

核型 VASH2 促进人胚胎组织细胞的增殖研究

葛倩倩,涂敏,高文涛,苗毅*

(南京医科大学第一附属医院胰腺中心,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究核型 VASH2 在人胚胎组织增殖中的功能。方法:免疫荧光分析 VASH2 蛋白在人胚肾细胞 293T 的表达水平和细胞中的表达部位。利用免疫组化法分析 VASH2 在多种胚胎组织中的表达水平。MTT 法检测核型 VASH2 对 293T 细胞活性的影响,流式细胞仪检测细胞周期。结果:通过免疫荧光试验发现 VASH2 蛋白分胞浆型及胞核型 2 型。胞核型 VASH2 除了在已经发育完善的心脏组织中阴性表达或弱表达,在其他胚胎组织中显著高表达。核型 VASH2 的表达与胚胎细胞核分裂指数明显正相关 ($r = 0.826, P < 0.01$)。转染核型 VASH2 可促进 293T 细胞的生长;转染核型 VASH2 细胞的 G₂+S 期较空白组及干扰组增加,差异有显著性 ($P < 0.05$)。结论:VASH2 分为胞浆型及核型,核型 VASH2 具有促进胚胎细胞增殖的作用。

[关键词] 核型 VASH2;胚胎组织;增殖

[中图分类号] R329.28

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)05-600-07

doi:10.7655/NYDXBNS20150502

Distribution characteristics of nuclear VASH2 expression in human fetal tissues

Ge Qianqian, Tu Min, Gao Wentao, Miao Yi*

(Pancreas Center, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] Objective: Vasohibin (VASH), one of new gene families, is believed to be involved in cancer-promoting. However, the exact function is still unknown. To analyze the expression level of nuclear VASH2 protein in human fetal tissues from different gestational ages. **Methods:** Immunofluorescent method (IF) was used to detect the expression of VASH2 protein in 293T and intracellular localization. Nuclear VASH2 polyclonal antibody was used to analyze the expression level of nuclear VASH2 protein in human fetal tissues from different gestational ages, and the change of embryonic cell mitotic counts and the expression of nuclear VASH2 was assessed by using immunohistochemistry (IHC). The cell growth was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT). Flow Cytometry (FCM) was used to determine the cell cycles. **Results:** We found that the protein expression of VASH2 (with 355 amino acid residues) was located in the cytoplasm while VASH2 (with 311 amino acid residues) was located in the nucleus. Nuclear VASH2 was generally lower in fully-developed embryos and markedly expression during undergoing several maturational processes. There is a significant positive correlation between nuclear VASH2 and mitotic counts ($r = 0.826, P < 0.01$). Nuclear VASH2 promoted proliferation of 293T cells. FCM analysis showed increasing proportion of S and G₂ / M phase in nuclear VASH2 transfection. **Conclusion:** This is the first study to report differences in the intracellular localization of VASH2 protein. Nuclear VASH2 protein found in a variety of tissues is not a tissue-specific protein, and may play important roles in histogenesis and organogenesis.

[Key words] nuclear VASH2; human fetal tissues; proliferation

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(05):600-606]

Vasohibin (VASH) 是近年来发现的一族新基因, 该基因家族目前由 VASH1 及 VASH2 共同组

成^[1], 分别于 2004 和 2006 年先后被鉴定^[2-5]。VASH1 与 VASH2 在孕中期的人胚胎组织内皮细胞中广泛表达, 此后两者的表达量降低, 在孕后期及新生儿期两者在内皮细胞中表达水平保持一定水平^[2,5]。VASH1 抑制血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR-2) 表达, 引起内皮

[基金项目] 国家自然科学基金(81272239, 81170336, 81172267, 81372657)

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

细胞凋亡,从而抑制血管生成^[2-4]。研究发现,VASH2 具有与 VASH1 截然相反的功能:对血管生成起促进作用^[6]。最近,VASH2 还被发现在多种实体肿瘤中具有促进肿瘤血管生成的作用^[7-9]。因此,VASH 家族被认为在胚胎发育及肿瘤的发生、发展过程中起作用,作用方式可能是调控血管生成。

本课题组分析 VASH2 蛋白在细胞内定位时发现编码 355 个氨基酸的 VASH2 蛋白定位于胞浆中,而编码 311 个氨基酸的 VASH2 蛋白定位于胞核中,所以根据细胞内定位将 VASH2 分为胞浆型及胞核型。但胞浆型及胞核型 VASH2 究竟有怎样的生理和病理学意义,目前还不清楚。已有研究主要集中在胞浆型 VASH2,而胞核型 VASH2 蛋白在人正常胚胎组织中表达分布的研究尚未见报道^[10-11]。本研究首次分析了胞核型 VASH2 在不同胎龄人胚胎组织中的表达。

