

人原代肺动脉内皮-平滑肌接触式共培养方法的技术改进

孙理想,武亦娴,曾晓宁,孔 辉,王 虹,解卫平*

(南京医科大学第一附属医院呼吸与危重症医学科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:改进人肺动脉内皮细胞(human pulmonary artery endothelial cells,HPAECs)-人肺动脉平滑肌细胞(human pulmonary artery smooth muscle cells,HPASMCs)接触式共培养方法,为更好模拟体内两种细胞间相互作用提供研究平台。方法:采用微孔聚碳酸酯膜为载体,将 HPAECs 和 HPASMCs 接种于微孔膜两侧,建立 HPAECs-HPASMCs 联合培养模型以模拟正常血管壁两种细胞的结构关系,通过调整细胞种植密度、培养时间、培养液体系、培养基种类、血清浓度等,倒置相差显微镜、Hoechst 染色及流式细胞术比较不同条件下接触式共培养模型中细胞贴壁、生长和凋亡的差异,免疫荧光染色观察优化共培养条件后细胞标记物的表达变化。结果:①明胶预包被 Transwell 膜可促进内皮细胞的黏附和生长;②渗透压升高增加内皮细胞凋亡;③内皮细胞培养基较 DMEM/RPMI1640 更有利于接触式共培养模型的建立;④内皮细胞生长因子为 1%、胎牛血清为 2%时两种细胞生长稳定;⑤优化共培养条件对两种细胞的自身特性无显著影响。结论:当培养体系为内皮细胞培养基、维持 1%内皮细胞生长因子及 2%胎牛血清组分条件,可建立稳定的 HPAECs-HPASMCs 接触式共培养模型,为体外模拟人肺动脉血管壁结构功能和研究两种细胞间相互作用构建了良好平台。

[关键词] 肺动脉内皮细胞;肺动脉平滑肌细胞;接触式共培养;Transwell 小室

[中图分类号] R329.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)06-674-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20170605

Improvement of a direct contact co-culture model of human pulmonary artery endothelial cells and smooth muscle cells

Sun Lixiang, Wu Yixian, Zeng Xiaoning, Kong Hui, Wang Hong, Xie Weiping*

(Department of Respiratory & Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** The current study was aimed to mimic the physiology of human pulmonary vascular using an improved contact co-culture method containing human pulmonary artery endothelial cells(HPAECs) and human pulmonary artery smooth muscle cells (HPASMCs). **Methods:** HPAECs and HPASMCs were seeded on the opposite sides of a porous Transwell membrane that allowed formation of cell-cell contacts. The adhesion of HPAECs was determined by inverted phase contrast microscope and Hoechst staining. Flow cytometry was used to analyze the apoptosis of HPAECs and HPASMCs in different media and serum concentrations. The markers of PAECs and PSMCs were detected separately by immunofluorescence for identifying the characterization of the two kinds of cells. **Results:** The data from Hoechst staining showed that gelatin-precoated Transwell membrane facilitated the adhesion of HPAECs. Moreover, the apoptosis of HPAECs was increased under the hyperosmotic pressure. Compared with DMEM and RPMI 1640 medium, the endothelial cell medium(ECM) was more suitable for the contact co-culture system. Additionally, ECM with 1% endothelial cell growth supplement(ECGs) and 2% fetal bovine serum(FBS) promoted the growth of both HPAECs and HPASMCs. Moreover, co-culture adjustment showed no significant impact on characterization of PAECs and PSMCs in the aspect of cell morphologies and specific markers. **Conclusion:** ECM maintaining 1% ECGs and 2% FBS is better for setting HPAECs-HPASMCs contact co-culture system to mimic the physiology of human pulmonary vascular and to investigate the interactions between the two kinds of cells.

[Key words] HPAECs; HPASMCs; direct contact co-culture; Transwell

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(06):674-680]

[基金项目] 国家自然科学基金(81273571);江苏高校优势学科建设工程资助项目(JX10231802)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wpxie@njmu.edu.cn

肺动脉内皮与平滑肌是构成肺动脉壁的主要细胞成分,两种细胞相互作用、沟通对话是维持血管壁自身结构稳定和正常血管生理功能的关键^[1-2]。目前认为,多种肺血管疾病的发生发展与该框架功能紊乱有关,如肺动脉高压^[3-5]、肺血管炎^[6]等。人肺动脉内皮细胞(human pulmonary artery endothelial cells, HPAECs)-人肺动脉平滑肌细胞(human pulmonary artery smooth muscle cells, HPASMCs)联合培养是研究该框架功能的理想模型,对探索肺血管疾病的发病机制及疾病进展有重要意义。

