

• 论 著 •

缺氧诱导的间充质干细胞外泌体对胃癌细胞生长和转移的影响及机制*

杜 雄¹, 李延新¹, 段小瑞¹, 康 婷^{2△}

延安大学附属医院:1. 病理科;2. 肿瘤科, 陕西延安 716000

摘 要:目的 探讨缺氧条件下间充质干细胞外泌体对胃癌细胞生长和转移的影响及机制。方法 在正常和缺氧条件下培养人骨髓间充质干细胞, 差速离心法收集细胞培养上清液中的外泌体, 透射电镜和蛋白质印迹法(Western blot)鉴定外泌体, 将胃癌细胞 MGC-803 分别与磷酸盐缓冲液(PBS)、正常间充质干细胞外泌体(Nom-exo)、缺氧诱导的间充质干细胞外泌体(Hypo-exo)孵育, CCK8 检测细胞增殖能力、流式细胞术检测细胞凋亡、Transwell 小室法检测细胞迁移和侵袭能力, Western blot 检测 CD44、c-myc、G1/S-特异性周期蛋白-D1(Cyclin D1)、磷酸化的 β -连环素(p- β -catenin)、 β -连环素(β -catenin)表达水平。结果 相比于 PBS 组, Nom-exo 和 Hypo-exo 组 MGC-803 细胞增殖能力、迁移和侵袭能力显著增加($P < 0.05$)、凋亡水平显著下降($P < 0.05$), Wnt/ β -catenin 信号通路显著激活($P < 0.05$); 相比于 Nom-exo 组, Hypo-exo 组 MGC-803 细胞增殖能力、迁移和侵袭能力显著增加($P < 0.05$)、凋亡水平显著下降($P < 0.05$), Wnt/ β -catenin 信号通路亦显著激活($P < 0.05$)。结论 缺氧条件下, 间充质干细胞外泌体能够显著促进胃癌细胞的生长和转移, 其机制为促进 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活。

关键词: 缺氧; 间充质干细胞; 外泌体; 胃癌; 生长; 转移

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.22.008 中图分类号: R735.2

文章编号: 1673-4130(2021)22-2724-06

文献标志码: A

Effect and mechanism of hypoxia induced mesenchymal stem cell exosomes in regulating the growth and metastasis of gastric cancer cells*

DU Xiong¹, LI Yanxin¹, DUAN Xiaorui¹, KANG Ting^{2△}

1. Department of Pathology; 2. Department of Oncology, Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an, Shaanxi 716000, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of mesenchymal stem cell exosomes on the growth and metastasis of gastric cancer cells under hypoxic conditions. **Methods** Human bone marrow mesenchymal stem cells were cultured under normal and hypoxic conditions. The exosomes in the cell culture supernatant were collected by differential centrifugation. Exosomes were identified by transmission electron microscopy and Western blot. The gastric cancer cells MGC-803 were separated from phosphate buffered saline (PBS), normal mesenchymal stem cell exosomes (Nom-exo), hypoxia-induced mesenchymal stem cell exosomes (Hypo-exo) incubation, CCK8 was used to detect cell proliferation and flow cytometry was used to detect apoptosis, Transwell cell methods were used to detect the cell migration and invasion ability. Western blot was used to detect the expression levels of CD44, c-myc, Cyclin D1, p- β -catenin and β -catenin. **Results** Compared with PBS group, the proliferation ability, migration and invasion ability of MGC-803 cells in Nom-exo and Hypo-exo groups were significantly increased ($P < 0.05$), the apoptosis level was significantly decreased ($P < 0.05$), and Wnt/ β -catenin signaling pathway was significantly activated ($P < 0.05$). Compared with Nom-exo group, the proliferation ability, migration and invasion ability of MGC-803 cells in Hypo-exo groups were significantly increased ($P < 0.05$), the apoptosis level was significantly decreased ($P < 0.05$), and Wnt/ β -catenin signaling pathway was significantly activated ($P < 0.05$). **Conclusion** In hypoxic conditions, mesen-

* 基金项目: 陕西省重点研发计划项目(2019SF-132)。

作者简介: 杜雄, 男, 副主任医师, 主要从事胃癌相关临床和基础研究。△ 通信作者, E-mail: kangting6doctor@163.com。

本文引用格式: 杜雄, 李延新, 段小瑞, 等. 缺氧诱导的间充质干细胞外泌体对胃癌细胞生长和转移的影响及机制[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(22): 2724-2728.

