

P85 磷酸肌醇-3 激酶-蛋白激酶 C- ζ 复合物对血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 激活平滑肌细胞 p70 核蛋白体 S6 激酶的调节作用

廖端芳¹, Berk BC², 关永源

(中山医科大学药理学教研室, 广州 510089; 1. 衡阳医学院心肺药理研究室, 衡阳 421001;

2. Center for Cardiovascular Research, University of Rochester Medical Center, Rochester, New York 14642, USA)

[主题词] 肌, 平滑, 血管; 磷酸肌醇-3 激酶; 血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$; 蛋白激酶 C; p70 核蛋白体 S6 激酶

[摘要] 作者以前的研究发现蛋白激酶 C- ζ 介导血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 经 Ras-MEK 途径激活血管平滑肌细胞丝裂素活化的蛋白激酶 MAPK 或细胞外信号调节激酶 ERK1/2。本文研究了 P85 磷酸肌醇-3 激酶-蛋白激酶 C- ζ 复合物核蛋白体激酶 p70S6 激酶活性的调节作用及其信号传递途径。Western Blot 分析显示正常培养的血管平滑肌细胞表达 p70S6 激酶、p85 磷酸肌醇-3 激酶和蛋白激酶 C- ζ 。100 nmol 血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 和 10 $\mu\text{g/L}$ 血小板源生长因子刺激并不影响 p70S6 激酶、p85 磷酸肌醇-3 激酶和蛋白激酶 C- ζ 表达。p70S6 激酶磷酸转移酶活性分析发现血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 与血管平滑肌细胞作用 5 min 即开始激活 p70S6 激酶, 20 min 达高峰, 并呈剂量依赖性。磷酸肌醇-3 激酶抑制剂 wortmannin (10 nmol)、蛋白激酶 C- ζ 抑制剂 Pseudo Z (50 μmol) 和 p70S6 激酶抑制剂 rapamycin (100 $\mu\text{g/L}$) 均可明显阻断血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 诱导的 p70S6 激酶激活。有趣的是, 我们观察到 p85 磷酸肌醇-3 激酶和蛋白激酶 C- ζ 受血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 和血小板源生长因子刺激后均向 Ras 转位并与其结合, 抗 Ras 抗体可将 p85 磷酸肌醇-3 激酶或蛋白激酶 C- ζ 混合沉淀, 抗 p85 磷酸肌醇-3 激酶抗体亦可使蛋白激酶 C- ζ 沉淀下来。提示 Ras、p85 磷酸肌醇-3 激酶和蛋白激酶 C- ζ 三种蛋白结合在一起形成一个功能复合体, Wortmannin 和 Pseudo Z 可阻断这个功能复合体的形成。此外, 血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 和血小板源生长因子与血管平滑肌细胞孵育 24 h 明显促进细胞增殖, 氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入率增加约 50%, Wortmannin 和非特异性蛋白激酶 C 抑制剂 Chelerythine 均抑制血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 和血小板源生长因子对血管平滑肌细胞的促增殖作用。综合上述结果, 说明血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 通过 Ras-磷酸肌醇-3 激酶-蛋白激酶 C- ζ 途径激活 p70S6 激酶和刺激血管平滑肌细胞增殖, p85 磷酸肌醇-3 激酶-蛋白激酶 C- ζ 复合物在其中起重要调节作用。

[中图分类号] Q55

[文献标识码] A

Phosphatidylinositol 3-kinase/ Protein Kinase C- ζ Complex Regulates Angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$ Activation of p70 Ribosomal S6 Kinase in Vascular Smooth Muscle Cells

LIAO Duarr Fang¹, Bradford C BERK², and GUAN Yong-Yuan³

(3. Department of Pharmacology, Sun Yat-sen University of Medicine Sciences, Guangzhou 510089, 1. Division of Cardiopulmonary Pharmacology, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China. 2. Center for Cardiovascular Research, University of Rochester Medical Center, Rochester, New York 14642, USA)

MeSH Angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$; Phosphotransferases, Phosphatidylinositol; Protein Kinase C; Phosphotransferases, RNA Ribosomal S6; Muscle, Smooth, Vascular

ABSTRACT **Aim** To investigate the effects of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase C- ζ (PKC- ζ) complex on regulating angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$ activation of p70 ribosomal S6 kinase (p70S6K) in vascular smooth muscle cells (VSMC).

Methods VSMC isolated from 200 g to 250 g male Sprague-Dawley rats were cultured to 70% to 80% confluence and were growth-arrested by incubation in 0.1% calf serum/DMEM for 48 h before use. Both ^3H -TdR incorporation and cell counting were used to estimate the proliferation of VSMC. Western blot, immunoprecipitation and immunoblot analyses were performed to evaluate the $\text{Ang} \text{ II}$ -stimulated kinase expression and Ras-PI3K-PKC- ζ association of VSMC. Phosphotransferase assay by using S6 peptide as substrate was employed to measure the p70 S6K activity.

