

# PDGF-BB 诱导肺动脉平滑肌细胞表型转换时 细胞骨架的变化

吴珊珊<sup>1</sup>, 谢亮<sup>2</sup>, 刘翰旻<sup>2</sup>, 刘斌<sup>1△</sup>

1. 西南医科大学附属医院 儿科(泸州 646000);

2. 四川大学华西第二医院 西部妇幼医学研究院 血管重构与发育缺陷实验室(成都 610041)

**【摘要】** 目的 研究血小板衍生生长因子(PDGF-BB)诱导大鼠肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)表型转换时细胞骨架构象的改变,探讨 PASMCs 表型转换的机制。方法 原代培养并鉴定 SD 大鼠 PASMCs,将 PASMCs 分为对照组(细胞不加诱导剂培养 24 h)、实验组(细胞用 PDGF-BB 10 ng/mL 诱导培养 24 h);实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)及 Western blot 检测细胞表型转化标志基因[ $\alpha$ -肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、平滑肌 22 $\alpha$  蛋白(SM22 $\alpha$ )]mRNA 及相关蛋白的表达;免疫荧光法检测细胞骨架微丝 F-actin 及微管  $\alpha$ -tubulin、 $\beta$ -tubulin 的构象;CCK-8 法检测细胞增殖能力及划痕实验观察细胞迁移能力。结果 与对照组相比,PDGF-BB 下调  $\alpha$ -SMA 及 SM22 $\alpha$  表达水平;细胞骨架荧光强度明显减弱,F-actin 排列紊乱、边缘不规则、呈毛刺样, $\alpha$ -tubulin、 $\beta$ -tubulin 形态模糊,表现为共定位;明显增强 PASMCs 增殖与迁移能力。结论 PDGF-BB 可能通过影响细胞骨架构象诱导 PASMCs 表型转换,进而改变细胞增殖及迁移能力。

**【关键词】** 肺动脉平滑肌细胞 表型转换 细胞骨架

## The Changes of Cytoskeleton during Phenotypic Transition of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells Induced by PDGF-BB

WU Shan-shan<sup>1</sup>, XIE Liang<sup>2</sup>, LIU Han-min<sup>2</sup>, LIU Bin<sup>1△</sup>. 1. Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of South West Medical University, Luzhou 646000, China; 2. The Vascular Remodeling and Developmental Defects Research Unit, West China Institute of Women and Children's Health, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: lblyfy@126.com

**【Abstract】** **Objective** To study the changes of cytoskeleton during the phenotypic transition of rat pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) induced by platelet-derived growth factor (PDGF-BB), and to explore the mechanism involved in the process of phenotypic transition of PASMCs. **Methods** PASMCs of Sprague Dawley (SD) rats were cultured and identified by immunohistochemistry (IHC) method. The cells were randomly divided into control group and PDGF-BB treated group (10 ng/mL). RT-qPCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein level of marker genes ( $\alpha$ -SMA and SM22 $\alpha$ ) during the process of phenotypic transition of PASMCs. The changes of cytoskeleton were observed by fluorescent microscopy, cell proliferation was measured by CCK-8 method; and cell migration was observed by wound healing assay. **Results** Compared with control group, PDGF-BB down-regulated the mRNA and protein expression of  $\alpha$ -SMA and SM22 $\alpha$ . The fluorescence intensity of cytoskeletal protein was significantly reduced after the treatment of PDGF-BB. In addition, the structure of F-actin was disorganized with a burr-like appearance, and the structures of  $\alpha$ -tubulin and  $\beta$ -tubulin were irregular with co-location appearance. PDGF-BB significantly enhanced the proliferation and migration of PASMCs. **Conclusion** PDGF-BB could induce a conformation change in cytoskeletal proteins for PASMCs phenotypic transition, and enhance the ability of proliferation and migration of PASMCs.