chymal stem cell exosomes can significantly promote the growth and metastasis of gastric cancer cells, the mechanism is to promote the activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words: hypoxia; mesenchymal stem cells; exosomes; gastric cancer; growth; metastasis

胃癌是一种常见的消化道恶性肿瘤,在中国其发病率位居恶性肿瘤第三位,病死率位居第二位,虽然随着医疗技术的发展,胃癌的手术和化疗均取得了一定的进展,胃癌患者的 5 年生存率逐渐提高,但仍低于 30%^[1-3]。由于缺乏早期诊断的特异性标志物,胃癌患者往往在确诊时就已经处于中晚期,错过了手术和化疗的最佳时机,并且胃癌发生发展的分子机制尚不明确,治疗靶点受限^[4-5],所以探究胃癌的发生机制对于其临床诊断和治疗至关重要。

肿瘤细胞和微环境细胞受到多种应激因素的影响,例如缺氧、代谢应激、氧化应激等^[6]。缺氧是实体肿瘤的特征,癌细胞的快速生长导致局部缺氧,进而刺激肿瘤微环境中的各种基质细胞对肿瘤产生影响^[7-8]。间充质干细胞是肿瘤微环境的重要组成部分,可有助于肿瘤的发生发展^[9]。肿瘤外泌体是肿瘤细胞所分泌的纳米级囊泡,可调控肿瘤的生长、转移、免疫逃逸等^[10]。但在缺氧条件下,间充质干细胞外泌体对胃癌细胞的影响研究较少,本研究探讨了缺氧条件下间充质干细胞外泌体对胃癌细胞生长和转移的影响。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 人骨髓间充质干细胞 hBMSCs (美国 ScienCell 公司, Cat. XY-XB-1578), 人胃癌细胞 MGC-803 (美国 ScienCell 公司, Cat. ml-cs-0276), 兔源 CD9 抗体、兔源 CD63 抗体、兔源 TSG101 抗体、兔源 p- β -catenin 抗体、兔源 β -catenin 抗体 (英国 Abcam 公司, Cat. 分别为 ab92726、ab134045、ab125011、ab246504、ab32572), 细胞凋亡检测试剂盒 (沈阳万类生物技术有限公司, Cat. WLA030b), CCK8 检测试剂盒 (沈阳万类生物技术有限公司, Cat. WLA074), 兔源 CD44 抗体、兔源 c-myc 抗体、兔源 cyclin D1 抗体、兔源 GAPDH 抗体、HRP 标记山羊抗兔 IgG (沈阳万类生物技术有限公司, Cat. 分别为 WL03531、WL01781、WL01435a、WL01114、WLA023), Matrigel 胶 (福麦斯生物技术有限公司, Cat. 356234), 无外泌体胎牛血清 (美国 Gibco 公司, Cat. A2720801), 流式细胞仪 (美国 Beckman 公司), 透射电镜 (日本 Hitachi 公司), 0.4 μ m 的 Transwell 小室 (美国康宁公司, Cat. 3413)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 (1) 正常的 hBMSCs 培养: 取液氮保存的细胞, 于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中迅速解冻, 然后转移至

细胞培养皿中培养, hBMSCs 培养于含 10% 胎牛血清、1% 非必须氨基酸、1% 谷氨酰胺的 DMEM/F12 培养基中, MGC-803 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 细胞置于含 5% CO_2 , 37 $^{\circ}$ C 的细胞培养箱中培养, 隔天更换细胞培养基, 细胞生长至汇合率 80% 时进行细胞传代。(2) 缺氧诱导的 hBMSCs 培养: 将 hBMSCs 细胞置于 0.2% O_2 , 5% CO_2 , 37 $^{\circ}$ C 的细胞培养箱中, 细胞培养 2 d 后收集细胞培养上清液, 用于提取外泌体。

1.2.2 外泌体的提取与鉴定 使用差速离心法提取正常间充质干细胞外泌体 (Nom-exo)、缺氧诱导的间充质干细胞外泌体 (Hypo-exo), 将正常培养和缺氧培养的 hBMSCs 培养基更换为无外泌体胎牛血清配制的完全培养基, 继续培养细胞, 收集细胞培养上清液, 使用差速离心法收集细胞上清液中的外泌体, 主要步骤为: 将上清液以 3 000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min 去除死细胞; 然后将上清液以 6 000 $\times$ g 离心 40 min, 去除细胞碎片; 10 000 $\times$ g 离心 1 h, 取上清液; 100 000 $\times$ g 离心 1 h, 收集沉淀, 用 400 μ L 无菌磷酸盐缓冲液 (PBS) 重悬外泌体。使用透射电镜观察外泌体的形态结构, 拍照记录。使用蛋白质印迹法 (Western blot) 检测外泌体标志蛋白 CD9、CD63、TSG101 的表达水平。将 MGC-803 细胞分为 Nom-exo 组、Hypo-exo 组和 PBS 组, 分别与 10 μ g/mL 的 Nom-exo、Hypo-exo 以及等体积的 PBS 溶液共孵育 24 h 后进行后续研究。

