

· 基础研究 ·

蛋白酶激活受体2经RhoA信号抑制人内皮祖细胞增殖、迁移功能

顾圣玮, 顾浩, 马晴晴, 姚欣, 曾晓宁*

南京医科大学第一附属医院呼吸与危重症医学科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:探究蛋白酶激活受体2(protease-activated receptor 2, PAR2)对人内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)功能的影响。方法:EPC予以PAR2天然激动剂类胰蛋白酶、合成激动剂SLIGKV-NH₂、合成抑制剂FSLRLY-NH₂处理, EdU、Transwell实验观察EPC增殖、迁移, 实时定量PCR、ELISA分析检测相关细胞因子及受体表达, 免疫印迹法评估Ras同源家族成员A(Ras homolog family member A, RhoA)水平;同时给予RhoA特异性抑制剂Y-27632, 观察PAR2活化效应可否被取消。结果:PAR2激动剂可剂量依赖性抑制EPC增殖及迁移($P < 0.05$), 下调血管内皮生长因子A、血管内皮生长因子受体2、基质细胞衍生因子1及趋化性细胞因子受体4等表达($P < 0.05$), 该效应可被PAR2抑制剂取消;活化PAR2可显著上调EPC RhoA表达($P < 0.05$), 抑制PAR2活性可取消该效应;Y-27632可逆转PAR2激动剂导致的EPC细胞增殖、迁移抑制($P < 0.05$)。结论:PAR2经RhoA信号抑制EPC增殖、迁移功能, 是极具潜力的内皮再生与血管生成调控靶点。

[关键词] 蛋白酶激活受体2;内皮祖细胞;增殖;迁移;RhoA

[中图分类号] R562.25

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2023)05-655-08

doi:10.7655/NYDXBNS20230510

Protease-activated receptor-2 inhibits human endothelial progenitor cell proliferation and migration via RhoA signaling

GU Shengwei, GU Hao, MA Qingqing, YAO Xin, ZENG Xiaoning*

Department of Pulmonary & Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** The present study aims to investigate the role of protease-activated receptor 2 (PAR2) in the regulation of human endothelial progenitor cell (EPC) function. **Methods:** EPCs were stimulated with tryptase (a natural agonist of PAR2), SLIGKV-NH₂ (a synthetic agonist of PAR2) and FSLRLY-NH₂ (an antagonist of PAR2). Cell proliferation and migration were evaluated by EdU incorporation and Transwell model. Expression of the cytokines and receptors were estimated by real-time quantitative PCR and ELISA. Level of intercellular Ras homolog family member A (RhoA) was assessed by Western blot analysis. And RhoA antagonist Y-27632 was also applied to determine whether the effects of PAR2 activation can be abolished by RhoA inhibition. **Results:** The agonists of PAR2 dramatically inhibited EPCs proliferation and migration in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). PAR2 activation markedly suppressed the expression of vascular endothelial growth factor-A, vascular endothelial growth factor receptor-2, stromal cell-derived factor-1 and C-X-C chemokine receptor type 4 ($P < 0.05$). All these effects can be abolished by the PAR2 antagonist ($P < 0.05$). PAR2 activation increased the level of RhoA in EPCs, which was also repressed by FSLRLY-NH₂ ($P < 0.05$). Y-27632 notably reversed the influence of PAR2 activation on EPCs proliferation and migration ($P < 0.05$). **Conclusion:** The activation of PAR2 blunted EPCs proliferation and migration via RhoA signal, hinting a potential role of PAR2 as a novel target for the modulation of endothelial regeneration and vasculogenesis.

[Key words] protease-activated receptor 2; endothelial progenitor cells; proliferation; migration; RhoA

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(05):655-662]

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81970016, 81001428)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zeng_xiao_ning@hotmail.com

蛋白酶激活受体 (protease-activated receptor, PAR) 属 G 蛋白偶联受体, 包括 4 个亚型。其中, PAR2 作为唯一胰酶受体, 功能最为特殊, 可被胰蛋白酶、类胰蛋白酶等活化, 在平滑肌、上皮和内皮等多种结构细胞上均有表达^[1]。研究表明, 多种血管疾病进展与 PAR2 的激活有关, 如肺动脉高压、动脉粥样硬化、糖尿病血管并发症等, 提示 PAR2 在调节内皮完整性和血管稳态方面起重要作用^[2-3]。有研究显示, PAR2 活化可参与内皮细胞的多种功能, 如细胞增殖、血管生成及促炎介质释放等^[4-5]。Ras 同源家族成员 A (Ras homolog family member A, RhoA) 作为重要的 PAR2 下游信号^[6], 被证实参与内皮功能调控^[7-8]。在研究中发现作为调节内皮完整性和血管稳态的重要来源, 内皮祖细胞 (endothelial progenitor cell, EPC) 存在 PAR2 表达, 然其是否参与调控 EPC 功能及其相关机制目前仍知之甚少。