**【Key words】** Pulmonary artery smooth muscle cells Phenotypic conversion Cytoskeleton

肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PASMCs)构成肺动脉壁中膜,主要功能是通过舒缩调节血管张力。在生长发育过程中和病理因素刺激下,PASMCs 可发生收缩型和合成型两种表型的相互转化,其中收缩型主要执行收缩功

能,合成型则与增殖、迁移及合成与分泌细胞外基质能力相关<sup>[1]</sup>。目前鉴定 PASMCs 表型转换的标志物主要是  $\alpha$ -肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)及平滑肌 22 $\alpha$  蛋白(SM22 $\alpha$ ),在收缩型细胞中, $\alpha$ -SMA 及 SM22 $\alpha$  表达较高,合成型细胞中表达降低<sup>[2]</sup>。研究发现,机体内发育成熟的血管中 PASMCs 主要为收缩型,在肺动脉高压(pulmonary artery hypertension, PAH)等

病理因素刺激下, PSMCs 可由收缩型转化为增殖及迁移活性较高的合成型。PSMCs 表型转化引起的增殖和迁移是 PAH 血管重构病理机制的中心环节<sup>[3-4]</sup>, 因此研究其表型转化的机制对 PAH 的防治具有重要意义。

血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB)是一种重要的有丝分裂原, 可促进平滑肌细胞从收缩型转换为合成型, 调节平滑肌细胞的增殖和迁移<sup>[5]</sup>。研究发现, PDGF-BB 及其受体 mRNA 在 PAH 患者肺动脉内皮细胞及平滑肌细胞中高表达, 参与肺血管重构, 是 PAH 的重要致病因素<sup>[6-7]</sup>。本研究选用 PDGF-BB 作为 PSMCs 表型转化的诱导因子, 观察其诱导细胞发生表型转换时, 细胞微丝骨架 F-actin, 微管骨架  $\alpha$ -tubulin、 $\beta$ -tubulin 的变化, 探讨 PSMCs 表型转换可能的机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

健康雄性 SD 大鼠, 体质量约 150~200 g, 由四川大学实验动物中心提供; 0.25% 胰酶、青/链霉素、DMEM-F12 培养基(美国 Hyclone 公司); 胎牛血清(FBS, 美国 GEMINI 公司); PDGF-BB(美国 R&D 公司); CCK-8 增殖检测试剂盒(日本同仁化学); 兔抗大鼠  $\alpha$ -SMA 及 SM22 $\alpha$ (美国 Abcam 公司); 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥公司); 兔抗 GAPDH IgG、小鼠抗  $\alpha$ -tubulin IgG、兔抗  $\beta$ -tubulin IgG、Alexafluor<sup>®</sup> 594 山羊抗兔荧光抗体 IgG、Alexafluor<sup>®</sup> 488 及 Alexafluor<sup>®</sup> 594 山羊抗小鼠荧光抗体 IgG、Alexafluor<sup>®</sup> 488 鬼笔环肽、4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)(美国 CST 公司); DAB 显色液(武汉博士德生物); BCA 蛋白定量试剂盒(北京索莱宝科技生物); Trizol(Invitrogen); iQ<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix、CFX96 Touch<sup>™</sup> Detection System (Bio-Rad)。

PDGF-BB 溶液的配制: 将 50  $\mu$ g PDGF-BB 加入无菌 4 mmol/L HCl 1 mL 中, 配制浓度为 50  $\mu$ g/mL 的储备液, 冻存于 -20  $^{\circ}$ C 冰箱中, 工作浓度根据文献<sup>[8-10]</sup>及预实验设定为 10 ng/mL。

### 1.2 实 验 方 法

1.2.1 大鼠 PSMCs 的原代培养、鉴定及实验分组 参考文献<sup>[11-12]</sup>方法, 采用颈椎脱臼法处死 SD 大鼠, 无菌条件下分离肺动脉中膜层, 组织块贴壁于

培养瓶, 加入含 20% FBS 的 DMEM-F12 培养液, 置于 37  $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 孵箱, 细胞萌出后根据细胞形态、免疫组化检测血管平滑肌细胞表型标志基因  $\alpha$ -SMA 的表达, 鉴定 PSMCs。取第 3~7 代细胞用于实验。培养的细胞分为对照组和实验组。实验组细胞加入 PDGF-BB(10 ng/mL)诱导 24 h, 对照组细胞不加诱导剂培养 24 h。