1.2.3 细胞增殖 采用 CCK8 法检测细胞增殖能力, 将 MGC-803 细胞接种于 96 孔板, 每孔 5×10^3 个细胞, 每孔加入适量外泌体, 使外泌体终浓度为 10 μ g/mL, 96 孔板中体积为 100 μ L, 每组 3 个复孔, 并设置 24 h、48 h、72 h 时间点对应的培养板, 在细胞培养箱中培养, 于对应时间点取出 96 孔板, 每孔加入 10 μ L 的 CCK8 溶液, 于培养箱中孵育 4 h 后, 使用酶标仪检测各孔 450 nm 处的吸光度 (A) 值, A 值越大, 细胞增殖能力越强。

1.2.4 细胞凋亡 将 MGC-803 细胞接种于 6 孔板中, 加入外泌体, 使其终水平为 10 μ g/mL, 于细胞培养箱中培养 24 h, 按照细胞凋亡检测试剂盒说明书, 每孔 5×10^4 个细胞, 用 500 μ L 的染色缓冲液重悬细胞成单细胞悬液, 随后添加 5 μ L 的异硫氰酸荧光素 (Annexin V-FITC) 和 5 μ L 的碘化丙啶染料 (PI), 混匀后室温避光孵育 15 min, 并设置 Annexin V-FITC 和 PI 单阳性管用于荧光补偿调节, 空白管用于电压

调节;使用流式细胞仪检测上述各样品的荧光值,使用 FlowJo v5.573 软件分析细胞凋亡数。

1.2.5 细胞迁移与侵袭 Transwell 小室用于检测细胞迁移,Matrigel 胶于 4 °C 融化后,取 50 μ L 平铺于 Transwell 小室中用于检测细胞侵袭。取 MGC-803 细胞用 DMEM 培养基稀释至 2.5×10^4 个/毫升,取 200 μ L 细胞接种于 Transwell 小室中,每孔 5×10^3 个细胞,每组 3 个复孔,每个小室中加入外泌体,使其终水平为 10 μ g/mL,小室放置于 24 孔板中,每孔加入 600 μ L 含 10% 胎牛血清的完全培养基,并将上述 24 孔板转移至细胞培养箱中培养 24 h,小室底部用 PBS 清洗后用无水乙醇固定 30 min,然后将小室倒扣,底部滴加结晶紫染色 10 min,清洗后晾干,于显微镜下观察、拍照并计数,比较各组细胞迁移数及侵袭数。

1.2.6 Western blot 取各组与 10 μ g/mL 外泌体共孵育后的 MGC-803 细胞 1×10^6 个,加入 200 μ L RIPA 蛋白裂解液和 2 μ L PMSF 蛋白酶抑制剂,冰上裂解 30 min 后,以 $12\,000 \times g$,4 °C 离心 10 min,取上清液,即为细胞总蛋白。根据 BCA 蛋白定量试剂盒定量,定量后各组蛋白加入上样缓冲液煮沸 30 min,使蛋白样品充分变性,然后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,用 5% 的脱脂牛奶对聚偏二氟乙烯膜(PVDF)封闭 2 h,然后以 1:1 000 比例稀释后的一抗 4 °C 孵育过夜,TBST 洗膜后二抗室温孵育 1.5 h,再用 TBST 洗膜后按照 ECL 试剂盒说明书配制发光液,并将 PVDF 膜浸入发光液中反应半分钟,曝光并拍照,用 Image J 软件对曝光结果进行定量分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 LSD-*t* 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外泌体提取及鉴定 透射电镜观察外泌体形态结果显示,外泌体具有双层膜结构,形态呈“杯托样”,粒径在 30~100 nm,Western blot 检测外泌体标志蛋白结果显示,差速离心法提取的外泌体表达标志蛋白 CD9、CD63、TSG101,符合外泌体的结构及生物学特征。见图 1~2。