首先自制适用于免疫组化的 VASH2 特异性抗体,通过酶联免疫吸附试验、免疫印迹和免疫荧光试验验证了抗体的效价和特异性,证明用该方法可制备具有较高特异性和灵敏度的多克隆抗体^[12]。现应用免疫组化分析胞核型 VASH2 在不同胎龄人胚胎组织中的表达,形态计量技术检测人胚胎组织细胞的胞核型 VASH2 和核分裂相计数(mitotic count,MC),分析二者的相关性为进一步的功能研究提供新的思路。据此,本课题组对转染胞核型 VASH2 的人胚胎细胞的活性进行 MTT 及细胞周期检测,以深入探讨 VASH2 胚胎发育中促增殖的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

293T 细胞、慢病毒载体 Lv-CMV-EGFP 及辅助包装元件载体 pVSV-G 和 delta8.91 均系本实验室保存。高糖 DMEM、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, Wisent 公司,加拿大);脂质体 Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司,美国);Flag 抗体(Abmart 公司,上海);ECL 显影液及 PVDF 膜(碧云天生物技术有限公司,上海)。核蛋白提取试剂盒(Millipore 公司,美国)。胎儿多器官正常组织芯片(BE01014a, Biomax 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建与细胞转染

编码 VASH2 的 311 个氨基酸的 C 端带 Flag 标签的质粒(Origene 公司,美国)。本实验室前期已成功构建编码 VASH2 的 355 个氨基酸 C 端带 Flag 标签

的质粒^[12-13],再将编码 355 个氨基酸的 VASH2 cDNA 及编码 311 个氨基酸 VASH2 cDNA 基因克隆到 Lv-CMV-EGFP 载体中^[12-13]。用 293T 细胞铺 6 孔板,使 24 h 后汇合率达到 40%,质粒共 2 μ g 加入到 250 μ L DMEM 培养基中,同时取 10 μ L 脂质体 Lipofectamine 2000 加入到 250 μ L DMEM 培养基中,室温孵育 5 min 后混合,再室温孵育 20 min,均匀滴入 293T 细胞中。6 h 后更换培养液,36~48 h 观察感染后的 293T 有绿色荧光表达,获得瞬时转染高表达 VASH2(编码 311 个氨基酸/355 个氨基酸)的 293T 细胞。

1.2.2 免疫荧光检测

将细胞用 0.01 mol/L PBS 洗涤 1 次,用 4% 的多聚甲醛室温固定 15 min。0.1% TritonX-100 透化 10 min;PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。去除山羊血清封闭液之后,直接加入 5% BSA 稀释的 Flag 一抗,4 $^{\circ}$ C 杂交过夜。PBS 漂洗 5 次,每次 5 min;加入 5% BSA 稀释的二抗,室温避光杂交 1 h;PBS 漂洗 5 次,每次 5 min 抗淬灭封片剂封片,Olympus 激光共聚焦荧光显微镜上观察。

1.2.3 胚胎组织蛋白芯片及免疫组织检测核型 VASH2

胎儿多器官正常组织芯片包含 26 个器官/78 点,以多聚甲醛固定,石蜡包埋处理,制成 5 μ m 厚的切片。胚胎组织免疫组化试验由南京医科大学第一附属医院病理科完成。具体步骤为:石蜡切片常规二甲苯、梯度酒精脱蜡至水;0.3% 甲醇-H₂O₂ 封闭 20 min,10% 正常山羊血清封闭 30 min 后吸去血清,滴加一抗(VASH2,1:50~1:1 000 稀释)4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜;滴加二抗(生物素标记羊抗鼠 IgG,1:1 000 稀释),37 $^{\circ}$ C 温育 30 min,复合物 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min;新鲜配制的 DAB 显色液避光显色,显微镜下控制显色程度,中止显色,苏木素衬染核;乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,37 $^{\circ}$ C 干燥 48 h。Nikon 显微镜观察并照像。胞核型 VASH2 阳性细胞胞核呈棕黄色颗粒。胞核型 VASH2 标记指数:400 倍高倍镜下,按每个组织芯片中随机 10 个不重复视野中 1 000 个细胞的显色强度确定为阴性、弱阳性、阳性及强阳性(阴性为不着色和着淡蓝色,弱阳性为浅黄色,阳性为棕黄色,强阳性为棕褐色)。核分裂相计数:在 400 倍高倍镜下观察每例胚胎细胞染色切片,选择核分裂相最多的区域,连续计数 10 个不重复相邻视野中核分裂数,为每例的 MC。

