

GW501516 通过 TGF β -Smad3 信号途径促进人脐静脉内皮细胞 PAI-1 的表达*

莫中成 李霞 张大棣 朱明燕 张青海 曾颖
伍荣 鲁艳莉 陈意 易光辉**

(南华大学医学院心血管疾病研究所, 动脉硬化化学湖南省重点实验室, 衡阳 421001)

摘要 为探讨过氧化物酶体增殖物激活型受体 δ (peroxisome proliferator-activated receptor- δ , PPAR δ)激动剂 GW501516 对人脐静脉内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂 1 (PAI-1) 表达的影响及机制, 采用 siRNA、TGF β -Smad3 信号通路阻滞剂等处理细胞, 经实时定量 PCR、Western blot 方法分别检测细胞中 PAI-1 及磷酸化 Smad3 蛋白的表达. 结果显示, 与对照组比较, GW501516 可诱导人脐静脉内皮细胞(HUVEC)中 PAI-1 表达, 且此效应呈浓度和时间依赖性($P < 0.05$); siRNA 沉默 PPAR δ 的表达后, 可阻抑 GW501516 对 HUVEC 细胞 PAI-1 表达的促进作用; TGF β -Smad3 信号通路抑制剂 SB-431542 与 SIS3 均可降低 HUVEC 细胞 pSmad3 蛋白的表达, 而细胞 PAI-1 表达也随之降低. 结果提示, GW501516 可促进 HUVEC 细胞 PAI-1 的表达, 其机制可能与 TGF β -Smad3 信号通路有关.

关键词 GW501516, 纤溶酶原激活物抑制剂 1, 过氧化物酶体增殖物激活型受体 δ , 转化生长因子 β , Smad3

学科分类号 R363, R54

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00357

血浆纤维蛋白原水平增高是心脑血管病的独立危险因素, 可能通过促进血栓形成和纤维蛋白沉积影响动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的形成^[1-3]. 血管内纤维蛋白的清除主要靠纤溶酶来调节, 后者是由组织型和尿激酶型纤溶酶原激活物(tPA 和 uPA)作用于纤溶酶原形成的, 而纤溶酶原激活物抑制剂 1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)可抑制 tPA 和 uPA 的活性. 临床及流行病学研究提示, As 及冠心病患者存在纤溶活性受损, 而血浆纤溶活性的降低常常归因于 PAI-1 水平的增高^[4-5]. PAI-1 可能通过影响内皮细胞再生、细胞外基质形成、平滑肌细胞迁移和增殖、附壁血栓形成等过程参与 As 的发生.

过氧化物酶体增殖物激活型受体 δ (peroxisome proliferator-activated receptor- δ , PPAR δ)是 PPAR 的亚型之一, 是依赖配体激活的核转录因子. 有研究表明, PPAR δ 激活后, 可通过调节脂质代谢, 提高脂肪酸氧化等作用, 抑制 As 的发生发展^[6-8]. 研究发现, PAI-1 启动子上含有与过氧化物酶体增殖物反应元件(peroxisome proliferator response elements, PPRE)具高度同源性的序列^[9]. 不饱和脂肪酸和贝

特类调脂药等 PPAR 激活物, 可调控 PAI-1 的表达^[10]. 但是, PPAR δ 对 PAI-1 表达的调控作用及分子机制并不十分清楚. 转化生长因子 β (TGF β)具有多重生物学功能, 对维持血管壁的正常结构起重要作用, 并对 As 有一定的保护作用. 研究发现 TGF 是 PPAR 的一种分子靶点^[11]. Smad3 为 TGF β 的下游转导因子, Smad3 高表达可促进血管平滑肌细胞及内膜增生, 从而参与 As 的发生发展. 由于 PAI-1 启动子上同时还具有 Smad 的结合位点, 因此 PPAR δ 有可能通过 TGF β -Smad3 信号通路调控 PAI-1 的表达. 本研究拟从细胞水平观察 PPAR δ 对人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)中 PAI-1 表达的影响及 TGF β -Smad 信号通路在其中的作用, 研究 PPAR δ 对血栓形成与纤溶因子表达的作用及分子机制, 为

* 国家自然科学基金资助项目(81270360, 81100211), 湖南省科技计划资助项目(2013SK3114)和湖南省重点学科建设项目(南华大学基础医学学科, 湘教发[2011]76 号).

** 通讯联系人.

Tel: 0734-8281586, E-mail: ghyi6108@163.com

收稿日期: 2013-07-31, 接受日期: 2013-12-30

探讨 PPAR δ 在 As 发生发展中的作用提供新的实验依据.

1 材料与方法

1.1 材料

HUVEC 为原代培养; DMEM 培养基、新生小牛血清购自 Gibco/BRL 公司; 实时定量 PCR 试剂盒 SYBR Premix Ex TaqTM 购自 TaKaRa 公司; HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自 Dako 公司; PAI-1 单抗购自晶美生物公司; GW501516 粉剂购自科泰公司; SB-431542、TGF β 、MTT 和 DMSO 购自 Sigma 公司; SIS3 购自 Calbio Chem 公司; Trizol、硝酸纤维素膜购自 Invitrogen 公司; 逆转录-多聚酶链反应试剂盒购自 Promega 公司; TNF α 购自 Invitrogen 公司; 引物均由上海生工公司合成; 其他试剂均为进口或国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 HUVEC 的原代培养

采用胶原酶 I 消化法. 取产后新鲜脐带, 注入终浓度为 0.1% 的胶原酶 I, 消化 10 min, 放出含有内皮细胞的消化液并用温 PBS 轻轻反复冲洗, 收集液体至离心管中, 离心去上清, 加入 M199 培养液制成细胞悬液, 接种入培养器皿中, 以 20% 胎牛血清培养基置温箱培养, 2~3 天可见细胞长成单层, 加内皮生长支持物 75 mg/L, 传 2~3 代后置液氮罐中冻存细胞备用.

