

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00117

ERK1/2介导去甲肾上腺素对内皮祖细胞的功能调节

姜其钧, 吴建祥, 刘 星, 梁 春, 任雨笙, 吴宗贵*

第二军医大学长征医院心血管内科, 上海 200003

[摘要] **目的** 探讨去甲肾上腺素(NE)对内皮祖细胞(EPCs)增殖和迁移能力的调节作用及其分子机制。**方法** 将培养的健康成人外周血 EPCs 用不同浓度的 NE、肾上腺素能受体拮抗剂或 MAPK 信号通道阻滞剂干预,检测 EPCs 的增殖和迁移能力,以及 ERK1/2 信号通路的激活情况。**结果** NE 浓度依赖性地(0.01、0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$)促进 EPCs 增殖,与对照组比较 EPCs 分别增加(48.3 \pm 23.3)%、(70.5 \pm 35.6)%、(82.4 \pm 14.9)%和(100.3 \pm 48.1)%。 α 受体拮抗剂酚妥拉明、选择性 β_2 肾上腺素能受体拮抗剂 I127、JNK 抑制剂 SP600125 和 ERK1/2 抑制剂 A6355 能够阻断 NE 的促增殖作用;而 β_1 受体拮抗剂美托洛尔和 p38 抑制剂 PD169318 不能阻断 NE 的刺激效应。10 $\mu\text{mol/L}$ NE 促进 EPCs 的迁移($P<0.05$),10 $\mu\text{mol/L}$ 酚妥拉明和 10 $\mu\text{mol/L}$ I127 能够阻断这种作用,但美托洛尔不能。NE 能够浓度依赖性(0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$)地激活 EPCs 内的 ERK1/2,酚妥拉明和 I127 能够阻断 ERK1/2 激活($P<0.05$),而美托洛尔不能。**结论** NE 可能通过 α 和 β_2 肾上腺素能受体激活 ERK1/2 促进 EPCs 的迁移和增殖。

[关键词] 内皮祖细胞;去甲肾上腺素; α 受体拮抗剂; β 受体拮抗剂;细胞增殖;细胞迁移;ERK1/2

[中图分类号] R 329.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)02-0117-06

ERK1/2 pathway-mediated norepinephrine regulates function of endothelial progenitor cells

JIANG Qi-jun, WU Jian-xiang, LIU Xing, LIANG Chun, REN Yu-sheng, WU Zong-gui*

Department of Cardiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To analyze the effects of norepinephrine(NE) on the proliferation and migration of endothelial progenitor cells (EPCs) and the related mechanism. **Methods** NE, adrenoceptor antagonist, and MAPK signal pathway blocker of various concentrations were used to treat peripheral EPCs derived from healthy adults. The proliferation potential, migration capacity and activation of ERK1/2 were assessed after different treatments. **Results** NE increased the proliferation potential of EPCs in a dose-dependent manner. The number of EPCs increased by (48.3 \pm 23.3)%, (70.5 \pm 35.6)%, (82.4 \pm 14.9)% and (100.3 \pm 48.1)% after treatment with NE at 0.01 $\mu\text{mol/L}$, 0.1 $\mu\text{mol/L}$, 1 $\mu\text{mol/L}$ and 10 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Addition of alpha adrenoceptor antagonist phentolamine, selective beta 2 adrenoceptor antagonist I127, JNK blocker SP600125 and ERK1/2 blocker A6355 could block the above effects of NE, and beta 1 adrenoceptor antagonist metoprolol and p38 blocker PD169318 failed to block the effects of NE. NE at 10 $\mu\text{mol/L}$ significantly promoted the migration of EPCs ($P<0.05$). These effects could be blocked by addition of phentolamine (10 $\mu\text{mol/L}$) and I127 (10 $\mu\text{mol/L}$), but not by addition of metoprolol. NE(0.1, 1 and 10 $\mu\text{mol/L}$) activated ERK1/2 pathway in a dose-dependent manner, which could also be blocked by phentolamine and I127, but not by metoprolol. **Conclusion** NE can increase the proliferation potential and migration capacity of EPCs via activating ERK1/2 pathway with alpha and beta 2 adrenoceptor.

