DOI:10.16016/j.1000-5404.201603040

斯钙素1激活PI3K/Akt/eNOS通路促进内皮祖细胞增殖和迁移

袁方正圆,杨 杰,王彦伟,张 弢,黄 岚 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军心血管病研究所)

[摘要] **目的** 研究斯钙素1(stanniocalcin 1,STC1)对内皮祖细胞(endothelial precusor cells,EPCs)增殖和迁移的影响并探讨其机制。**方法** 密度梯度离心法分离、培养后,采用荧光双染法鉴定SD大鼠脾源性EPCs。不同浓度人重组斯钙素1(recombinant human stanniocalcin 1,rhSTC1)处理EPCs,结合siRNA技术干扰EPCs STC1表达,检测EPCs增殖能力及迁移能力的变化;观察STC1对蛋白激酶B(protein kinase B,PKB/Akt)、内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase,eNOS)及其磷酸化水平的影响;然后观察使用磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase,PI3K)特异性抑制剂LY294002和eNOS特异性抑制剂L-NAME预处理的EPCs对rhSTC1的反应。**结果** 荧光双染法鉴定EPCs阳性率约为88.5%;外源性给予rhSTC1呈浓度依赖性的促进EPCs增殖与迁移;而干扰内源性STC1的表达,则抑制其增殖与迁移;外源性给予rhSTC1增加EPCs中Akt和eNOS的磷酸化水平,而运用PI3K抑制剂(LY294002)和eNOS抑制剂(L-NAME)分别处理EPCs后,rhSTC1诱导的EPCs增殖与迁移能力明显降低。**结论** STC1通过激活PI3K/Akt/eNOS信号通路,增强EPCs增殖、迁移能力,为损伤血管的修复提供了新的靶点。

[关键词] 斯钙素1;内皮祖细胞;增殖;迁移;蛋白激酶B;内皮型一氧化氮合酶
[中图法分类号] R322.12; R329.28; R345.7 [文献标志码] A

Stanniocalcin 1 promotes proliferation and migration of endothelial progenitor cells *via* PI3K/Akt/eNOS pathway activation

Yuan Fangzhengyuan, Yang Jie, Wang Yanwei, Zhang Tao, Huang Lan (Institute of Cardiovascular Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of stanniocalcin 1 (STC1) on the proliferation and migration of endothelial progenitor cells (EPCs), and investigate the potential mechanism involved. **Methods** EPCs were isolated from the spleens of Sprague-Dawley rats by density-gradient centrifugation, and then cultured and identified with double-fluorescent immunostaining. These EPCs were treated with recombinant human STC1 at different concentrations, or transfected with its siRNA to silence the STC1 expression. The proliferation and migration properties of these EPCs as well as the effects of STC1 on the expression levels of protein kinase B (Akt), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and their phosphorylation were detected. Selective phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K) inhibitor (LY294002) and eNOS inhibitor (L-NAME) were used to reverse the response of pre-treated EPCs to rhSTC1. **Results** Double-fluorescent immunostaining indicated that the purity of our EPCs was about 88.5%. Exogenous rhSTC1 treatment promoted the proliferation and migration of EPCs in a dose-dependent manner *via* the PI3K/Akt/eNOS pathway activation, which was reflected by the increasing of Akt and eNOS phosphorylation levels. Endogenous STC1-expression silence interfered the proliferation and migration of EPCs, and inhibitors LY294002 and L-NAME inhibited the

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81370211)
[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.20160612.0901.002.html(2016-06-12)

rhSTC1-induced effect on pre-treated EPCs by blocking PI3K/Akt/eNOS pathway. **Conclusion** STC1 enhances EPCs to proliferate and migrate by activating PI3K/Akt/eNOS pathway. Our findings maybe provide a new therapeutic target for the repair of injured vascular endothelium.