HUVEC 贴壁生长于 10% 新生小牛血清 1640 双抗培养液中, 培养液中加 10 mmol/L HEPES、100U 青霉素和 100U 链霉素, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中静置培养, 每 2~3 天进行培养传代, 种 6 孔板, 取对数生长期细胞进行实验.

1.2.2 实时定量逆转录-聚合酶链反应检测 mRNA 的表达

TRIZOL 法抽提细胞总 RNA. 以无 RNA 酶水溶解后取适量于紫外线分光光度仪测定, A_{260}/A_{280} 的比值在 1.8~2.0 之间, 取总 RNA 3 μ g, 按试剂盒说明进行逆转录反应. 选取 cDNA 样品分别进行实时定量 PCR 反应(Real-time PCR), 反应体系 25 μ l, 含 SYBR green mix (2 \times) 12.5 μ l, 双蒸水 8.5 μ l, cDNA 2 μ l, 上下游引物各 1 μ l. PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 10 min, 扩增循环 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 共 40 个循环, 72 $^{\circ}$ C 采集荧光信号. 引物等序列由上海生物工程有限公司合成. PAI-1 引物: 上游, 5' CGGAGCACGGTCA-

AGCAAGTG 3', 下游, 5' GTTGAGGGCAGAG-AGAGGCGC 3'; PPAR δ 引物: 上游, 5' GCTT-CCAGAAGTGCCTGGCA 3', 下游, 5' ATCAC-AAAGGGCGCCGTGTG 3'; β -actin 引物: 上游, 5' TGCCTGACATTAAGGAG AAGCTGTG 3', 下游, 5' CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG 3'.

1.2.3 蛋白质印迹(Western blotting)检测蛋白质的表达

用细胞裂解液裂解细胞后, 于 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 5 min, 小心吸出上清液, 用 BCA 法进行蛋白质定量. 加 5 \times 蛋白上样缓冲液后煮沸 5 min 使蛋白变性, 行 12% SDS-PAGE(上样量每孔 10 μ l, 蛋白质分子质量标记上样 6 μ l), 电转移至 PVDF 膜上, 丽春红染色观察转移效果. 2% 脱脂牛奶封闭 4 $^{\circ}$ C 过夜, 次日用一抗室温摇床孵育 2 h, 0.1% Tween-PBS 洗 5 次(5 min/次), 再加辣根过氧化物酶标记的二抗室温摇床孵育 1 h, 0.1% Tween-PBS 洗 6 次(5 min/次), 蛋白质条带采用 ECL 化学发光检测试剂盒显示于 X 光片. 结果用 Labwork 凝胶图像分析系统对胶片扫描, 目的蛋白各组的面积灰度值减去背景灰度值与经过同样处理的对照蛋白灰度值的比值进行比较和半定量分析.

1.2.4 RNA 干扰实验

采用上海吉玛制药技术有限公司提供的 siRNA, 针对 PPAR δ 构建 1 条含有目的片段的双链 DNA 和阴性对照片段 1 条, 序列如下: 含目的片段序列(621): Primer forward, UUCUCCGAAC-GUGUCACGUTT, Primer reverse, ACGUGACAC-GUUCGGAGAATT; 对照片段 (NC): Primer forward, CGGCGCCCUUUGUGAUCCATT, Primer reverse, UGGAUCACAAAGGGCGCCGTG.

将脐静脉内皮细胞接种于 6 孔板, 待细胞长至密度 80%, 将 siRNA621、无关对照 siRNA 和转染脂质体 Lipofactamine 2000 用 Opti-MEM 培养液稀释, 转染比例为 1:3, siRNA 终浓度为 100 nmol/L, 室温完全混匀 20 min, 给细胞换液, 用 PBS 洗 1 遍, 将混合液导入培养好的细胞中, 作用体积 2 ml/孔, 然后将细胞在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 温箱中继续培养, 6 h 后换正常培养基, 继续放置培养箱培养. 以 FAM (Cy3 标记) 染料对转染效率进行评估.

1.2.5 数据处理及统计学分析

实验所得数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 单因素方差分析(one way-ANOVA), 两组间比较采

用方差分析及 *t* 检验, 由 SPSS13.0 统计软件完成, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 实验结果

2.1 GW501516 对 HUVEC 中 PAI-1 表达的影响

2.1.1 不同浓度 GW501516 对 HUVEC PAI-1 表达的影响

Real-time PCR 和 Western blotting 检测 HUVEC 中 PAI-1 的表达, 结果发现, 与对照组比较 (0 nmol/L GW501516 组), 经不同浓度 GW501516 (10、25、50、100 nmol/L) 处理, 细胞 PAI-1 mRNA 和蛋白质的表达上调 ($P < 0.05$), 且随 GW501516 浓度增加, 上调幅度越大, 说明 GW501516 可呈浓度依赖性促进 HUVEC 中 PAI-1 的表达(图 1)。