[Key words] endothelial progenitor cells; norepinephrine; alpha adrenoceptor antagonist; beta adrenoceptor antagonist; cell proliferation; cell migration; ERK1/2

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(2):117-122]

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是成人最重要的一组调节血管新生和形成血管内皮的干细胞,其功能调节对了解很多疾病的发

病机制非常有帮助。EPCs 虽然在骨髓、脾脏和外周血均有分布,但它的来源主要是骨髓的造血干细胞^[1]。既往的研究发现骨髓中有丰富的交感神经

[收稿日期] 2011-09-13 **[接受日期]** 2011-10-27

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)课题(2005CB523309). Supported by National Program on Key Basic Research Project of China (“973” Program, 2005CB523309).

[作者简介] 姜其钧,博士,讲师、主治医师. E-mail: jqjraymond@qq.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81885301, E-mail: zgwu@medmail.com.cn

维分布^[2]。这些分布在骨髓中的神经纤维可能参与了骨髓各种细胞的增殖和动员^[3-4]。为研究 EPCs 是否同样受交感神经末梢调节,本研究通过体外培养的 EPCs 研究其增殖和迁移能力,探讨交感神经神经递质去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)对 EPCs 功能调节及其可能的分子机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 Histopaque 1077 淋巴细胞分离液购自美国 Amersham Biosciences 公司;血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)购于英国 Peprotech 公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购于美国 Gibco 公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)、硫氰酸荧光素标记荆豆凝集素-I(FITC-UEA-I)、0.25%胰酶、去甲肾上腺素、非选择性 α 受体拮抗剂酚妥拉明、选择性 β_1 受体拮抗剂美托洛尔、 β_2 肾上腺素能受体拮抗剂 I127 (粉剂)、JNK 抑制剂 SP600125 和 ERK1/2 抑制剂 A6355 均购自美国 Sigma 公司; p38 抑制剂 PD169318 购自美国 Cayman 公司;鼠抗人磷酸化 ERK1/2 IgG 和 ERK1/2 IgG 购自美国 Cell Signaling Technology 公司;乙酰化低密度脂蛋白(Dil-Ac-LDL)购自美国 Molecular Probe 公司;PE 标记的 VEGF-R2 抗体购自美国 R&D 公司,PE 标记的 CD133 单克隆抗体购自德国 Miltenyi Biotec 公司,FITC 标记的 CD34 抗体购自美国 Southern Biotech 公司。

1.2 EPCs 的分离、培养与鉴定 取健康志愿者的外周血,以 1:2 的比例 PBS 稀释,再缓慢移至 Histopaque 1077 淋巴细胞分离液上方,室温下 $400 \times g$ 离心 30 min,分离出中间的单核细胞。将分离好的单核细胞用含有 10% FBS、10 ng/ml VEGF 和 10 ng/ml bFGF 的 M199 培养液稀释成 5×10^6 /ml,放入 37°C 、5% CO_2 孵箱中培养。4 d 后洗掉未贴壁细胞,每 3 d 换一次液。取第 7 天的细胞,加入 2.4 mg/L Dil-ac-LDL 和 10 mg/L FITC-UEA-I, 37°C 下孵育 1 h 后,用荧光显微镜检测双染色阳性细胞百分比。另取第 7 天的细胞,用 0.25%胰蛋白酶消化,分别加入 10 mg/L PE 标记的 VEGF-R2 抗体、10 mg/L PE 标记的 CD133 单克隆抗体、10 mg/L FITC 标记的 CD34 抗体, 4°C 孵育 30 min 后,上流式细胞仪检测细胞表面标志物表达率。第 7 天加入无血清的培养液同步化细胞 24 h^[4],再进行后续实验。

1.3 NE 对 EPCs 增殖的促进作用 将同步化后的 EPCs 用 0.25%胰酶消化,以 1×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板,分别加入浓度为 0.01、0.1、1、10 和 100

$\mu\text{mol/L}$ 的 NE 干预 72 h,加入 MTT, 37°C 孵育 4 h。上酶标仪检测 450 nm 处的光密度(D_{450})值。根据细胞增殖情况选择合适的 NE 作用浓度用于后续干预实验。

1.4 α 和 β 受体在 NE 促进 EPCs 增殖和迁移中的作用

1.4.1 实验分组 设置空白对照组、NE 组、酚妥拉明组、美托洛尔组和 I127 组(浓度均为 $10 \mu\text{mol/L}$),以及酚妥拉明+NE 组、美托洛尔+NE 组和 I127+NE 组(浓度均为 $10 \mu\text{mol/L}$),在 EPCs 培养液中分别加入相应浓度的药物,空白对照组不加任何药物。

