

氯通道 CIC-3 反义寡核苷酸对过氧化氢诱导的大鼠主动脉平滑肌细胞凋亡的影响

周 园, 周家国, 丘钦英, 黎小妍, 刘 捷, 关永源
(中山大学中山医学院药理学教研室, 广东省广州市 510080)

[关键词] 病理学与病理生理学; 氯通道; CIC-3 反义寡核苷酸; 细胞凋亡; H_2O_2 ; 血管平滑肌细胞

[摘 要] 目的 研究 CIC-3 反义寡核苷酸对 H_2O_2 诱导的大鼠主动脉平滑肌细胞凋亡的影响。方法 蛋白免疫印迹法检测 CIC-3 蛋白表达; 形态学方法、DNA 琼脂糖电泳、MTT 法和流式细胞仪观察和分析 H_2O_2 诱导的大鼠主动脉平滑肌细胞形态学改变、DNA 断裂、细胞存活率和凋亡率及 CIC-3 反义寡核苷酸转染对其影响。结果 CIC-3 反义寡核苷酸转染抑制内源性 CIC-3 蛋白表达后, 可加重 H_2O_2 诱导大鼠主动脉平滑肌细胞形态学改变及 DNA 断裂, 细胞凋亡率由 $52.8\% \pm 13.6\%$ 增至 $75.7\% \pm 5.8\%$ ($n=6, P<0.01$), 而细胞存活率由 $48.9\% \pm 4.3\%$ 进一步降低为 $31.3\% \pm 4.3\%$ ($n=6, P<0.01$)。结论 CIC-3 反义寡核苷酸转染促进 H_2O_2 诱导的大鼠主动脉平滑肌细胞凋亡。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of CIC-3 Antisense Oligonucleotide on H_2O_2 -Induced Apoptosis in Rat Aortic Vascular Smooth Muscle Cells

ZHOU Yuan, ZHOU Jia-Guo, QIU Qin-Ying, LI Xiao-Yan, LIU Jie, and GUAN Yong-Yuan

(Department of Pharmacology, Zhongshan Medical College of Sun Yat-Sen University, Guangzhou, 510080, China)

[KEY WORDS] Chloride Channel; CIC-3 Antisense Oligonucleotide; Apoptosis; H_2O_2

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of CIC-3 antisense oligonucleotide on H_2O_2 induced apoptosis in rat aortic vascular smooth muscle cells. **Methods** Western blot was performed to detect the expression of CIC-3 protein. Morphological determination, DNA agarose gel electrophoresis, MTT assay and flow cytometry analysis were performed to measure the morphological changes, DNA ladder, viability and apoptotic rate and effects of CIC-3 antisense oligonucleotide on rat aortic smooth muscle cells. **Results** The antisense oligonucleotide specific to CIC-3 mRNA decreased the expression of CIC-3 protein and enhanced the apoptotic events induced by H_2O_2 including ultrastructural alteration and DNA ladder. The apoptotic cell death rate increased from $52.8\% \pm 13.6\%$ to $75.7\% \pm 5.8\%$ ($n=6, P<0.01$), and whereas the viability further decreased from $48.9\% \pm 4.3\%$ to $31.3\% \pm 4.3\%$ ($n=6, P<0.01$) by CIC-3 antisense oligonucleotide transfection. **Conclusion** CIC-3 antisense oligonucleotide potentiated apoptosis induced by H_2O_2 in rat aortic smooth muscle cells.

血管平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)增殖与凋亡的失衡是动脉粥样硬化的重要病理改变之一^[1]。已知在细胞增殖与凋亡过程都伴随有细胞容积的改变,增殖早期,多数细胞会因代谢增强而增加氨基酸、水等物质的进入,导致细胞肿胀;而细胞凋亡早期的典型特征之一就是在正常渗透压下产生的凋亡性容积减低现象。近年来研究表明,容积调节性氯通道(volume-regulated chloride channel, VRCC)参与上述过程的调控^[2]。VRCC 广泛分布于哺乳动物