Results VSMC expressed p85PI3K, PKC- ζ and p70S6K; $\text{Ang} \text{ II}$ and PDGF stimulation did not affect the p85PI3K, PKC- ζ and p70S6K expression. 2) 100 nmol $\text{Ang} \text{ II}$

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题(39970847)

[作者简介] 廖端芳, 男, 湖南省沅江市人, 1959 年出生, 博士研究生。关永源, 男, 广东省人, 中山医科大学药理学教授, 博士研究生导师, 国务院学位委员会药学科评议组成员, 《中国药理学通报》常务编委, 中国药理学会心血管专业委员会常务委员。

treatment obviously stimulated p70S6K activity of VSMC at 5 min with peak at 20 min. PI3K inhibitor wortmannin (10 nmol) and pseudosubstrate of PKC- ζ pseudo Z (50 μ mol) blocked Ang ① activation of p70S6K. 3) In response to Ang ① , PI3K translocated to the membrane and associated with Ras as shown by PI3K coprecipitation with Ras antibody. Furthermore, both anti-Ras and anti-PI3K antibodies could precipitate PKC- ζ , suggesting that Ang ① treatment resulted in formation of Ras-PI3K-PKC- ζ complex. Wortmannin and pseudo Z significantly blocked the complex formation. 4) In addition, 100 nmol Ang ① and 10 ng/mL PDGF incubation with VSMC for 24 hours stimulated VSMC proliferation, which could be abrogated by wortmannin and nonspecific PKC inhibitor chelerythrine. **Conclusion** This findings demonstrate that Ang ① stimulation of p70S6K occurs via a pathway of Ras-PI3K-PKC- ζ and p85PI3K-PKC- ζ complex play an important role in this procedure

血管紧张素 ① (angiotensin ① , Ang ①) 在血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 增殖和肥大过程中起重要作用^[1]。文献[2-4]报道 Ang ① 增加细胞内钙离子浓度、激活蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)、活化一系列由生长因子诱导的信号传导通路, 如激活蛋白酪氨酸激酶、激活丝裂素活化的蛋白激酶 (mitogenic activated protein kinase, MAPK) 或细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinases 1/2, ERK1/2) 等等。P70 核蛋白体激酶 (p70 ribosomal S6 kinase, p70S6 激酶) 系丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员。当细胞参与对生长因子、分裂等早期反应时, p70S6 激酶被激活。文献报道在球囊损伤的大鼠主动脉和心衰心脏, p70S6 激酶被迅速激活^[4,5]。P70S6K 通过调节 mRNA 的翻译过程实现对细胞生长的调控^[6,7], p70S6 激酶的活化受其上游磷脂肌醇-3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 的调节^[8]。文献[9,10]报道 Ang ① 可刺激培养的 VSMC 和心肌细胞 p70S6 激酶活性, 然而其信号传导途径并不清楚, 推测与 Ras-Raf-MEK-ERK1/2 有关。作者以前的工作显示 Raf 在 Ang ① 激活 ERK1/2 过程中并不起主要作用, 而由 PKC- ζ 取而代之^[11,12]。Saward 等^[13]报道 1 μ mol Ang ① 与 VSMC 作用 15 min 可激活 PI3K, 使 PI3K p85 亚单位酪氨酸磷酸化并发生膜转位。近年不少文献显示 PKC- ζ 是 PI3K 的下游效应蛋白, 同时也参与 p70S6 激酶的调节, 其活性受 PI3K 代谢产物 PtdIns(3,5)P(3) 的调控^[14-16]。因而, 我们推测 PKC- ζ 亦可能介导 Ang ① 激活 p70S6 激酶, 并提出 PI3K-PKC- ζ 联合调控 p70S6 激酶活性的工作假设。

1 材料与方法

1.1 材料

抗 H-Ras 抗体和抗 PKC- ζ 抗体分别购自 Boehringer Mannheim 和 Santa Cruz 公司, 抗 p70S6 激酶抗体和抗 p85PI3K 抗体购自 Upstate Biotechnology Inc 公司, S6 肽由加拿大 Kinetek Pharmaceuticals Inc

公司赠送, [$r\text{-}^{32}\text{P}$]ATP 为 Dupont 公司产品, Protein A-agarose 为 Life Technologies Inc 公司产品, wortmannin、chelerythrine 和 rapamycin 为 Sigma 公司产品, PKC- ζ 假性底物购自 Calbiochem 公司 (La Jolla, CA)。

