

# 蛋白酶激活受体1活化对小鼠内皮祖细胞增殖和迁移的影响

代静澜\*, 古平, 潘波, 牟海刚(解放军324医院心内科, 重庆 400020)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)37-3465-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.37.04

**摘要** 目的:研究蛋白酶激活受体1(PAR-1)活化对小鼠内皮祖细胞(EPCs)增殖和迁移的影响,及CXC型趋化因子受体4(CXCR4)的作用。方法:取对数生长期的的小鼠EPCs,加入PAR-1激活剂SFLLRN(50 μmol/L)进行活化,再加入CXCR4拮抗药AMD3100使后者终浓度分别为0、50、100、200 nmol/L(即b、c、d、e组);另设不活化、不加AMD3100的为空白对照(即a组)进行比较。采用荧光定量实时聚合酶链式反应法检测各组细胞中CXCR4 mRNA表达水平,Transwell小室共培养分析EPCs的迁移能力,MTT法检测各组细胞作用24、48、72、96 h后的EPCs增殖情况。结果:与a组比较,b组EPCs中CXCR4 mRNA表达水平和细胞迁移能力均明显增加( $P<0.05$ ),细胞增殖能力增强;与b组比较,d、e组EPCs中CXCR4 mRNA表达水平明显降低( $P<0.05$ ),c、d、e组EPCs细胞迁移能力均明显减弱( $P<0.05$ ),增殖能力明显减慢,且呈剂量依赖性。结论:PAR-1活化能促进小鼠EPCs的增殖和迁移,其作用可能与CXCR4表达的上调有关。

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

## Effects of PAR-1 Activation on the Proliferation and Migration of Endothelial Progenitor Cells in Mice

DAI Jing-lan, GU Ping, PAN Bo, MOU Hai-gang (Dept. of Cardiology, No. 324 Hospital of PLA, Chongqing 400020, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To explore the effects of PAR-1 activation on the proliferation and migration of endothelial progenitor cells (EPCs) in mice and the effects of CXC receptor 4 (CXCR4). **METHODS:** Mice EPCs at logarithmic growth phase were stimulated by 50 μmol/L SFLLRN (protease-activated receptor 1 activator), then added with 0, 50, 100, 200 nmol/L of AMD3100 (group b, c, d, e), which was an antagonist of CXCR4. Unactivated EPCs without AMD3100 were included in blank control (group a). The mRNA expression of CXCR4 was detected by fluorescent quantitative real-time PCR. The migration ability of EPCs was analyzed by Transwell chambers, and the proliferation of EPCs was detected by MTT after treated for 24, 48, 72 and 96 h. **RESULTS:** Compared with group a, the mRNA expression of CXCR4 and migration ability of EPCs were enhanced significantly in group b ( $P<0.05$ ), and the proliferation ability of EPCs was also enhanced. Compared with group b, the mRNA expression of CXCR4 was decreased significantly in group d and e ( $P<0.05$ ), and the migration ability of EPCs were decreased significantly in group c, d and e ( $P<0.05$ ); and the proliferation ability of EPCs was obviously slow down in dose-dependant manner. **CONCLUSIONS:** Activation of PAR-1 induces the proliferation and migration of EPCs in mice, and its mechanism may be related to the up-regulation of CXCR4.

**KEY WORDS** Protease-activated receptor 1; CXC receptor 4; Mice; Endothelial progenitor cells; Proliferation; Migration

发的肿瘤病理类型、生物学特性、组织化学改变等应与人体大肠癌类似。包埋法建立人大肠癌原位移植瘤的成功率较高,笔者以往的经验显示成功率达90%~100%;肿瘤的生物学特性与人大肠癌自然生长和转移过程相似,可出现肠梗阻、肝转移、腹水、种植转移、恶病质等<sup>[1-3]</sup>。但其缺点是对手术要求较高,需要操作人员有一定的手术经验和技能,而且手术耗时相对较长,动物死亡率较高。

