文章编号:1000-5404(2014)16-1643-04

论著

过氧化物酶增殖激活受体γ通过上调组织蛋白酶L表达增强内皮祖细胞的侵袭能力

王 强[1,2],余 洁[1],赵 刚[1],卢 巍[1],邓梦杨[1],康华利[1],黄 岚[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军心血管病研究所[1];601083 成都,成都军区总医院心血管内科[2])

[摘要] **目的** 观察过氧化物酶增殖激活受体γ(peroxisome proliferator-activated receptor-γ, PPARγ)激活后对内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)侵袭能力的影响并探讨其分子机制。**方法** 分离和培养大鼠骨髓源性EPCs,分别用PPARγ激动剂罗格列酮(0、1、5、10 μmol/L)、PPARγ拮抗剂GW9662(5 μmol/L)或组织蛋白酶L(cathepsin L)抑制剂Z-FF-FMK(10 μmol/L)干预EPCs后,采用基质胶侵袭实验检测EPCs的侵袭能力;半定量RT-PCR、Western blot检测cathepsin L mRNA和蛋白的表达。**结果** PPARγ激动剂罗格列酮(1~10 μmol/L)呈剂量依赖增强EPCs的侵袭能力、上调EPCs中cathepsin L的mRNA和蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$),而PPARγ拮抗剂GW9662(5 μmol/L)可削弱罗格列酮(10 μmol/L)上调cathepsin L mRNA和蛋白表达的作用($P<0.01$);此外,GW9662(5 μmol/L)或cathepsin L抑制剂Z-FF-FMK(10 μmol/L)均可明显减弱罗格列酮(10 μmol/L)促进EPCs侵袭的作用($P<0.01$)。**结论** PPARγ激活后通过上调cathepsin L表达增强EPCs的侵袭能力。

[关键词] 过氧化物酶增殖激活受体γ;内皮祖细胞;侵袭;归巢;组织蛋白酶L
[中图法分类号] R322.12;R329.28;R394.3 [文献标志码] A

PPARγ enhances invasive capacity of endothelial progenitor cells *via* up-regulation of cathepsin L

Wang Qiang[1,2], Yu Jie[1], Zhao Gang[1], Lu Wei[1], Deng Mengyang[1], Kang Huali[1], Huang Lan[1] ([1]Institute of Cardiovascular Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Department of Cardiology, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu, Sichuan Province, 610083, China)

[**Abstract**] Objective To observe the effect of peroxisome proliferator-activated receptor-γ (PPARγ) activation on the invasive capacity of endothelial progenitor cells (EPCs) and explore the underlying mechanism. Methods The rat bone marrow-derived EPCs isolated and cultured *in vitro* were treated with PPARγ agonist rosiglitazone (0, 1, 5, and 10 μmol/L), PPARγ antagonist GW9662 (5 μmol/L) or cathepsin L inhibitor Z-FF-FMK (10 μmol/L). The invasive capacity of EPCs was evaluated by Matrigel invasion assay. The mRNA and protein expression of cathepsin L were analyzed by semi-quantitative RT-PCR and Western blotting. Results Treatment of PPARγ agonist rosiglitazone increased the invasive capacity of EPCs in a dose-dependent manner ($P<0.05$, $P<0.01$). The mRNA and protein expression of cathepsin L were up-regulated by rosiglitazone in a concentration-dependent manner ($P<0.05$, $P<0.01$), which was blocked by PPARγ antagonist GW9662 (5 μmol/L) ($P<0.01$). In addition, pretreatment of EPCs with GW9662 (5 μmol/L) or cathepsin L inhibitor Z-FF-FMK (10 μmol/L) attenuated rosiglitazone-promoted EPCs invasion ($P<0.01$). Conclusion These findings demonstrate that the activation of PPARγ may enhance the invasive capacity of EPCs *via* up-regulating cathepsin L expression.