目前,HPAECs-HPASMCs 共培养模型分为直接接触培养模式、纤维膜共培养模式(微孔底膜套皿模型)、悬浮胶共培养模式、平行板流动舱系统^[7]、组织工程人工血管等。其中纤维膜共培养模式近年来比较常用,是在 HPAECs 和 HPASMCs 之间增加一层支持载体,在其两侧分别种植 HPAECs 和 HPASMCs。以 Transwell 膜为例,分为:①非接触式:将 HPASMCs 接种于 Transwell 内膜上,同时将相同密度的 HPAECs 接种于培养板底部,两种细胞间不发生细胞连接,主要通过分泌可溶性因子相互作用;②接触式:先将 Transwell 外膜朝上置于无菌培养皿内,HPAECs 种植于外膜,待细胞贴壁生长后翻转膜并插入培养板,同时内膜上种植相同密度的 HPASMCs,此时膜两侧细胞分泌的可溶性因子不仅可通过作用于细胞膜受体产生影响,还可通过建立的细胞间连接进入胞内发挥作用^[8-9]。与非接触式相比,接触式能够很好地模拟血管壁内层结构,反映两种细胞间层次关系,更好地观察细胞间相互作用,在科学研究和实际应用等领域具有良好前景。然而,目前共培养在技术与应用上还存在一些问题,包括:与体内仍存在一定差别,不能完全反映体内变化;各种细胞生长特性不同,共培养模型的建立需兼顾到两种甚至多种细胞,体系条件需长期摸索。

本研究以建立 Transwell 膜为载体的接触式共培养模型过程中所出现的问题,如培养液体积、细胞培养时间、种植密度、培养基的选择和体系成分等进行比较与改进,进一步完善接触式共培养体系。

1 材料和方法

1.1 材料

HPAECs 与 HPASMCs 均购自美国 ScienCell 公司。HPAECs 以含有 100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素、1% 内皮细胞生长因子(endothelial cell growth supplement, ECGS) 及 5% 胎牛血清(fetal

bovine serum, FBS) 的内皮细胞培养基(endothelial cell medium, ECM) 常规传代培养, HPASMCs 以含有 100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素、1% 平滑肌细胞生长因子(smooth muscle cell growth supplement, SMCGS) 及 2% FBS 的平滑肌细胞培养基(smooth muscle cell medium, SMCM) 常规传代培养。将细胞置于 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO_2 饱和湿度的培养箱(Thermoforma 公司, 美国)中,隔天换液,3~4 d 传代 1 次,所有实验均选用 4~9 代细胞。

1.2 方法

1.2.1 接触式共培养模型建立^[10-12]

明胶预包被 Transwell 膜:模型建立前,在超净台内将 Transwell 小室(Corning 公司, 美国)倒置于 100 mm 无菌培养皿(Corning 公司, 美国)中,以 0.1% 的明胶(Sigma 公司, 美国)包被 Transwell 外膜,吸去多余明胶,紫外线下照射 30 min、晾干待用,显微镜下可观察到整齐排列的结晶。

Transwell 外膜内皮细胞的种植:由于倒置的 Transwell 外膜与培养皿盖之间距离有限,在外膜上种植不同体积的细胞悬液,当细胞悬液为 180 μ L 时与皿盖开始形成接触,为此选择 160 μ L 的培养液体积,并根据培养体积调整细胞悬液的密度。选取对数生长期的第 4~9 代 HPAECs,用 0.25% 的胰蛋白酶消化后,低速离心并收集制成 6×10^8 个/L 细胞悬液,将 160 μ L 的细胞悬液均匀种植在明胶预包被的 Transwell 外膜上,同时在培养皿中加入 5 mL 无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS),以减少培养液蒸发,放入培养箱培养,根据细胞悬液的蒸发情况(图 1),控制培养时间在 3 h 以内,待细胞贴壁后,将 Transwell 膜翻转,插入培养板中,加入含 5% FBS 的 ECM 培养基培养 6 h。

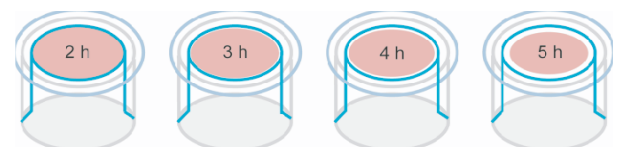


图 1 160 μ L 体积的细胞悬液在不同培养时间下的液面干燥情况

Figure 1 Evaporation of 160 μ L medium under different incubation periods

Transwell 内膜平滑肌细胞的种植:内皮细胞稳定生长后,选取对数生长期的第 4~9 代肺动脉平滑肌细胞,用相同方法制备 HPASMCs 细胞悬液,在内膜上种植相同密度的平滑肌细胞,内室使用含 2% FBS 的 SMCM 培养基,放入培养箱培养 24 h 后,内

