

STAT3 介导血管紧张素 II 诱导的间充质干细胞 VEGF 生成

张竞文¹, 胡 亮¹, 刘 超¹, 王露露¹, 李庆平^{1,2*}

(¹南京医科大学药理学系, ²江苏省心血管病分子干预重点实验室, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 探讨血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 对骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)中信号转导和转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)水平的调节, 分析 STAT3 在 Ang II 诱导 MSCs 的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达增加中的作用, 研究血管紧张素转化酶(angiotensin converting enzyme, ACE)与 Ang II 刺激诱导的 STAT3 磷酸化之间的关系。方法: 分离培养大鼠 MSCs, 以 Ang II 处理细胞, 并用针对 STAT3 的小干扰 RNA(STAT3 siRNA)或 ACE 抑制剂卡多普利提前进行干预。用免疫印迹法(Western blot)检测细胞内 STAT3 磷酸化和 ACE 表达水平; 用 Real-time PCR 法检测细胞内 VEGF mRNA 表达水平; 用 ELISA 法检测培养液中 VEGF 蛋白水平。结果: ①在 MSCs 中, Ang II 诱导 STAT3 的磷酸化水平增加; ② STAT3 siRNA 明显抑制 Ang II 诱导的 VEGF 表达和分泌; ③卡托普利显著抑制了 Ang II 诱导的 STAT3 磷酸化。结论: 在 MSCs 中, STAT3 参与了 Ang II 诱导的 VEGF 表达, 并且 Ang II 诱导的 STAT3 具有 ACE 依赖性。

[关键词] 骨髓间充质干细胞; 血管紧张素 II; 血管内皮生长因子; 信号转导和转录激活因子 3; 血管紧张素转化酶

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)07-891-05

Involvement of signal transducer and activator of transcription 3 in angiotensin II-upregulated vascular endothelial growth factor production in mesenchymal stem cells

ZHANG Jing-wen¹, HU Liang¹, LIU Chao¹, WANG Lu-lu¹, LI Qing-ping^{1,2*}

(¹Department of Pharmacology, ²Key Laboratory of Cardiovascular Disease and Molecular Intervention, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the involvement of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in angiotensin II (Ang II) induced vascular endothelial growth factor(VEGF) expression and the role of angiotensin converting enzyme(ACE) in regulating STAT3 phosphorylation in mesenchymal stem cells(MSCs). **Methods:** STAT3 phosphorylation under Ang II stimulation was analyzed by Western blot analysis. siRNA targeting STAT3 (STAT3 siRNA) was used to inhibit STAT3, and its effect on VEGF production was examined by measuring VEGF protein level in conditioned media and VEGF mRNA expression in MSCs with ELISA and real-time PCR, respectively. Besides, captopril was used to specifically inhibit ACE, and its effect on STAT3 phosphorylation was analyzed by Western blot. **Results:** ① Ang II stimulation significantly increased STAT3 phosphorylation level; ② Pretreatment with STAT3 siRNA markedly abolished the Ang II-induced increase of VEGF mRNA expression and protein synthesis; ③ Captopril significantly inhibited the Ang II-induced STAT3 phosphorylation. **Conclusion:** STAT3 is involved in the Ang II-stimulated VEGF expression, and the Ang II-induced STAT3 phosphorylation is ACE dependent in MSCs.

[Key words] mesenchymal stem cells; angiotensin II; vascular endothelial growth factor; signal transducer and activator of transcription 3; angiotensin converting enzyme

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(7): 891-895]

心肌细胞内在的修复能力很弱, 血管再生也很有限, 这一弱势促成和发展了如今对急性慢性心肌缺

血疾病的细胞治疗。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)因其具有多潜能、低免疫原性以及易于体外增殖等特点被认为是细胞治疗的理想选择。然而, 在 MSCs 治疗的过程中, 由于细胞在缺血环境中面临了炎症、营养缺乏、酶分解以及氧剥夺

[基金项目] 国家自然科学基金资助(30973534, 81173052)

