

· 基础研究 ·

PAR-1 激活对小鼠内皮祖细胞 CXCR4 mRNA 表达及细胞增殖与迁移的影响*

代静澜¹, 潘波¹, 古平¹, 牟海刚¹, 白家驹²

(1. 解放军第三二四医院心血管内科, 重庆 400020; 2. 第三军医大学西南医院全军肝病中心实验室, 重庆 400038)

摘要:目的 研究蛋白酶激活受体-1(PAR-1)活化后对小鼠内皮祖细胞(EPCs) CXC 型趋化因子受体 4(CXCR4) mRNA 表达及细胞增殖、迁移的影响。方法 分离鉴定小鼠 EPCs, 分别以不同浓度 PAR-1 激活剂 SFLLRN 加入培养的 EPCs 中, 以 PAR-1 小干扰 RNA(siRNA)转染 EPCs, 并设立空白对照组。采用荧光定量实时聚合酶链反应(RT-PCR)分析各组细胞 PAR-1、CXCR4 mRNA 表达; MTT 法检测各组 EPCs 增殖情况; Transwell 小室共培养分析各组 EPCs 的迁移能力。结果 SFLLRN 激活组 EPCs 增殖率、迁移率及 PAR-1、CXCR4 mRNA 表达均较空白对照组、PAR-1 特异 siRNA 转染组增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。CXCR4 mRNA 与 PAR-1 mRNA 表达呈明显正相关($r = 0.991$)。结论 PAR-1 可能通过促使 CXCR4 的表达增加, 从而促进 EPCs 的增殖和迁移。

关键词:内皮祖细胞;蛋白酶激活受体-1;CXC 型趋化因子受体 4;细胞增殖;迁移

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.33.032

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)33-4056-03

Effect of activated PAR-1 on the expression of CXCR4 mRNA, proliferation and migration of mouse endothelial progenitor cells*

Dai Jinglan¹, Pan Bo¹, Gu Ping¹, Mu Haigang¹, Bai Jiasi²

(1. Department of Cardiology, No. 324 Hospital of People's Liberation Army, Chongqing 400020, China;

2. Laboratory of Liver Disease Center, Southwest Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effect of protease-activated receptor 1(PAR-1) activation on the expression of CXCR4 mRNA of mouse endothelial progenitor cells(EPCs) and proliferation, migration of EPCs. Methods Mouse EPCs were activated by different concentration of SFLLRN(one agonist of PAR-1), or transfected by small interfering RNA of PAR-1. The expressions of PAR-1 and CXCR4 mRNA of EPCs were detected by fluorescent quantitative real-time PCR. Proliferation, migration of EPCs were detected by MTT, Transwell chambers respectively. Results The expressions of PAR-1 and CXCR4 mRNA in SFLLRN group were higher than that in other groups($P < 0.05$). The expression of CXCR4 mRNA was highly positive correlation with PAR-1 mRNA($r = 0.991$). The proliferation, migration of mouse EPCs were induced by activation of PAR-1. Conclusion Activation of PAR-1 promotes cell proliferation and migration of mouse EPCs, this effect may be depended on CXCR4.

Key words: endothelial progenitor cells; protease-activated receptor 1; CXC receptor 4; cell proliferation; migration

已有研究表明,干细胞来源的内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)在血管内膜损伤后,可以被动员、募集至受损部位,发育为成熟的内皮细胞,从而修复受损血管内膜的功能^[1]。但在这一过程中, EPCs 受何种因素的驱动和调控,目前并不完全清楚^[2]。蛋白酶激活受体-1(protease-activated receptor-1, PAR-1)是血管细胞上凝血酶的主要受体,由 425 个氨基酸组成单链多肽分子,属于 G 蛋白偶联受体超家族。PAR-1 表达于成熟血管内皮细胞膜上,与新生血管形成有关^[3];也表达于肿瘤细胞膜上,与肿瘤侵袭、转移有关^[4]。研究还发现 PAR-1 也表达于 EPCs 膜上, PAR-1 活化后是否作为始动因素促进 EPCs 的迁移和增殖,值得进一步研究。细胞的定向迁移受多种因素的调控, CXC 型趋化因子受体 4(CXC receptor 4, CXCR4)无疑是其中最重要的分子之一;同时在 EPCs 表面存在 CXCR4 的表达,推测 CXCR4 可能在 EPCs 迁移过程中起着关键作用。本文旨在研究 PAR-1 活化后对小鼠 EPCs CXCR4 mRNA 表达及细胞增殖、迁移的影响,为进一步探讨 PAR-1 在 EPCs 修复受损血管内膜过程中的作用及其机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 BALB/c 小鼠购自第三军医大学实验动物中心。