外室更换为统一的培养基,共培养24 h。

1.2.2 流式细胞术检测细胞凋亡

两种细胞在不同培养条件下共培养24 h,用不含EDTA的0.25%胰蛋白酶消化,分别收集内、外室细胞,1 500 r/min离心5 min,弃去上清液,预冷PBS洗涤2次,将每组细胞重悬于300 μ L的凋亡结合缓冲液,加入5 μ L Annexin V和5 μ L PI工作液,轻轻混匀后室温下避光15 min,流式细胞仪(BD公司,美国)检测细胞凋亡。

1.2.3 免疫荧光染色检测细胞标记物

两种细胞在优化前后的培养条件下培养24 h,4%多聚甲醛固定30 min;弃固定液,加入0.5%的TritonX-100通透化处理20 min;PBS漂洗3次,5%BSA室温封闭30 min;去除封闭液,分别加入兔抗人VE-cadherin抗体(1:200, Abcam公司,美国)、兔抗人vWF抗体(1:100, Santa Cruz公司,美国)和兔抗人 α -SMA抗体(1:200, Abcam公司,美国)4 $^{\circ}$ C孵育过夜;PBST漂洗3次,加入驴抗兔IgG荧光二抗(1:2 000, Life公司,美国)室温避光孵育1 h;PBST

漂洗3次,Hoechst 33342(1:100)37 $^{\circ}$ C孵育30 min,PBST漂洗3次,滴加抗荧光淬灭封片液后荧光显微镜下观察、拍照。

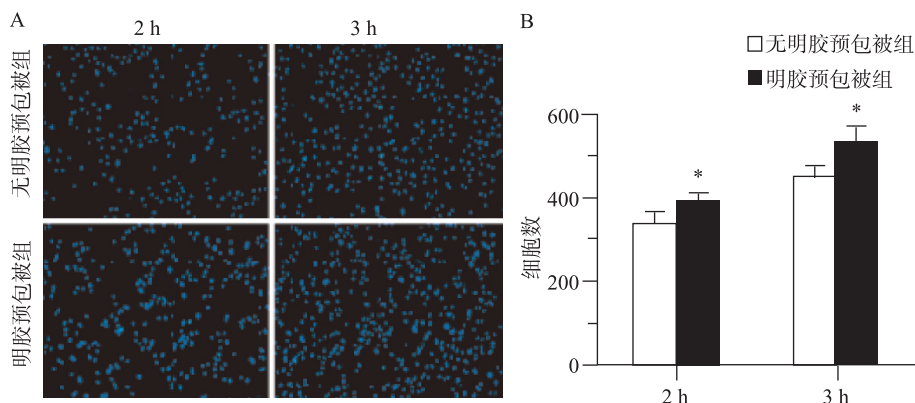
1.3 统计学方法

采用SPSS 20.0统计分析软件进行分析,计量资料数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*法, $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 明胶预包被 Transwell 膜对上皮细胞贴壁及生长的影响

由于培养皿盖与Transwell外膜之间仅可允许种植约160 μ L的细胞悬液,培养时间过长,极易出现培养液蒸发,液面干燥,导致细胞死亡,时间过短细胞还未及贴壁,培养时间控制在3.0 h内为佳,为了缩短细胞贴壁时间,模型建立前予0.1%明胶包被Transwell膜,以促进细胞贴壁。与无明胶预包被组比较,明胶预包被能促进细胞贴壁($P<0.05$,图2)。



A: Hoechst 33342 染细胞核观察细胞贴壁情况($\times 100$); B: 两组贴壁细胞数比较,与无明胶预包被组比较,* $P<0.05$ ($n=3$)。

图2 明胶预包被及培养时间对 Transwell 外膜种植上皮细胞贴壁的影响

Figure 2 Effects of gelatin-precoated Transwell membrane and culture periods on the adhesion of HPAECs

2.2 渗透压升高对内皮细胞凋亡的影响

Transwell 外膜种植细胞悬液的体积仅160 μ L,缓冲能力有限,培养过程中为调节因培养液蒸发所致的渗透压升高,在培养皿中加入5 mL无菌PBS,放入培养箱培养3 h,固定细胞,Hoechst染色,荧光显微镜下可观察到凋亡细胞的细胞核呈致密浓染,或呈碎块状致密浓染,随机拍取10个视野,计数凋亡细胞和总细胞数,计算凋亡率,发现培养皿中加入5 mL PBS组内皮细胞的凋亡较未加入PBS组明显减少(图3)。

