

普罗布考抑制过氧化氢刺激大鼠主动脉平滑肌细胞增殖的机制

盛林¹, 马承恩¹, 郝琳¹, 岳欣², 潘其兴²

(山东大学1. 第二医院心内科, 山东省济南市 250033; 2. 齐鲁医院心内科, 山东省济南市 250012)

[关键词] 药理学; 普罗布考; 过氧化氢; 细胞增殖; 细胞凋亡; 细胞外信号调节蛋白激酶 1; 丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶 1

[摘要] 目的 研究普罗布考抑制过氧化氢促大鼠主动脉平滑肌细胞增殖的机制。方法 采用 MTT、³H-胸腺嘧啶核苷掺入法、流式细胞术和逆转录聚合酶链反应观察过氧化氢刺激条件下普罗布考对血管平滑肌细胞细胞周期、DNA 合成、细胞增殖和凋亡的影响。结果 普罗布考抑制过氧化氢刺激血管平滑肌细胞增殖和 DNA 合成。与过氧化氢组比较, 普罗布考+ 过氧化氢组细胞计数、吸光度值和³H-胸腺嘧啶核苷掺入量分别下降了 46.9%、45.0% 和 39.5% ($P < 0.05$)。普罗布考通过使血管平滑肌细胞生长停滞在 G₀/G₁ 期抑制过氧化氢刺激细胞增殖。过氧化氢使细胞外信号调节激酶 1 mRNA 相对表达量增加近 6 倍, 丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶 1 mRNA 相对表达量下降了 82.2%。普罗布考抑制细胞外信号调节蛋白激酶 1 mRNA 的表达, 增强丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶 1 mRNA 的表达。普罗布考诱导过氧化氢刺激条件下血管平滑肌细胞凋亡。结论 普罗布考通过下调细胞外信号调节蛋白激酶 1 mRNA 的表达抑制细胞周期运转和诱导血管平滑肌细胞凋亡两种机制抑制过氧化氢刺激血管平滑肌细胞增殖。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Antiproliferative Mechanisms of Probucol in H₂O₂-Stimulated Rat Aortic Smooth Muscle Cells

SHENG Lin¹, MA Cheng-En¹, HAO Lin¹, YUE Xin², and PAN Qi-Xing²

(1. Department of Cardiology, the Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, China; 2. Department of Cardiology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China)

[KEY WORDS] Probucol; Hydrogen Peroxide; Cell Proliferation; Cell Apoptosis; Extracellular Signal-Regulated Kinase 1; Mitogen-Activated Protein Kinases Phosphatase 1

[ABSTRACT] Aim To investigate the antiproliferative mechanisms of probucol in rat vascular smooth muscle cells (VSMC) stimulated by H₂O₂. Methods Effects of probucol on cell cycle, DNA synthesis, cell proliferation and apoptosis in the presence of H₂O₂ were observed by means of MTT test, cell number count, ³H-TdR incorporation, FCM and RT-PCR.

Results Probucol significantly inhibited proliferation and DNA synthesis of VSMC stimulated by H₂O₂. Cell number, A value and ³H-TdR incorporation in probucol+ H₂O₂ group were reduced by 46.9%, 45.0%, and 39.5%, respectively, compared with H₂O₂ group ($P < 0.05$). Probucol protected against H₂O₂-induced VSMC proliferation through inducing cell growth arrest at G₀/G₁ phase. H₂O₂ increased extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK-1) mRNA transcriptional levels by about 6 times and decreased mitogen-activated protein kinases phosphatase 1 (MKP-1) mRNA by 82.2%, respectively, compared with controls. Probucol down-regulated the increase in H₂O₂-stimulated ERK-1 mRNA level and up-regulated MKP-1 mRNA level decreased by H₂O₂. Probucol induced apoptosis of VSMC under H₂O₂-stimulated condition. Conclusion Probucol suppresses H₂O₂-stimulated VSMC proliferation by inhibition of cell cycle progression via down-regulating ERK-1 mRNA transcriptional level, as well as induction of apoptosis of VSMC.