1.2.2 荧光显微镜观察细胞微丝骨架 F-actin、微管骨架  $\alpha$ -tubulin 和  $\beta$ -tubulin 调整 PSMCs 密度为  $5 \times 10^4$  mL<sup>-1</sup>, 每孔 2 mL 接种于 18 mm 的玻璃爬片上培养, 按照实验分组处理 24 h 后进行免疫荧光染色。具体实验步骤如下: ①观察细胞骨架各成分的形态及构象: PBS 洗涤后, 以体积分数为 4% 多聚甲醛固定 12 min, PBS 再次洗涤, 0.3% Triton 通透 12 min, PBS 洗涤 3 次, 在不同爬片上分别加入 Alexafluor<sup>®</sup> 488 鬼笔环肽、小鼠抗  $\alpha$ -tubulin IgG 及兔抗  $\beta$ -tubulin IgG(抗体滴度均为 1:100)湿盒 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 洗涤后, 分别加入 Alexafluor<sup>®</sup> 594 山羊抗兔 IgG、Alexafluor<sup>®</sup> 594 山羊抗小鼠 IgG(抗体滴度为 1:300)避光孵育 1 h 后, 加入 DAPI(1:300)湿盒避光室温孵育 10 min。荧光显微镜观察并采图。②观察微管骨架  $\alpha$ -tubulin、 $\beta$ -tubulin 定位情况: 同上述步骤将细胞固定后, 小鼠抗  $\alpha$ -tubulin IgG、兔抗  $\beta$ -tubulin IgG(抗体滴度均为 1:100)湿盒 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 洗涤后, 加入 Alexafluor<sup>®</sup> 594 山羊抗兔 IgG、Alexafluor<sup>®</sup> 488 山羊抗小鼠 IgG(抗体滴度为 1:300)避光孵育 1 h 后, 加入 DAPI 湿盒避光室温孵育 10 min。观察并采图。

1.2.3 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测细胞  $\alpha$ -SMA 及 SM22 $\alpha$  基因的转录 调整 PSMCs 密度为  $5 \times 10^4$  mL<sup>-1</sup>, 每孔 2 mL 接种于 6 孔板, 按照实验分组处理 24 h 后, Trizol 法提取细胞总 RNA, 使用逆转录试剂盒按照 1  $\mu$ g RNA 体系将 mRNA 逆转录为 cDNA。使用 iQ<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix 定量试剂及 CFX96 Touch<sup>™</sup> Detection System 仪器检测 mRNA 的相对表达水平。扩增基因包括  $\alpha$ -SMA(NM\_031004)、SM22 $\alpha$ (NM\_031549)和内参基因 GAPDH(NM\_17701)。引物序列见表 1。引物序列由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成。反应条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95  $^{\circ}$ C 变性 10 s, 59  $^{\circ}$ C 退火 45 s, 40 个循环, 80  $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 扩增产物大小分别为:  $\alpha$ -SMA 产物为 149 bp, SM22 $\alpha$  产物为 244 bp, GAPDH 产物为 103 bp。使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法

表 1 PCR 引物序列  
Table 1 Sequences of primers used in this study

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
$\alpha$ -SMA	AGCGTGGCTATTTCCTTCGTT	AGCGTGGCTATTTCCTTCGTT
SM22 $\alpha$	TGGCTGAAGAATGGCGTGAT	TCCATCGTTCTTGGTCACGG
GAPDH	GGTGATGCTGGTGTGAGTAT	AGATGATGACCCTTTTGCCCC

计算 mRNA 的相对表达量。

### 1.2.4 Western blot 检测细胞 $\alpha$ -SMA 及 SM22 $\alpha$

蛋白的表达 调整 PSMCs 密度为  $5 \times 10^4$  mL<sup>-1</sup>, 每孔 2 mL 接种于 6 孔板, 按照实验分组处理 24 h 后, 使用 RIPA 裂解液提取总蛋白, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度后, 取 50  $\mu$ g 蛋白样品于 100 g/L SDS-PAGE 电泳进行蛋白分离, 通过电转移将蛋白印迹转到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上, 然后用 5% 牛奶封闭, 4  $^{\circ}$ C 过夜孵育兔抗  $\alpha$ -SMA、SM22 $\alpha$  IgG 及兔抗 GAPDH IgG (抗体滴度分别为 1:200、1:200、1:500), TBST 洗膜后, 37  $^{\circ}$ C 孵育山羊抗兔荧光二抗 (抗体滴度为 1:10 000)。用激光成像仪检测系统 (Odyssey) 进行曝光, 使用 Image J 软件测量条带的灰度值。以各组目的条带与 GAPDH 条带灰度值的比值为  $\alpha$ -SMA 及 SM22 $\alpha$  蛋白相对表达量。