1.2 主要试剂和材料 小牛血清(Hyclone 公司), 密度梯度 1.077 的淋巴细胞分离液(天津灏洋公司), 纤维粘连蛋白(Sigma 公司), EMB-2 培养基(Cambrex 公司), FITC-UEA-1(Vector 公司), DiI-ac-LDL(Molecular Probes 公司)。

1.2 方法

1.2.1 EPCs 的分离、培养和鉴定 含 2% 小牛血清的 PBS 冲洗小鼠骨髓腔, 收集离心后用含 2% 小牛血清的 PBS 重悬细胞, 密度梯度 1.077 的淋巴细胞分离液分离出单个核细胞。然后将收集的细胞悬浮于 EMB-2 内皮细胞培养基中, 按 $10^7 \sim 10^8$ 个细胞接种于已包被纤维连接蛋白的培养瓶内, 于 37°C , 5% CO_2 恒温培养。检测细胞摄取 $1.1'$ — $2'$ (十八烷基)-3,3',3'-四甲基吡啶花青高氯酸盐标记的乙酰化低密度脂蛋白(DiI-ac-LDL)和结合异硫氰酸荧光素标记的荆豆凝集素-1(FITC-UEA-1)功能。

1.2.2 实验分组 取处于增殖期的 EPCs, 换为含 1% 血清的 EMB-2 培养基培养, 实验分为空白对照组、PAR-1 siRNA 转染

* 基金项目:解放军第三二四医院院管课题资助项目(2010008)。研究。

作者简介:代静澜(1972~), 主治医师, 硕士, 主要从事缺血性心脏病的研究。

1 组(转染 1 号 siRNA 序列)、PAR-1 siRNA 转染 2 组(转染 2 号 siRNA 序列)、无关对照组(转染无关对照 siRNA 序列)及 SFLLRN 激活组(25、50、100 $\mu\text{mol/L}$)。

1.2.3 PAR-1 siRNA 序列的设计与合成 根据 NCBI GENEbank 中小鼠 PAR-1 基因序列(ID:14062)选择目标序列,设计的 siRNA 序列如下。1 号:正义链 5'-CCC UGC UCG AAG GCU ACU AdTdT-3',反义链 3'-dTdTGGG ACG AGC UUC CGA UGA U-5';2 号:正义链 5'-GCA GUC CUC UUC AAA AAC AdTdT-3',反义链 3'-dTdTTCGU CAG GAG AAG UUU UUG U-5';无关对照序列:正义链 5'-CGG UUC AGG ACG GAU CAC AdTdT-3',反义链 3'-dTdTGCC AAG UCC UGC CUA GUG U-5'。采用 BLAST 检索,确认设计 siRNA 序列的特异性,再由上海生工生物公司合成。

1.2.4 细胞转染 按说明书使用 Lipofectamine 2000 转染增殖期 EPCs;首先将处于对数生长期的 EPCs 用细胞刮子刮下,计数后接种于含 1%小牛血清 EMB-2 培养基的 6 孔培养板中(2×10^6 /孔),37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中过夜;然后制备 siRNA-Lipofectamine 2000 转染复合物,加入含 EPCs 的培养板中,轻轻混匀,继续培养 24 h 后更换为新鲜培养基。

1.2.5 PAR-1 激活的处理 取增殖期 EPCs 用细胞,计数后接种于含 1%小牛血清 EMB-2 培养基的 6 孔培养板中(2×10^6 /孔),37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中过夜;然后添加 PAR-1 激动剂 SFLLRN,使其终浓度分别为 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$,培养 24 h 后更换为新鲜培养基。

