigel基质胶中侵袭能力,促进微血管形成^[17]。黄芪注射液促进体外血管内皮细胞增殖^[18]。

本研究中灌胃黄芪注射液后脑缺血再灌注损伤大鼠的神经功能评分明显低于模型组,说明黄芪注射液后可以有效的恢复脑缺血再灌注损伤大鼠的神经功能;黄芪注射液组给药后的大鼠脑缺血再灌注皮质区中MVD明显高于模型组,说明黄芪注射液可以促进血管新生;黄芪注射液组给药后大鼠脑缺

血再灌注皮质区中的VEGF mRNA和HIF-1 α mRNA表达水平、VEGF和HIF-1 α 蛋白表达水平均明显高于模型组。基于VEGF和HIF-1 α 促进血管新生的作用以及HIF-1 α 对VEGF表达的重要调节作用,我们推测黄芪注射液可能是通过上调HIF-1 α ,促进VEGF的表达、血管新生、脑缺血再灌注损伤大鼠脑神经损伤的恢复。

[参 考 文 献]

- [1] 杨锡兰,王盼,董银凤,等.大豆异黄酮和法舒地尔联合应用对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J].蚌埠医学院学报,2016,41(6):712.
- [2] 董银凤,陈前芬.大豆异黄酮对大鼠脑缺血再灌后ATP酶及bcl-2和bax的影响[J].蚌埠医学院学报,2012,37(1):8.
- [3] 孙念霞,高维娟.黄芪防治缺血性脑血管病的作用机制研究进展[J].河北中医报,2014,29(1):51.
- [4] 刁勇,梁振生,李玉东,等.黄芪防治脑缺血损伤的研究进展[J].中国药学杂志,2010,45(3):161.
- [5] 刘莎莎,高维娟,钱涛,等.黄芪注射液腹腔注射脑缺血再灌注模型大鼠海马组织神经元凋亡及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3的表达[J].中国组织工程研究,2012,16(20):3747.
- [6] 吕倩,王昌明,蒋明,等.HIF-1 α 和VEGF在大鼠COPD中的表达及与肺血管重构的关系研究[J].中国药理学通报,2012,28(6):772.
- [7] 王文杰,左霞,郭俐宏,等.大株红景天注射液对大鼠脑缺血再灌注后血管内皮损伤的影响[J].新乡医学院学报,2016,33(1):26.
- [8] 沈丽萍,王帅帅,董丽果,等.经鼻给脐血间充质干细胞条件培养基治疗脑缺血再灌注损伤[J].中国组织工程研究,2013,17(45):7891.
- [9] WACKER BK, PERFATER JL, GIDDAY JM. Hypoxia preconditioning induces stroke tolerance in mice via a cascading HIF, sphingosine kinase, and CCL2 signaling pathway [J]. J Neurochem,2012,123(6):954.
- [10] 郭晓燕,梅元武.脑缺血耐受机制的研究进展[J].神经损伤与功能重建,2012,7(6):451.
- [11] DOMBROWSKI SM, DESHPANDE A, DINGWALL C, et al. Chronic hydrocephalus-induced hypoxia: increased expression of VEGFR-2 + and blood vessel density in hippocampus [J]. Neuroscience,2008,152(2):346.
- [12] 刘媛媛,潘莉,郭晋,等.急性脑梗死患者血清VEGF及Ang-1水平的动态变化及其意义[J].蚌埠医学院学报,2012,37(10):1178.
- [13] 陈懿,朱惠斌,廖君,等.脑泰方对脑缺血再灌注大鼠HIF-1 α /VEGF的调节作用[J].中国中西医结合杂志,2014,34(10):1225.
- [14] 张志慧,吴以岭.通心络对 β_1 -42损伤人脑微血管内皮细胞HIF-1 α /VEGF表达的干预作用[J].中国药理学通报,2010,20(1):124.
- [15] 李国元,赵久达,王成,等.HIF-1 α 和VEGF在胃癌中的表达及临床意义[J].中国癌症杂志,2010,20(8):602.