[**Key words**] stanniocalcin 1; endothelial progenitor cells; proliferation; migration; protein kinase B; endothelial nitric oxide synthase

Supported by the General Program of the National Natural Science Foundation of China (81370211). Corresponding author: Huang Lan, Tel: 86-23-68755601, E-mail: huanglan260@126.com

内皮祖细胞(endothelial precusor cells,EPCs)是内皮细胞的前体细胞,可靶向归巢至损伤血管部位有效促进内皮修复。但 EPCs 数目和有效的定向迁移影响了 EPCs 靶向治疗临床应用,找到调节 EPCs 增殖、迁移的关键靶点对于调控 EPCs 有效修复血管至关重要。斯钙素 1(stanniocalcin 1,STC1)是一种糖蛋白激素,广泛存在于人富含血管的器官、组织中,最近的研究表明 STC1 能保护心肌细胞、内皮细胞对抗有害刺激,有效促进细胞增殖、迁移的作用[1]。STC1 对 EPCs 的功能影响研究尚少。本实验拟观察 STC1 对 EPCs 增殖、迁移的影响,并研究 STC1 是否通过 PI3K/Akt/eNOS 信号通路起作用,以期为以提高 EPCs 功能为基础的细胞靶向治疗提供新依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

大鼠淋巴细胞分离液购于灏洋生物制品公司(中国),DMEM 低糖培养基和胎牛血清购自 Gibico 公司(美国),胰酶购自 HyClone 公司(美国),rhSTC1 购自 Biovendor 公司(英国),STC1 抗体购自 Santa Cruz 公司(美国),siRNA STC1 来源于上海吉玛制药技术有限公司(中国),Lipofectamine lipo2 000 购自 Invitrogen 公司(美国),PI3K 抑制剂 LY294002 和 eNOS 抑制剂 L-NAME 购自 Sigma 公司(美国),Akt、p-Akt(S1177)及 eNOS、p-eNOS(S1177)抗体来源于 Cell Signaling Technology 公司(美国),Transwell 细胞小室购自 Millipore 公司(美国)。

1.2 EPCs 的分离培养

雄性 SD 大鼠 2 只,体质量 150 g 左右,由新桥医院实验动物中心提供。脱臼法处死,无菌操作分离脾脏。超净工作台上,200 目滤网放在玻璃皿上,再将脾脏置于滤网上。剪碎脾脏用 4 ℃预冷的无菌磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,至滤网上组织发白。15 mL 离心管加 4 mL 大鼠淋巴细胞分离液,将滤过的液体轻轻吸入离心管中,滤液约 8 mL,4 ℃ 2 000 r/min 离心 20 min。取出离心管,轻轻吸出离心管中间白色薄膜层,此为单个核细胞。吸取的单个核细胞加入装有 PBS 的离心管中,1 500 r/min 离心洗涤,重复 2 次。洗涤后,弃除 PBS,管内加入含 10% 优质胎牛血清的 DMEM 低糖培养基,用吸管轻轻吹打混匀。接种至 6、24 孔板或者 96 孔板中,细胞置 5% CO_2、37 ℃、饱和湿度培养箱中培养,第 2 天换液后每 3 天换液。

1.3 EPCs 荧光双染鉴定

4~7 d 后,培养的细胞与 2.4 μg/mL DiI-ac-LDL 避光孵育 1 h。吸除孵育液,PBS 清洗 3 次,4% PFA 固定,吸除液体,PBS 清洗 3 次。10 μg/mL FITC-UEA-I 避光孵育 1 h。PBS 清洗 1 次。DiI-ac-LDL 和 FITC-UEA-I 双染阳性细胞为 EPCs。

1.4 rhSTC1 对 EPCs 增殖的影响

取出培养了 6 d 的 EPCs 96 孔板,每组加入相应浓度的 rhSTC1,未处理组为对照,放回培养箱培养。24 h 后取出,每孔加入 CCK-8 检测试剂 10 μL,将 96 孔板放回培养箱中孵育 4 h 后取出置于酶标仪中,波长 450 nm 处测定光密度值[$D(450)$]。

1.5 rhSTC1 对 EPCs 迁移的影响

24 孔板中每个孔中加入加入 500 μL 含 10% 胎牛血清 DMEM 低糖培养基,待测孔加入 rhSTC1,其稀释终浓度为 20、50、100 μg/mL,未处理组为对照。将 Tranwell 小室放入 24 孔板中,胰酶消化重悬 EPCs,每孔加入 200 μL 含 2×10^5 个细胞的无血清 DMEM 低糖培养基细胞悬液。盖好板子,37 ℃,饱和湿度,5% CO_2 培养箱培养 16 h。PBS 漂洗 2 次,无水乙醇固定 30 s,PBS 漂洗 1 次。棉签轻轻擦去上层未迁移细胞,结晶紫染色 5 min,PBS 漂洗 3 次。在 200 倍显微镜计数迁移细胞,随机选取 5 个视野。