1.2.6 RT-PCR 分析 PAR-1 和 CXCR4 mRNA 水平 取不同时期各组 EPCs,采用 Trizol 试剂(Invitrogen 公司)抽提细胞总 RNA,紫外分光光度计定量后置 -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。按 M-MLV 逆转录试剂盒(Invitrogen 公司)说明书进行操作,37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min,85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,反转录成 cDNA。然后在 ABI PRISM 7 000 定量 PCR 仪上扩增,总体系 20 μL ,包括 SYBR Green Mix(上海海洋纺公司)10 μL ,cDNA 模板 2 μL ,上下游引物各 0.5 μL ;反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 退火

40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 40 个循环。分析得到阈值循环数(Ct),采用相对定量法计算 PAR-1 或 CXCR4 的 mRNA 表达量(GAPDH 为内参照)。PAR-1 上游引物:5'-GGC TCC TGC AGT CTG TTC GTA TCG-3',下游引物:5'-CAA TCG CTC GGC AAA GTA GCC A-3',扩增片段长度 423 bp;CXCR4 上游引物:5'-GAA ATG GAG GCC ATC AGT ATA TAC A-3',下游引物:5'-CCA GGG TTC GCC CAT AAA GTC A-3',扩增片段长度 317 bp;GAPDH 上游引物:5'-GGG GAG CCA AAA GGG TCA TCA TCT-3',下游引物:5'-GAG GGG CCA TCC ACA GTC TTC T-3',扩增片段长度 235 bp。实验重复 3 次。

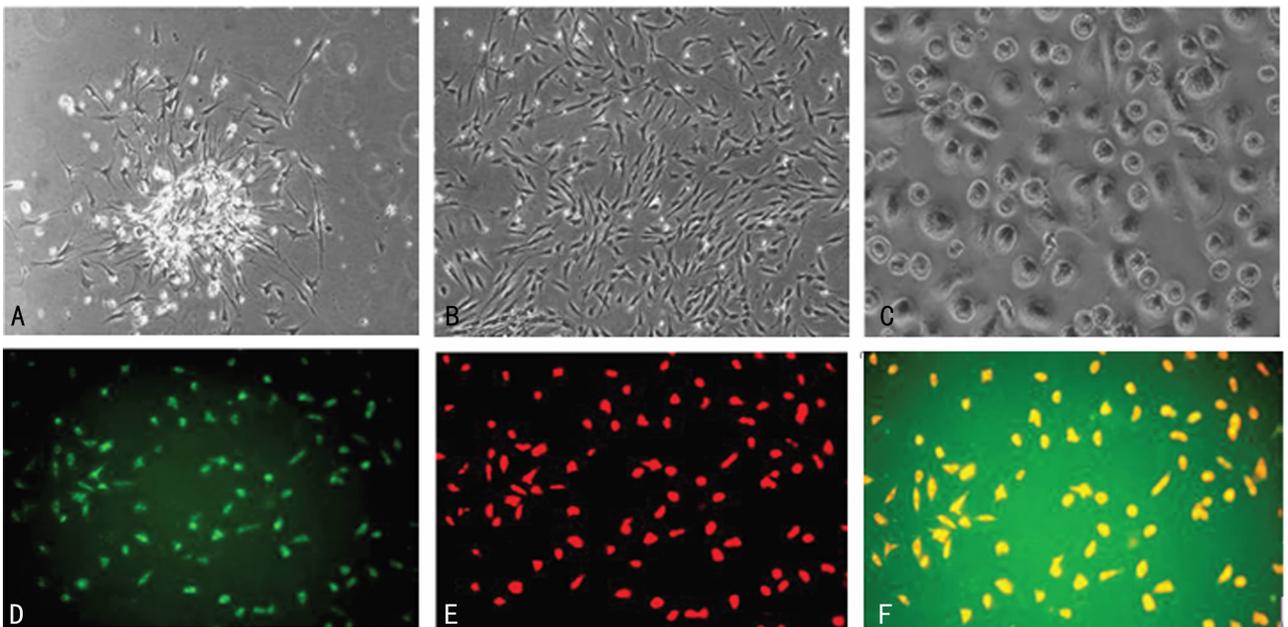
1.2.7 MTT 法检测各组 EPCs 增殖活性 将各组 EPCs 消化离心后,以 0.5×10^6 /孔加入 96 孔板中,每组设 3 个复孔。分别培养 24、48、72 和 96 h 后,每孔加入 5 g/L MTT 20 μL ,然后孵育 4 h,吸弃上清,加入 DMSO 200 μL 震荡 10 min,490 nm 处读取吸光度(A)值。取每次各浓度孔 A 值的均值作为该浓度的最终 A 值。实验重复 3 次,绘制细胞生长曲线。