1.4.2 EPCs 增殖能力评价 采用 MTT 法,参照 1.3 项下所述进行,按实验分组给予相应干预药物。

1.4.3 EPCs 迁移能力检测 采用 Transwell 小室评价 EPCs 的迁移能力。将同步化后的 EPCs 用 0.25%胰酶消化,用无血清的 M199 培养液重悬后,以 2×10^4 /ml 的密度重新种植于 24 孔板 Transwell 的上室,下室加入含 50 ng/ml VEGF 的培养液,1 h 后将干预药物(按 1.4.1 项下的实验分组)加于上室。在 CO_2 孵箱内孵育 24 h,以 4%多聚甲醛固定 30 min,棉签擦去膜上侧的细胞,结晶紫染色 3 min,清水洗去结晶紫,在高倍光学显微镜($\times 100$)下计数 6 个随机视野的 EPCs 数量。

1.5 MAPK 信号通路在 NE 促进 EPCs 增殖中的作用 培养至第 8 天的 EPCs 培养液中分别加入 $10 \mu\text{mol/L}$ NE、 $1 \mu\text{mol/L}$ SP600125 (JNK 抑制剂)、 $1 \mu\text{mol/L}$ A6355 (ERK1/2 抑制剂)和 $1 \mu\text{mol/L}$ PD169318 (p38 抑制剂),并设空白对照组、SP600125 ($1 \mu\text{mol/L}$) + NE ($10 \mu\text{mol/L}$) 组、A6355 ($1 \mu\text{mol/L}$) + NE ($10 \mu\text{mol/L}$) 组和 PD169318 ($1 \mu\text{mol/L}$) + NE ($10 \mu\text{mol/L}$) 组,同 1.3 项下方法检测细胞增殖情况。

1.6 蛋白质印迹法检测不同药物干预后的 EPCs 中 ERK1/2 及磷酸化 ERK1/2 的表达 将 NE (0.01、0.1、1、10 和 $100 \mu\text{mol/L}$) 以及其他药物(酚妥拉明+NE、美托洛尔+NE、I127+NE,浓度均为 $10 \mu\text{mol/L}$) 干预后的 EPCs 加入蛋白提取裂解液,于 4°C 裂解细胞 30 min, 4°C $8\ 000 \times g$ 离心 30 min,去除沉淀,加入上样缓冲液后煮沸 10 min,进行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,并转入硝酸纤维素膜,5%无脂牛奶封闭 1 h,分别给予鼠抗人磷酸化 ERK1/2 IgG 和 ERK1/2 IgG, 4°C 孵育 12 h, TBST 洗 3 次,羊抗鼠二抗室温下孵育 1 h,ECM 发光液显影,Image-pro plus 6.0 软件分析信号强度。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 15.0 统计学软件。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据比较采用方差分析,多组间比较采用 One-Way ANOVA 法,两组数据间比较采用 SNK 法,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 EPCs的形态与鉴定 EPCs体外培养48 h后出现集落,4 d后多数集落都已形成。于第8天加入Dil-ac-LDL和FITC-UEA-I染色,其中90%细胞吞噬Dil-ac-LDL,且FITC-UEA-I染色阳性(图1)。采

用PE标记的鼠抗人CD133,FITC标记的鼠抗人CD34以及PE标记的鼠抗人VEGF-R2抗体上流式细胞仪检测细胞表面标志物,结果显示CD133、CD34及VEGF-R2阳性率分别为(89.5±5.3)%、(66.2±6.2)%和(93.2±8.2)%,证实所分离培养的细胞为EPCs。

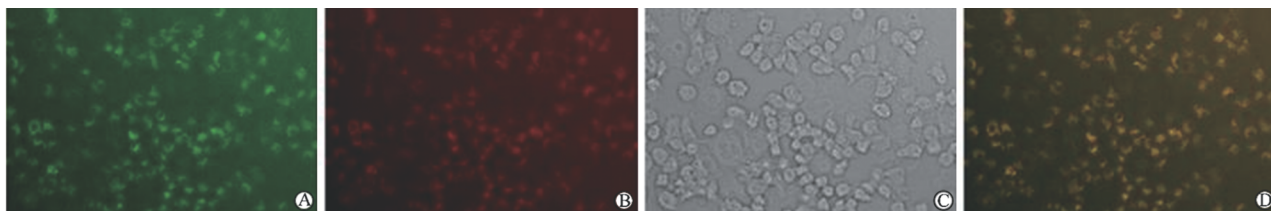


图1 EPCs FITC-UEA-I和Dil-ac-LDL双染阳性

Fig 1 Double positive staining of FITC-UEA-I and Dil-ac-LDL in EPCs

A: FITC-UEA-I; B: Dil-ac-LDL; C: Cells with no staining; D: Double staining of FITC-UEA-I and Dil-ac-LDL. Original magnification: ×100

