

# PKC、PKA信号通路在调控体外培养人牙囊细胞VEGF表达中的作用

陈学鹏<sup>1</sup> 段银钟<sup>2</sup> 钱红<sup>2</sup> 金作林<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>浙江大学医学院附属口腔医院正畸科, 杭州 310006; <sup>2</sup>第四军医大学口腔医学院正畸科, 西安 710032)

**摘要** 该文主要探讨PKC、PKA信号通路在调控体外培养人牙囊细胞VEGF表达中的作用。选取生长状态良好的第4代人牙囊细胞, 采用Real-time PCR和Western blot分别检测PKC激动剂(PMA)、PKC非特异性抑制剂(Gö6983)、PKC- $\alpha$ 和 $\gamma$ 特异性抑制剂(HBDDE)、PKC- $\beta$ 特异性抑制剂(LY333531)、PKA激动剂(dbcAMP)和抑制剂(KT5720)对体外培养人牙囊细胞VEGF mRNA和蛋白表达的影响。结果显示, PMA组和PMA+HBDDE组VEGF mRNA和蛋白的表达水平明显高于对照组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 而PMA+Gö6983组和PMA+LY333531组VEGF mRNA和蛋白的表达水平与对照组之间无明显差异( $P > 0.05$ )。dbcAMP组VEGF mRNA和蛋白的表达水平明显高于对照组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 而dbcAMP+KT5720组VEGF mRNA和蛋白的表达水平与对照组之间无明显差异( $P > 0.05$ )。这表明, PKC、PKA信号通路均参与了体外培养人牙囊细胞VEGF表达的调控, 其中PKC信号通路中参与调控的亚型是PKC- $\beta$ 。

**关键词** 牙囊细胞; 血管内皮生长因子; 蛋白激酶C; 蛋白激酶A

牙齿萌出是一个复杂且受到严密调控的过程, 在这一过程中, 牙囊细胞发挥了重要作用, 其主要原因是牙囊细胞能够分泌一系列牙齿萌出相关因子参与对牙齿萌出的调控<sup>[1]</sup>。研究表明, 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是牙囊细胞分泌的一种牙齿萌出相关因子, 与牙齿萌出过程中的骨改建密切相关<sup>[2-3]</sup>。但目前对于人牙囊细胞VEGF表达的调控机理尚不清楚。蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)、蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)信号通路是两条重要的细胞内信号转导通路, 它们在细胞代谢、基因表达等许多方面发挥重要的调控作用, 是机体细胞功能调节机制中的一个重要组成部分<sup>[4-6]</sup>。研究表明, PKC、PKA信号通路与一些细胞VEGF表达的调控相关<sup>[7-8]</sup>, 但PKC、PKA信号通路在人牙囊细胞VEGF表达中是否发挥调控作用尚未见相关报道, 本实验将对这一问题进行探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

DMEM培养液(美国Hyclone公司); 胎牛血清、胰蛋白酶(美国Gibco公司); 小鼠抗人波形丝蛋白单克隆抗体、兔抗人细胞角蛋白多克隆抗体、小鼠抗人

CD29单克隆抗体(丹麦Dako公司); 小鼠抗人CD34单克隆抗体、小鼠抗人Nestin单克隆抗体、小鼠抗人Stro-1单克隆抗体、小鼠抗人VEGF单克隆抗体、小鼠抗人GAPDH单克隆抗体(美国Santa Cruz公司); 辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG、羊抗小鼠IgG-FITC(美国Sigma公司); Trizol(美国Invitrogen公司); 逆转录试剂盒(美国Promega公司); Premix Ex Taq、Premix Taq(SYBR)(日本TaKaRa公司); PMA(美国Promega公司); Gö6983、LY333531、HBDDE、dbcAMP、KT5720(美国Calbiochem公司); 二甲基亚砜(DMSO, 上海东风试剂厂); CO<sub>2</sub>细胞培养箱(美国Forma Scientific公司); YJ-875型超净工作台(苏州净化设备厂); 倒置相差显微镜、荧光显微镜及照像系统(日本Olympus公司); 凝胶成像分析仪(英国Ultra-Violet Products Ltd公司); 核酸蛋白定量分析仪(德国Eppendorf); Mastercycler梯度PCR仪(德国Eppendorf公司); API PRISM 7300 Real-time PCR仪(美国Applied Biosystems公司)。

