

## 神经病学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000552

## PAR2 在损伤的大鼠脊髓星形胶质细胞增生中的作用研究

黎天尊, 夏永智, 刘 强, 晏 怡

(重庆医科大学附属第一医院神经外科, 重庆 400016)

**【摘要】目的:**探讨蛋白酶激活受体 2(protease activated receptor 2, PAR2)对损伤的大鼠脊髓星形胶质细胞增生的作用。**方法:**原代培养得到高纯度(>98%)大鼠脊髓星形胶质细胞,建立体外星形胶质细胞损伤模型。星形胶质细胞损伤后立即给予生理盐水(损伤模型组)、PAR2 特异性抑制剂 FSLLRY-NH2(FSLLRY-NH2 组)、PAR2 特异性抗体 Anti-PAR2 antibody(Anti-PAR2 antibody 组)处理;对照组为原代培养的大鼠脊髓星形胶质细胞,不作任何处理。应用蛋白质印迹法及免疫荧光标记技术检测星形胶质细胞标志蛋白胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)和波形蛋白(Vimentin)的表达情况,应用 CCK-8 法检测星形胶质细胞增殖活性。**结果:**损伤后 24 h 及 72 h 对照组、FSLLRY-NH2 组和 Anti-PAR2 antibody 组 GFAP 和 Vimentin 的表达均明显低于损伤模型组,损伤后 12、24、72 h 对照组、FSLLRY-NH2 组和 Anti-PAR2 antibody 组星形胶质细胞增殖活性均明显低于损伤模型组( $P<0.05$ )。**结论:**大鼠脊髓星形胶质细胞损伤后阻断 PAR2 可抑制其细胞增生。

**【关键词】**损伤脊髓星形胶质细胞;蛋白酶激活受体 2;细胞增生;胶质纤维酸性蛋白;波形蛋白

**【中图分类号】**R320.27

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2014-08-11

## Role of PAR2 in proliferation of injured spinal cord astrocytes of rats

Li Tianzun, Xia Yongzhi, Liu Qiang, Yan Yi

(Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

**【Abstract】Objective:** To explore the role of protease activated receptor2(PAR2) in proliferation of injured spinal cord astrocytes of rats. **Methods:** High purity spinal cord astrocytes of rats were achieved from primary culture(purity>98%) and the injured astrocytes model *in vitro* was established. Injured astrocytes were treated by normal saline(injured group), PAR2 inhibitor FSLLRY-NH2(FSLLRY-NH2 group) and PAR2 antibody Anti-PAR2 antibody(Anti-PAR2 antibody group) immediately. Primary culture cells without any treatment were included in control group. The expression levels of GFAP and Vimentin, marker proteins of astrocytes, were detected using the immunofluorescence staining and Western blot after injured astrocytes model being established and treated. Proliferative activity of astrocytes was detected by CCK-8 after injured astrocytes model being established and treated. **Results:** At 24 h and 72 h after injured astrocytes model being established, the expression levels of GFAP and Vimentin were significantly higher in injured group compared with those in control group, FSLLRY-NH2 group and Anti-PAR2 antibody group; proliferative activity of astrocytes was also significantly higher in injured group compared with that in control group, FSLLRY-NH2 group and Anti-PAR2 antibody group at 12, 24, 72 h after injured astrocytes model being established( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Blocking PAR2 can inhibit proliferation of injured spinal cord astrocytes of rats.

**【Key words】** injured spinal cord astrocytes; protease activated receptor 2; cell proliferation; glia fibrillary acidic protein; Vimentin

胶质瘢痕中最主要的细胞是星形胶质细胞,脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后星形胶质细胞肿

胀、增生和肥大继而发生反应性胶质增生,并明显上调表达胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)和波形蛋白(Vimentin),成为胶质瘢痕形成的标志,胶质瘢痕是中枢神经系统(central nervous system, CNS)损伤后轴突再生的主要障碍之一<sup>[1-2]</sup>。蛋白酶激活受体 2(protease activated receptor 2, PAR2)广泛分布于中枢神经系统的神经元、神经胶质细胞和小胶质细胞中,胰蛋白酶等可使其激活<sup>[3]</sup>,研究提示 PAR2 可能在 SCI 后星形胶质细胞反

作者简介:黎天尊, Email: 903495394@qq.com,

研究方向:脊髓损伤后胶质瘢痕形成。

通信作者:晏 怡, Email: yongzhixia@aliyun.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81100906);重庆市自然科学基金资助项目(编号:cstc2012jjA10055);国家临床重点专科建设经费资助项目(编号:财社[2011]170 号)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150310.2143.005.html>  
(2015-03-10)