2.2 NE刺激EPCs的增殖 与空白对照组相比,0.01、0.1、1、10和100 μmol/L浓度的NE均能促进EPCs增殖,增殖率分别为(48.3±23.3)%、(70.5±35.6)%、(82.4±14.9)%、(100.3±48.1)%、(53.6±16.5)%,以10 μmol/L浓度作用最强。

2.3 α、β受体在NE促EPCs增殖中的作用 如图2所示,相对于空白对照,NE [(103.6±29.1)% , P<0.01]、酚妥拉明 [(43.1±7.3)% , P<0.05]、美托洛尔 [(64.0±9.1)% , P<0.05]和I127 [(32.9±4.4)% , P<0.05]均能显著促进EPCs的增殖;酚妥拉明+NE组 [(48.5±9.0)%]和I127+NE组 [(29.3±5.8)%]的增殖率相对于酚妥拉明组和I127组差异均无统计学意义,但均低于NE组 (P<0.05);而美托洛尔+NE组的增殖率 [(109.6±7.0)%]高于美托洛尔组 (P<0.01),与NE组比较差异无统计学意义。结果表明酚妥拉明和I127能拮抗NE对EPCs的促增殖作用,而美托洛尔则不能。

2.4 MAPK信号通路在NE促EPCs增殖中的作用 图3表明:相对于对照组,NE组可促进EPCs的增殖 (P<0.01),而SP600125 [-(24.3±9.7)% , P<0.05]可抑制EPCs的增殖,A6355 [-(14.4±3.2)% , P>0.05]和PD169318 [-(1.5±9.8)% , P>0.05]则对EPCs增殖无影响;SP600125+NE组 [(48.6±40.7)%]和PD169318+NE组 [(73.8±21.8)%]的增殖率分别高于SP600125组 (P<0.01)和PD169318组 (P<0.01),但SP600125+NE组低于NE组 (P<0.05),PD169318+NE组与NE组差异无统计学意义;A6355+NE组的增殖率相对于A6355组差异无统计学意义 [-(9.0±11.4)% vs -(14.4±3.2)% , P>0.05],但低于NE组 (P<0.01)。这说明A6355和SP600125能够抑制NE对EPCs增殖的促进作用,而PD169318则不能。

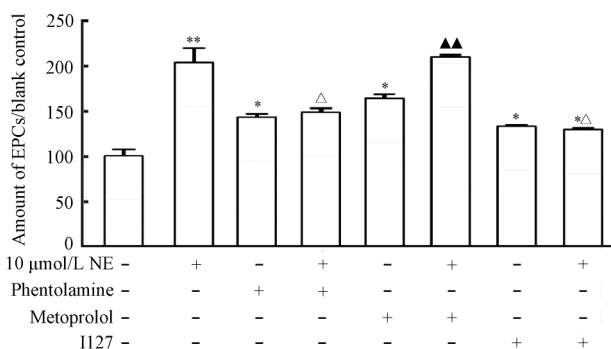


图2 肾上腺素能受体在NE促EPCs增殖中的作用

Fig 2 Role of adrenoceptor in promotion of EPCs proliferation by NE

* P<0.05, ** P<0.01 vs blank control; Δ P<0.05 vs NE group; ▲▲ P<0.01 vs metoprolol group. n=6, $\bar{x} \pm s$

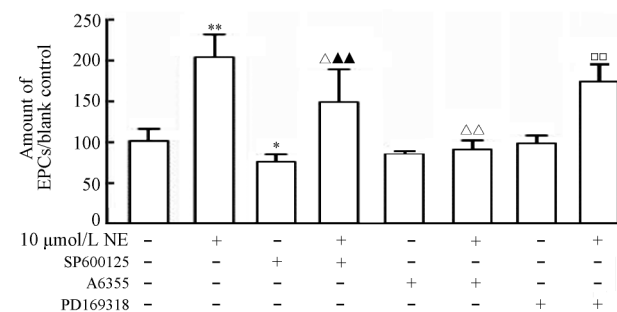


图3 MAPK信号通路在NE促EPCs增殖中的作用
Fig 3 Role of MAPK signal pathway in promotion of EPCs proliferation by NE