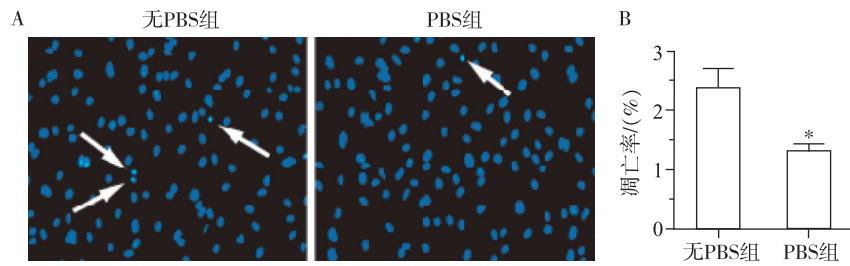
2.3 培养基的选择对共培养模型的影响

不同培养基具有不同配方,不同细胞对葡萄

糖、氨基酸等营养物质的需求也各异。共培养作为一个统一的培养体系,需要选择一种可以同时满足两种细胞生长的营养液。分别选用含5% FBS的ECM培养基(Sciencell公司,美国)、RPMI1640培养基(Gibco公司,美国)和DMEM培养基(Gibco公司,美国)共培养24 h后,流式细胞术检测各组HPAECs和HPASMCs凋亡,发现ECM培养基组HPAECs凋亡较DMEM组、RPMI1640组明显减少,而各组HPASMCs的凋亡没有明显差异(图4)。

2.4 血清浓度对两种细胞稳定生长的影响

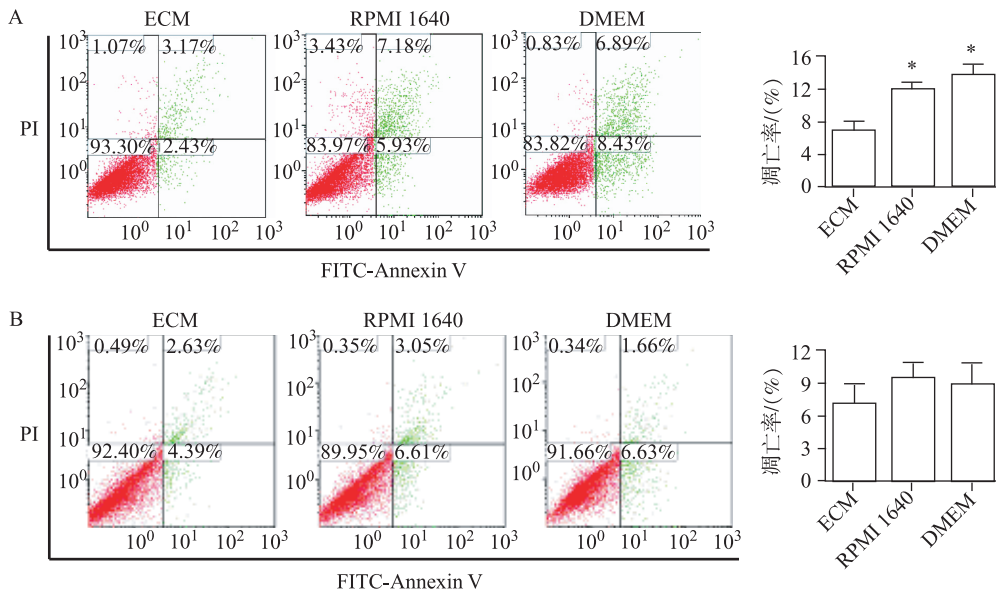
血清中含有多种蛋白质(白蛋白、球蛋白、铁蛋



A: Hoechst 33342 染细胞核观察细胞凋亡情况($\times 200$),白箭头示凋亡细胞;B: 两组细胞凋亡率比较,与无 PBS 组比较, $P < 0.05$ ($n=3$)。

图 3 渗透压对内皮细胞凋亡的影响

Figure 3 Impact of osmotic pressure on the apoptosis of ECs



A: 培养基对 HPAECs 凋亡的影响,与 ECM 组比较, $P < 0.05$;B: 培养基对 HPASMCs 凋亡的影响,各组之间差异无统计学意义, $P > 0.05$ ($n=3$)。