1.2.4 人胚肾细胞 293T 核型 VASH2 过表达及抑制稳定转染细胞株的制备

核型 VASH2 慢病毒过表达载体和干扰质粒均为本实验室前期制作^[7,13]。用 293T 细胞铺 6 孔板, 24 h 后汇合率达到 70%。3 个质粒共 4 μg (慢病毒过表达或干扰质粒:pVSV-G:delta8.91=4:3:2) 加入到 250 μL DMEM 培养基中,同时取 10 μL 脂质体 Lipofectamine 2000 加入到 250 μL DMEM 培养基中,室温孵育 5 min 后混合,再室温孵育 20 min,均匀滴入 293T 细胞中。6 h 后更换培养液,48 h 后收取上清病毒液,用 0.45 μm PVDF 微孔滤膜过滤后(加入 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的聚凝胺)感染人胚肾细胞 293T, 48~72 h 收取细胞进行流式分选(感染后的 293T 带绿色荧光),获得稳定高表达或干扰的核型 VASH2 的细胞株。利用核蛋白提取试剂盒(Millipore 公司,美国)分离胞浆及胞核蛋白,Western blot 检测提取细胞胞核蛋白,4:1 体积与 5 \times SDS 上样缓冲液混合,100 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min。进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳。PVDF 膜用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭,2 h 后弃封闭液,加入 VASH2 多克隆小鼠抗体(1:1 500),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。洗膜 3 \times 10 min,加入抗鼠二抗(1:1 000),孵育后洗膜、显影,并以 H3 组蛋白作对照。

1.2.5 MTT 法检测细胞增殖

分别取对数生长期的核型 VASH2 过表达组(293T-VASH2)及对照组(293T-EGFP)与抑制组(293T-shVASH2)及其对照(293-shcont),接种于 96 孔板,每孔 2×10^3 个细胞,每组细胞取 3 个复孔,分别培养 1、2、3、4 和 5 d 后进行 MTT 检测。具体方法:每

孔加 20 μL 的 5 mg/mL MTT 溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 min,离心 10 min(1 500 r/min),弃液,每孔加二甲基亚砜 200 μL ,震荡 5 min,酶标仪 550 nm 波长测光密度值。

1.2.6 细胞周期检测

收集对数生长期的 3 组细胞,用 PBS 洗涤,胰酶消化后离心 3 min(1 500 r/min),弃上清液,70% 乙醇固定,-20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,PBS 洗涤 2 次,用含有 0.2% Triton X-100,10 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠(EDTA),100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 碘化丙啶(PI)的 500 μL PBS 重悬细胞,室温下静置 30 min,之后用流式细胞仪检测细胞周期。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 软件进行相关统计分析,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两两均数的比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差(One-Way ANOVA)。胞核型 VASH2 和 MC 的关系用 Spearman 等级相关进行分析。 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

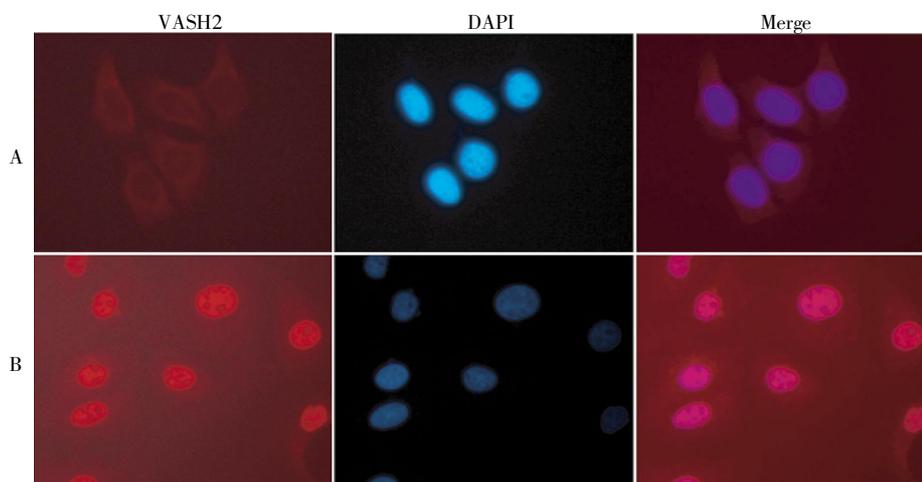
2 结果

2.1 细胞免疫荧光法检测 VASH2 蛋白细胞内定位

取 293T、293T-VASH2 (355 个氨基酸/311 个氨基酸) 瞬时表达细胞进行免疫荧光,检测其在细胞内的定位情况,荧光显微镜下拍照分析发现,VASH2 蛋白(C 端带 Flag 标签的 355 个氨基酸)在细胞质定位明显(图 1A),VASH2 蛋白(C 端带 Flag 标签的 311 个氨基酸)在细胞核定位明显(图 1B)。