反应性增生与胶质瘢痕形成中起重要作用<sup>[2,4]</sup>。本实验通过原代培养的大鼠脊髓星形胶质细胞,建立星形胶质细胞损伤模型,利用 PAR2 特异性抑制剂(FS-LLRY-NH2)和 PAR2 特异性抗体(Anti-PAR2 antibody)2 种不同的方法分别阻断 PAR2,探讨 PAR2 对损伤的大鼠脊髓星形胶质细胞增生的影响,为 SCI 后抑制星形胶质细胞反应性增生与胶质瘢痕形成,促进轴突再生提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

DMEM/F-12 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、D-Hanks 液、购自 Gibco 公司,GFAP 一抗(ab68428)和 Vimentin 一抗(ab20346)购自 Abcam 公司,HRP 标记兔抗小鼠二抗、FITC 标记山羊抗兔二抗、Western 一抗稀释液、Western 二抗稀释液、Western 封闭液、免疫荧光一抗稀释液、免疫荧光二抗稀释液、DAPI 染色液、CCK-8 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,Western 凝胶试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司,PBS、PBST、4%血清封闭液为实验室配制。

### 1.2 大鼠脊髓星形胶质细胞的培养

取新生 1 d 内 SD 乳鼠(来自重庆医科大学动物实验中心),75%酒精浴,剖开椎管取出脊髓组织,仔细剥离脊膜及血管组织,将脊髓组织剪成约 0.5~1.0 mm<sup>3</sup> 小块,0.25%胰蛋白酶消化 15 min。用含 10%胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基终止消化,过滤、离心,弃上清液后加入新鲜培养基制成细胞悬液,以  $1 \times 10^5$  个/ml 密度接种于 25 cm<sup>2</sup> 一次性塑料培养瓶中,置于 37 ℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,24 h 后换液。继续培养待细胞长至约 80%融合,用 0.25%胰蛋白酶消化、传代。取第 3 代细胞用于实验。

### 1.3 大鼠脊髓星形胶质细胞及细胞纯度的鉴定

取上述培养的大鼠脊髓星形胶质细胞,4%多聚甲醛固定(20 min),PBS 洗 3 次(每次 5 min),4%血清 37 ℃封闭 60 min,加 GFAP 一抗(1:100)4 ℃过夜,PBS 洗 3 次(每次 5 min),FITC 标记的二抗(1:50)37 ℃孵育 90 min,PBS 洗 3 次(每次 5 min),DAPI 37 ℃孵育 5 min,PBS 清洗 3 次(每次 5 min),50%甘油封片后在 LEICA TCS SP2 激光共聚焦显微镜下检测。

### 1.4 建立大鼠脊髓星形胶质细胞损伤模型及星形胶质细胞损伤模型干预

参照既往的方法<sup>[5]</sup>,细胞消化后接种于 6 孔板中经多聚赖氨酸处理的盖玻片上,待细胞生长至 70%~80%融合后,用 10  $\mu$ l Tip 头贴盖玻片呈“#”字划过,造成 1 mm 宽的划痕,划痕线之间的平行间距为 0.5 cm,D-Hanks 液清洗去除损伤细胞碎片,加新鲜培养基继续培养,制成体外大鼠星形胶质细

胞损伤模型。建立好星形胶质细胞损伤模型后,分别立即给予生理盐水(对照组)、PAR2 特异性抑制剂 FSLLRY-NH2 (FSLLRY-NH2 组)、PAR2 特异性抗体 Anti-PAR2 antibody (Anti-PAR2 antibody 组)处理,对照组为原代培养的星形胶质细胞。

### 1.5 蛋白质印迹技术检测 GFAP 及 Vimentin 的表达

分别于细胞损伤处理后 1、6、12、24、72 h 各时间点提取各组细胞总蛋白,加入蛋白酶抑制剂,-80 ℃保存备用。Bradford 考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度,调整样本蛋白质浓度,保证上样量一致,SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,Bio-Rad 转膜装置将蛋白转移至 PVDF 膜上,Western blot 封闭液 37 ℃封闭 90 min,加入相应一抗 4 ℃孵育过夜,PBST 洗涤 3 次(每次 5 min),辣根过氧化物酶标记的二抗 37 ℃孵育 90 min,PBST 洗涤 3 次(每次 5 min),DAB 显色后,扫描各免疫印迹条带并以 GAPDH 为内参用 Quantity One-4.6.2 软件进行结果分析。