1.6 siRNA 沉默 STC1 对 EPCs 增殖、迁移的影响

siRNA STC1 正义链:5′-GCUCAAUGUUUGCAGCAUUTT-3′,反义链:5′-AAUGCUGCAAACAUUGAGCTT-3′,TT 为 3′端悬头。siRNA 阴性对照为与 STC1 序列无同源性的对照,未处理组作对照。24 孔板(或 96 孔板)用不含双抗(青霉素、链霉素)的 10% 优质胎牛血

清和 DMEM 低糖培养基培养 EPCs,培养至第 5 天,细胞密度 60% ~80%,准备待用。取 20 pmol siRNA STC1 或 siRNA 阴性对照(96 孔板 5 pmol)溶于 50 μL 无血清 DMEM 低糖培养基稀释配制成 A 液。1 μL(96 孔板 0.25 μL)lipo2 000 加入 50 μL 无血清 DMEM 低糖培养基,混匀,室温放置 5 min,配制为 B 液。A、B 液混合,放置 20 min。期间将待用细胞培养板内培养基换为无血清培养基,每孔 400 μL。AB 混合液加入对应孔内 37 ℃、饱和湿度,5% CO_2 培养箱孵育。4 ~6 h 后吸弃细胞培养板内培养液,换为含 10% 优质胎牛血清的 DMEM 低糖培养基。放入孵箱继续培养。转染 48 h 后,CCK-8 检测增殖能力,Transwell 检测迁移能力。

1.7 STC1 对 EPCs 中 PI3K/Akt/eNOS 信号通路相关蛋白表达影响

1.7.1 rhSTC1 对 EPCs 中 Akt 和 eNOS 表达的影响 20、50、100 μg/mL rhSCT1 孵育 EPCs 24 h,未处理组为对照,提取细胞总蛋白,Western blot 检测 p-Akt、p-eNOS 和 t-Akt、t-eNOS 表达。

1.7.2 siRNA 沉默 STC1 对 EPCs 中 Akt 和 eNOS 表达的影响 培养 5 d 的 EPCs 利用 siRNA 沉默技术抑制 STC1 的表达,培养 48 h。提取 EPCs 总蛋白,Western blot 检测 p-Akt、p-eNOS 和 t-Akt、t-eNOS 表达。

1.8 LY294002(PI3K 特异性抑制剂)和 L-NAME(eNOS 特异性抑制剂)对 EPCs 增殖、迁移的影响 10 μmol/L LY294002(PI3K 特异性抑制剂)和 100 μmol/L L-NAME(eNOS 特异性抑制剂)分别预处理 EPCs 30 min,再加入终浓度 50 μg/mL rhSCT1 孵育 24 h;未加抑制剂,只加 rhSCT1 为 STC1 组,未处理组为对照。分别采用 CCK-8 和 Transwell 细胞迁移实验检测 EPCs 增殖能力和迁移能力。

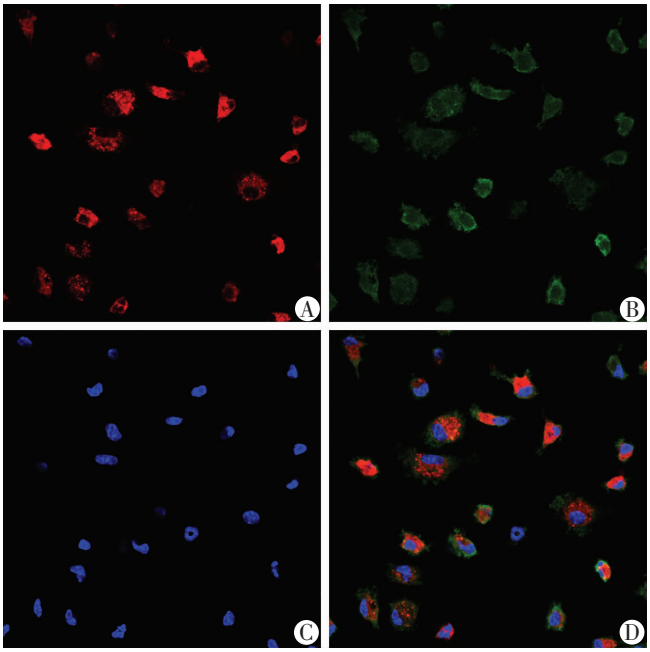
1.9 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 18.0 统计学软件分析。多组之间比较采用单因素方差分析,组间两两比较用 Dunnett-t 检验。