收稿日期: 2011-12-19 接受日期: 2012-02-29

国家自然科学基金(No.30400510)和浙江省教育厅科研计划(No.Y200909021)资助项目

\*通讯作者。Tel: 029-84776136, E-mail: Zuolinj@fmmu.edu.cn

## 1.2 人牙囊细胞的培养及鉴定

人牙囊细胞的原代培养参照我们以前报道的方法<sup>[9]</sup>进行。待原代培养的牙囊细胞生长至80%丰度时,用0.25%胰蛋白酶消化,1:2传代,通过差速传代法提纯牙囊细胞,大约传代2次即可纯化细胞。对所培养的细胞进行波形丝蛋白、角蛋白、CD29、CD34、Nestin、Stro-1等免疫细胞化学染色鉴定其细胞表型。

## 1.3 人牙囊细胞的预处理

取生长状态良好的第4代人牙囊细胞,消化后配成单细胞悬液,接种到75 cm<sup>2</sup>培养瓶中。当细胞处于对数生长期时,在孵育实验前1 d换新鲜的含5% FBS的DMEM培养液,孵育实验前5 h换成12 mL无血清的DMEM培养液。5 h后将培养的细胞按处理条件不同随机分成7组,每组3瓶,分为对照组(无血清的DMEM培养液孵育2 h)、PMA组(50 ng/mL PMA孵育2 h)、PMA+Gö6983组(1 μmol/L Gö6983预孵育1 h, 50 ng/mL PMA+1 μmol/L Gö6983共孵育2 h)、PMA+HBDDE组(100 μmol/L HBDDE预孵育1 h, 50 ng/mL PMA+100 μmol/L HBDDE共孵育2 h)、PMA+LY333531组(50 nmol/L LY333531预孵育1 h, 50 ng/mL PMA+50 nmol/L LY333531共孵育2 h)、dbcAMP组(50 μg/mL dbcAMP孵育2 h)、dbcAMP+KT5720组(1.1 μmol/L KT5720预孵育1 h, 50 μg/mL dbcAMP+1.1 μmol/L KT5720共孵育2 h)。上述各实验组的药物均配置在无血清的DMEM培养液中。各组细胞按要求孵育完成后终止培养。

## 1.4 Real-time PCR检测VEGF mRNA的表达

**1.4.1 总RNA提取和检测** 弃培养液,按Trizol试剂说明提取细胞总RNA,紫外分光光度计测定 $D_{260}/D_{280}$ 比值、总RNA浓度,1.5%琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性。将总RNA浓度统一稀释成1 μg/μL。

**1.4.2 逆转录** 根据Promega公司Reverse Transcription System操作说明进行,20 μL反应体系包括: Reverse Transcription 10×buffer 2 μL、dNTP Mixture 2 μL、Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor 0.5 μL、MgCl<sub>2</sub> 4 μL、Oligo(dT) 0.5 μg、总RNA 1 μg(1 μL)及AMV Reverse Transcriptase 15 U,加去RNase水至终体积20 μL。混合后,按以下条件进行逆转录反应: 42 °C 15 min, 95 °C 5 min, 4 °C 5 min,即完成cDNA第一链的合成。

**1.4.3 温度梯度PCR** *VEGF*(NCBI accession

number: M32977)及*GAPDH*(NCBI accession number: BC029618)的引物由大连宝生物公司合成。*VEGF*上游引物: 5'-CGA AAC CAT GAA CTT TCT GC-3',下游引物: 5'-CCT CAG TGG GCA CAC ACT CC-3',扩增片段为302 bp; *GAPDH*上游引物: 5'-GTC AGT GGT GGA CCT GAC CT-3',下游引物: 5'-TGA GCT TGA CAA AGT GGT CG-3',扩增片段为212 bp。将引物浓度调整到20 μmol/L,采用温度梯度PCR,确定最适退火温度。在PCR管中加入20 μL反应体系,依次为Premix Ex Taq 10 μL、cDNA模板0.5 μL、上下游引物各0.5 μL、去离子水8.5 μL。反应条件: 94 °C预变性5 min, 1个循环; 95 °C变性30 s, 50~70 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 30个循环; 最后72 °C延伸10 min, 至4 °C。根据胶上产物的亮度,选择58.8 °C为引物的最适退火温度。