EPC 起源于骨髓, 可从外周血单个核细胞中分离提取^[9], 体内外均具有高增殖和促血管生成潜能。机体受损时, 损伤部位释放趋化细胞因子可使 EPC 从骨髓动员至外周血, 继而迁至受损处分化为成熟内皮细胞, 嵌入并修复血管^[10]。有证据证实, 肺动脉高压患者循环 EPC 数量显著减少并伴功能障碍, 提示 EPC 可能是血管功能异常的重要原因^[11]。近年来在一些血管相关疾病如肺动脉高压^[12]、糖尿病血管并发症^[13]和冠心病^[14]中, EPC 作为细胞治疗的有力候选成员之一, 其功能改善已成为治疗此类疾病的重要策略。

EPC 表达 PAR2, 而 PAR2 激活能否调节 EPC 功能有待进一步研究。本研究通过体外培养 EPC, 观察 PAR2 活化对 EPC 增殖、迁移功能的影响及其相关因子、受体的水平变化, 阐明 RhoA 信号在该过程中的重要作用。

1 材料和方法

1.1 材料

类胰蛋白酶 (Tr, T7063, Sigma-Aldrich 公司, 美国); PAR2 激动剂 SLIGKV-NH2 (AP, RP20334, 南京金斯瑞公司), PAR2 抑制剂 FSLRLY-NH2 (FS, C7865BL120-1, 南京金斯瑞公司), RhoA 抑制剂 Y-27632 (B1293, Apexbio 公司, 美国); EdU 细胞增殖检测试剂盒 (C10310, 广州锐博生物科技有限公司), 人血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A) 酶联免疫吸附实验 (enzyme-

linked immuno sorbent assay, ELISA) 检测试剂盒 (DVE00, R&D 公司, 美国), 人基质细胞衍生因子 1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1) ELISA 检测试剂盒 (DSA00, R&D 公司, 美国); 抗 PAR2 特异性抗体 (ab180953, Abcam 公司, 英国), 抗 RhoA 特异性抗体 (ab187027, Abcam 公司, 英国), 抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 特异性抗体 (2118, CST 公司, 美国), 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (sc-2004, Santa Cruz 公司, 美国); EGM-2 BulletKit 培养基 (CC3162, Lonza 公司, 美国)。

本研究方案经南京医科大学第一附属医院伦理委员会批准 (伦理号: 2019-SR-184), 并获得所有患者的书面知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人外周血分离 EPC, 培养于 EGM-2 完全培养基中, 置 37 °C、5% CO₂ 条件的细胞培养箱孵育, 每隔 2~3 d 更换培养基, 直至细胞密度达 80% 后, 胰酶消化、传代。选择第 4~6 代细胞进行实验。

1.2.2 EdU 掺入实验

EdU 掺入实验检测 EPC 增殖功能。细胞铺至孔板并饥饿 6~8 h 后, 以不同浓度类胰蛋白酶、SLIGKV-NH2 分别刺激 EPC 24 h, 抑制剂联合组在 PAR2 激动剂给药前 30 min 予 FS 或 Y-27632; 50 μmol/L EdU 孵育 4 h 后, 固定、破膜、Apollo 及 Hoechst 染色。通过计算 Apollo、Hoechst 双染的细胞核数目以评估细胞增殖率。随机选取 5 个不同视野进行拍照计数, 重复 3 次后进行统计学分析。

1.2.3 Transwell 小室实验

Transwell 小室实验检测 EPC 迁移功能。细胞铺板并饥饿 6~8 h, 低血清培养基调整细胞密度后以 150 μL 细胞悬液接种于 Transwell 上室, 置于 24 孔板中, 加入含不同刺激物的完全培养基于下室; 细胞培养箱孵育 24 h, 弃培养基、PBS 清洗, 多聚甲醛固定 30 min 后棉签擦拭移除小室上层细胞, 结晶紫染色后 PBS 清洗、晾干, 显微镜拍照。随机选取 4 个不同视野进行拍照计数并统计学分析。

1.2.4 实时定量 PCR

实时定量 PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 检测 EPC 中 VEGF-A、血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor

receptor-2, VEGFR-2)、SDF-1、趋化性细胞因子受体4(C-X-C chemokine receptor type 4, CXCR-4)mRNA表达量。100 pmol/L Tr或100 μ mol/L SLIGKV-NH2刺激EPC 24 h, PBS清洗2遍,使用TRIzol提取细胞总RNA,逆转录试剂盒逆转录后加入SYBR进行实时定量PCR实验。扩增条件为下:预变性95 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 变性95 $^{\circ}$ C 5 s \rightarrow 退火60 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 延伸72 $^{\circ}$ C 10 min,共40个循环。以GAPDH为内参,计算 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值,最后比较目的基因相对表达量。所用引物委托南京金斯瑞生物科技有限公司合成:人GAPDH上游引物5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTG-3',下游引物5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3';人VEGF-A上游引物5'-AGGGCAGAATCATCACGAAGT-3',下游引物5'-AGGGTCTCGATTGGATGGCA-3';人VEGFR-2上游引物5'-GGCCCAATAATCAGAGTGGCA-3',下游引物5'-CCAGTGTCAATTCGATCACTTT-3';人SDF-1上游引物5'-ATTCTCAACACTCCAACTGTGC-3',下游引物5'-ACTTTAGCTTCGGGTCAATGC-3';人CXCR-4上游引物5'-ACTACACCGAGGAAATGGGCT-3',下游引物5'-CCCACAATGCCAGTTAAGAAGA-3'。