2 结果

2.1 EPCs 的鉴定

红色荧光(图 1A)表示具有摄取 Dil-acLDL 的能力的细胞;绿色荧光(图 1B)表示能与 FITC-UEA-1 结合的细胞;图像融合显示双染的细胞即为 EPCs(图 1D)。蓝色荧光(图 1C)表示细胞核 DAPI 染色。随机视野(n =5)计数双染阳性细胞百分比为(88.5 ± 5.2)%。



A:Dil-acLDL 阳性细胞;B:FITC-UEA-1 阳性细胞;C:DAPI 阳性细胞;D:双阳性细胞为正在分化的 EPCs

图 1 激光共聚焦显微镜观察吞噬 Dil-acLDL 和 UEA-1 鉴定 EPCs (×400)

2.2 rhSTC1 对 EPCs 增殖、迁移的影响

外源性给予不同浓度(20、50、100 μg/mL)rhSTC1 处理 EPCs。CCK-8 检测细胞增殖情况显示,20 μg/mL STC1 处理组(1.41 ± 0.04)、50 μg/mL STC1 处理组(1.59 ± 0.08)、100 μg/mL STC1(1.95 ± 0.06)处理组与正常对照组(1.22 ± 0.05)相比,D(450)值都显著增加(P < 0.05),提示 rhSTC1 呈浓度依赖性地促进 EPCs 增殖。

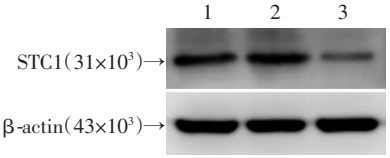
运用 Transwell 小室实验检测细胞迁移情况也表明,EPCs 迁移数量 20 μg/mL STC1 处理组(37.40 ± 1.50)、50 μg/mL STC1 处理组(43.00 ± 1.34)、100 μg/mL STC1 处理组(48.00 ± 1.23)均显著高于正常对照组[(30.00 ± 2.30),P < 0.05],说明 rhSTC1 浓度依赖性的促进 EPCs 迁移。

2.3 siRNA 沉默 STC1 对 EPCs 增殖、迁移的影响

Western blot 结果显示沉默 STC1 组与对照组相比,STC1 的表达水平明显下调(图 2)。进一步用 CCK-8 检测细胞增殖情况,发现干扰 STC1,阴性对照组 D(450)值(1.13 ± 0.05)与正常对照组(1.22 ± 0.05)相比无明显变化,而沉默 STC1 组 D(450)值(0.95 ± 0.04)较正常对照组明显减少(P < 0.05),说明抑制 EPCs 内源性 STC1 抑制了 EPCs 的增殖。

Transwell 小室实验观察细胞的迁移情况发现阴性对照组 EPCs 迁移数目(29.40 ± 1.97)与正常对照组

(30.00±2.30)相比,无明显变化。沉默 STC1 组 EPCs 迁移数目(22.00±1.67)较正常对照组(30.00±2.30)明显减少($P<0.05$),说明抑制 EPCs 内源性 STC1 抑制了 EPCs 的迁移。