组织和细胞,在调节细胞容积、免疫反应、细胞膜电位及细胞的增殖、凋亡等过程中发挥了重要作用,但其分子基础迄今尚未完全明了^[3]。有报道认为 CIC-3 可能编码了 VRCC^[4],但这一观点仍有广泛争议^[5]。最近,我们在血管 SMC 上的研究发现, CIC-3 蛋白是 VRCC 的分子基础^[6],应用 CIC-3 反义寡核苷酸抑制 CIC-3 蛋白表达后可明显抑制内皮素 1 诱导的 SMC 增殖^[7],但 CIC-3 氯通道是否参与血管 SMC 的凋亡过程尚未见报道。本实验在以往研究的基础上,观察 CIC-3 反义寡核苷酸转染大鼠主动脉 SMC 后,对 H_2O_2 诱导的细胞凋亡的影响。

[收稿日期] 2006-03-13 [修回日期] 2006-05-09

[基金项目] 国家自然科学基金(30472021, 30500616); CMB(00730); 广东省自然科学基金(5300822)

[作者简介] 周园,博士研究生,研究方向为心血管药理,联系电话 020-39358085, E-mail 为 zyxxyl@126.com。周家国,博士,副教授,研究方向为心血管药理, E-mail 为 zhoujg@mail.sysu.edu.cn。通讯作者 关永源,教授,博士研究生导师,研究方向为心血管药理,联系电话 020-87331857, E-mail 为 guanyy@mail.sysu.edu.cn。

1 材料和方法

1.1 药品、试剂与仪器

DMEM/F12、LipofectAMINE2000 购于 Invitrogen

公司;新生牛血清购于 Hyclone 公司;胰蛋白酶购于 Sigma 公司;Western blot Kit 购于 Bio Rad 公司;CLC-3 多克隆抗体购于 Alomone Labs 公司; β -actin 抗体购于 New Marker 公司;二抗购于 Cell signaling 公司;硫代磷酸化修饰的 CLC-3 寡核苷酸片段由上海生物工程公司合成并纯化。 CO_2 培养箱(美国 Labtech 公司, C200 型),倒置显微镜(日本 Nikon 公司, TS100 型),高速冷冻离心机(德国 Hettich 公司, U32R 型),微型电泳仪、垂直电泳和水平电泳装置(美国 Bio-Rad 公司, PAC300 型),凝胶扫描分析系统(美国 Advanced American Biotechnology 公司, 5434478 型),酶标仪(美国 Bio-TEK 公司, ELX800 型),流式细胞仪(美国 Beckman 公司, EPICS-Elite 型)。

1.2 细胞培养及药物处理

组织贴块法培养大鼠主动脉平滑肌细胞(aortic smooth muscle cells, ASMC)。无菌条件下分离雄性 SD 大鼠(150~200 g)胸主动脉,轻柔去除外膜、内皮后,将中膜肌层剪碎(1~2 mm²),均匀铺于培养瓶上,4~6 h 后加入含 20% 小牛血清、青霉素、链霉素各 100 kU/L 的 DMEM/F12 培养基,37℃、5% CO_2 静置培养。细胞生长近融合时,倒置相差显微镜观察,可见细胞呈梭形,高低起伏排列为“峰与谷”状。特异的 α -actin 免疫组织化学法染色表明 SMC 纯度>95%。选择生长良好的第 8~14 代细胞用于实验。实验时,细胞以 80% 密度接种于 96 孔板和 35 mm 培养皿或 6 孔板中,瞬时转染 48 h 后加入 H_2O_2 处理。 H_2O_2 诱导细胞凋亡模型按文献[8]方法,细胞以 80% 密度接种于 96 孔板和 35 mm 培养皿或 6 孔板 24 h 后,给予 800 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理细胞 24 h。

1.3 反义、正义和随义寡核苷酸转染

靶向人 CLC-3 mRNA 起始密码区的反义和正义序列参照文献[9]合成。反义序列是 5'-TCC ATT TGT CAT TGT-3';正义序列是 5'-ACA ATG ACA AAT GGA-3'。本实验室以随机方式设计了随义系列 5'-TCT ATT CCT GTA TTG-3',其与反义寡核苷酸片段碱基组成相同,但随机排列且与 Genbank 中已知的与 CLC-3 有关的序列无同源性。为保证稳定性,寡核苷酸的前三个碱基被硫代磷酸化修饰。转染按 LipofectAMINE2000 说明书进行,即将正义、随义及反义寡核苷酸和脂质体分别稀释于无血清、无抗生素 DMEM/F12 培养基中至所需浓度,室温放置 5 min 后将寡核苷酸与脂质体缓慢混匀,室温孵育 20 min。吸弃细胞原培养基,换无血清、无抗生素的培养基,将寡核苷酸与脂质体混合物加入孔或皿中。转染 6

