

凝血酶和 PAR-1 受体对成骨细胞白介素-6 和成纤维细胞生长因子-2 表达的影响

宋淑军 王宗烨

中图分类号: R34 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)12-0905-03

摘要:目的 探讨凝血酶对小鼠成骨细胞某些因子表达的调节作用。方法 使用小鼠颅骨的成骨细胞,通过荧光定量 PCR 方法和人工合成的 PAR-1 或 PAR-4 特异性激活肽了解受体介导的凝血酶对成骨细胞因子表达的影响。结果 凝血酶不影响成骨细胞转化生长因子、血小板生长因子 A、胰岛素样生长因子-Ⅰ和-Ⅱ的表达,凝血酶和 PAR-1 受体激活肽可以显著上调成骨细胞成纤维细胞生长因子-2(FGF-2)和白介素-6(IL-6)的表达,但对 IL-6 表达的调节作用,凝血酶远较 PAR-1 激活肽为强,而 PAR-4 特异性激活肽并不影响这两种因子的表达。结论 凝血酶可以促进小鼠成骨细胞 FGF-2 和 IL-6 的表达,此作用可能是通过 PAR-1 和非 PAR-1 通路介导的,凝血酶对 FGF-2 表达的调节可能完全是由 PAR-1 介导的,而凝血酶对 IL-6 表达的影响部分是由 PAR-1 介导的,部分可能是由未知受体介导的。PAR-4 并不参与介导凝血酶对 FGF-2 和 IL-6 表达的调节作用。

关键词:凝血酶;成骨细胞;成骨细胞成纤维细胞生长因子-2;白介素-6

DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2009.12.009

The regulation effects of thrombin on mouse osteoblast FGF-2 and IL-6 expression SONG Shujun, WANG Zongye. The Department of Pathology and Laboratory, PLA 306 Hospital, Beijing 100101, China

Abstract: **Objective** The aim of this study is to investigate the regulation effects of thrombin on the expression of some factors expressed in osteoblasts. **Methods** The regulation effects on mRNA expression of some selected osteoblast-derived factors by thrombin and synthetic peptides that specifically activate PAR-1 and PAR-4 were investigated by quantitative real time PCR in mouse primary osteoblasts. **Results** The expression of IGF-Ⅰ, IGF-Ⅱ and PDGFA was not affected by the application of thrombin. Thrombin stimulated the mRNA expression of interleukine-6 and fibroblast growth factor-2. The PAR-1-activating peptide can promote the expression of FGF-2 and interleukine-6. The effect of thrombin on the regulation of IL-6 expression was much more potential than that of PAR-1AP. However, in the regulation of FGF-2 expression the effects of thrombin was similar to PAR-1AP. PAR-4-activating peptide was no effect on the regulation of either IL-6 or FGF-2 expression. **Conclusion** The results presented here demonstrate that thrombin up-regulates mRNA expression of IL-6 and FGF-2 through PAR-1-dependent and independent pathways. Thrombin regulated the expression of FGF2 is fully PAR-1-dependent. Thrombin up-regulated the expression of IL-6 was partially PAR-1-dependent in mouse osteoblast. PAR-4 does not participate this activity.

Key words: Thrombin; Osteoblast; FGF-2; IL-6

凝血酶对多种细胞具有激素样的功能^[1]。凝血酶可以促进成骨细胞的增殖、抑制碱性磷酸酶(成骨细胞分化的标志性分子)活性,抑制成骨细胞凋亡^[2,3]。凝血酶所致的一些细胞反应是通过刺激合

成和分泌某些生长因子和细胞因子而完成,因此探讨凝血酶对细胞或生长因子表达的影响有助于了解凝血酶生物学功能的作用机制。多数凝血酶诱导的细胞反应是通过已知受体介导的,至今已经发现了三种凝血酶受体,分别为蛋白酶激活受体(protease-activated receptor, PAR)-1、-3 和 -4^[4,6]。以前的研究表明小鼠成骨细胞表达两种凝血酶受体,PAR-1 和 PAR-4,并且两者均具有生物功能活性^[3]。PAR 的激