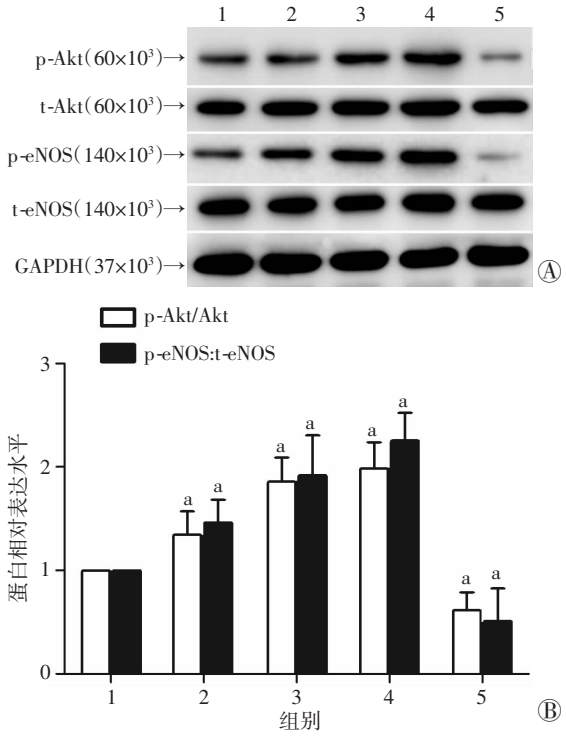


1:对照;2:阴性对照;3:siRNA STC1

图 2 Western blot 检测沉默 STC1 对 EPCs STC1 表达的影响

2.4 STC1 影响 Akt 与 eNOS 的磷酸化

rhSTC1 对 Akt 和 eNOS 的表达无影响,但明显促进 Akt 和 eNOS 的磷酸化且呈浓度依赖性。用 siRNA 转染处理 EPCs,沉默内源性 STC1 同样对 Akt 和 eNOS 的表达无明显影响,但干扰 STC1 明显下调 Akt 和 eNOS 的磷酸化水平(图 3)。提示 STC1 影响 EPCs 增殖、迁移可能与 PI3K/Akt/eNOS 信号通路有关。



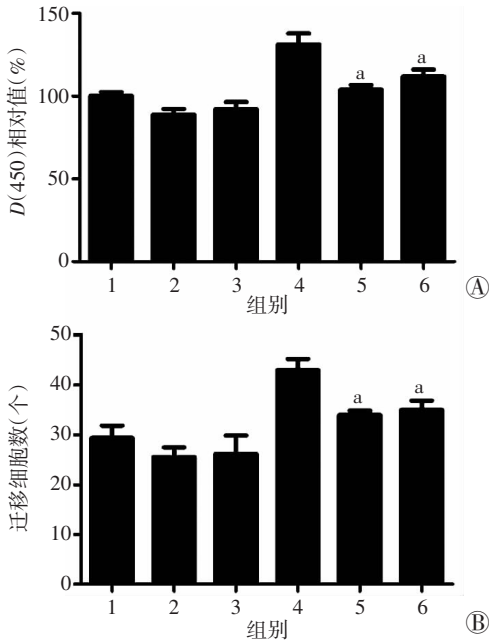
1:对照; 2:STC1 20 μg/mL; 3:STC1 50 μg/mL; 4:STC1 100 μg/mL;5:siRNA STC1

A:Western blot 检测 p-Akt-Ser^{473}、p-eNOS-Ser^{1177} 和 Akt、eNOS;B:半定量分析($n=5,\bar{x}\pm s$) a:$P<0.05$,与对照比较

图 3 Western blot 检测不同浓度 rhSTC1 和沉默 STC1 对 Akt 和 eNOS 磷酸化的影响

2.5 抑制 PI3K/Akt/eNOS 信号通路对 rhSTC1 诱导的 EPCs 增殖、迁移的影响

与 STC1 组相比,分别用 LY294002 和 L-NAME 预处理 EPCs 后,STC1 诱导的细胞增殖、迁移明显被逆转($P<0.05$,图 4),提示 STC1 促进 EPCs 增殖、迁移是通过 PI3K/Akt/eNOS 发挥作用的。



1:对照;2:LY294002;3:L-NAME;4:STC1;5:LY294002 + STC1;6:L-NAME + STC1

A: CCK-8 检测 EPCs 增殖活性($n=6,\bar{x}\pm s$);B: Transwell 小室实验检测细胞迁移数目($n=5,\bar{x}\pm s$) a:$P<0.05$,与 STC1 比较