[**Key words**] peroxisome proliferator-activated receptor-γ; endothelial progenitor cells; invasion; homing; cathepsin L

Supported by the National Natural Science Foundation of China(81100112). Corresponding author: Huang Lan, Tel: 86-23-68755601, E-mail: huanglan260@126.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81100112)
[通信作者] 黄 岚,电话:(023)68755601,E-mail: huanglan260@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140803.1605.001.html(2014-08-03)

缺血性心脏病是严重危害人类健康的疾病。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells,EPCs)可从骨髓、脾脏等动员到外周血,迁移、归巢于缺血部位,促进新生

血管形成,从而减轻或缓解心肌缺血[1]。目前EPCs用于治疗缺血性心脏病的最大难题是EPCs归巢效率低,缺血性心脏病患者常伴有的众多危险因素使EPCs归巢能力进一步受损[2],因此,探讨如何促进EPCs归巢有重要意义。

过氧化物酶体增殖物激活受体γ(peroxisome proliferator-activated receptor-γ, PPARγ)是核受体超家族成员,可以通过调节其靶基因的转录,调节机体一系列生理和病理过程,包括脂质代谢、糖代谢、炎症反应和动脉粥样硬化等[3]。研究表明,PPARγ激活后可以增强EPCs的增殖、迁移和抗凋亡能力[4-6],然而,PPARγ对EPCs归巢的影响尚不清楚。

EPCs从血管内侵袭进入缺血组织是其归巢的关键环节[7]。本研究拟观察PPARγ激活后对EPCs侵袭能力的影响并探讨其分子机制,以初步阐明PPARγ在EPCs归巢于缺血组织中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

雄性SD大鼠20只,150~180 g,2月龄,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供;PPARγ激动剂罗格列酮(rosiglitazone, Rosi)、PPARγ拮抗剂GW9662购自Cayman Chemical公司;组织蛋白酶L(cathepsin L)抑制剂Z-FF-FMK购自Calbiochem公司;基质胶(BD Matrigel™ Matrix)购自BD公司;cathepsin L抗体购自Abcam公司。

1.2 大鼠骨髓源性EPCs的培养

参照课题组前期的方法[8],密度梯度离心法获取大鼠骨髓单个核细胞,以1×10^6 cells/ cm^2的密度接种于包被有纤连蛋白的培养瓶,置于含5% CO_2、饱和湿度、37 ℃培养箱中培养,至培养第4天,用PBS洗去未贴壁的细胞,加入适量培养基继续培养。培养5~7 d的细胞用于实验。

1.3 EPCs的鉴定

培养5~7 d细胞中加入DiI标记的乙酰化低密度脂蛋白(DiI-ac-LDL,2.4 μg/mL),37 ℃下避光孵育1 h;4%多聚甲醛固定细胞15 min,PBS清洗2次,将10 μg/mL的FITC标记的荆豆凝集素I(FITC-UEA-I)滴加于上述标本中,37 ℃下避光孵育1 h;荧光显微镜鉴定ac-LDL(红色)和UEA-I(绿色)双染阳性细胞即为正在分化的EPCs[9]。

1.4 基质胶侵袭实验

参照Urbich[10]的方法。将80 μL稀释后的Matrigel胶加入Transwell小室的上层,37 ℃孵育2~3 h使其成凝胶状;滤膜底面铺被0.1%明胶。EPCs培养至第6天时分别加入不同浓度的PPARγ激动剂罗格列酮(0、1、5、10 μmol/L)、PPARγ拮抗剂GW9662(5 μmol/L)或cathepsin L抑制剂Z-FF-FMK(10 μmol/L),培养24 h后,消化EPCs,用无血清培养基重悬EPCs,将1×10^5 EPCs加入Transwell小室的上层,下层加入500 μL含20% FBS的培养基;再在Transwell的上、下室均加入与之前相同的处理药物;培养16 h,取出Transwell小室,用棉签擦掉上层的细胞,无水乙醇固定5 min,DAPI染色10 min,随机选择5个视野(×400)观察侵袭到小室下层的细胞数,以每高倍视野细胞数(cells/HPF)代表EPCs的侵袭能力。