作者单位: 100101 北京,中国人民解放军第306医院病理实验科

通讯作者: 宋淑军, Email: shuj80@gmail.com

活过程中产生的新的氨基末端 ,可以使受体本身激活 ,诱导细胞内的生物信息^[7] ,因此 ,氨基酸序列和配基一致的人工合成短肽(受体激活肽) ,同样可激活 PAR 而不需要蛋白裂解。本研究的目的是探讨凝血酶对成骨细胞一些生长和细胞因子基因表达的影响以及利用特异性的 PAR-1 和 PAR-4 激活肽研究小鼠成骨细胞不同凝血酶受体在介导细胞或生长因子表达中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

PAR-1 激活肽(TFFLR-NH₂)和 PAR-4 激活肽(AYPGKF-NH₂)由 Auspep 合成 ,M-MLV Reverse Transcriptase 试剂盒购于 Promega 公司。凝血酶由澳大利亚蒙纳士大学(Monash University)生化和分子生物学教研室提供。细胞培养所用物品和定量 PCR 试剂盒购自 Invitrogen。

1.2 原代成骨细胞的分离及培养

从新生 24 h 内的小鼠取下颅顶骨 ,采用胶原酶系列消化法得到小鼠原代成骨细胞^[21]。消化所得细胞培育至近汇合 ,胰酶消化后种植在相应的培养器皿中 ,所有实验均使用第一次传代培养的细胞。细胞培养液使用 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)含有 10% 胎牛血清 ,庆大霉素 (50 μg/ml) ,两性霉素 B (2.5 μg/ml) 和 L-谷氨酸 (300 μg/ml) ,细胞培养在 37℃ ,含 5% 的二氧化碳的空气中。

1.3 实时定量 PCR

第一次传代的小鼠成骨细胞生长至近融合时 ,无血清培养 24 h ,然后使用 100 nmol/L 凝血酶处理细胞 6 h ,采用 RNeasy Mini 试剂盒(Qiagen)提取小鼠原代成骨细胞总 RNA。1 μg RNA 经 RQ1 DNA 酶处理后 ,反转录以 oligo (dT)15 为引物 ,使用 M-MLV Reverse Transcriptase 试剂盒合成 cDNA。成骨细胞转化生长因子 β1 (TGFβ1) ,血小板生长因子 A (PDGFA) ,胰岛素样生长因子 -I (IGF- I) 和 -II (IGF- II) ,FGF-2、IL-6 等 mRNA 的表达采用实时定量 PCR 的方法检测 ,实时定量 PCR 采用 SYBR Green master mix 试剂盒 ,在 Stratagene Mx 3000p 定量 PCR 仪上进行 ,每反应总体积为 20 μl ,PCR 温度循环设计为 95℃ ,10 min ;然后以 95℃、30 s ,60℃、30 s 和 72℃、30 s 循环 40 次。mRNA 表达量用管家基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)校正。引物设计使用 “ Primer Selection ” <http://alces.med.umn.edu/rawprimer.html> ,由 GeneWorks 合成 ,序列见表 1。数

据分析 :数据 Cycle Threshold (CT) 值由荧光定量 PCR 仪自代软件完成 ,根据标本目的基因的 CT 值和管家基因的 CT 值 ,用 ΔΔCT 的方法^[8] 计算基因的相对表达量。

表 1 引物序列列表

| 名称 | 上游引物 | 下游引物 |
|--------|------------------------------|---------------------------------|
| GAPDH | 5'-GATGCCCCCATGTTTGTGAT-3' | 5'-TTCGTGACAATCTTGAGTGAAGTGT-3' |
| TGFβ-1 | 5'-ACCCCACTGATAGCGCTGA-3' | 5'-AGCAGTGAGCGCTGAATCGAA-3' |
| PDGFA | 5'-CTGATCTGGCCCATGTGT-3' | 5'-ACCTTGACACTGCGGTGGTG-3' |
| IL-6 | 5'-CATGTCTCTGCGAAATCGTG-3' | 5'-TTCGTCAAGTGCATCATCGTGT-3' |
| IGF-I | 5'-TGAATTTGGCCTCTTAAGAGCA-3' | 5'-CCACAGATCGAGTCAAGTACG-3' |
| IGF-II | 5'-CCCTCAGCAAGTGCTAAAGA-3' | 5'-TGGATACCGAGGCAATTCATAG-3' |
| FGF-2 | 5'-GGACCCCAAGCGGCTCTACT-3' | 5'-TGACGTGTGGTTCGCTCTTC-3' |