h 后换成含血清的培养基继续培养。寡核苷酸标记 FAM 荧光以观察细胞对寡核苷酸的摄取。

1.4 Western blot 检测

用冰浴的 PBS 洗涤细胞两遍,加入细胞裂解液(50 mmol/L Tris·Cl, 150 mmol/L NaCl, 0.2 g/L NaN_3 , 1 g/L NP-40, 1 g/L SDS, 5 g/L 脱氧胆酸钠, 5 mg/L aprotinin, 1 mmol/L PMSF)裂解 30 min,刮下细胞,4℃,12 kr/min,离心 10 min,吸取上清进行蛋白质定量。将蛋白质等量样本加入 6×SDS 凝胶加样缓冲液混合,与蛋白质分子质量 Marker 一起进行 SDS-PAGE 电泳。电泳完毕后,恒压 100 V 电转 2 h,将蛋白转移到硝酸纤维素膜上,用 5% 脱脂奶粉 PBST 缓冲液室温封闭 2 h,洗脱后加入 CLC-3 多克隆抗体(1:400 稀释)与 β -actin 抗体(稀释倍数为 1:400),室温温育 1 h。PBST 洗膜 1 h,室温下孵育二抗(抗 CLC-3 抗体 1:1 000,抗 β -actin 抗体 1:1 000,抗生物素二抗 1:1000)1 h, PBST 洗膜 1 h。化学发光法检测,加检测液于硝酸纤维素膜上,与膜作用 3 min,曝光到 X 光片上。胶片用凝胶成像系统扫描、分析条带灰度值。

1.5 存活率测定(MTT 法)

MTT 被线粒体中的琥珀酸脱氢酶代谢后,产生深紫色的甲臞结晶,其量与活细胞数成正比,故常用于细胞活性测定。接种于 96 孔板的细胞处理相应时间后,加入 MTT(5 g/L)10 μL ,置 37℃、5% CO_2 培养箱中孵育 4 h 后去除培养基,加入二甲基亚砜(DMSO)100 μL 溶解结晶体,于酶标仪(Bio-Tek, USA)上在波长为 570 nm 处测定吸光度 OD 值,细胞存活率(%)=处理组 OD 值/对照组 OD 值×100%。

1.6 形态学观察(Hoechst33258 染色)

接种于 35 mm 培养皿的细胞处理相应时间后,移去培养基,用 PBS 洗细胞 2 次,甲醇:冰醋酸(3:1,体积比)固定 10 min,然后用蒸馏水洗细胞 2 次,晾干,加入 5 mg/L Hoechst33258 (Promega Chemical Co, USA)染色 5 min,用蒸馏水洗 2 次,室温下晾干,在荧光显微镜(激发波长 360 nm,发射波长 450 nm)下观察并随机拍照。

1.7 DNA 断裂片段分析

细胞经 H_2O_2 处理 24 h 后,移去培养基, PBS 洗涤 2 次后,加入 500 μL 细胞裂解液(10 mmol/L Tris·HCl, 1 mmol/L EDTA, 0.5% Triton X-100, 100 g/L 蛋白酶 K)裂解 10 min,将裂解液小心吸入 Eppendorf 管,37℃水浴过夜,用酚:氯仿(1:1,体积比,下同)、酚:氯仿:异丙醇(25:24:1)、氯仿各抽提 1 次,12 kr/min,离心 10 min。取上清,加 1/10 体积 300 mmol/L 乙酸钠和 2 倍体积无水乙醇沉淀过夜,12 kr/min,离

心 10 min。弃上清,将沉淀用体积分数为 0.70 乙醇洗涤 2 次,加入 20 μ L TE(含 20 mg/L RNase A)溶解,37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h。样品在含 0.5 mg/L EB 的 1.0 g/L 琼脂糖凝胶上以 60 V 电泳 1 h,紫外灯下观察拍照。