1.2.5 ELISA

ELISA检测EPC上清中VEGF-A及SDF-1的蛋白表达量。100 pmol/L类胰蛋白酶或100 μ mol/L SLIGKV-NH2刺激EPCs 24 h后收集细胞上清,采用人VEGF-A、SDF-1 ELISA检测试剂盒,根据说明书进行检测。

1.2.6 蛋白质免疫印迹实验

蛋白质免疫印迹实验检测EPC中PAR2、RhoA蛋白水平。不同药物作用EPC 24 h后收集细胞,200 μ L RIPA冰上裂解15 min;收集裂解物,12 000 r/min离心20 min后吸取上清,十二烷基硫酸钠蛋白变性;制胶上样,80~120 V恒压电泳,300 mA恒流PVDF转膜;含Tween 20的Tris洗涤缓冲液(tris buffered saline tween, TBST)配制5%脱脂奶粉溶液,室温封闭1 h;加入抗PAR2(1:1 000)、RhoA(1:1 000)、GAPDH(1:1 000)抗体4 $^{\circ}$ C孵育过夜;TBST洗涤后,与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG抗体孵育;ECL化学发光液曝光,并用Bio-Rad成像系统及Image J软件进行分析。

1.3 统计学方法

应用Graphpad 6.0进行分析处理,计量资料以均数 \pm 标准误($\bar{x} \pm S_x$)表示,单因素方差分析比较多组间差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 类胰蛋白酶、SLIGKV-NH2抑制EPC增殖与迁移

Tr是PAR2的天然激动剂。免疫印迹结果显示,EPC存在PAR2表达,给予Tr 100 pmol/L处理24 h后,PAR2表达上调($P < 0.05$),PAR2抑制剂FS可取消此效应(图1A),提示类胰蛋白酶可通过PAR2引起自身反馈性表达增高。细胞增殖、迁移是血管生成的重要事件。本研究结果显示,不同浓度(1、10、50、100、1 000 pmol/L)Tr处理24 h可导致细胞增殖、迁移功能明显减弱($P < 0.05$,图1B、C)。AP作为激活PAR2的模拟合成肽,亦可剂量依赖性(1、10、50、100、200 μ mol/L)抑制EPC增殖与迁移($P < 0.05$,图1D、E),浓度 ≥ 100 μ mol/L时差异具有显著性。据上述结果,后续实验选择100 pmol/L Tr和100 μ mol/L AP进行。

2.2 PAR2激活下调EPC增殖、迁移相关细胞因子及受体表达

EPC释放的生长、趋化因子及其受体参与缺血组织处细胞的增殖与迁移。实时定量PCR结果显示,Tr、SLIGKV-NH2下调VEGF-A、VEGFR-2、SDF-1、CXCR-4的mRNA水平($P < 0.05$,图2A)。ELISA结果亦显示,PAR2激活后EPC上清中VEGF-A及SDF-1的蛋白表达量显著下降($P < 0.05$,图2B)。