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell,

VSMC) 增殖是动脉粥样硬化和介入治疗后血管再狭窄的主要病理基础。在促进 VSMC 增殖的众多因素中, 活性氧分子过氧化氢(H₂O₂) 具有重要作用, 据报道 H₂O₂ 可激活细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK), 通过复杂的信号级联反应诱导 VSMC 增殖^[1]。我们先前的研究也证明了 H₂O₂ 可以刺激 VSMC 增殖^[2]。普罗布考是兼具抗

[收稿日期] 2006-12-11 [修回日期] 2007-06-02

[作者简介] 盛林, 博士, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为血脂异常与动脉粥样硬化发病机制, E-mail 为 shenglin1961@yahoo.com.cn。马承恩, 硕士, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病防治。潘其兴, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病与介入损伤后冠状动脉再狭窄防治。

氧化作用的降脂类药, 研究证明普罗布考能抑制动脉粥样硬化斑块进展, 降低冠状动脉介入治疗后血管再狭窄的发生率^[3,4]。但是, 普罗布考抑制 H₂O₂ 刺激 VSMC 增殖是否与抑制 ERK 有关, 目前还不清楚。本研究以 H₂O₂ 作为刺激因素, 从细胞周期、细胞凋亡和信号蛋白分子 ERK-1 及其负性调节酶丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶 1 (mitogen activated protein kinases phosphatase 1, MKP-1) 转录活性变化等方面进一步探讨普罗布考抑制 VSMC 增殖的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

SD 大鼠由山东医科大学动物实验中心提供, DMEM 培养粉和胎牛血清为 Gibco 公司产品, 普罗布考由齐鲁制药厂提供, H₂O₂、MTT 和兔抗人平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, SMA) 为 Sigma 公司产品, ³H-胸腺嘧啶核苷 (³H-TdR) 购自中国科学院原子能研究所, 溴化乙锭购自华美生物制品公司。FANScan 流式细胞仪为美国 BD 公司产品, PCR 仪为 MT Research INC 产品, DYY-26B 型稳压稳流电泳仪为上海医疗仪器厂产品。

1.2 血管平滑肌细胞的培养

贴块法培养 VSMC。取 100~150 g 雄性 SD 大鼠胸主动脉, 剥去血管内外膜, 剪成 1 mm² 组织块, 贴于培养瓶内, 于 37℃、5% CO₂ 条件下用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养。经 SMA 单抗免疫组织化学染色阳性证实为 VSMC, 纯度 > 95%。0.25% 胰蛋白酶消化传代, 选 5~10 代细胞用于实验。

1.3 实验分组

实验分组: 空白对照组用含 0.5% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 72 h; ④普罗布考组将普罗布考与 VSMC 在含 0.5% 胎牛血清的 DMEM 培养基中共同孵育 72 h; ④H₂O₂ 组将 H₂O₂ 与 VSMC 在含 0.5% 胎牛血清的 DMEM 培养基中共同培养 72 h; 普罗布考+H₂O₂ 组将普罗布考和 H₂O₂ 在含 0.5% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养 72 h。以上各组均设 6 个复孔。根据预实验结果, 选用普罗布考 100 μ mol/L 和 H₂O₂ 100 μ mol/L 最大效应浓度用于实验。

1.4 细胞增殖实验

将 VSMC 按 1×10^7 /L 移植到含 10% 胎牛血清 96 孔培养板中, 细胞贴壁后换成 0.5% 胎牛血清饥饿培养 24 h, 然后按上述分组加入各试剂。培养终止前每孔加入 5 g/L MTT 50 μ L, 二甲基亚砜终止反应。酶联免疫仪 570 nm 波长处读取吸光度值。