1.5 半定量RT-PCR检测

RNA提取试剂提取细胞总RNA,根据试剂盒说明书进行RT-PCR检测,引物由TaKaRa公司合成。Cathepsin L的引物序列,上游:5′-GTATGGCACGAATGAGGAAGAG-3′,下游:5′-CACAGGAGTCACACAACCCTTT-3′,终产物271 bp;GAPDH的引物序列,上游:5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′,下游:5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′,终产物452 bp;反应条件为94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,共25个循环。PCR产物采用2%琼脂糖凝胶进行电泳,Bio-Rad凝胶成像系统进行分析,测量cathepsin L和GAPDH的PCR产物电泳条带光密度,以二者比值代表cathepsin L mRNA相对表达量,分析结果。

1.6 Western blot检测

RIPA裂解液提取细胞总蛋白,BCA法测定蛋白浓度。12% SDS-PAGE电泳分离蛋白,每孔上样量30~40 μg,湿转法转移到PVDF上,含5% BSA的TBST室温下封闭1~2 h,一抗(cathepsin L、GAPDH分别1∶1 500、1∶500稀释)4 ℃过夜,TBST洗膜10 min × 3次,二抗(1∶5 000稀释)室温1 h,TBST洗膜10 min × 3次,ECL化学发光法显色、曝光。Quantity one图像分析系统进行蛋白条带灰度分析,测量cathepsin L和GAPDH蛋白的电泳条带光密度,以二者比值代表cathepsin L蛋白相对表达量,分析结果。

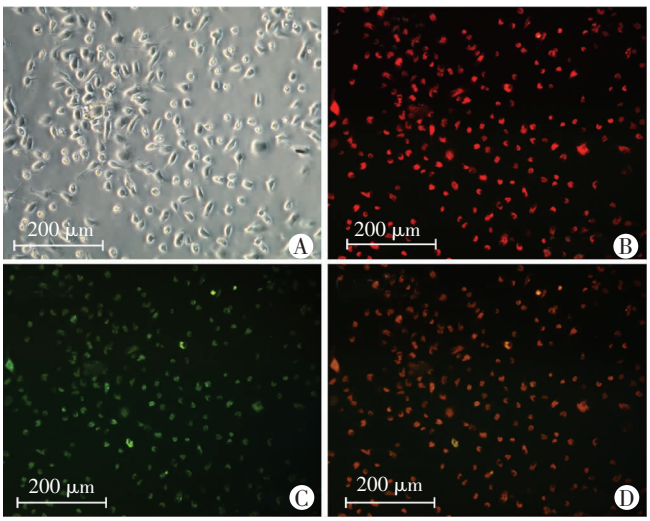
1.7 统计学处理

所有计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,使用SPSS 18.0统计学软件进行分析,组间比较选用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。

2 结果

2.1 大鼠骨髓源性内皮祖细胞的鉴定

如图1所示,红色荧光细胞为ac-LDL摄取阳性,绿色荧光细胞为UEA-I结合阳性,双染阳性细胞即为正在分化的EPCs[9]。本实验所分离培养的大鼠骨髓MNCs双染阳性率大于90%($n=10$),符合EPCs的特征。

