

## ERK1/2 信号通路介导 PDGF-CC 诱导的鼠心肌纤维化及其机制

王汉章, 马礼坤, 王磊, 李龙伟, 李卉卉

**摘要** 目的 研究 ERK1/2 通路在血小板源性生长因子 (PDGF)-CC 诱导的鼠心肌纤维化中的作用及其可能的机制。方法 取 SD 大鼠乳鼠心脏组织, 差速贴壁法分离并纯化心肌成纤维细胞。按不同药物处理随机分成对照组 (CON 组)、PDGF-CC (P 组)、PDGF-CC + ERK1/2 抑制剂 U0126 (PU 组)。MTT 法检测心肌成纤维细胞的增殖, qRT-PCR 法检测 mRNA 含量, Western blot 法分析蛋白表达量。结果 MTT 法显示 P 组细胞数较 CON 组显著增加 ( $P < 0.01$ ), 而 PU 组细胞数较 P 组明显减少 ( $P < 0.01$ )。qRT-PCR 法显示 P 组中 PDGF- $\alpha$  受体 (PDGFR- $\alpha$ )、ERK1、ERK2、I 型和 III 型胶原蛋白 (Col I、Col III) 的 mRNA 表达水平均明显高于 CON 组 ( $P < 0.001$ ), PDGFR- $\beta$  的 mRNA 表达量在 P 组与 CON 组间差异无统计学意义。与 P 组相比, PU 组中 PDGFR- $\alpha$ 、ERK1、ERK2、Col I 和 Col III mRNA 表达均明显下降 ( $P < 0.01$ )。Western blot 法显示 P 组中磷酸化 PDGFR- $\alpha$  (p-PDGFR- $\alpha$ )、ERK1/2、p-ERK1/2、Col I 和 Col III 的表达量均明显高于 CON 组 ( $P < 0.001$ ), PU 组中 p-PDGFR- $\alpha$ 、ERK1/2、p-ERK1/2、Col I 和 Col III 蛋白表达量均显著低于 P 组 ( $P < 0.001$ )。结论 PDGF-CC 可能通过结合 PDGFR- $\alpha$  激活 ERK1/2 信号通路, 诱导鼠心肌成纤维细胞过量增殖伴胶原蛋白的合成, 参与心肌纤维化的发生。

**关键词** 心肌纤维化; 心肌成纤维细胞; 血小板源性生长因子; 细胞外信号调节激酶类

中图分类号 R 542.23; R 977.6; R 329.21

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)10-1489-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.10.016

血小板源性生长因子家族 (platelet-derived growth factors, PDGFs) 是通过结合细胞表面受体并诱导成纤维细胞增殖和趋化的多肽家族, 与纤维化密切相关。鼠肺纤维化中 PDGF-CC 的表达显著呈正相关性而与 PDGF-DD 表达呈负相关性<sup>[1]</sup>, 而在肾纤维化过程中显示 PDGF-CC 可引起肾成纤维细

胞的增殖并转化, 导致肾衰竭的发生<sup>[2]</sup>。细胞外信号调节蛋白激酶通路 (extracellular signal regulated kinase, ERK) 包括 ERK1 和 ERK2。研究<sup>[3-5]</sup>显示 ERK 信号通路参与了心肌损伤后的病理生理过程, 如心脏肥大、高糖及心肌梗死等。然后目前关于 ERK1/2 通路在心肌成纤维细胞的研究未见深入报道, 该实验通过体外培养鼠心肌成纤维细胞并加入外源性 PDGF-CC 后, 观察心肌成纤维细胞的增殖程度, 并检测 ERK1/2 信号通路及胶原蛋白 (Col I 和 Col III) 的表达, 探讨 PDGF-CC 在心肌纤维化中的信号通路及其可能的作用机制。