1.5 ³H-胸腺嘧啶核苷掺入法和细胞计数测定细胞增殖

各组细胞于终止培养前 16 h 加入 ³H-胸腺嘧啶核苷 3.7×10^4 Bq/孔, 至相应的观察点后终止培养并按文献[5]方法收集细胞, 在 β 闪烁计数仪上测定 ³H-胸腺嘧啶核苷放射活性。细胞计数于观察终点时收集细胞, 0.5% 台盼蓝进行细胞染色, 血球计数器计数细胞。

1.6 细胞周期与细胞凋亡检测

将 VSMC 以 0.5% 饥饿血清处理 72 h 作为 0 点, 并按以上分组加入试剂分别处理 2、12 和 24 h, 然后消化收集细胞分装于测定管中。取沉淀细胞快速注入 75% 乙醇中固定, PBS 洗 2 次, 离心, 弃上液, 加 0.1 g/L RNase 100 μ L, 37℃水浴 30 min, PBS 洗 2 次, 加入碘化丙锭染液 0.5 mL, 4℃避光 30 min, 采用流式细胞仪进行细胞周期和细胞凋亡分析。细胞周期 G₀/G₁ 峰前出现典型的亚二倍体峰为细胞凋亡峰。

1.7 细胞外信号调节激酶 1 和丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶 1 mRNA 的表达检测

将 VSMC 传代于 24 孔培养板中, 按上述方案培养至终点。吸出培养液后加入 Trizol 试剂, 严格按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA。取 10 μ L RNA, 冰上依次加入 Oligo dT (0.5 g/L) 0.2 μ L, dNTP (10 mmol/L) 2.5 μ L, M-MLV 逆转录酶 (200 Mu/L) 0.5 μ L, RT buffer (5 $\times$) 4 μ L, RNasin (40 M/L) 0.5 μ L, 加 DEPC 水处理过的三蒸水将总体积补至 20 μ L。37℃水浴 30 min, 95℃放置 10 min 以灭活 M-MLV, 0℃放置 5 min。置于 -20℃保存备用。取 200 μ L 离心管, 以逆转录产物 5 μ L 作为模板, 分别加入上游引物 (50 mmol/L) 0.5 μ L, 下游引物 (50 mmol/L) 0.5 μ L, dNTP (10 mmol/L) 1 μ L, Taq 酶 (5 u/ μ L) 0.5 μ L, PCR Buffer (10 $\times$) 5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 5 μ L, 加三蒸水将总体积补至 50 μ L。加入液体石蜡 50 μ L, 瞬间离心混匀, 放入 PCR 仪, 95℃预变性, 91.6℃变性 45 s $\rightarrow$ 57℃退火 60 s $\rightarrow$ 72℃延伸 60 s, 30 个循环, 最后 72℃延伸 5 min。ERK-1 引物序列上游 5'-ACA CAT GCT TTG GGT CCT TC-3', 下游 5'-AGG AAC AGC TCA CAG CCC TA-3', 扩增产物长度为 883 bp; MKP-1 引物序列上游 5'-TCT GGA TTG TCG CTC CTT CT-3', 下游 5'-GTC TGC CTT GTG GTT GTC CT-3', 扩增产物长度为 619 bp; GAPDH 引物序列上游 5'-CAT CAC CAT CTT CCA GGA GCA-3', 下游 5'-TGA CCT TGC CCA CAG CCT TG-3', 扩增产物长度 443 bp。取 PCR 扩增产物行琼脂糖凝胶电泳, 紫外透射下观察, 出现特异性条带为阳性。采用 FR-980A 生物电泳图

像分析仪进行琼脂糖凝胶扫描和扩增条带光密度分析。以 GAPDH 作为内参照并计算 ERK-1 和 MKP-1 mRNA 的相对表达强度。

1.8 统计学分析

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料采用组间 t 检验, 计数资料采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 普罗布考对过氧化氢促血管平滑肌细胞增殖的影响

与空白对照组比较, 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 72 h 后吸光度值、细胞计数和 ^3H -TdR 掺入量均显著增加 ($P < 0.001$); 加入普罗布考 100 $\mu\text{mol/L}$ 后细胞增殖明显受抑制, 细胞计数、吸光度值和 ^3H -T-dR 掺入量分别下降了 46.9%、45.0% 和 39.5% ($P < 0.01$)。普罗布考作用 72 h 对 VSMC 生存无显著影响(表 1)。