2.3 PAR2抑制剂FS取消PAR2活化引起的EPC功能改变

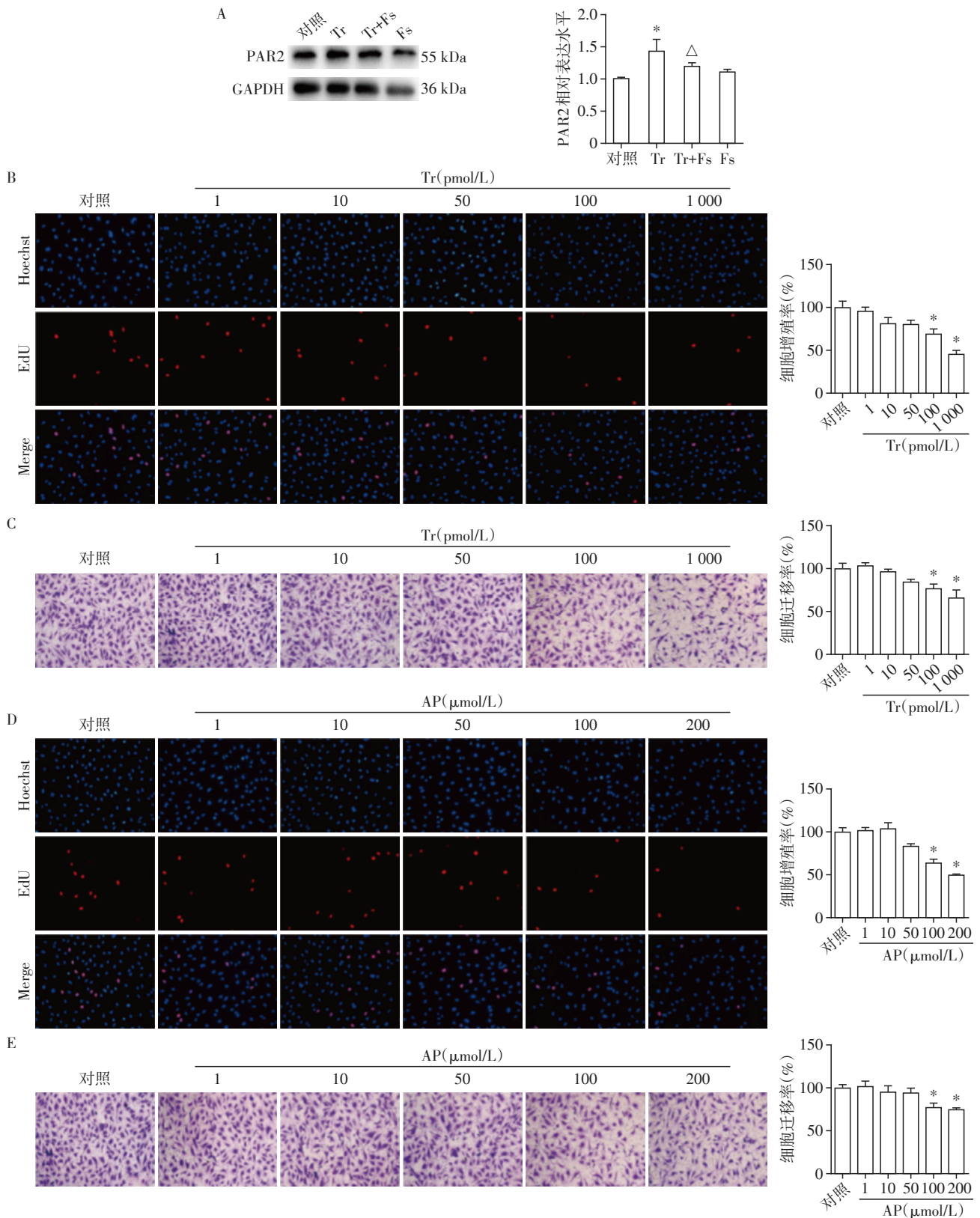
为了探讨PAR2激动剂引起的EPC功能改变是否直接经由PAR2受体实现,本研究选用PAR2抑制剂FS以阻断PAR2受体功能。200 μ mol/L FS可取消2种激动剂诱导的EPC细胞增殖、迁移功能下调效应($P < 0.05$,图3)。

2.4 RhoA参与介导PAR2活化引起的EPC增殖、迁移抑制过程

作为PAR2下游的重要信号分子,RhoA参与调节细胞的骨架重塑、黏附运动等功能。免疫印迹结果显示,Tr、AP处理EPC 24 h后,RhoA表达显著上调($P < 0.05$),PAR2抑制剂FS可取消此上调效应(图4A)。同时,予以特异性RhoA抑制剂Y-27632(图4B、C),PAR2激动剂引起的EPC增殖、迁移抑制被逆转($P < 0.05$)。

3 讨论

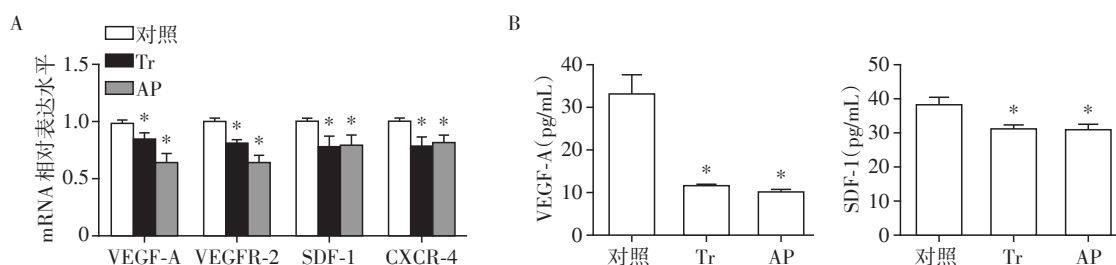
本研究通过分离、培养人外周血来源的EPC,发现选择性激活PAR2可经由RhoA信号抑制EPC增



A: Tr 调控 EPC PAR2 表达的蛋白质免疫印迹分析; B: PAR2 天然激动剂影响细胞增殖的 EdU 掺入分析($\times 100$); C: PAR2 天然激动剂影响细胞迁移的 Transwell 小室分析($\times 100$); D: PAR2 合成激动剂影响细胞增殖的 EdU 掺入分析($\times 100$); E: PAR2 合成激动剂影响细胞迁移的 Transwell 小室分析($\times 100$)。Tr: PAR2 天然激动剂类胰蛋白酶; F_s: PAR2 特异性抑制剂 FSLRLY-NH₂; AP: PAR2 合成激动剂 SLIGKV-NH₂。与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 Tr 组比较, [△] $P < 0.05$ ($n=3$)。

