

# 曲匹地尔对培养大鼠血管平滑肌细胞的有丝分裂素激活蛋白激酶(MAPK)和 P34<sup>cdc2</sup>激酶的影响

程 焰, 刘 萍, 安国顺<sup>1</sup>, 曾繁典\*, 唐朝枢<sup>1</sup>

(同济医科大学临床药理研究所, 武汉 430030; <sup>1</sup>北京医科大学心血管基础研究所, 北京 100083)

**摘要** 目的:研究曲匹地尔(Tra)对培养大鼠主动脉血管平滑肌细胞的细胞增殖周期及对有丝分裂素激活蛋白激酶(MAPK)和 P34<sup>cdc2</sup>激酶的表达及活性的影响。方法:以流式细胞术测定细胞周期,免疫印迹法测定 MAPK 和 P34<sup>cdc2</sup>的表达,免疫沉淀后测定 MAPK 和 P34<sup>cdc2</sup>对其特异性底物髓脂质碱性蛋白(MBP)和 Histone H1 的磷酸化活性。结果:Tra 降低细胞周期中 S 期比例和细胞分裂增殖指数,能明显抑制给血清刺激后 MAPK 的表达和活性,明显抑制 P34<sup>cdc2</sup>激酶活性而对其表达无明显影响。结论:Tra 对细胞周期的影响与其抑制 MAPK 和 P34<sup>cdc2</sup>激酶活性和 MAPK 的蛋白表达有关。

**关键词** 曲匹地尔;血管平滑肌;免疫印迹;蛋白激酶类;免疫沉淀

血管平滑肌细胞(VSMC)是动脉粥样硬化斑块病变组织和动脉损伤后增厚的肌性内膜中的主要成分,其增殖的调节是动脉粥样硬化及经皮冠状动脉成形术(PTCA)后再狭窄的研究焦点之一<sup>[1,2]</sup>。细胞增殖与细胞周期密切相关。在细胞周期的调控中,有丝分裂素激活蛋白激酶 MAPK 和细胞分裂周期基因 cdc2 编码产物 P34<sup>cdc2</sup>有重要作用,前者控制细胞周期的启动(G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>期),后者控制 DNA 复制和有丝分裂的诱发(G<sub>1</sub>-S, G<sub>2</sub>-M)<sup>[3,4]</sup>。

曲匹地尔(Trapidil, Tra)作为一种血管扩张药物用于治疗缺血性心脏病。90 年代初 Kuratsu 等发现其能抑制培养的胶质瘤细胞的增生<sup>[5]</sup>。我们以前的工作已证实 Tra 能浓度依赖性阻抑内皮素-1 诱导的培养大鼠 VSMC 的增生<sup>[6]</sup>。本研究拟进一步探讨去血清细胞周期同步化后, Tra 对血清刺激诱导 VSMC 增殖细胞周期的影响及其对控制细胞周期的两个关键酶 P34<sup>cdc2</sup>和 MAPK 的表达及活性的影响。

## 材 料 和 方 法

**药品与试剂** RPMI 1640,胰蛋白酶, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 苯甲基磺酰氟(PMSF), 二硫苏糖醇

(DTT), PPO, POPOP, 抑肽酶(aprotinin), 亮肽酶(leupeptin), Triton X-100, 髓脂质碱性蛋白(MBP), ATP 二钠盐, HEPES, 牛血清白蛋白(BSA), 蛋白酶 A 抑制剂, MAPK 多克隆抗体, histone H1, propidium iodide(PI)等均购自 Sigma 公司;胎牛血清(FCS), P81 phosphocellulose 滤纸, P34<sup>cdc2</sup>多克隆抗体等购自 Gibco 公司;SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质购自上海丽珠东风生物技术有限公司;硝酸纤维素膜, agarose beads 购自 Bio Rad;碱性磷酸酶标记羊抗兔多克隆抗体购自华美公司;trapidil(Tra)为武汉市第二制药厂馈赠(白色粉末, 纯度 > 98.5%, 新鲜配制于生理盐水中, 终浓度为 500 μmol·L<sup>-1</sup>)。

**动物** (170 ± 30) g Wistar ♂大鼠购自北京医科大学试验动物中心, 清洁级, No. 01-3056。

**仪器** 流式细胞仪, 美国 Becton Dickinson; 液闪计数仪, 瑞典 Pharmacia Wallac 1410 型; LEICA Q550 IW 图像分析系统, 美国 LEICA 公司; 恒压恒流电泳仪与电泳槽, 转移电泳槽, 垂直板电泳槽, 北京六一厂; 紫外/可见分光光度仪, 岛津公司; 低温高速离心机, 美国 Dupont 公司; FASS 440 型流式细胞仪, 美国 Becton Dickinson 公司。