1.2 血管平滑肌细胞培养

参照文献[17], 从 200~250 g 雄性 Sprague Dawley 大鼠胸主动脉分离出 VSMC, 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基培养。取 5~13 代 VSMC 于 100 cm 培养皿中培养至 70%~80% 融合, 用含 0.1% 小牛血清的 DMEM 培养基继续培养 48 h 使 VSMC 处于静止状态, 然后用 Ang ① 、PDGF 等刺激 20 min。PI3K 的抑制剂 Wortmannin、非特异性 PKC-抑制剂 Chelerythrine、PKC- ζ 抑制剂 (PKC- ζ 假性底物) Pseudo Z 和 p70S6 激酶抑制剂 rapamycin 于 Ang ① 、PDGF 之前 10 min 加入。

1.3 细胞蛋白提取与浓度测定

血管紧张素 ① (Ang ①)、PDGF 作用后的 VSMC 用磷酸缓冲液洗三次, 每皿加 1.0 mL TME 缓冲液 (10 mmol Tris, 5 mmol MgCl_2 , 1 mmol EDTA, 25 mmol NaF, pH 7.5; 临用前加 100 μ mol Na_3VO_4 , 20 mg/L leupeptin, 1 mg/L pepstatin A, 4 mg/L aprotinin, 1 mmol DTT) 裂解细胞。速冻, 冰浴上缓慢复苏, 刮下细胞, 冰浴上用超声粉碎细胞, 15 000g 离心 30 min, 取上清液, 按 Bradford 蛋白测定盒说明书测定蛋白浓度, 样品贮存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 待用。

1.4 p70S6 激酶活性测定

参照文献[18], 取抗 p70S6 激酶抗体免疫沉淀物 (50% bead slurry) 5 μL , 加 30 μL 反应缓冲液 (25 mmol β -glycerophosphate, 20 mmol MOPS, pH 7.2, 5 mmol EGTA, 2 mmol EDTA, 20 mmol MgCl_2 , 1 mmol Na_3VO_4 , 0.25 mmol dithiothreitol), 加 4 μg 底物 S6 寡肽和 50 μmol [$r\text{-}^{32}\text{P}$]ATP (2×10^{15} dpm/mol), 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min, 取 20 μL 反应混合物点样于 2 cm^2 p81 phosphocellulose 反应纸 (Whatman 公司), 用含 1% orthophosphoric acid 去离子水冲洗三次, 用 β -计数器记录放射性。

1.5 Western Blot 实验

参照文献[11], 配制 9% 的 SDS-PAGE 分离胶和 3% 的积层胶, 每孔加入 20 μ g 蛋白样品, 置电泳缓冲液中, 70 V 电泳约 20 min。待样品进入分离胶后, 150 V 电泳至所需时间。将蛋白转印至硝酸纤维薄膜, 用 Life Technologies 公司商用封闭液于室温处理 2 h, 按 1:200 加 p70S6 激酶、p85PI3K 或 PKC- ζ 单抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜, TBS 液洗膜 10 min \times 3 次, 用辣根过氧化物酶试剂盒 (ECL, Amersham International plc. United Kingdom) 显色。

1.6 Ras- 磷脂肌醇-3 激酶- 蛋白激酶 C- ζ 混合沉淀实验

参照文献[12], 取 TME 缓冲液提取的蛋白, 加抗 Ras 单抗或 p85PI3K 单抗和 protein A-agarose 于 4 $^{\circ}$ C 混合 12 h 进行免疫沉淀 (immunoprecipitation, IP)。Protein A-agarose 用 TME 缓冲液洗一次, TTBS 缓冲液 (20 mmol Tris, pH 7.5, 500 mmol NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% beta-mercaptoethanol) 洗二次, 再用 TME 缓冲液洗一次。然后, 用 9% 的 SDS-PAGE 胶将免疫复合物分离, 用抗 p85PI3K 和 PKC- ζ 单抗进行免疫印迹 (immunoblot, IB) 实验。