### 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 1~3 d 龄 SD 雄性大鼠 30 只, 由安徽医科大学动物中心提供, 清洁级, 5~6 g。

**1.2 主要试剂** HG/DMEM 培养基购自美国 HyClone 公司; U0126、RIPA 细胞裂解液 (内含 1 mmol/L PMSF) 购自上海碧云天生物公司; 四季青胎牛血清购自浙江天杭生物公司; MTT 购自美国 Sigma 公司; PDGF-CC 购自美国 Pepro Tech 公司; 兔抗大鼠 IgG 购自北京中杉金桥公司; PCR 引物由上海生工设计合成; 兔抗大鼠 p-PDGFR- $\alpha$ 、ERK1/2、p-ERK1/2、Col I 和 Col III 一抗购自美国 Bioworld 公司; TR-Izol Reagent 购自美国 Ambion 公司; PCR 试剂盒 QuantiNova<sup>TM</sup> SYBR Green 购自美国 Qiagen 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 细胞分离与培养** 75% 乙醇消毒乳鼠后处死, 无菌条件下剪取心脏并收集心尖部组织, 充分剪碎组织, 置于含 1% 双抗 (链霉素和青霉素) 的 PBS 缓冲液洗涤 3 次。加入 5 倍于组织块体积的 0.08% 胰蛋白酶, 37 °C 水浴消化 3 min 后吹打 1 min, 收集细胞上清液并用培养基中和, 重复以上步骤直至组织消化完全。1 200 r/min 离心 4 min, 弃上清液, 加入 3 ml 培养基 (HG/DMEM, 10% 体积胎牛血清, 1% 体积双抗), 转至细胞培养瓶内孵育 90 min 移去培养基。再次加入等体积培养基, 以后每隔 1 d 换液 1 次, 待心肌成纤维细胞铺满培养瓶底

2017-05-03 接收

基金项目: 安徽省科技攻关计划项目 (编号: 1604a0802074); 安徽省公益性技术应用研究联动计划项目 (编号: 15011d04032)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院心血管内科, 合肥 230001

作者简介: 王汉章, 男, 硕士研究生;

马礼坤, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: lkmal19@163.com

部面积约 70% 时按 1 : 2 进行传代,第 2 ~ 4 代细胞用于实验。第 2 代心肌成纤维细胞行波形蛋白 Vimentin 免疫学染色鉴定,同时细胞核行 DAPI 染色。

**1.3.2 实验分组及干预** ① 对照组(control, CON 组): 只加培养基; ② PDGF-CC 组(P 组): 培养基 + 20 ng/ml PDGF-CC; ③ PDGF-CC + ERK1/2 抑制剂 U0126(PU 组): 培养基 + 20 ng/ml PDGF-CC + 10 μmol/ml U0126(ERK1/2 抑制剂,半抑制浓度 = 10 μmol/ml)。上述分组中细胞接种密度一致,培养基均为含 10% 胎牛血清的 HG/DMEM,孵育条件为 5% CO<sub>2</sub>、37 °C。

**1.3.3 MTT 比色法检测心肌成纤维细胞的增殖** 将细胞随机分成 4 组: 凋零组(仅培养基)、细胞组(细胞 + 培养基)、P 组(细胞 + 培养基 + PDGF-CC)、PU 组(细胞 + 培养基 + PDGF-CC + U0126)。收集对数期细胞,向 96 孔板每孔加入 100 μl 细胞悬液,设置 5 个复孔,孵育 24 h,分组干预后继续培养 48 h 后加入 5 mg/ml 的 MTT (20 μl/孔) 孵育 4 h 吸净孔内液体,每孔加入 150 μl DMSO 充分溶解 10 min,在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量个孔的吸光度(optical density, OD) 值。OD 值大小间接反映心肌成纤维细胞的数量,其值越大,表示细胞数越多。实验重复 3 次,取各组平均值。

**1.3.4 qRT-PCR 法检测 PDGFR-α、PDGFR-β、ERK1、ERK2、Col I 和 Col III 的 mRNA 表达水平** 对数期细胞接种于 6 孔板,孵育 24 h,分组处理后继续培养 48 h。采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,核酸蛋白分析仪检测 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 在 1.8 ~ 2.0,说明提取的 RNA 纯度较高,可用于下一步实验。取 RNA 5 μg,逆转录合成 cDNA,荧光定量 PCR 仪 Mx3000P 扩增目的基因。设置反应参数为 95 °C 预热 2 min 95 °C 变性 5 s 60 °C 退火 10 s,共 40 个循环。每孔得到 Ct 值,采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法对目的基因的表达水平进行定量,计算各 mRNA 相对表达倍数,ΔCt = Ct(目的基因) - Ct(内参基因)。每组设 3 孔,重复 3 次。引物由上海生工公司设计、合成,引物序列见表 1,内参基因为 β-actin。

