

[文章编号] 1007-3949(2010)18-07-0527-05

• 实验研究 •

藤黄酸通过阻抑表皮生长因子受体酪氨酸磷酸化抑制大鼠主动脉平滑肌细胞增殖

刘勇^{1,2}, 林美², 李雯¹, 何延政², 施森², 曾宏², 王深明¹

(1. 中山大学附属第一医院血管外科, 广东省广州市 510080; 2. 泸州医学院附属医院血管外科, 四川省泸州市 646000)

[关键词] 藤黄酸; 表皮生长因子受体; 酪氨酸磷酸化; 血管平滑肌细胞

[摘要] 目的 探讨藤黄酸对表皮生长因子诱导大鼠主动脉平滑肌细胞增殖的作用及其机制。方法 CCK8法和³H-胸腺嘧啶掺入法检测不同浓度藤黄酸(0.25、0.5、1.0及2.0 μmol/L)对表皮生长因子诱导的血管平滑肌细胞增殖的影响, 流式细胞仪检测不同浓度藤黄酸对表皮生长因子诱导的细胞周期转换的影响, Western blotting检测不同浓度藤黄酸对表皮生长因子诱导的表皮生长因子受体和酪氨酸磷酸化的作用, 斑点结合检测藤黄酸是否在体外表皮生长因子结合进而影响其活性。结果 藤黄酸抑制表皮生长因子诱导的血管平滑肌细胞增殖和DNA合成, 藤黄酸抑制表皮生长因子诱导的血管平滑肌细胞周期的演进, 藤黄酸抑制表皮生长因子受体和酪氨酸磷酸化, 表皮生长因子在体外并不与藤黄酸结合。结论 藤黄酸通过对表皮生长因子受体磷酸化的抑制进而抑制表皮生长因子诱导的血管平滑肌细胞增殖, 这种抑制可能是通过直接抑制酪氨酸磷酸化引起的, 而不是通过藤黄酸与表皮生长因子受体结合引起的。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Gambogic Acid Inhibits Cell Proliferation via Suppressing Epithelial Growth Factor Receptor Tyrosine Phosphorylation in Rat Aortic Smooth Muscle Cell

LIU Yong^{1,2}, LIN Mei², LI Wen¹, HE Yan-Zheng², SHI Sen², ZENG Hong², and WANG Shen-Ming¹

(1. The First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China; 2. Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[KEY WORDS] Gambogic Acid; Epithelial Growth Factor Receptor; Tyrosine Phosphorylation; Vascular Smooth Muscle Cell**[ABSTRACT]** **Aim** To investigate the effects of gambogic acid (GA) on rat vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation and migration stimulated by epithelial growth factor (EGF) and its underlying molecular mechanism.

Methods The inhibitory effect of GA at various concentration on the proliferation induced by EGF was measured by using CCK8 assay and ³H-thymidine incorporation. The effects of GA on the cell cycle progression stimulated by EGF were analyzed by flow cytometry. The effect of GA on EGF receptor (EGFR) and p-Tyrosine was measured by Western blotting. The capacity of GA binding with EGF was also measured. **Results** GA inhibited EGF-induced ³H-thymidine incorporation into DNA and proliferation on VSMC. The cell cycle progression was blocked significantly in the GA pretreated cells. GA significantly inhibited expression of p-EGFR, p-Tyrosine stimulated by EGF compared with the control group without GA. Dot binding assay shown that a negative binding signal was detected on the GA and BSA spot incubated with EGF. **Conclusions** These observations show that inhibition effects on VSMC proliferation of GA are mediated by the inhibition of EGFR tyrosine phosphorylation. The inhibitory effects of GA are due to directly tyrosine phosphorylation inhibition, rather than binding with EGF.