**1.4.4 Real-time PCR反应** 上API PRISM 7300 Real-time PCR仪,以*GAPDH*为内参照(管家基因),每个体系作3个复孔。20 μL反应体系包括: cDNA 0.5 μL、ROX 0.4 μL、Premix Taq(SYBR) 10 μL、上下游引物各0.4 μL、去离子水8.3 μL。反应条件: 95 °C预变性10 s, 1个循环; 95 °C变性5 s, 58.8 °C退火31 s, 72 °C延伸45 s, 40个循环。

**1.4.5 结果与计算** 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行数据分析。Ct值的含义为每个反应管内荧光强度达到设定的阈值时所经历的循环数。 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{VEGF} - Ct_{GAPDH})_{\text{实验组}} - (Ct_{VEGF} - Ct_{GAPDH})_{\text{对照组}}$ 。RGE(relative gene expression) =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示的是实验组*VEGF*基因的表达相对于对照组的变化倍数。

## 1.5 Western blot检测人牙囊细胞VEGF蛋白的表达

用冰冷的PBS洗涤细胞3次,加细胞裂解液,在冰上将细胞迅速刮下,冰浴条件下超声破碎细胞,离心后吸出上清液体,用Bradford方法进行蛋白质浓度测定。

取40 μg细胞总蛋白与加样缓冲液混匀,热变性后,点样于10% SDS-PAGE胶中电泳,转移至PVDF膜上。封闭液室温封闭1 h后,用含小鼠抗人VEGF单克隆抗体(1:800稀释)的PBS温育1 h, PBS洗膜,含辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠二抗(1:2 000稀释)PBS温育1 h,洗膜后, ECL发光自显影,洗片显带。同一张膜洗脱后,用小鼠抗人*GAPDH*单克隆抗体(1:800稀释)和辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠二抗(1:2 000稀释)重新孵育,发光自显影,洗片显带作为内对照。在成像分析仪系统测定各条带灰度值,以

VEGF/GAPDH的灰度比值表示VEGF蛋白的相对表达水平。

### 1.6 统计学方法

定量实验结果的所有数据均以均数±标准差表示,采用统计软件包SPSS15.0进行统计分析,与对照组之间差异的比较采用独立样本 $t$ 检验, $P<0.05$ 有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 人牙囊细胞的培养及鉴定

人牙囊细胞的培养及鉴定见图1。人牙囊细胞呈典型的成纤维样细胞形态,利用差速消化法可排除上皮细胞污染,达到纯化牙囊细胞的目的。免疫细胞化学染色显示所培养的细胞抗波形丝蛋白染色阳性,抗角蛋白染色阴性,表明细胞来源于外胚间充质。抗CD29、Nestin、Stro-1染色阳性,抗CD34染色阴性,表明所培养的细胞具有间充质干细胞的某些特性。

