

# 活性氧不参与二氯化钴诱导的人肺动脉平滑肌细胞增殖

杨春涛<sup>1</sup>, 蔡典其<sup>1</sup>, 白洪波<sup>1</sup>, 刘国辉<sup>1</sup>, 刘筱蔼<sup>1</sup>, 许继德<sup>1</sup>, 李运泉<sup>2</sup>

(1. 广州医科大学生理教研室, 广东省广州市 510182; 2. 中山大学附属第一医院心血管儿科, 广东省广州市 510080)

[关键词] 肺动脉高压; 平滑肌细胞; 活性氧; 二氯化钴; 增殖; 缺氧

[摘要] **目的** 探讨活性氧是否参与二氯化钴诱导的人肺动脉平滑肌细胞(HPASMC)过度增殖。**方法** 用化学性缺氧模拟剂二氯化钴处理 HPASMC, 建立缺氧性肺动脉高压血管重塑的细胞模型。用外源性活性氧供体过氧化氢处理 HPASMC, 观察活性氧对细胞增殖的影响; 活性氧清除剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC)预处理 HPASMC, 观察其对二氯化钴或过氧化氢诱导的细胞增殖的改善作用; 应用细胞计数试剂盒 8 检测细胞增殖, Western blot 检测缺氧诱导因子 1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )蛋白的表达, 双氯荧光素染色和荧光照相术检测细胞内活性氧的含量。**结果** 在 25 ~ 50  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围内, 二氯化钴处理 24 h 可诱导 HPASMC 增殖, 50  $\mu\text{mol/L}$  二氯化钴处理 24 h 可使细胞内 HIF-1 $\alpha$  的水平明显增加; 与二氯化钴的作用类似, 过氧化氢在 12 ~ 25  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围内处理 24 h 也可引起细胞增殖, 但不改变 HIF-1 $\alpha$  的水平; 在二氯化钴或过氧化氢处理前, 用不同浓度的 NAC 预处理, 在 1 500  $\mu\text{mol/L}$  浓度时, NAC 预处理可明显抑制过氧化氢诱导的 HPASMC 过度增殖( $P < 0.05$ ), 而对二氯化钴诱导的细胞增殖则无明显影响( $P > 0.05$ ); 另外, 50  $\mu\text{mol/L}$  二氯化钴处理 6 ~ 24 h 对细胞内活性氧的含量无明显影响( $P > 0.05$ )。**结论** 化学性缺氧可诱导 HPASMC 过度增殖, 其机制可能不依赖于活性氧。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Reactive Oxygen Species May Not Be Involved in the Cellular Proliferation Induced by Cobalt Chloride in HPASMC

YANG Chun-Tao<sup>1</sup>, CAI Dian-Qi<sup>1</sup>, BAI Hong-Bo<sup>1</sup>, LIU Guo-Hui<sup>1</sup>, LIU Xiao-Ai<sup>1</sup>, XU Ji-De<sup>1</sup>, and LI Yun-Quan<sup>2</sup>

(1. Department of Physiology, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510182, China; 2. Department of Cardiovascular Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

[KEY WORDS] Pulmonary Arterial Hypertension; Smooth Muscle Cells; Reactive Oxygen Species; Cobalt Chloride; Proliferation; Hypoxia

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether reactive oxygen species (ROS) were involved in cobalt chloride ( $\text{CoCl}_2$ ) induced cellular proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells (HPASMC). **Methods**

HPASMC were exposed to a chemical hypoxia agent  $\text{CoCl}_2$  to establish a cellular model of pulmonary arterial hypertension. An exogenous ROS donor, hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), was administered to examine the direct effect of ROS on HPASMC proliferation. Before the exposure of HPASMC to  $\text{CoCl}_2$  or  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a ROS scavenger, N-acetylcysteine (NAC), was used to assess the effect of inhibitory oxidative stress on the cellular proliferation induced by the two agents above. Cell proliferation was measured by cell counter kit 8, expression of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) was tested by Western blot assay and intercellular ROS were observed by 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate staining followed by photofluorography.