### 1.6 免疫荧光标记技术检测损伤区星形胶质细胞 GFAP 的表达和划痕宽度的变化

分别于细胞损伤处理后 12、24、72 h 各时间点,以 4%多聚甲醛固定(20 min),PBS 洗 3 次(每次 5 min),4%胎牛血清 37 ℃封闭 60 min,加 GFAP 一抗(1:100)4 ℃过夜,PBS 洗 3 次(每次 5 min),FITC 标记的二抗(1:50)37 ℃孵育 90 min,PBS 洗 3 次(每次 5 min),DAPI 37 ℃孵育 5 min,PBS 清洗 3 次(每次 5 min),50%甘油封片后在 LEICA TCS SP2 激光共聚焦显微镜下观察并照相,用 Image-Pro Plus6.0 软件分析计算免疫荧光图片中划痕宽度的变化。

### 1.7 CCK-8 法检测星形胶质细胞增殖活力

分别于细胞损伤处理后 1、6、12、24、72 h 各时间点,以 0.25%胰蛋白酶消化制成密度为  $1.0 \times 10^5$  个/ml 细胞悬液,接种到 96 孔板,经 CCK-8 试剂盒处理细胞后,用酶联免疫检测仪在 490 nm 处 450 nm 检测各组细胞吸光度(absorbance, A)值。

### 1.8 统计学方法

结果以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,用 SPSS 17.0 软件进行重复测量资料的方差分析,各组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 大鼠脊髓星形胶质细胞及其纯度鉴定

传至第 3 代的大鼠脊髓星形胶质细胞,经星形胶质细胞标志蛋白 GFAP 和细胞核(DAPI 染色)双标后,激光共聚焦显微镜下检测。显微镜下星形胶质细胞呈扁平、多角形,突起短而粗大,GFAP 免疫荧光鉴定阳性;GFAP 阳性细胞为星形胶质细胞,在激发光下成绿色,细胞核在激发光下成蓝色,用 GFAP 阳性细胞除以所有有核细胞得到星形胶质细胞纯度为 >98% (图 1)。

2.2 GFAP 及 Vimentin 的表达

细胞损伤后 1、6、12、24 h 及 72 h, Western blot 检测各组细胞 GFAP(50 kD) 及 Vimentin(54 kD) 的表达结果见图 2, 以 GAPDH(36 kD) 为内参计算各组细胞 GFAP 及 Vimentin 的表达量见表 1 和表 2。数据结果采用重复测量资料的方差分析, 各组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, 结果显示在 24 h 及 72 h 对照组、FSLRY-NH2 组和 Anti-PAR2 antibody 组 GFAP 及 Vimentin 的表达量明显低于损伤模型组(表 1 和表 2)。

2.3 细胞划痕平均宽度

细胞划痕后, 划痕边缘受损伤的星形胶质细胞增生明

显, 如图 3 所示细胞划痕后划痕边缘的星形胶质细胞增生明显, 但 FSLRY-NH2 组和 Anti-PAR2 antibody 组划痕边缘的星形胶质细胞密度小于损伤模型组。各组细胞划痕的平均宽度如表 3 所示, 细胞损伤后 24 h 及 72 h, 损伤模型组细胞划痕平均宽度明显小于 FSLRY-NH2 组和 Anti-PAR2 antibody 组(统计方法同上)。

2.4 细胞增殖活性

各组细胞增殖活性见表 4, 细胞损伤后 1 h 及 6 h, 各组细胞之间增殖活性无统计学差异; 细胞损伤后 12、24 h 及 72 h, 损伤模型组细胞增殖活性明显高于对照组、FSLRY-NH2 组和 Anti-PAR2 antibody 组的细胞(统计方法同上)。