表面标志物 Cripto-1 表达对食管癌干细胞生长的作用机制研究

宋 爽,徐琳琳

[摘要] **目的:**探讨表面标志物 Cripto-1 (CR-1) 的表达对食管癌干细胞生长的作用机制。**方法:**自食管癌 Eca109 细胞中分选 Eca109 干细胞,提取正常食管上皮细胞 HEEC 和 Eca109 细胞,Eca109 干细胞总蛋白,采用 Western-blot 法检测 CR-1 表达水平;构建 CR-1 基因沉默载体 CNE2/CR-1⁻ 及过表达载体 CNE1/CR-1⁺,利用脂质体转染法将 CNE2/CR-1⁻ 和 CNE1/CR-1⁺ 分别转染进 Eca109 干细胞中,并设对照组,采用 RT-PCR 法检测 CR-1 表达;MTT 法检测对照组、CNE2/CR-1⁻ 组、CNE1/CR-1⁺ 组 Eca109 干细胞增殖情况;流式细胞仪检测各组 Eca109 干细胞凋亡情况;Western-blot 法检测各组细胞 Akt、p-Akt 蛋白表达情况。**结果:**Eca109 细胞及 Eca109 干细胞中 CR-1 表达均明显高于 HEEC ($P < 0.01$)。RT-PCR 结果显示,CNE2/CR-1⁻ 组 CR-1 表达水平明显低于对照组,CNE1/CR-1⁺ 组明显高于对照组 ($P < 0.01$)。MTT 结果显示,CNE2/CR-1⁻ 组细胞增殖明显低于对照组,CNE1/CR-1⁺ 组明显高于对照组 ($P < 0.01$)。流式细胞仪检测显示,CNE2/CR-1⁻ 组细胞凋亡率明显高于对照组,CNE1/CR-1⁺ 组细胞凋亡率明显低于对照组 ($P < 0.01$)。Western-blot 结果显示,CNE2/CR-1⁻ 组 p-Akt 蛋白表达明显低于对照组,CNE1/CR-1⁺ 组 p-Akt 蛋白表达明显高于对照组 ($P < 0.01$);而 Akt 蛋白表达未出现明显变化 ($P > 0.05$)。**结论:**CR-1 作为潜在的食管癌干细胞标记物,可能通过 PI3K/Akt 信号通路调控食管癌干细胞的增殖与凋亡。

[关键词] 食管肿瘤;干细胞标志物;增殖;凋亡**[中图分类号]** R 735.1**[文献标志码]** A**DOI:** 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.10.006

Active mechanism of the surface marker CR-1 expression on the esophageal cancer stem cell growth

SONG Shuang, XU Lin-lin

(Department of Histology and Embryology, Henan Medical College, Zhengzhou Henan 450052, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the active mechanism of the surface marker Cripto-1 (CR-1) expression on esophageal cancer stem cell growth. **Methods:** Eca109 stem cells was isolated from Eca109 cells. The total proteins of HEEC, Eca109 cells and Eca109 stem cells were extracted, and the expression level of CR-1 was detected using Western-blot. The silencing CNE2/CR1⁻ vector targeting CR-1 gene and overexpression vector CNE1/CR-1⁺ were constructed, and transfected into the Eca109 stem cells using lipofectamine. The control group was set. The transfection efficiency was examined using RT-PCR. The proliferation of Eca109 stem cells in control group, CNE2/CR-1⁻ and CNE1/CR-1⁺ were detected using MTT. the prognosis of Eca109 stem cells in each group was examined using flow cytometer. The protein expression levels of Akt and p-Akt in each group were detected using Western-blot. **Results:** The expression levels of CR-1 in Eca109 cells and Eca109 stem cells were significantly higher than that in HEEC cells ($P < 0.01$). RT-PCR results showed that the expression level of CR-1 in CNE2/CR-1⁻ group was significantly lower than that in control group, and the expression level of CR-1 in CNE1/CR-1⁺ group was significantly higher than that in control group ($P < 0.01$). MTT assay results showed that the cell proliferation in CNE2/CR-1⁻ group was significantly lower than that in control group, and which in CNE1/CR-1⁺ group was significantly higher than that in control group ($P < 0.01$). Flow cytometry results showed that the apoptosis rate of cells in CNE2/CR-1⁻ group was significantly higher than that in control group, which in CNE1/CR-1⁺ group was significantly lower than that in control group ($P < 0.01$). Western-blot results showed that the expression level of p-Akt protein in CNE2/CR-1⁻ was significantly lower than that in control group, and the expression level of p-Akt protein in CNE1/CR-1⁺ group was significantly higher than that in control group ($P < 0.01$). The expression change of Akt protein was not obvious ($P > 0.05$). **Conclusions:** The CR-1, an

[收稿日期] 2016-09-05**[作者单位]** 河南医学高等专科学校 组胚教研室,河南 郑州 450052**[作者简介]** 宋 爽(1983-),女,硕士,助教。

[16] 张小鸿,徐先祥,汪宁卿. 黄芪保护血管内皮细胞作用机制研究进展[J]. 中国中药杂志,2013,48(18):1526.

[17] WANG S, FENG Y, WANG LY, *et al.* The effect of polysaccharide from radix astragalion cells survival against oxygen glucose deprivation and phosphorylation of Akt [J]. Pharm Biotechnol, 2011,18(4):288.

[18] ZHANG Y, HU G, LI S, *et al.* Pro-angiogenic activity of astragaloside IV in HUVECs in vitro and zebrafish in vivo [J]. Mol Med Report, 2012,5(3):805.

(本文编辑 刘畅)