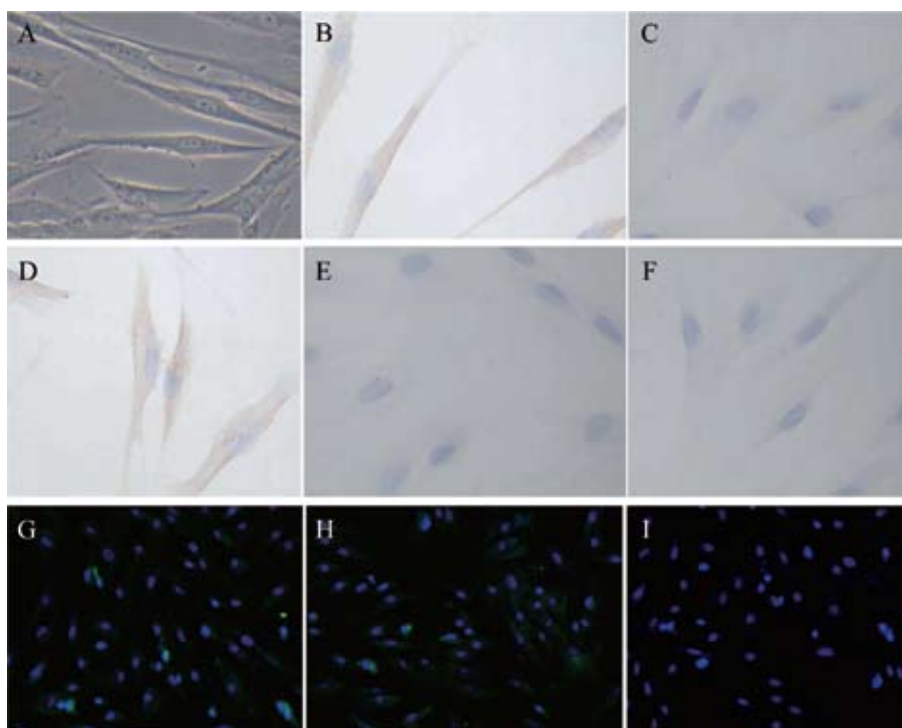
### 2.2 各处理组人牙囊细胞VEGF mRNA表达水平的比较

温度梯度PCR电泳图见图2。

如表1所示,PMA组、PMA+HBDDE组及dbcAMP组VEGF mRNA的表达水平明显高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。而PMA+Gö6983组、PMA+LY333531组及dbcAMP+KT5720组VEGF mRNA的表达水平与对照组之间无明显差异( $P>0.05$ )。

### 2.3 各处理组人牙囊细胞VEGF蛋白表达水平的比较

各组人牙囊细胞VEGF蛋白电泳结果见图3,各组VEGF蛋白相对表达水平见图4。与对照组相比,PMA组、PMA+HBDDE组及dbcAMP组VEGF蛋白的表达水平明显升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。PMA+Gö6983组、PMA+LY333531组及dbcAMP+KT5720组VEGF蛋白的表达水平与对照组之间无明显差异( $P>0.05$ )。



A: 第4代人牙囊细胞(100×); B: 第4代人牙囊细胞抗波形丝蛋白染色阳性(400×); C: 第4代人牙囊细胞抗角蛋白染色阴性(400×); D: 第4代人牙囊细胞抗CD29染色阳性(400×); E: 第4代人牙囊细胞抗CD34染色阴性(400×); F: 阴性对照(400×); G: 第4代人牙囊细胞抗Nestin染色阳性; H: 第4代人牙囊细胞抗Stro-1染色阳性; I: 阴性对照。

A: human dental follicle cells (HDFC) in the fourth passage (100×); B: positive immunostaining for vimentin in the fourth passage HDFC (400×); C: negative immunostaining for keratin in the fourth passage HDFC (400×); D: positive immunostaining for CD29 in the fourth passage HDFC (400×); E: negative immunostaining for CD34 in the fourth passage HDFC (400×); F: the negative control (400×); G: positive immunostaining for Nestin in the fourth passage HDFC; H: positive immunostaining for Stro-1 in the fourth passage HDFC; I: the negative control.

图1 人牙囊细胞的培养及鉴定

Fig.1 Culture and identification of human dental follicle cells

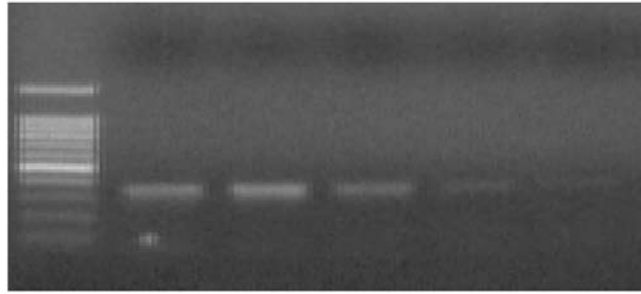
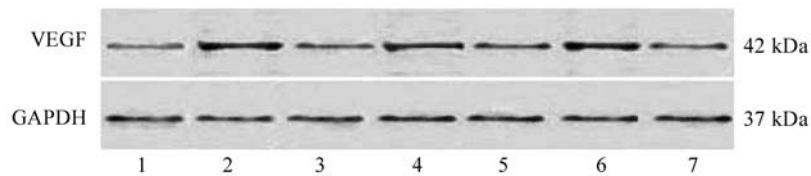


图2 温度梯度PCR

Fig.2 Temperature gradient PCR



1: 对照组; 2: PMA组; 3: PMA+Gö6983组; 4: PMA+HBDDE组; 5: PMA+LY333531组; 6: dbcAMP组; 7: dbcAMP+KT5720组。

1: control group; 2: PMA group; 3: PMA+Gö6983 group; 4: PMA+HBDDE group; 5: PMA+LY333531 group; 6: dbcAMP group; 7: dbcAMP+KT5720 group.