**1.3.5 Western blot 法检测 p-PDGFR-α、ERK1/2、p-ERK1/2、Col I 和 Col III 蛋白表达量** 将对数期细胞接种于 6 孔板内孵育 24 h,分组干预后继续孵育 48 h。加入 1 ml RIPA 细胞裂解液进行充分裂解,12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,BCA 法检测蛋白样品的浓度。凝胶电泳分离蛋白(电压 100 V)并转至 PVDF 膜,室温封闭 2 h。加入一抗(1

: 500) 4 °C 摇动过夜,漂洗 3 次。加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1 : 1 000) 室温孵育 2 h,洗涤 3 次。ECL 发光试剂盒检测蛋白,北京科创锐新生物凝胶成像系统进行条带分析。以 β-actin 为内参照。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5' - 3')
PDGFR-α	F: CCTGGCATGATGGTTGATTCTACTT R: GGTCTCTTTTCGGGTTCACTGTTC
PDGFR-β	F: GCACCGAAACAAACACACCTT R: ATGTAACCACCGTCGCTCTC
ERK1	F: TCCATCGACATCTGGTCTGT R: AGCTGCTCCAGGTAGTGCTT
ERK2	F: TGAAGTTGAACAGGCTCTGG R: AGTCGTCCAACCTCCATGTCA
Col I	F: ACGCATGAGCCGAAGCTAAC R: AGGGACCCTTAGGCCATTGT
Col III	F: ATAGACCTCAAGGCCCAAG R: CCACCCATTCTCCGACT
β-actin	F: AGTGTGACGTTGACATCCGT R: TGCTAGGAGCCAGAGCAGTA

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验或方差分析 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 心肌成纤维细胞的生理学特性及鉴定** 原代心肌成纤维细胞通过差速贴壁法分离,细胞可达 95% 以上纯度。培养 3 ~ 4 d,可见细胞融合,呈交叉重叠生长,无自发性搏动,细胞呈长梭形或多边形。细胞生长达到 70% 进行传代。免疫荧光染色鉴定绿色为波形蛋白 Vimentin 染色,蓝色为细胞核 DAPI 染色,见图 1。

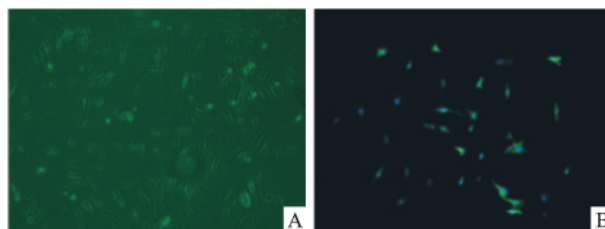


图 1 原代心肌成纤维细胞形态及鉴定

A: 光镜下观察细胞形态 × 100; B: 荧光显微镜下观察细胞形态(波形蛋白 Vimentin 染色为绿色,细胞核 DAPI 染色为蓝色) × 200

**2.2 心肌成纤维细胞增殖的检测结果** 通过 MTT 法检测各组心肌成纤维细胞的增殖,在加入 PDGF-CC 刺激后 P 组细胞数与 CON 组相比明显增多,差异有统计学意义(*t* = 5.74, *P* < 0.01)。而 PU 组加

入 ERK1/2 抑制剂后细胞增殖受到抑制( $t = 8.46$ ,  $P < 0.01$ ) ,见图 2。

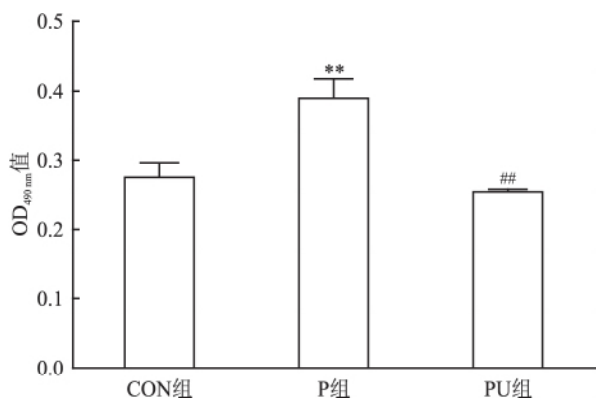


图2 MTT 法检测各组心肌成纤维细胞的增殖与 CON 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 P 组比较: ##  $P < 0.01$