图1 PAR2 活化抑制 EPC 细胞增殖与迁移

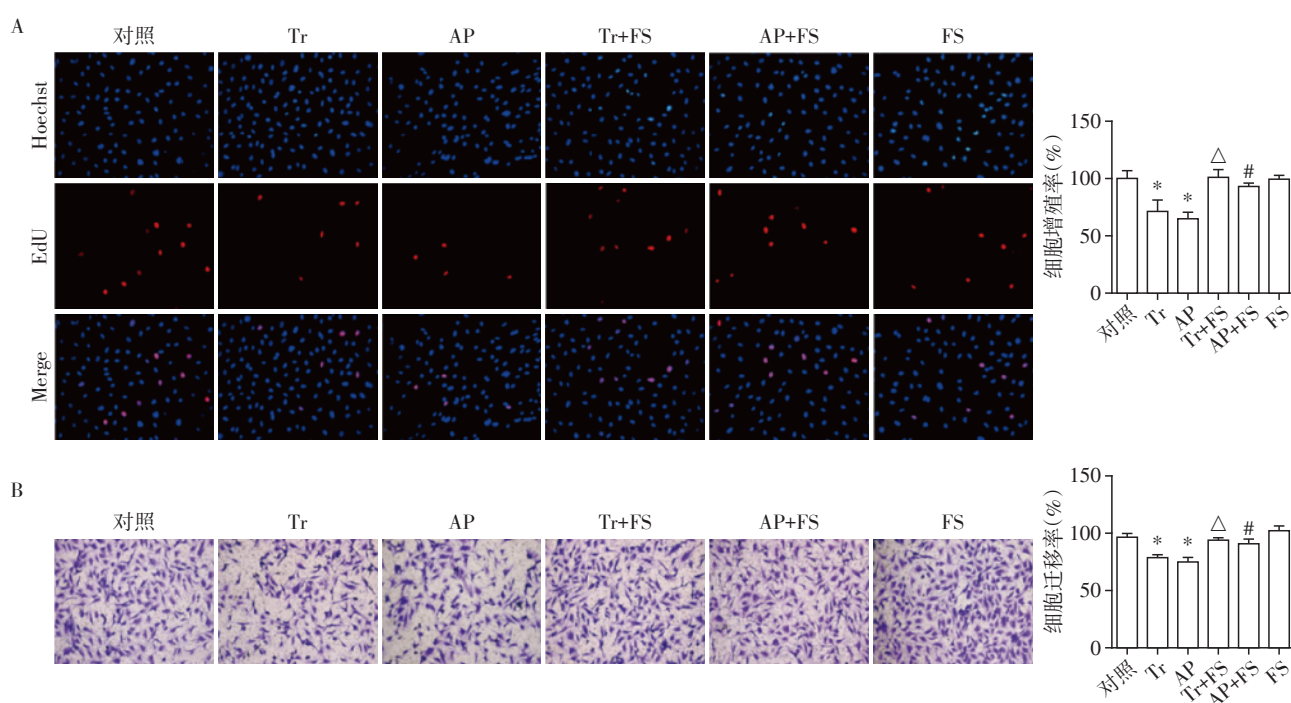
Figure 1 The activation of PAR2 inhibits the proliferation and migration of EPC



A: 细胞因子 mRNA 相对表达量实时定量 PCR 分析; B: 细胞上清因子 ELISA 分析。Tr: PAR2 天然激动剂类胰蛋白酶; AP: PAR2 合成激动剂 SLIGKV-NH₂。与对照组比较, * $P < 0.05$ ($n=3$)。

图2 PAR2活化对细胞增殖、迁移相关因子及受体的影响

Figure 2 Implication of PAR2 activation in the expression of EPC proliferation and migration-related cytokines and receptors



A: PAR2 抑制剂影响细胞增殖的 EdU 掺入分析 ($\times 100$); B: PAR2 抑制剂影响细胞迁移的 Transwell 小室分析 ($\times 100$)。Tr: PAR2 天然激动剂类胰蛋白酶; AP: PAR2 合成激动剂 SLIGKV-NH₂; FS: PAR2 特异性抑制剂 FSLLRV-NH₂。与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 Tr 组比较, [△] $P < 0.05$; 与 AP 组比较, [#] $P < 0.05$ ($n=3$)。