表 1. 普罗布考对过氧化氢刺激血管平滑肌细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 级	吸光度值	细胞计数 ($\times 10^4$)	^3H -TdR (counts/min)
空白对照组	0.258 $\pm$ 0.018	1.075 $\pm$ 0.101	11220 $\pm$ 752
H_2O_2 组	1.022 $\pm$ 0.067 ^b	2.824 $\pm$ 0.490 ^b	32654 $\pm$ 2 819 ^b
普罗布考组	0.301 $\pm$ 0.098	1.299 $\pm$ 0.097	12870 $\pm$ 386
普罗布考+ H_2O_2 组	0.562 $\pm$ 0.016 ^a	1.501 $\pm$ 0.094 ^a	19750 $\pm$ 1 244 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与 H_2O_2 组比较; b 为 $P < 0.001$, 与空白对照组比较。

2.2 普罗布考对过氧化氢刺激下细胞周期和细胞凋亡的影响

经血清饥饿法同步处理 72 h 后作为 0 点(对照组), 此时 89.27% $\pm$ 8.55% 的 VSMC 处于 G_0/G_1 期, 10.73% $\pm$ 1.46% 处于 $\text{S}/\text{G}_2\text{M}$ 期, 细胞凋亡为 0.20% $\pm$ 0.05% (图 1)。加 H_2O_2 100 $\mu\text{mol/L}$ 继续培养逐渐进入分裂期, 与对照组比较, 24 h G_0/G_1 期细胞明显减少, $\text{S}/\text{G}_2\text{M}$ 期细胞明显增多, 细胞凋亡显

著增加(表 2 和图 2)。普罗布考+ H_2O_2 与 VSMC 共同培养 24 h 后细胞增殖周期受到明显抑制, G_0/G_1 期细胞明显增多 ($P < 0.05$)。普罗布考与 H_2O_2 共同作用 2 h 后 VSMC 凋亡显著增加, 24 h 凋亡达到高峰(表 2 和图 3)。

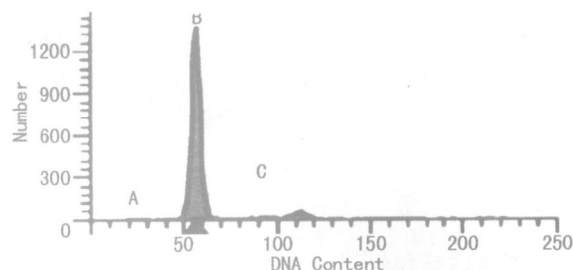


图 1. 0.5% 饥饿血清处理 72 h 细胞周期分析 A 为凋亡峰, B 为 G_0/G_1 期, C 为 $\text{S}/\text{G}_2\text{M}$ 期。

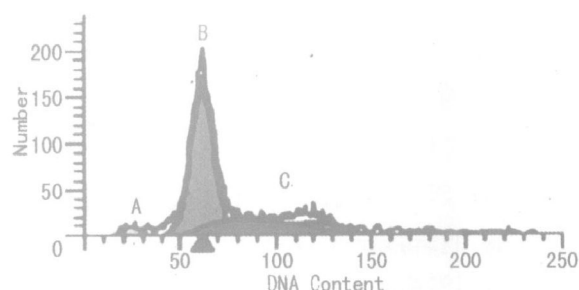


图 2. H_2O_2 作用 24 h 细胞周期和细胞凋亡分析 A 为凋亡峰, B 为 G_0/G_1 期, C 为 $\text{S}/\text{G}_2\text{M}$ 期。