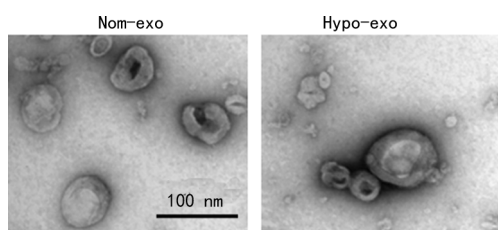


图 1 透射电镜观察外泌体形态结构

2.2 缺氧条件下间充质干细胞外泌体对胃癌细胞增殖能力的影响 相比于 PBS 组,Nom-exo 组 MGC-803 细胞增殖能力显著增加($P < 0.05$),Hypo-exo 组 MGC-803 细胞增殖能力亦显著增加($P < 0.05$),相比于 Nom-exo 组 MGC-803 细胞,Hypo-exo 组 MGC-803 细胞增殖能力显著增加($P < 0.05$)。见图 3。

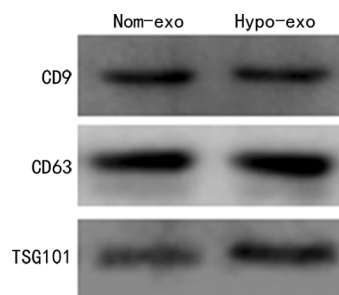


图 2 Western blot 检测外泌体标志蛋白表达

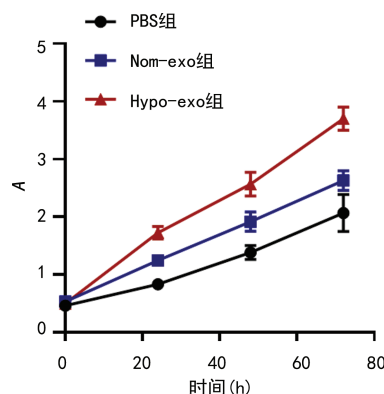


图 3 间充质干细胞外泌体对胃癌细胞增殖能力的影响

2.3 缺氧条件下间充质干细胞外泌体对胃癌细胞凋亡水平的影响 相比于 PBS 组,Nom-exo 组 MGC-803 细胞凋亡水平显著降低($P < 0.05$),Hypo-exo 组 MGC-803 细胞凋亡水平显著降低($P < 0.05$);而相比于 Nom-exo 组,Hypo-exo 组 MGC-803 细胞凋亡水平亦显著降低($P < 0.05$)。见图 4。

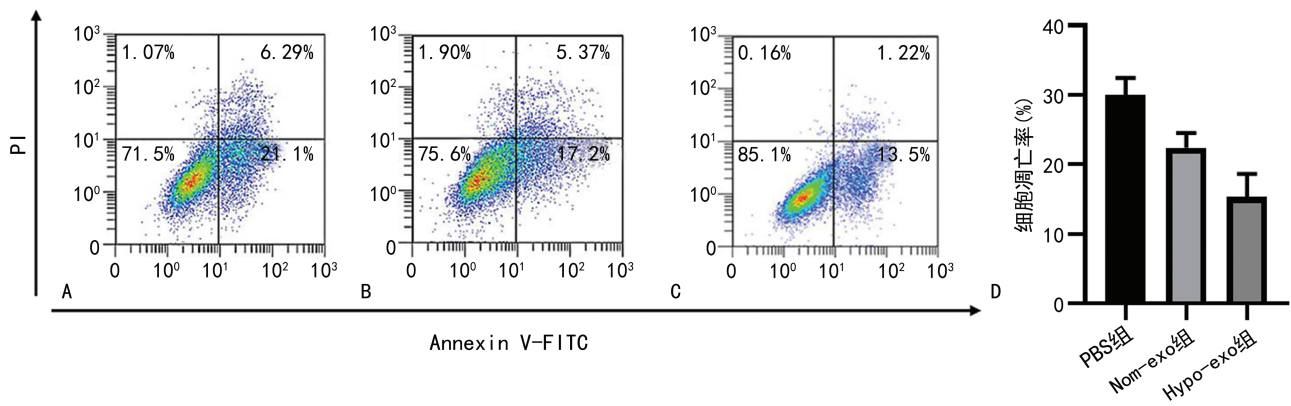
2.4 缺氧条件下间充质干细胞外泌体对胃癌细胞迁移能力的影响 相比于 PBS 组,Nom-exo 组 MGC-803 细胞迁移数目显著增加($P < 0.05$),Hypo-exo 组 MGC-803 细胞迁移数目显著增加($P < 0.05$);相比于 Nom-exo 组,Hypo-exo 组 MGC-803 细胞迁移数目亦显著增加($P < 0.05$)。见图 5。