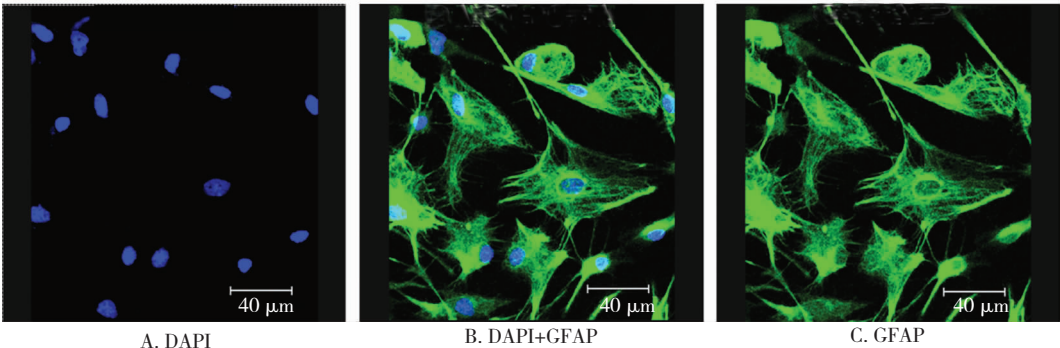


图 1 免疫荧光法鉴定星形胶质细胞及星形胶质细胞纯度 (400 ×)

Fig.1 Identification of astrocytes and astrocytes purity by immunofluorescence (400 ×)

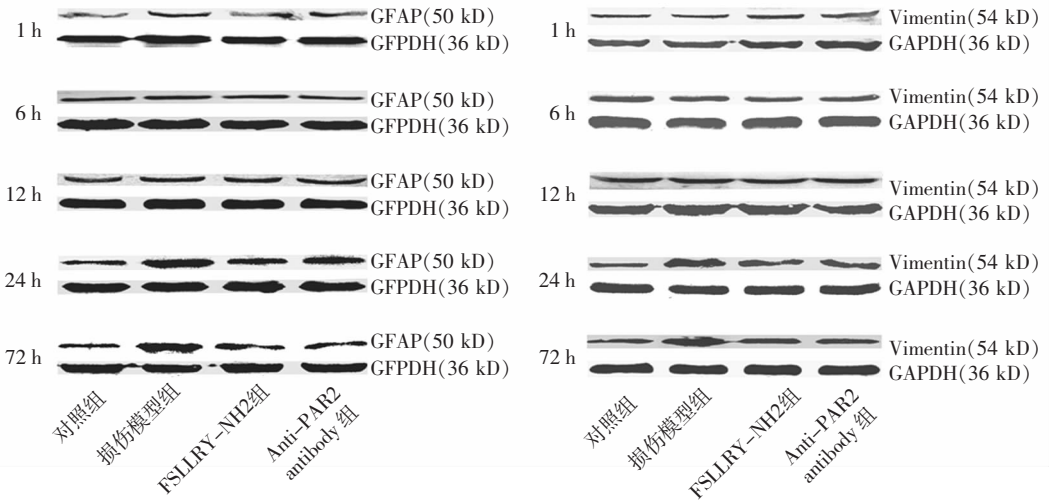


图 2 蛋白质印迹法检测各实验组细胞 GFAP 和 Vimentin 的表达

Fig.2 Expression of GFAP and Vimentin detected by Western blot

表 1 GFAP 在各组细胞中的表达量  
Tab.1 Expression quantity of GFAP

| 组别                   | 1 h           | 6 h           | 12 h          | 24 h                       | 72 h                       |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|----------------------------|----------------------------|
| 对照组                  | 0.426 ± 0.066 | 0.434 ± 0.084 | 0.467 ± 0.051 | 0.453 ± 0.053 <sup>a</sup> | 0.461 ± 0.050 <sup>b</sup> |
| 损伤模型组                | 0.422 ± 0.090 | 0.463 ± 0.060 | 0.561 ± 0.061 | 0.858 ± 0.072              | 1.042 ± 0.097              |
| FSLRY-NH2组           | 0.378 ± 0.061 | 0.433 ± 0.035 | 0.468 ± 0.059 | 0.599 ± 0.045 <sup>c</sup> | 0.589 ± 0.088 <sup>d</sup> |
| Anti-PAR2 antibody 组 | 0.367 ± 0.085 | 0.439 ± 0.064 | 0.467 ± 0.029 | 0.712 ± 0.066 <sup>e</sup> | 0.554 ± 0.012 <sup>f</sup> |

注: 分组因素  $F=18.505, P=0.001$ ; 时间因素  $F=39.403, P=0.000$ ; 两者交互作用  $F=9.189, P=0.000$ 。与损伤模型组比较, a:  $P=0.000$ ; b:  $P=0.000$ ; c:  $P=0.001$ ; d:  $P=0.000$ ; e:  $P=0.018$ ; f:  $P=0.000$