### 1.2.5 CCK-8 法检测细胞增殖能力 调整

PSMCs 密度为  $3 \times 10^4$  mL<sup>-1</sup>, 每孔 100  $\mu$ L 接种于 96 孔板, 细胞贴壁生长至 70% 左右, 按照实验分组处理, 每组设 5 个复孔, 培养 24 h 后, 每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 试剂, 继续置于孵箱 1.5 h 后, 酶标仪测量 450 nm 处每孔的吸光度 ( $A_{450}$ ) 值, 计算细胞相对增殖率。细胞相对增殖率 (%) =  $A_{450}$  实验组 /  $A_{450}$  对照组  $\times 100\%$ 。

### 1.2.6 细胞划痕法检测细胞迁移能力

在 6 孔板底部划直线标记, 以  $5 \times 10^4$  mL<sup>-1</sup> 密度接种于 6 孔板, 贴壁生长至 80% 左右, 吸去原培养液, 使用 1 mL 枪头垂直于 6 孔板底部标记进行划痕, 保持每组划痕宽度一致, PBS 清洗划痕处脱落细胞, 按照实验分组处理, 分别在 0 h、12 h、24 h 时倒置相差显微镜下观察标记处划痕宽度 (mm) 并采图, 划痕宽度改变越大反映细胞迁移能力越强。

### 1.3 统计学方法

符合正态分布的实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组间比较采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠 PSMCs 原代培养及鉴定

组织块贴壁培养 4~6 d 后, 细胞从组织边缘萌出, 传代后细胞呈长梭形 (图 1A)。免疫组化示  $\alpha$ -SMA 阳性染色形成束状, 纵向平行排列, 贯穿细胞长轴 (图 1B), 约 95% 以上细胞为阳性, 表明细胞为 PSMCs。

### 2.2 PSMCs 微丝骨架 F-actin、微管骨架 $\alpha$ -tubulin、 $\beta$ -tubulin 的构象

荧光显微镜下 (图 2) 观察发现, 对照组 F-actin 纵向平行排列成束状, 贯穿平滑肌细胞的长轴, PDGF-BB 孵育诱导 24 h 后, 细胞微丝骨架 F-actin 出现排列不规则, 细胞边缘毛刺样表现。对照组  $\alpha$ -tubulin、 $\beta$ -tubulin 排列清晰可见, 荧光强度较强, 特别是细胞核周更强; PDGF-BB 孵育诱导 24 h 后,  $\alpha$ -tubulin、 $\beta$ -tubulin 荧光强度减弱, 排列不清晰。

通过免疫荧光染色观察微管骨架  $\alpha$ -tubulin、 $\beta$ -tubulin 的定位情况, 如图 3 所示, 对照组与实验组  $\alpha$ -tubulin、 $\beta$ -tubulin 均出现重叠现象, 表现为共定位。

### 2.3 PSMCs 细胞 $\alpha$ -SMA 及 SM22 $\alpha$ 基因及蛋白的表达

见图 4, 与对照组相比, PDGF-BB 孵育 PSMCs 24 h 后,  $\alpha$ -SMA 及 SM22 $\alpha$  mRNA 相对表达量降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),  $\alpha$ -SMA 及 SM22 $\alpha$  蛋白相对表达水平也降低 ( $P < 0.05$ )。表明 PDGF-BB 孵育后细胞从收缩型转变为合成型。

### 2.4 PSMCs 增殖能力

实验组细胞  $A_{450}$  值 ( $1.442 2 \pm 0.079 5$ ) 较对照组  $A_{450}$  值 ( $1.093 8 \pm 0.027 3$ ) 增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与对照组比较, 相对增殖率约为 132%。