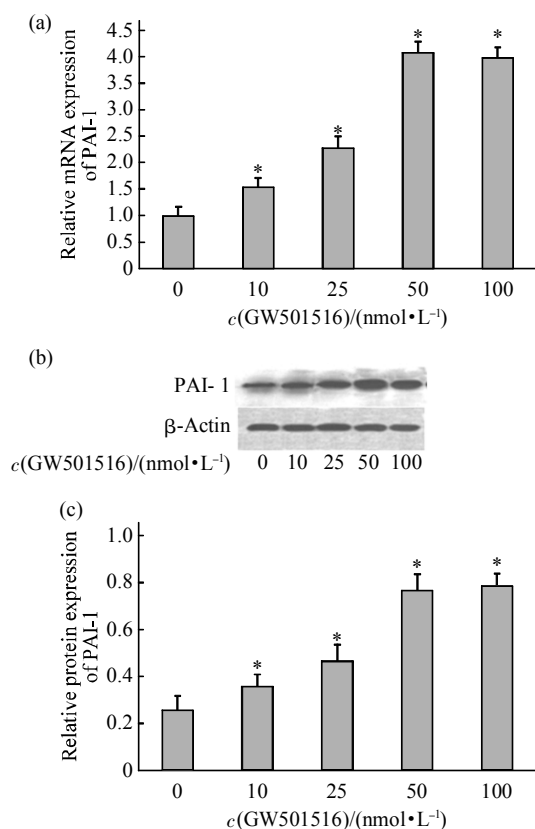


Fig. 1 Effect of GW501516 on PAI-1 expression in HUVEC

HUVEC were treated with GW501516(0, 10, 25, 50, 100 nmol/L) for 36 h, respectively. (a) PAI-1 mRNA expression were measured by Real-time PCR. (b) Western blot shows changes in protein expression levels of PAI-1. (c) Bar Graph shows the levels of PAI-1 protein expression in HUVEC by densitometric analysis. The data are represented as the $\bar{x} \pm s$. $n=3$ in each group. $*P < 0.05$ vs the control group.

2.1.2 50 nmol/L GW501516 处理不同时间对 HUVEC PAI-1 表达的影响

HUVEC 经 50 nmol/L GW501516 处理 HUVEC 不同时间 (0、12、24、36、48 h) 后, 采用 Real-time PCR 和 Western blotting 检测细胞 PAI-1 mRNA 和蛋白质表达的改变. 结果显示, 不同时间的 GW501516 对 HUVEC PAI-1 mRNA 和蛋白质的表达有明显促进作用, 随时间增加, PAI-1 的表达逐渐上调(图 2)。

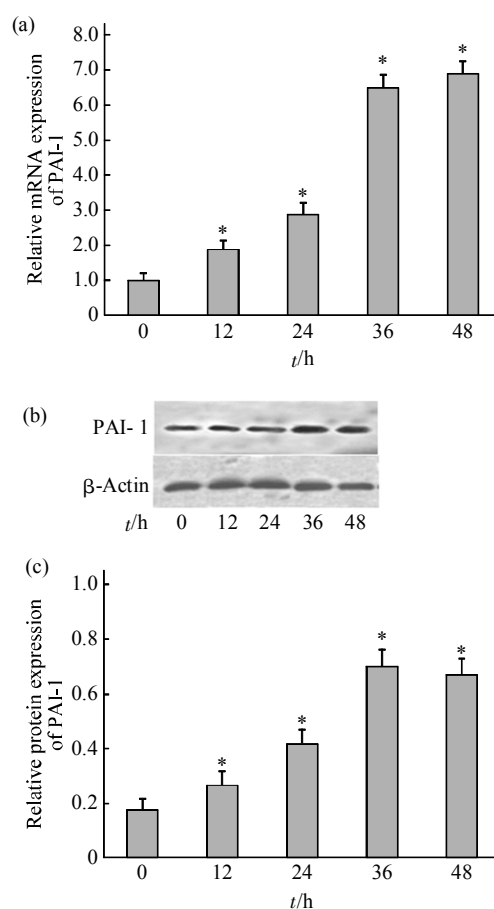


Fig. 2 Effect of GW501516 on PAI-1 expression in HUVEC

HUVEC were treated with 50 nmol/L GW501516 for different time (0, 12, 24, 36, 48 h), respectively. (a) PAI-1 mRNA expression were measured by Real-time PCR. (b) Western blot shows changes in protein expression levels of PAI-1. (c) Bar Graph shows the levels of PAI-1 protein expression in HUVEC by densitometric analysis. The data are represented as the $\bar{x} \pm s$. $n=3$ in each group. $*P < 0.05$ vs the control group.

2.2 Smad3 抑制剂 SIS3 对 HUVEC 中 pSmad3 及 PAI-1 表达的影响

采用 Smad3 抑制剂 SIS3 (5 μ mol/L) 和 (或) GW501516 (50 nmol/L) 处理 HUVEC 24 h 后, 以 Real-time PCR 检测细胞 PAI-1 mRNA 的表达,

Western blotting 分别检测细胞 pSmad3 及 PAI-1 蛋白的表达. 结果显示, 与对照组比较, GW501516 可上调 HUVEC 中 PAI-1 的表达, 并可促进 Smad3 的磷酸化, 而 SIS3 的作用则与之相反. 此外, 与 GW501516 单独处理组比较, GW501516 与 SIS3 共同处理组细胞的 PAI-1 表达和 Smad3 磷酸化均受到抑制($P < 0.05$)(图 3).