粘贴法建立原位移植瘤,其操作相对包埋法简便易行,对操作人员而言难度较低,对实验动物创伤小。笔者在实验中采用了医用OB生物胶,该生物胶的主要成分是 $\alpha$ -氰基丙烯酸烷基酯,其生物相容性好,不会产生致癌、致畸和致突变作用,因而不会干扰本实验的结果。粘贴法在胃癌中应用较多,而在大肠癌中鲜见。

本文结果显示,两组裸小鼠成瘤率均达到100%,均得到了病理证实。实验周期较短,在3周左右就能在体外扪及瘤块

\* 主治医师,硕士。研究方向:缺血性心脏病的研究。E-mail: guotaibi@163.com

生长。但包埋法组的瘤质量较粘贴法组更高,裸小鼠体质量减轻程度等恶病质表现更明显,且其肿瘤生物学特性尤其是肿瘤转移、腹水产生等较粘贴法组更明显。由此推测可能是粘贴组喷涂胶量过多,创面胶液过量会形成结晶,延缓其降解吸收,影响移植瘤的生长所致<sup>[2]</sup>,但这还需要进一步的研究证实。总之,两种方法建模均表现出良好的成瘤率和肿瘤生长,但包埋法组能更好地表现肿瘤转移等生物学特性。

### 参考文献

- [1] 刘静,史勤,吕祥.健脾复方对人大肠癌移植瘤裸小鼠肿瘤生长转移的影响[J].辽宁中医药大学学报,2010,12(8):57.
- [2] 苏晓妹,魏品康,张涛,等.人胃癌完整组织块裸鼠原位种植转移模型的建立方法和技巧[J].西南国防医药,2009,19(12):1182.
- [3] 王磊,陈卫昌,谢学顺,等.塞来昔布对实验性结肠癌原位移植瘤生长及血管形成的影响[J].中华肿瘤防治杂志,2006,13(17):1295.

(收稿日期:2013-03-19 修回日期:2013-06-17)

蛋白酶激活受体1(Protease-activated receptor 1, PAR-1)是一种带有7个跨膜区的G蛋白偶联受体,研究发现PAR-1在促进细胞分裂、增殖和血管形成中发挥着重要作用<sup>[1-2]</sup>。CXC趋化因子受体4(CXC receptor 4, CXCR4)作为基质细胞衍生因子1(SDF-1)的唯一受体,广泛表达于多种细胞组织中,与SDF-1结合,构成SDF-1/CXCR4轴,SDF-1/CXCR4轴通过调控内皮祖细胞(Endothelial progenitor cells, EPCs)参与血管新生及其相关的生物学效应<sup>[3]</sup>。AMD3100是CXCR4拮抗药,可有效阻断SDF-1和CXCR4的相互作用,但并不活化CXCR4<sup>[4-5]</sup>。本文通过观察PAR-1活化对小鼠EPCs增殖和迁移的影响,以及AMD3100对该过程的干预作用,探讨PAR-1通过SDF-1/CXCR4轴影响EPCs功能的相关机制。

## 1 材料

ABI PRISM7000定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国应用生物系统公司)。

AMD3100(美国Tocris生物科技公司,批号:3299-1,分析纯);小牛血清(美国Hyclone公司);淋巴细胞分离液(天津灏洋公司,密度梯度:1.077);Trizol试剂、M-MLV逆转录试剂盒(美国Invitrogen公司);兔抗SDF-1多克隆抗体(武汉博士德公司);SYBR Green Mix(上海东洋纺公司);纤维连接蛋白(FN)、PAR-1激活剂SFLLRN(美国Sigma公司);伊红美蓝(EMB)培养基(美国Cambrex公司);异硫氰酸荧光素(FITC)-荆立凝集素1(UEA-1)(美国Vector公司);DiI荧光标记的乙酰化低密度脂蛋白(DiI-ac-LDL)(美国Molecular Probes公司)。