图 4 不同培养基对 HPAECs 和 HPASMCs 凋亡的影响

Figure 4 Influence of different media on the apoptosis of HPAECs and HPASMCs

白等)、金属离子、激素、促黏附物质、多种促细胞生长因子等,同时也存在细胞生长抑制因子或毒性因子,因此适当的血清浓度对细胞生长非常重要。由于 HPAECs 和 HPASMCs 正常培养条件下的血清浓度不同,因此需要选择一个合适的血清浓度以维持两种细胞的稳定生长。分别选用 0%、1%、2%、5% FBS 的 ECM(含 1% ECGS),共培养 24 h 后,流式细胞术检测发现在含有 1% ECGS 的条件下,血清浓度对 HPAECs 的凋亡没有显著影响,而 2% FBS 组的 HPASMCs 与 5% FBS 组比较,凋亡明显减少(图 5),因此选择含 2% FBS 和 1% ECGS 的 ECM 作为接触式共培养的培养体系。

2.5 优化共培养条件对两种细胞自身特性的影响

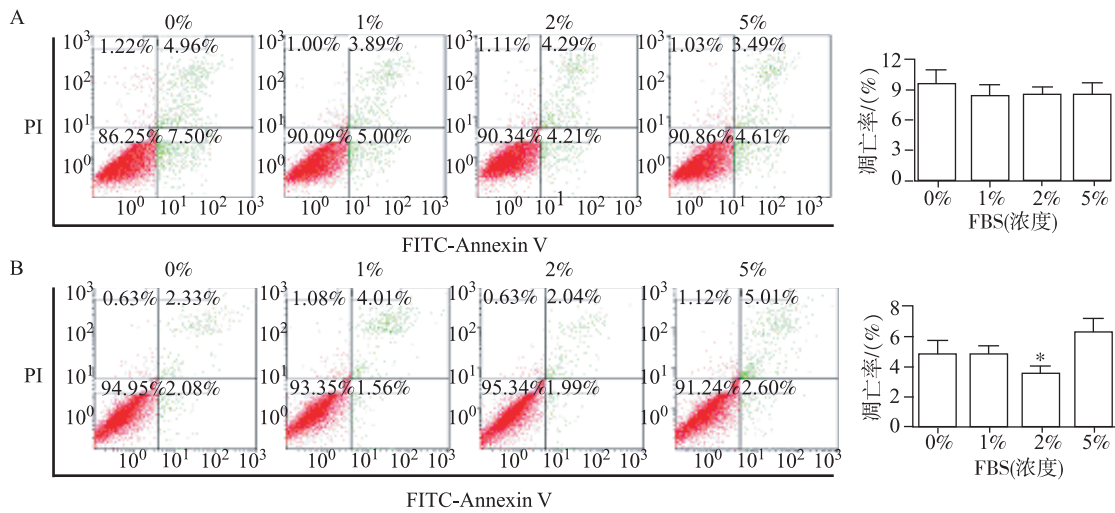
不同培养条件可能对细胞的生长和分化等产生影响。在优化共培养条件后对两种细胞优化前后的状态进行了观察,发现形态学上没有明显变化,同时

对细胞标记物进行了鉴定,结果显示其表达水平无显著差异(图 6),提示优化条件后对两种细胞自身特性无明显影响。

3 讨论

通过对共培养体系中各影响因素的系列探索,成功建立了稳定的 HPAECs-HPASMCs 接触式共培养模型,本方法改进的关键是 Transwell 外膜细胞的种植方法及共培养体系成分的调整。

