

## SDF-1 通过 PI3K/Akt 和 MAPK/Erk 信号通路对人微血管内皮细胞功能产生影响

高静,朱红霞,王敏哲\*,苟静,张丽

(新疆医科大学第五附属医院内分泌科,新疆 乌鲁木齐 830011)

**[摘要]** 目的:观察基质细胞衍生因子-1(stromal cell derived factor-1,SDF-1)对人微血管内皮细胞(human microvascular endothelial cell line-1,HMEC-1)功能的影响,并对相关机制进行初步探讨,从而明确 SDF-1 在糖尿病血管病变中的作用。方法:体外培养 HMEC-1,分别在培养基中加入不同浓度的 SDF-1(0、25、50、100  $\mu\text{g/L}$ ),Western blot 检测 HMEC-1 中 PI3K/Akt 和 MAPK/Erk 信号通路的活化情况,MTT 和流式细胞分析检测 HMEC-1 增殖和凋亡能力的变化情况,划痕愈合实验检测 HMEC-1 迁移能力的变化情况。采用 PI3K/Akt 和 MAPK/Erk 信号通路抑制剂 LY294002 和 U0126 阻断 HMEC-1 中 PI3K/Akt 和 MAPK/Erk 信号通路后,再以 SDF-1 处理 HMEC-1,MTT 和流式细胞分析检测 HMEC-1 增殖和凋亡能力的变化情况;划痕愈合实验检测 HMEC-1 迁移能力的变化情况。结果:Western blot 结果显示,25  $\mu\text{g/L}$  的 SDF-1 处理即可显著活化 HMEC-1 中的 PI3K/Akt 和 MAPK/Erk 信号通路,且随着 SDF-1 处理浓度的升高,PI3K/Akt 和 MAPK/Erk 信号通路活化水平逐渐升高。同 0  $\mu\text{g/L}$  的 SDF-1 处理组相比,25、50、100  $\mu\text{g/L}$  的 SDF-1 均可显著加强 HMEC-1 的增殖和迁移能力( $P < 0.01$ ),并抑制 HMEC-1 的凋亡水平( $P < 0.01$ ),且这种作用具有剂量依赖性。当采用 LY294002 和 U0126 阻断 HMEC-1 中的 PI3K/Akt 和 MAPK/Erk 信号通路后,SDF-1 促 HMEC-1 增殖和迁移能力及抑制 HMEC-1 凋亡的能力均显著降低( $P < 0.01$ )。结论:SDF-1 可通过活化 PI3K/Akt 和 MAPK/Erk 信号通路,进而促进 HMEC-1 的增殖和迁移,并抑制 HMEC-1 的凋亡水平,从而在糖尿病血管病变中发挥一定的作用。

**[关键词]** 基质细胞衍生因子-1;信号通路;糖尿病;人微血管内皮细胞;PI3K/Akt;MAPK/Erk

**[中图分类号]** R587.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)09-1205-06

**doi:**10.7655/NYDXBNS20150904

## SDF-1 affects human microvascular endothelial cell function by influence PI3K/Akt and MAPK/Erk signaling pathway

Gao Jing,Zhu Hongxia,Wang Minzhe\*,Gou Jing,Zhang Li

(Department of Endocrinology,the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University,Urumqi 830011,China)

**[Abstract]** Objective:To observe the effect of stromal cell derived factor-1(SDF-1)on human microvascular endothelial cell line-1(HMEC-1),and study the relevant mechanism. **Methods:**HMEC-1 cells were treated with SDF-1 of different concentrations(0,25,50,100  $\mu\text{g/L}$ ),then the phosphorylation level of PI3K/Akt and MAPK/Erk were detected by Western blot,and the proliferation ability and apoptosis rate of HMEC-1 cells were detected by MTT and FCM. Changes on migration ability of HMEC-1 cells was detected by wound healing assay. MCF-7 cells were pretreated with PI3K/Akt and MAPK/Erk signaling pathway inhibitor to observe the effect of PI3K/Akt and MAPK/Erk signaling pathway on SDF-1 induced proliferation,apoptosis and migration in HMEC-1 cells. **Results:**Compared with 0  $\mu\text{g/L}$  SDF-1 treated group,25,50 and 100  $\mu\text{g/L}$  SDF-1 treatment activated PI3K/Akt and MAPK/Erk signaling pathway,promoted proliferation and migration ability,and induced HMEC-1 cells apoptosis ( $P < 0.01$ ),and those effects were concentration-dependent. When pretreated with PI3K/Akt and MAPK/Erk signaling pathway inhibitor,the effect of SDF-1 on promoting proliferation and migration ability,and inducing HMEC-1 cells apoptosis ability were significantly blocked. **Conclusion:**By activation PI3K/Akt and MAPK/Erk signaling pathway,SDF-1 can promote proliferation and migration ability,and induce HMEC-1 cells apoptosis,thus plays a role in diabetic angiopathy.