**Results** Treatment of HPASMC with  $\text{CoCl}_2$  for 24 h at concentrations ranging from 25 to 50  $\mu\text{mol/L}$  induced significant cellular proliferation, and treatment with 50  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CoCl}_2$  for 24 h obviously increased intercellular HIF-1 $\alpha$  level. Similarly, treatment with  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 h at concentrations ranging from 12 to 25  $\mu\text{mol/L}$  triggered cellular proliferation, howev-

[收稿日期] 2013-01-16

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81200606); 广东省科技计划项目(2012B031800298); 广州医学院科学研究基金项目(2011C23)

[作者简介] 杨春涛, 博士, 副教授, 研究方向为细胞损伤与保护机制, E-mail 为 yang-chuntao@163.com。蔡典其, 本科, 研究方向为气体分子的生物学作用, E-mail 为 caidianqi@163.com。通讯作者李运泉, 研究生, 副教授, 研究方向为儿童心血管疾病, E-mail 为 gzyyh2004@yahoo.com.cn。

er, treatment with  $H_2O_2$  didn't alter HIF-1 $\alpha$  level in HPASMC. Pretreatment with NAC, prior to the treatment with  $CoCl_2$  or  $H_2O_2$ , statistically attenuated  $H_2O_2$ -induced HPASMC proliferation ( $P < 0.05$ ), but not  $CoCl_2$ -induced cellular proliferation ( $P > 0.05$ ). Exposure of HPASMC to 50  $\mu\text{mol/L}$   $CoCl_2$  for 6-24 h didn't alter intracellular ROS content. **Conclusion** ROS may not be involved in  $CoCl_2$ -induced cellular proliferation in HPASMC.

肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension, PAH) 是严重影响生命健康的重大疾病, 而肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary artery smooth muscle cell, PASMC) 过度增殖是 PAH 发生的主要病理基础<sup>[1,2]</sup>。大量研究显示, 缺氧诱导的 PAH 与氧化应激和 PASMC 过度增殖密切相关<sup>[1,3,4]</sup>。二氯化钴 (cobalt chloride,  $CoCl_2$ ) 是一种常用的缺氧模拟试剂, 可诱导组织细胞产生缺氧和氧化应激的状态, 使胞内缺氧诱导因子 (hypoxia inducible factor, HIF) 的水平和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的含量增加<sup>[5,6]</sup>。然而, ROS 是否参与  $CoCl_2$  诱导的 PASMC 过度增殖目前尚未见报道。为此, 本研究拟观察  $CoCl_2$  对人肺动脉平滑肌细胞 (human pulmonary artery smooth muscle cell, HPASMC) 增殖的影响并探讨 ROS 在此过程中的作用, 为阐明化学性缺氧诱导 PAH 提供细胞学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

$CoCl_2$ 、过氧化氢 (hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ )、N-乙酰半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC) 和双氯荧光素 (2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate, DCFH-DA) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 细胞计数试剂盒 (cell counter kit, CCK) 8 购自日本东仁化学科技 (上海) 有限公司; HIF-1 $\alpha$  抗体购自 Abcam 公司; DMEM 高糖培养基和胎牛血清购自 Gibco 公司。

### 1.2 细胞培养和处理

HPASMC 由美国 ScienCell 公司提供, 来源于正常人肺动脉组织, 经  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 和 Desmin 蛋白免疫染色鉴定后使用。该细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $CO_2$  条件下, 培养于含有 15% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中。化学性缺氧处理: 将 HPASMC 用不同浓度的化学性缺氧模拟试剂  $CoCl_2$  处理 24 h; 氧化应激处理: 将 HPASMC 用不同浓度的 ROS 供体  $H_2O_2$  处理 24 h; 为进一步观察氧化应激在其中的作用, 在  $CoCl_2$  或  $H_2O_2$  处理前用 ROS 清除剂 NAC 预处理 1 h, 再检测  $CoCl_2$  或  $H_2O_2$  对细胞增殖的影响。