1.8 流式细胞仪检测

荧光染料碘化丙啶(PI)染色后,流式细胞仪分析细胞的 DNA 含量,根据亚二倍体峰计算凋亡细胞的百分率。取待测细胞,常规消化后,PBS 洗涤 2 次,1.5 kr/min,离心 3 min 收集细胞,用 70% 的乙醇 4 $^{\circ}$ C 固定 24 h。测定前离心洗去乙醇,加碘化丙啶染液(含 50 mg/L PI, 10 mg/L RNase A, 1 g/L Triton X-100, 10 g/L 柠檬酸钠和 5 g/L NaCl),室温下避光染色 30 min。流式细胞仪测定荧光强度值并以 Multi-cycle 软件处理结果,计算凋亡率。

1.9 统计方法

结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用方差分析进行统计判断,计算由 SPSS 11.0 标准版统计软件完成。

2 结果

2.1 大鼠主动脉平滑肌细胞 CIC-3 蛋白的表达

为了检测寡核苷酸片段被大鼠主动脉平滑肌细

胞摄入情况,用标记 FAM 荧光的寡核苷酸进行转染。结果如图 1 所示,对照组细胞无荧光,而转染反义、正义及随义寡核苷酸的细胞在荧光显微镜下呈绿色荧光,表明寡核苷酸被细胞摄入。

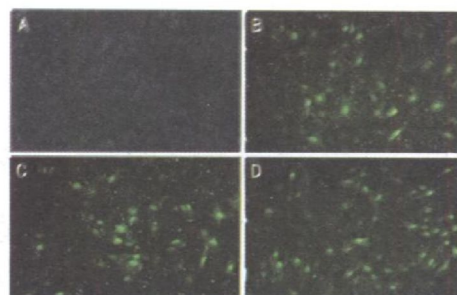


图 1. 大鼠主动脉平滑肌细胞转染荧光标记寡核苷酸(200 \times) A 为对照组, B 为正义组, C 为随义组, D 为反义组。

用 100 mg/L CIC-3 反义寡核苷酸转染 24、48 和 72 h 后,大鼠 ASMC 内源性 CIC-3 蛋白的表达量分别降低 20.1% \pm 2.8%、54.8% \pm 1.6% 和 54.2% \pm 3.3%,48 h 时的抑制作用最强(图 2 和表 1)。



图 2. CIC-3 反义寡核苷酸转染后不同时间大鼠主动脉平滑肌细胞 CIC-3 蛋白表达的免疫印迹结果

表 1. 转染 CIC-3 反义寡核苷酸不同时间后 CIC-3 蛋白表达的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

细胞分组	时间	相对灰度值
空白对照组	—	100%
反义转染组	24 h	80% \pm 2.8% ^a
反义转染组	48 h	45% \pm 1.6% ^b
反义转染组	72 h	46% \pm 3.3% ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较

当用 25、50、100 和 200 mg/L 的 CIC-3 反义寡核苷酸转染细胞 48 h 后,内源性 CIC-3 蛋白的表达分别降低 21.2% \pm 1.6%、38.9% \pm 3.1%、57.5% \pm 5.1% 和 56.9% \pm 4.7% (图 3 和表 2),其中以 100 mg/L 抑制作用最强。而正义(100 mg/L)和随义寡核苷酸(100 mg/L)以及 LipofectAMINE2000 对 CIC-3 蛋白的表达没有明显影响($n=6$, $P > 0.05$)。

2.2 细胞凋亡的形态学检查

荧光显微镜下,细胞经 Hoechst 33258 染色后,

正常胞核呈均匀荧光,而 800 μ mol/L H_2O_2 处理 24 h 后,细胞皱缩、变圆,染色质浓集,可见凋亡小体(图 4)。转染 100 mg/L CIC-3 反义寡核苷酸可促进 H_2O_2 诱导的细胞凋亡样形态学改变,而 CIC-3 正义、随义寡核苷酸及脂质体转染则无明显影响(图 4)。

表 2. 转染不同浓度 CIC-3 寡核苷酸后 CIC-3 蛋白表达的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