### 2.5 PSMCs 迁移能力

如图 5、表 2 所示, PDGF-BB 诱导 12 h、24 h 后细胞均向划痕内迁移, 细胞迁移能力较同时点对照组增强 ( $P < 0.05$ )。

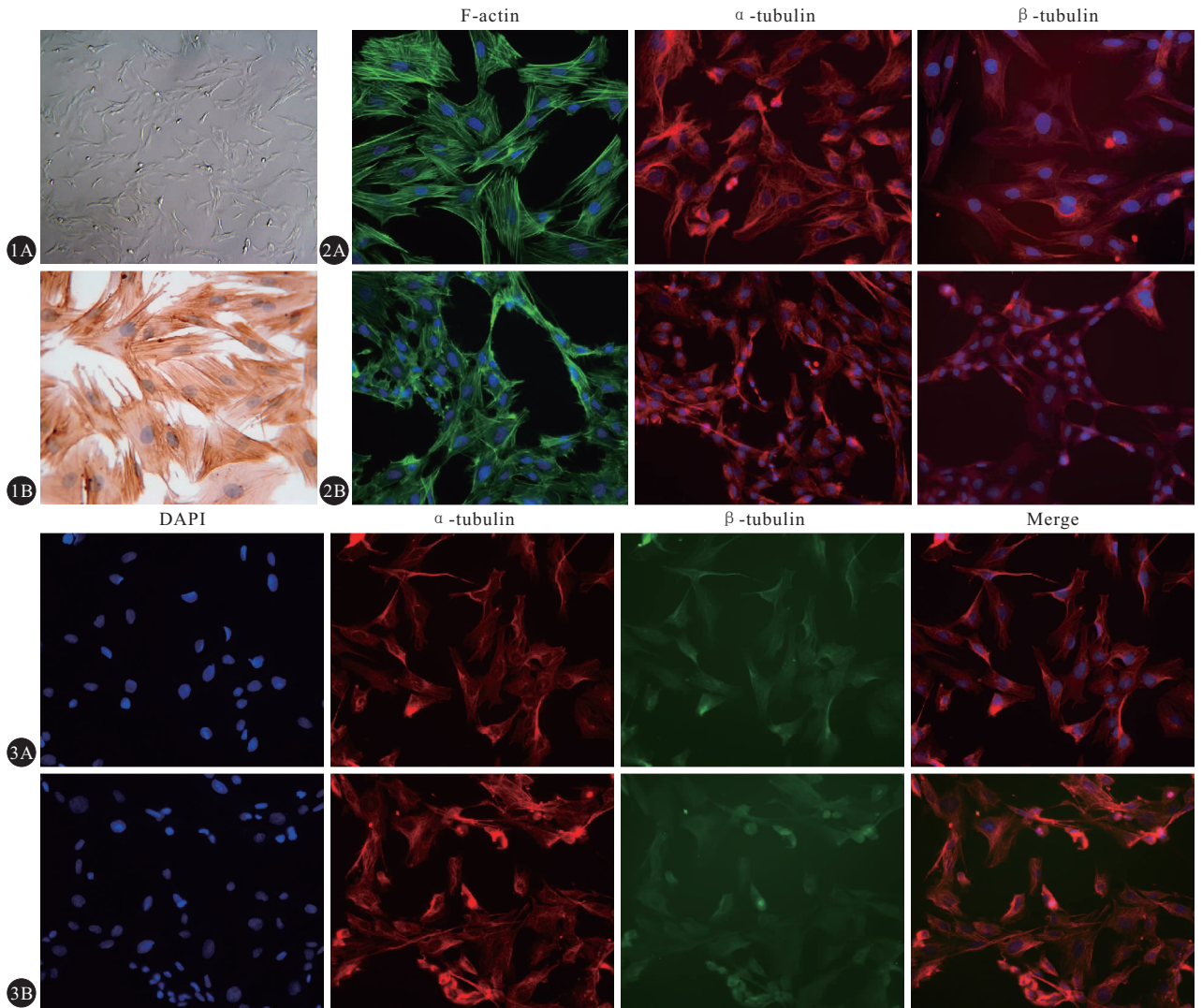


图 1 大鼠原代 PASMCs 生长(A, ×40)和  $\alpha$ -SMA 免疫组化染色鉴定(B, ×400) 图 2 荧光显微镜观察微丝骨架 F-actin, 微管骨架  $\alpha$ -tubulin,  $\beta$ -tubulin. ×400 图 3 荧光显微镜观察微管骨架  $\alpha$ -tubulin,  $\beta$ -tubulin 的定位情况. ×400

Fig 1 Growth of primary rat PASMCs (A, ×40), immunohistochemical staining of  $\alpha$ -SMA (B, ×400) Fig 2 The conformation of F-actin,  $\alpha$ -tubulin and  $\beta$ -tubulin were observed by fluorescence microscopy. ×400 Fig 3 The co-localization of  $\alpha$ -tubulin and  $\beta$ -tubulin was observed by fluorescence microscopy. ×400