### 1.3 细胞增殖实验

将 HPASMC 接种于 96 孔培养板, 培养至 80%

融合时, 将含 15% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基更换为无血清培养基, 以去除血清对细胞增殖的诱导作用。给予无血清培养基配制的  $CoCl_2$ 、 $H_2O_2$  和/或 NAC, 每组设 4 个复孔。处理结束后, 每孔加 100  $\mu\text{L}$  (1:10 稀释) CCK-8 溶液, 其中的 WST-8 成分可以与细胞线粒体脱氢酶反应生成黄色水溶性物质。颜色的深浅可反映线粒体的数目和功能, 从而间接反映细胞的数目<sup>[7]</sup>。在 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 3 h 后, 用酶标仪 (Molecular Devices 公司, 美国) 记录各孔在 450 nm 处的吸光度 (absorbance, A)。计算正常对照组和处理组 A 值的比值, 以正常对照组的 A 值作为 100%, 实验重复 4 次。

### 1.4 细胞内 ROS 含量的检测

按照文献介绍的方法<sup>[5]</sup> 检测细胞内 ROS 的含量。当细胞生长到约 80% 融合时, 将含 15% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基更换为无血清培养基。用无血清培养基配制 50  $\mu\text{mol/L}$   $CoCl_2$ , 处理 HPASMC 6~24 h。处理结束后, 细胞经 PBS 洗 2 次, 在 10  $\mu\text{mol/L}$  DCFH-DA 染液中 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 20 min。DCFH-DA 进入细胞后, 可以脱去 DA 基团而被限制在细胞内, 随后 DCFH 被细胞内的 ROS 氧化生成发出绿色荧光的 DCF。在荧光显微镜下随机选取 4 个不重复的区域摄片, 用 ImageJ 1.47i 软件的 Histogram 模块分析 DCF 的平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI), 其大小能反映 ROS 的含量。

### 1.5 Western blot 检测蛋白的表达

将 HPASMC 接种于 60 mm  $\times$  15 mm 培养皿内, 每组 4 皿。经  $CoCl_2$  或  $H_2O_2$  处理 24 h 后, 用预冷的 PBS 洗 1 次, 加入细胞裂解液, 4 $^{\circ}\text{C}$  静置 30 min。12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 用 BCA 法进行蛋白定量。总蛋白经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离后, 转移至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上, 并将膜置于 5% 脱脂奶粉中室温封闭 1 h。随后加入兔抗人的 HIF-1 $\alpha$  抗体 (1:5 000 稀释) 或内参  $\beta$ -actin 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$  轻摇、过夜。经 TBS-T 漂洗 3 次, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗, 室温孵育 1 h, TBS-T 漂洗 3 次。用增强型化学发光法将信号曝光至 X 光胶片上, 用 ImageJ 1.47i 软件进行半定量分析。

1.6 统计学方法

实验数据用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 One-way ANOVA 及 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CoCl<sub>2</sub> 诱导 HPASMC 增殖和缺氧反应

HPASMC 经不同浓度的 CoCl<sub>2</sub> 处理 24 h 后, CCK-8 实验检测细胞增殖,结果显示,25  $\mu\text{mol/L}$  CoCl<sub>2</sub> 可诱导明显的增殖反应,使细胞数目明显增多,与正常对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ;图 1)。当 CoCl<sub>2</sub> 的浓度增高至 50  $\mu\text{mol/L}$  时,对细胞增殖的诱导作用达到峰值( $P < 0.01$ ;图 1)。另外,50  $\mu\text{mol/L}$  CoCl<sub>2</sub> 处理 24 h 可使细胞内 HIF-1 $\alpha$  的相对水平从  $0.54 \pm 0.10$  提高至  $0.95 \pm 0.18$ ,与正常对照组比较差异具有统计学意义(图 2),提示 CoCl<sub>2</sub> 处理可模拟细胞的缺氧状态。