2.2 VASH2 蛋白在不同胚胎组织中的表达水平

利用免疫组化研究 VASH2 在不同胎龄人胚胎



A: 免疫荧光分析抗带 Flag 抗体的 293T 细胞(瞬时转染 C 端带有 Flag 标签的 355 个氨基酸的 VASH2 蛋白, $\times 400$);B: 免疫荧光分析抗带 Flag 抗体的 293T 细胞(瞬时转染 C 端带有 Flag 标签的 311 个氨基酸的 VASH2 蛋白, $\times 400$)。

图 1 VASH2 蛋白细胞内定位

Figure 1 Intracellular localization of the VASH2 protein

组织中的表达水平。结果显示,人胚胎组织细胞核存在 VASH2 蛋白阳性或强阳性反应,胞核型 VASH2 蛋白阳性反应可见于 16 周胎龄胚胎组织小肠及输卵管,20 周胎龄胚胎组织胰腺、胆囊、肝脏、直肠、胃、肾上腺、脾脏、胸腺、皮肤、骨、脑、肺、骨骼肌、肾脏、眼、脐带及胎盘,28 周胎龄胚胎组织结肠及卵巢(表 1,图 2)。而在 20 周成熟心脏组织中未见染色,胞核型 VASH2 蛋白表达为阴性(图 2A,B)。在阳性表达的胚胎组织中,不同胎龄组织中胞核型 VASH2 蛋白阳性染色强度并无明显差异(表 1)。胞核型 VASH2 表达与组织学分型无相关关系,而与胚胎发育完善成熟有一定关系。为此,对不同胎龄人胚胎组织细胞分裂指数以及组织中胞核型 VASH2 蛋白的表达进行了检测,以深入探讨胞核型 VASH2 的功能。26 例人不同胚胎组织细胞阳

性胞核型 VASH2 和富于核分裂相的细胞 MC2 指标差异均具有显著性(表 2)。胞核型 VASH2 表达与 MC 之间呈正相关($r = 0.826, P < 0.01$,图 3)。

2.3 人胚肾细胞 293T 核型 VASH2 过表达/抑制细胞株的鉴定

293T 细胞经 3 质粒共转染后产生慢病毒过表达颗粒,24 h 后在倒置显微镜下观察,可见转染成功的细胞带有绿色荧光(重组慢病毒质粒携带绿色荧光蛋白基因),转染率>70%。经检测得出病毒颗粒滴度为 5×10^7 TU/mL。慢病毒感染 293T 后,细胞形态及生长状态无明显变化,感染效率 40%左右。过表达株经流式分选后,继续培养细胞数代,其阳性率可达 95%以上;抑制株用 2 μ g/mL 嘌呤霉素作用 2 周,继续培养以获得较高阳性率。采用 Western blot 分别检测干扰(293T-shVASH2)及过表达(293T-