1.7 细胞计数与氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入实验

参照文献[13], 取生长良好的 VSMC 制成细胞悬液 (4×10^7 个/L) 接种于 24 孔培养板中, 每孔 0.5 mL (2×10^4 个细胞), 孵育 24 h。换无血清培养基继续孵育 24 h 后, 使 VSMC 处于静止期, 加小牛血清至浓度为 10%, 同时分组加入 100 nmol Ang II (终浓度, 下同) 或 10 μ g/L PDGF (终浓度, 下同)。Wortmannin (终浓度 10 nmol, 下同)、chelerythrine (终浓度 10 μ mol, 下同) 和 rapamycin (终浓度 100 nmol, 下同) 于 Ang II 、PDGF 前 10 min 加入, 对照组为只含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基, 继续培养 24 h。然后进行下列实验: 细胞消化液分离细胞, 以 4% 台盼蓝染色计数。④继续培养 18 h, 加氚标胸腺嘧啶脱氧核苷 (^3H -thymine deoxyribonucleotide, ^3H -TdR) 至终浓度为 2 mCi/L, 6 h 后收样, 弃含 ^3H -TdR 培养基, 用 D-hanks 液洗三次, 以细胞消化液消化。用真空泵将细胞抽吸于玻璃纤维滤纸上, 5% 三氯醋酸固定, 无水乙醇脱水, 干燥后置闪烁瓶中加入闪烁液 (甲苯 500 mL, PPO 3, POPOP 0.1 g) 于液体闪烁分析仪 (Packard 公司) 测放射性强度, 以每分钟衰减数 (decay per minute, dpm 或 d/min) 表示。

1.8 统计处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据经方差分析后进行 q 检验, 差异的显著性用 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 判断。

2 结果

2.1 血管平滑肌细胞表达 p70 核蛋白体 S6 激酶、p85 磷脂肌醇-3 激酶和蛋白激酶 C- ζ

Western Blot 分析发现正常培养的 VSMC 表达 p70S6 激酶、p85PI3K 亚单位和 PKC- ζ , Ang II 和 PDGF 刺激并不影响 p70S6 激酶、p85PI3K 亚单位和 PKC- ζ 的表达 (图 1, Figure 1)。

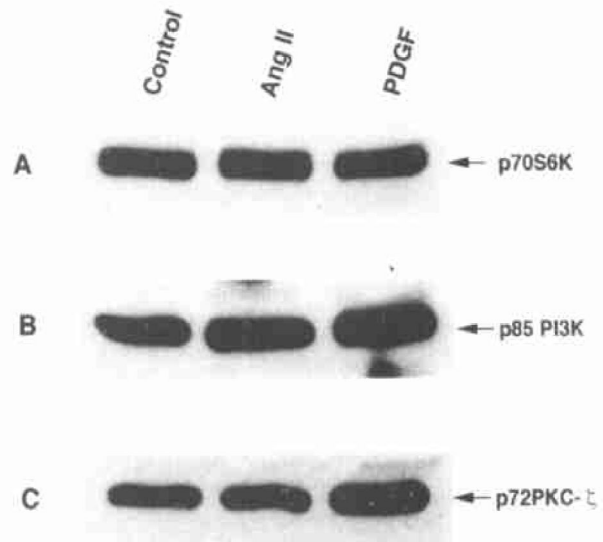


图 1 血管平滑肌细胞表达 p70 核蛋白体 S6 激酶、p85 磷脂肌醇-3 激酶亚型和蛋白激酶 C- ζ

Figure 1 VSMC express p70S6K, p85PI3K subtype and PKC- ζ Western blot analysis was carried out with anti-p70S6K antibody (A), anti-p85PI3K antibody (B) and anti-p70S6K, antibody (C), respectively.

2.2 血管紧张素 II 激活血管平滑肌细胞 p70 核蛋白体 S6 激酶

图 2 (Figure 2) 显示 Ang II 与 VSMC 作用 5 min 即开始激活 p70S6 激酶, 20 min 达高峰, 约为处理前的 5 倍, 随后逐渐降低 (A), 并呈剂量依赖性 (B)。p70S6 激酶抑制剂 rapamycin (100 nmol)、PI3K 抑制剂 wortmannin (10 nmol) 和 PKC- ζ 抑制剂 Pseudo Z (50 μ mol) 均可有效阻断 Ang II 的作用 (图 3, Figure 3)。

2.3 血管紧张素 II 刺激 Ras- 磷脂肌醇-3 激酶-蛋白激酶 C- ζ 复合物形成

细胞受 Ang II 和 PDGF 刺激后, 可观察到 PI3K 向 Ras 转位并与之结合的现象, 在抗 Ras 抗体沉淀的蛋白中有 PI3K 存在。图 3A (Figure 3A) 中可见抗 Ras 抗体沉淀的蛋白电泳分离转膜后再用抗 PI3K 抗体杂交可显示 p85 条带, wortmannin 10 nmol 可阻断 Ras-PI3K 相互结合。图 4B 和图 4C (Figure 4B and 4C) 中可见不但抗 Ras 抗体可将 PKC- ζ 混合沉淀

(B); 而且抗 PI3K 抗体也可将 PKC- ζ 沉淀下来, PI3K、PKC- ζ 之间的相互作用亦可被 wortmannin 和 pseudo Z 阻断(C)。由此, 我们可以推断细胞受 Ang $\text{\textcircled{E}}$ 和 PDGF 刺激后, Ras、PI3K、PKC- ζ 三种蛋白结合在一起形成一个功能复合体。Wortmannin 和 pseudo Z 可阻断这个功能复合体的形成, 说明 PI3K-PKC- ζ 在这个功能复合体中起重要作用。