2.5 缺氧条件下间充质干细胞外泌体对胃癌细胞侵袭能力的影响 Nom-exo 组 MGC-803 细胞侵袭数目显著高于 PBS 组($P < 0.05$),Hypo-exo 组 MGC-803 细胞侵袭数目显著高于 PBS 组($P < 0.05$);并且 Hypo-exo 组细胞侵袭数目显著高于 Nom-exo 组细胞侵袭数目($P < 0.05$)。见图 6。

2.6 缺氧条件下间充质干细胞外泌体对胃癌细胞 Wnt/ β -连环素(β -catenin)信号通路的影响 相比于 PBS 组,Nom-exo 和 Hypo-exo 组 MGC-803 细胞中

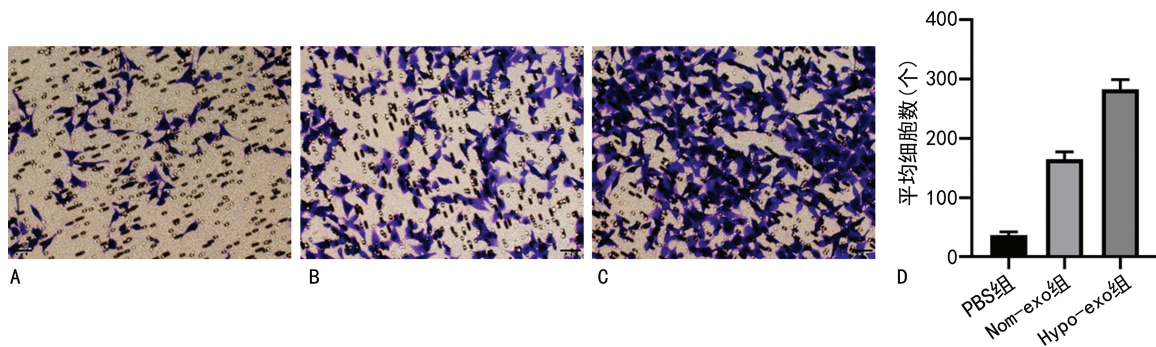
β -catenin 磷酸化水平显著升高 ($P < 0.05$), CD44、c-myc、G1/S-特异性周期蛋白-D1 (Cyclin D1) 表达显著上调 ($P < 0.05$), 并且 Hypo-exo 组 MGC-803 细胞 β -

catenin 磷酸化水平, CD44、c-myc、Cyclin D1 表达水平均显著高于 Nom-exo 组 ($P < 0.05$)。见图 7。



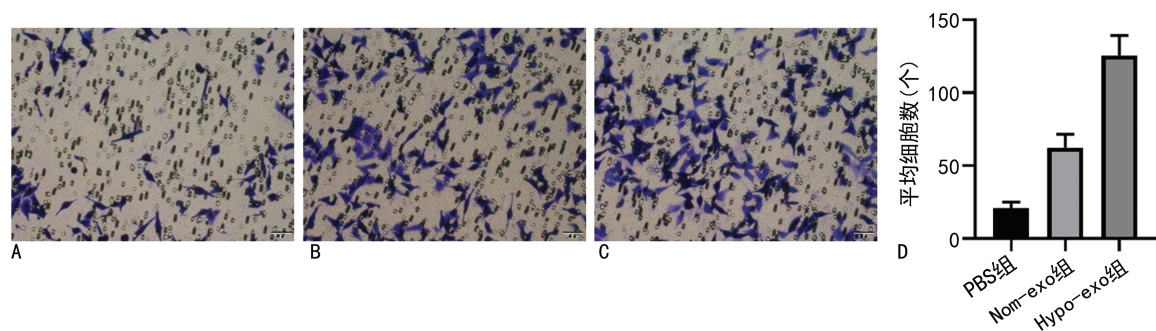
注: A、B、C 分别为 PBS 组、Nom-exo 组、Hypo-exo 组细胞凋亡图; D 为细胞凋亡率的统计值图。