2A, 3A: Control group; 2B, 3B: PDGF-BB group

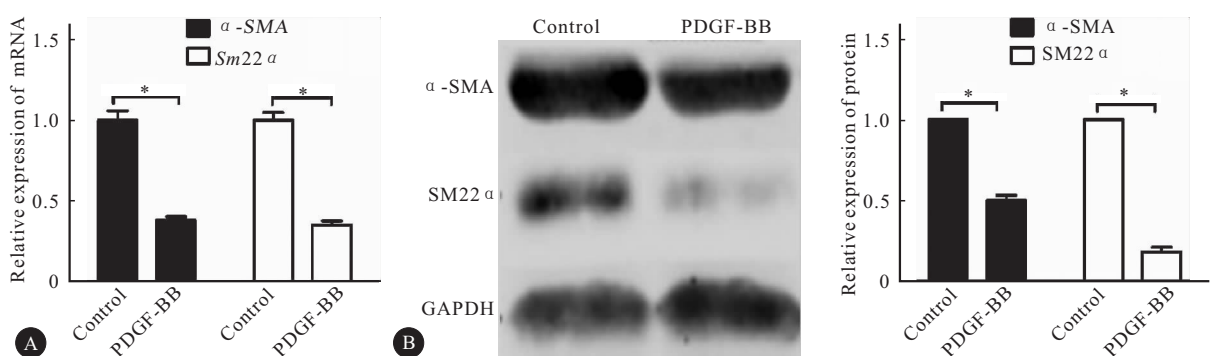


图 4  $\alpha$ -SMA 及 SM22 $\alpha$  mRNA 水平(A)及蛋白表达水平(B)的变化

Fig 4 RT-qPCR and Western blot were used to detect the expressions of  $\alpha$ -SMA and SM22 $\alpha$  mRNA (A) and protein (B)

\*  $P < 0.05$

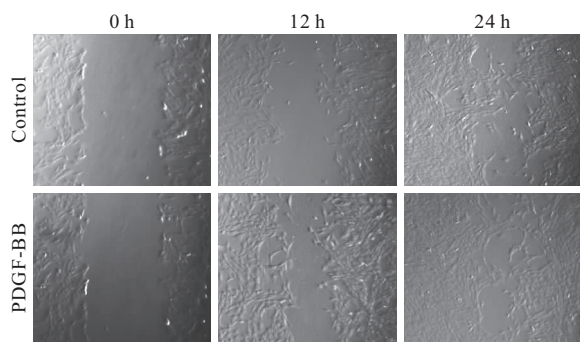


图 5 划痕实验观察 PDGF-BB 对 PSMCs 迁移能力的影响。×40  
Fig 5 The effect of PDGF-BB on the migration of PSMCs observed by cell scratches. ×40

A: Control group; B: PDGF-BB group

表 2 各组细胞划痕实验中划痕宽度/mm

Table 2 The cell migration ability measured by scratches/mm

Group	n	0 h	12 h	24 h
Control	5	2.00±0.02	1.34±0.03	0.78±0.05
PDGF-BB	5	2.02±0.02	1.00±0.03 <sup>#</sup>	0.51±0.04 <sup>#</sup>

<sup>#</sup>  $P < 0.05$ , vs. control group

### 3 讨论

在低氧刺激、血管活性物质、生长因子家族、机械力等各种因素的作用下, PSMCs 可以从收缩型转换为增殖活性较高的合成型<sup>[13-14]</sup>。PDGF-BB 是平滑肌细胞表型转化中涉及的重要因子之一, 可促进 PSMCs 从收缩型转换为合成型<sup>[15]</sup>, 在 PAH 发病机制中起着重要的作用<sup>[6-7, 11]</sup>。目前, PDGF-BB 诱导 PSMCs 表型转换的机制尚不完全清楚, 故本研究利用 PDGF-BB 诱导 PSMCs 发生表型转换, 探讨其表型转换可能的机制。

本研究结果显示, PDGF-BB 10 ng/L 诱导 PSMCs 24 h 后, 平滑肌细胞收缩型标志基因  $\alpha$ -SMA 及 SM22 $\alpha$  的转录和翻译水平均降低, 表明 PDGF-BB 孵育后 PSMCs 由收缩型向合成型转换, 与文献研究结果一致<sup>[8, 11, 15]</sup>。既往研究认为 PDGF-BB 激活了有丝分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路<sup>[16]</sup>、磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase, PI-3K) 通路<sup>[11]</sup>、Hippo/YAP 通路<sup>[15]</sup>、RhoA/ROCK 等信号通路, 引起 Krüppel 样因子 4 (Krüppel-like factor 4, KLF4)、转录因子 Sp1、HERP1、Elk-1 以及心肌素 myocardin 等细胞因子的表达变化, 从而影响血清反应因子 (SRF) 与顺式调控元件 CArG 的结合, 最终抑制表型转换相关基