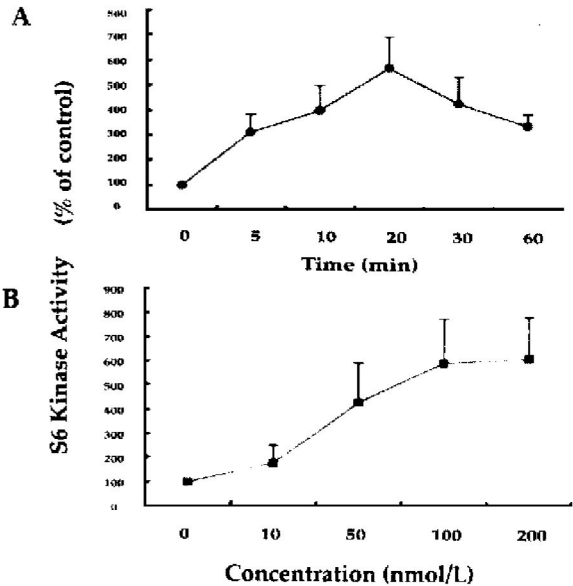


图2 血管紧张素 $\text{\textcircled{E}}$ 对血管平滑肌细胞 p70 核蛋白体 S6 激酶活性的影响
Figure 2 The effects of Ang $\text{\textcircled{E}}$ on p70S6K activity of VSMC
A: Time course of Ang $\text{\textcircled{E}}$ on p70S6K activity. B: Concentration response of Ang $\text{\textcircled{E}}$ on p70S6K activity.

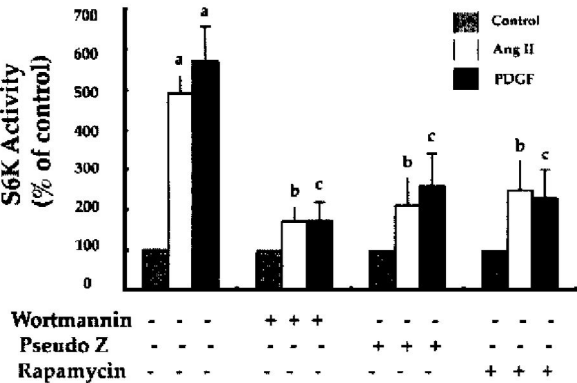


图3 p70 核蛋白体 S6 激酶抑制剂 rapamycin、磷脂肌醇-3 激酶抑制剂 wortmannin 和蛋白激酶 C- ζ 抑制剂 pseudo Z 对血管紧张素 $\text{\textcircled{E}}$ 活化血管平滑肌细胞 p70 核蛋白体 S6 激酶的影响
Figure 3 The effects of p70S6K inhibitor rapamycin, PI3K inhibitor wortmannin and PKC- ζ inhibitor pseudo Z on Ang $\text{\textcircled{E}}$ activation of p70S6K in VSMC a: $P < 0.01$ compared with control group, b: $P < 0.01$ compared with Ang $\text{\textcircled{E}}$ group, c: $P < 0.01$ compared with PDGF group.

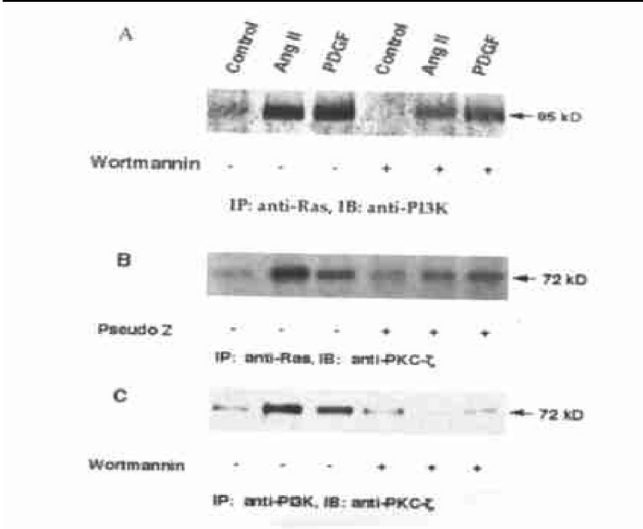


图4 p85 磷脂肌醇-3 激酶和蛋白激酶 C 与 Ras 的联系
Figure 4 Ras association with p85PI3K and PKC- ζ A and B. p85PI3K and PKC- ζ were immunoprecipitated (IP) with Ras antibody. C. PKC- ζ was immunoprecipitated (IP) by p85PI3K antibody.