图 4 间充质干细胞外泌体对胃癌细胞凋亡水平的影响



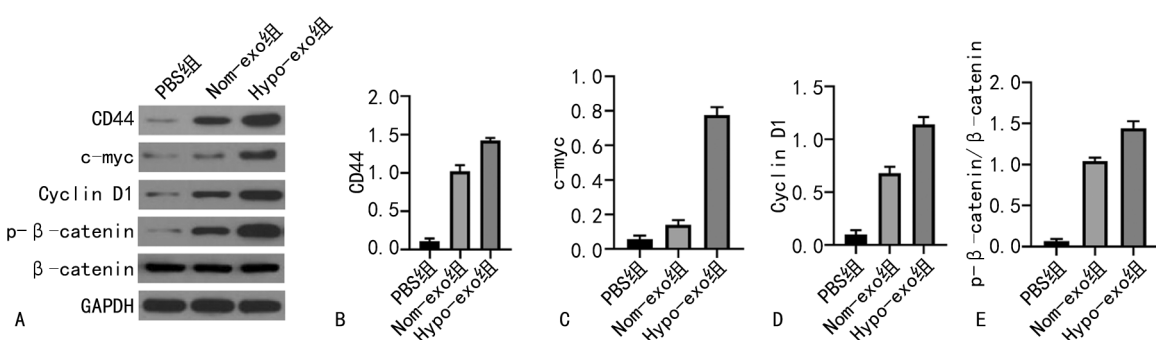
注: A、B、C 分别为 PBS 组、Nom-exo 组、Hypo-exo 组细胞迁移图; D 为平均细胞数的统计值图。

图 5 间充质干细胞外泌体对胃癌细胞迁移能力的影响



注: A、B、C 分别为 PBS 组、Nom-exo 组、Hypo-exo 组细胞侵袭图; D 为平均细胞数的统计值图。

图 6 细胞侵袭实验检测外泌体对胃癌细胞侵袭能力的影响



注: A 为各组蛋白表达情况; B、C、D、E 分别为 CD44、c-myc、Cyclin D1、p-β-catenin/β-catenin 表达水平的统计值图。

图 7 间充质干细胞外泌体对胃癌细胞 Wnt/β-catenin 信号通路的影响

3 讨 论

在肿瘤的生长过程中,肿瘤细胞生长迅速并且超过肿瘤血管新生的速度,肿瘤细胞群周围毛细血管的氧有效弥散范围不能满足肿瘤快速生长的需要,导致肿瘤组织内毛细血管的氧和营养供应不均,由此形成肿瘤缺氧微环境。缺氧亦是肿瘤微环境的重要特征,研究表明,实体肿瘤中缺氧区域占 0.35%~4.25%,中位氧含量约为 2%^[11]。缺氧的肿瘤微环境会调控肿瘤的血管新生、肿瘤代谢、免疫应答、生长、转移以及肿瘤耐药等过程^[12]。间充质干细胞是肿瘤微环境中的重要基质细胞,在肿瘤的发生和发展过程中改造肿瘤微环境,调控肿瘤血管新生及免疫逃逸^[13]。外泌体是肿瘤微环境中的重要组成部分,肿瘤微环境中的多种基质细胞均可通过分泌外泌体作为旁分泌介质而调控肿瘤的生长和转移。本研究探讨了缺氧诱导的间充质干细胞外泌体对胃癌细胞生长、转移的影响及其机制。

本研究通过差速离心法提取了 Nom-exo 和 Hypo-exo,鉴定结果显示,所提取的 Nom-exo 和 Hypo-exo 形态结构和理化性质均符合外泌体的特征。有研究表明,缺氧条件下,间充质干细胞衍生的外泌体微小 RNA(miR)-193a-3p、miR-210-3p、和 miR-5100 通过激活 STAT3 信号通路诱导上皮-间质转化(EMT),进而促进肺癌细胞的侵袭^[14]。缺氧条件也可通过多种途径诱导胃癌细胞的增殖和转移,研究表明,低氧诱导的 miR-224 会促进胃癌细胞生长、迁移和侵袭,缺氧可通过诱导巨噬细胞活化而诱导胃癌的发生发展^[15-16]。为了探究缺氧条件下间充质干细胞外泌体是否对胃癌细胞的生长和转移有影响,本研究将 Nom-exo 和 Hypo-exo 与胃癌细胞共孵育后发现,相比于 Nom-exo 组,Hypo-exo 组胃癌细胞 MGC-803 的增殖能力显著增加,细胞迁移和细胞侵袭能力也显著增加,Hypo-exo 组 MGC-803 细胞的水平显著低于 Nom-exo 组,提示缺氧条件下间充质干细胞外泌体也可以促进胃癌细胞的生长和转移。