血管平滑肌细胞异常的增殖和迁移在动脉硬化和血管损伤后再狭窄中起着重要的作用。表皮生长因子 (epithelial growth factor, EGF) 是已知重要的

血管平滑肌细胞异常增殖与迁移的刺激因子^[1,2]。EGF和EGF受体(EGFR)接到的信号通路在血管重塑和血管损伤后新生内膜形成中起着极其重要的作用^[3]。因此,在病变形成过程中,它常被作为一个药物治疗战略的靶点。藤黄树产自中国及东南亚地区,中医药文献报道藤黄树脂具有较强的止血、抗炎、抗氧化和抗感染作用。藤黄酸(gambogic acid, GA)是藤黄树脂中提取的有效成分,既往研究报道藤黄酸可通过抑制AKT、ERK、c-Src、FAK和VEGFR2等起到较强的抗癌、抗炎和抑制血管新生的作

[收稿日期] 2010-05-10

[修回日期] 2010-07-09

[作者简介] 刘勇,主治医师,博士研究生,主要从事动脉粥样硬化发病机制研究,Email为 lyong74@163.com。通讯作者王深明,博士,主任医师,教授,博士研究生导师,主要研究方向为周围血管疾病的基础与临床,Email为 Shenmingwang@vip.sohu.com。何延政,博士,主任医师,教授,硕士研究生导师,主要研究方向为周围血管疾病的基础与临床,Email为 heyanzheng@163.com。

用^[4-7]。本研究旨在探讨藤黄酸对 EGF 诱导的血管平滑肌细胞增殖及迁移的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

SD 雄性大鼠, 120~140 g 由中山大学中山医学院动物中心提供。EGF 购自 R&D 公司, 胎牛血清购自 Gibco 公司, CCK8 检测试剂盒购自上海同仁化学研究所, BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司, 藤黄酸为中国药科大学郭青龙教授惠赠。³H-胸腺嘧啶苷购自中国同位素公司, 碘化丙锭 (PI) 购自 Sigma 公司。兔抗大鼠 EGFR 单克隆抗体、兔抗大鼠 pT-EGFR 单克隆抗体购自 Bioworld 公司, 小鼠抗大鼠磷酸化酪氨酸 (pTyr) 单克隆抗体购自 CST 公司, 小鼠抗大鼠 EGF 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司, GAPDH、小鼠抗大鼠 α -actin 抗体购自武汉博士德公司。

1.2 大鼠主动脉平滑肌细胞的分离培养与鉴定

取 SD 大鼠胸主动脉, 在无菌条件下, 剪开胸主动脉, 剥去内外膜, 取中膜按组织块培养法接种于细胞培养瓶, 用含 10% 胎牛血清、100 u/L 青霉素和链霉素的 DMEM 的培养基, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。经形态学和免疫组织化学证实为平滑肌细胞。实验用第 3~8 代细胞。

1.3 平滑肌细胞增殖检测

将平滑肌细胞按 1×10^4 个/孔加入 96 孔板中, 次日贴壁后, 换用无血清培养基培养 24 h 按终浓度 0.25、0.5、1.0 及 2.0 μ mol/L 加入藤黄酸处理 24 h 后, 再每孔加入 EGF (10 μ g/L), 24 h 后每孔加入 20 μ L WST-8 继续培养 4 h 后, 在酶联免疫检测仪上 (450 nm) 测各孔的 OD 值。每组设 3 个复孔。

1.4 DNA 合成检测

将平滑肌细胞按 5×10^4 个/孔加入 6 孔板, 次日贴壁后换用无血清培养基培养 24 h 每组设 3 个复孔。各组细胞加入相应浓度的藤黄酸处理 24 h 后, 再在相应各组加入 EGF (10 μ g/L) 继续培养 24 h 终止培养。终止培养前每孔加入 ³H-胸腺嘧啶核苷 (1 mCi/L), 在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱继续孵育 16 h。吸取培养基, 4℃预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次。然后用 10% 三氯醋酸和乙醇/乙醚混合液洗涤细胞, 然后用 1.0 mol/L NaOH 溶液 500 μ L, 并反复吹打使其溶解于含有 ³H-胸腺嘧啶核苷的酸溶液。收集 400 μ L 上述液体加入 3 mL 液相闪烁试剂中, 液相闪烁仪读取每孔的 CPM 值。