表 1 人胚胎组织胞核型 VASH2 蛋白显色强度情况

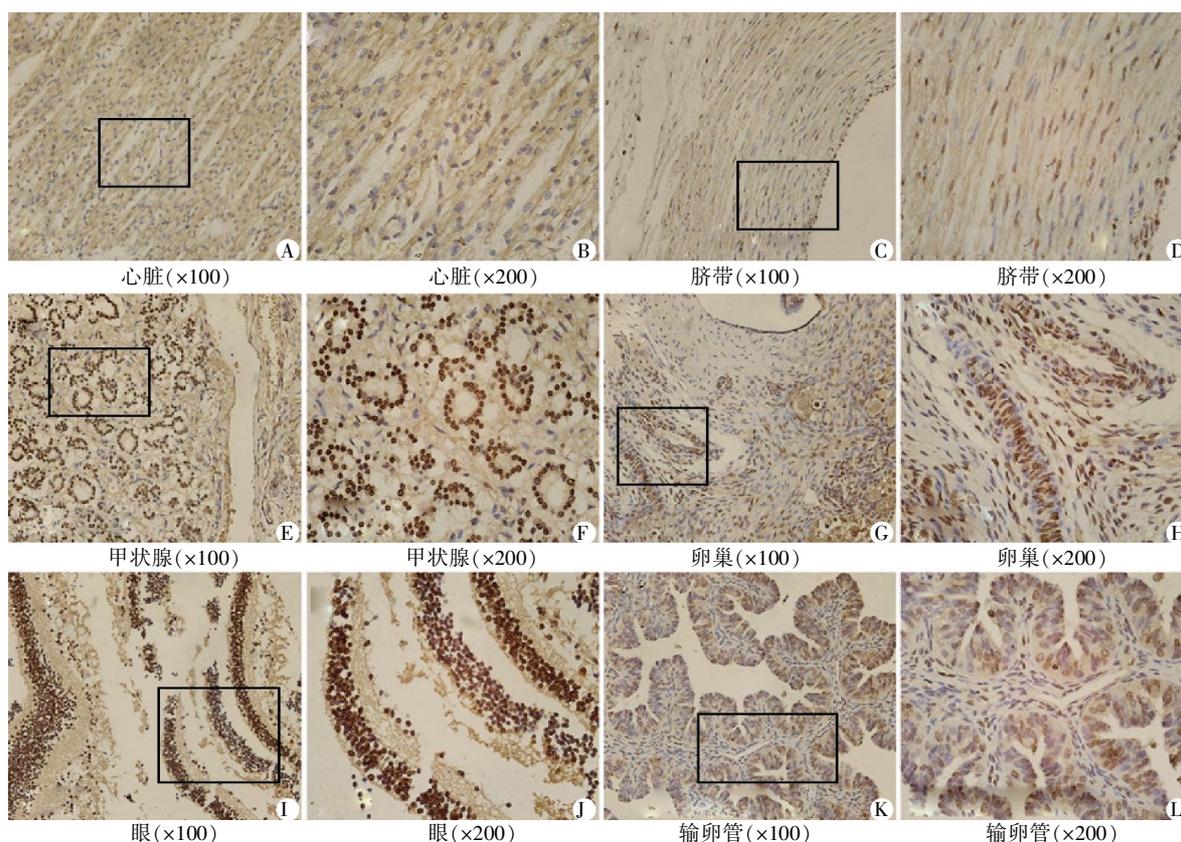
Table 1 Expression of nuclear VASH2 protein in human fetal tissues from different gestational ages

人胚胎组织表达	胎龄	胞核型 VASH2 蛋白显色强度				
		点数	阴性	弱阳性	阳性	强阳性
小肠	16 周	3	0	1	2	0
输卵管	16 周	3	0	0	0	3
胰腺	20 周	3	0	0	0	3
心脏	20 周	3	3	0	0	0
胆囊	20 周	3	0	0	0	3
肝脏	20 周	3	0	0	2	1
直肠	20 周	3	0	0	0	3
胃	20 周	3	0	0	0	3
肾上腺	20 周	3	0	0	0	3
脾脏	20 周	3	0	0	0	3
胸腺	20 周	3	0	0	0	3
皮肤	20 周	3	0	0	0	3
骨	20 周	3	0	0	0	3
脑	20 周	3	0	1	2	0
肺	20 周	3	0	0	2	1
骨骼肌	20 周	3	1	2	0	0
肾脏	20 周	3	0	0	0	3
眼	20 周	3	0	0	0	3
脐带	20 周	3	0	0	2	0
胎盘	20 周	3	0	0	0	3
膀胱	24 周	3	0	3	0	0
甲状腺	24 周	3	0	0	0	3
附睾	24 周	3	0	0	0	3
子宫	28 周	3	0	0	0	3
结肠	28 周	3	0	2	1	0
卵巢	28 周	3	0	0	0	3

表 2 细胞核分裂指数计数和人胚胎组织胞核型 VASH2 标记指数

Table 2 the change of embryonic cell mitotic counts and the expression of nuclear VASH2 ($\bar{x} \pm s$)

人胚胎组织	细胞核分裂指数(%)	胞核型 VASH2 标记指数(%)
小肠	43.70 \pm 3.25	50.97 \pm 4.50
输卵管	21.09 \pm 5.04	40.34 \pm 5.64
胰腺	83.20 \pm 4.80	90.70 \pm 3.67
心脏	5.46 \pm 3.47	10.00 \pm 4.35
胆囊	80.30 \pm 7.00	65.35 \pm 2.40
肝脏	78.60 \pm 3.00	87.40 \pm 1.00
直肠	79.80 \pm 5.60	90.00 \pm 2.30
胃	67.70 \pm 2.45	74.20 \pm 8.70
肾上腺	34.89 \pm 4.76	45.78 \pm 5.45
脾脏	23.56 \pm 6.54	54.87 \pm 3.44
胸腺	67.94 \pm 5.82	89.76 \pm 8.09
皮肤	78.90 \pm 10.90	97.66 \pm 0.93
骨	91.10 \pm 1.00	95.60 \pm 3.12
脑	92.50 \pm 2.90	98.90 \pm 1.40
肺	78.50 \pm 2.57	86.40 \pm 3.54
骨骼肌	37.80 \pm 5.34	46.50 \pm 6.00
肾脏	76.95 \pm 8.77	89.50 \pm 3.78
眼	89.78 \pm 7.88	99.90 \pm 0.89
脐带	23.57 \pm 6.89	40.80 \pm 7.96
胎盘	35.70 \pm 3.32	67.44 \pm 3.20
膀胱	73.10 \pm 4.10	90.10 \pm 8.30
甲状腺	56.21 \pm 7.43	65.75 \pm 9.98
附睾	67.90 \pm 5.70	73.23 \pm 4.53
子宫	43.79 \pm 2.45	68.70 \pm 5.50
结肠	18.76 \pm 6.00	25.90 \pm 3.00
卵巢	33.54 \pm 6.57	53.18 \pm 3.21