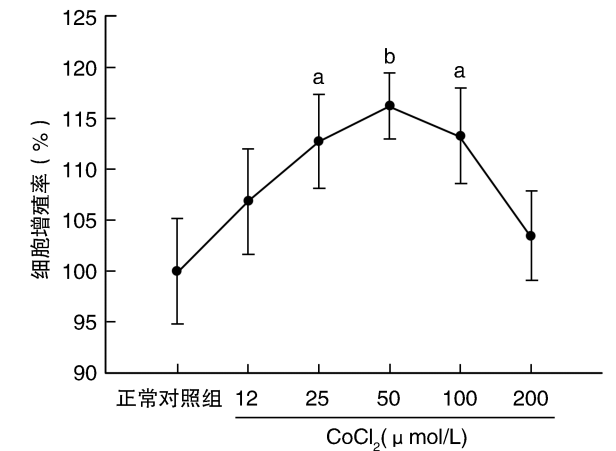


图 1. CoCl<sub>2</sub> 对 HPASMC 增殖的影响 a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ ,与正常对照组比较。  
Figure 1. Effect of CoCl<sub>2</sub> on the cellular proliferation of HPASMC

2.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HPASMC 增殖反应

为了明确 CoCl<sub>2</sub> 诱导的 HPASMC 增殖是否与氧化应激有关,进一步观察不同浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 24 h 对细胞增殖的影响,结果显示,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理与 CoCl<sub>2</sub> 的作用类似,也能诱导 HPASMC 增殖,12  $\mu\text{mol/L}$  时开始诱导细胞增殖( $P < 0.05$ ;图 3),25  $\mu\text{mol/L}$  时细胞增殖达到高峰( $P < 0.01$ ;图 3)。而 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理对细胞内 HIF-1 $\alpha$  的水平无明显影响,处理组和正常对照组分别为  $0.54 \pm 0.10$  和  $0.48 \pm 0.13$ (图 2)。

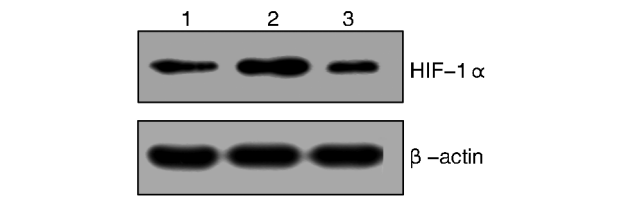


图 2. 不同处理因素对 HPASMC 胞内 HIF-1 $\alpha$  水平的影响  
1 为正常对照组,2 为 50  $\mu\text{mol/L}$  CoCl<sub>2</sub> 处理 24 h 组,3 为 25  $\mu\text{mol/L}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 24 h 组。

Figure 2. Effect of the indicated treatments on the level of HIF-1 $\alpha$  in HPASMC

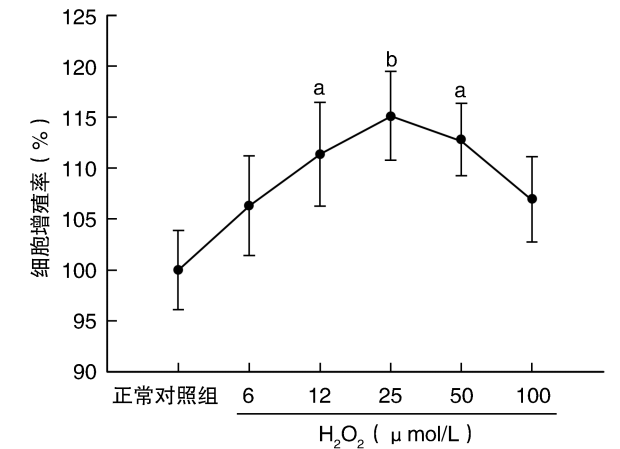


图 3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 HPASMC 增殖的影响 a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ ,与正常对照组比较。  
Figure 3. Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the cellular proliferation of HPASMC

2.3 NAC 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 或 CoCl<sub>2</sub> 诱导的 HPASMC 增殖的影响

NAC 是还原型谷胱甘肽 (reduced glutathione, GSH) 的前体,可通过增加 GSH 的生成而清除 ROS。结果显示,在 25  $\mu\text{mol/L}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 24 h 前,用不同浓度的 NAC 预处理 1 h,其中 1 500  $\mu\text{mol/L}$  NAC 预处理可明显抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的细胞增殖作用( $P < 0.05$ ;表 1),然而,NAC 预处理对 50  $\mu\text{mol/L}$  CoCl<sub>2</sub> 处理 24 h 诱导的 HPASMC 增殖无明显影响( $P > 0.05$ ;表 2)。