表 2 Vimentin 在各组细胞中的表达量

Tab.2 Expression quantity of Vimentin

| 组别                   | 1 h           | 6 h           | 12 h          | 24 h                       | 72 h                       |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|----------------------------|----------------------------|
| 对照组                  | 0.305 ± 0.057 | 0.323 ± 0.072 | 0.331 ± 0.043 | 0.326 ± 0.022 <sup>a</sup> | 0.327 ± 0.023 <sup>b</sup> |
| 损伤模型组                | 0.299 ± 0.017 | 0.316 ± 0.052 | 0.292 ± 0.065 | 0.581 ± 0.071              | 0.736 ± 0.075              |
| FSLRY-NH2组           | 0.316 ± 0.052 | 0.307 ± 0.045 | 0.324 ± 0.030 | 0.468 ± 0.045 <sup>c</sup> | 0.545 ± 0.079 <sup>d</sup> |
| Anti-PAR2 antibody 组 | 0.339 ± 0.085 | 0.304 ± 0.064 | 0.329 ± 0.024 | 0.439 ± 0.066 <sup>e</sup> | 0.493 ± 0.034 <sup>f</sup> |

注: 分组因素  $F=14.015, P=0.002$ ; 时间因素  $F=43.004, P=0.000$ ; 两者交互作用  $F=6.680, P=0.000$ 。与损伤模型组比较, a:  $P=0.000$ ; b:  $P=0.000$ ; c:  $P=0.034$ ; d:  $P=0.004$ ; e:  $P=0.013$ ; f:  $P=0.001$

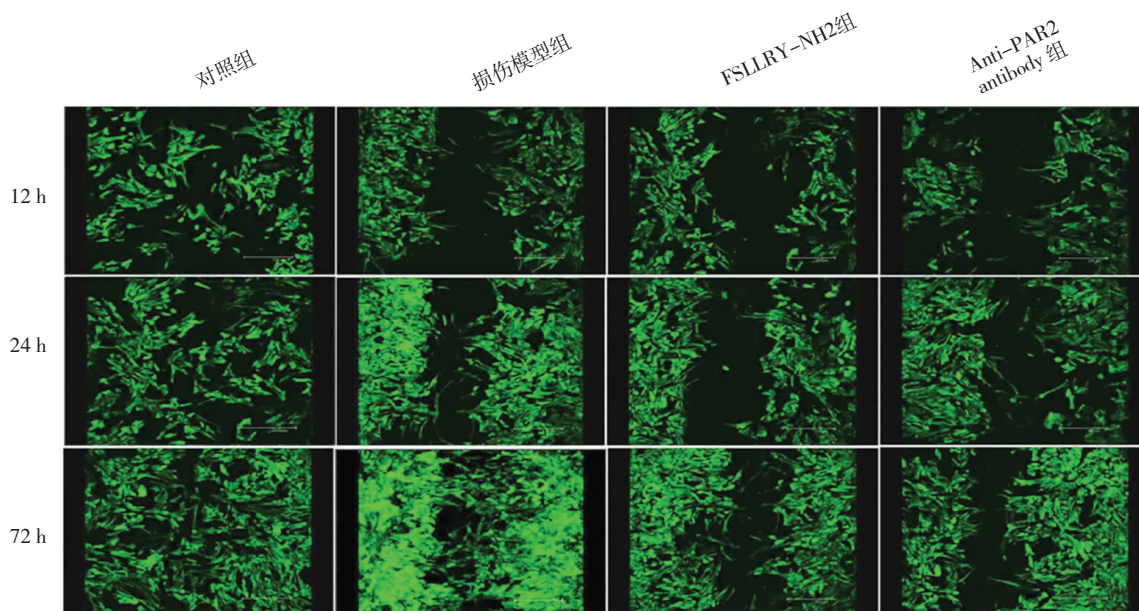


图 3 免疫荧光法检测各实验组细胞划痕宽度 (50 × )

Fig.3 Scratch width by immunofluorescence (50 × )

表 3 各实验组细胞划痕宽度比较 (μm,  $\bar{x} \pm s$ )Tab.3 Comprison of average scratch width (μm,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                   | 12 h                       | 24 h                          | 72 h                          |
|----------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 对照组                  | 0.000 ± 0.000 <sup>a</sup> | 0.000 ± 0.000 <sup>b</sup>    | 0.000 ± 0.000 <sup>c</sup>    |
| 损伤模型组                | 359.953 ± 39.252           | 158.975 ± 40.001              | 25.313 ± 8.251                |
| FSLRY-NH2组           | 399.188 ± 40.266           | 346.253 ± 36.937 <sup>d</sup> | 226.103 ± 32.447 <sup>e</sup> |
| Anti-PAR2 antibody 组 | 388.176 ± 54.455           | 308.425 ± 44.153 <sup>f</sup> | 224.184 ± 20.725 <sup>g</sup> |