BALB/c小鼠,♂,6周龄,体质量约20g,SPF级,第三军医大学实验动物中心提供,使用许可证号:SCXK(军)2002007。

## 2 方法

### 2.1 EPCs的分离、培养和鉴定

将BALB/c小鼠采用颈椎脱臼法处死,用体积分数为75%的乙醇浸泡10min后,超净工作台内取出双下肢股骨和胫骨,以4℃预冷的0.01mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)5ml冲洗骨髓腔,反复吹打以获得骨髓单细胞悬液,然后将单细胞悬液缓慢滴加在密度梯度为1.077的淋巴细胞分离液上,20℃下离心半径8cm,2000r/min离心20min,用滴管轻缓取出中间白色云雾状单个核细胞层,PBS洗涤离心2次。然后将收集的细胞悬浮于EMB内皮细胞培养基中,按细胞密度 $10^7 \sim 10^8$ 个接种于已包被纤维连接蛋白的培养瓶内,于37℃、5%CO<sub>2</sub>恒温培养。通过检测细胞摄取DiI-ac-LDL和结合FITC-UEA-1的能力表明EPCs培养成功。

### 2.2 PAR-1活化的预处理

取增殖期的EPCs用细胞刮子刮下,计数后接种于含1%小牛血清EBM培养基的6孔培养板中(每孔 $2 \times 10^6$ 个),37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中过夜,然后加入SFLLRN使其终浓度为50μmol/L,培养24h后更换为新鲜培养基。

### 2.3 分组与给药

取预处理的EPCs,加入AMD3100使其终浓度分别为0、50、100、200nmol/L(即b、c、d、e组),同时另设立空白对照(预先未活化,也不加AMD3100,即a组),每组至少重复3次。

### 2.4 CXCR4 mRNA的测定

取“2.3”项下各组EPCs,采用荧光定量实时PCR方法,首先用Trizol试剂抽提细胞总RNA,紫外分光光度计定量后置于一70℃保存备用。按M-MLV逆转录试剂盒说明书进行操作,37℃15min,85℃5s,转录成cDNA。然后在ABI PRISM 7000定量PCR仪上扩增,总体积20μl,包括SYBR Green Mix 10μl、cDNA模板2μl、上下游引物各0.5μl。反应条件:94℃预变性2min,94℃变性30s,57℃退火40s,72℃延伸30s,共40个循环。分析得到阈值循环数,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,采用相对定量法计算CXCR4 mRNA表达量。CXCR4上游引物:5'-GAAATGGAGCCATCAGTATATACA-3',下游引物:5'-CCAGGGTTCGCCATAAAGTCA-3',扩增片段长度317bp;GAPDH上游引物:5'-GGGGAGCCAAAGGGTCATCATCT-3',下游引物:5'-GAGGGGCCATCCA-CAGTCTTCT-3',扩增片段长度235bp。

### 2.5 EPCs增殖活性测定

取“2.3”项下各组EPCs,采用MTT法,将活化后的EPCs以每孔 $0.5 \times 10^6$ 个加入96孔板中,每组设3个复孔,于培养箱中培养24、48、72、96h后,每孔加入5mg/ml的MTT 20μl孵育4h,吸弃上清液,加入200μl二甲基亚砷(DMSO)震荡10min,于490nm波长处测定吸光度(A),并绘制细胞增殖曲线。吸光度越大,细胞增殖越明显。

### 2.6 EPCs迁移测定

采用Transwell小室共培养的方法,聚碳酸酯膜为8.0μm孔径,上室加入“2.3”项下处理后的EPCs(每孔 $2 \times 10^4$ 个),下室加入SDF-1(100ng/ml),作用16h后结晶紫染色,常规拍照并计数每个视野的细胞数。

### 2.7 统计学处理

采用SPSS 13.0软件进行分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用配对t检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 CXCR4 mRNA表达变化