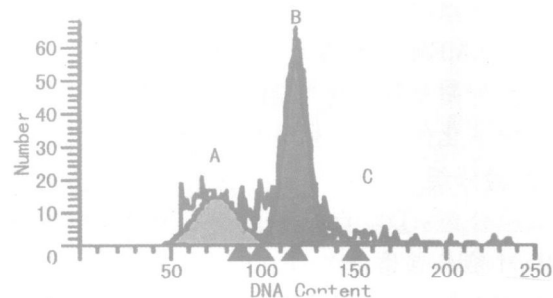


图 3. 普罗布考和 H_2O_2 共同作用 24 h 对血管平滑肌细胞细胞周期和细胞凋亡的影响 A 为凋亡峰, B 为 G_0/G_1 期, C 为 $\text{S}/\text{G}_2\text{M}$ 期。

表 2. 普罗布考对过氧化氢作用不同时间下细胞周期和细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

	对照组	2 h		12 h		24 h	
		H_2O_2	普罗布考+ H_2O_2	H_2O_2	普罗布考+ H_2O_2	H_2O_2	普罗布考+ H_2O_2
G_0/G_1	89.27% $\pm$ 8.55%	84.93% $\pm$ 7.52%	86.46% $\pm$ 9.18%	74.99% $\pm$ 7.14% ^a	80.80% $\pm$ 6.28% ^a	61.66% $\pm$ 5.99% ^a	88.44% $\pm$ 10.77% ^a
$\text{S}/\text{G}_2\text{M}$	10.73% $\pm$ 1.46%	15.07% $\pm$ 1.19%	14.44% $\pm$ 2.17%	25.01% $\pm$ 2.01% ^a	19.19% $\pm$ 2.10% ^a	38.34% $\pm$ 2.38% ^a	11.56% $\pm$ 1.51% ^a
细胞凋亡	0.20% $\pm$ 0.05%	1.46% $\pm$ 0.11%	4.19% $\pm$ 0.47% ^a	1.12% $\pm$ 0.43%	6.61% $\pm$ 0.88% ^a	2.58% $\pm$ 0.99% ^a	28.53% $\pm$ 2.49% ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组和过氧化氢组比较。

2.3 普罗布考对过氧化氢刺激下细胞外信号调节激酶 1 和丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶 1 mRNA 表达的影响

H₂O₂ 组 ERK-1 mRNA 表达量明显高于空白对照组 ($P < 0.001$); 加入普罗布考后, ERK-1 mRNA 表达量比 H₂O₂ 组约减少了 80% ($P < 0.001$)。H₂O₂ 组 MKP-1 mRNA 表达量明显低于空白对照组, 下降了 82.2% ($P < 0.05$); 加普罗布考后, MKP-1 mRNA 表达量较 H₂O₂ 组明显增加 ($P < 0.01$)。普罗布考对静息状态细胞的 ERK-1 mRNA 无明显影响, 但可以轻度增加 MKP-1 mRNA 表达 ($P < 0.05$; 图 4-7 和表 3)。

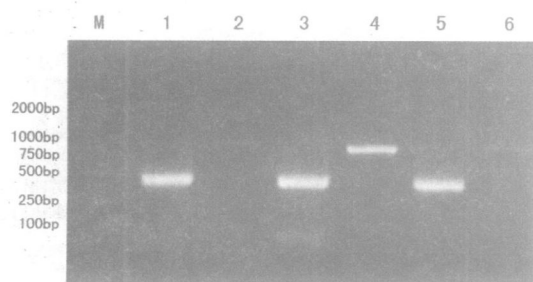


图 4. 过氧化氢对血管平滑肌细胞细胞外信号调节激酶 1 mRNA 表达的影响 1、3、5 为对照 GAPDH, 2 为对照组, 4 为普罗布考组, 6 为 H₂O₂ 组。