图3 类胰蛋白酶/SLIGKV-NH₂通过激活 PAR2 抑制 EPC 增殖与迁移

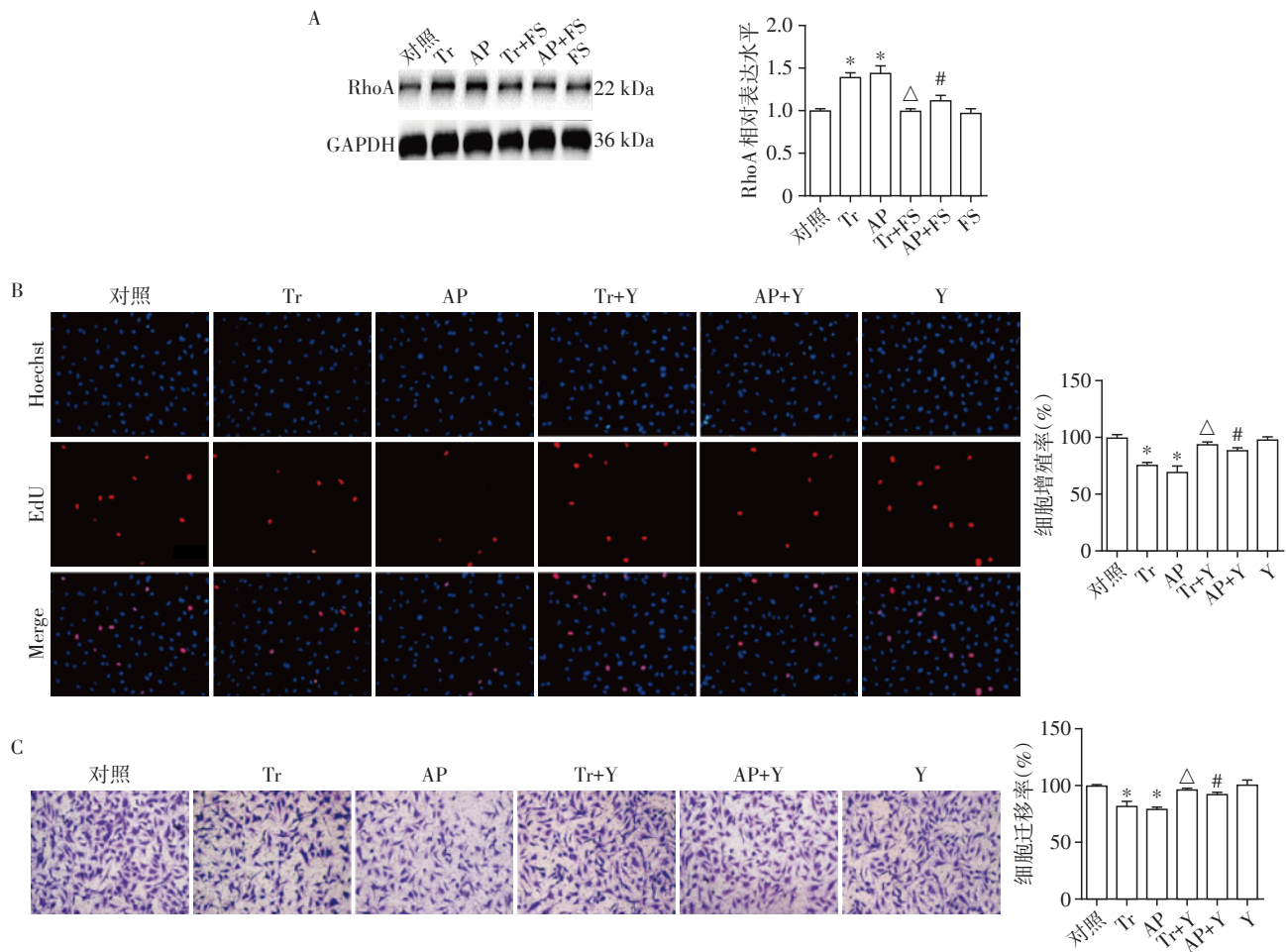
Figure 3 Tryptase/SLIGKV-NH₂ inhibits the proliferation and migration of EPC by activating PAR2

殖、迁移功能。PAR2 激动剂 Tr、PAR2 合成激动剂 AP 可下调增殖、迁移相关细胞因子及受体表达、上调 RhoA 信号,该效应分别被 PAR2 及 RhoA 抑制剂取消,提示 PAR2-RhoA 信号轴可能是 EPC 参与血管修复、再生的重要机制之一。

1997 年,Asahara 等^[9]通过免疫磁珠法首次从人外周血单核细胞层分离出 EPC,其在心血管系统疾病^[14]、呼吸系统疾病^[12]等多种病理生理过程中的重要作用均被证实。研究显示,野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠接受骨髓来源的 EPC 后,右心衰表现明

显减轻,存活率也显著提高^[12],提示 EPC 是肺动脉高压等血管相关疾病治疗的有效手段。

PAR2 参与血管功能调控过程,研究表明动脉粥样硬化斑块中 PAR2 表达上调^[3];PAR2 激活可引起内皮屏障破坏、血管通透性增加、炎症介质上调,导致血脑屏障结构与功能紊乱^[4],提示内皮细胞调控中 PAR2 至关重要。然而,PAR2 在 EPC 中的作用尚不清楚。鉴于 EPC 是内皮细胞的干性前体细胞,本研究通过原代培养 EPC 以探究 PAR2 激活对其功能的影响,阐明血管稳态调控的 EPC 机制及其作为



A: PAR2 调控 EPC RhoA 表达的蛋白质免疫印迹分析; B: PAR2 经由 RhoA 信号调控 EPC 增殖的 EdU 掺入分析($\times 100$); C: PAR2 经由 RhoA 信号调控 EPC 迁移的 Transwell 小室分析($\times 100$)。Tr: PAR2 天然激动剂类胰蛋白酶; AP: PAR2 合成激动剂 SLIGKV-NH₂; FS: PAR2 特异性抑制剂 FSLLRY-NH₂; Y: RhoA 抑制剂 Y-27632。与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 Tr 组比较, ^Δ $P < 0.05$; 与 AP 组比较, [#] $P < 0.05$ ($n=3$)。