*通讯作者, E-mail: qingpingli@yahoo.com.cn

等因素,细胞移植后功能下降,存活率降低,这一点大大阻碍了MSCs治疗的发展^[1]。因此如何提高MSCs治疗效果是目前广受关注和研究的重要议题。MSCs移植参与心肌保护的一个主要机制是通过旁分泌各种生长因子以应对炎症刺激、发挥促血管生成和促存活的效应^[2]。在众多生长因子中,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)发挥了主要的作用^[3]。各种促进VEGF表达和分泌的因素均有可能提高MSCs的心肌保护能力。血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ)是肾素-血管紧张素系统中一个重要的多肽,不仅存在于血循环中,也存在于各种局部组织细胞,包括MSCs中^[4]。本课题组曾报道Ang Ⅱ能够显著促进干细胞VEGF生成,这一效应与Akt和ERK1/2通路的激活有关^[5]。

信号转导和转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)是介导VEGF表达的主要转录激活因子^[6],可通过低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)激活VEGF的转录。STAT3参与MSCs中基础条件以及应激条件下的VEGF生成^[6-7]。经STAT3敲除的MSCs对心脏的保护能力下降,表现为VEGF表达减少、控制炎症的能力降低、MSCs所介导的心脏左室功能恢复能力下降^[8]。因此STAT3被认为是刺激MSCs VEGF表达以及保护作用的有效靶点。

STAT3通路能被多种应激因素增强,有研究发现Ang Ⅱ作为一种活性多肽也具有促进STAT3的活化的潜能^[9-10]。这一机制是否存在于MSCs中迄今未见报道,STAT3是否介导或参与Ang Ⅱ诱导的VEGF表达更属未知。因此,本研究旨在研究STAT3是否参与Ang Ⅱ诱导的MSCs中VEGF表达。考虑到之前本课题组已证明血管紧张素转化酶(angiotensin converting enzyme, ACE)参与了Ang Ⅱ诱导的VEGF表达(另文待发表),本研究还将分析ACE对STAT3磷酸化的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

雄性清洁级幼年Sprague-Dauley (SD)大鼠,(80 \pm 10)g,购于南京医科大学实验动物中心,动物合格证号:SCXK(苏)2002-0031。低糖DMEM(L-DMEM)、胰蛋白酶(1:250)(美国Gibco公司);胎牛血清(美国Hyclone公司);Ang Ⅱ(美国Sigma公司);FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)(瑞士Roche公司);大鼠VEGF ELISA试剂盒(美国

R&D公司)。STAT3抗体、p-STAT3抗体(美国Cell Signaling公司);卡托普利(captopril,美国Sigma公司); β -actin抗体(上海Abmart公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔抗体(美国Cell Signaling公司);STAT3小干扰RNA(上海吉玛公司);Lipofectamine 2000(美国Invitrogen公司)。

1.2 方法

1.2.1 MSCs分离和培养

麻醉SD大鼠,在无菌条件下取其股骨、胫骨骨干,用L-DMEM冲洗骨髓腔,将冲出的骨髓液移入预先置有等体积1.131 g/ml Percoll细胞分离液的离心管中,以2 000 r/min,离心20 min。收集中间层的单个核细胞,用L-DMEM洗涤2次,之后以1.0 \times 10⁵个/ml的浓度接种于培养瓶内,用含体积分数10% FBS的L-DMEM在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的条件下进行培养;48 h后更换新鲜培养液。根据细胞生长情况,每3 d半量换液1次。待细胞生长至铺满瓶底的80%~90%时,用2.5 g/L的胰蛋白酶消化进行传代培养,每3 d半量换液1次,直至贴壁细胞彼此融合、铺满瓶底,再重复上述操作进行传代,使用3~5代细胞用于实验。

1.2.2 Real-time PCR反应

用TRIzol(美国Invitrogen Life Technologies公司)提取细胞总RNA,于-80 $^{\circ}$ C保存。SYBR Green Master按说明书使用。引物序列:VEGF上游:5'-GCGGGCTGCTGCAATG-3',下游:5'-TGCAACGC-GAGTCT-GTGTTT-3'; β -actin上游:5'-GCACCG-CAAATGCTTCTA-3',下游:5'-GGTCTTTACGGAT-GTCAACG-3'。