1.2.8 EPCs 迁移测定 采用 Transwell 小室共培养的方法,采用 8.0 μm 孔径的聚碳酸酯膜分隔上下小室,上室加入各组 EPCs(2×10^4 /孔),下室加入基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1,SDF-1),作用浓度 100 ng/mL,作用 16 h 后结晶紫染色,每孔计数 5 个视野。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行数据处理,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验或 Pearson 相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 EPCs 培养及鉴定 接种后第 7 天,细胞集落逐渐增多,细胞体积变大(图 1A),第 10 天左右达 80%~90%融合,细胞伸展成纺锤状(图 1B),第 14 天细胞基本铺满瓶底,呈铺路石样密集排列(图 1C)。采用 Dil-ac-LDL 和 FITC-UEA-I 染色,于荧光显微镜下观察,结合 FITC-UEA-I 的贴壁细胞呈绿色(图 1D),摄取 Dil-ac-LDL 的贴壁细胞呈红色(图 1E),双阳性标记细胞呈黄色(图 1F),被认为是正在分化的 EPCs。



A、B、C:分别为培养第 7、10、14 天的 EPCs,倒置相差显微镜($\times 200$);D、E、F:分别为 EPCs 结合 FITC-UEA-I、摄取 Dil-ac-LDL、双标记叠加,荧光显微镜($\times 200$)。

图 1 EPCs 形态学及荧光鉴定

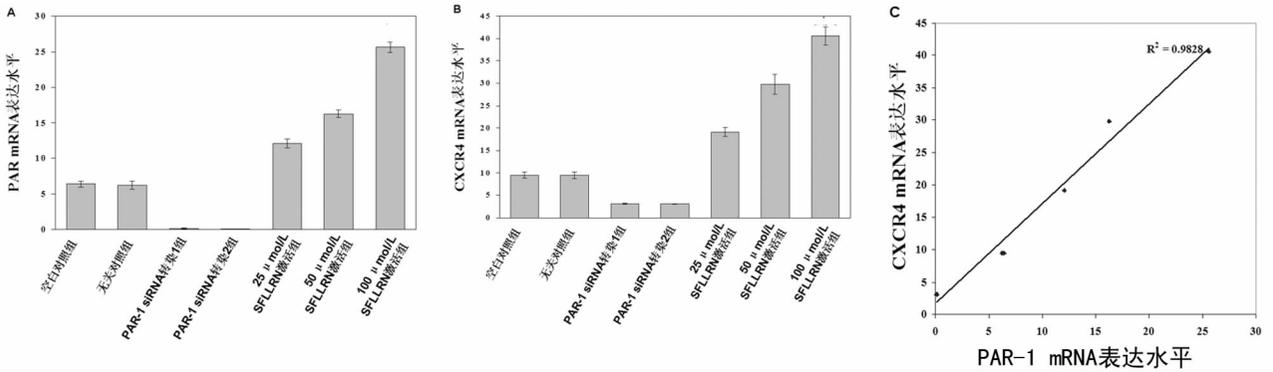


图2 各组 PAR-1 mRNA 和 CXCR4 mRNA 表达及其相关性

2.2 各组 PAR-1 和 CXCR4 mRNA 的表达及其相关性 不同浓度 SFLLRN 激活 PAR-1 后, PAR-1、CXCR4 mRNA 表达水平均较空白对照组、PAR-1 特异 siRNA 转染组增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2A、B。同时, CXCR4 mRNA 与 PAR-1 mRNA 表达呈明显正相关 ($r = 0.991$)。见图 2C。

2.3 各组 EPCs 增殖情况 各处理组 EPCs 的生长曲线见图 3, 不同浓度 SFLLRN 激活 PAR-1 情况下, EPCs 生长明显加快, 而采用 siRNA 特异性阻断 PAR-1, EPCs 生长明显减慢。