1.5 细胞周期检测

6 孔板培养的平滑肌细胞长至 70%~80% 时, 换用无血清培养基继续培养 24 h 每组 3 瓶, 分组同上。各组细胞加入相应浓度的藤黄酸处理 24 h 后, 再在相应各组加入 EGF (10 μ g/L) 继续培养 24 h 终止培养。细胞胰酶消化后, 10% FBS 终止消化, 细胞收集于 15 mL 离心管内离心, 1000 r/min 离心 3 min, 5 mL PBS 重悬细胞, 1000 r/min 离心 3 min, PBS 洗涤 2 次, 弃去 PBS 70% 酒精固定, 4℃过夜, 1000 r/min 离心 5 min, 弃酒精。2 mL PBS 重悬细胞, 洗涤 2 次, 1000 r/min 离心 5 min, 弃去 PBS, PI 溶液 500 μ L (PI 20 mg/L, RNA 酶 20 mg/L, 0.1% Triton-x-100) 4℃避光染色 1 h。上机进行细胞周期分析, FCM 计数 10000 个细胞, G0/G1 期为静止期, G2/M + S 期为增殖期。

1.6 Western blotting 检测蛋白的表达

血管平滑肌细胞以无血清培养基培养 24 h 后, 各组加入相应浓度的藤黄酸培养 24 h 给予 EGF (10 μ g/L) 刺激 5 min 后提取总蛋白^[8,9]。将抽提的蛋白按每孔 20 μ L 在 10% SDS-PAGE 电泳进行蛋白分离, 然后电转到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉-TBST 室温封闭 1 h, PVDF 膜分别与小鼠抗大鼠 pTyr、兔抗大鼠 EGFR 和 pT-EGFR (1:1000)、GAPDH 抗体 (1:5000) 4℃孵育过夜。PVDF 膜用 10 mL TBST 液洗 10 min, 共 3 次。再与 HRP 标记的羊抗兔 IgG、抗小鼠 IgG (1:5000) 37℃孵育 1 h。特异性蛋白条带应用化学发光法进行检测, 胶片曝光洗片后进行半定量分析。

1.7 Dot-binding 实验

按 Lo 等^[10]的方法, 取硝酸纤维素膜, 用铅笔标记直径为 0.5 cm 的圆形区域, 在转膜液中浸泡 30 s 晾干。将重组的 EGF 蛋白和藤黄酸分别稀释成 10 mg/L 和 0.4 g/L, 分别将 5 μ L EGF 和藤黄酸以及 BSA 按照 EGF、藤黄酸、BSA 的顺序滴在膜上, 晾干。将膜放入含 5% BSA 的 PBS 中, 室温封闭 30 min, 用 PBS 洗膜, 每次 5 min, 洗 3 次。将 EGF 蛋白用 PBS 稀释为 0.5 mg/L, 室温下与膜反应 1 h, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。将膜与 EGF 一抗反应, 室温 1 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。室温下与相应的 HRP-二抗反应 1 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。暗房中向膜上滴加 ECL 发光液, 胶片覆盖压片, 胶片置于显影液中, 待胶片显影条带清晰时, 置于定影液中定影, 扫描仪扫描蛋白条带。

1.8 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差

分析, 两组间比较用 q 检验。

2 结果

2.1 藤黄酸对 EGF 诱导的血管平滑肌细胞增殖的影响

无血清培养基加入 $2.0 \mu\text{mol/L}$ 藤黄酸后, 与对照组相比 CCK8 值仅轻度下降 ($P > 0.05$); 给予 $10 \mu\text{g/L}$ EGF 刺激 24 h 后, CCK8 值显著上升 ($P < 0.01$); 但在给予藤黄酸处理后, 与 EGF 组比较, CCK8 值随藤黄酸浓度增加而逐渐下降 ($P < 0.01$; 表 1)。

2.2 藤黄酸对 EGF 诱导的血管平滑肌细胞 DNA 合成的影响

无血清培养基加入 $2.0 \mu\text{mol/L}$ 藤黄酸后, 与对照组相比 CPM 值仅轻度下降 ($P > 0.05$); 给予 $10 \mu\text{g/L}$ EGF 刺激 24 h 后, CPM 值显著上升 ($P < 0.01$); 但在给予藤黄酸处理后, 与 EGF 组比较, CPM 随藤黄酸浓度增加而逐渐下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 抑制率分别达到 29.1%、42.8%、47.4% 和 62.5% (表 1)。