**[Key words]** stromal cell derived factor-1; signaling pathway; diabetes; human microvascular endothelial cell;PI3K/Akt;MAPK/Erk

[Acta Univ Med Nanjing,2015,35(09):1205-1210]

**[基金项目]** 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2014211C129)

\*通信作者(Corresponding author),E-mail:wangminzhe1960@126.com

糖尿病是一组以高血糖为特征的代谢性疾病,严重危害人类健康<sup>[1]</sup>。糖尿病患者常伴有心血管病变与微血管病变,从而损害心、脑、肾和视网膜等重要靶器官的功能<sup>[2-4]</sup>。糖尿病患者出现血管病变的机制目前还不是很清楚,因此,探讨糖尿病血管病变的发病机制具有重大临床意义。基质细胞衍生因子-1(stromal cell derived factor-1, SDF-1)是一种重要的血管生成蛋白,也被称为 CXCL12<sup>[5-6]</sup>,其受体为 CXCR4。研究显示,糖尿病患者外周血中 SDF-1 含量显著降低,且在合并心血管病变与微血管病变患者中下降更明显。SDF-1 水平下降可导致糖尿病患者外周血中内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)数量下降,血管修复能力受损<sup>[7]</sup>。可见 SDF-1 在糖尿病患者血管病变的发生发展中具有重要作用。然而, SDF-1 在调控糖尿病患者血管病变中的作用机制目前还不是很清楚。据此,本研究通过观察 SDF-1 对人微血管内皮细胞(human microvascular endothelial cell line-1, HMEC-1)功能的影响,并对相关机制进行初步探讨,从而明确 SDF-1 在糖尿病血管病变中的作用,为临床干预 SDF-1/CXCR4 轴治疗糖尿病血管病变提供一定的理论基础,结果报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

HMEC-1 购自上海信裕生物技术有限公司。细胞培养于含 10%FBS 的 DMEM 培养基内,37℃、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下培养。细胞传代至对数生长期开始实验。活化实验中采用 0、25、50、100 μg/L 的 SDF-1 处理 HMEC-1 24 h。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞总蛋白提取

实验用细胞以冰 PBS 洗涤 2 次,400 g 离心 5 min;弃去上清,细胞沉淀中加入蛋白酶磷酸酶抑制剂和 100 μL CytoBuster 蛋白提取试剂,高速涡旋细胞裂解混合物 25 s,室温放置 15 min;4℃ 12 000 g 离心 15 min;所得上清部分即细胞总蛋白,除留部分样品检测蛋白浓度外,其余分装 15 μL/管,-80℃ 冻存。

#### 1.2.2 BCA 法测定蛋白浓度

按说明书倍比稀释标准品 BSA;按体积比 50:1 混合 BCA 试剂 A 和试剂 B,即为工作液;96 孔板中加入 200 μL/孔工作液,随后加入 25 μL 倍比稀释的标准品或待测样品,每种样品设置 3 个复孔。37℃

孵育 30 min;振荡器短暂混匀后在波长 562 nm 处测定吸光度值;根据标准品的吸光度值和浓度梯度绘制标准曲线,根据标准曲线及待测样品的吸光度值推算各蛋白样品浓度。