2 结果

2.1 凝血酶对成骨细胞所选生长因子和细胞因子表达的调节作用

凝血酶的使用不影响小鼠原代成骨细胞 IGF- I 和 IGF- II、PDGFA、TGFβ1 的 mRNA 表达 ,然而凝血酶处理组 FGF-2 和 IL-6 的表达明显高于对照组 ,且凝血酶呈剂量依赖性促进小鼠成骨细胞 FGF-2 和 IL-6 的表达 ,结果显示 1 nmol/L 的凝血酶即可显著上调两因子的表达 ,100 nmol/L 时此作用最强 ,相对表达量分别为 4.78 ± 0.58 和 28.23 ± 4.56 ,200 的凝血酶对两种因子表达的刺激作用反而变弱(图 1)。

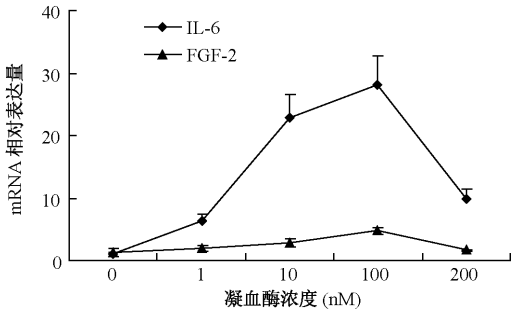


图 1 凝血酶对小鼠成骨细胞 IL-6 和 FGF-2 表达的影响
注 小鼠的成骨细胞生长至融合 ,无血清培养 24 h 后 ,凝血酶(所示浓度)处理细胞 6 h ,提取总 RNA ,采用定量 PCR 技术分析凝血酶对成骨细胞因子表达的影响 ,采用 ΔΔCT 法计算基因的相对表达量

2.2 特异性蛋白酶激活肽对成骨细胞 FGF-2 和 IL-6 表达的影响

为了了解小鼠成骨细胞所表达的两个凝血酶受体(PAR-1 和 PAR-4)在凝血酶调节 FGF-2 和 IL-6 表达中的作用 ,使用特异性蛋白酶受体激活肽 PAR-1AP 和 PAR-4AP 处理成骨细胞 ,发现 PAR-1AP 可以促进 FGF-2 和 IL-6 表达 ,基因相对表达量分别为

4.09 ± 0.42 和 12.55 ± 2.67, PAR-4AP 的使用并未影响 FGF-2 和 IL-6 在小鼠成骨细胞的表达。

3 讨论

凝血酶除了凝血功能外,凝血酶对细胞具有激素样的调节作用,凝血酶的许多功能是通过其刺激产生某些细胞或/和生长因子而完成,凝血酶所调节的多数细胞反应是由其受体介导的。诱导某些细胞和生长因子的分泌是凝血酶参与调节某些细胞生理、病理过程的一种机制,本实验使用凝血酶处理,通过定量 PCR 的方法对多种成骨细胞因子表达进行观察,了解凝血酶对这些因子表达的调节作用,并了解小鼠成骨细胞的两种凝血酶受体对这一作用的介导。结果显示凝血酶可显著上调 IL-6 和 FGF2 的表达,这种作用可能是凝血酶在骨组织损伤修复中的一种保护作用。因为活性的凝血酶通常出现在组织损伤部位,过去研究表明骨损伤部位的凝血酶有利于骨的修复^[9],且 IL-6 和 FGF-2 可以促进骨折愈合^[10,11],因此凝血酶可能是通过刺激分泌这些因子而起作用。