**2.3 实时荧光定量 PCR 检测结果** 计算各组 PDGFR- $\alpha$ 、PDGFR- $\beta$ 、ERK1、ERK2、Col I 和 Col III 的 mRNA 相对表达量显示: 与 CON 组比较, P 组中 PDGFR- $\alpha$  的 mRNA 表达明显上调, 差异有统计学意义( $t = 23.42$ ,  $P < 0.001$ ) ,给予 ERK1/2 抑制剂后 PU 组中 PDGFR- $\alpha$  的 mRNA 表达水平明显低于 P 组( $t = 8.37$ ,  $P < 0.01$ ) ,而 PDGFR- $\beta$  的 mRNA 表达水平在 P 组与 CON 组相比差异无统计学意义。P 组中 ERK1 和 ERK2 的 mRNA 表达水平显著高于 CON 组( $t = 14.07, 26.25$ ,  $P < 0.001$ ) ,而 PU 组中 ERK1 和 ERK2 的 mRNA 表达水平较 P 组均明显下降( $t = 11.04, 11.36$ ,  $P < 0.001$ ) 。Col I 和 Col III 基因的 mRNA 表达水平中 P 组表达量均明显高于 CON 组( $t = 25.06, 29.99$ ,  $P < 0.001$ ) ,给予抑制剂后二者表达量均明显下降( $t = 18.48, 11.91$ ,  $P < 0.001$ ) ,见图 3。

**2.4 Western blot 检测结果** P 组中 p-PDGFR- $\alpha$  的蛋白表达量与 CON 组比较显著增加, 差异有统计学意义( $t = 23.78$ ,  $P < 0.001$ ) 。同时 P 组中 ERK1/2 和 p-ERK1/2 的表达量与 CON 组相比, 蛋白表达量均明显增加( $t = 16.89, 15.60$ ,  $P < 0.001$ ) 。Col I 和 Col III 的蛋白表达量 P 组明显高于 CON 组( $t = 25.71, 22.64$ ,  $P < 0.001$ ) 。PU 组加入 ERK 抑制剂后 p-PDGFR- $\alpha$ 、ERK1/2、p-ERK1/2、Col I 和 Col III 蛋白表达量均显著下降, 差异有统计学意义( $t = 19.95, 15.11, 17.21, 17.83, 14.90$ ,  $P < 0.001$ ) ,见图 4。