#### 1.2.3 Western blot

等量的上样蛋白经 8%~10% SDS-PAGE 分离胶和 5%浓缩胶分离后,半干转印至硝酸纤维素膜上,用含 5% BSA 的 TBST 室温封闭 1 h,加入一抗 4℃ 过夜孵育。第二天用 0.1% TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加入相应的 HRP 标记的二抗,室温孵育 1 h。0.1% TBST 洗膜后,硝酸纤维素膜以 Super-signal West Femto/Pico HRP 敏感化学发光底物对条带进行显色。Actin 作为内参对照,所有实验至少重复 3 次。

#### 1.2.4 MTT 增殖检测

上述 SDF-1 处理的细胞培养至对数生长期,接种于 96 孔培养板中,每孔中加入 20 μL MTT 溶液,作用 4 h 后吸出上清,加入 150 μL DMSO 溶液,低速震荡 10 min 后,波长 490 nm 处测定吸光度值。阻断 PI3K 和 Erk1/2 信号通路实验中,在加入完全培养基及 SDF-1 前,先以 PI3K/Akt 信号通路抑制剂 LY294002(5 μmol/L)和 MAPK/Erk 信号通路抑制剂 U0126(10 μmol/L)预处理细胞 1 h。

#### 1.2.5 凋亡率检测

收集上述 SDF-1 处理的细胞,1 000 g 离心 5 min,1% BSA PBS 洗涤 1 次。用 100 μL 结合缓冲液将细胞重悬,加入 2 μL Annexin V 染料和 0.1 μL PI 染料,避光 15 min,流式细胞仪检测。阻断 PI3K 和 Erk1/2 信号通路实验中,在加入完全培养基及 SDF-1 前,先以 LY294002(5 μmol/L)和 U0126(10 μmol/L)预处理细胞 1 h。

#### 1.2.6 伤口愈合实验

取对数生长期的 HMEC-1,24 孔板每孔接种 1×10<sup>5</sup> 个细胞。37℃ 5%CO<sub>2</sub> 培养 24 h 后,用 1 mL 移液枪头在 24 孔板中间划一横线,PBS 冲洗 2 次后加入完全培养基,加入 100 μg/L 的 SDF-1 继续培养 24 h。采用相差显微镜观察并记录细胞迁移情况。阻断 PI3K 和 Erk1/2 信号通路实验中,在加入完全培养基及 SDF-1 前,先以 LY294002(5 μmol/L)和 U0126(10 μmol/L)预处理细胞 1 h。