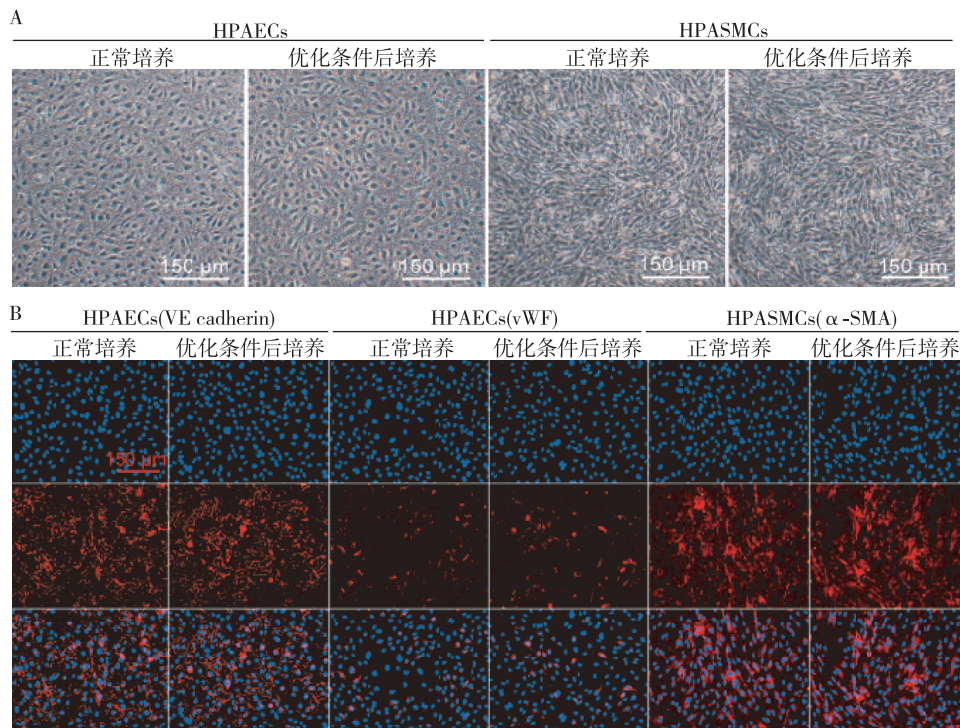
由于培养皿盖与倒置的 Transwell 外膜之间距离小、种植细胞悬液体积受限,同时考虑液体蒸发因素,故需尽量缩短细胞贴壁时间。一般来说,细胞的黏附与细胞表面的整联受体蛋白有关。细胞外基质中含有大量的胶原、血小板凝血蛋白、骨桥蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白等分子^[13],这些蛋白中均具有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(arginine-glycine-aspartic acid,



A: 血清浓度对 HPAECs 凋亡的影响; B: 血清浓度对 HPASMCs 凋亡的影响, 与 5% FBS 组比较, *P<0.05 (n=4)。

图 5 不同血清浓度 ECM 培养基 (含 1% ECGS) 对接触式共培养 HPAECs 和 HPASMCs 凋亡的影响

Figure 5 Apoptosis of HPAECs and HPASMCs in ECM (1% ECGS) containing different concentration of serum



A: HPAECs 汇合形成单层, 呈“鹅卵石”状排列; HPASMCs 为梭形, 呈现“峰-谷”现象 (×40); 优化前后两种细胞形态标记物无显著差异。 B: 免疫荧光检测细胞标记物的表达 (×200), 优化前后 HPAECs (VE-cadherin 和 vWF)、HPASMCs (α-SMA) 的标记物表达无显著差异。

图 6 优化共培养条件对 HPAECs 和 HPASMCs 自身特性的影响

Figure 6 Characteristics of HPAECs and HPASMCs in the adjusted co-culture system

RGD) 分子链段, 能够与细胞膜表面的受体蛋白结合形成整联蛋白, 介导细胞与细胞、细胞与不同底物间的相互作用, 对细胞的增殖、分化等过程产生重要影响^[14]。明胶是胶原经酸解、热解或酶解后得到的多肽链段的集合, 具有 RGD 三肽序列, 能够促进细胞的黏附与增殖^[15], 本研究表明 Transwell 膜以 0.1% 的明胶包被后明显有利于细胞的贴壁, 而未予明胶包

被的 Transwell 膜细胞贴壁较少。细胞膜是半透膜, 当细胞内、外存在渗透压差时, 水和小分子物质可以顺渗透压差自由进出细胞、改变胞内环境。过高的渗透压可使水分子扩散出胞导致细胞皱缩, DNA 和蛋白质破坏、细胞周期停滞甚至死亡^[16]。由于种植悬液体积受限, 故种植时需严密考虑因液体蒸发所带来的悬液渗透压的大幅波动。Transwell 外膜