细胞分组	浓度	相对灰度值
空白对照组	—	100%
脂质体转染组	—	99.0% \pm 3.2%
正义转染组	100 mg/L	97.0% \pm 2.0%
随义转染组	100 mg/L	101% \pm 3.8%
反义转染组 1	25 mg/L	79.0% \pm 1.6% ^a
反义转染组 2	50 mg/L	61.0% \pm 3.1% ^a
反义转染组 3	100 mg/L	43.0% \pm 5.1% ^a
反义转染组 4	200 mg/L	43.0% \pm 4.7% ^a

a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比较。



图3. 不同浓度 CIC-3 反义寡核苷酸转染后大鼠主动脉平滑肌细胞 CIC-3 蛋白表达的免疫印迹结果

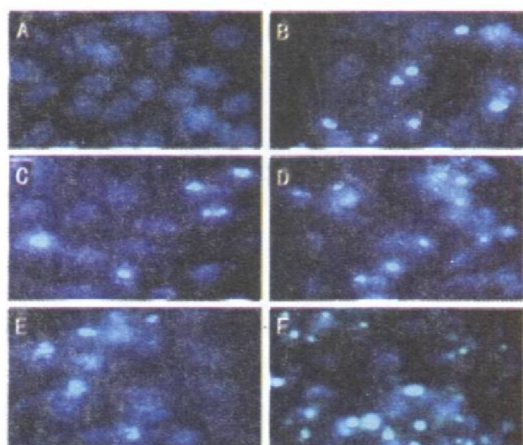


图4. 转染 CIC-3 寡核苷酸对 H_2O_2 诱导的主动脉平滑肌细胞形态学改变的影响 (400 \times) A 为对照组, B 为 H_2O_2 组, C 为脂质蛋白(a) + H_2O_2 组, D 为随义 + H_2O_2 组, E 为正义 + H_2O_2 组, F 为反义 + H_2O_2 组。

2.3 DNA 断裂片段分析结果

大鼠主动脉平滑肌细胞经 H_2O_2 处理 24 h 后, 电泳出现 DNA “梯状图谱”(图 5)。100 mg/L CIC-3 反义寡核苷酸转染加重 DNA 断裂程度, 而正义、随义寡核苷酸及脂质体转染没有明显影响(图 5)。

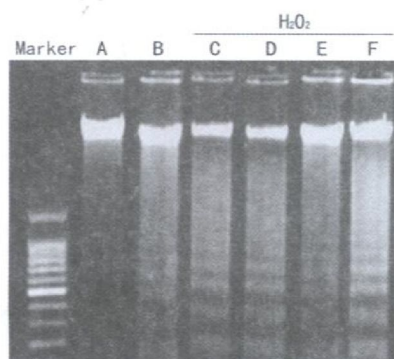


图5. 转染不同 CIC-3 寡核苷酸对 H_2O_2 诱导的细胞 DNA 断裂的影响 A 为对照组, B 为 H_2O_2 组, C 为脂质蛋白(a) + H_2O_2 组, D 为正义 + H_2O_2 组, E 为随义 + H_2O_2 组, F 为反义 + H_2O_2 组。

2.4 细胞存活率检测结果

大鼠主动脉 SMC 存活率见表 3。 H_2O_2 处理引起细胞存活率下降。CIC-3 反义寡核苷酸转染可浓

度依赖性地加重 H_2O_2 引起的细胞死亡, 100 mg/L CIC-3 反义寡核苷酸转染使细胞存活率下降($n = 6$, $P < 0.01$), 与其对内源性 CIC-3 蛋白表达的抑制程度相一致, 而 CIC-3 正义、随义寡核苷酸及脂质体转染对 H_2O_2 引起的细胞死亡没有明显影响($n = 6$, $P > 0.05$)。

表 3. 大鼠主动脉平滑肌细胞存活率的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

细胞分组	浓度	细胞存活率
空白对照组	—	100%
H_2O_2 处理组	—	49% \pm 4.3%
H_2O_2 + LP 组	—	48% \pm 3.4%
H_2O_2 + 正义组	100 mg/L	49% \pm 4.9%
H_2O_2 + 随义组	100 mg/L	51% \pm 5.3%
H_2O_2 + 反义组 1	25 mg/L	45% \pm 5.3% ^a
H_2O_2 + 反义组 2	50 mg/L	38% \pm 4.5% ^b
H_2O_2 + 反义组 3	100 mg/L	31% \pm 4.3% ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 H_2O_2 处理组比较。