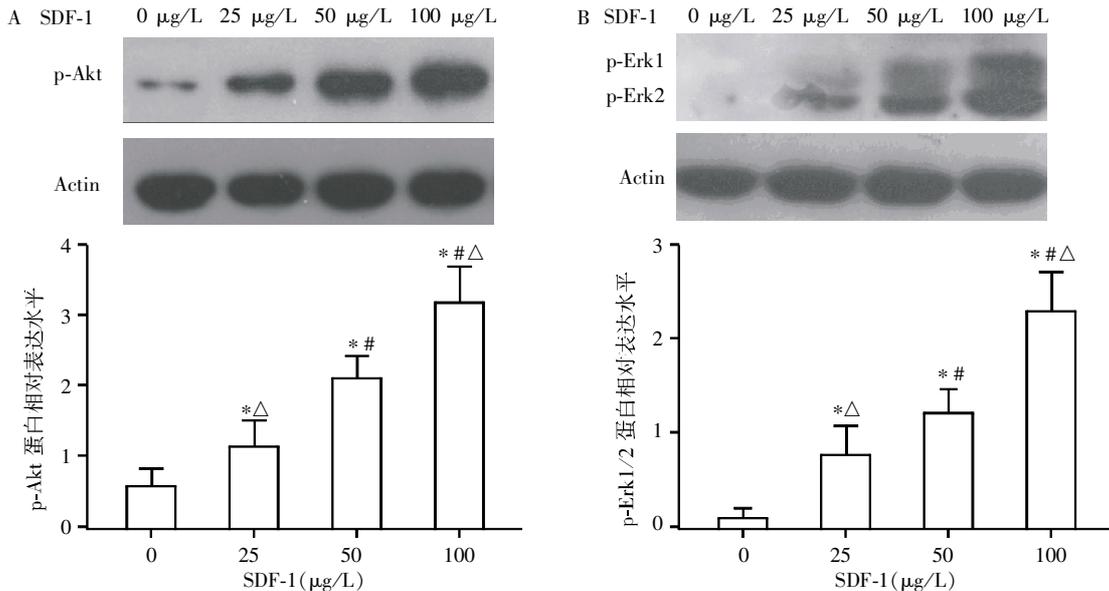
### 1.3 统计学方法

采用 SPSS15.0 统计软件进行数据分析。多组间数据比较采用 Anova 法,2 组间数据比较采用 *t* 检验,*P* ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 SDF-1 对 HMEC-1 中 PI3K/Akt 和 MAPK/Erk 信号通路的活化作用

同 0  $\mu\text{g/L}$  组相比, 25、50、100  $\mu\text{g/L}$  的 SDF-1 处理可显著增加 HMEC-1 中 Akt(图 1A) 和 Erk 蛋白磷酸化水平(图 1B)。



与 SDF-1 0  $\mu\text{g/L}$  组相比, \* $P < 0.05$ ; 与 SDF-1 25  $\mu\text{g/L}$  组相比, # $P < 0.05$ ; 与 SDF-1 50  $\mu\text{g/L}$  组相比,  $\Delta P < 0.05$ 。

图 1 Western blot 检测 SDF-1 对 HMEC-1 中 Akt 和 Erk 蛋白磷酸化水平的影响

Figure 1 The effect of SDF-1 on the phosphorylation of Akt and Erk

同 SDF-1 处理组相比, 以 LY294002(5  $\mu\text{mol/L}$ ) 和 U0126 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 预处理细胞 1 h, 可显著阻断 HMEC-1 中 PI3K/Akt 和 MAPK/Erk 信号通路(图 3)。

### 2.4 PI3K/Akt 和 MAPK/Erk 信号通路在 SDF-1 影响 HMEC-1 增殖、凋亡及迁移能力中的作用

阻断 PI3K/Akt 和 MAPK/Erk 信号通路后, 100  $\mu\text{g/L}$  的 SDF-1 处理所引起的 HMEC-1 增殖和迁移能力升高及凋亡水平降低均被显著阻断 ( $P < 0.01$ , 图 4)。

## 3 讨论

免疫反应目前被广泛认为是导致免疫系统疾病的首要原因。导致不同疾病发病的免疫应答过程中, 趋化因子作为免疫系统的主要武器在调节机体免疫应答中发挥重要作用。糖尿病作为免疫系统疾病之一, 患者常伴有大血管病变与微血管病变。SDF-1 是一种趋化因子, 也是一种重要的血管生成蛋白,