2.4 Wortmannin 和 chelerythrine 阻断血管紧张素 $\text{\textcircled{E}}$ 诱导血管平滑肌细胞增殖

台盼蓝染色细胞计数和³H-TdR 掺入法分析显示 Ang $\text{\textcircled{E}}$ (100 nmol) 和 PDGF (10 μ g/L) 均有较强的刺激 VSMC 增殖的作用, Ang $\text{\textcircled{E}}$ 和 PDGF 处理组细胞计数明显高于对照组, ³H-TdR 掺入量显著增加。Wortmannin 和 chelerythrine 均可阻断 Ang $\text{\textcircled{E}}$ 和 PDGF 的作用(表 1, Table 1)。

表1 血管紧张素 $\text{\textcircled{E}}$ 、血小板源生长因子、Wortmannin 和 chelerythrine 对血管平滑肌细胞增殖的影响

Table 1 Effects of Ang $\text{\textcircled{E}}$, PDGF, wortmannin and chelerythrine on VSMC proliferation (n = 6, $\bar{x} \pm s$)

Groups	Cell number ($\times 10^4$)	³ H-TdR incorporation (dpm)
Control	2.26 \pm 0.14	503 \pm 51
Ang $\text{\textcircled{E}}$	3.32 \pm 0.29 ^a	740 \pm 75 ^a
PDGF	3.51 \pm 0.46 ^a	754 \pm 95 ^a
Wortmannin	2.25 \pm 0.21	512 \pm 41
Ang $\text{\textcircled{E}}$ + Wortmannin	2.32 \pm 0.12 ^b	540 \pm 34 ^b
PDGF+ Wortmannin	2.31 \pm 0.23 ^c	542 \pm 60 ^c
Chelerythrine	2.42 \pm 0.43	493 \pm 75
Ang $\text{\textcircled{E}}$ + Chelerythrine	2.47 \pm 0.43 ^b	550 \pm 84 ^b
PDGF+ Chelerythrine	2.42 \pm 0.36 ^c	560 \pm 71 ^c

a: $P < 0.01$ vs control; b: $P < 0.01$ vs Ang $\text{\textcircled{E}}$; c: $P < 0.01$ vs PDGF

3 讨论

本文的主要发现是 PKC- ζ 和 PI3K 联合调节

Ang Ⅱ激活血管平滑肌细胞核蛋白体激酶 p70S6 激酶。有如下两点支持这一结论: Ang Ⅱ与 VSMC 作用 5 min 即开始激活 p70S6 激酶, 20 min 达高峰, 并呈剂量依赖性。P70S6K 抑制剂 rapamycin、PI3K 抑制剂 wortmannin 和 PKC- ζ 抑制剂(PKC 假性底物) Pseudo Z 均可明显阻断 Ang Ⅱ诱导的 p70S6 激酶激活; ④细胞受 Ang Ⅱ和 PDGF 刺激后, 形成 Ras-PI3K-PKC- ζ 功能复合体, wortmannin 和 chelerythrine 可抑制这个功能复合体的形成。以前认为 Ang Ⅱ主要引起 VSMC 肥大, 近年发现 Ang Ⅱ也具有生长因子的特性, 可引起细胞增殖^[1, 13]。已知生长因子通过其细胞膜上的蛋白酪氨酸受体, 将信号传给 Ras, Ras 发生膜转位并激活丝氨酸/苏氨酸激酶 Raf, 后者是蛋白酪氨酸激酶受体信号传导的中心, Raf 通过 MEK 激活 ERK1/2 进行信号联级放大, ERK1/2 (又称丝裂素激活的激酶, mitogen-activated protein kinases, MAPK) 将信号传至细胞核, 启动 DNA 合成和相关蛋白合成, 促进 VSMC 增殖。然而, Ang Ⅱ并不作用于蛋白酪氨酸受体, 而是作用于 7-TM 受体(seven transmembrane receptors, 7-TM)。7-TM 受体是一种 G 蛋白受体, 并不具有酪氨酸激酶活性。那么, Ang Ⅱ是怎样促进细胞增殖的呢? 不少文献报道提示蛋白酪氨酸受体与 7-TM 受体之间存在相互“对话”(cross talk)^[19~ 21]。Ang Ⅱ可借道生长因子信号传递通路。文献[21, 22]报道 Ang Ⅱ可激活细胞内多种蛋白激酶及其信号通道, 如 Raf、PKC、PI3K、PLC