**大鼠主动脉 VSMC 培养** 取大鼠胸主动脉, 按 Ross 方法分离并传代培养 VSMC<sup>[7]</sup>, 培养液为含 20%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 实验采用第 6 代细胞。

**实验分组** 分 5 组: C 组无血清培养后细胞培

收稿日期: 1998-06-15

\* 联系人 Tel: (027) 83692628, Fax: (027) 83622308, E-mail: fdzeng@tjmu.edu.cn

养液中不加血清刺激; S 组无血清培养后细胞培养液中加 20% FCS; Tra 组无血清培养后加入 Tra  $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  但不加血清刺激; S + Tra 组培养液中加 20% FCS 和不同浓度 Tra (5, 50 和  $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。

**VSMC 细胞周期的测定**<sup>[8]</sup> 将细胞浓度为  $1 \times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$  接种于 24 孔板, 孵育 24 h 贴壁后换无血清 RPMI 1640 培养液, 再孵育 16 h, 按上述分组分别加入不同的试剂, 再孵育 16 h, 以胰酶消化后, 于 70% 冷乙醇固定 30 min, 离心并以冷磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次, 细胞悬液的终体积为 0.5 ml。加入 RNase (终浓度为  $3000 \text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) 37℃, 孵育 30 min, 再以 PI  $50 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  染色 40 min, 流式细胞仪分析细胞周期。

**细胞周期同步化和培养组织细胞粗提液制备**<sup>[9,10]</sup> 将  $1 \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$  VSMC 接种于 24 孔板, 孵育 24 h, 贴壁后换无血清 RPMI 1640 培养液孵育 48 h 使细胞同步化到 G<sub>0</sub> 期。按上述分组分别加入不同的试剂, 再孵育 10 min (测 MAPK 表达及活性) 或 24 h (测 P34<sup>cdc2</sup> 表达及活性) 后, 将培养的 VSMC 加入适量 PBS 停止孵育, 用 25% 的胰蛋白酶将贴壁生长的细胞消化制成细胞悬液, 离心  $2000 \times g$ , 30 s, 弃上清液, 将沉淀溶于 0.5 ml 细胞裂解液 (HEPES  $50 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.5, NaCl  $150 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>  $2 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , NaF  $100 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  $10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , DTT  $2 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , PMSF  $1 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 抑肽酶  $100 \text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ , 亮氨酸  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 1% Triton X-100 冰上孵育 30 min, 超声破碎细胞 5 s, 离心 ( $13000 \times g$ , 10 min, 4℃), 去除沉淀, 取上清少量以 Lowry 法蛋白定量, 余留作蛋白激酶活性测定和免疫印迹 (Western blotting)。

**SDS PAGE 电泳及免疫印迹** 上述细胞粗提液分别取蛋白 50 μg 以 10% SDS-PAGE 电泳分离后, 在 100 V 下转移 3 h, 以 MAPK 多克隆抗体或 P34<sup>cdc2</sup> 多克隆抗体与转移到硝酸纤维素膜上的蛋白免疫印迹反应过夜。加入碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 的二抗后显色反应检测蛋白的表达量。

**免疫沉淀及激酶活性检测**<sup>[11,12]</sup> 取细胞溶解液 0.5 ml, 与 P34<sup>cdc2</sup> 多克隆抗体 1 μg 或 MAPK 的多克隆抗体 5 μg, 在 4℃ 共同振荡孵育 4 h, 收集免疫复合物, 在相同条件下进一步与预先吸附有抗鼠

IgG 的 agarose beads 孵育 30 min, 再以细胞裂解液 4℃ 下洗涤沉淀两次, 以  $0.2 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  的牛血清白蛋白结合抗原后离心, 取上清加入激酶缓冲液 (HEPES  $20 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.2, MgCl<sub>2</sub>  $10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , MnCl<sub>2</sub>  $2 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , DTT  $2 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>  $0.5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , BSA  $0.1 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ , MBP  $1 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  或 Histone H1  $0.1 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ , ATP 二钠盐  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 蛋白激酶 A 抑制剂  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , γ-<sup>32</sup>P-ATP  $1 \mu\text{Ci} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) 0.1 ml, 30℃ 孵育 10 min, 加入冷 PBS 终止反应。每孔取 100 μl 点在 P81 phosphocellulose 滤纸上, 用 0.5% 磷酸缓冲液彻底清洗, 吹干, 加闪烁液静息过夜, 在 β 液闪计数仪上测定 <sup>32</sup>P 放射活性, 同时作空白对照, 即免疫沉淀时不加细胞溶解液, 其余操作同上。取 10 μl γ-<sup>32</sup>P-ATP (3.7 kBq) 点在 P81 phosphocellulose 滤纸上, 加闪烁液测其放射强度作为标准管。以 (实验管 - 空白管) / 标准管的数值表示 MAPK 及 P34<sup>cdc2</sup> 活性 (<sup>32</sup>P pmol · min<sup>-1</sup> · mg<sup>-1</sup> protein)。