图3 Western blot分析VEGF蛋白质水平

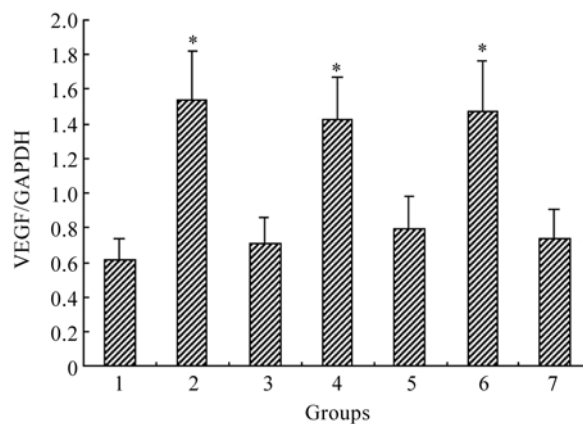
Fig.3 Analysis of VEGF protein levels by Western blot

表1 PKC(PKA)激动剂和抑制剂对体外培养人牙囊细胞VEGF mRNA表达的影响

Table 1 Effect of PKC(PKA) activator or inhibitor on VEGF mRNA expression in cultured human dental follicle cells

组别	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	RGE
Groups	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	RGE
Control	15.44±0.25	0±0	1±0
PMA	14.16±0.06	-1.28±0.25	2.45±0.41*
PMA+Gö6983	15.28±0.17	-0.16±0.17	1.12±0.13
PMA+HBDDE	14.20±0.08	-1.24±0.20	2.37±0.31*
PMA+LY333531	15.19±0.16	-0.25±0.21	1.19±0.17
dbcAMP	14.41±0.21	-1.03±0.21	2.05±0.31*
dbcAMP+KT5720	15.25±0.16	-0.19±0.17	1.15±0.14

\* $P < 0.05$ .



1: 对照组; 2: PMA组; 3: PMA+Gö6983组; 4: PMA+HBDDE组; 5: PMA+LY333531组; 6: dbcAMP组; 7: dbcAMP+KT5720组。\* $P < 0.05$ 。

1: control group; 2: PMA group; 3: PMA+Gö6983 group; 4: PMA+HBDDE group; 5: PMA+LY333531 group; 6: dbcAMP group; 7: dbcAMP+KT5720 group. \* $P < 0.05$ .

图4 PKC(PKA)激动剂和抑制剂对体外培养人牙囊细胞VEGF蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of PKC(PKA) activator or inhibitor on VEGF protein expression in cultured human dental follicle cells

### 3 讨论

牙齿萌出中的骨改建需要牙囊细胞、成骨细胞、破骨细胞及细胞外基质共同参与, 并受多种牙齿萌出相关因子的调控。在这一过程中, 牙囊细胞的作用尤为关键, 它通过合成并分泌一系列牙齿萌出相关因子, 精确调控成骨细胞、破骨细胞分化及发挥功能, 因而在牙齿萌出通道形成中发挥了不可替代的作用。VEGF是新生血管形成的中心调控因子, 具有改变细胞外基质、增加血管通透性、促进血管内皮细胞增殖和新生血管形成、参与骨形成和代谢等作用<sup>[10-11]</sup>。研究表明, 牙囊细胞能够合成并分泌VEGF<sup>[2,9]</sup>, 且VEGF参与牙齿萌出过程中的骨改建, 是一种重要的牙齿萌出相关因子, 其在牙齿萌出中的作用主要包括: (1)促进成骨细胞的增殖和分化; (2)趋化单核细胞进入牙囊, 并与集落刺激因子-1(CSF-1)协同作用, 促进破骨细胞的形成和分化; (3)与其它牙齿萌出相关因子相互作用, 构成错综复杂的分子调控网络, 共同调控牙齿的萌出<sup>[1-3,12]</sup>。

VEGF是牙齿萌出分子调控网络的重要一环, 因此阐明人牙囊细胞VEGF表达的调控机理对于深入认识牙齿萌出的分子调控机制具有重要意义。但目前对于人牙囊细胞VEGF表达的调控机理尚不清楚。PKC、PKA是两条重要的细胞内信号转导通路, 它们在机体细胞功能调节方面发挥重要作用, 其中之一就是调控下游基因的表达。有研究证实, PKC、PKA信号通路参与一些细胞VEGF表达的调控, 因此, 有理由推测人牙囊细胞VEGF表达的调控可能与这两条信号通路有关。本研究采用SYBR Green I实时定量PCR及Western blot分别检测了PKC、PKA两条信号通路各自的激动剂和抑制剂对人牙囊细胞VEGF mRNA和蛋白表达的影响。SYBR Green I染料法是一种简便、性价比较高的实时监测方法, 常常被用于进行RNA表达相对定量以及DNA定量研究中。为了排除非特异性扩增, 本研究进行了熔解曲线分析, VEGF、GAPDH的熔解曲线均只有一个峰, 基本排除非特异性扩增对实验结果的干扰。