种植内皮细胞后,在培养皿中加入适量 PBS 有助于平衡体系湿度、维持渗透压相对稳定,从而减少内皮细胞凋亡。

共培养体系建立时,还需充分考虑不同种类细胞对营养物质的需求和代谢不同。葡萄糖是活细胞的能量来源和新陈代谢的中间产物,是细胞的主要供能物质。细胞的糖代谢主要取决于对葡萄糖的摄取,葡萄糖不能自由通过细胞膜,需借助膜上的葡萄糖转运体来完成。内皮细胞由于胞膜缺乏葡萄糖转运体,因此在葡萄糖的摄取及代谢上具有自身特点。目前研究表明,高浓度葡萄糖可通过氧化应激、细胞内钙超载、线粒体功能障碍等机制引起血管内皮细胞损伤甚至凋亡^[17-19],本研究中发现 ECM、RPMI 1640、DMEM 培养基对内皮细胞凋亡产生不同的影响,可能与葡萄糖含量不同有关(ECM 培养基葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L,RPMI1640 为 11.1 mmol/L,DMEM 为 22.2 mmol/L)。此外,血清的成分十分复杂,既含有促进细胞生长的多肽类细胞因子、激素等,也含有对细胞产生毒性的某些物质,如多胺氧化酶、补体、细胞毒素等。目前普遍研究结果表明,提高血清浓度可以促进细胞增殖,但不同来源、不同种属、甚至同种细胞不同状态,对血清的反应也不尽相同。葛敏等^[20]研究发现当血清浓度由 7.5% 升高至 10% 时,淋巴管内皮细胞的增殖和成管能力骤然下降;杨雷等^[21]研究也发现当血清浓度越过 50% 临界点时,肝癌细胞死亡率由之前的 <1% (生长良好) 急剧升高至 95% 以上,显示出血清明显的毒性作用。同时需指出的是,本研究采用的是原代 HPASMCs,相对敏感,正常培养的血清浓度为 2%,此时细胞生长维持相对稳定;然而当血清浓度调整为原来的 2.5 倍(5%) 时,可能对细胞状态产生影响。本研究结果显示,正常浓度血清培养 HPASMCs 时凋亡率仅为 3.5%,而大幅提高血清浓度(原来的 2.5 倍)后,细胞凋亡率增长至 6%,凋亡率的显著性差异可能是由于基础凋亡率较低造成(虽只增加 2.5%,但存在统计学差异)。

由于两种细胞生长特性不同,共培养体系成分的调控对模型的建立尤为重要。生理条件下,内皮细胞排列于血管壁内侧,感受循环中有丝分裂原、切应力和血流动力学等变化,是多种刺激与损伤因素的“感受器”^[22-24],同时通过分泌血管活性物质调节血管功能^[25],故内皮细胞的稳定是共培养模型成功建立的基础。本研究结果显示,含 1% ECGS 和 2% FBS 组分的 ECM 共培养体系较 DMEM、RPMI1640

培养基更有利于两种细胞的稳定生长。同时,优化共培养条件前后,HPAECs 和 HPASMCs 形态学和标记物的表达均没有显著差异,两种细胞的自身特性未发生明显改变。

本研究稳定建立了以 Transwell 膜为载体的接触式共培养模型,为进一步开展相关细胞分子生物学研究、探讨肺血管疾病的发病机制提供了平台。

[参考文献]

- [1] Gao Y, Chen T, Raj JU. Endothelial and smooth muscle cell interactions in the pathobiology of pulmonary hypertension[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 54(4):451-460
- [2] Shimoda LA, Laurie SS. Vascular remodeling in pulmonary hypertension[J]. *J Mol Med*, 2013, 91(3):297-309
- [3] Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pathogenesis of pulmonary arterial hypertension [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(12):4306-4313
- [4] Sitbon O, Morrell N. Pathways in pulmonary arterial hypertension: the future is here[J]. *Eur Respir Rev*, 2012, 21(126):321-327
- [5] Wang G, Jacquet L, Karamariti E, et al. Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells[J]. *J Physiol*, 2015, 593(14):3013-3030
- [6] Kawano-Dourado L, Ab'saber AM, Capelozzi VL, et al. In situ evidence of pulmonary endothelial activation in patients with granulomatosis with polyangiitis and systemic sclerosis[J]. *Lung*, 2015, 193(3):355-359
- [7] Li M, Stenmark KR, Shandas R, et al. Effects of pathological flow on pulmonary artery endothelial production of vasoactive mediators and growth factors [J]. *J Vasc Res*, 2009, 46(6):561-571
- [8] Jacot JG, Wong JY. Endothelial injury induces vascular smooth muscle cell proliferation in highly localized regions of a direct contact co-culture system [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2008, 52(1):37-46
- [9] Gairhe S, Bauer NN, Gebb SA, et al. Serotonin passes through myoendothelial gap junctions to promote pulmonary arterial smooth muscle cell differentiation[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 303(9):767-777
- [10] Mathura RA, Russell-Puleri S, Cancel LM, et al. Hydraulic conductivity of smooth muscle Cell-Initiated arterial cocultures[J]. *Ann Biomed Eng*, 2016, 44 (5):1721-1733
- [11] Suhaeri M, Subbiah R, Kim SH, et al. Novel platform of cardiomyocyte culture and coculture via fibroblast-derived matrix-coupled aligned electrospun nanofiber [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(1):224-235