注: 分组因素  $F=369.760, P=0.000$ ; 时间因素  $F=64.986, P=0.000$ ; 两者交互作用  $F=11.341, P=0.000$ 。与损伤模型组比较, a:  $P=0.000$ ; b:  $P=0.001$ ; c:  $P=0.000$ ; d:  $P=0.000$ ; e:  $P=0.000$ ; f:  $P=0.001$ ; g:  $P=0.000$

表 4 CCK-8 法检测各组细胞的细胞增殖活性 (A 值,  $\bar{x} \pm s$ )Tab.4 Proliferative activity of astrocytes detected by CCK-8 (A value,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                   | 1 h           | 6 h           | 12 h                       | 24 h                        | 72 h                       |
|----------------------|---------------|---------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 对照组                  | 0.315 ± 0.032 | 0.322 ± 0.036 | 0.333 ± 0.030 <sup>a</sup> | 0.357 ± 0.048 <sup>b</sup>  | 0.385 ± 0.040 <sup>c</sup> |
| 损伤模型组                | 0.317 ± 0.036 | 0.341 ± 0.021 | 0.459 ± 0.044              | 0.607 ± 0.050               | 0.732 ± 0.034              |
| FSLRY-NH2组           | 0.315 ± 0.024 | 0.336 ± 0.018 | 0.366 ± 0.037 <sup>d</sup> | 0.447 ± 0.058 <sup>e</sup>  | 0.495 ± 0.068 <sup>f</sup> |
| Anti-PAR2 antibody 组 | 0.320 ± 0.035 | 0.333 ± 0.014 | 0.377 ± 0.058 <sup>g</sup> | 0.463 ± 0.0768 <sup>h</sup> | 0.513 ± 0.082 <sup>i</sup> |

注: 分组因素  $F=28.255, P=0.000$ ; 时间因素  $F=43.605, P=0.000$ ; 两者交互作用  $F=5.229, P=0.000$ 。与损伤模型组比较, a:  $P=0.008$ ; b:  $P=0.001$ ; c:  $P=0.000$ ; d:  $P=0.031$ ; e:  $P=0.011$ ; f:  $P=0.001$ ; g:  $P=0.048$ ; h:  $P=0.018$ ; i:  $P=0.002$

### 3 讨论

胶质瘢痕是 CNS 损伤后轴突再生的主要障碍之一, CNS 损伤后星形胶质细胞反应性增生, 初期可能有利于维持损伤局部微环境的稳定, 但持续的胶质增生将导致胶质瘢痕形成, 阻碍 CNS 损伤后轴突再生<sup>[1]</sup>。GFAP 和 Vimentin 双基因敲除小鼠 SCI 后星形胶质细胞反应性胶质增生明显受到抑制, 轴突再生增强<sup>[6]</sup>。本研究亦发现, 同时抑制 GFAP 和 Vimentin 的表达后, 胶质瘢痕的形成减弱, 神经芽生增强<sup>[7]</sup>。然而作为胶质瘢痕的主要细胞, 星形胶质细胞损伤后反应性胶质增生并明显上调表达 GFAP 和 Vimentin 的分子调节机制至今仍不清楚。

PAR2 为 PARs (包括 PAR1、2、3、4) 家族成员, 为 G 蛋白偶联受体家族, 在 CNS 炎症反应、缺血及神经退行性改变等病理过程中发挥着重要作用<sup>[8]</sup>。有研究提示 PAR2 可能在 SCI 后炎症反应介导的胶质瘢痕形成中发挥了重要作用<sup>[9-11]</sup>。本课题组前期研究也发现, PAR2 可能参与大鼠 SCI 后胶质瘢痕的行成<sup>[12]</sup>。星形胶质细胞作为胶质瘢痕的主要细胞, 其损伤后反应性胶质增生与胶质瘢痕的形成关系密切, 因此本实验运用星形胶质细胞损伤模型研究了 PAR2 对损伤的大鼠脊髓星形胶质细胞增生的影响, 从细胞水平证明了 PAR2 可能参与大鼠 SCI 后胶质瘢痕的行成。