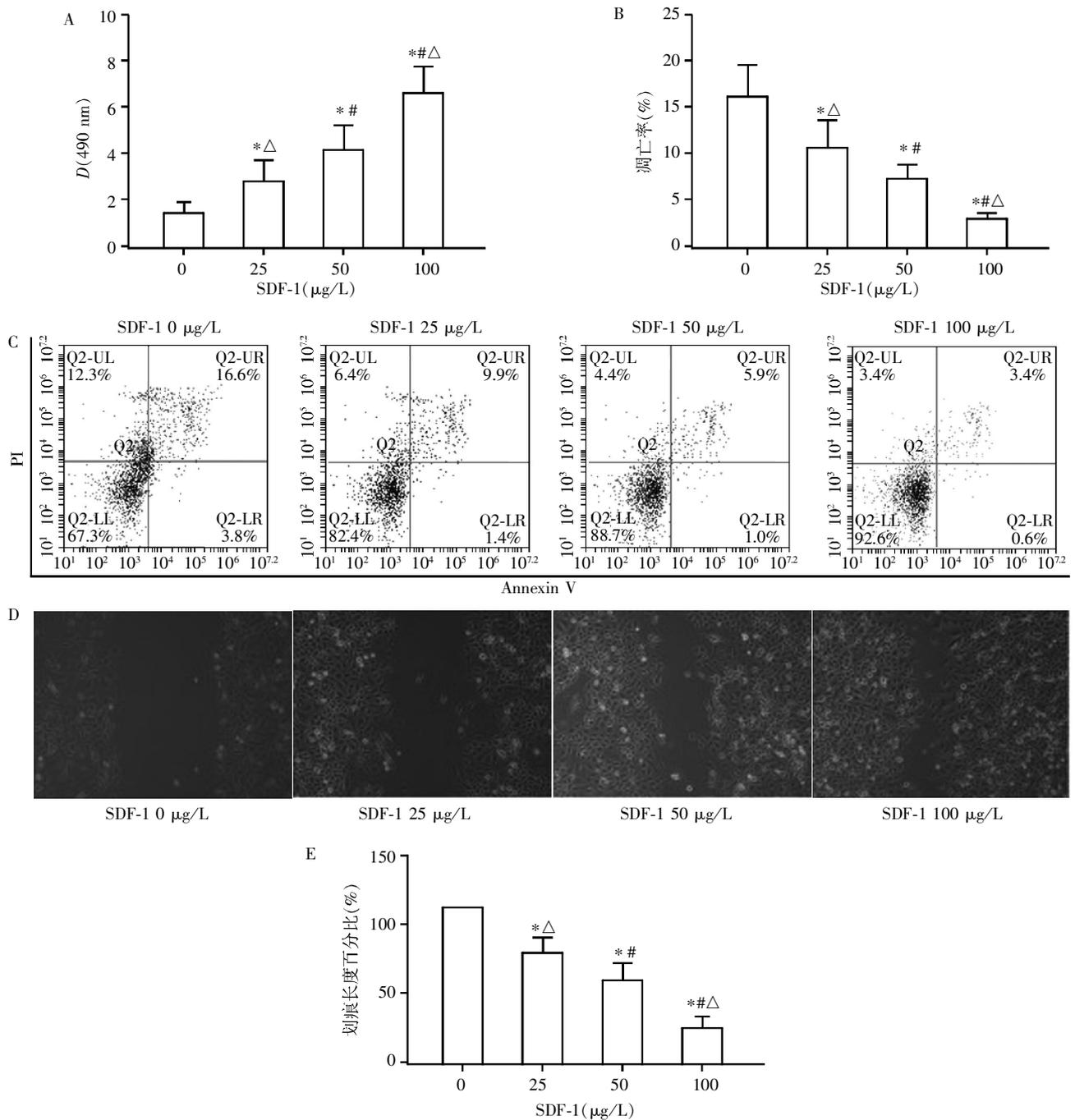
### 2.2 SDF-1 对 HMEC-1 增殖、凋亡及迁移的影响

同 0  $\mu\text{g/L}$  组相比, 25、50、100  $\mu\text{g/L}$  的 SDF-1 处理可显著增加 HMEC-1 的增殖能力(图 2A), 降低 HMEC-1 的凋亡水平(图 2B、C,  $P < 0.05$ ) 和迁移能力(图 2D、E,  $P < 0.05$ )。

### 2.3 LY294002 和 U0126 阻断 HMEC-1 中的 PI3K/Akt 和 MAPK/Erk 信号通路效果检测

SDF-1 也被称为 CXCL12<sup>[8-9]</sup>, 其受体为 CXCR4。目前研究表明, SDF-1 在 1 型糖尿病中, 可募集 T 细胞至胰腺处, 从而调控糖尿病的发生和发展<sup>[10]</sup>。同时, SDF-1 及其受体 CXCR4 可通过促进内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPC) 从骨髓向缺血的视网膜处募集, 从而促使视网膜受损血管的修复和新生<sup>[11]</sup>。据此, SDF-1 在糖尿病的发生发展及糖尿病患者血管病变的发生发展中具有重要作用。然而目前关于 SDF-1 在调控糖尿病患者血管病变中的作用机制还不是很清楚。