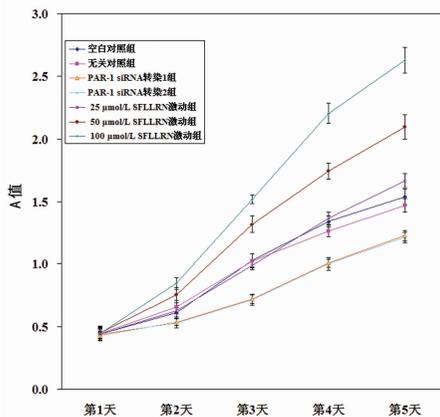


图3 各组 EPCs 增殖情况

2.4 各组 EPCs 迁移能力 在 SFLLRN 激活 PAR-1 作用下, EPCs 迁移较空白对照组明显增强 ($P < 0.05$); 特异性阻断 PAR-1, 则 EPCs 迁移能力减弱 ($P < 0.05$); 与阻断 PAR-1 比较, 激活 PAR-1 可显著促进 EPCs 的迁移作用 ($P < 0.05$), 见图 4。

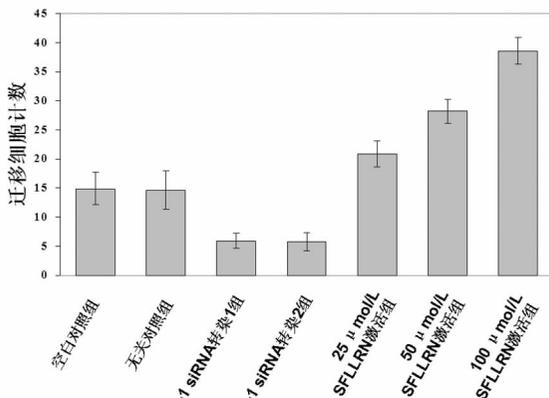


图4 各组 EPCs 迁移情况

3 讨论

Caballero 等^[5] 研究发现血管内膜损伤后可以动员、募集

EPCs 迁移至损伤部位, 在体内局部微环境作用下能发育为适宜局部生长的内皮细胞, 从而修复受损内皮细胞功能。但 EPCs 如何动员并募集至受损血管内皮附近, 目前尚不完全清楚^[6]。

基质细胞衍生因子 (SDF-1)/CXCR4 轴可能在 EPCs 动员和募集过程中起着重要作用。SDF-1 主要在骨髓基质细胞及骨髓内皮细胞表达, 有研究表明在缺血组织和损伤血管的平滑肌也有强表达^[7]。SDF-1 可促进小鼠内皮祖细胞扩增并阻止其凋亡^[8], Huang 等^[9] 用体外扩增的 EPC 做 SDF-1 诱导的迁移实验, 发现 SDF-1 对 EPC 有强大的趋化活性, 这种趋化活性呈浓度依赖性。SDF-1 与 CXCR4 具有高度的亲和力, 两者特异性结合, 形成 SDF-1/CXCR4 轴, 启动细胞内信号转导系统, 诱导成熟或不成熟的祖细胞动员, 并参与血管的生成, 发挥多种生物学功能, 与胚胎发育、炎症反应、HIV 感染、造血细胞调控以及干细胞的迁移等有密切关系^[10]。

PAR-1 是 7 次跨膜 G 蛋白偶联受体家族, 含有其自身内在配体 SFLLRN。丝氨酸蛋白酶水解 PARs 的 N2 末端, 从而显露一个新的“被限制的配体”, 后者与受体本身第 2 个样的细胞外区结合而使其不可逆的激活, 继而转导其他细胞信号^[11-12]。研究发现用凝血酶作用前列腺癌细胞 DU145 可诱导 IL-8 和 VEGF 的分泌, 敲除 PAR-1 基因后, 检测到肿瘤缩小, 血管密度降低, 肿瘤局部 IL-8、VEGF 降低, 提示 PAR-1 在前列腺癌血管生成中的重要意义^[13]。PAR-1 的基因表达在血管生成中起关键作用, 活化的 PAR1 明显诱导 VEGF mRNA 的表达, 增强 VEGF 的功能。研究表明 PAR-1 激活后可旁分泌成纤维细胞生长因子、诱导原癌基因 c-fos、c-myc 和 c-sis 表达, 激活促有丝分裂蛋白酶和促进活性氧成, 启动细胞的分裂和增殖^[14]。