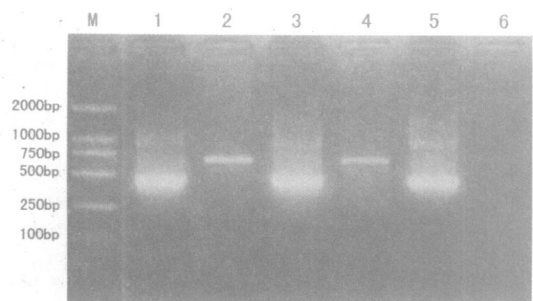


图 5. 过氧化氢对血管平滑肌细胞丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶 1 mRNA 表达的影响 1、3、5 为对照 GAPDH, 2 为对照组, 4 为普罗布考组, 6 为 H₂O₂ 组。

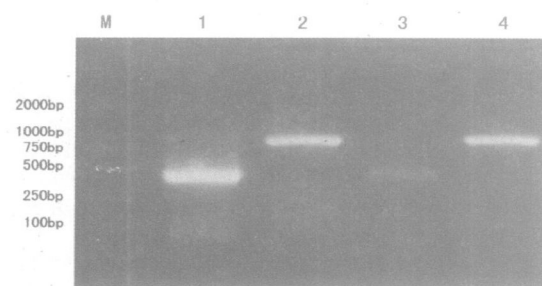


图 6. 普罗布考+ H₂O₂ 对血管平滑肌细胞细胞外信号调节激酶 1 mRNA 表达的影响 1、3 为对照 GAPDH, 2 为普罗布考+ H₂O₂ 组, 4 为 H₂O₂ 组。

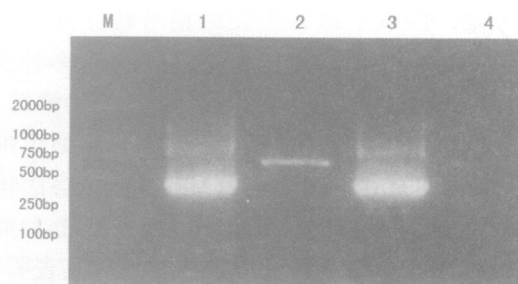


图 7. 普罗布考+ H₂O₂ 对血管平滑肌细胞丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶 1 的影响 1、3 为对照 GAPDH, 2 为普罗布考+ H₂O₂ 组, 4 为 H₂O₂ 组。

表 3. 普罗布考对 H₂O₂ 诱导细胞外信号调节激酶 1 和丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶 1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

分组	ERK-1	MKP-1
对照组	0.307 ± 0.017	0.314 ± 0.046
H ₂ O ₂ 组	2.067 ± 0.247 ^b	0.056 ± 0.019 ^b
普罗布考组	0.370 ± 0.089	0.537 ± 0.075 ^a
普罗布考+ H ₂ O ₂ 组	0.424 ± 0.072 ^d	0.128 ± 0.025 ^c

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.01$, d 为 $P < 0.001$, 与 H₂O₂ 组比较。

3 讨论

本研究结果发现, 100 μ mol/L H₂O₂ 能刺激大鼠 VSMC 增殖、DNA 合成和细胞周期运转, 增强 ERK-1 mRNA 转录表达, 降低 MKP-1 mRNA 表达。相反, 普罗布考降低 ERK-1 mRNA 转录表达、增强 MKP-1 mRNA 表达, 抑制 G₀/G₁ 期细胞向 S 期转变, 使 VSMC 生长停滞在 G₀/G₁ 期, 并大量诱导细胞凋亡。通过这些作用机制, 普罗布考有效地抑制了 H₂O₂ 刺激 VSMC 增殖。

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 在细胞分化、生长、凋亡以及在调节各种转录因子和基因表达等方面发挥重要作用。当 MAPK 分子内部 T-X-Y 磷酸化结构域 [X 可以是谷氨酸 (E)、脯氨酸 (P) 和甘氨酸 (G)] 中的苏氨酸 (T) 和酪氨酸 (Y) 残基磷酸化后, MAPK 被激活。活化结构域可以是 TEY、TPY 和 TGY。据此, 可将 MAPK 分为三种类型: ERK1/2、c-JNK 和 p38。ERK-1 和 ERK-2 在结构上高度相似, 多数情况下 ERK-1 和 ERK-2 的生物学功能基本相同。外界刺激因子通过活化 ERK 诱导细胞增殖。MKP-1 一般认为是 ERK 的负性调节酯酶, 通过使 ERK 磷酸化结构域中的丝/苏氨酸脱磷酸而灭活 ERK。