### 3 讨论

心脏组织是由心肌细胞、心肌间质细胞和细胞

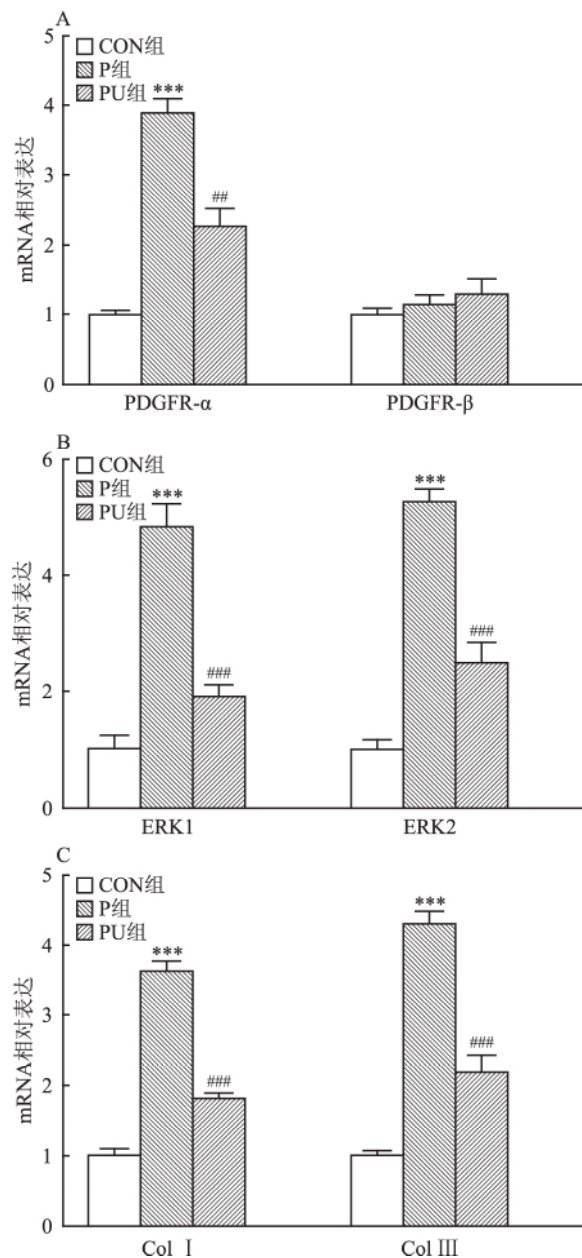


图3 PDGFR- $\alpha$ 、PDGFR- $\beta$ 、ERK1、ERK2、Col I 和 Col III 的 mRNA 表达量

A: PDGFR- $\alpha$  和 PDGFR- $\beta$  的 mRNA 表达; B: ERK1 和 ERK2 的 mRNA 表达; C: Col I 和 Col III 的 mRNA 表达; 与 CON 组比较: \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与 P 组比较: ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$

外基质构成, 心肌成纤维细胞是心肌间质细胞的最主要成分, 而细胞外基质主要由 I 型和 III 型胶原蛋白组成, 心肌成纤维细胞是合成这两种胶原蛋白的主要细胞。心肌纤维化是心脏组织对机体内外部环境刺激所发生的慢性代偿性反应, 是细胞外基质蛋白代谢紊乱的结果, 细胞生长因子过度刺激可引起以心肌成纤维细胞为主的心肌间质细胞代偿性增生。心肌纤维化出现心室容受性下降, 逐渐导致心脏收缩舒张功能减退, 并且影响心脏的电传导活动, 导致