本研究结果显示, 转染 PAR-1 小干扰 RNA 可下调 EPCs PAR-1 和 CXCR4 mRNA 表达并抑制 EPCs 增殖及迁移能力。与空白对照组、PAR-1 siRNA 转染组比较, SFLLRN 激活组 EPCs 增殖率、迁移率增高, 差异有显著性, 其 PAR-1 与 CXCR4 mRNA 表达上调, 且 CXCR4 mRNA 表达与 PAR-1 mRNA 表达呈正相关。提示 PAR-1 可能通过 SDF-1/CXCR4 轴促进 EPCs 的增殖、迁移, 为进一步探讨 PAR-1 在 EPCs 增殖、迁移中的作用及其机制提供实验基础。

参考文献:

- [1] Jujo K, Li M, Losordo DW. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium[J]. J Mol Cell Cardiol, 2008, 45(4): 530-544.
- [2] Alev C, Ii M, Asahara T. Endothelial progenitor cells: a novel tool for the therapy of ischemic (下转第 4061 页)

多元醇,口服在肠道基本不吸收,在常温酸性条件下不与蒙脱石散发生任何化学反应,但有促进口服毒物从肠道排除的作用。本研究也发现采用蒙脱石甘露醇溶液进行灌胃,能减轻百草枯急性中毒导致的肺间质纤维化的程度。

经口染毒 4 h 与 1 h 后给予蒙脱石甘露醇溶液的研究比较发现,在第 15 天对大鼠的运动能力及耐力方面的影响区别不明显,但 1 h 后给药与 4 h 后给药两组肺纤维化程度无明显差异。可能与百草枯在大鼠胃肠道吸收速度及吸收率较低有关。本研究中没有进一步探讨更长时间的给药对其结果的影响,也没有进一步观察给药后更长时间各组大鼠运动功能、耐力及肺间质纤维化程度的变化,另外,如果能动态观察各组大鼠动脉血气的变化情况,将更有助于判断该治疗方案的疗效。但可以提示,积极的消化道毒物处理可在一定程度上减轻百草枯急性中毒所致的肺间质纤维化,而不要因为中毒时间稍长,放弃消化道毒物的清除。

综上所述,从运动能力及耐力、肺组织羟脯氨酸含量及病理切片均提示蒙脱石甘露醇溶液对百草枯中毒大鼠肺间质纤维化及由此可能影响的运动能力及耐力有一定的改善作用,对肺损伤有一定的保护作用,虽不能完全阻止肺纤维化的发生和发展,但可延缓肺间质纤维化的进程,减轻纤维化的程度,对百草枯急性中毒救治有积极作用。可以作为百草枯急性中毒综合救治一项有效的早期干预措施。

参考文献:

- [1] 王伯良,涂艳阳,仲月霞,等.百草枯致大鼠多脏器损害的观察[J].中华急诊医学杂志,2010,19(12):1296-1299.
- [2] Cory-Slechta DA. Studying toxicants as single chemicals: does this strategy adequately identify neurotoxic risk [J]. *Neurotoxicology*,2005,26(4):491-510.
- [3] 李国强,魏路清,刘阳,等.持续血浆灌流清除百草枯中毒患者血中百草枯的临床研究[J].中国危重病急救医学,2011,23(10):588-592.
- [4] Lin JL,Chen KH,Huang WH,et al. Improved survival in

severe paraquat poisoning with repeated pulse therapy of cyclophosphamide and steroids[J]. *Intensive Care Med*,2011,37(6):1006-1013.