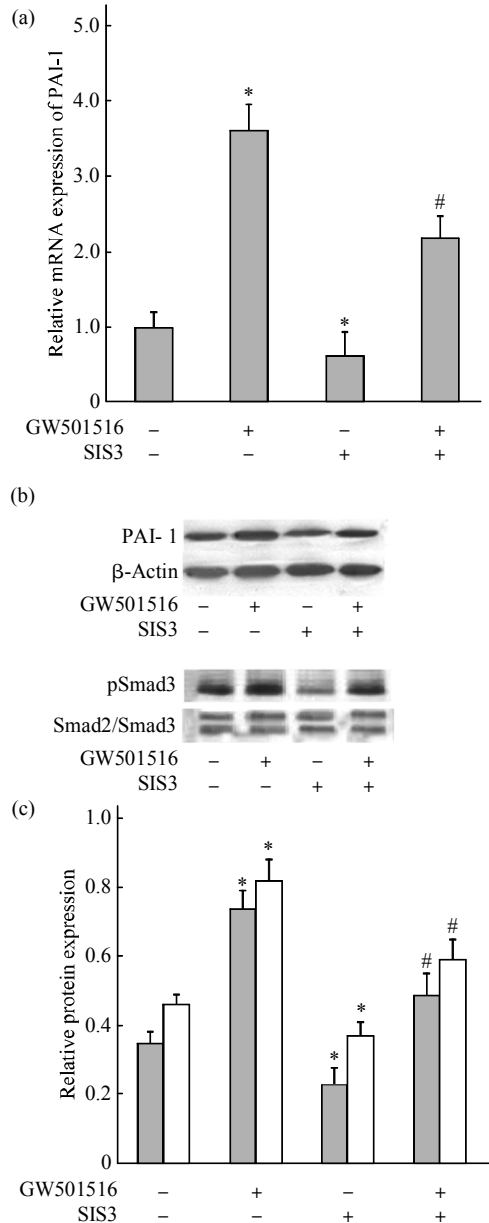


Fig. 3 Effect of SIS3 on PAI-1 and pSmad3 expression in HUVEC

HUVEC were treated with SIS3(5 μmol/L) and/or GW501516(50 nmol/L) for 24 h, respectively. (a) PAI-1 mRNA expression were measured by Real-time PCR. (b) Western blot shows changes in protein expression levels of PAI-1 and pSmad3. (c) Bar Graph shows the levels of PAI-1 and pSmad3 protein expression in HUVEC by densitometric analysis. The data are represented as the $\bar{x} \pm s$. $n = 3$ in each group. * $P < 0.05$ vs the control group. # $P < 0.05$ vs the only GW501516-treated group. ■: PAI-1; □: pSmad3.

2.3 TGFβ-Smad3 信号通路阻滞剂 SB-431542 对 HUVEC 中 PAI-1 表达的影响

经 TGFβ-Smad3 信号通路阻滞剂(SB-431542)、GW501516(50 nmol/L)和(或)TGFβ 处理 HUVEC 24 h 后, 以 Real-time PCR 与 Western blotting 分别检测细胞 PAI-1 mRNA 和蛋白质的表达. 结果显示, 与对照组比较, TGFβ 和 GW501516 均可上调 HUVEC 中 PAI-1 的表达, 而 SB-431542 则可以抑制 TGFβ 的作用($P < 0.05$); 而与 GW501516 单独处理组比较, SB-431542 与 GW501516 共处理的 HUVEC 中 PAI-1 的表达下调($P < 0.05$)(图 4).

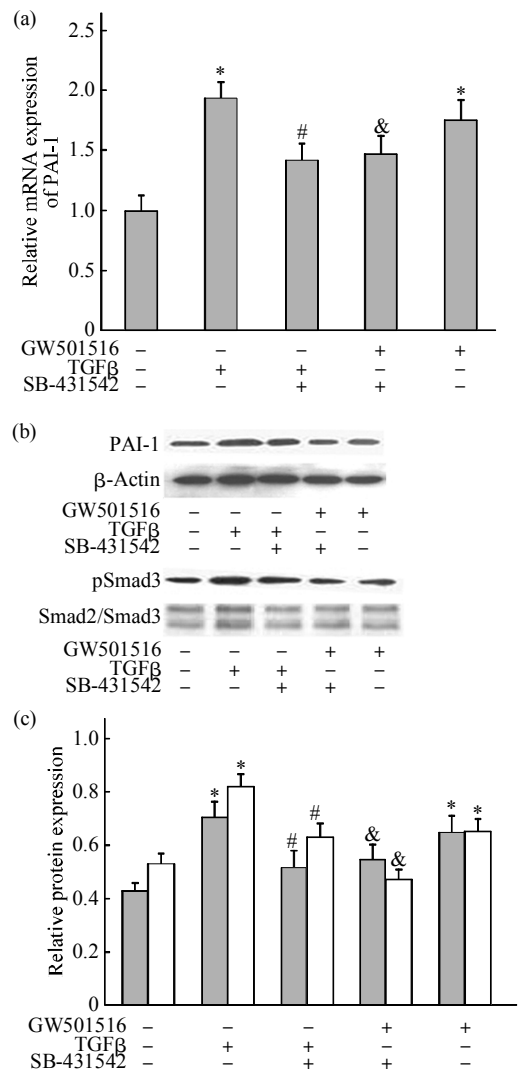


Fig. 4 Effect of SB-431542 on PAI-1 expression in HUVEC

HUVEC were treated with SB-431542, TGFβ and (or) 50 nmol/L GW501516 for 24 h, respectively. (a) PAI-1 mRNA expression were measured by Real-time PCR. (b) Western blot shows changes in protein expression levels of PAI-1 and pSmad3. (c) Bar Graph shows the levels of PAI-1 and pSmad3 protein expression in HUVEC by densitometric analysis. The data are represented as the $\bar{x} \pm s$. $n = 3$ in each group. * $P < 0.05$ vs the control group, # $P < 0.05$ vs the only TGFβ-treated groups, & $P < 0.05$ vs the only GW501516-treated groups. ■: PAI-1; □: pSmad3.