因  $\alpha$ -SMA 及 SM22 $\alpha$  的表达, 调控平滑肌细胞发生表型转换<sup>[17-18]</sup>。

有研究<sup>[11, 19]</sup>报道, PDGF-BB 诱导 PSMCs 表型转换时微丝发生构象变化, 但未见细胞整体骨架构象变化的完整报道。细胞骨架是真核细胞内的蛋白纤维网络结构, 由微管 (microtubule, MT)、微丝 (microfilament, MF) 及中间纤维 (intermediate filament, IF) 组成, 作为物质运输、信号转导的重要枢纽, 参与细胞生命活动<sup>[20]</sup>。微管主要由  $\alpha$  及  $\beta$  微管蛋白 (tubulin) 组成, 通常  $\alpha$ -tubulin、 $\beta$ -tubulin 以二聚体形式存在, 并以头尾相连的方式聚合成微管蛋白原纤维, 13 根原纤维构成一个中空微管。微丝是由双股肌动蛋白链以螺旋形式构成的纤维 (F-actin), 其主要成分为球形肌动蛋白单体 (G-actin)。微丝可动态可逆的聚合及解聚, 出现重建现象, 调节细胞迁移、收缩等功能活动<sup>[21]</sup>。目前, 对于细胞骨架与表型转换间的关系仍未得到统一认识, 有学者认为 PDGF-BB 诱导 RhoA、PI3K/AKT 信号通路改变, 引起微丝骨架构象变化, 导致了平滑肌细胞收缩型标志蛋白表达减弱, 促使了细胞发生表型转换<sup>[11, 19, 22-23]</sup>; 也有学者认为平滑肌细胞骨架聚集是收缩型标志蛋白表达 SM22 $\alpha$  调节的结果<sup>[24]</sup>。本实验通过免疫荧光染色观察了 PDGF-BB 诱导细胞表型转换时细胞微管骨架和微丝骨架的构象变化。结果表明, PDGF-BB 诱导 PSMCs 24 h 后, 细胞微丝骨架 F-actin 的束状纵向平行排列消失, 出现排列不规则, 细胞边缘毛刺样表现, 细胞微管骨架  $\alpha$ -tubulin、 $\beta$ -tubulin 荧光强度减弱, 排列不清晰, 表明随着平滑肌细胞向合成型细胞转变时, 微丝及微管的聚集程度降低。但  $\alpha$ -tubulin、 $\beta$ -tubulin 仍表现为共定位, 说明  $\alpha$ -tubulin、 $\beta$ -tubulin 微管蛋白可能仍然以二聚体形式存在。此外, 本实验结果也表明, PDGF-BB 诱导后, 细胞增殖及迁移能力明显增强, 与文献结果一致<sup>[25-26]</sup>。我们推测, 由于细胞微管骨架聚集程度的降低, 有利于细胞有丝分裂时纺锤体的形成, 可能起到促进有丝分裂, 加快细胞周期进程的作用, 从而增强了 PSMCs 的增殖能力; 另外, 由于微丝 F-actin 的聚集程度降低, 可能加快细胞微丝重建, 进而增强细胞的迁移能力。

综上, PDGF-BB 诱导 PSMCs 表型转换时, 微丝、微管骨架均发生了构象变化, 这种改变可能影响了细胞的增殖及迁移能力。但是, 细胞骨架在 PDGF-BB 诱导平滑肌细胞表型转换过程中是否有决定性作用, 以及在表型转换过程中起主导作用的

是微丝还是微管等问题还有待进一步的研究与探讨。总的来说,本研究丰富了血管增殖性疾病的发病机制,为逆转肺动脉平滑肌细胞表型转换以及 PAH 等血管增殖性疾病药物的开发提供一定参考。