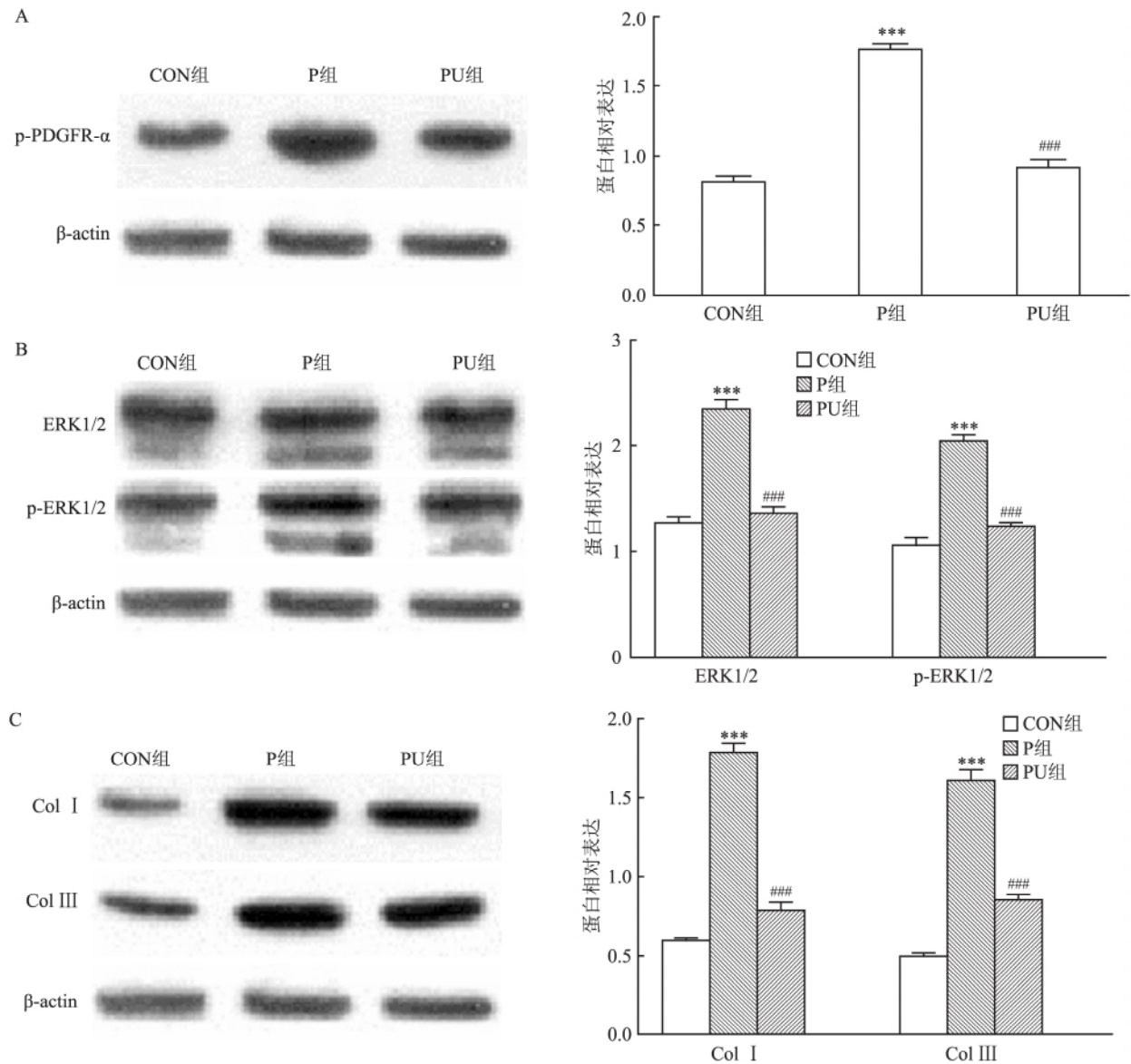


图4 p-PDGFR-α、ERK1/2、p-ERK1/2、Col I 和 Col III 的蛋白表达量

A: p-PDGFR-α 的蛋白表达; B: ERK1/2 和 p-ERK1/2 的蛋白表达; C: Col I 和 Col III 的蛋白表达; 与 CON 组比较: \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与 P 组比较: ###  $P < 0.001$

心力衰竭和恶性心律失常的发生<sup>[6]</sup>。心肌间质中成纤维细胞过度增殖,伴细胞外基质胶原蛋白浓度升高是发生心肌纤维化效应的基本病理生理机制。

PDGFs 包括 PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-CC、PDGF-DD 和 PDGF-AB。PDGFs 维持细胞正常的增殖,当机体内环境紊乱刺激细胞因子合成增多,进而引起成纤维细胞的过度增殖。研究<sup>[7]</sup>显示大鼠盐皮质激素诱导心肌纤维化中 PDGFs 和 PDGFRs 的表达显著增加,PDGFRs 主要定位在成纤维细胞和肌成纤维细胞,表明 PDGFs/PDGFRs 参与心肌纤维化的病理发生。后续研究<sup>[8]</sup>显示 PDGF-BB 主要与 PDGFR-β 结合,引起下游 PI3K/AKT 信号通路的

激活,导致心肌成纤维细胞大量增殖并转化肌成纤维细胞,同时胶原蛋白合成增多。PDGFs 还可通过提高组织金属蛋白酶抑制剂的合成来抑制胶原酶的作用,减少细胞外基质的降解,使细胞外基质蛋白浓度升高。本实验对纯化的心肌成纤维细胞给予 PDGF-CC 刺激后心肌成纤维细胞明显增殖,表明 PDGF-CC 能够促进心肌成纤维细胞的分裂生长。与 PDGFs 结合的受体分为 PDGFR-α 和 PDGFR-β 两种。研究<sup>[9]</sup>表明 PDGF-CC 在心肌成纤维细胞与 PDGFR-α 结合。然而另一项研究<sup>[10]</sup>显示 PDGF-CC 在人血管平滑肌细胞及微血管内皮细胞中通过激活 PDGFR-αβ 和 ERK 依赖性信号转导途径诱导组织

因子表达。PDGF-CC 介导的小鼠角膜中的新血管形成反应可能由 PDGF- $\alpha\alpha$  和  $\beta\beta$  受体转导所致<sup>[11]</sup>。PDGFR- $\alpha$  和 PDGFR- $\beta$  在未结合状态以单体形式存在,这两类受体一旦与 PDGFs 结合后,其单体会形成 PDGFR- $\alpha\alpha$ 、PDGFR- $\beta\beta$  或 PDGFR- $\alpha\beta$  二聚体。本研究显示 PDGF-CC 刺激心肌成纤维细胞后,PDGFR- $\beta$  mRNA 表达量未见升高,而 PDGFR- $\alpha$  高表达,推测心肌成纤维细胞上可能以 PDGFR- $\alpha\alpha$  二聚体形式与 PDGF-CC 结合,PDGF-CC 刺激 PDGFR 后形成的二聚体形式具有一定的组织差异性。