图 4 LY294002 和 L-NAME 对 rhSTC1 诱导的 EPCs 增殖、迁移的影响

3 讨论

随着我国逐步进入老龄化社会,心脑血管疾病慢慢成为威胁人们的主要疾病。动脉粥样硬化作为多种心脑血管疾病的共同病理基础,有效的预防与治疗对控制心脑血管疾病的发生和发展至关重要。血管内皮的损伤是动脉粥样硬化的始动环节,尽早促进损伤血管的再内皮化、恢复血管内皮的完整性,可有效预防血栓形成和抑制血管平滑肌细胞的异常增生。因此,探索内皮再生机制,促进受损血管处内皮细胞的良性再生,是治疗损伤性血管疾病的关键。EPCs 是血管内皮的前体细胞,在体内能够归巢至损伤血管壁的新生内膜中分化成有功能的内皮细胞参与损伤血管的再内皮化。研究发现冠心病患者循环血中 EPCs 数量显著下降,迁移能力受损,常见心血管病危险因子如吸烟、高

脂血症、高糖血症等也损害了 EPCs 的增殖和迁移能力[2-5],导致 EPCs 归巢至受损内皮处的数量减少,修复能力显著降低。目前,对于调控 EPCs 增殖、迁移的机制研究尚不透彻,缺乏比较有效的调控手段。因此进一步研究调节 EPCs 的关键因子,有效促进 EPCs 增殖、迁移,在 EPCs 介导的细胞治疗中显得尤为重要。

STC1 是一种能促进内皮细胞增殖、迁移的糖蛋白激素,主要通过旁分泌和自分泌的形式作用于细胞线粒体内膜的受体后进一步发挥作用。STC1 在人心脏、肺、肝、肾脏等高度血管化的组织中广泛存在,与心血管功能密切相关。目前的研究认为它是一种保护性激素,保护心肌细胞对抗缺氧,防止钙超载。在内皮细胞中,能提高动脉内皮细胞的活性,促进人脐静脉内皮细胞增殖、迁移,促进血管新生。已有研究表明 STCI 通过多种通路调节了乳腺癌细胞、人脐静脉内皮细胞、生长板软骨细胞的增殖、迁移,但 STC1 对 EPCs 增殖、迁移的作用及机制尚少见报道。本实验室在前期研究发现 Notch、PI3K/Akt、MAPK 等多条信号通路参与 EPCs 增殖与迁移的调控,对 STC1 是否也通过这些通路影响 EPCs 增殖、迁移,我们进行了实验研究。

我们的研究表明,外源性给予不同浓度 rhSTC1,可浓度依赖性地促进大鼠脾源性 EPCs 的增殖、迁移,而用 siRNA 技术沉默大鼠 EPCs 内源性 STC1,EPCs 的增殖、迁移功能受到了抑制;STC1 影响 EPCs Akt 与 eNOS 的磷酸化,而抑制 Akt 与 eNOS 的磷酸化可明显阻断 STC1 对 EPCs 增殖、迁移的促进作用。

STC1 对细胞功能影响的研究已多有报道,然而其对 EPCs 生物学功能的报道尚少见到。在已有细胞学功能研究报道中,STC1 对不同细胞功能的作用也不尽相同。STC1 在乳腺癌细胞中、卵巢癌细胞、脐静脉内皮细胞中促进了细胞增殖、迁移,在乳腺癌细胞、宫颈癌细胞、生长板软骨细胞中抑制了增殖、迁移。乳腺癌中,Chang 等[6]发现抑制 STC1 能减小肿瘤大小,抑制乳腺癌细胞侵袭,而 Daniel 等[7]则证实抑制 STC1 表达,可以上调了黄体酮受体进而抑制乳腺癌细胞增殖;在卵巢癌中,Liu 等[8]发现 STC1 促进了卵巢细胞的增殖、迁移;Guo 等[9]过表达 STC1 发现宫颈癌细胞增殖和迁移的能力受到抑制。非肿瘤细胞中,Law 等[10]证实 STC1 促进了人脐静脉内皮细胞增殖、迁移。但是,Wu 等[11]的研究则发现 STC1 抑制了生长板软骨细胞的增殖;本研究中,我们发现 STC1 能促进 EPCs 的增殖、迁移,这与 Liu[8]、Law 等[10]的报道一致。STC1 不同细胞生物学功能,可能与不同细胞类型,不同的微环境有关。在生长板软骨细胞中,STC1 抑制增殖的作用可被磷酸盐转运抑制剂磷酸三钠甲酸盐逆转。说明 STC1 抑制生长板软骨细胞增殖可能与 STC1 调节钙磷代谢从而影响软骨细胞的钙磷微环境有关。在宫颈癌细胞和乳腺癌细胞中,STC1 抑制了细胞增殖、迁移,而在乳腺癌细胞中这一功能是通过上调黄体酮受体实现,说明性别差异,性激素也可能参与了 STC1 对细胞增殖、迁移的调节。