1.2.3 Western blot检测

细胞裂解液提取细胞总蛋白。上样前加入5 \times SDS加样缓冲液煮沸5 min,50 μ g蛋白质样品用10% SDS-PAGE电泳分离后转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭2 h,采用p-STAT3与 β -actin抗体(1:1 000),4 $^{\circ}$ C孵育过夜。以TBST洗膜10 min \times 3次,HRP标记的二抗室温孵育2 h;TBST洗膜10 min \times 3次,加ECL发光液并用Kodak图像分析软件分析图像。将PVDF膜以Strip液洗脱后,再次用5%脱脂奶粉室温封闭2 h,加入STAT3抗体(1:1 000),4 $^{\circ}$ C孵育过夜,洗膜后用HRP标记的二抗室温孵育2 h,加发光液并分析图像。

1.2.4 ELISA测定VEGF含量

收集的细胞上清离心后去除细胞残渣,保存于-80 $^{\circ}$ C。按照ELISA试剂盒说明书操作,酶标仪测

定在 490 nm 波长处光吸收值。

1.2.5 siRNA 的转染及转染效率的检测

收集细胞后加入适量含 10%血清无抗生素的培养液,将细胞稀释种于 6 孔板中。置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱孵育。24 h 后用 Lipofectamine 2000 按说明将 100 nmol/L 的 siRNA 加入培养液中。STAT3 siRNA 是从上海吉玛公司提供的 3 对序列中选取干扰效果最好的 1 对用于实验。1 对相对随机的 siRNA 作为 STAT3 siRNA 的阴性对照(Negative control,NC)。STAT3 siRNA 序列:5'-GAGCCAA-GAUUGGGCAUAUTT-3',5'-AUAUGCCCAUCUUG-GCUCTT-3';NC 序列:5'-UUCUCCGAACGUGUCA-CGUTT-3',5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。干扰效果通过 Western blot 检测。转染 48 h 后,提取各组细胞总 RNA 和细胞胞浆蛋白。

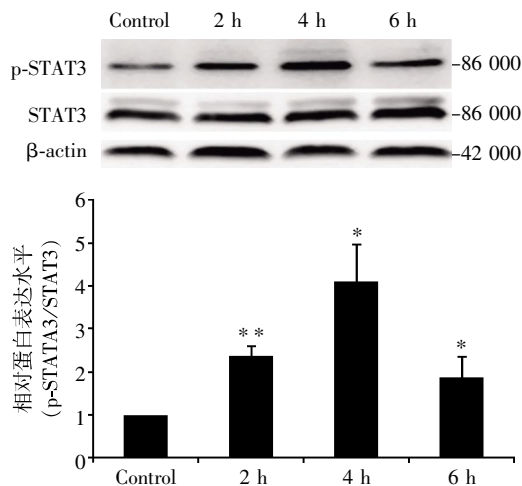
1.3 统计学方法

应用 Excel 统计软件,所有数据以均数±标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示,多组间均数的比较分别采用单因素方差分析、多因素方差分析及两两比较的 SNK-*q* 检验进行比较。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ang II 刺激 MSCs 的 STAT3 磷酸化

为了观察 Ang II 对 STAT3 磷酸化的影响,用 Ang II 100 nmol/L 分别作用 MSCs 2、4、6 h,收集蛋白做 Western blot 检测。结果表明 STAT3 磷酸化水平在 Ang II 作用 2 h 时已显著增高,在 4 h 达到峰值;而总的 STAT3 水平则不受影响(图 1)。



与 Control 相比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$, $n = 3$ 。

图 1 Ang II 促进 MSCs 中 STAT3 磷酸化水平增高

Figure 1 Phosphorylation levels of STAT3 increased induced by Ang II in MSCs

2.2 STAT3 参与了 Ang II 诱导 MSCs 的 VEGF 表达

为了观察 STAT3 在 Ang II 诱导 VEGF 表达中的作用,分别用 100 nmol/L NC siRNA 或 STAT3 siRNA 转染 MSCs,分为 NC siRNA 组以及 STAT3 siRNA 组。再以 100 nmol/L Ang II 或者无血清培养基持续刺激细胞 12 h,收集细胞 RNA 和细胞培养液上清以 real-time PCR 和 ELISA 检测。STAT3 siRNA 干扰 STAT3 的表达效果用 Western blot 检测(图 2)。Ang II 处理 12 h 后,real-time PCR 结果表明,STAT3 siRNA 显著抑制了 Ang II 诱导合成的 VEGF mRNA 表达(图 3)。同时,ELISA 结果进一步支持了 Real-time PCR 结果,即 STAT3 被抑制后,Ang II 诱导 VEGF 蛋白的分泌也显著降低(图 4)。