表 1 藤黄酸对 EGF 诱导的血管平滑肌细胞增殖和 DNA 合成的作用 ($n = 3$)

分 组	CCK8 值	CPM 值
空白对照组	0.363 ± 0.071	6293.0 ± 536.4
藤黄酸组	0.349 ± 0.062	6060.3 ± 683.9
EGF 组	0.876 ± 0.041^a	16623.3 ± 800.9^a
EGF + $0.25 \mu\text{mol/L}$ 藤黄酸组	0.712 ± 0.084	11800.0 ± 424.4^b
EGF + $0.5 \mu\text{mol/L}$ 藤黄酸组	0.537 ± 0.084^c	9506.0 ± 650.4^c
EGF + $1.0 \mu\text{mol/L}$ 藤黄酸组	0.477 ± 0.050^c	8740.0 ± 515.2^c
EGF + $2.0 \mu\text{mol/L}$ 藤黄酸组	0.381 ± 0.054^c	6241.9 ± 753.5^c

a 为 $P < 0.01$ 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$ c 为 $P < 0.01$ 与 EGF 组比较。

2.3 藤黄酸对 EGF 诱导的血管平滑肌细胞周期的影响

无血清培养基加入 $2.0 \mu\text{mol/L}$ 藤黄酸后, 与对照组相比, 增殖期细胞轻度减少 ($P > 0.05$); $10 \mu\text{g/L}$ EGF 刺激 24 h 后, 增殖期细胞数显著上升 ($P < 0.01$), 而不同浓度藤黄酸处理的血管平滑肌细胞细胞周期进程受到明显的抑制 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; 表 2 和图 1)。

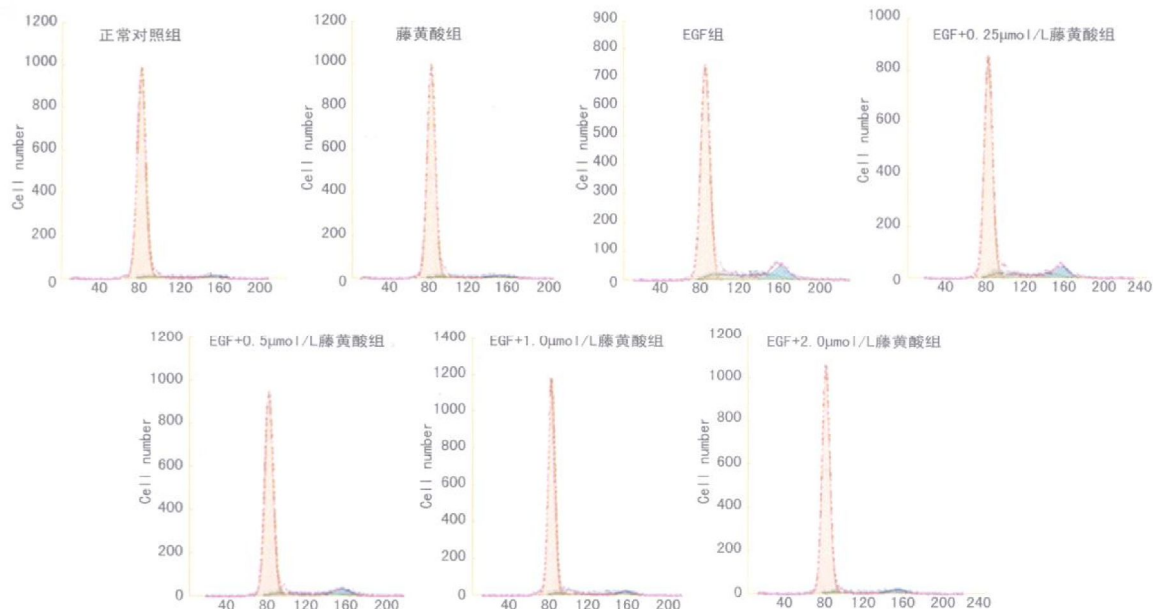


图 1 藤黄酸对 EGF 诱导的血管平滑肌细胞周期的影响

2.4 藤黄酸对 EGF 诱导的 EGFR、pEGFR 及 pTyr 表达的影响

无血清培养基的血管平滑肌细胞 pEGFR 和

pTyr 表达水平较低, EGF 刺激后其表达水平迅速升高 ($P < 0.01$)。不同浓度藤黄酸处理组 pEGFR 和 pTyr 随着藤黄酸浓度上升其表达水

平呈浓度依赖性下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而 EGFR 表达没有明显的变化 (表 3 和图 2)。