* P<0.05, ** P<0.01 vs blank control; Δ P<0.05, ΔΔ P<0.01 vs NE group; ▲▲ P<0.01 vs SP600125 group; □□ P<0.01 vs PD169318 group. n=6, $\bar{x} \pm s$

2.5 α和β受体在NE促EPCs迁移中的作用 取

培养至第8天的 EPCs 进行迁移实验,在上室中分别加入以下药物干预: NE 10 $\mu\text{mol/L}$, 酚妥拉明 10 $\mu\text{mol/L}$ +NE 10 $\mu\text{mol/L}$, 美托洛尔 10 $\mu\text{mol/L}$ +NE 10 $\mu\text{mol/L}$, I127 10 $\mu\text{mol/L}$ +NE 10 $\mu\text{mol/L}$ 。24 h 后取出 Transwell 小室,镜下计数每个高倍视

野($\times 100$)中 EPCs 的数量,分别为 71.7 ± 19.6 (对照组)、 124.1 ± 12.2 、 57.2 ± 14.3 、 112.8 ± 26.0 和 61.3 ± 11.5 (图 4)。结果表明,10 $\mu\text{mol/L}$ NE 促进 EPCs 的迁移($P < 0.05$),酚妥拉明和 I127 能够阻断这种作用,但美托洛尔不能。

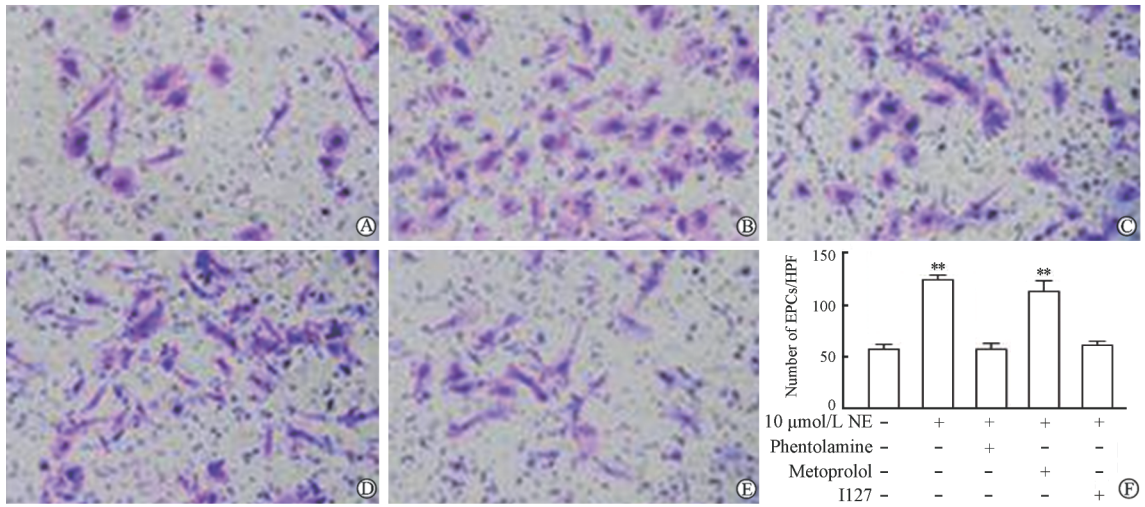


图 4 NE 促进 EPCs 迁移

Fig 4 NE promoted migration of EPCs

A-E: Stained by crystal violet. A: Blank control; B: NE; C: NE+phenolamine; D: NE+metoprolol; E: NE+I127; Original magnification: $\times 100$ (A-E). F: Migration of EPCs in each group; HPF: High power field; * * $P < 0.01$ vs blank control group; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

2.6 ERK1/2 信号通路激活 在同步化之后的 EPCs 的培养液中分别加入 0.1、1、10 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 NE,其磷酸化 ERK1/2 的表达相对于对照组分别增加 $(114.3 \pm 32.5)\%$ 、 $(193.0 \pm 28.6)\%$ 、 $(342.6 \pm 110.6)\%$ 和 $(48.3 \pm 34.1)\%$ (图 5)。而酚妥拉明 $[(119 \pm 11.0)\%]$ 、I127 $[(143.9 \pm 33.1)\%]$ 均能抑制 ERK1/2 的激活,与 NE 组 $[(372.2 \pm 56.4)\%]$ 比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 6);美托洛尔组 $[(324.0 \pm 73.4)\%]$ 与 NE 组 $[(372.2 \pm 56.4)\%]$ 比较差异无统计学意义,提示美托洛尔不能抑制 ERK1/2 的激活。