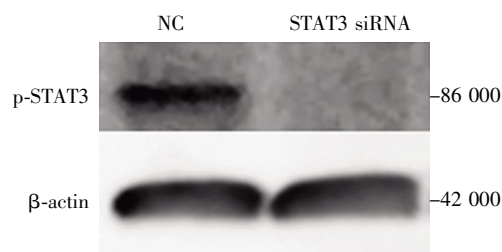
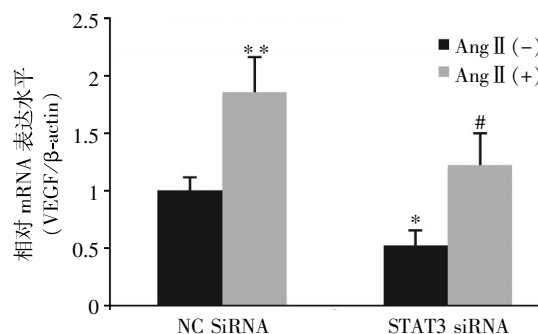


图 2 Western blot 测定 STAT3 siRNA 的干扰效果

Figure 2 The efficiency of STAT3 siRNA transfection detected by Western blot

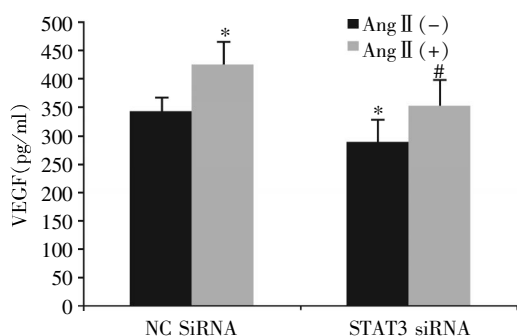


与不加 Ang II 的 NC 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与加 Ang II 的 NC 组比较,# $P < 0.05$, $n = 3$ 。

图 3 STAT3 被抑制后 Ang II 诱导的 VEGF mRNA 水平降低
Figure 3 VEGF mRNA induced by Ang II decreased by blockage of STAT3 in MSCs

2.3 卡托普利抑制了 Ang II 诱导的 STAT3 磷酸化

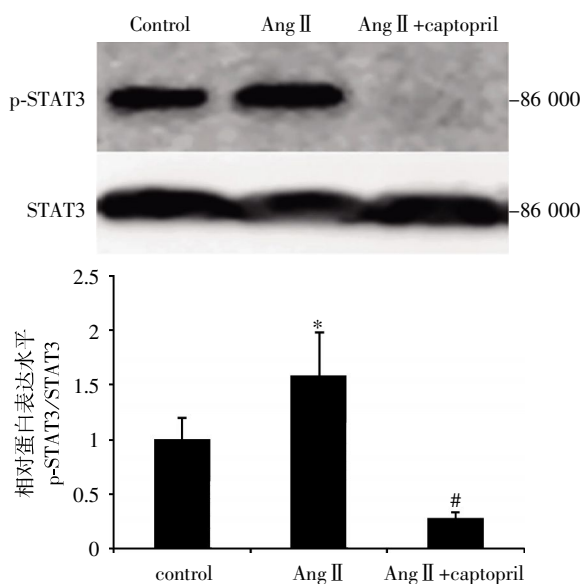
为了观察 ACE 在 Ang II 诱导的 STAT3 磷酸化中的作用,在 Ang II 刺激之前用 ACE 抑制剂卡托普利(1 mmol/L)预处理 MSCs 1 h,然后用 100 nmol/L Ang II 持续刺激细胞 6 h 收集蛋白做 Western blot 检测。结果表明卡托普利预处理组 Ang II 诱导的磷酸化 STAT3 显著减少,但总蛋白没有影响,表明 ACE 被抑制后,Ang II 诱导的 STAT3 磷酸化显著降低(图 5)。