2.4 CoCl<sub>2</sub> 处理不改变 HPASMC 胞内 ROS 的水平

为了查明 CoCl<sub>2</sub> 处理是否会引起细胞的氧化应激状态,通过 DCFH 染色结合荧光显微镜照相检测 HPASMC 胞内 ROS 的含量发现,50  $\mu\text{mol/L}$  的 CoCl<sub>2</sub> 处理 6~24 h 并未使细胞内 ROS 的含量明显增加(图 4A),与正常对照组比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ;图 4B)。

表 1. 不同浓度 NAC 预处理对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的 HPASMC 增殖的影响

Table 1. Effect of pretreatment with different concentrations of NAC on the proliferation induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in HPASMC

分 组	细胞增殖率
正常对照组	100.00%
25 μmol/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组	115.23% ± 4.34% <sup>a</sup>
500 μmol/L NAC + 25 μmol/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组	111.46% ± 5.08%
1 000 μmol/L NAC + 25 μmol/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组	107.39% ± 7.16%
1 500 μmol/L NAC + 25 μmol/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组	102.82% ± 3.53% <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 25 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组比较。

表 2. 不同浓度 NAC 预处理对 CoCl<sub>2</sub> 引起的 HPASMC 增殖的影响

Table 2. Effect of pretreatment with different concentrations of NAC on the proliferation induced by CoCl<sub>2</sub> in HPASMC

分 组	细胞增殖率
正常对照组	100.00%
50 μmol/L CoCl <sub>2</sub> 组	116.25% ± 3.46% <sup>a</sup>
500 μmol/L NAC + 50 μmol/L CoCl <sub>2</sub> 组	115.37% ± 5.08% <sup>a</sup>
1 000 μmol/L NAC + 50 μmol/L CoCl <sub>2</sub> 组	116.49% ± 6.51% <sup>a</sup>
1 500 μmol/L NAC + 50 μmol/L CoCl <sub>2</sub> 组	115.82% ± 3.92% <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较。

### 3 讨 论

HPASMC 增殖过度 and/或凋亡减少是 PAH 的重要病理基础。本研究用化学性缺氧模拟试剂 CoCl<sub>2</sub> 处理 HPASMC, 发现 CoCl<sub>2</sub> 可诱导明显的增殖反应。与 CoCl<sub>2</sub> 的作用类似, 外源性 ROS 供体 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 也可引起明显的增殖反应。ROS 清除剂 NAC 可抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的细胞增殖, 而不能抑制 CoCl<sub>2</sub> 引起的细胞增殖, 并且 CoCl<sub>2</sub> 处理对胞内 ROS 的水平也无明显影响。

缺氧一方面可反射性地收缩血管, 另一方面也可导致内皮功能失调、平滑肌细胞过度增殖而引起血管重构, 最终导致 PAH 的发生, 故一般认为缺氧是 PAH 发病的重要原因<sup>[2,8]</sup>。本研究发现 CoCl<sub>2</sub> 处理使 HPASMC 增殖明显增加, 并上调了细胞内 HIF-1α 水平, 这与上述观点是一致的。实验性缺氧包括物理性缺氧和化学性缺氧。物理性缺氧可通过降低培养组织细胞所处环境的 O<sub>2</sub> 分压、增加 N<sub>2</sub> 分压