此外, 经 Western blotting 检测细胞 pSmad3 蛋白的表达. 结果显示, 与对照组比较, TGFβ 与 GW501516 均可上调 HUVEC 中 pSmad3 蛋白的表达, 而 SB-431542 则可以抑制 TGFβ 的作用 ($P < 0.05$), 而与 GW 501516 单独处理组比较, SB-431542 与 GW501516 共处理的 HUVEC 中 pSmad3 蛋白的表达明显下调 ($P < 0.05$), 提示 SB-431542 抑制了 Smad 蛋白的磷酸化(图 4).

2.4 PPARδ siRNA 对 HUVEC 中 PAI-1 表达的影响

2.4.1 荧光显微镜鉴定 siRNA 转染效率

以 FAM (Cy3 标记)染料对转染效率进行评估, 将 siRNA 转染到 HUVEC 和 24 h 在荧光显微下观察拍照, 结果显示, 在荧光显微镜下发绿色光的为 siRNA 转染产物, 随着脂质体复合体比例的增高, 转染效率提高(图 5).

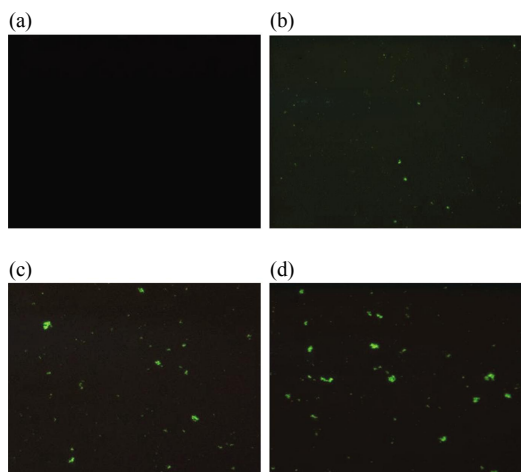


Fig. 5 Efficiency of siRNA transfection were measured by fluorescence microscope

(a) Control group. (b) siRNA : RNAi-Mate = 1 : 1. (c) siRNA : RNAi-Mate = 1 : 2. (d) siRNA : RNAi-Mate = 1 : 3.

2.4.2 PPARδ siRNA 对 HUVEC 中 PAI-1 表达的影响

经转染 siRNA 和(或) 50 nmol/L 的 GW501516 处理 HUVEC 24 h, 采用 Real-time PCR 与 Western blotting 分别检测细胞 PAI-1 mRNA 和蛋白质的表达. 结果显示, 与 NC 组相比, GW501516 明显上调 PAI-1 mRNA 和蛋白质的表达, 而 siRNA 621 处理组的 PAI-1 表达下调(图 6).

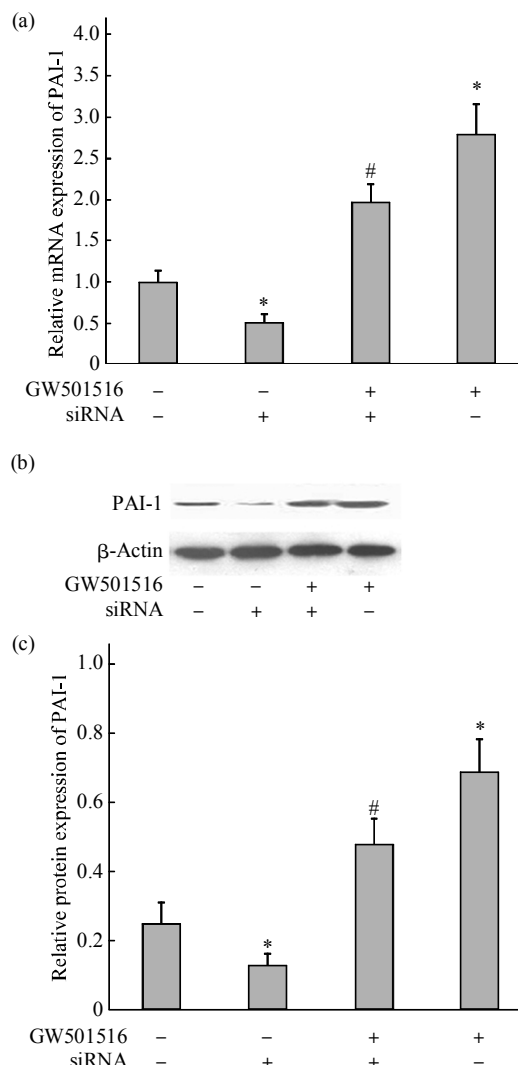


Fig. 6 Effect of siRNA on PAI-1 expression in HUVEC

HUVEC were treated with siRNA 621 and (or) 50 nmol/L GW501516 for 24 h, respectively. (a) PAI-1 mRNA expression were measured by Real-time PCR. (b) Western blot shows changes in protein expression levels of PAI-1. (c) Bar Graph shows the levels of PAI-1 protein expression in HUVEC by densitometric analysis. The data are represented as the $\bar{x} \pm s$. $n = 3$ in each group. * $P < 0.01$ vs the control group, # $P < 0.01$ vs the only GW501516-treated group.

3 讨论

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一个慢性的炎症过程, As 的发生发展过程中存在着很多危险因素^[12], 纤溶系统的失衡在血栓形成和动脉粥样硬化的发生、发展过程中扮演重要角色. PAI-1 是丝氨酸蛋白酶抑制剂及家族成员之一, 是纤溶系统

的主要生理性抑制剂, 主要由血管内皮细胞分泌, 并受多种细胞因子的影响. 研究发现, 血浆 PAI-1 水平的升高与动脉粥样硬化、冠心病、心肌梗死、

脑梗塞等血栓性疾病及炎症密切相关^[3], 降低 PAI-1 的水平和活性可以延缓 As 的发展, 减少心血管事件的发生(图 7).