图4 PAR2 激活经由 RhoA 信号抑制 EPC 增殖与迁移

Figure 4 PAR2 activation decreased the proliferation and migration of EPC via RhoA

潜在治疗靶标的可能性。

EPC 增殖作为细胞关键功能,对内皮再生及伤口愈合十分重要。本研究探究了 PAR2 激活对 EPC 增殖的影响,同时选用 Tr、AP^[15] 进行观察。结果显示两者效应相似,均剂量依赖性抑制 EPC 增殖功能,效应均被 PAR2 抑制剂取消,表明 EPC 增殖抑制确实通过活化 PAR2 实现。同时, EPC 迁移作为机体受损后细胞归巢至损伤部位的重要事件,对血管的精准修复颇为关键。本研究观察了 PAR2 活化对 EPC 迁移的影响,发现激活 PAR2 可显著抑制 EPC 迁移功能,抑制 PAR2 活性可取消该效应。上述结果均表明, PAR2 参与调控 EPC 功能,特异性活化 PAR2 可直接抑制 EPC 增殖与迁移。

生理状态下 EPC 主要定居于骨髓干细胞池,损伤后接受相关信号、从骨髓动员至外周血,继而定

位于受损组织、发挥生物学效应。该过程受多种信号调控,如 VEGF-A、SDF-1、VEGFR-2、CXCR-4 等。VEGF-A 作为多效生长因子,可与受体 VEGFR-2 结合,通过促进 EPC 增殖以促进血管生成^[16]; SDF-1 作为关键干细胞归巢因子, SDF-1/CXCR-4 轴在调控 EPC 迁移中发挥重要作用^[17]。本研究发现 PAR2 激活显著下调 VEGF-A、SDF-1 及相关受体表达,提示 PAR2 抑制 EPC 功能可能与此相关。然而,有研究显示 PAR2 激活可促 EPC 迁移及成管而不影响增殖^[18], 与本研究结果存在差异。究其原因,可能由于该研究类胰蛋白酶组同时加入了肝素,改变了类胰蛋白酶结构(肝素参与类胰蛋白酶组装^[19]),造成细胞反应差异;此外研究中 EPC 来源不同,也可能是造成差异的重要因素。

RhoA 作为 PAR2 的重要下游信号,参与细胞骨

架重塑、运动黏附以及凋亡等过程^[20]。本研究显示,RhoA是PAR2诱导EPC功能变化的重要通路。活化PAR2可上调EPC中RhoA表达,PAR2抑制剂可取消该效应,特异性抑制RhoA活性可逆转PAR2激活诱导的EPC功能下调。作为细胞运动调节相关的核心因子,Rho家族参与细胞事件中的诸多环节,RhoA通过其效应器Rho相关蛋白激酶,促肌球蛋白收缩以参与细胞运动相关过程。研究表明,细胞增殖过程中RhoA表达下调,抑制肌球蛋白形成与收缩,进而促进与干/祖细胞增殖、分化相关的Yes相关蛋白/含PDZ结合序列转录共激活子(Yes-associated protein/transcriptional co-activator with PDZ binding motif, YAP/TAZ)核转位,细胞增殖能力增强^[21];而细胞运动过程中,除细胞前端板状伪足提供动力外,下调的RhoA导致细胞后缘肌球蛋白收缩力减弱,有利于松散细胞与细胞以及细胞与基质间的连接,使其易向不同方向延伸^[22-23]。本研究中RhoA表达受PAR2激活而上调,可能通过调控肌球蛋白的形成并增强其收缩,在增殖迁移相关动力学事件中发挥作用。而另有研究发现,RhoA还可通过调节肌动蛋白的再分布及组装,参与SDF-1诱导的细胞迁移^[24];本研究发现PAR2活化诱导SDF-1下调,或可通过改变RhoA信号、参与EPC迁移抑制过程。

综上所述,本研究表明PAR2可通过上调EPC RhoA信号抑制细胞增殖、迁移功能,PAR2可能作为EPC功能调控的重要靶标。鉴于EPC在内皮修复与再生中的重要作用,研究结果为血管相关疾病的治疗提供了新思路。然而本研究仅在体外进行了相关探索,仍存在不足,有待在体内进一步展开深入研究。

[参考文献]

[1] 王红玉,顾浩,葛爱,等.蛋白酶激活受体2经ROS信号调控支气管上皮间充质表型转化[J].南京医科大学学报(自然科学版),2022,42(6):790-795

[2] JOSEPH C, BERGHAUSEN E M, BEHRINGER A, et al. Coagulation-independent effects of thrombin and factor Xa: role of protease-activated receptors in pulmonary hypertension [J]. *Cardiovasc Res*, 2022, 118 (16): 3225-3238

[3] JONES S M, MANN A, CONRAD K, et al. PAR2 (protease-activated receptor 2) deficiency attenuates atherosclerosis in mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38 (6): 1271-1282