A,B:20周的心脏组织;C,D:20周的脐带组织;E,F:24周的甲状腺组织;G,H:28周的卵巢组织;I,J:20周的眼组织;K,L:16周的输卵管组织。

图2 胞核型 VASH2 在不同胎龄人胚胎多种组织中的分布

Figure 2 Distribution of nuclear VASH2 protein in various human fetal tissues from different gestational age

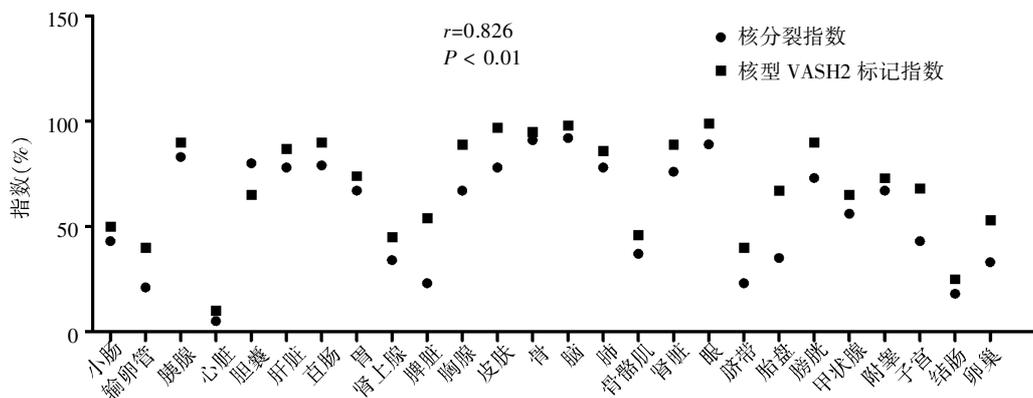


图3 人胚胎组织胞核型 VASH2 标记指数和核分裂相计数相关性分析

Figure 3 Correlation analysis between nuclear VASH2 and mitotic counts

VASH2) VASH2 的效果,发现过表达组表达量显著高于对照组,而干扰组则明显低于对照组(图 4A)。

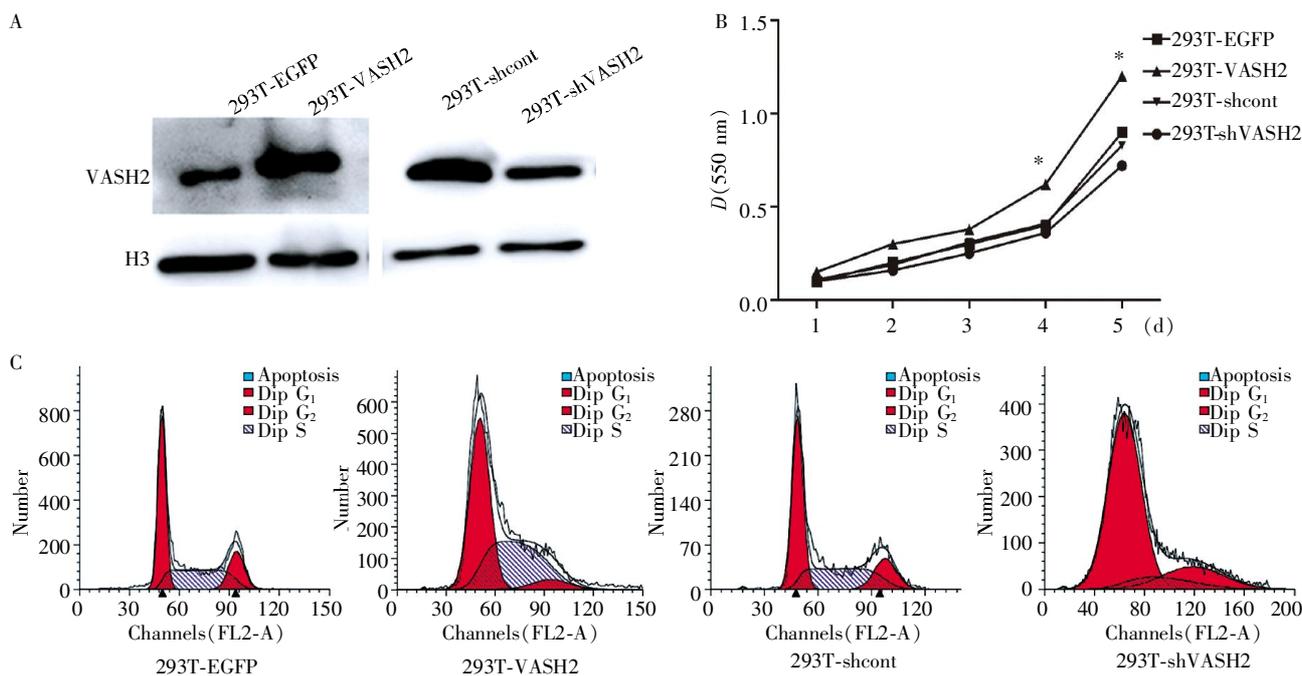
2.4 293T 增殖能力及细胞周期的检测

经 MTT 法检测发现过表达组细胞增长速度明显快于对照组及干扰组($P < 0.05$),干扰组细胞增长速度低于对照组两组之间有明显差异($P < 0.05$,图 4B)。通过流式细胞分析技术检测各组细胞所处的细胞周期比例,发现过表达组细胞中处于 G_2+S 期的细胞比例多

于对照组及干扰组,并且差异有统计学意义($P < 0.05$,图 4C)。干扰组细胞中处于 G_2+S 期的细胞比例低于空白组,两组之间有明显差异($P < 0.05$,图 4C)。

3 讨论

既往, VASH2 被认为是仅存在于胞浆中的蛋白,本课题组通过标签 VASH2 蛋白的免疫荧光试验发现 VASH2(编码 355 个氨基酸)定位于细胞浆而



A: Western blot 检测 VASH2 的蛋白表达; B: 各组 293T 的生长曲线(与干扰组比较, * $P < 0.05$); C: 各组 293T 细胞周期检测。

图 4 293T 细胞株鉴定及增殖能力检测