H_2O_2 是活性氧中最为重要的信号转导分子之一, 它既可以直接刺激细胞增殖, 也可以作为多种细胞外刺激因子的细胞内第二信号对 VSMC 的增殖、分化和凋亡发挥重要作用。研究表明, H_2O_2 通过蛋白激酶 C(PKC)-MAPK 激酶 1/2(MEK1/2) 通路活化 ERK1/2, 同时通过磷酸化和氧化作用灭活 MKP-1, 抑制 MPK-1 对 ERK 的脱磷酸化作用^[6]。本研究表明, H_2O_2 可以在转录水平上调节 ERK-1 和 MKP-1 转录表达。普罗布考是具有强抗氧化活性的降脂药, 其抑制 VSMC 增殖已有报道, 但是相关机制仍知之甚少。Komai 等^[7] 报道, 普罗布考可以抑制天然型脂蛋白(a) 向氧化型脂蛋白(a) 转化, 通过抗氧化作用减少氧化型脂蛋白(a) 生成, 抑制氧化型脂蛋白(a) 对 ERK 的磷酸化作用和 VSMC 增殖, 说明普罗布考的抗氧化活性仍然是抑制 VSMC 增殖的机制之一。最近, 涂永生等^[8] 报道普罗布考抑制氧化型低密度脂蛋白诱导 VSMC 增殖与细胞增殖周期有关。普罗布考通过下调细胞周期素 D1 蛋白表达, 阻断细胞周期 G_0/G_1 期向 S 期转换, 从而抑制细胞周期运转和细胞增殖。本研究中流式细胞分析也发现普罗布考可以抑制 G_0/G_1 期向 S 转换, 使大量 VSMC 生长停滞在细胞的 G_0/G_1 期, 提示普罗布考也可能以同样的机制抑制 H_2O_2 刺激 VSMC 增殖。在本研究中我们进一步考察了普罗布考与信号蛋白 ERK-1 和 MKP-1 之间的关系, 因为有报道, 细胞周期素 D1 是 ERK1/2 下游信号中的主要靶目标, 为各种生长因子刺激条件下细胞周期推进通过 G_1/S 检测点所必需^[9]。磷酸化的 ERK1/2 可以通过激活细胞周期素 D1 启动子在转录水平上调控细胞周期素 D1 表达, 而抑制 ERK 表达或其蛋白活性即可通过降低细胞周期素 D1 转录抑制细胞周期运转。本研究结果发现, 普罗布考对 H_2O_2 刺激条件下 ERK-1 mRNA 转录表达上调和 MKP-1 mRNA 表达下调均有抑制作用, 说明普罗布考通过降低 ERK-1 mRNA 表达和增强 MKP-1 mRNA 表达抑制 VSMC 增殖。总之, 我们的研究表明, 普罗布考抑制细胞周期素 D1 上游信号分子 ERK-1 表达可能是抑制细胞周期运转, 继而抑制 VSMC 增殖的关键机制。

在研究中我们还发现普罗布考能诱导部分 VSMC 凋亡, 这表明诱导细胞凋亡是普罗布考抑制 H_2O_2 刺激 VSMC 增殖的另一重要机制。关于普罗布考诱导 VSMC 凋亡的机制目前仍不十分清楚。在介入损伤动物模型中发现, 普罗布考通过上调 VSMC 血红素氧合酶 1(heme oxygenase-1, HO-1) 表达

分解血红素产生一氧化碳、胆绿素和胆红素, 并通过分解产物一氧化碳等诱导血管中膜平滑肌细胞凋亡, 抑制血管内膜增生^[10,11]。但是, 有报道利用其他方法虽然可以通过提高 HO-1 表达诱导细胞生长静止, 抑制 VSMC 增殖, 但并不诱导 VSMC 凋亡^[12,13]。因此, 普罗布考诱导细胞凋亡是否完全依赖于 HO-1 还有待于进一步阐明。