本研究观察了 SDF-1 对 HMEC-1 功能的影响, 并对相关机制进行初步探讨, 从而明确 SDF-1 在糖尿病血管病变中的作用。文献报道, SDF-1/CXCR4 信号可经 Erk 和 PI3K/Akt 途径调节人类骶骨软骨细胞周期和上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)<sup>[12]</sup>。且 CXCR4 信号可通过 PI3K/Akt 和 Erk 通路诱导胶质母细胞瘤出现 EMT<sup>[13-14]</sup>。同时, 文献还报道, SDF-1 可通过促进表皮干细胞迁移和增殖而加



A: MTT 检测细胞增殖情况; B、C: 流式细胞检测细胞凋亡情况; D、E: 划痕实验检测细胞迁移能力。与 SDF-1 0 μg/L 组相比, \* $P < 0.05$ ; 与 SDF-1 25 μg/L 组相比, # $P < 0.05$ , 与 SDF-1 50 μg/L 组相比,  $\Delta P < 0.05$ 。

图 2 不同浓度 SDF-1 对 HMEC-1 增殖、凋亡及迁移的影响检测

Figure 2 The effect of SDF-1 on proliferation, apoptosis and migration of HMEC-1

速皮肤伤口的愈合<sup>[15]</sup>。目前关于 SDF-1 可否通过 PI3K/Akt 和 MAPK/Erk 信号通路, 进而影响 HMEC-1 的增殖和迁移能力, 并抑制 HMEC-1 的凋亡水平还未见文献报道。

本研究结果显示, 不同浓度的 SDF-1 处理 HMEC-1 后, 随着 SDF-1 处理浓度的升高, HMEC-1 中 PI3K/Akt 和 MAPK/Erk 信号通路的活化水平亦

逐渐升高, 同时, SDF-1 可显著增加 HMEC-1 的增殖能力和迁移能力, 并抑制 HMEC-1 的凋亡水平, 且这些作用均具有剂量依赖性。进一步采用 LY294002 和 U0126 阻断 HMEC-1 中的 PI3K/Akt 和 MAPK/Erk 信号通路后, 结果显示 SDF-1 促 HMEC-1 增殖和迁移能力及抑制 HMEC-1 凋亡的能力均被显著阻断。据此, 本研究结果显示, SDF-1 可通过激活