### 参 考 文 献

- [1] BEAMISH JA, HE P, KOTTKEMARCHANT K, *et al.* Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*, 2010, 16(5): 467-491.
- [2] 钱国清, 王良兴, 陈 婵, 等. 大鼠细小鼠肺动脉平滑肌细胞原代培养和鉴定方法的研究. *中国应用生理学杂志*, 2010, 26(1): 125-128.
- [3] TAJISIC T, MORRELL NW. Smooth muscle cell hypertrophy, proliferation, migration and apoptosis in pulmonary hypertension. *Compr Physiol*, 2011, 1(1): 295-317.
- [4] SHIMODA LA, LAURIE SS. Vascular remodeling in pulmonary hypertension. *J Mol Med (Berl)*, 2013, 91(3): 297-309.
- [5] FREDRIKSSON L, LI H, ERIKSSON U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004, 15(4): 197-204.
- [6] HASSOUN PM, MOUTHON L, BARBERÀ JA, *et al.* Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54(1 Suppl): 10-19.
- [7] SCHERMULY RT, DONY E, GHOFRANI HA, *et al.* Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest*, 2005, 115(10): 2811-2821.
- [8] CHEN S, LIU B, KONG D, *et al.* Atorvastatin calcium inhibits phenotypic modulation of PDGF-BB-induced VSMCs via down-regulation the Akt signaling pathway. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0122577 [2017-05-17]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122577>.
- [9] CHEN J, CUI X, QIAN Z, *et al.* Multi-omics analysis reveals regulators of the response to PDGF-BB treatment in pulmonary artery smooth muscle cells. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 781-796.
- [10] ZHAO Y, LV W, PIAO H, *et al.* Role of platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) in human pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *J Recept Signal Transduct Res*, 2014, 34(4): 254-260.
- [11] FAN Z, LI C, QIN C, *et al.* Role of the PI3K/AKT pathway in modulating cytoskeleton rearrangements and phenotype switching in rat pulmonary arterial vascular smooth muscle cells. *DNA Cell Biol*, 2014, 33(1): 12-20.
- [12] YIN Y, WU X, YANG Z, *et al.* The potential efficacy of R8-modified paclitaxel-loaded liposomes on pulmonary arterial hypertension. *Pharm Res*, 2013, 30(8): 2050-2062.
- [13] 孟立平, 郭航远, 季 政. 血管平滑肌细胞表型转化的影响因素及相关血管疾病. *中国心血管杂志*, 2015, 20(5): 385-388.
- [14] OWENS GK, KUMAR MS, WAMHOFF BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*, 2004, 84(3): 767-801.
- [15] XIE C, GUO Y, ZHU T, *et al.* Yap1 protein regulates vascular smooth muscle cell phenotypic switch by interaction with myocardin. *J Biol Chem*, 2012, 287(18): 14598-14605.
- [16] HUANG J, PARMACEK MS. Modulation of smooth muscle cell phenotype: the other side of the story. *Circ Res*, 2012, 111(6): 659-661.
- [17] WANG Z, WANG DZ, HOCKEMEYER D, *et al.* Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression. *Nature*, 2004, 428(6979): 185-189.
- [18] KAWAI-KOWASE K, OWENS GK. Multiple repressor pathways contribute to phenotypic switching of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 292(1): C59-C69.
- [19] KAPLANALBUQUERQUE N, GARAT C, DESSEVA C, *et al.* Platelet-derived growth factor-bb-mediated activation of akt suppresses smooth muscle-specific gene expression through inhibition of mitogen-activated protein kinase and redistribution of serum response factor. *J Biol Chem*, 2003, 278(41): 39830-39838.
- [20] FLETCHER DA, MULLINS RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 2010, 463(7280): 485-492.
- [21] TANG DD, GERLACH BD. The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration. *Respir Res*, 2017, 18(1): 54-66.
- [22] MACK CP, SOMLYO AV, HAUTMANN M, *et al.* Smooth muscle differentiation marker gene expression is regulated by RhoA-mediated actin polymerization. *J Biol Chem*, 2001, 276(1): 341-347.
- [23] HELLSTRAND P, ALBINSSON S. Stretch-dependent growth and differentiation in vascular smooth muscle: role of the actin cytoskeleton. *Can J Physiol Pharmacol*, 2005, 83(10): 869-875.
- [24] HAN M, DONG LH, ZHENG B, *et al.* Smooth muscle 22 alpha maintains the differentiated phenotype of vascular smooth muscle cells by inducing filamentous actin bundling. *Life Sci*, 2009, 84(13/14): 394-401.
- [25] SON JE, LEE E, JUNG SK, *et al.* Anthocyanidins, novel FAK inhibitors, attenuate PDGF-BB-induced aortic smooth muscle cell migration and neointima formation. *Cardiovasc Res*, 2014, 101(3): 503-512.
- [26] DONG L, WEN J, MIAO S, *et al.* Baicalin inhibits PDGF-BB-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation through suppressing PDGFR $\beta$ -ERK signaling and increase in p27 accumulation and prevents injury-induced neointimal hyperplasia. *Cell Res*, 2010, 20(11): 1252-1262.

(2018-01-03 收稿, 2018-03-09 修回)

编辑 沈 进