综上所述, 我们的研究资料表明, 普罗布考通过下调 ERK-1 mRNA 表达抑制细胞周期运转和诱导凋亡两种机制抑制 VSMC 增殖。但是, 这两种机制之间有无关联, 普罗布考通过什么机制诱导 VSMC 凋亡目前尚不清楚, 有待于深入研究。

[参考文献]

- [1] Tabet F, Schiffrin EL, Touyz RM. Mitogen-activated protein kinase activation by hydrogen peroxide is mediated through tyrosine kinase-dependent, protein kinase C-independent pathways in vascular smooth muscle cells: upregulation in spontaneously hypertensive rat [J]. *J Hypertens*, 2005, **23** (11): 1961-1962.
- [2] 盛林, 潘其兴, 刘亚军, 于爱琴, 马玉林, 杨凯. Probuco 对碱性成纤维细胞生长因子和过氧化氢促大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2001, **17** (6): 515-518.
- [3] Choy K, Beck K, Png FY, Wu BJ, Leichtweis SB, Thomas SR, et al. Processes involved in the site-specific effect of probucol on atherosclerosis in apolipoprotein E gene knockout mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25** (8): 1684-690.
- [4] Tardif JC, Grégoire J, Schwartz L, Laramée L, Reeves F, et al. Effects of AGF1067 and probucol after percutaneous coronary interventions [J]. *Circulation*, 2003, **107** (4): 552-558.
- [5] Jiang B, Xu S, Brecher P, Cohen RA. Growth factors enhance interleukin-1 β induced persistent activation of nuclear factor- κ B in rat vascular smooth muscle cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (11): 1811-816.
- [6] Lee KH, Lim S, Kang SM, Kim DH, Cho HK, Chung JH, et al. Antiproliferative mechanisms of raxofelast (IRFF016) in H_2O_2 -stimulated rat aortic smooth muscle cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, **484** (2-3): 119-125.
- [7] Komai N, Morishita R, Yamada S, Oishi M, Iguchi S, Aoki M, et al. Mitogenic activity of oxidized lipoprotein (a) on human vascular smooth muscle cells [J]. *Hypertension*, 2002, **40** (3): 310-314.
- [8] 涂永生, 严鹏科, 朱炳阳, 黄红林, 廖端芳. 普罗布考抑制大鼠血管平滑肌细胞周期素 D1 蛋白表达和 $G_1 \rightarrow S$ 转换[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (6): 676-680.
- [9] Shukla N, Rowe D, Hinton J, Angelini GD, Jeremy JY. Calcium and the replication of human vascular smooth muscle cells: studies on the activation and translocation of extracellular signal regulated kinase (ERK) and cyclin D1 expression [J]. *Eur J Pharmacol*, 2005, **509** (1): 21-30.
- [10] Deng YM, Wu BJ, Witting PK, Stocker R. Probuco protects against smooth muscle cell proliferation by upregulating heme oxygenase-1 [J]. *Circulation*, 2004, **110** (13): 1855-860.
- [11] Wu BJ, Kathir K, Witting PK, Beck K, Choy K, Li C, et al. Antioxidants protect from atherosclerosis by a heme oxygenase-1 pathway that is independent of free radical scavenging [J]. *J Exp Med*, 2006, **203** (4): 1117-127.
- [12] Li W, Tanaka K, Morioka K, Uesaka T, Yamada N, Takamori A, et al. Thymidine phosphorylase gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating heme oxygenase-1 and p27 KIP1 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25** (7): 1370-375.
- [13] Choi BM, Kim YM, Jeong YR, Pae HO, Song CE, Park JE, et al. Induction of heme oxygenase-1 is involved in antiproliferative effects of paclitaxel on rat vascular smooth muscle cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **321** (1): 132-137.

(此文编辑 文玉珊)