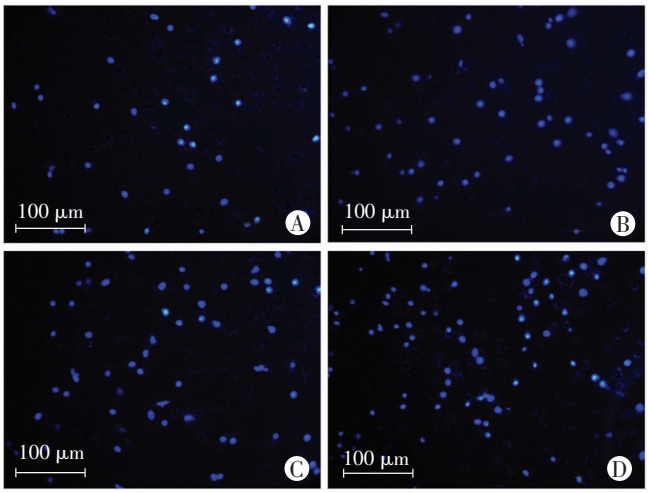


A:白光;B:ac-LDL;C:UEA-Ⅰ;D:Overlay

图1 大鼠骨髓源性内皮祖细胞的鉴定

2.2 PPARγ 激动剂罗格列酮增强 EPCs 的侵袭能力

采用基质胶侵袭实验检测 EPCs 侵袭能力；如图 2 所示，对照组和罗格列酮（1、5、10 μmol/L）组侵袭到 Tanswell 小室下层的细胞数（cells/HPF）分别为：（36.21 ± 4.67）、（43.70 ± 7.59）、（50.85 ± 6.04）、（54.62 ± 7.38），提示罗格列酮可增强 EPCs 的侵袭能力（$P < 0.05$，$P < 0.01$，$n = 6$），并呈一定的剂量依赖关系。



A：对照组；B：ROSi 1 μmol/L；C：ROSi 5 μmol/L；D：ROSi 10 μmol/L

图 2 罗格列酮（Rosi）增强 EPCs 的侵袭能力观察

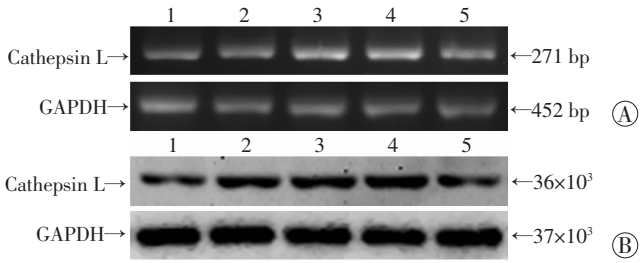
2.3 激活 PPARγ 上调 EPCs 中 cathepsin L 的表达

2.3.1 激活 PPARγ 上调 EPCs 中 cathepsin L mRNA 的表达

采用半定量 RT-PCR 检测 PPARγ 激活后对 EPCs 中 cathepsin L mRNA 表达水平的影响；如图 3A 所示，对照组和罗格列酮（1、5、10 μmol/L）组 cathepsin L/GAPDH 光密度比值分别为：（1 ± 0）、（1.48 ± 0.33）、（1.79 ± 0.27）、（1.98 ± 0.37），提示罗格列酮呈浓度依赖上调 cathepsin L mRNA 的表达（$P < 0.05$，$P < 0.01$，$n = 5$），而 PPARγ 拮抗剂 GW9662（5 μmol/L）预处理可以明显减弱罗格列酮（10 μmol/L）上调 cathepsin L mRNA 表达的作用［cathepsin L/GAPDH 光密度比值：（1.13 ± 0.21）*vs*（1.98 ± 0.37），$P < 0.01$，$n = 5$］；说明激活 PPARγ 可上调 EPCs 中 cathepsin L mRNA 的表达。

2.3.2 激活 PPARγ 上调 EPCs 中 cathepsin L 蛋白的表达

采用 Western blot 检测 PPARγ 对 EPCs 中 cathepsin L 蛋白表达的影响；如图 3B 所示，对照组和罗格列酮（1、5、10 μmol/L）组 cathepsin L/GAPDH 光密度比值分别为：（1 ± 0）、（1.36 ± 0.25）、（1.70 ± 0.38）、（1.91 ± 0.36），提示罗格列酮呈浓度依赖的上调 cathepsin L 蛋白的表达（$P < 0.05$，$P < 0.01$，$n = 5$），而 PPARγ 拮抗剂 GW9662（5 μmol/L）预处理可以明显减弱罗格列酮（10 μmol/L）上调 cathepsin L 蛋白表达的作用［cathepsin L/GAPDH 光密度比值：（1.14 ± 0.23）*vs*（1.91 ± 0.36），$P < 0.01$，$n = 5$］；说明激活 PPARγ 可上调 EPCs 中 cathepsin L 蛋白的表达。