[4] ZHOU Q, WANG Y W, NI P F, et al. Effect of tryptase on mouse brain microvascular endothelial cells via protease-

activated receptor 2 [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15 (1): 248

[5] LIU H, LESSIEUR E M, SAADANE A, et al. Neutrophil elastase contributes to the pathological vascular permeability characteristic of diabetic retinopathy [J]. *Diabetologia*, 2019, 62(12): 2365-2374

[6] DAS K, PRASAD R, SINGH A, et al. Protease-activated receptor 2 promotes actomyosin dependent transforming microvesicles generation from human breast cancer [J]. *Mol Carcinog*, 2018, 57(12): 1707-1722

[7] SHU A, DU Q, CHEN J, et al. Catalpol ameliorates endothelial dysfunction and inflammation in diabetic nephropathy via suppression of RAGE/RhoA/ROCK signaling pathway [J]. *Chem Biol Interact*, 2021, 348: 109625

[8] MEEKINS L C, ROSADO-ADAMES N, MADDALA R, et al. Corneal endothelial cell migration and proliferation enhanced by Rho kinase (ROCK) inhibitors in in vitro and in vivo models [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57 (15): 6731-6738

[9] ASAHARA T, MUROHARA T, SULLIVAN A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. *Science*, 1997, 275(5302): 964-967

[10] LEE N G, JEUNG I C, HEO S C, et al. Ischemia-induced Netrin-4 promotes neovascularization through endothelial progenitor cell activation via Unc-5 Netrin receptor B [J]. *Faseb J*, 2020, 34(1): 1231-1246

[11] SUN H X, LI G J, DU Z H, et al. The relationship between endothelial progenitor cells and pulmonary arterial hypertension in children with congenital heart disease [J]. *BMC Pediatr*, 2019, 19(1): 502

[12] HARPER R L, MAIOLO S, WARD R J, et al. BMPR2-expressing bone marrow-derived endothelial-like progenitor cells alleviate pulmonary arterial hypertension *in vivo* [J]. *Respirology*, 2019, 24(11): 1095-1103

[13] DAI Q, FAN X, MENG X, et al. FGF21 promotes ischaemic angiogenesis and endothelial progenitor cells function under diabetic conditions in an AMPK/NAD⁺-dependent manner [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25 (6): 3091-3102

[14] ZHANG H F, WANG Y L, TAN Y Z, et al. Enhancement of cardiac lymphangiogenesis by transplantation of CD34 (+) VEGFR-3 (+) endothelial progenitor cells and sustained release of VEGF-C [J]. *Basic Res Cardiol*, 2019, 114(6): 43

[15] GARCÍA - GONZÁLEZ G, SÁNCHEZ - GONZÁLEZ A, HERNÁNDEZ-BELLO R, et al. Triggering of protease-activated receptors (PARs) induces alternative M2 macrophage polarization with impaired plasticity [J]. *Mol Immunol*, 2019, 114: 278-288

[16] YU B, DONG B, HE J, et al. Bimodal imaging - visible nanomedicine integrating CXCR4 and VEGFa genes directs synergistic reendothelialization of endothelial progenitor cells[J]. *Adv Sci(Weinh)*, 2020, 7(24):2001657

[17] YU G, LIU P, SHI Y, et al. Sitagliptin stimulates endothelial progenitor cells to induce endothelialization in aneurysm necks through the SDF - 1/CXCR4/NRF2 signaling pathway[J]. *Front Endocrinol(Lausanne)*, 2019, 10:823

[18] QIAN N, LI X, WANG X, et al. Tryptase promotes breast cancer angiogenesis through PAR-2 mediated endothelial progenitor cell activation[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(2):1513-1520

[19] HALLGREN J, LINDAHL S, PEJLER G. Structural requirements and mechanism for heparin-dependent activation and tetramerization of human beta I - and beta II - tryptase[J]. *J Mol Biol*, 2005, 345(1):129-139

[20] FLENTJE A, KALSI R, MONAHAN T S. Small GTPases and their role in vascular disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(4):917

[21] OTSU K, IDA-YONEMOCHI H, IKEZAKI S, et al. Oxygen regulates epithelial stem cell proliferation via RhoA-actomyosin-YAP/TAZ signal in mouse incisor[J]. *Development*, 2021, 148(4):dev194787

[22] LAWSON C D, RIDLEY A J. Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion [J]. *J Cell Biol*, 2018, 217(2):447-457

[23] MAVRIA G, VERCOULEN Y, YEO M, et al. ERK-MAPK signaling opposes Rho-kinase to promote endothelial cell survival and sprouting during angiogenesis [J]. *Cancer Cell*, 2006, 9(1):33-44

[24] LUO J, LI D, WEI D, et al. RhoA and RhoC are involved in stromal cell-derived factor-1-induced cell migration by regulating F - actin redistribution and assembly [J]. *Mol Cell Biochem*, 2017, 436(1-2):13-21

[收稿日期] 2023-02-03
(本文编辑:唐 震)