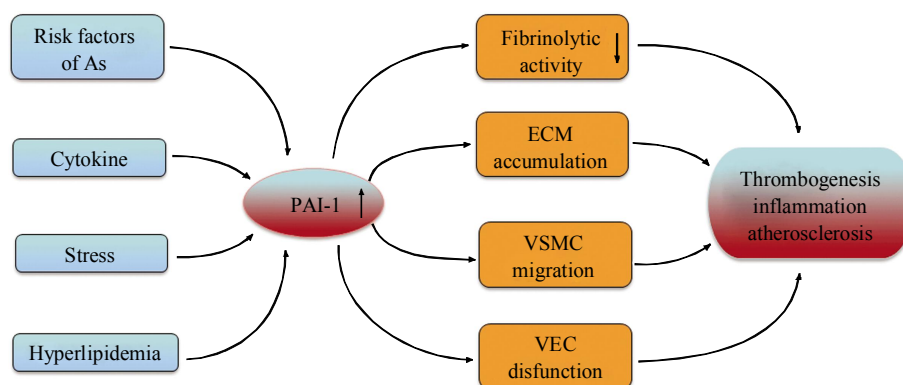


Fig. 7 Diagrammatic representation of the effects of increased PAI-1 in thrombogenesis, inflammation and atherosclerosis

As: Atherosclerosis; PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1; VSMC: Vascular smooth muscle cell; ECM: Extracellular matrix; VEC: Vascular endothelial cell.

临床流行病学研究^[14-15]表明, 相对于正常血管, As 血管斑块中的 PAI-1 水平升高. 超重/肥胖和酗酒、吸烟等心血管危险因素与不良的生活方式也可以增加血浆 PAI-1 的水平, 并有导致缺血性心脏病的危险. 此外, 高脂血症、细胞因子(如白介素 1、肿瘤坏死因子等)以及应激等也可增加体内 PAI-1 的水平. 研究表明, PAI-1 致 As 的主要机制为促进细胞外基质积聚及血栓形成, 调节平滑肌细胞增殖和迁移, 此外与炎症、内皮细胞功能受损等也密切相关^[6]. 血栓的形成和机化是促进 As 发展的重要原因, 内源性纤溶活性降低可导致微血栓形成和血栓沉积, 而内源性纤溶活性主要由 PAI-1 调节, Cesari 等^[6]亦报道在严重炎症患者体内 PAI-1 表达增加有促进微血栓形成的作用. 因此, PAI-1 活性的增加导致内源性纤溶活性降低是心血管疾病一个独立的危险因素. PAI-1 水平的升高还可使血小板释放出更多的小血小板源生长因子等细胞因子, 这些细胞因子进入动脉壁, 引起平滑肌细胞增殖, 进而促进 As 病变的发生发展. Bicakcigil 等^[4]的研究发现 PAI-1 水平升高加速了血管平滑肌细胞的迁移和增殖. PAI-1 还能使内皮细胞通透性增强, 导致内皮依赖性凝血功能和血管黏附分子表达增强, 激活凝血过程, 加速血栓形成^[7]. 欧阳琳等^[8]研究提示 PAI-1 的异常表达在慢性肾衰竭维持性血液透析患者动脉硬化进程中起重要作用, PAI-1 的表达与中膜厚度或钙化程度呈正相关. 此外, 血浆

PAI-1 水平与血脂水平密切相关, 甘油三酯和胆固醇增加, 高密度脂蛋白降低可能影响 PAI-1 的表达, 其中甘油三酯对 PAI-1 影响最为显著, PAI-1 与甘油三酯呈明显正相关(图 7).

内皮细胞功能不良不仅是形成 As 病变的始动因素, 对晚期 As 斑块的稳定也有重要影响, TNF α 等致 As 因素能使内皮细胞活化及功能不良, TNF α 的细胞毒性可引起内皮细胞凋亡^[9], 本研究则以 HUVEC 为对象来探讨 PPAR δ 激活物对内皮细胞 PAI-1 表达的影响及可能机制. PPAR δ 是 PPAR 的亚型之一, 在心肌、血管等组织中的表达高于 PPAR α 和 PPAR γ , PPAR δ 的效应往往是通过结合配体而产生的^[20-21], GW501516 是 PPAR δ 的外源性激活物, 除参与调脂、脂肪细胞分化、糖脂代谢、炎症反应及胰岛素信号转导等过程外, 还可能影响凝血纤溶系统^[22-23]. PAI-1 启动子上含有与 PPRE 高度同源的序列, 它与 PPAR δ 之间的联系仍不清楚. 本研究采用 PPAR δ 配体 GW501516 干预 HUVEC 细胞, 探讨 PPAR δ 对内皮细胞 PAI-1 表达的影响. 结果发现, GW501516 促进 PAI-1 表达的上调; 并且经 siRNA 技术沉默 PPAR δ 的表达后, GW501516 对 HUVEC 表达 PAI-1 的上调作用受到抑制, 这表明 GW501516 可通过活化 PPAR δ 参与调节 HUVEC 的 PAI-1 表达. 我们在前期研究中发现, GW501516 可减弱 TNF α 对 HUVEC 增殖的抑制作用, 促进 HUVEC 的增殖, 提示 PPAR δ 对