Figure 4 Identification of stably transfected 293T and effects of VASH2 on the proliferation of 293T cells

VASH2(编码 311 个氨基酸)定位于细胞核中,因此将 VASH2 蛋白首次分为胞浆型 VASH2 和胞核型 VASH2 两型。最近,本课题组又成功开发了适用于免疫组化的 VASH2 抗体,可以识别胞核型 VASH2 蛋白^[12]。

2006 年 Takumi 等^[5]学者通过免疫组化分析揭示 VASH2 在妊娠中期胚胎脏器的内皮细胞中广泛表达。这个时间点后 VASH2 的表达变得微弱,但是在后妊娠期至新生儿期的动脉内皮细胞中 VASH2 持续表达^[5]。但是该研究使用的抗体仅能识别胞浆型 VASH2 蛋白。本实验结果显示,胞核型 VASH2 蛋白在 20 周胎龄已发育成熟,胎心中表达阴性或弱阳性。心脏是脊椎动物最先形成的功能器官^[14-15]。而在其他尚未发育完善的人胚胎组织,如 16 周胎龄胚胎组织小肠及输卵管,20 周胎龄胚胎组织胰腺、胆囊、肝脏、直肠、胃、肾上腺、脾脏、胸腺、皮肤、骨、脑、肺、骨骼肌、肾脏、眼、脐带及胎盘,28 周胎龄胚胎组织结肠及卵巢,胞核型 VASH2 蛋白则显著高表达,说明胞核型 VASH2 可能参与了人胚胎组织的发育和成熟。这一结果将胞核型 VASH2 的功能与细胞增殖相联系。

核分裂指数反映细胞的生长指数,可以直接识别细胞周期不同阶段的唯一细胞形态,核分裂指数能证明那些正在分裂的细胞核^[16]。因此,在本实验

中计算各例胚胎细胞核分裂指数以研究分析人胚胎细胞胞核型 VASH2 的增殖作用。对 20 例人胚胎标本核分裂相计数研究结果表明,核分裂相计数在胞浆型 VASH2 阴性表达组与胞核型 VASH2 阳性表达组存在非常显著的差异。胞核型 VASH2 阴性表达胚胎细胞无核分裂相,而胞核型 VASH2 表达阳性胚胎细胞核分裂相明显。对核分裂相计数与人胚胎细胞胞核型 VASH2 阳性标记指数之间的关系做分析,发现两者之间存在正相关性($r = 0.826, P < 0.01$)。基于以上结果,胞核型 VASH2 对胚胎组织的增殖行为有重要影响。分析 20 例人胚胎标本,发现表达量越高,核分裂相计数越高。这一结果说明胞核型 VASH2 在人胚胎组织中可能有促增殖作用。