MAPK 是细胞信号转导通路中的重要途径之一,其信号链主要有 4 条: p38 MAPK、ERK1/2、JNK 和 ERK5。ERK1/2 信号通路负责调控细胞生长和分化。研究<sup>[12]</sup>报道 STAT1/3 信号通路介导高糖引起的心肌成纤维细胞的增殖并引起胶原蛋白分泌,其中 ERK1/2 信号通路可能参与协同调控其纤维化过程。另一项文献<sup>[13]</sup>报道了 ERK 通路可能与肝脏纤维化的发展紧密相关。PDGF-CC 能诱导肾脏成纤维细胞上 ERK1/2 通路的激活,表明 ERK1/2 通路的激活可能会促进成纤维细胞的增殖<sup>[2]</sup>。本研究实验显示心肌成纤维细胞给予 PDGF-CC 刺激后 ERK1/2 的 mRNA 及蛋白表达量均明显升高,同时给予抑制剂后其表达量显著下降,表明 PDGF-CC 刺激心肌成纤维细胞 ERK1/2 基因转录合成 mRNA,引起 ERK1/2 通路磷酸化和激活。同时 Col I 和 Col III 的表达亦显著增加,提示 PDGF-CC 诱导心肌成纤维细胞上 ERK1/2 通路的激活,导致下游胶原蛋白的合成,引起心肌纤维化的效应。

Ras/Raf/MEK 通路是激活 ERK1/2 的上游信号途径,活化的 Ras 相继将 Raf 和 MEK 激活并转移到胞核,导致 ERK1/2 激活。U0126 能高效抑制 MEK1/2 及其磷酸化,进而阻断下游信号通路 ERK1/ERK2 的活化。研究<sup>[14]</sup>表明 U0126 通过阻断 ERK 通路抑制了 FasL 诱导的小鼠扩张型心肌病和慢性心衰的进展,证明 U0126 具有抗纤维化作用。本研究实验显示 U0126 可以减弱 PDGF-CC 对心肌成纤维细胞的增殖作用,通过抑制 ERK1/2 信号通路,同时使胶原蛋白合成减少,表明 U0126 抑制 PDGF-CC 作用于心肌成纤维细胞后下游信号通路 ERK1/2 的激活,使有关纤维化效应的信号链没有被过度激活。U0126 可能在减轻心肌纤维化方面具有一定的作用。

## 参考文献

- [1] Zhuo Y, Zhang J, Laboy M, et al. Modulation of PDGF-C and PDGF-D expression during bleomycin-induced lung fibrosis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004, 286(1): L182-8.
- [2] Seikrit C, Henkel C, van Roeyen C R, et al. Biological responses to PDGF-AA versus PDGF-CC in renal fibroblasts [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2013, 28(4): 889-900.
- [3] Li C, Chen Z, Yang H, et al. Selumetinib, an oral anti-neoplastic drug, may attenuate cardiac hypertrophy *via* targeting the erk pathway [J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e159079.
- [4] Zhang Y, Zhang L, Zhang Y, et al. The protective role of liquiritin in high fructose-induced myocardial fibrosis *via* inhibiting NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 1337-49.
- [5] Duan J, Yang Y, Liu H, et al. Osthole ameliorates acute myocardial infarction in rats by decreasing the expression of inflammatory-related cytokines, diminishing MMP-2 expression and activating p-ERK [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(1): 207-16.
- [6] Camelliti P, Borg T K, Kohl P. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts [J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 65(1): 40-51.
- [7] 范彬,马礼坤,李谦,等.伊马替尼减轻 DOCA 诱导的大鼠心肌纤维化与 PDGFs/PDGFRs 信号通路有关 [J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(3): 430-7.
- [8] Fan H, Ma L, Fan B, et al. Role of PDGFR- $\beta$ /PI3K/AKT signaling pathway in PDGF-BB induced myocardial fibrosis in rats [J]. *Am J Transl Res*, 2014, 6(6): 714-23.
- [9] Li X, Pontén A, Aase K, et al. PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor [J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(5): 302-9.
- [10] Gebhard C, Akhmedov A, Mocharla P, et al. PDGF-CC induces tissue factor expression: role of PDGF receptor alpha/beta [J]. *Basic Res Cardiol*, 2010, 105(3): 349-56.
- [11] Cao R, Bråkenhielm E, Li X, et al. Angiogenesis stimulated by PDGF-CC, a novel member in the PDGF family, involves activation of PDGFR- $\alpha\alpha$  and - $\alpha\beta$  receptors [J]. *FASEB J*, 2002, 16(12): 1575-83.
- [12] Dai B, Cui M, Zhu M, et al. STAT1/3 and ERK1/2 synergistically regulate cardiac fibrosis induced by high glucose [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 32(4): 960-71.
- [13] 曹荣娟,李俊,詹迪迪,等.玉屏风多糖对肝星状细胞中 PDGF-BB, PDGFR- $\beta$  的表达及 ERK1/2 通路的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2011, 46(9): 861-4.
- [14] Huby A C, Turdi S, James J, et al. FasL expression in cardiomyocytes activates the ERK1/2 pathway, leading to dilated cardiomyopathy and advanced heart failure [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2016, 130(4): 289-99.