Wnt/ β -catenin 信号通路是调控肿瘤细胞生长和转移的经典通路,该通路激活后 β -catenin 能够与其他蛋白分子结合形成复合物,在病理条件下可调控相关蛋白的表达以促进肿瘤的发生发展^[17]。c-myc、CD44、cyclin D1 是 Wnt 信号通路下游的靶基因,随着 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活而激活,调控原癌基因和抑癌基因的表达,进而促进肿瘤的生长和转移^[18-19]。已有许多研究表明 Wnt/ β -catenin 信号通路参与调控肿瘤细胞的生长和转移,例如,Wnt/ β -catenin 信号通路通过 H3 赖氨酸 27 乙酰化的表观遗传调控促进胃癌进展,Wnt/ β -catenin 途径与多种微小

RNA(miRNA)之间的相互作用可调节胃癌 EMT,Wnt/ β -catenin 信号通路是调控胃癌进展的关键信号通路。本研究发现,相比于 Nom-exo 组,Hypo-exo 组 MGC-803 细胞 c-myc、CD44、cyclin D1 表达水平均显著升高, β -catenin 磷酸化水平亦显著升高,即 Wnt/ β -catenin 信号通路被激活,说明缺氧条件下间充质干细胞外泌体能够激活 Wnt/ β -catenin 信号通路。

综上所述,Hypo-exo 能够促进胃癌细胞的生长和转移,其机制为激活胃癌细胞中的 Wnt/ β -catenin 信号通路,但是外泌体中包含多种物质,研究最广泛的是 miRNA、长链非编码 RNA 等,所以间充质干细胞中何种物质发挥调控作用还需进一步研究。

参考文献

- [1] HIRONAKA S. Anti-angiogenic therapies for gastric cancer [J]. Asia Pac J Clin Oncol, 2019, 15(4): 208-217.
- [2] BIAGIONI A, SKALAMERA I, PERI S, et al. Update on gastric cancer treatments and gene therapies [J]. Cancer Metastasis Rev, 2019, 38(3): 537-548.
- [3] COURTOIS S, LEHOURS P, BESSÈDE E. The therapeutic potential of metformin in gastric cancer [J]. Gastric Cancer, 2019, 22(4): 653-662.
- [4] OUE N, SENTANI K, SAKAMOTO N, et al. Molecular carcinogenesis of gastric cancer: lauren classification, mucin phenotype expression, and cancer stem cells [J]. Int J Clin Oncol, 2019, 24(7): 771-778.
- [5] SONG M, LATORRE G, IVANOVIC-ZUVIC D, et al. Autoimmune diseases and gastric cancer risk: a systematic review and meta-analysis [J]. Cancer Res Treat, 2019, 51(3): 841-850.
- [6] HINSHAW D C, SHEVDE L A. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression [J]. Cancer Res, 2019, 79(18): 4557-4566.
- [7] BUTTURINI E, CARCERERI DE PRATI A, BORIERO D, et al. Tumor dormancy and interplay with hypoxic tumor microenvironment [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(17): 4305-4325.
- [8] NOMAN M Z, HASMIM M, LEQUEUX A, et al. Improving cancer immunotherapy by targeting the hypoxic tumor microenvironment: new opportunities and challenges [J]. Cells, 2019, 8(9): 1083-1095.
- [9] HUGHES R M, SIMONS B W, KHAN H, et al. Asporin restricts mesenchymal stromal cell differentiation, alters the tumor microenvironment, and drives metastatic progression [J]. Cancer Res, 2019, 79(14): 3636-3650.
- [10] LIU Q, PENG F, CHEN J. The role of exosomal microRNAs in the tumor microenvironment of breast cancer [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(16): 3884-3910.
- [11] JING X, YANG F, SHAO C, et al. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment [J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 157-171.

(下转第 2734 页)