STC1 促进 EPCs 增殖、迁移通过了 PI3K/AKt/eNOS 途径。Murai 等[12]发现 STC1 通过 PI3K/AKt 信号通路增强了乳腺癌细胞侵袭性。我们的研究与之相似,发现 STC1 促进了 EPCs 中 Akt 蛋白 Ser^{473} 位点磷酸化,激活了 PI3K/AKt 信号通路。活化的 PI3K/AKt 信号通路可以进一步激活下游多条通路,常见促进细胞增殖、迁移的有 mTOR,IKK,eNOS 等。

eNOS 是调节 EPCs 功能的重要分子,与 EPCs 增殖、迁移密切相关。因此,我们推测 STC1 可能通过 PI3K/AKt 进一步激活 eNOS,进而促进 EPCs 的增殖、迁移。eNOS 的活化除了增加细胞内钙离子,促进钙调蛋白与 eNOS 结合,促进 eNOS 活化外,还可以通过 eNOS 磷酸化、热休克蛋白 90、小凹蛋白等调节 eNOS 活性。其中 eNOS 磷酸化是蛋白翻译后 eNOS 功能调控的重要手段。eNOS 丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸残基可以被磷酸化,是 eNOS 磷酸化的主要位点。现有被证实有重要作用的磷酸化位点有位于还原酶区的的 Ser^{1177} 和位于钙调素结合区的 Thr^{495}。其他的还有 Ser^{114},Ser^{633}, Tyr^{81}, and Tyr^{657}。在静息的细胞中,Ser^{1177} 位点一般不被磷酸化。但当细胞暴露于流体剪切力或接触到雌激素,VEGF,胰岛素,缓激肽时。这些刺激因子会激活 Akt,AMP 依赖的蛋白激酶[Adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK],钙调蛋白激酶Ⅱ(Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ,CaMK Ⅱ),蛋白激酶 A(Protein Kinase A,PKA)等激酶促进 eNOS 磷酸化。我们的研究证实 STC1 与雌激素和 VEGF 类似,在 EPCs 中 STC1 激活 PI3K/AKt,活化的 Akt 进一步促进了 eNOS 磷酸化位点 Ser1177 磷酸化进而激活 eNOS。

活化的 eNOS 与活化的 Akt 参与了 EPCs 的增殖、迁移、动员、血管新生等多种生物学功能[13-16]。STC1 激活 PI3K/AKt/eNOS 的具体机制还不明确,而 STC1 受体结合分析和分馏法分析显示,STC1 大多数高亲和力结合位点位于线粒体内膜上,STC1 是否通过直接结合受体,进而影响分子构象或激活下游分子激活 PI3K/AKt/eNOS 通路还有待进一步证实。Law 等[10]研究发现,STC1 在 HUVEC 中促进了 VEGF、SDF-1 等

旁分泌促血管生长因子表达,EPCs 是 ECs 前体细胞,其旁分泌功能较 ECs 更强,我们推测 STC1 也可能促进了 EPCs 表达 VEGF 等细胞因子。而大量文献证实 VEGF 可以活化 AKt/eNOS 途径,所以 STC1 也可能通过促进 EPCs 表达 VEGF,进而间接活化 Akt/eNOS 信号通路。

综上所述,我们的实验证明 STC1 可以促进大鼠脾脏来源 EPCs 的增殖和迁移,这一功能与激活 PI3K/Akt/eNOS 信号通路相关。我们的这一发现也为改善 EPCs 功能为基础的细胞靶向治疗提供了新思路。