为了进一步证实胞核型 VASH2 对人胚胎组织的促增殖作用,采用人胚胎细胞 293T 细胞株(人肾细胞),构建了过表达及干扰 VASH2 的稳转细胞株。通过 MTT 法绘制转染后胞核型 VASH2 及干扰组细胞生长曲线,提示与对照组比较,胞核型 VASH2 对人胚胎细胞的增殖有一定促进作用。但胞核型 VASH2 对胚胎细胞增殖作用机制尚不清楚。流式细胞仪检测细胞周期显示,与对照组相比,稳定表达胞核型 VASH2 进入 S 期和 G₂/M 期显著增多,提示胞核型 VASH2 可能通过某种机制刺激细胞 DNA 合成,推动细胞进入 S 期,促进细胞增

殖。该结果说明核型 VASH2 具有促进胚胎细胞增殖的作用。

VASH2 蛋白具有不同的细胞定位,355 个氨基酸序列的 VASH2 蛋白定位于细胞浆,而 311 个氨基酸序列定位于细胞核。后续实验需要扩大组织样本量,进一步明确核型 VASH2 在胚胎组织中的功能,还可以采用基因敲除动物模型进行动物水平的基因功能验证。而核型 VASH2 的作用机制则有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Sato Y, Sonoda H. The vasohibin family: a negative regulatory system of angiogenesis genetically programmed in endothelial cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(1): 37-41
- [2] Watanabe K, Hasegawa Y, Yamashita H, et al. Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis[J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(7): 898-907
- [3] Yoshinaga K, Ito K, Moriya T, et al. Roles of intrinsic angiogenesis inhibitor, vasohibin, in cervical carcinomas [J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(2): 446-451
- [4] Tamaki K, Moriya T, Sato Y, et al. Vasohibin-1 in human breast carcinoma: a potential negative feedback regulator of angiogenesis[J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(1): 88-94
- [5] Shibuya T, Watanabe K, Yamashita H, et al. Isolation and characterization of vasohibin-2 as a homologue of VEGF-inducible endothelium-derived angiogenesis inhibitor vasohibin [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(5): 1051-1057
- [6] Kimura H, Miyashita H, Suzuki Y, et al. Distinctive localization and opposed roles of vasohibin-1 and vasohibin-2 in the regulation of angiogenesis [J]. *Blood*, 2009, 113(19): 4810-4818
- [7] Xue X, Gao W, Sun B, et al. Vasohibin 2 is transcriptionally activated and promotes angiogenesis in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncogene*, 2013, 32(13): 1724-1734
- [8] Takahashi Y, Koyanagi T, Suzuki Y, et al. Vasohibin-2 expressed in human serous ovarian adenocarcinoma accelerates tumor growth by promoting angiogenesis [J]. *Mol Cancer Res*, 2012, 10(9): 1135-1146
- [9] Koyanagi T, Saga Y, Takahashi Y, et al. Downregulation of vasohibin-2, a novel angiogenesis regulator, suppresses tumor growth by inhibiting angiogenesis in endometrial cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(3): 1058-1062
- [10] Tu M, Liu X, Han B, et al. Vasohibin2 promotes proliferation in human breast cancer cells via upregulation of fibroblast growth factor2 and growth/differentiation factor15 expression [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(2): 663-669
- [11] Li Z, Tu M, Han B, et al. Vasohibin2 decreases the cisplatin sensitivity of hepatocarcinoma cell line by downregulating p53 [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e90358
- [12] Sun J, Tu M, Han B, et al. Generation and characterization of rabbit polyclonal antibodies against Vasohibin-2 for determination of its intracellular localization [J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(1): 255-261
- [13] 孙杰, 涂敏, 卫积书, 等. Vasohibin-2 慢病毒过表达载体的构建及相关增殖功能研究 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2013, 33(6): 732-737
- [14] Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, et al. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease [J]. *Cell*, 2001, 106(6): 709-721
- [15] Song YL, Tang M, Liu CJ, et al. Different signal molecules involved in the muscarinic modulation of pacemaker current I (f) on the heart of mouse embryo in different developmental stages [J]. *Sheng Li Xue Bao*, 2005, 57(1): 33-38
- [16] 张天泽, 徐光炜. 肿瘤学 [M]. 天津: 科学技术出版社, 1996: 375-417

[收稿日期] 2014-11-30