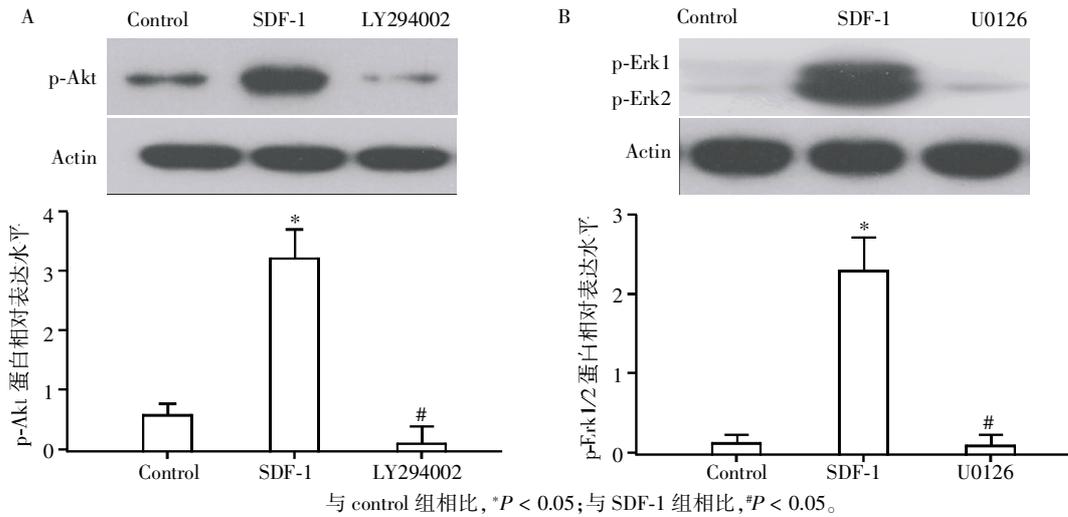


图 3 PI3K/Akt 和 MAPK/Erk 信号通路阻断效果检测

Figure 3 Check the inhibit effect of PI3K/Akt and MAPK/Erk pathways inhibitor

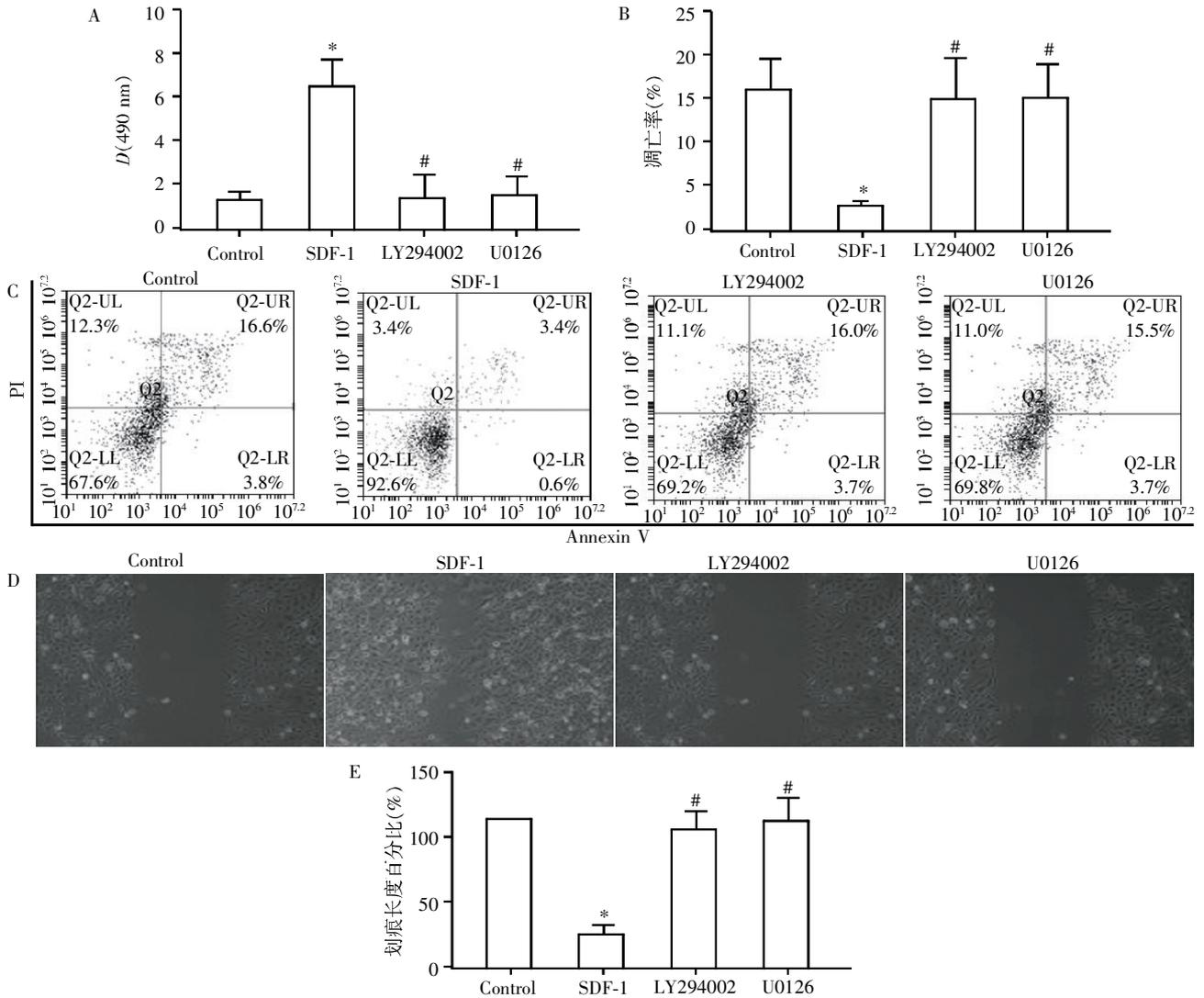


图 4 PI3K/Akt 和 MAPK/Erk 信号通路阻断对 HMEC-1 增殖、凋亡及迁移能力的影响

Figure 4 The effect of PI3K/Akt and MAPK/Erk pathways on proliferation, apoptosis and migration of HMEC-1