与不加 Ang II 的 NC 组比较, * $P < 0.05$; 与加 Ang II 的 NC 组比较, * $P < 0.05$, $n = 3$ 。

图 4 STAT3 被抑制后对 Ang II 诱导 VEGF 蛋白分泌水平的影响

Figure 4 Blockage of STAT3 attenuated VEGF protein secretion stimulated by Ang II



与 Control 相比, * $P < 0.05$; 与 Ang II 处理组相比, * $P < 0.05$ 。

图 5 ACE 被抑制后 Ang II 诱导的 STAT3 磷酸化水平降低
Figure 5 Inhibition of ACE attenuated the Ang II-induced STAT3 phosphorylation

3 讨论

本研究首次在 MSCs 证明① Ang II 诱导 STAT3 磷酸化; ② STAT3 磷酸化参与了 Ang II 诱导的 VEGF 表达和分泌; ③ Ang II 诱导的 STAT3 磷酸化具有 ACE 依赖性。

研究发现 Ang II 刺激在多种细胞能够诱导 STAT3 磷酸化^[9], 而关于 Ang II 诱导 STAT3 磷酸化的机制, 有研究发现 ACE 能够通过细胞内 Ang II 合成促进 STAT3 的激活^[11]。本研究数据表明, Ang II 刺激能够显著诱导 MSCs 中 STAT3 磷酸化, 并且 Ang II 诱导的 STAT3 磷酸化具有 ACE 依赖性, 因为 ACE

抑制剂卡托普利显著抑制了 STAT3 的磷酸化水平。Ang II 在多种细胞能够诱导 VEGF 表达^[5,12-13], 其诱导机制包括通过 ACE、HIF-1 α 、ROS 等介导对 VEGF 的表达^[12,14]。本研究前期工作也证明 Akt 和 ERK1/2^[15] 参与了 Ang II 诱导的 VEGF 生成^[5]。STAT3 是介导 VEGF 生成的重要转录因子, 有文献报道 STAT3 参与了 MSCs 基础条件和应激条件下的 VEGF 生成。然而, 关于它在 Ang II 诱导的 VEGF 表达上调中的作用至今未见报道。本研究发现 STAT3 参与了 Ang II 诱导的 MSCs 中 VEGF 表达和分泌, 并且 Ang II 诱导的 STAT3 磷酸化具有 ACE 依赖性。

之前还发现 ACE 参与了 Ang II 诱导的 VEGF 表达, 并且 Ang II 诱导的 ACE 具有 STAT3 依赖性(另文待发表)。考虑到本研究发现 Ang II 诱导的 STAT3 磷酸化也依赖 ACE, 本研究认为 ACE 和 STAT3 磷酸化之间存在着相互促进的关系, 这一关系可能进一步促进了 VEGF 的表达。

STAT3 介导 VEGF 产生的其他机制, HIF-1 α 被认为起着很关键的作用。HIF-1 α 是众所周知的介导 VEGF 生成的重要转录因子。有研究发现 STAT3 能够通过抑制 HIF-1 α 降解和加速 HIF-1 α 合成来稳定和提 HIF-1 α 的蛋白水平; 在肿瘤细胞的研究中, VEGF 表达的最大化转录需要 STAT3 和 HIF-1 α 都结合到 VEGF 转录启动子上^[16]。并且, 在干细胞中的研究发现, 雌激素诱导的 STAT3 增加 HIF-1 α 活化水平进而增加 VEGF 表达^[17]。因此推断 HIF-1 α 可能也参与了 STAT3 介导的 Ang II 诱导的 VEGF 表达增加。这一推断是否成立有待进一步探讨。

总之, 本研究发现 STAT3 参与了 Ang II 诱导的大鼠 MSCs 中 VEGF 表达, 且诱导的 STAT3 磷酸化与 ACE 有关。本研究不仅揭示了 STAT3 在 Ang II 效应中的重要性, 也进一步明确了 Ang II 诱导 VEGF 生成的机制。因此, STAT3 可能成为提高缺血心肌中移植 MSCs 功能新的治疗靶点。