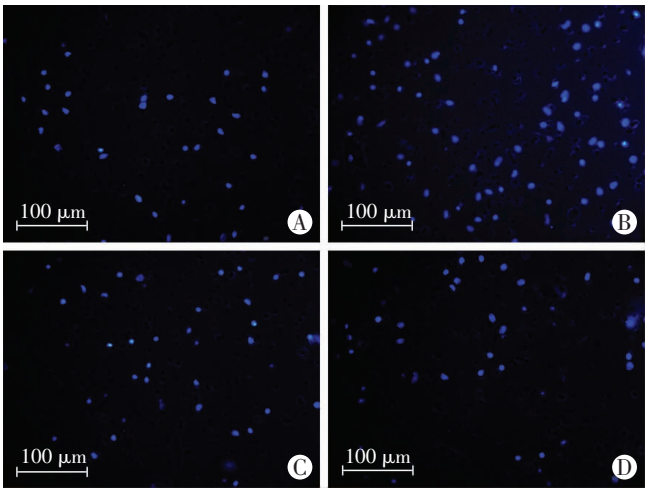


A：RT-PCR 检测结果；B：Western blot 检测结果　1：对照组；2：罗格列酮（ROSi）1 μmol/L；3：ROSi 5 μmol/L；4：ROSi 10 μmol/L；5：ROSi（10 μmol/L）+ GW9662（5 μmol/L）

图 3 激活 PPARγ 上调 EPCs 中 cathepsin L 的表达

2.4 罗格列酮通过 PPARγ-Cathepsin L 途径增强 EPCs 的侵袭能力

如图 4 所示，采用 PPARγ 拮抗剂 GW9662（5 μmol/L）预处理 30 min 后，罗格列酮（10 μmol/L）增强 EPCs 侵袭能力的效应显著减弱［侵袭到 Tanswell 小室下层的细胞数（cells/HPF）：（37.52 ± 5.72）*vs*（51.70 ± 7.89），$P < 0.01$，$n = 6$］；同样的，Cathepsin L 抑制剂（Z-FF-FMK，10 μmol/L）也明显阻断了罗格列酮（10 μmol/L）促进 EPCs 侵袭的作用（$P < 0.01$，$n = 6$）；说明罗格列酮通过 PPARγ-Cathepsin L 途径增强 EPCs 的侵袭能力。



A：对照组；B：罗格列酮（ROSi）10 μmol/L；C：ROSi（10 μmol/L）+ GW9662（5 μmol/L）；D：ROSi（10 μmol/L）+ Z-FF-FMK（10 μmol/L）

图 4 罗格列酮通过 PPARγ-Cathepsin L 依赖途径增强 EPCs 的侵袭能力

3 讨论

冠状动脉粥样硬化导致的缺血性心脏病是严重危害人类健康的疾病。EPCs 是一类成体干细胞，EPCs 可从骨髓、脾脏等动员到外周血，迁移、归巢于缺血部位，促进新生血管形成，从而减轻或缓解心肌缺血[1]。EPCs 在缺血性心脏病的治疗中有良好的应用前景，然

而EPCs向缺血心肌组织归巢的效率低,而缺血性疾病患者常伴有的众多心血管病危险因素使EPCs归巢能力进一步受损,导致治疗效果有限[2]。因此,在EPCs用于缺血性心脏病的治疗中,如何提高EPCs的归巢效率成为当前亟待解决的问题。

EPCs归巢包括趋化、黏附和侵袭等过程,其中EPCs从血管内侵袭进入缺血组织是EPCs归巢的关键环节[7, 10]。本研究发现,PPARγ激动剂罗格列酮呈剂量依赖增强EPCs的侵袭能力。因此,我们推测PPARγ激动剂可能通过增强EPCs的侵袭能力、促进EPCs归巢,从而促进缺血组织的血管新生[11-12]。那么PPARγ激动剂罗格列酮又是如何增强EPCs的侵袭能力呢?