等等。一般认为 Ang Ⅱ可通过两条途径激活 p70S6 激酶: 一条可能通过 Ras-Raf-MEK-ERK1/2 途径。作者以前的研究发现 Raf 在 Ang Ⅱ激活 ERK1/2 中并不起主要作用, 而由 PKC- ζ 取而代之^[11, 12]。另一条可能通过 Ras-PI3K 途径^[8~ 10, 12], 然而, 其详细通路并不清楚。文献[14~ 16]报道 PKC- ζ 参与 p70S6 激酶的调节并介导其上游 PI3K 的效应, PKC- ζ 的活性依赖于 PI3K 的产物 PIP3。我们推测 PKC- ζ 和 PI3K 联合参与 Ang Ⅱ激活 p70S6 激酶的调节。本实验观察到 VSMC 优势表达 p85PI3K 和 PKC- ζ , Ang Ⅱ剂量依赖性地激活 p70S6 激酶。Rapamycin、wortmannin 和 Pseudo Z 均可阻断 Ang Ⅱ的作用。有趣的是, 我们发现细胞受 Ang Ⅱ和 PDGF 刺激后, 形成 Ras-PI3K-PKC- ζ 功能复合体, 抗 Ras 抗体和抗 PI3K 抗体可混合沉淀 PKC- ζ , wortmannin 和 pseudo Z 均可阻断此复合体的形成。此外, 我们用 VSMC 增殖作为终点指标分析了 PI3K 和 PKC- ζ 的作用, 观察到 PI3K 抑制剂 wortmannin 和非特异性 PKC 抑制剂 chelerythrine 均可明显抑制 Ang Ⅱ诱导的 VSMC 增殖。结合以前的工作, 我们提出 Ang Ⅱ激活血管平滑肌细胞 p70S6 激酶可能包含如下信号传导途径: Ang Ⅱ作用于 VSMC AT1 受体, 激活 PI3K, 活化的 PI3K 诱导 PKC- ζ 一同与 Ras 结合形成功能复合体, 并激活 PKC- ζ , 最终激活 p70S6 激酶, 导致 VSMC 增殖(图 5, Figure 5)。

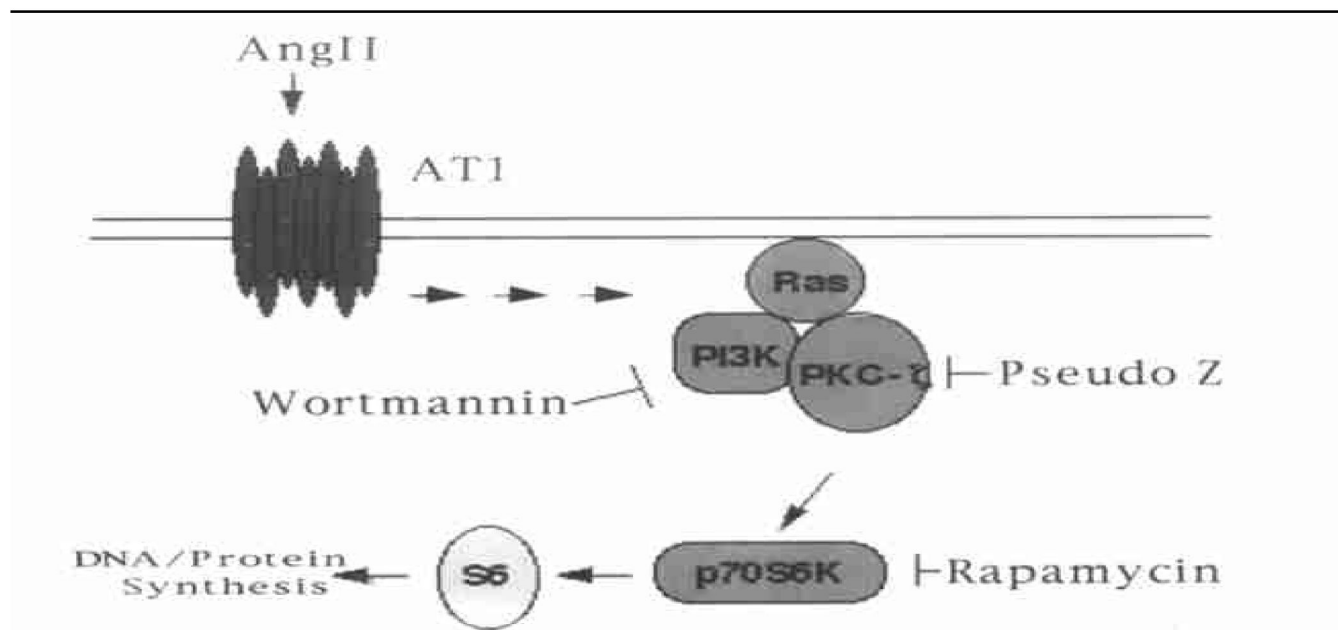


图 5 血管紧张素 Ⅱ经由 Ras-磷酰肌醇-3 激酶-蛋白激酶 C- ζ 激活 p70 核蛋白体 S6 激酶的途径

Figure 5 Ang Ⅱ activates p70S6K via the Ras-PI3K-PKC- ζ pathway.