以前研究表明凝血酶可以通过其受体 PAR-1 上调某些细胞 IL-6 的表达,如人支气管上皮细胞^[12]和血管平滑肌细胞^[13],此外凝血酶可以通过 PAR-1 刺激人的血管平滑肌细胞 FGF-2 的分泌^[14]。进一步的研究表明凝血酶还可以诱导成骨细胞系 MC3T3-E1 细胞 IL-6 的表达,但尚不清楚介导这一作用的受体。本实验结果显示凝血酶显著上调小鼠原代成骨细胞 IL-6 和 FGF-2 的表达,由于小鼠的成骨细胞表达两种凝血酶受体^[3],因此,为了了解 PAR-1 和 PAR-4 在凝血酶诱导成骨细胞因子产生中的作用,我们使用凝血酶特异性受体激活肽 PAR-1AP 和 PAR-4AP,发现只有 PAR-1AP 可以上调成骨细胞 IL-6 和 FGF-2 的表达,而 PAR-4AP 却没有此作用,说明 PAR-1 参与凝血酶对 IL-6 和 FGF-2 在成骨细胞表达的调节作用,而 PAR-4 似乎并不参与两者表达的调节。此外如果比较凝血酶和特异性的受体激活肽对因子表达调节的强度,可以看出 PAR-1AP 在调控 IL-6 表达的作用远较凝血酶弱,而对 FGF-2 表达的影响 PAR-1AP 和凝血酶则无明显差距,说明凝血酶对 FGF-2 表达的调节可能完全是由 PAR-1 介导的,其他凝血酶受体似乎并未参与,而凝血酶对 IL-6 表达的调节作用除了 PAR-1 参与外,可能其他未知凝血酶受体也参与其中。

结论:凝血酶在成骨细胞通过 PAR-1 依赖性和 PAR-1 非依赖性通路调节因子的表达,FGF-2 表达的调节完全是由 PAR-1 介导的,IL-6 表达的调节部分是由 PAR-1 介导的。PAR-4 并不参与 FGF-2 和 IL-6 的表达。

【参考文献】

- [1] Martorell L, Martínez-González J, Rodríguez C, et al. Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis. *Thromb Haemost*, 2008, 99(2):305-315.
- [2] Song SJ, Pagel CN, Pike RN, et al. Studies on the receptors mediating responses of osteoblasts to thrombin. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37(1):206-213.
- [3] Pagel CN, De Niese MR, Abraham LA, et al. Inhibition of osteoblast apoptosis by thrombin. *Bone*, 2003, 33:733-743.
- [4] Vu T K, Hung DT, Wheaton VI, et al. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 1991, 64:1057-1068.
- [5] Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, et al. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature*, 1997, 386:502-506.
- [6] Kahn ML, Zheng YW, Huang W, et al. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*, 1998, 394:690-694.
- [7] Coughlin SR. How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96:11023-11027.
- [8] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [9] Hanratty BM, Ryaby JT, Pan XH, et al. Thrombin related peptide TP508 promoted fracture repair in a mouse high energy fracture model. *J Orthop Surg Res*, 2009, 29:4:1.
- [10] Rozen N, Lewinson D, Bick T, et al. Fracture repair: modulation of fracture-callus and mechanical properties by sequential application of IL-6 following PTH 1-34 or PTH 28-48. *Bone*, 2007, 41(3):437-445.
- [11] Ide J, Kikukawa K, Hirose J, et al. The effect of a local application of fibroblast growth factor-2 on tendon-to-bone remodeling in rats with acute injury and repair of the supraspinatus tendon. *J Shoulder Elbow Surg*, 2009, 18(3):391-398.
- [12] Asokanathan N, Graham PT, Fink J, et al. Activation of protease-activated receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 stimulates IL-6, IL-8, and prostaglandin E2 release from human respiratory epithelial cells. *J Immunol*, 2002, 168(7):3577-3585.
- [13] Okuno T, Matsuda K, Ueyama K, et al. Leiomyosarcoma of the pulmonary vein. *Pathol Int*, 2000, 50(10):839-846.
- [14] Cao H, Dronadula N, Rao GN. Thrombin induces expression of FGF-2 via activation of PI3K-Akt-Fra-1 signaling axis leading to DNA synthesis and motility in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 290(1):C172-C182.