损伤可诱导星形胶质细胞反应性增生, 并明显上调表达其细胞骨架中间丝成分 GFAP 和 Vimentin, 是胶质瘢痕形成的标志<sup>[1, 13-14]</sup>, 在本实验的大鼠脊髓星形胶质细胞损伤模型中也得到了证实。损伤模型建立后 24 h 及 72 h GFAP 和 Vimentin 的表达明显上调, 明显高于对照组正常细胞的表达水平。本实验运用 PAR2 特异性抑制剂 (FSLRY-NH2) 和 PAR2 特异性抗体 (Anti-PAR2 antibody) 两种不同的方法, 对损伤的大鼠脊髓星形胶质细胞 PAR2 进行阻断。本研究观察到, 损伤的大鼠脊髓星形胶质细胞 PAR2 被阻断后 12、24 h 和 72 h, 其细胞增殖活性明显被抑制; 被阻断后 24 h 及 72 h GFAP 和 Vimentin 的表达也有明显下降。损伤的大鼠脊髓星形胶质细胞 PAR2 被阻断后 1 h 与 6 h, 各组间的细胞增殖活性并无明显差异, 可能是由于从细胞受到损伤到表现

出增殖活性差异需要一个时间过程; 各组间 GFAP 和 Vimentin 的表达情况在 24 h 及 72 h 才有明显差异, 迟于各组间细胞增殖活性出现明显差异的时间 12、24 h 和 72 h, 可能原因是从出现增殖差异到骨架中间丝成分 GFAP 和 Vimentin 表现出差异具有时间累积效应。本实验结果表明, 大鼠脊髓星形胶质细胞损伤后阻断 PAR2 可抑制其细胞增生, 因此, PAR2 可能是抑制损伤后星形胶质细胞增生与胶质瘢痕形成的治疗靶点。然而, PAR2 通过何种具体机制影响损伤的大鼠脊髓星形胶质细胞增生, 参与 SCI 后胶质瘢痕形成, 目前尚不十分清楚。损伤可诱导星形胶质细胞活化, 活化的星形胶质细胞释放出前炎症因子和趋化因子<sup>[15]</sup>, SCI 后在活化的星形胶质细胞释放的趋化因子的作用下以小胶质细胞为主的炎症细胞向脊髓损伤部位聚集, 这些炎症细胞将释放大量前炎症因子<sup>[12]</sup>, 前炎症因子不仅可以激活星形胶质细胞中的 PAR2<sup>[16]</sup>, 还可促进 PAR2 在该细胞中的表达上调<sup>[8]</sup>。研究表明, 丝裂原激活的蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 活化后可介导细胞生长、增殖、分化、迁移, 目前已知的 MAPK 有 c-Jun 氨基端激酶 (c-Jun N-terminal Kinase, JNK)、细胞外信号调节激酶 (extracellular signal regulated kinase, ERK) 和 p38<sup>[17]</sup>, PAR2 活化后可引起下游信号分子 JNK、ERK 和 p38 的激活<sup>[18-20]</sup>。Gadea 等<sup>[4]</sup>在细胞研究中发现 JNK 激活后, GFAP 及 Vimentin 表达增加、星胶细胞增生及反应性胶质化形成, 另外 Bernardi 等<sup>[21]</sup>在研究中发现抑制 JNK 激活后, GFAP 表达下降。因此推测, SCI 后损伤局部以小胶质细胞为主的细胞释放的大量前炎症因子激活了大鼠脊髓星形胶质细胞中的 PAR2, 而激活的 PAR2 通过 JNK 途径影响 GFAP 及 Vimentin 蛋白的表达, 是导致 SCI 后胶质瘢痕形成的主要原因之一。另外, 激活的 PAR2 是否可通过 ERK 和 p38 影响星形胶质细胞中 GFAP 及 Vimentin 蛋白的表达也有待进一步研究证明。

综上所述, 本研究证实了大鼠脊髓星形胶质细胞损伤后阻断 PAR2 可抑制其细胞增生。但 PAR2 通过何种具体机制影响损伤的大鼠脊髓星形胶质细胞增生, 参与 SCI 后胶质瘢痕形成, 还需要进一步研究证明。