[致谢] 本文部分工作在美国华盛顿大学 Dr. Berk 实验室和加拿大哥伦比亚大学 Dr. Pelech 实验室完成。

参考文献

- [1] Berk BC. Angiotensin I signal transduction in vascular smooth muscle: pathways activated by specific tyrosine kinases [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1999, **10**: S62– S68
- [2] Taubman MB, Berk BC, Izumo S, et al. Angiotensin I induces c-fos mRNA in aortic smooth muscle cells: role of Ca^{2+} mobilization and protein kinase C activation [J]. *J Biol Chem*, 1989, **264**: 526– 530
- [3] Molloy CJ, Taylor DS, Weber H. Angiotensin I stimulation of rapid protein tyrosine phosphorylation and protein kinase activation in rat aortic smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 1993, **268** (10): 7 338– 345
- [4] Duff JL, Berk BC, Corson MA. Angiotensin I stimulates the pp44 and pp42 mitogen-activated protein kinases in cultured rat aortic smooth muscle cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, **188**: 257 – 264
- [5] Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, et al. Angiotensin I signaling in vascular smooth muscle. New concepts [J]. *Hypertension*, 1997, **29** (1 Pt 2): 366– 373
- [6] Pullen N, Thomas G. The modular phosphorylation and activation of p70S6k [J]. *FEBS Lett*, 1997, **410** (1): 78– 82
- [7] Avruch J. Insulin signal transduction through protein kinase cascades [J]. *Mol Cell Biochem*, 1998, **182** (1– 2): 31– 48
- [8] Chung J, Grammer TC, Lemon KP, et al. PDGF- and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase [J]. *Nature*, 1994, **370** (6484): 71– 75
- [9] Giasson E, Meloche S. Role of p70S6 protein kinase in angiotensin I -induced protein synthesis in vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 1995, **270** (10): 5 225– 231
- [10] Sadoshima J, Izumo S. Rapamycin selectively inhibits angiotensin I -induced increase in protein synthesis in cardiac myocytes in vitro. Potential role of 70-kD S6 kinase in angiotensin I -induced cardiac hypertrophy [J]. *Circ Res*, 1995, **77** (6): 1 040– 052
- [11] Liao DF, Duff JL, Daum G, et al. Angiotensin I stimulates MAP kinase kinase activity in vascular smooth muscle cell. Role of Raf [J]. *Circ Res*, 1996, **79** (5): 1 007– 014
- [12] Liao DF, Monia B, Dean N, et al. Protein kinase C- ζ mediates angiotensin I -activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 6 146– 150
- [13] Saward L, Zahradka P. Angiotensin I activates phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells [J]. *Circ Res*, 1997, **81** (2): 249– 257
- [14] Chou MM, Hou W, Johnson J, et al. Regulation of protein kinase C ζ by PI3-kinase and PDK-1 [J]. *Curr Biol*, 1998, **8** (19): 1 069– 077
- [15] Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, et al. Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1 [J]. *Science*, 1998, **281** (5385): 2 042– 045
- [16] Romanelli A, Martin KA, Toker A, et al. p70S6 kinase is regulated by protein kinase C ζ and participates in a phosphoinositide 3-kinase-regulated signalling complex [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, **19** (4): 2 921– 928
- [17] Liao DF, Jin ZG, Baas AS, et al. Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275** (1): 189– 196
- [18] Xu YJ, Ouk Kim S, Liao DF, et al. Stimulation of 90- and 70-kDa ribosomal protein S6 kinases by arginine vasopressin and lysophosphatidic acid in rat cardiomyocytes [J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, **59** (9): 1 163– 171
- [19] Velloso LA, Folli F, Sun XJ, et al. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (22): 12 490– 495
- [20] Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H, et al. Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin I -induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 1998, **273** (15): 8 890– 896
- [21] Berk BC, Corson MA. Angiotensin I signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases [J]. *Circ Res*, 1997, **80** (5): 607– 616
- [22] Eguchi S, Iwasaki H, Ueno H, et al. Intracellular signaling of angiotensin I -induced p70S6 kinase phosphorylation at Ser(411) in vascular smooth muscle cells. Possible requirement of epidermal growth factor receptor, Ras, extracellular signal-regulated kinase, and Akt [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274** (52): 36 843– 851

(此文 2000- 07- 11 收到, 2000- 09- 05 修回)

(此文编辑 胡必利)