表 2 藤黄酸对 EGF 诱导的血管平滑肌细胞细胞周期的影响 ($n = 3$)

分 组	G2/M + S 期细胞	G0/G1 期细胞
空白对照组	7.4% $\pm$ 2.9%	91.6% $\pm$ 8.3%
藤黄酸组	6.4% $\pm$ 1.9%	93.6% $\pm$ 7.8%
EGF 组	23.2% $\pm$ 4.7% ^a	76.8% $\pm$ 5.9%
EGF + 0.25 μ mol/L 藤黄酸组	18.8% $\pm$ 3.7% ^b	81.2% $\pm$ 6.4%
EGF + 0.5 μ mol/L 藤黄酸组	13.3% $\pm$ 2.4% ^c	86.7% $\pm$ 5.9%
EGF + 1.0 μ mol/L 藤黄酸组	10.4% $\pm$ 1.9% ^c	89.6% $\pm$ 7.5%
EGF + 2.0 μ mol/L 藤黄酸组	7.5% $\pm$ 1.5% ^c	92.5% $\pm$ 8.7%

a 为 $P < 0.01$ 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$ c 为 $P < 0.01$ 与 EGF 组比较。

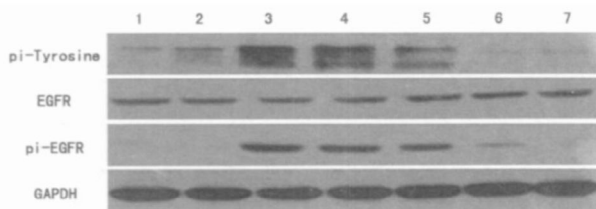


图 2 藤黄酸对 EGF 诱导的 EGFR、p-EGFR 及 p-Tyrosine 表达的影响 1 为空白对照组, 2 为藤黄酸组, 3 为 EGF 组, 4 为 EGF + 0.25 μ mol/L 藤黄酸组, 5 为 EGF + 0.5 μ mol/L 藤黄酸组, 6 为 EGF + 1.0 μ mol/L 藤黄酸组, 7 为 EGF + 2.0 μ mol/L 藤黄酸组。

表 3 藤黄酸对 EGF 诱导的 p-EGFR 和 p-Tyrosine 的影响 ($n = 3$)

分 组	p-EGFR	p-Tyrosine
空白对照组	9.0% $\pm$ 4.70%	14.2% $\pm$ 4.69%
藤黄酸组	8.5% $\pm$ 3.62%	14.7% $\pm$ 3.9%
EGF 组	85.70% $\pm$ 6.80% ^a	101.01% $\pm$ 9.83% ^a
EGF + 0.25 μ mol/L 藤黄酸组	73.70% $\pm$ 4.71% ^b	81.97% $\pm$ 6.57% ^b
EGF + 0.5 μ mol/L 藤黄酸组	51.53% $\pm$ 5.10% ^c	70.35% $\pm$ 6.53% ^c
EGF + 1.0 μ mol/L 藤黄酸组	37.70% $\pm$ 5.79% ^c	38.56% $\pm$ 6.58% ^c
EGF + 2.0 μ mol/L 藤黄酸组	11.02% $\pm$ 5.00% ^c	16.30% $\pm$ 6.24% ^c

a 为 $P < 0.01$ 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$ c 为 $P < 0.01$ 与 EGF 组比较。