PMA是一种结构与二酰基甘油(DAG)类似的多环类物质, 在低浓度下即可模拟DAG活化PKC。本研究发现, 使用PMA后人牙囊细胞VEGF基因和蛋白的表达均较对照组明显增强, 差异有统计学意义。然而PMA促进牙囊细胞VEGF表达的作用被PKC非特异性抑制剂Gö6983(可以阻断PKC- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 等亚

型)抑制, 这表明PKC信号通路参与对人牙囊细胞VEGF表达的调控。这与一些学者在其它细胞中的研究结果相符<sup>[7,13]</sup>。Hoshi等<sup>[7]</sup>发现PKC信号通路激活后, 促进AP-1转录因子复合体的形成, 而AP-1可与VEGF基因转录启动子区域4个AP-1结合位点结合, 促进VEGF的转录。由于PKC家族有多个亚型, 为确定究竟是哪个(些)亚型在调控中真正发挥作用, 本研究还观察了另外两种PKC抑制剂的作用, 结果发现PKC- $\alpha$ 和 $\gamma$ 亚型的特异性抑制剂HBDDE不能抑制PMA促进人牙囊细胞VEGF表达的作用, 而PKC- $\beta$ 亚型的特异性抑制剂LY333531则能抑制PMA的作用(其作用效果与Gö6983基本相当), 这证明PKC信号通路激活后是PKC- $\beta$ 亚型参与对牙囊细胞VEGF表达的调控, 而不是PKC- $\alpha$ 和 $\gamma$ 亚型。Ohshiro等<sup>[14]</sup>研究发现, PKC- $\beta$ 基因敲除的糖尿病小鼠VEGF表达水平明显低于野生型糖尿病小鼠, 这同样说明PKC家族中是PKC- $\beta$ 亚型参与高糖诱导的VEGF表达调控。

Valdehita等<sup>[8]</sup>发现血管活性肠肽(VIP)能够通过cAMP/PKA信号通路上调人乳腺癌细胞株VEGF的表达。Jeon等<sup>[15]</sup>报道PKA信号通路激活后, 通过磷酸化cAMP反应元件结合蛋白(CREB)进而启动VEGF基因的转录。这表明可以通过PKA信号通路调控VEGF表达。本研究观察了PKA激动剂和抑制剂对体外培养人牙囊细胞VEGF基因和蛋白表达的影响。二丁酰环腺苷酸 dbcAMP是cAMP的衍生物, 与cAMP具有相似的生理功能和作用机制, 能够激活PKA信号通路。体外培养人牙囊细胞与dbcAMP (50  $\mu\text{g/mL}$ )孵育2 h可使VEGF基因和蛋白的表达水平明显升高, 与对照组之间的差异有统计学意义。KT5720是PKA的一种可逆性竞争抑制剂, 它能与PKA的R亚基竞争性结合C亚基, 抑制PKA的催化活性。本研究发现, KT5720能够抑制dbcAMP促进人牙囊细胞VEGF表达的作用, 这表明PKA信号通路参与对人牙囊细胞VEGF表达的调控。

本研究表明, PKC、PKA信号通路均参与人牙囊细胞VEGF表达的调控, 其中, PKC信号通路中参与调控的亚型是PKC- $\beta$ 。至于是否还有其它信号转导通路在人牙囊细胞VEGF表达中发挥调控作用, 尚有待于进一步研究。