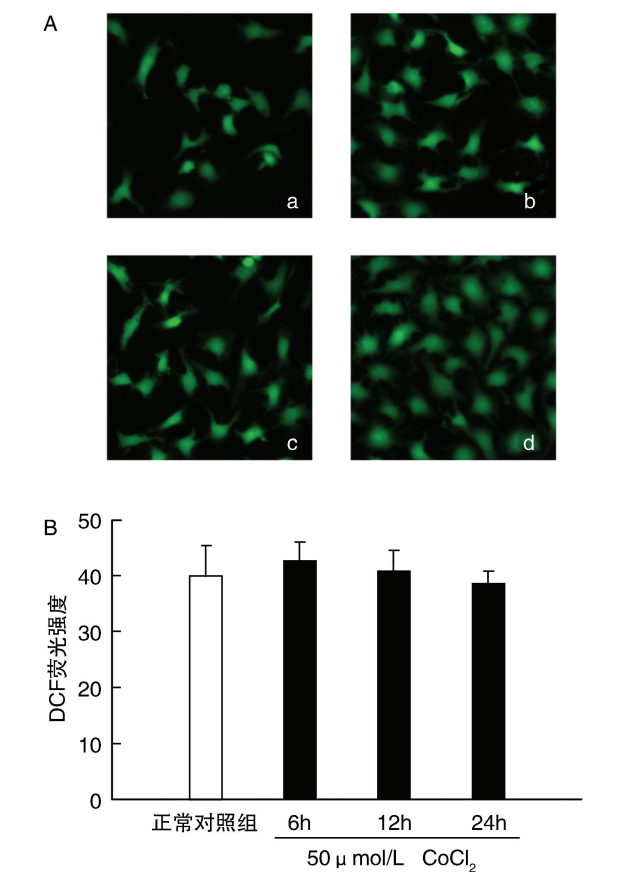


图 4. CoCl<sub>2</sub> 处理对 HPASMC 胞内 ROS 水平的影响 A 为 DCFH 染色后荧光照相检测细胞内 ROS 含量的照片; a 为正常对照组, b 为 50 μmol/L CoCl<sub>2</sub> 处理 6 h 组, c 为 50 μmol/L CoCl<sub>2</sub> 处理 12 h 组, d 为 50 μmol/L CoCl<sub>2</sub> 处理 24 h 组。B 为用 ImageJ 1.47i 软件定量分析图 A 的结果。

Figure 4. Effect of CoCl<sub>2</sub> on intracellular ROS content in HPASMC

的方法实现<sup>[9]</sup>。化学性缺氧则可通过向培养基中加入一些化合物实现, 如 CoCl<sub>2</sub>、氯化镍、硫代硫酸钠等。两者的共同特征是使胞内 HIF 的表达和活性增加并通过上调血管内皮生长因子和促红细胞生成素等基因的表达而促进细胞增殖<sup>[10]</sup>。物理性缺氧对实验装置要求较高, 常需使用专门的培养箱或缺氧盒, 一旦缺氧装置密封不良常影响缺氧的效果; 由于化学性缺氧是通过加入化学物质实现的, 常可获得较为稳定的缺氧效果, 故而备受关注。故本文为研究缺氧诱导 HPASMC 增殖提供了一种简单的实验方法。

CoCl<sub>2</sub> 在诱导组织细胞发生缺氧时常导致氧化应激反应, 使胞内 ROS 水平升高<sup>[5,11]</sup>, ROS 是诱导细胞增殖的重要信号分子, 尤其是在肿瘤细胞和平滑肌细胞中<sup>[12]</sup>。另外, Wang 等<sup>[4]</sup>研究发现, 缺氧引起的 Ca<sup>2+</sup> 释放和平滑肌收缩是 ROS 依赖性的。因



而,本研究又进一步观察了外源性 ROS 供体对 HPASMC 增殖的影响。结果发现,与  $\text{CoCl}_2$  的作用类似, $\text{H}_2\text{O}_2$  也可直接诱导 HPASMC 增殖,Shimizu 等<sup>[13]</sup>的报道支持此研究结果。然而, $\text{CoCl}_2$  引起的 HPASMC 增殖是否也是 ROS 依赖的,目前尚未见文献报道。NAC 是内源性 ROS 清除剂 GSH 的前体,通过加入 NAC 可促进 GSH 的生成<sup>[14]</sup>,因而,应用 NAC 在  $\text{H}_2\text{O}_2$  或  $\text{CoCl}_2$  处理 HPASMC 前预处理细胞。结果显示,NAC 预处理可明显抑制  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 HPASMC 增殖,而对  $\text{CoCl}_2$  诱导的细胞增殖则无明显影响。DCFH 可被 ROS(主要是  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 氧化生成发出绿色荧光的 DCF,因而,绿色荧光的强度可间接反映细胞内 ROS 含量。通过检测  $\text{CoCl}_2$  处理后胞内 ROS 的含量发现,50  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CoCl}_2$  处理 HPASMC 6~24 h 并未使细胞内 ROS 的含量明显升高,这提示  $\text{CoCl}_2$  诱导 HPASMC 增殖可能与 ROS 无关。此发现与上述研究报道不一致<sup>[4,13]</sup>,究其原因可能是:尽管化学性缺氧和物理性缺氧有很多相似之处,如上调 HIF 的表达和活性,但是其和物理性缺氧以及体内组织细胞的缺氧状态之间仍有许多不同。因而,在用化学性缺氧建立平滑肌细胞增殖的实验模型时,这些问题值得注意。