[参考文献]

- [1] Kawada H, Fujita J, Kinjo K, et al. Mesenchymal, but not hematopoietic, stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction in mice [J]. *Kidney Int*, 2005, 68(5): 1940-1943
- [2] Uemura R, Xu M, Ahmad N, et al. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling [J]. *Circ Res*, 2006, 98(11): 1414-1421
- [3] Yang J, Zhou W, Zheng W, et al. Effects of myocardial

- transplantation of marrow mesenchymal stem cells transfected with vascular endothelial growth factor for the improvement of heart function and angiogenesis after myocardial infarction[J]. *Cardiology*,2007,107(1):17-29
- [4] Strawn WB,Richmond RS,Ann Tallant E,et al. Renin-angiotensin system expression in rat bone marrow haematopoietic and stromal cells [J]. *Brit J Haematol*,2004,126(1):120-126
- [5] Shi RZ,Wang JC,Huang SH,et al. Angiotensin II induces vascular endothelial growth factor synthesis in mesenchymal stem cells[J]. *Exp Cell Res*,2009,315(1):10-15
- [6] Wang M,Zhang W,Crisostomo P,et al. STAT3 mediates bone marrow mesenchymal stem cell VEGF production [J]. *J Mol Cell Cardiol*,2007,42(6):1009-1015
- [7] Deng W,Chen QW,Li XS,et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells with support of bispecific antibody and ultrasound-mediated microbubbles prevent myocardial fibrosis via the signal transducer and activators of transcription signaling pathway[J]. *Cytotherapy*,2011,13(4):431-40
- [8] Poynter JA,Herrmann JL,Manukyan MC,et al. Intracoronary mesenchymal stem cells promote postischemic myocardial functional recovery,decrease inflammation,and reduce apoptosis via a signal transducer and activator of transcription 3 mechanism [J]. *J Am Coll Surg*,2011,213(2):253-260
- [9] Zhou H,Huang B,Du J,et al. Role of the JAK2/STAT pathway and losartan in human glomerular mesangial cell senescence [J]. *Mol Med Report*,2010,3(3):393-398
- [10] Wang BW,Chang H,Shyu KG. Regulation of resistin by cyclic mechanical stretch in cultured rat vascular smooth muscle cells [J]. *Clin Sci (Lond)*,2009,118(3):221-230
- [11] Zhang W,Chen X,Shi S,et al. Expression and activation of STAT3 in chronic proliferative immune complex glomerulonephritis and the effect of fasinopril[J]. *Nephrol Dial Transplant*,2005,20(5):892-901
- [12] Kosaka T,Miyajima A,Shirotake S,et al. Ets-1 and hypoxia inducible factor-1alpha inhibition by angiotensin II type-1 receptor blockade in hormone-refractory prostate cancer [J]. *Prostate*,2010,70(2):162-169
- [13] Otake AH,Mattar AL,Freitas HC,et al. Inhibition of angiotensin II receptor 1 limits tumor-associated angiogenesis and attenuates growth of murine melanoma[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*,2010,66(1):79-87
- [14] Arafat HA,Gong Q,Chipitsyna G,et al. Antihypertensives as novel antineoplastics:angiotensin-I-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor blockers in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *J Am Coll Surg*,2007,204(5):996-1005
- [15] Anandanadesan R,Gong Q,Chipitsyna G,et al. Angiotensin II induces vascular endothelial growth factor in pancreatic cancer cells through an angiotensin II type 1 receptor and ERK1/2 signaling [J]. *J Gastrointestinal Surg*,2008,12(1):57-66
- [16] Xu Q,Briggs J,Park S,et al. Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways [J]. *Oncogene*,2005,24(36):5552-5560
- [17] Wang M,Tan J,Coffey A,et al. Signal transducer and activator of transcription 3-stimulated hypoxia inducible factor-1alpha mediates estrogen receptor-alpha-induced mesenchymal stem cell vascular endothelial growth factor production [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*,2009,138(1):163-171

[收稿日期] 2012-04-16