HMEC-1 中的 PI3K/Akt 和 MAPK/Erk 信号通路, 进而促进 HMEC-1 的增殖和迁移能力, 并抑制 HMEC-1 的凋亡水平, 从而在糖尿病血管病变中发挥一定的保护作用。本研究为临床干预 SDF-1/CXCR4 轴, 从而治疗糖尿病血管病变提供了一定的理论基础。

#### [参考文献]

- [1] Marzbanrad F, Hambly B, Ng E, et al. Relationship between heart rate variability and angiotensinogen gene polymorphism in diabetic and control individuals[J]. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2014, 2014:6683-6686
- [2] 付建芳, 张南雁, 涂艳阳, 等. 尿酸、尿微量白蛋白水平与 2 型糖尿病颈动脉内膜病变的关系[J]. *南方医科大学学报*, 2013, 30(1): 140-142
- [3] Mattock MB, Morrish NJ, Viberti GC, et al. Prospective study of microalbuminuria as predictor of mortality in NIDDM[J]. *Diabetes*, 1992, 41(6): 736-741
- [4] 梁玉娥, 王建平. SDF-1/CXCR4 与糖尿病大血管病变关系的研究[J]. *现代医药卫生*, 2014, 30(4): 528-530
- [5] Feng G, Hao D, Chai J. Processing of CXCL12 impedes the recruitment of endothelial progenitor cells in diabetic wound healing[J]. *FEBS J*, 2014, 281(22): 5054-5062
- [6] Errede M, Girolamo F, Rizzi M, et al. The contribution of CXCL12-expressing radial glia cells to neuro-vascular patterning during human cerebral cortex development[J]. *Front Neurosci*, 2014, 15(8): 324
- [7] 黎金凤, 林安华, 邓颖, 等. SDF-1 对糖尿病外周血 EPCs 功能的影响及其与 PI3K/AKT 信号通路的关系[J]. *天津医药*, 2014, 42(11): 1069-1072
- [8] Wei L, Zhang B, Cao W, et al. Inhibition of CXCL12/CXCR4 suppresses pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation and cell cycle progression via PI3K/Akt pathway under hypoxia[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2014, 25(1): 1-11
- [9] Abu El-Asrar AM, Mohammad G, Nawaz MI, et al. High-mobility group Box-1 modulates the expression of inflammatory and angiogenic signaling pathways in diabetic retina[J]. *Curr Eye Res*, 2014, 11(1): 1-12
- [10] Zhao Y, Guo C, Hwang D, et al. Selective destruction of mouse islet beta cells by human T lymphocytes in a newly-established humanized type 1 diabetic model[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 399(4): 629-636
- [11] 马晓昀, 徐格致. 基质细胞衍生因子-1 与增生性糖尿病视网膜病变的研究进展[J]. *世界临床药物*, 2007, 28(7): 394-403
- [12] Yang P, Wang G, Huo H, et al. SDF-1/CXCR4 signaling up-regulates survivin to regulate human sacral chondrosarcoma cell cycle and epithelial-mesenchymal transition via ERK and PI3K/AKT pathway[J]. *Med Oncol*, 2015, 32(1): 377
- [13] Lv B, Yang X, Lv S, et al. CXCR4 Signaling induced epithelial-mesenchymal transition by PI3K/AKT and ERK pathways in glioblastoma[J]. *Mol Neurobiol*, 2014 [Epub ahead of print]
- [14] Liao A, Shi R, Jiang Y, et al. SDF-1/CXCR4 axis regulates cell cycle progression and epithelial-mesenchymal transition via up-regulation of survivin in glioblastoma[J]. *Mol Neurobiol*, 2014 [Epub ahead of print]
- [15] Guo R, Chai L, Chen L, et al. Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) accelerated skin wound healing by promoting the migration and proliferation of epidermal stem cells[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2015, 51(6): 578-585

[收稿日期] 2015-01-13