2.5 细胞凋亡率检测结果

用流式细胞仪检测细胞凋亡的变化如图 6 所示, CIC-3 反义寡核苷酸转染可使细胞凋亡率由 52.8% \pm 13.6% 升至 75.7% \pm 5.8% ($n = 6$, $P < 0.01$, 表 4), 而 CIC-3 正义、随义寡核苷酸及脂质体转染对此没有明显影响(表 4, $n = 6$, $P > 0.05$)。

表 4. 大鼠主动脉细胞凋亡率的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

细胞分组	细胞凋亡率
空白对照组	2.2% \pm 1.4%
H_2O_2 处理组	52.8% \pm 13.6%
H_2O_2 + LP 组	57% \pm 10%
H_2O_2 + 正义组	54% \pm 13%
H_2O_2 + 随义组	58% \pm 12%
H_2O_2 + 反义组	75.7% \pm 5.8% ^b

b 为 $P < 0.01$, 与 H_2O_2 处理组比较。

3 讨论

正常情况下, 血管平滑肌细胞增殖与凋亡的平衡决定血管壁的生长、结构, 二者失衡可引起血管重

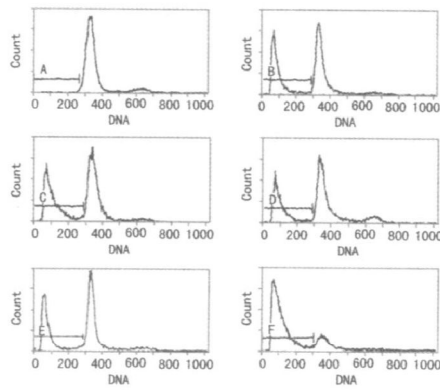


图 6. 大鼠主动脉平滑肌细胞流式细胞分析 A 为对照组, B 为 H_2O_2 组, C 为脂蛋白(a) + H_2O_2 组, D 为 NPPB + H_2O_2 组, E 为 DIDS + H_2O_2 组, F 为反义 + H_2O_2 组。

构,是动脉粥样硬化的重要病理改变^[10]。研究如何调控平滑肌细胞的凋亡和增殖,对揭示动脉粥样硬化的病因和防治具有重要意义。

已知细胞的增殖和凋亡过程均伴随有细胞容积的变化。在增殖早期,细胞因代谢增强而增加氨基酸、水等物质的进入,可导致细胞肿胀;而细胞凋亡早期的典型特征之一是在正常渗透压条件下发生的细胞皱缩,即凋亡性容积减低现象,提示通过调节容积可能调控细胞的增殖与凋亡。容积调节性氯通道是维持细胞容积的动态平衡中的主要氯通道,研究表明,VRCC 在细胞的增殖、凋亡发生过程中有重要作用。氯通道阻断剂 NPPB、DIDS 等可抑制多种细胞的增殖反应^[11,12]。在神经元和 PC12 细胞,氯通道阻断剂 NPPB、SITS 和 DIDS 等不仅抑制细胞的调节性容积减低过程,而且可保护细胞的凋亡^[13]。但亦有不一致甚至完全相反的报道,如 VRCC 阻断剂 NPPB、IAA-94 对家兔心肌细胞缺血再灌时的细胞凋亡并无保护作用,反而促进凋亡,增加缺血诱发的心肌梗死面积^[14,15]。这些差异可能与氯通道阻断剂缺乏选择性有关,如 NPPB、SITS、DIDS 等不仅可抑制容积调节性氯通道,而且对 Ca^{2+} 激活的氯通道亦有明显阻断作用, SITS、DIDS 不仅阻断氯通道而且阻断 ATP-敏感性 K^+ 通道、SLC4 家族 ($Na^+-HCO_3^-$ 转运体) 等^[16,17]。最近在 CIC-3 基因敲除小鼠研究中发现, CIC-3 氯通道相对特异性阻断剂 DIDS 和 NPPB 对心肌细胞的凋亡仍有明显的保护作用^[18]。提示氯通道阻断剂对凋亡的影响可能尚存在与 CIC-3 氯通道无关的其它机制。

我们前期的研究表明, CIC-3 反义寡核苷酸抑制 CIC-3 蛋白表达的同时,亦明显抑制 ET-1 诱导的主动脉平滑肌细胞的增殖^[8]。本实验中,我们采

用 CIC-3 反义寡核苷酸转染,发现 CIC-3 蛋白的下调可促进 H_2O_2 诱导的血管平滑肌细胞凋亡。我们的研究结果提示 CIC-3 氯通道通过促进细胞增殖和抑制细胞凋亡调控血管平滑肌细胞的功能。