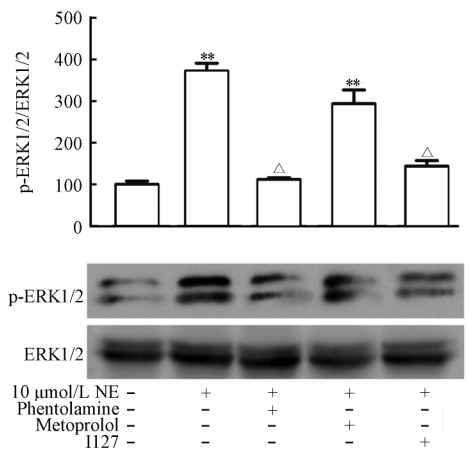


图 6 肾上腺素能受体介导 ERK1/2 的激活

Fig 6 Adrenoceptor-mediated activation of ERK1/2

* * $P < 0.01$ vs control group, $\Delta P < 0.05$ vs NE group; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

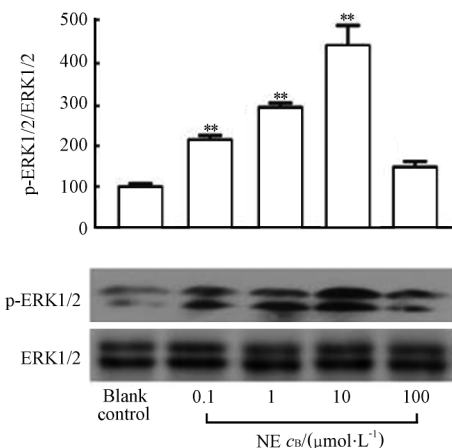


图 5 NE 激活 ERK1/2

Fig 5 NE activated ERK1/2

* * $P < 0.01$ vs blank control; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

NE 在各种生理以及病理情况下的血管新生中发挥重要作用。如在寒冷刺激下,NE 不仅能够刺激棕色脂肪细胞产生热量,还能促进 VEGF 分泌,增加局部的血管分布密度^[5]。同样 NE 在长期焦虑症引起的肿瘤发生概率增加中发挥重要作用^[6]。自主神经紊乱、长期的精神刺激以及情绪波动能够显

著增加交感神经末梢分泌 NE, 促进肿瘤细胞的 VEGF 的分泌, 进一步促进肿瘤的生长^[7]。而本研究发现 NE 能够通过刺激 EPCs 促进成人的血管新生。NE 能够剂量依赖性地促进 EPCs 的增殖和迁移能力, 而非选择性 α 肾上腺受体阻滞剂、 β_2 肾上腺素能受体阻滞剂、JNK 阻滞剂以及 ERK1/2 信号通路阻滞剂能够阻断这种作用, 而 β_1 肾上腺素能受体阻滞剂、p38 信号通路阻滞剂不能阻断这种作用。这些结果提示 NE 通过 α 肾上腺素能受体和 β_2 肾上腺素能受体激活内皮祖细胞内的 ERK1/2 信号通路, 增强内皮祖细胞的增殖能力和迁移能力。这一发现为交感神经促进肿瘤生长提供了新的理论依据, 也为肿瘤治疗提供了新的研究领域。

EPCs 还是成年人血管内皮细胞修复以及各种病理情况下(如大血管损伤、缺血性疾病、烧伤、创伤时), 血运重建重要的调节细胞和参与细胞。它能够修复血管内皮细胞, 减轻动脉粥样硬化的进展^[8], 以及通过增加新生血管增加缺血性疾病中缺血组织的功能重建。而 EPCs 除在脾脏和肝脏中有少量分布外, 主要来源为骨髓。在生理条件下, 循环系统中 EPCs 仅占全部外周血单个核细胞的 0.03% ~ 0.06%^[9]。局部的血管损伤、缺血、烧伤、创伤及细胞因子等均能刺激 EPCs 从骨髓中大量动员。而许多病理因素如高血压^[10]、吸烟^[11]、高血脂^[12] 和高血糖^[13] 等均能影响 EPCs 的动员。因此开展内皮祖细胞从骨髓中的动员以及功能的研究能够帮助我们改善各种血管性疾病的治疗。