- [5] 王永进,王泽惠.百草枯中毒治疗的研究进展[J].中国急救医学,2003,23(6):404-406.
- [6] Posecion NC,Ostrea EM,Bielawski DM. Quantitative determination of paraquat in meconium by sodium borohydride-nickel chloride chemical reduction and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*,2008,862(1/2):93-99.
- [7] 刘峰,管向东,张忠臣,等.百草枯中毒急性肺损伤抗凝治疗的实验研究[J].中华劳动卫生职业病杂志,2012,30(3):190-193.
- [8] 王泽惠,王永进,侯云生,等.阿魏酸钠对百草枯中毒大鼠急性肺损伤的保护作用[J].中华急诊医学杂志,2006,15(7):599-601.
- [9] Li LR,Sydenham E,Chaudhary B,et al. Glucocorticoid with cyclophosphamide for paraquat-induced lung fibrosis [J]. *Coch Dat Sys Rev*,2012,7(10):CD008084.
- [10] Neves FF,Sousa RB,Pazin-Filho A,et al. Severe paraquat poisoning:clinical and radiological findings in a survivor [J]. *J Bra Dneumol*,2010,36(4):513-516.
- [11] 刘瑞,李成刚,梁欣,等.博莱霉素诱导大鼠肺纤维化过程中羟脯氨酸及氧化应激指标的变化[J].第四军医大学学报,2004,25(23):2210-2212.
- [12] 张朝贤,钱益新,付仲文,等.百草枯生产工艺改进及应用前景[J].植物保护,1999,25(1):41-43.
- [13] 郑文,唐文浩.土壤粒度与含水量对太阳光降解百草枯的影响[J].安徽农业科学,2007,35(8):2370-2371.
- [14] 常威,何忠芳.蒙脱石散对水溶性维生素吸收的影响[J].兰州医学院学报,2004,30(1):17-19.

(收稿日期:2013-07-20 修回日期:2013-08-17)

(上接第 4058 页)

- diseases [J]. *Antioxid Redox Signal*,2011,15(4):949-965.
- [3] Tripathy D,Sanchez A,Yin X,et al. Thrombin,a mediator of cerebrovascular inflammation in AD and hypoxia [J]. *Front Aging Neurosci*,2013,5(1):19-23.
- [4] Cooper CR,Chay CH,Gendernalik JD,et al. Stromal factors involved in prostate carcinoma metastasis to bone [J]. *Cancer*,2003,97(3 Suppl):S739-747.
- [5] Caballero S,Hazra S,Bhatwadekar A,et al. Circulating mononuclear progenitor cells: differential roles for subpopulations in repair of retinal vascular injury [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2013,54(4):3000-3009.
- [6] Dragneva G,Korpisalo P,Herttua S. Promoting blood vessel growth in ischemic diseases:challenges in translating preclinical potential into clinical success [J]. *Dis Model Mech*,2013,6(2):312-322.
- [7] Young KC,Torres E,Hatzistergos KE. Inhibition of the SDF-1/CXCR4 axis attenuates neonatal hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. *Circ Res*,2009,104(11):1293-1301.
- [8] Wang YB,Liu YF,Lu XT,et al. *Rehmannia glutinosa* extract activates endothelial progenitor cells in a rat model

of myocardial infarction through a SDF-1 α /CXCR4 cascade [J]. *PLoS One*,2013,8(1):e54303.

- [9] Huang NF,Dewi RE,Okogbaa J,et al. Chemotaxis of human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells [J]. *Am J Transl Res*,2013,5(5):510-520.
- [10] Isabelle P,David J,Shahin R. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway:a molecular hub modulating neo-angiogenesis [J]. *Trends Immunol*,2007,28(3):299-307.
- [11] Garcia-Lopez MT,Gutierrez-Rodriguez M,Herranz R. Thrombin-activated receptors: promising targets for cancer therapy [J]. *Curr Med Chem*,2010,17(2):109-128.
- [12] Zhang C,Srinivasan Y,Arlow DH,et al. High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1 [J]. *Nature*,2012,492(7429):387-392.
- [13] Brauer RR,Zigler M,Villares GJ,et al. Transcriptional control of melanoma metastasis: the importance of the tumor microenvironment [J]. *Semin Cancer Biol*,2011,21(2):83-88.
- [14] Soh UJ,Dores MR,Chen B,et al. Signal transduction by protease activated receptors [J]. *Br J Pharmacol*,2010,160(2):191-203.

(收稿日期:2013-06-27 修回日期:2013-07-18)