[参考文献]

- [1] Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM. Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques [J]. *J Clin Invest*, 1995, **95** (2): 2266-2272
- [2] Lang F, Ritter M, Gamper N, Huber S, Tanneur V, et al. Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2000, **10** (5-6): 417-428
- [3] Eggemont J, Trouet D, Carton I, Nilus B. Cellular function and control of volume-regulated anion channels [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2001, **35** (3): 263-274
- [4] Duan D, Winter C, Crowley S, Hume JR, Horowitz B. Molecular identification of a volume-regulated chloride channel [J]. *Nature*, 1997, **390** (6658): 417-421
- [5] Weylandt KH, Valverde MA, Nobles M, Raguz S, Amey JS, Diaz M. Human CIC-3 is not the swelling-activated chloride channel involved in cell volume regulation [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276** (20): 17461-467
- [6] Zhou JC, Ren JL, Qian QY, He H, Guan YY. Regulation of intracellular Cl^- concentration through volume-regulated CIC-3 chloride channels in A10 vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 2005, **280** (8): 7301-308
- [7] Wang GL, Wang XR, Lin MJ, He H, Lan XJ, Guan YY. Deficiency in CIC-3 chloride channels prevents rat aortic smooth muscle cell proliferation [J]. *Circ Res*, 2002, **91** (10): e28-32
- [8] Ryer EJ, Sakakibara K, Wang C, Sarkar D, Fisher PB, Faries PL, et al. Protein kinase C delta induces apoptosis of vascular smooth muscle cells through induction of the tumor suppressor p53 by both p38-dependent and p38-independent and p38-independent mechanisms [J]. *J Biol Chem*, 2005, **280** (42): 35310-317
- [9] Wang L, Chen L, Jacob TJ. The role of CIC-3 in volume-activated chloride currents and volume regulation in bovine epithelial cells demonstrated by antisense inhibition [J]. *J Physiol*, 2000, **524** (Pt1): 63-75
- [10] Mayr M, Xu Q. Smooth muscle cell apoptosis in arteriosclerosis [J]. *Exp Gerontol*, 2001, **36** (7): 969-987
- [11] Wonderegger R, Gong W, Monen SH, Dooley SN, Gonce JL, Comer TD, et al. Blocking swelling-activated chloride current inhibits mouse liver cell proliferation [J]. *J Physiol*, 2001, **532** (3): 661-672
- [12] Xiao GN, Guan YY, He H. Effects of Cl^- channel blockers on endothelin-1-induced proliferation of rat vascular smooth muscle cells [J]. *Life Sci*, 2002, **70** (19): 2233-241
- [13] Wei L, Xiao AY, Jin C, Yang A, Lu ZY, Yu SP. Effects of chloride and potassium channel blockers on apoptotic cell shrinkage and apoptosis in cortical neurons [J]. *Neurosci Lett*, 2004, **368** (3): 325-334
- [14] Szabo I, Lepple-Wienhues A, Kaba KN, Zoratti M, Gulbins E, Lang F. Tyrosine kinase-dependent activation of a chloride channel in CD-95-induced apoptosis in T lymphocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (11): 6169-174
- [15] Soukani R, Ghaleb B, Tissier R, d'Anglemont de Tassigny A, Aouam K, Berdossa P, et al. Inhibitors of swelling-activated chloride channels increase infarct size and apoptosis in rabbit myocardium [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2003, **17** (5): 555-561
- [16] Romero MF, Fulton CM, Boron WF. The SLC4 family of HCO_3^- transporters [J]. *Physiol Rev*, 2004, **84** (5): 495-509
- [17] Remillard CV, Lupien MA, Crepeau V, Leblanc N. Role of Ca^{2+} - and swelling-activated Cl^- channels in α -adrenoceptor-mediated tone in pressurized rabbit mesenteric arterioles [J]. *Cardiovasc Res*, 2000, **46** (3): 557-568
- [18] Takahashi N, Wang X, Tanabe S, Uramoto H, Jishage K, Uchida S, et al. CIC-3-independent sensitivity of apoptosis to Cl^- channel blockers in mouse cardiomyocytes [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2005, **15** (6): 263-270

(此文编辑 胡必利)