PAI-1 表达的调控作用可能影响 HUVEC 的增殖。

TGF β 参与细胞的生长分化及组织炎症、损伤修复等多种生物学作用,具有多重生物学功能,对于维持血管壁的正常结构起重要作用,并对 As 有一定的保护作用^[24-26]。而 TGF β 的下游基因 Smad3 也与 As 的发生发展密切相关,研究发现,Smad3 基因敲除小鼠 As 明显加重、斑块局部血管平滑肌细胞明显增生、基质显著减少。Smad3 高表达可以促进血管平滑肌细胞增生,促进内膜增生,TGF β -Smad3 通过促纤维化以及抗炎作用可以稳定斑块的作用^[27-28]。通过对 Smad3 作用机制的深入研究,TGF β -Smad3 信号通道可能成为 As 药物研究干预的靶点。本研究结果显示,TGF β 可以促进 HUVEC 中 PAI-1 表达上调,而 TGF β -Smad3 信号通路的特异性阻滞剂 SB-431542 和 SIS3 则下调 HUVEC 细胞 PAI-1 的表达。此外,通过对 Smad3 磷酸化蛋白的检测发现,TGF β 、SB-431542 和 SIS3 通过影响 Smad3 蛋白的磷酸化而影响 HUVEC 中 PAI-1 的表达。这些结果提示 TGF β -Smad3 信号通路可能参与 PPAR δ 对 HUVEC 中 PAI-1 表达的调控。

由于 PAI-1 在血栓性疾病、动脉粥样硬化及其相关性疾病发生、发展的不同环节和阶段具有多种生物学效应,其重要性备受关注。本研究首先观察 PPAR δ 的特异性激活物 GW501516 可促进 HUVEC 细胞表达 PAI-1,并证实了 GW501516 对 HUVEC 细胞中 PAI-1 基因的转录调控涉及到 PPAR δ 的激活和 Smad3 蛋白所介导的 TGF β -Smad3 信号途径,揭示了 PPAR δ 调控 PAI-1 基因表达的可能分子机制,从新的角度揭示 GW501516 的药理学作用,为靶向 PPAR δ 新药的研发提供理论基础,为揭示 PAI-1 在 As 发生发展中的作用提供新的实验依据。

参 考 文 献

- [1] Zhou B, Pan Y, Yu Q, *et al.* Fibrinogen facilitates atherosclerotic formation in Sprague-Dawley rats: a rodent model of atherosclerosis. *Exp Ther Med*, 2013, **5**(3): 730-734
- [2] Tusetto A, Prati P, Baracchini C, *et al.* Association of plasma fibrinogen, C-reactive protein and G-455>A polymorphism with early atherosclerosis in the VITA Project cohort. *Thromb Haemost*, 2011, **105**(2): 329-335
- [3] Zhou B R, Pan Y, Zhai Z M. Fibrinogen and P-selectin expression in atherosclerosis model of Sprague Dawley rat. *Chin Med J (Engl)*, 2011, **124**(22): 3768-3772
- [4] Bicakcigil M, Tasan D, Tasdelen N, *et al.* Role of fibrinolytic parameters and plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) promoter polymorphism on premature atherosclerosis in SLE patients. *Lupus*, 2011, **20**(10): 1063-1071
- [5] Peng Y, Liu H, Liu F, *et al.* Atherosclerosis is associated with plasminogen activator inhibitor type-1 in chronic haemodialysis patients. *Nephrology (Carlton)*, 2008, **13**(7): 579-586
- [6] Lee C H, Olson P, Hevener A, *et al.* PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(9): 3444-3449
- [7] Hu C, Jia W, Fang Q, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) delta genetic polymorphism and its association with insulin resistance index and fasting plasma glucose concentrations in Chinese subjects. *Diabet Med*, 2006, **23** (12): 1307-1312
- [8] Lee C H, Chawla A, Urbiztondo N, *et al.* Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. *Science*, 2003, **302**(5644): 453-457
- [9] Banfi C, Eriksson P, Giandomenico G, *et al.* Transcriptional regulation of plasminogen activator inhibitor type 1 gene by insulin: insights into the signaling pathway. *Diabetes*, 2001, **50**(7): 1522-1530
- [10] Ye P, Hu X, Liu Y, *et al.* Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in human endothelial cells increases plasminogen activator inhibitor type-1 expression. *Chin Med J (Engl)*, 2003, **116**(1): 29-33
- [11] Kim H J, Ham S A, Kim S U, *et al.* Transforming growth factor-beta1 is a molecular target for the peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Circ Res*, 2008, **102**(2): 193-200
- [12] 周寿红, 杨旭红, 宋 涛, 等. 亚毒性剂量毒死蜱降低新西兰兔 ABCA1 表达加重高脂诱导的动脉粥样硬化. *生物化学与生物物理进展*, 2011, **38**(1): 46-54
- [13] 周寿红, 杨旭红, 宋 涛, 等. 亚毒性剂量毒死蜱降低新西兰兔 ABCA1 表达加重高脂诱导的动脉粥样硬化. *生物化学与生物物理进展*, 2011, **38**(1): 46-54
- [14] 叶国红, 韩莲花, 李红霞, 等. 探讨血管紧张素 II 对人脐静脉内皮细胞产生超氧阴离子和 1 型纤溶酶原激活物抑制剂的作用机制. *中国循环杂志*, 2012, **27**(2): 141-144
- [15] Ye G H, Han L H, Li H X, *et al.* Chinese Circulation Journal, 2012, **27**(2): 141-144
- [16] Ekmekci H, Gungor O Z, Ekmekci O B, *et al.* Significance of vitronectin and PAI-1 activity levels in carotid artery disease: comparison of symptomatic and asymptomatic patients. *Minerva Med*, 2013, **104**(2): 215-223
- [17] Sakata T, Mannami T, Baba S, *et al.* Potential of free-form TFPI and PAI-1 to be useful markers of early atherosclerosis in a Japanese general population (the Suita Study): association with the intimal-medial thickness of carotid arteries. *Atherosclerosis*, 2004, **176**(2): 355-360
- [18] Cesari M, Pahor M, Incalzi R A. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): a key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions. *Cardiovasc Ther*, 2010, **28**(5): e72-e91
- [19] Naya M, Tsukamoto T, Inubushi M, *et al.* Elevated plasma plasminogen activator inhibitor type-1 is an independent predictor of coronary microvascular dysfunction in hypertension. *Circ J*, 2007, **71**(3): 348-353
- [20] 欧阳琳, 彭佑铭, 伍国宝, 等. PAI-1 和 ET-1 在维持性血液透析患者动脉硬化中的作用. *中南大学学报(医学版)*, 2013, **38**(5): 458-467
- [21] Ouyang L, Peng Y, Wu G, *et al.* *J Central South University*