NE 在体内分泌的周期性变化是人体昼夜节律调节最重要的机制^[14]。而最近的研究发现内皮祖细胞在体内的分泌也呈严格的周期性, 且分泌的高峰与交感神经活动的高峰严格吻合^[15]。最近的研究发现骨髓中的神经活动可能对骨髓中各种细胞功能的调节发挥非常重要的作用。如多巴胺被发现能够通过 D₂ 受体起到抑制 EPCs 动员的作用^[16]。既往的研究还发现在体外培养的骨髓造血细胞中添加 NE 能够增加其增殖率和细胞内 RNA 的合成^[17]。而本研究中发现生理浓度的 NE (0.023 ~ 7.3 $\mu\text{mol/L}$) 能够刺激 EPCs 的增殖和迁移能力。因此我们推测骨髓中的交感神经末梢能够通过 NE 节律性地调节 EPCs 的动员。这可能也是创伤和缺血性疾病时 EPCs 可迅速动员的机制之一。

关于 NE 刺激 EPCs 增殖和迁移的机制还需要进一步的研究。内皮祖细胞内有多条活跃的信号传递通道。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路是生物体内重要的信号转导系统之一, 参与介导细胞生长、发育、分裂和分化等多种生理及病理过程。在真核细胞中, 目前已确定有 4 条 MAPK 通路(ERK1/2, JNK, p38 和 ERK5), 其中 ERK1/2 最早被发现, 且最具特征性, 主要与细胞的增殖、转化和分化有关, 并多用于此类研究^[18]。我们的前期研究发现糖基化终产物能够显著激活 MAPK 信号通路^[19], 且罗格列酮能够部分逆转这种改变^[20]。有研究发现 NE 能够通过 α_1 肾上腺素能受体激活 ERK1/2 调节脐静脉内皮细胞的功能^[21]。而本研究中发现 NE 能通过 ERK1/2 信号分子调节内皮祖细胞的功能。

NE 可能通过多种机制激活内皮祖细胞内的 ERK1/2 信号分子, 如通过 G 蛋白偶联受体增加细胞的钙内流、激活 cAMP, 进一步激活 PKA 或者 PKC^[22], 或是通过 G_s 激活 ERK1/2^[23]。被激活的 ERK1/2 可以进一步激活 NF- κ B 将信号传导至细胞核内, 影响细胞的增殖和蛋白合成。本研究发现 NE 通过肾上腺素能受体 α 和 β_2 激活 ERK1/2, 进而调节内皮祖细胞的功能。而肾上腺素能受体调节 ERK1/2 的具体机制以及 ERK1/2 激活导致的进一步的分子和细胞学效应还需要后续的研究才能明确。

综上所述, 本研究结果提示 NE 能够通过肾上腺素能受体 α 和 β_2 激活 ERK1/2 信号通路, 进一步调节内皮祖细胞的增殖和迁移能力。而这一结果为肿瘤的血管新生研究以及 EPCs 在骨髓动员的研究提供了很好的理论依据。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Shirakura K, Masuda H, Kwon S M, Obi S, Ito R, Shizuno T, et al. Impaired function of bone marrow-derived endothelial progenitor cells in murine liver fibrosis[J]. *Biosci Trends*, 2011, 5: 77-82.
- [2] Elenkov I, Wilder R, Chrousos G, Vizi E. The sympathetic nerve—an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system[J]. *Pharmacol Rev*, 2000, 52:

- 595-638.
- [3] Méndez-Ferrer S, Battista M, Frenette P S. Cooperation of beta (2)- and beta(3)-adrenergic receptors in hematopoietic progenitor cell mobilization[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1192: 139-144.
- [4] Katayama Y, Battista M, Kao W M, Peired A J, Thomas S A, et al. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow[J]. *Cell*, 2006, 124: 407-421.
- [5] Park S, Kang J H, Jeong K J, Lee J, Han J W, Choi W S, et al. Norepinephrine induces VEGF expression and angiogenesis by a hypoxia-inducible factor-1alpha protein-dependent mechanism[J]. *Int J Cancer*, 2011, 128: 2306-2316.
- [6] Freire-Garabal M, Rey-Méndez M, García-Vallejo L, Balboa J, Suárez J, Rodrigo E, et al. Effects of nefazodone on the development of experimentally induced tumors in stressed rodents[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2004, 176: 233-238.
- [7] Guo K, Ma Q, Wang L, Hu H, Li J, Zhang D, et al. Norepinephrine-induced invasion by pancreatic cancer cells is inhibited by propranolol[J]. *Oncol Rep*, 2009, 22: 825-830.
- [8] Zhang Q, Kutryk M J. Dysregulation of angiogenesis-related microRNAs in endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 405: 42-46.
- [9] Henrich D, Hahn P, Wahl M, Wilhelm K, Dernbach E, Dimmeler S, et al. Serum derived from multiple trauma patients promotes the differentiation of endothelial progenitor cells in vitro: possible role of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor165[J]. *Shock*, 2004, 21: 13-16.
- [10] Zhou Z, Peng J, Wang C J, Li D, Li T T, Hu C P, et al. Accelerated senescence of endothelial progenitor cells in hypertension is related to the reduction of calcitonin gene-related peptide[J]. *J Hypertens*, 2010, 28: 931-939.
- [11] Di Stefano R, Barsotti M C, Felice F, Magera A, Lekakis J, Leone A, et al. Smoking and endothelial progenitor cells: a revision of literature[J]. *Curr Pharm Des*, 2010, 16: 2559-2566.
- [12] Cheng J, Cui R, Chen C H, Du J. Oxidized low-density lipoprotein stimulates p53-dependent activation of proapoptotic Bax leading to apoptosis of differentiated endothelial progenitor cells[J]. *Endocrinology*, 2007, 148: 2085-2094.
- [13] Chen Y, Lin S, Lin F Y, Wu T C, Tsao C R, Huang P H, et al. High glucose impairs early and late endothelial progenitor cells by modifying nitric oxide-related but not oxidative stress-mediated mechanisms[J]. *Diabetes*, 2007, 56: 1559-1568.
- [14] Wongchitrat P, Felder-Schmittbuhl M P, Phansuwan-Pujito P, Pévet P, Simonneaux V. Endogenous rhythmicity of Bmal1 and Rev-erb alpha in the hamster pineal gland is not driven by norepinephrine[J]. *Eur J Neurosci*, 2009, 29: 2009-2016.
- [15] Busik J V, Tikhonenko M, Bhatwadekar A, Opreanu M, Yakubova N, Caballero S, et al. Diabetic retinopathy is associated with bone marrow neuropathy and a depressed peripheral clock[J]. *J Exp Med*, 2009, 206: 2897-2906.
- [16] Chakroborty D, Chowdhury U R, Sarkar C, Baral R, Dasgupta P S, Basu S. Dopamine regulates endothelial progenitor cell mobilization from mouse bone marrow in tumor vascularization[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118: 1380-1389.
- [17] Chakroborty D, Sarkar C, Basu B, Dasgupta P S, Basu S. Catecholamines regulate tumor angiogenesis[J]. *Cancer Res*, 2009, 69: 3727-3730.
- [18] 顾平, 王彦永, 马芹颖, 温雅, 崔冬生, 刘力, 等. ERK1/2 信号转导通路对骨髓基质细胞条件培养液诱导大鼠中脑神经干细胞分化作用的影响[J]. *第二军医大学学报*, 2007, 28: 589-592.
- Gu P, Wang Y Y, Ma Q Y, Wen Y, Cui D S, Liu L, et al. Influence of ERK1/2 signal-transduction pathway on differentiation of mesencephalic neural stem cells induced by bone marrow stromal cell-conditioned medium[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2007, 28: 589-592.
- [19] Sun C, Liang C, Ren Y, Zhen Y, He Z, Wang H, et al. Advanced glycation end products depress function of endothelial progenitor cells *via* p38 and ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathways[J]. *Basic Res Cardiol*, 2009, 104: 42-49.
- [20] Liang C, Ren Y, Tan H, He Z, Jiang Q, Wu J, et al. Rosiglitazone *via* upregulation of Akt/eNOS pathways attenuates dysfunction of endothelial progenitor cells, induced by advanced glycation end products[J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 158: 1865-1873.
- [21] Seya Y, Fukuda T, Isobe K, Kawakami Y, Takekoshi K. Effect of norepinephrine on RhoA, MAP kinase, proliferation and VEGF expression in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 553: 54-60.
- [22] Fredriksson J M, Lindquist J M, Bronnikov G E, Nedergaard J. Norepinephrine induces vascular endothelial growth factor gene expression in brown adipocytes through a beta-adrenoreceptor/cAMP/protein kinase A pathway involving Src but independently of Erk1/2[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 13802-13811.
- [23] Yaniv S P, Lucki A, Klein E, Ben-Shachar D. Dexamethasone enhances the norepinephrine-induced ERK/MAPK intracellular pathway possibly *via* dysregulation of the alpha2-adrenergic receptor; implications for antidepressant drug mechanism of action[J]. *Eur J Cell Biol*, 2010, 89: 712-722.

[本文编辑] 魏学丽, 邓晓群