与a组( $11.25 \pm 1.28$ )比较,EPCs在50μmol/L SFLLRN作用下CXCR4 mRNA表达量明显增加( $27.96 \pm 1.42$ )( $P < 0.05$ )。与b组( $27.96 \pm 1.42$ )比较,50nmol/L AMD3100可使活化后的EPCs中CXCR4 mRNA表达量有减少趋势( $24.17 \pm 1.09$ )( $P > 0.05$ ),而100、200nmol/L AMD3100能使活化后的EPCs中CXCR4 mRNA表达量明显减少[( $3.57 \pm 0.33$ )、( $2.31 \pm 0.21$ )]( $P < 0.05$ )。

### 3.2 EPCs增殖曲线

与a组比较,SFLLRN通过特异性激活PAR-1,可明显促进EPCs的增殖;但活化后的EPCs,在加入不同浓度AMD3100作用后细胞增殖明显减慢,各组EPCs的增殖曲线见图1。

### 3.3 EPCs迁移能力变化

b组[( $28.87 \pm 1.96$ )个]EPCs中每个视野迁移细胞的数目较a组[( $15.07 \pm 2.22$ )个]明显增加( $P < 0.05$ );与b组比较,c、b、d组[( $24.20 \pm 1.74$ )、( $10.93 \pm 1.28$ )、( $6.07 \pm 1.03$ )个]EPCs的迁移细胞数目明显减少( $P < 0.05$ )。

## 4 讨论

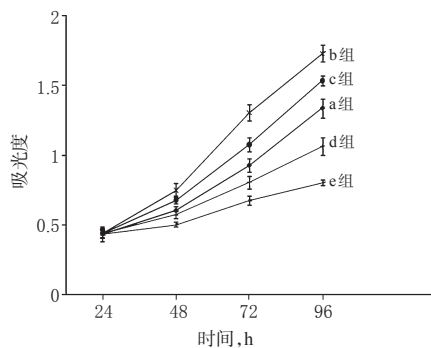


图1 不同组别EPCs的增殖曲线

Fig 1 Proliferation curves of EPCs in each group

EPCs通过再内皮化促进血管修复,在新生血管形成和损伤血管的再内皮化中起着重要作用。研究发现骨髓、脐带血及外周血中存在干细胞来源的EPCs,体外培养过程中能够保持未分化型增殖达到所需数量,在体外经诱导分化可表达内皮细胞特征性抗原<sup>[6]</sup>。

SDF-1属于CXC型趋化因子,CXCR4为SDF-1特异性受体。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,发挥多种生物学功能,在介导炎症反应、造血干细胞迁移及归巢、恶性肿瘤侵袭转移、人类免疫缺陷病毒(HIV)感染及血管形成中发挥了重要作用<sup>[7]</sup>。研究显示,CD34<sup>+</sup>骨髓间充质干细胞对SDF-1的反应性移动可被CXCR4拮抗药阻断<sup>[8]</sup>,提示SDF-1/CXCR4轴是干细胞迁移至损伤组织进行修复的途径。SDF-1/CXCR4轴不仅促进EPCs增殖、迁移,而且诱导细胞管样结构的形成,AMD3100则拮抗上述作用<sup>[9]</sup>。Son BR等<sup>[3]</sup>研究发现血管内膜损伤部位的SDF-1浓度梯度对EPCs有强烈的迁移、归巢定位作用,SDF-1/CXCR4轴通过调控EPCs参与了血管新生及其相关的生物学效应,但目前调控SDF-1/CXCR4轴影响EPCs功能的机制尚不清楚。