综上所述,本文首次在 HPASMC 证实,化学性缺氧处理可诱导细胞增殖,这种作用与 ROS 无关,而可能与直接上调 HIF 活性有关。当然,为了使本文的研究更具普遍性和说服力,可使用多种不同类型的化学性缺氧模拟剂并从多个角度检测细胞增殖。

#### [参考文献]

- [1] Zuckerbraun BS, Shiva S, Ifedigbo E, et al. Nitrite potently inhibits hypoxic and inflammatory pulmonary arterial hypertension and smooth muscle proliferation via xanthine oxidoreductase-dependent nitric oxide generation[J]. *Circulation*, 2010, 121(1): 98-109.
- [2] 何华,刘齐宁,王惠芳,等.  $\text{PGE}_1$  对 COPD 合并缺氧性肺动脉高压的疗效[J]. *中国医师杂志*, 2004, 6(9): 1 155-157.
- [3] Liao B, Zheng YM, Yadav VR, et al. Hypoxia induces intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release by causing reactive oxygen species-mediated dissociation of FK506-binding protein 12.6 from ryanodine receptor 2 in pulmonary artery myocytes[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14(1): 37-47.
- [4] Wang YX, Zheng YM. ROS-dependent signaling mechanisms for hypoxic  $\text{Ca}^{2+}$  responses in pulmonary artery myocytes [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 12(5): 611-623.
- [5] Yang C, Ling H, Zhang M, et al. Oxidative stress mediates chemical hypoxia-induced injury and inflammation by activating NF-kappa B-COX-2 pathway in HaCaT cells[J]. *Mol Cells*, 2011, 31(6): 531-538.
- [6] Moroz E, Carlin S, Dyomina K, et al. Real-time imaging of HIF-1 alpha stabilization and degradation [J]. *PLoS One*, 2009, 4(4): e5 077.
- [7] Wu C, Liu F, Zhou X, et al. Effect of protein kinase C on proliferation and apoptosis of T lymphocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura children[J]. *Cell Mol Immunol*, 2005, 2(3): 197-203.
- [8] 易斌,钱桂生,白莉,等. 丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶 2 蛋白表达在低氧致大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16(8): 597-599.
- [9] Li Y, Yuan Z, Liu B, et al. Prevention of hypoxia-induced neuronal apoptosis through histone deacetylase inhibition [J]. *J Trauma*, 2008, 64(4): 863-871.
- [10] Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(5): 343-354.
- [11] Liu Y, Wang C, Wang Y, et al. Cobalt chloride decreases fibroblast growth factor-21 expression dependent on oxidative stress but not hypoxia-inducible factor in Caco-2 cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 264(2): 212-221.
- [12] Immenschuh S, Baumgart-Vogt E. Peroxiredoxins, oxidative stress, and cell proliferation[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7(5-6): 768-777.
- [13] Shimizu H, Hirose Y, Nishijima F, et al. ROS and PDGF- $\beta$  receptors are critically involved in indoxyl sulfate actions that promote vascular smooth muscle cell proliferation and migration[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 297(2): C389-396.
- [14] Nicovan Z. N-acetylcysteine (NAC) and glutathione (GSH): antioxidant and chemopreventive properties, with special reference to lung cancer[J]. *J Cell Biochem Suppl*, 1995, 22(Suppl): 24-32.

(此文编辑 曾学清)