- (Medical Sciences), 2013, **38**(5): 458–467
- [19] Ho F M, Liu S H, Liao C S, *et al.* High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH (2)-terminal kinase and caspase-3. *Circulation*, 2000, **101**(22): 2618–2624
- [20] Batista F A, Trivella D B, Bernardes A, *et al.* Structural insights into human peroxisome proliferator activated receptor delta (PPAR-delta) selective ligand binding. *PLoS One*, 2012, **7** (5): e33643
- [21] Sprecher D L, Massien C, Pearce G, *et al.* Triglyceride:high-density lipoprotein cholesterol effects in healthy subjects administered a peroxisome proliferator activated receptor delta agonist. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, **27**(2): 359–365
- [22] Serrano-Marco L, Barroso E, El K I, *et al.* The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) beta/delta agonist GW501516 inhibits IL-6-induced signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation and insulin resistance in human liver cells. *Diabetologia*, 2012, **55**(3): 743–751
- [23] Defaux A, Zurich M G, Braissant O, *et al.* Effects of the PPAR-beta agonist GW501516 in an *in vitro* model of brain inflammation and antibody-induced demyelination. *J Neuroinflammation*, 2009, **6**(1): 15–28
- [24] Li H, Ding Y, Yi G, *et al.* Establishment of nasal tolerance to heat shock protein-60 alleviates atherosclerosis by inducing TGF-beta-dependent regulatory T cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2012, **32**(1): 24–30
- [25] van Dijk R A, Engels C C, Schaapherder A F, *et al.* Visualizing TGF-beta and BMP signaling in human atherosclerosis: a histological evaluation based on Smad activation. *Histol Histopathol*, 2012, **27**(3): 387–396
- [26] Mccaffrey T A. TGF-beta signaling in atherosclerosis and restenosis. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2009, **S1**(1): 236–245
- [27] Edlin R S, Tsai S, Yamanouchi D, *et al.* Characterization of primary and restenotic atherosclerotic plaque from the superficial femoral artery: Potential role of Smad3 in regulation of SMC proliferation. *J Vasc Surg*, 2009, **49**(5): 1289–1295
- [28] Kim H J, Kim M Y, Jin H, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor {delta} regulates extracellular matrix and apoptosis of vascular smooth muscle cells through the activation of transforming growth factor- β 1/Smad3. *Circ Res*, 2009, **105**(1): 16–24

GW501516 Promotes PAI-1 Expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells Through TGF β -Smad3 Signaling Pathway*

MO Zhong-Cheng, LI Xia, ZHANG Da-Di, ZHU Ming-Yan, ZHANG Qing-Hai,
ZENG Ying, WU Rong, LU Yan-Ju, CHEN Yi, YI Guang-Hui**

(Institute of Cardiovascular Research, Key Laboratory for Arteriosclerosis of Human Province, University of South China, Hengyang 421001, China)

Abstract Increased plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) level is the risk of thrombotic disease and atherosclerosis (As). Our research aims to study the effect and mechanism of PPAR δ antagonist GW501516 on the expression of PAI-1. Firstly, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were incubated with DMEM, and then treated with siRNA and TGF β -Smad3 inhibitor, respectively. The protein and mRNA expression were examined by Western blotting assays and Real-time quantitative PCR, respectively. The result showed that GW501516 induced PAI-1 mRNA and protein expression in HUVECs compared with control groups ($P < 0.05$). According to PPAR δ gene, the designed PPAR δ siRNA primer silenced the PPAR δ expression and depressed the induction of GW501516 on PAI-1 expression. Then, the HUVECs were treated by SB431542 or SIS3, which is the TGF β -Smad3 signaling pathway blocker, and found that PAI-1 expression of cells were down-regulated. At last, we found that SB431542, SIS3 and GW501516 inhibited the expressions of pSmad3 protein. These results suggested that TGF beta-Smad3 signaling pathway involved in the regulation of GW501516-induced PAI-1 expression in HUVECs.

Key words GW501516, plasminogen activator inhibitor-1, PPAR δ , TGF β , Smad3

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00357

*This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (81270360, 81100211), The Science and Technology Plan Projects of Hunan Province (2013SK3114) and The Construct Program of The Key Discipline in Hunan Province (Basic Medicine Sciences in University of South China).

**Corresponding author.

Tel: 86-734-8281586, E-mail: ghyi6108@163.com

Received: July 31, 2013 Accepted: December 30, 2013