- Oxidative stress status and liver markers in coronary heart disease[J]. *Rep Biochem Mol Biol*, 2019, 8(1): 49-55.
- [9] HAARHAUS M, RAY K K, NICHOLLS S J, et al. Apabetalone lowers serum alkaline phosphatase and improves cardiovascular risk in patients with cardiovascular disease[J]. *Atherosclerosis*, 2019, 290(11): 59-65.
- [10] 中国医师协会急诊医师分会, 中华医学会心血管病学分会, 中华医学检验医学分会. 急性冠脉综合征急诊快速诊疗指南[J]. *中华急诊医学杂志*, 2016, 25(4): 397-404.
- [11] 中华医学会心血管病学分会介入心脏病学组, 中国医师协会心血管内科医师分会血栓防治专业委员会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 中国经皮冠状动脉介入治疗指南(2016)[J]. *中华心血管病杂志*, 2016, 44(5): 382-400.
- [12] OBERMAYER G, AFONYUSHKIN T, BINDEER C J. Oxidized low-density lipoprotein in inflammation-driven thrombosis[J]. *J Thromb Haemost*, 2018, 16(3): 418-428.
- [13] HARTLEY A, HASKARD D, KHAMIS R. Oxidized LDL and anti-oxidized LDL antibodies in atherosclerosis: novel insights and future directions in diagnosis and therapy[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2019, 29(1): 22-26.
- [14] IKENAGA H, KURISU S, KONO S, et al. Impact of malondialdehyde-modified low-density lipoprotein on tissue characteristics in patients with stable coronary artery disease: integrated backscatter-intravascular ultrasound study[J]. *Circ J*, 2016, 80(10): 2173-2182.
- [15] AZPIAZU D, GONZALO S, VILLA-BELLOSTA R. Tissue non-specific alkaline phosphatase and vascular calcification: a potential therapeutic target[J]. *Curr Cardiol Rev*, 2019, 15(2): 91-95.
- [16] NDREPEPA G, HOLDENRIEDER S, CASSESE S, et al. A comparison of gamma-glutamyl transferase and alkaline phosphatase as prognostic markers in patients with coronary heart disease[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2018, 28(1): 64-70.
- [17] PARK J B, KANG D Y, YANG H M, et al. Serum alkaline phosphatase is a predictor of mortality, myocardial infarction, or stent thrombosis after implantation of coronary drug-eluting stent[J]. *Eur Heart J*, 2013, 34(12): 920-931.
- [18] ROMANELLI F, CORBO A, SALEHI M, et al. Overexpression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) in endothelial cells accelerates coronary artery disease in a mouse model of familial hypercholesterolemia[J]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0186426.
- [19] KUNUTSOR S K, BAKKER S J, KOOTSTRA-ROS J E, et al. Serum alkaline phosphatase and risk of incident cardiovascular disease: interrelationship with high sensitivity C-reactive protein[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132822.
- [20] 谢玉娟, 廖伟. 血浆 NT-proBNP 与急性冠脉综合征后主要不良心血管事件关系[J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(15): 3829-3832.
- [21] 叶莎, 金爱萍, 高洁, 等. 复方丹参滴丸联合曲美他嗪对冠心病合并高脂血症患者血液流变学及血脂的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2019, 19(5): 868-871.
- [22] SZUCS B, SZUCS C, PETREKANITS M, et al. Molecular characteristics and treatment of endothelial dysfunction in patients with COPD: a review article[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): 1-12.

(收稿日期: 2021-02-21 修回日期: 2021-07-11)

(上接第 2728 页)

- [12] JUNG J, ZHANG Y, CELIKU O, et al. Mitochondrial NIX promotes tumor survival in the hypoxic niche of glioblastoma[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(20): 5218-5232.
- [13] YANG Q, CHEN J, ZHU Y, et al. Mesenchymal stem cells accelerate the remodeling of bladder VX2 tumor interstitial microenvironment by TGF β 1-Smad pathway[J]. *J Cancer*, 2019, 10(19): 4532-4539.
- [14] ZHANG X, SAI B, WANG F, et al. Hypoxic BMSC-derived exosomal miRNAs promote metastasis of lung cancer cells via STAT3-induced EMT[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 40-54.
- [15] HE C, WANG L, ZHANG J, et al. Hypoxia-inducible microRNA-224 promotes the cell growth, migration and invasion by directly targeting RASSF8 in gastric cancer[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 35.
- [16] YUN Z H, TAN Y L, WANG Y B, et al. Hypoxia decreases macrophage glycolysis and m1 percentage by targeting microRNA-30c and mTOR in human gastric cancer[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(8): 2368-2377.
- [17] NGUYEN V H L, HOUGH R, BERNAUDO S, et al. Wnt/ β -catenin signalling in ovarian cancer: Insights into its hyperactivation and function in tumorigenesis[J]. *J Ovarian Res*, 2019, 12(1): 122-138.
- [18] LI M, HAN Y, ZHOU H, et al. Transmembrane protein 170B is a novel breast tumorigenesis suppressor gene that inhibits the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 91-115.
- [19] SONG Y, LI Z X, LIU X, et al. The Wnt/ β -catenin and PI3K/AKT signaling pathways promote EMT in gastric cancer by epigenetic regulation via H3 lysine 27 acetylation[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(7): 1010428317712617.

(收稿日期: 2021-02-26 修回日期: 2021-07-18)