PAR-1是血管细胞上凝血酶的主要受体,属于G蛋白偶联受体超家族。缺乏PAR-1可导致血管脆弱、功能失调;成熟的血管内皮细胞PAR-1活化后,可以增加血管内皮生长因子(VEGF)合成和一氧化氮(NO)分泌,上调VEGF受体2(VEGFR-2)表达<sup>[10]</sup>;抑制PAR-1基因表达可抑制血管形成<sup>[11]</sup>。Cooper CR等<sup>[12]</sup>发现在前列腺癌PAR-1表达上调,通过对SDF-1的调控吸引前列腺癌细胞迁移。据此,笔者推测PAR-1可能是通过调节SDF-1/CXCR4轴达到调控EPCs动员、迁移过程,从而控制EPCs对损伤血管的修复能力。

本研究以体外培养小鼠EPCs为研究对象,观察PAR-1激动剂对EPCs的增殖和迁移的影响,并且用CXCR4拮抗药AMD3100干预。结果显示,PAR-1活化后能促进EPCs的增殖和迁移,其中伴有CXCR4 mRNA表达的增加,而AMD3100可以阻断上述作用。AMD3100是CXCR4的非肽类拮抗药,最初的研究源于AMD3100对HIV-1的抗感染作用,后来发现AMD3100能特异性与CXCR4结合,从而阻断SDF-1/CXCR4轴参与的生理过程;但由于其严重的毒副作用,目前主要用于干细胞动员和某些肿瘤的治疗<sup>[4-5,13]</sup>。本研究中,AMD3100可

阻断PAR-1活化对EPCs产生的增殖和迁移的促进作用,提示PAR-1对EPCs增殖和迁移作用与SDF-1/CXCR4轴有关。本实验为进一步探讨通过调控SDF-1/CXCR4轴以影响EPCs功能的机制提供了实验基础。

## 参考文献

- [1] Wang Z, Castresana MR, Newman WH. Reactive oxygen species-sensitive p38 MAPK controls thrombin-induced migration of vascular smooth muscle cells[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2004, 36(1): 49.
- [2] Soh UJ, Doros MR, Chen B, et al. Signal transduction by protease-activated receptors[J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 160(2): 191.
- [3] Son BR, Marquez-Curtis LA, Kucia M, et al. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by SDF-1-CXCR4 and HGF-c-met axes and involves matrix metalloproteinases[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(5): 1 254.
- [4] 常春康,张曦,赵佑山,等.CXCR4受体阻断剂AMD3100研究进展[J]. *中国实验血液学杂志*, 2011, 19(3): 831.
- [5] 周瑞明,曾荣.SDF-1/CXCR4拮抗剂AMD3100应用方面的研究进展[J]. *广东医学院学报*, 2010, 28(2): 205.
- [6] Jujo K, Ii M, Losordo DW. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 45(4): 530.
- [7] 孟晨,吴小涛.SDF-1/CXCR4信号轴在调节干细胞迁移及发育中的作用[J]. *东南大学学报:医学版*, 2011, 30(4): 625.
- [8] Jo DY, Rafii S, Hamada T, et al. Chemotaxis of primitive hematopoietic cells in response to stromal cell-derived factor-1[J]. *J Clin Invest*, 2000, 105(1): 101.
- [9] 陈飞兰,张华蓉,徐承平,等.SDF-1/CXCR4轴活化诱导人内皮祖细胞增殖、迁移及管型形成[J]. *基础医学与临床*, 2008, 28(5): 428.
- [10] Dupuy E, Habib A, Lebret M, et al. Thrombin induces angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in human endothelial cells: possible relevance to HIF-1alpha[J]. *J Thromb Haemost*, 2003, 1(5): 1 096.
- [11] Zhang H, Vakil V, Braunstein M, et al. Circulating endothelial progenitor cells in multiple myeloma: implications and significance[J]. *Blood*, 2005, 105(8): 3 286.
- [12] Cooper CR, Chay CH, Gendernalik JD, et al. Stromal factors involved in prostate carcinoma metastasis to bone [J]. *Cancer*, 2003, 97(Suppl 3): 739.
- [13] De Clercq E. The bicyclam AMD3100 story[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2(7): 581.

(收稿日期:2013-05-30 修回日期:2013-07-23)