2.5 藤黄酸与 EGF 的斑点结合情况

EGF 吸附处斑点阳性, 而藤黄酸斑点处和作为对照组的 BSA 斑点处均未有 EGF, 提示藤黄酸与 EGF 未发生结合 (图 3)。

3 讨论

血管平滑肌细胞的异常增殖及其从中膜向内膜的迁移在动脉粥样硬化形成和血管成形术后再狭窄

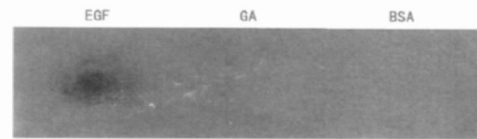


图 3 藤黄酸与 EGF 的斑点结合实验

中起着核心的作用^[11]。EGF 是已知的最重要的促进血管平滑肌细胞增殖与迁移的细胞因子之一。大量的证据表明, 在血管损伤后血管壁的重塑和新生内膜形成中 EGF 及 EGFR 所介导的信号通路起着非常重要的作用。而且, 通过抑制 EGF 信号进而阻止动脉粥样硬化形成已经在不同的动物模型上均得到了验证^[12-12]。因此, 在动脉粥样硬化形成过程中, 抑制 EGF 介导的血管平滑肌细胞增殖和迁移是一个关键的药理学战略。

既往报道藤黄酸具有通过抑制细胞增殖进而达到抗癌、抗炎和抑制血管新生的作用。本研究发现, 在给予藤黄酸预处理后, EGF 诱导的血管平滑肌细胞增殖和 DNA 合成受到了明显的抑制, 并且呈浓度依赖性。应用流式细胞仪检测发现藤黄酸抑制 EGF 诱导的血管平滑肌细胞增殖是通过抑制其从 G0/G1 期向 G2/M 期转化而达到的。

虽然 EGFR 在正常成人的动脉壁中表达水平非常低, 但是在动脉硬化早期和血管成形内皮细胞模型中其表达却明显升高^[2]。EGF 参与了血管形成和动脉移植术后病变动脉的新生内膜形成^[13]。通过应用 EGFR 特异性抗体、EGF 信号转导的各种化学抑制剂以及 EGFR 的反义寡核苷酸发现它们均能抑制新生内膜的形成^[13-15]。这些研究结果和本研究结果提示 EGFR 极有可能就是藤黄酸抑制血管平滑肌细胞增殖的作用靶点。为验证这种设想, 本研究检测了藤黄酸对 EGF 激活的 EGFR 表达的影响, 结果发现藤黄酸确实以浓度依赖方式抑制 EGF 诱导的 EGFR 磷酸化。藤黄酸导致 EGF 诱导的 EGFR 磷酸化表达下降, 其可能机制有以下两方面: 像酪氨酸抑制剂 AG1296 一样, 导致 EGFR 的 ATP 结合位点的构像改变, 进而抑制酪氨酸的磷酸化^[16-17]。

④藤黄酸与 EGF 结合从而导致 EGF 与 EGFR 结合受阻, 进而导致 EGFR 酪氨酸磷酸化受到抑制。如番茄红素与 PDGF-BB 结合进而影响了 PDGF-BB 的活性从而导致 PDGFR 磷酸化障碍一样^[8]。为进一步明确藤黄酸抑制 EGFR 磷酸化的机制, 本研究分别检测了磷酸化酪氨酸的表达和藤黄酸与 EGF 有无结合的斑点结合实验。结果发现藤黄酸与抑制 EGFR 磷酸化一样以浓度依赖方式抑制了 EGF 诱导

的血管平滑肌细胞酪氨酸磷酸化。而斑点结合实验结果显示,藤黄酸并不与 EGF 发生结合。因此,我们认为藤黄酸抑制 EGF 诱导的 EGFR 磷酸化表达,其可能机制是像酪氨酸抑制剂 AG1296 一样^[16],抑制了酪氨酸激酶的活化,进而抑制了信号通路的传递。

藤黄酸抑制 EGF 诱导的大鼠主动脉平滑肌细胞增殖,这种对增殖的抑制作用是通过阻止细胞周期演进来达到的。藤黄酸是通过抑制 EGFR 酪氨酸磷酸化的表达来达到抑制平滑肌细胞增殖和迁移的。这种抑制作用不是通过藤黄酸与 EGF 结合而可能是藤黄酸直接影响酪氨酸磷酸化来实现的。

[参考文献]