参考文献:

[1] Yu J, Wang Q, Wang H, *et al*. Activation of liver X receptor enhances the proliferation and migration of endothelial progenitor cells and promotes vascular repair through PI3K/Akt/eNOS signaling pathway activation[J]. Vascul Pharmacol, 2014, 62(3): 150 - 161. DOI: 10.1016/j.vph.2014.05.010

[2] Groleau J, Dussault S, Turgeon J, *et al*. Accelerated vascular aging in CuZnSOD-deficient mice: impact on EPC function and reparative neovascularization[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23308. DOI: 10.1371/journal.pone.0023308

[3] Hill J M, Zalos G, Halcox J P, *et al*. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk[J]. N Engl J Med, 2003, 348(7): 593 - 600. DOI: 10.1056/NEJMoa022287

[4] Chen J Z, Zhang F R, Tao Q M, *et al*. Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia[J]. Clin Sci (Lond), 2004, 107(3): 273 - 280. DOI: 10.1042/CS20030389

[5] Ingram D A, Lien I Z, Mead L E, *et al*. *In vitro* hyperglycemia or a diabetic intrauterine environment reduces neonatal endothelial colony-forming cell numbers and function[J]. Diabetes, 2008, 57(3): 724 - 731. DOI: 10.2337/db07-1507

[6] Chang A C, Doherty J, Huschtscha L I, *et al*. STC1 expression is associated with tumor growth and metastasis in breast cancer[J]. Clin Exp Metastasis, 2015, 32(1): 15 - 27. DOI: 10.1007/s10585-014-9687-9

[7] Daniel A R, Lange C A. Protein kinases mediate ligand-independent derepression of sumoylated progesterone receptors in breast cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(34): 14287 - 14292. DOI: 10.1073/pnas.0905118106

[8] Liu G, Yang G, Chang B, *et al*. Stanniocalcin 1 and ovarian tumorigenesis[J]. J Natl Cancer Inst, 2010, 102(11): 812 - 827. DOI: 10.1093/jnci/djq127

[9] Guo F, Li Y, Wang J, *et al*. Stanniocalcin1 (STC1) Inhibits Cell Proliferation and Invasion of Cervical Cancer Cells[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53989. DOI: 10.1371/journal.pone.0053989

[10] Law A Y, Wong C K. Stanniocalcin-1 and -2 promote angiogenic sprouting in HUVECs *via* VEGF/VEGFR2 and angiopoietin signaling pathways[J]. Mol Cell Endocrinol, 2013, 374(1/2): 73 - 81. DOI: 10.1016/j.mce.2013.04.024

[11] Wu S, Yoshiko Y, De-Luca F. Stanniocalcin 1 acts as a paracrine regulator of growth plate chondrogenesis[J]. J Biol Chem, 2006, 281(8): 5120 - 5127. DOI: 10.1074/jbc.M506667200.

[12] Murai R, Tanaka M, Takahashi Y, *et al*. Stanniocalcin-1 promotes metastasis in a human breast cancer cell line through activation of PI3K[J]. Clin Exp Metastasis, 2014, 31(7): 787 - 794. DOI: 10.1007/s10585-014-9668-z

[13] Li W, Du D, Wang H, *et al*. Silent information regulator 1 (SIRT1) promotes the migration and proliferation of endothelial progenitor cells through the PI3K/Akt/eNOS signaling pathway[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(3): 2274 - 2287.

[14] Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, *et al*. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells[J]. Nat Med, 2003, 9(11): 1370 - 1376. DOI: 10.1038/nm948

[15] de-Resende M M, Huw L Y, Qian H S, *et al*. Role of endothelial nitric oxide in bone marrow-derived progenitor cell mobilization[J]. Handb Exp Pharmacol, 2007(180): 37 - 44.

[16] Chen X, Chen Q, Wang L, *et al*. Ghrelin induces cell migration through GHSR1a-mediated PI3K/Akt/eNOS/NO signaling pathway in endothelial progenitor cells[J]. Metabolism, 2013, 62(5): 743 - 752. DOI: 10.1016/j.metabol.2012.09.014

(**收稿**:2016-03-07;**修回**:2016-06-02)

(编辑 邓强庭)