cathepsin L属于木瓜蛋白酶,cathepsin L由一个信号肽、一个前肽和一个酶的催化反应区组成。可释放到胞质或组织间隙,可降解细胞成分或细胞外基质成分,参与肿瘤的浸润与转移、关节炎、骨质疏松等病程[13]。研究证实,cathepsin L高表达于EPCs,在EPCs降解细胞外基质和向缺血组织侵袭的过程中发挥着重要作用,介导了EPCs归巢于缺血组织参与新生血管形成的过程[10];此外,cathepsin L参与了心肌梗死后心脏修复与重构的过程,在心梗后心脏修复的过程中,cathepsin L $^{-}/^{-}$小鼠心脏缺血部位的新生血管数量明显减少[14],提示cathepsin L在EPCs侵袭、归巢于缺血组织和血管新生的过程中发挥着重要的作用。本研究发现PPARγ激动剂罗格列酮呈浓度依赖上调EPCs中cathepsin L的mRNA和蛋白表达,而PPARγ特异性拮抗剂GW9662可以阻断罗格列酮上调cathepsin L表达的效应,提示罗格列酮通过激活PPARγ上调EPCs中cathepsin L的表达。进一步的实验结果显示,PPARγ拮抗剂GW9662或cathepsin L抑制剂Z-FF-FMK预处理后,罗格列酮促进EPCs侵袭的作用显著减弱,提示罗格列酮可通过PPARγ-cathepsin L途径增强EPCs的侵袭能力。

综上所述,PPARγ激活后可以通过上调cathepsin L表达增强EPCs的侵袭能力,进而促进EPCs向缺血组织的归巢。然而,本实验仅从细胞实验证实了上述设想,进一步的研究需在动物体内观察PPARγ激活后对EPCs归巢的影响,以及cathepsin L在其中的作用,研究结果将为缺血性心脏病的防治提供新思路。

参考文献:

[1] Alev C, Ii M, Asahara T. Endothelial progenitor cells: a novel tool for the therapy of ischemic diseases[J]. Antioxid & Redox Signal, 2011, 15(4): 949-965.

[2] Barsotti M C, Santoni T, Picoi M E L, *et al*. Endothelial progenitor cell homing in human myocardium in patients with coronary artery disease[J]. Int J Cardiol, 2014, 172(2): 516-517.

[3] Ahmadian M, Suh J M, Hah N, *et al*. PPARγ signaling and metabolism: the good, the bad and the future[J]. Nat Med, 2013, 19(5): 557-566.

[4] Liang C, Ren Y, Tan H, *et al*. Rosiglitazone via upregulation of Akt/eNOS pathways attenuates dysfunction of endothelial progenitor cells, induced by advanced glycation end products[J]. Br J Pharmacol, 2009, 158(8): 1865-1873.

[5] Werner C, Gensch C, P ss J, *et al*. Pioglitazone activates aortic telomerase and prevents stress-induced endothelial apoptosis[J]. Atherosclerosis, 2011, 216(1): 23-34.

[6] Zhang H F, Wang L, Yuan H J, *et al*. PPAR-γ agonist pioglitazone prevents apoptosis of endothelial progenitor cells from rat bone marrow[J]. Cell Biol Int, 2013, 37(5): 430-435.

[7] Chavakis E, Dimmeler S. Homing of progenitor cells to ischemic tissues[J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 15(4): 967-980.

[8] 陈剑飞, 黄岚, 于世勇, 等. 晚期糖基化终末产物对骨髓内皮祖细胞功能的影响及意义[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(3): 187-190.

[9] 赵晓辉, 吴楠, 尹扬光, 等. 雌二醇调控小鼠内皮祖细胞凋亡及体外血管新生研究[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(13): 1399-1402.

[10] Urbich C, Heeschen C, Aicher A, *et al*. Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization[J]. Nat Med, 2005, 11(2): 206-213.

[11] 何泉, 雷寒, 柳青, 等. PPAR-γ激动剂促大鼠急性心肌梗死后血管新生与eNOS表达调控[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(20): 1989-1992.

[12] Nagahama R, Matoba T, Nakano K, *et al*. Nanoparticle-mediated delivery of pioglitazone enhances therapeutic neovascularization in a murine model of hindlimb ischemia[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32(10): 2427-2434.

[13] Reiser J, Adair B, Reinheckel T. Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease[J]. J Clin Invest, 2010, 120(10): 3421-3431.

[14] Sun M, Chen M, Liu Y, *et al*. Cathepsin-L contributes to cardiac repair and remodelling post-infarction[J]. Cardiovasc Res, 2011, 89(2): 374-383.

(**收稿**:2013-12-25;**修回**:2014-03-26)

(编辑 栾 嘉)