- [1] Igura T, Kawata S, Miyagawa J, et al. Expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in neointimal cells induced by balloon injury in rat carotid arteries [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996 **16** (12): 1524-531
- [2] Majr TC, Keiser JA. Inhibition of cell growth effects of the tyrosine kinase inhibitor CGP53716 [J]. *J Pharmacol Exp Ther* 1997 **283** (1): 402-410
- [3] Pastore CJ, Isner JM, Bacha PA, et al. Epidermal growth factor receptor-targeted cytotoxin inhibits neointimal hyperplasia in vivo: Results of local versus systemic administration [J]. *Circ Res* 1995 **77** (3): 519-529
- [4] Wang X, Chen Y, Han QB, et al. Proteomic identification of molecular targets of gambogic acid: role of statin in hepatocellular carcinoma [J]. *Proteomics* 2009 **9** (2): 242-253
- [5] Pandey MK, Sung B, Ahn KS, et al. Gambogic acid: a novel ligand for transferrin receptor potentiates TNF-induced apoptosis through modulation of the nuclear factor-kappaB signaling pathway [J]. *Blood* 2007 **110** (10): 3517-525
- [6] Lu N, Yang Y, You QD, et al. Gambogic acid inhibits angiogenesis through suppressing vascular endothelial growth factor-induced tyrosine phosphorylation of KDR/Fk-1 [J]. *Cancer Lett* 2007 **258** (1): 80-89
- [7] Li R, Chen Y, Zeng LL, et al. Gambogic acid induces G0/G1 arrest and apoptosis involving inhibition of SRC-3 and inactivation of Akt pathway in K562 leukemia cells [J]. *Toxicology* 2009 **262** (2): 98-105
- [8] Yoshida Y, Mitsumata M, Ling G, et al. Migration of medial smooth muscle cells to the intima after balloon injury [J]. *Ann NY Acad Sci* 1997 **811** (4): 459-470
- [9] Kames A, Vesti BR, Daum G, et al. Heparin blockade of thrombin-induced smooth muscle cell migration involves inhibition of epidermal growth factor (EGF) receptor transactivation by heparin-binding EGF-like growth factor [J]. *Circ Res* 2000 **87** (2): 92-98
- [10] Lo HM, Hung CF, Tseng YL, et al. Lycopene binds PDGF-BB and inhibits PDGF-BB-induced intracellular signaling transduction pathway in rat smooth muscle cells [J]. *Biochem Pharmacol* 2007 **74** (1): 54-63
- [11] Hunter T, Cooper JA. Epidermal growth factor induces rapid tyrosine phosphorylation of proteins in A431 human tumor cells [J]. *Cell* 1981 **24** (3): 741-752
- [12] 尹小龙, 朱艳霞, 姚雨凡, 等. 表皮生长因子受体在血管紧张素 II 促血管平滑肌细胞增殖中的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006 **14** (9): 783-785
- [13] Chan AK, Kames A, Hawkins S, et al. Blockade of the epidermal growth factor receptor decreases intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery [J]. *J Vasc Surg* 2003 **37** (3): 644-649
- [14] Soares R, Guo S, Gartner F, et al. 17 beta-estradiol-mediated vessel assembly and stabilization in tumor angiogenesis requires TGF-beta and EGFR crosstalk [J]. *Angiogenesis* 2003 **6** (4): 271-281
- [15] Merklinger SL, Jones PL, Martinez EC, et al. Epidermal growth factor receptor blockade mediates smooth muscle cell apoptosis and improves survival in rats with pulmonary hypertension [J]. *Circulation* 2005 **112** (3): 423-431
- [16] Tanimoto T, Lungu AO, Berk BC. Sphingosine 1-phosphate transactivates the platelet-derived growth factor beta receptor and epidermal growth factor receptor in vascular smooth muscle cells [J]. *Circ Res* 2004 **94** (8): 1050-058
- [17] 汪洋, 徐和靖, 王万铁, 等. 酪氨酸激酶和蛋白激酶 C 参与高铁血红素诱导的抗大鼠心肌缺血再灌注损伤 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007 **15** (2): 93-97

(此文编辑 文玉珊)