## ERK1/2 signaling pathway mediates PDGF-CC-induced rat cardiac fibrosis and its mechanism

Wang Hanzhang, Ma Likun, Wang Lei et al

(Dept of Cardiology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

**Abstract Objective** To investigate the role and mechanism of ERK1/2 pathway in PDGF-CC-induced cardiac fibrosis in rats. **Methods** The cardiac fibroblasts were isolated and purified from cardiac tissues of SD neonatal rats by differential time attachment, then divided into 3 groups randomly: control group (CON), PDGF-CC group (P) and group of PDGF-CC + ERK1/2 inhibitor U0126 (PU). MTT assay was used to detect the proliferation of cardiac fibroblasts. The mRNA expression levels were detected by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR). The protein expressions were detected by Western blot. **Results** MTT showed that the number of cells in P group was significantly higher than that in CON group ( $P < 0.01$ ), while the number of cells in PU group was significantly lower than that in P group ( $P < 0.01$ ). qRT-PCR showed that the mRNA expressions of PDGFR- $\alpha$  (PDGF receptor- $\alpha$ ), ERK1, ERK2, collagen type I and type III (Col I, Col III) were significantly higher than CON group ( $P < 0.001$ ), PDGFR- $\beta$  mRNA expression showed no significant difference between P and CON group, and that PDGFR- $\alpha$ , ERK1, ERK2, Col I and Col III in PU group was markedly reduced as compared to P group ( $P < 0.01$ ). Western blot showed that the protein expressions of phosphorylated PDGFR- $\alpha$  (p-PDGFR- $\alpha$ ), ERK1/2, p-ERK1/2, Col I and Col III were significantly higher than that in CON group ( $P < 0.001$ ), and those expressions were significantly decreased in the PU group compared with P group ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** PDGF-CC may activate the ERK1/2 signaling pathway by binding to PDGFR- $\alpha$ , leads to excessive proliferation of rat cardiac fibroblasts with collagen synthesis and participate in the development of myocardial fibrosis.

**Key words** cardiac fibrosis; cardiac fibroblasts; platelet-derived growth factor; extracellular signal-regulated MAP kinases

(上接第 1488 页)

growth factor in BMMSCs by means of *in vivo* and *in vitro*. **Methods** To construct the lentiviral vector, we respectively transfected BMMSCs and HUVEC and cultured Lenti-miR-210/BMMSCs and Lenti-LacZ/BMMSCs. The expression of VEGF was detected by RT-PCR on day 7 and Western blot on day 14. After fluorescent stained by PKH26 red kit, Lenti-miR-210/HUVEC and Lenti-LacZ/HUVEC were cultured on matrigel for 24 h, then observed by fluorescence microscope. Two hydrogel systems (agomir-210, BMMSCs, and HyStem-HP; agomir-NC, BMMSCs, and HyStem-HP) were injected subcutaneously into nude mice. On the seventh day, the nude mice were killed and the sample was immunofluorescence stained by CD31. **Results** The expression of VEGF in Lenti-miR-210/BMMSCs group detected by RT-PCR on day 7 and Western blot on day 14 was much higher than that of the control group ( $P < 0.05$ ). After cultured in matrigel for 24 h, cells on Lenti-miR-210/HUVEC group developed much more vessel-like structures and junction size than those on Lenti-LacZ/HUVEC group. And CD31 positive cells in agomir-210 group were significantly higher than that of agomir-NC group by immunofluorescence stain. **Conclusion** Through *in vivo* and *in vitro* detection, miR-210 overexpression could effectively promote the expression and secretion of vascular endothelial growth factor BMMSCs.

**Key words** miR-210; bone marrow mesenchymal stem cells; vascular endothelial growth factor; gene transfection; HyStem-HP hydrogel