### 参考文献 (References)

- 1 Wise GE. Cellular and molecular basis of tooth eruption. *Orthod*

- Craniofac Res 2009; 12(2): 67-73.
- 2 Wise GE, Yao S. Expression of vascular endothelial growth factor in the dental follicle. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2003; 13(2/3/4): 173-80.
- 3 Yao S, Liu D, Pan F, Wise GE. Effect of vascular endothelial growth factor on RANK gene expression in osteoclast precursors and on osteoclastogenesis. *Arch Oral Biol* 2006; 51(7): 596-602.
- 4 Battaini F, Mochly-Rosen D. Happy birthday protein kinase C: Past, present and future of a superfamily. *Pharmacol Res* 2007; 55(6): 461-6.
- 5 Reyland ME. Protein kinase C isoforms: Multi-functional regulators of cell life and death. *Front Biosci* 2009; 14: 2386-99.
- 6 Enns LC, Ladiges W. Protein kinase A signaling as an anti-aging target. *Ageing Res Rev* 2010; 9(3): 269-72.
- 7 Hoshi S, Nomoto K, Kuromitsu J, Tomaris S, Nagata M. High Glucose induced VEGF expression via PKC and ERK in glomerular podocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290(1): 177-84.
- 8 Valdehita A, Carmena MJ, Collado B, Prieto JC, Bajo AM. Vasoactive intestinal peptide (VIP) increases vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and secretion in human breast cancer cells. *Regul Pept* 2007; 144(1/2/3): 101-8.
- 9 Chen XP, Qian H, Wu JJ, Ma XW, Gu ZX, Sun HY, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor in cultured human dental follicle cells and its biological roles. *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28(7): 985-93.
- 10 Allori AC, Sailon AM, Warren SM. Biological basis of bone formation, remodeling, and repair-part I: Biochemical signaling molecules. *Tissue Eng Part B Rev* 2008; 14(3): 259-73.
- 11 Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res* 2009; 153(2): 347-58.
- 12 Devescovi V, Leonardi E, Ciapetti G, Cenni E. Growth factors in bone repair. *Chir Organi Mov* 2008; 92(3): 161-8.
- 13 Bian ZM, Elnor SG, Elnor VM. Regulation of VEGF mRNA expression and protein secretion by TGF-beta2 in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 2007; 84(5): 812-22.
- 14 Ohshiro Y, Ma RC, Yasuda Y, Hiraoka-Yamamoto J, Clermont AC, Isshiki K, *et al.* Reduction of diabetes-induced oxidative stress, fibrotic cytokine expression, and renal dysfunction in protein kinase Cbeta-null mice. *Diabetes* 2006; 55(11): 3112-20.
- 15 Jeon SH, Chae BC, Kim HA, Seo GY, Seo DW, Chun GT, *et al.* The PKA/CREB pathway is closely involved in VEGF expression in mouse macrophages. *Mol Cells* 2007; 23(1): 23-9.

## Effect of Protein Kinase C (PKC) and Protein Kinase A (PKA) Signaling Pathways on the Expression of VEGF in Cultured Human Dental Follicle Cells

Chen Xuepeng<sup>1</sup>, Duan Yinzhong<sup>2</sup>, Qian Hong<sup>2</sup>, Jin Zuolin<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Orthodontics, Stomatological Hospital Affiliated to Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310006, China; <sup>2</sup>Department of Orthodontics, College of Stomatology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

**Abstract** The aim of this paper is to study whether PKC and PKA signaling pathways are involved in regulation of expression of VEGF in cultured human dental follicle cells (HDFC). HDFC in good status were incubated with PMA (PKC activator), PMA+Gö6983 (PKC non-specific inhibitor), PMA+HBDDE (PKC- $\alpha$  and  $\gamma$  specific inhibitor), PMA+LY333531 (PKC- $\beta$  specific inhibitor), dbcAMP (PKA activator), dbcAMP+KT5720 (PKA inhibitor) for 2 h, respectively. Real-time PCR and Western blot were used to detect the gene and protein expression of VEGF in these groups respectively. The results showed that the gene and protein expression of VEGF in the group with PMA alone or the group with PMA+HBDDE were significantly higher than that of the control ( $P<0.05$ ). There was no significant difference in the gene and protein expression of VEGF between the group with PMA+Gö6983 (or the group with PMA+LY333531) and the control ( $P>0.05$ ). dbcAMP can up-regulate the gene and protein expression of VEGF in cultured HDFC, while this effect can be inhibited by KT5720. In conclusion, these findings suggest that the expression of VEGF in cultured HDFC can be regulated via PKC and PKA signaling pathways. In PKC signaling pathway, PKC- $\beta$  may be the isoform that regulates VEGF expression in cultured HDFC.

**Key words** dental follicle cell; vascular endothelial growth factor; protein kinase C; protein kinase A

Received: December 19, 2011 Accepted: February 29, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30400510) and the Scientific Research Fund of Zhejiang Provincial Education Department (No.Y200909021)

\*Corresponding author. Tel: 86-29-84776136, E-mail: Zuolinj@fmmu.edu.cn