- [12] Gairhe S, Bauer NN, Gebb SA, et al. Myoendothelial gap junctional signaling induces differentiation of pulmonary arterial smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011, 301(4):L527-L535
- [13] Schaffner P, Dard MM. Structure and function of RGD peptides involved in bone biology[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2003, 60(1):119-132
- [14] Taubenberger AV, Woodruff MA, Bai H, et al. The effect of unlocking RGD-motifs in collagen I on pre-osteoblast adhesion and differentiation [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(10):2827-2835
- [15] Zhou J, Ding J, Nie B, et al. Promotion of adhesion and proliferation of endothelial progenitor cells on decellularized valves by covalent incorporation of RGD peptide and VEGF[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2016, 27(9):142
- [16] Tao GZ, Rott LS, Lowe AW, et al. Hyposmotic stress induces cell growth arrest via proteasome activation and cyclin/cyclin-dependent kinase degradation [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(22):19295-19303
- [17] Zhu M, Wen M, Sun X, et al. Propofol protects against high glucose-induced endothelial apoptosis and dysfunction in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Anesth Analg*, 2015, 120(4):781-789
- [18] Costantino S, Paneni F, Luescher TF. Pin1 inhibitor Juglone prevents diabetic vascular dysfunction[J]. *Int J Cardiol*, 2016, 203:702-707
- [19] Piconi L, Quagliaro L, Assaloni R, et al. Constant and intermittent high glucose enhances endothelial cell apoptosis through mitochondrial superoxide overproduction [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2006, 22(3):198-203
- [20] 葛敏, 蒋朝华, 戴婷婷, 等. 不同血清浓度对淋巴管内皮细胞培养的影响[J]. *组织工程与重建外科杂志*, 2013, 9(3):121-124
- [21] 杨雷, 何秋莎. 兔血清浓度对肝癌细胞系 2.2.15 细胞培养的影响[J]. *温州医学院学报*, 2000, 30(3):223
- [22] Ge D, Meng N, Su L, et al. Human vascular endothelial cells reduce sphingosylphosphorylcholine-induced smooth muscle cell contraction in co-culture system through integrin $\beta 4$ and Fyn[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(1):57-65
- [23] Shaidakov EV, Evlakhov VI. Role of the endothelium in pathogenesis of chronic postembolic pulmonary hypertension[J]. *Angiol Sosud Khir*, 2016, 22(1):22-27
- [24] Goldthorpe H, Jiang JY, Taha M, et al. Occlusive lung arterial lesions in endothelial-targeted, Fas-induced apoptosis transgenic mice[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2015, 53(5):712-718
- [25] Goldenberg NM, Kuebler WM. Endothelial cell regulation of pulmonary vascular tone, inflammation, and coagulation[J]. *Compr Physiol*, 2015, 5(2):531-559

[收稿日期] 2016-08-09

(上接第 668 页)

- serum marker in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2017, 19(1):15
- [5] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, et al. The novel Zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation[J]. *Cell*, 2002, 108(1):17-29
- [6] Salinas-Souza C, De Oliveira R, Alves MT, et al. The metastatic behavior of osteosarcoma by gene expression and cytogenetic analyses[J]. *Hum Pathol*, 2013, 44(10):2188-2198
- [7] Cox TR, Rumney RM, Schoof EM, et al. The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase[J]. *Nature*, 2015, 522 (7554):106-110
- [8] Costa R, Carneiro BA, Wainwright DA, et al. Developmental therapeutics for patients with breast cancer and central nervous system metastasis: current landscape and future perspectives[J]. *Ann Oncol*, 2016, 28(1):44-56
- [9] Gao Y, Xie J, Chen H, et al. Nanotechnology-based intelligent drug design for cancer metastasis treatment[J]. *Biotechnol Adv*, 2014, 32(4):761-777
- [10] 龙芷源, 王庭槐. Ezrin 蛋白在乳腺癌细胞迁移侵袭中的作用的研究进展[J]. *生理科学进展*, 2016, 47(1):21-26
- [11] Logothetis CJ, Lin SH. Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone[J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(1):21-28
- [12] Chatani M, Morimoto H, Takeyama K, et al. Acute transcriptional up-regulation specific to osteoblasts/osteoclasts in medaka fish immediately after exposure to microgravity [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:39545
- [13] Wang Y, He T, Liu J, et al. Synergistic effects of overexpression of BMP-2 and TGF- $\beta 3$ on osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(6):5514-5520
- [14] Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges[J]. *Nat Med*, 2006, 12(8):895-904
- [15] Dai QS, Zhou HY, Wu ZH, et al. Osterix transcriptional factor is involved in the metastasis of human breast cancers[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(3):1870-1874

[收稿日期] 2017-02-12