## 参 考 文 献

- [1] Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology[J]. *Acta Neuropathol*, 2010, 119(1): 7–35.
- [2] Zhang D, Hu X, Qian L, et al. Astroglisis in CNS pathologies: is there a role for microglia[J]. *Mol Neurobiol*, 2010, 41(2–3): 232–241.
- [3] Gieseler F, Ungefroren H, Settmacher U, et al. Proteinase-activated receptors (PARs) – focus on receptor-receptor-interactions and their physiological and pathophysiological impact[J]. *Cell Commun Signal*, 2013(11): 86.
- [4] Gadea A, Schinelli S, Gallo V. Endothelin-1 regulates astrocyte proliferation and reactive gliosis via a JNK/c-Jun signaling pathway[J]. *J Neurosci*, 2008, 28(10): 2394–2408.
- [5] Lin J, Cai W. Effect of vimentin on reactive gliosis: in vitro and in vivo analysis[J]. *Neurotrauma*, 2004, 21(11): 1671–1682.
- [6] Ribotta MG, Menet V, Privat A. Glial scar and axonal regeneration in the CNS: lessons from GFAP and vimentin transgenic mice[J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2004(89): 87–92.
- [7] Xia Y, Zhao T, Li J, et al. Antisense vimentin cDNA combined with chondroitinase ABC reduces glial scar and cystic cavity formation following spinal cord injury in rats[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 377(2): 562–566.
- [8] Sokolova E, Aleshin S, Reiser G. Expression of protease-activated receptor (PAR)-2, but not other PARs, is regulated by inflammatory cytokines in rat astrocytes[J]. *Neurochem Int*, 2012, 60(3): 276–285.
- [9] Zhang S, Zeng X, Yang H, et al. Mast cell tryptase induces microglia activation via protease-activated receptor 2 signaling[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2012, 29(5–6): 931–940.
- [10] Sokolova E, Aleshin S, Reiser G. Expression of protease-activated receptor (PAR)-2, but not other PARs, is regulated by inflammatory cytokines in rat astrocytes[J]. *Neurochem Int*, 2012, 60(3): 276–285.
- [11] Qu WS, Tian DS, Guo ZB, et al. Inhibition of EGFR/MAPK signaling reduces microglial inflammatory response and the associated secondary damage in rats after spinal cord injury[J]. *J Neuroinflammation*, 2012(9): 178.
- [12] 刘强, 夏永智, 晏怡. PAR2 调控 GFAP 与 Vimentin 在大鼠脊髓损伤后胶质瘢痕形成早期中的表达[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2013, 39(7): 421–426.
- [13] Ransom B, Behar T, Nedergaard M. New roles for astrocytes (stars at last)[J]. *Trends Neurosci*, 2003, 26(10): 520–522.
- [14] Zhu Z, Zhang Q, Yu Z, et al. Inhibiting cell cycle progression reduces reactive astroglisis initiated by scratch injury in vitro and by cerebral ischemia in vivo[J]. *Glia*, 2007, 55(5): 546–558.
- [15] Gao YJ, Ji RR. Targeting astrocyte signaling for chronic pain[J]. *Neurotherapeutics*, 2010, 7(4): 482–493.
- [16] Park GH, Ryu JR, Shin CY, et al. Evidence that protease-activated receptor-2 mediates trypsin-induced reversal of stellation in cultured rat astrocytes[J]. *Neurosci Res*, 2006, 54(1): 15–23.
- [17] Sui X, Kong N, Ye L, et al. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents[J]. *Cancer Lett*, 2014, 344(2): 174–179.
- [18] Pan SL, Tao KY, Guh JH, et al. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway plays a critical role in PAR2-induced endothelial IL-8 production and leukocyte adhesion[J]. *Shock*, 2008, 30(5): 496–502.
- [19] Hu L, Xia L, Zhou H, et al. TF/FVIIa/PAR2 promotes cell proliferation and migration via PKC $\alpha$  and ERK-dependent c-Jun/AP-1 pathway in colon cancer cell line SW620[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(5): 2573–2581.
- [20] Fukushima O, Nishimura S, Matsunami M, et al. Phosphorylation of ERK in the spinal dorsal horn following pancreatic pronociceptive stimuli with proteinase-activated receptor-2 agonists and hydrogen sulfide in rats: evidence for involvement of distinct mechanisms[J]. *J Neurosci Res*, 2010, 88(14): 3198–205.
- [21] Bernardi A, Frozza RL, Horn AP, et al. Protective effects of indomethacin-loaded nanocapsules against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: involvement of Neuroinflammation[J]. *Neurochem Int*, 2010, 57(6): 629–636.

(责任编辑: 冉明会)



《重庆医科大学学报》邮发代号: 78-132