## 结 果

### 1 Tra 对培养大鼠 VSMC 细胞周期的影响

以流式细胞仪分析细胞周期的结果表明, 与 C 组比较, 以 20% 血清刺激细胞后, 其 S 期、G<sub>2</sub>/M 期和 S + G<sub>2</sub>/M 期 (细胞有丝分裂增殖指数) 比例分别增加 110%, 36.4% 和 82.9%, ( $P$  均  $< 0.01$ )。以 Tra 5, 50 和  $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  处理后, S 期比例分别较单纯血清刺激组减少 13.1% ( $P < 0.05$ ), 18.7% ( $P < 0.01$ ) 和 58.6% ( $P < 0.01$ ) 细胞分裂增殖指数分别减少 12.9% ( $P < 0.05$ ), 18.7% ( $P < 0.01$ ) 和 49.6% ( $P < 0.01$ )。G<sub>2</sub>/M 期比例仅 Tra  $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组较单纯血清刺激组减少 25.9% ( $P < 0.01$ )。Tra  $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  对未给血清刺激的 VSMC 细胞周期无明显影响 (表 1)。

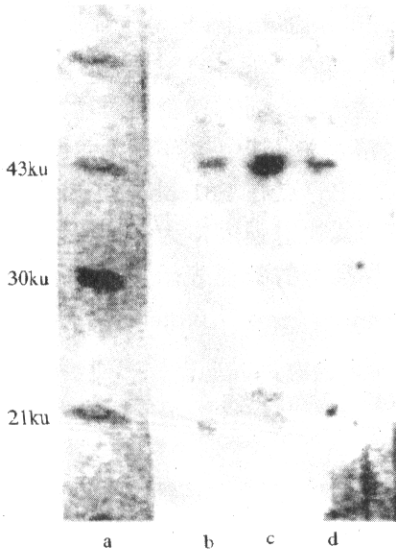
### 2 Tra 对 MAPK 和 P34<sup>cdc2</sup> 蛋白表达的影响

分别用 MAPK 和 P34<sup>cdc2</sup> 的多克隆抗体作免疫印迹分析。结果显示, 在去血清细胞周期同步化后, 再给血清刺激 10 min, 此时 MAPK 蛋白表达量明显增加, 24 h 后 P34<sup>cdc2</sup> 表达亦升高, Tra  $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  能明显抑制 MAPK 的表达而对 P34<sup>cdc2</sup> 的表达无明显影响 (图 1, 图 2)。

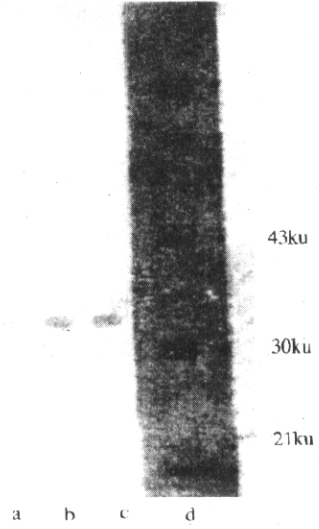
**Tab 1 Effect of trapidil(Tra) on % distribution of cell cycle in cultured rat aortic smooth muscle cells**

Group/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Cell cycle phase			
	$G_0/G_1$	S	$G_2/M$	$S+G_2/M$
Control	$65.7\pm 1.0^{**}$	$21.9\pm 2.1^{**}$	$12.8\pm 1.8^{**}$	$34.7\pm 0.9^{**}$
Tra (500)	$61.0\pm 1.8$	$24.6\pm 1.1$	$14.4\pm 1.6$	$39.0\pm 1.8$
20% FCS	$36.5\pm 3.7$	$46.0\pm 4.3$	$17.5\pm 2.4$	$63.5\pm 3.7$
20% FCS+ Tra (5)	$44.7\pm 5.8^*$	$40.0\pm 3.9^*$	$15.3\pm 2.6$	$55.3\pm 5.8^*$
20% FCS+ Tra (50)	$48.3\pm 1.1^{**}$	$37.4\pm 1.9^{**}$	$14.3\pm 2.5$	$51.7\pm 1.1^{**}$
20% FCS+ Tra (500)	$68.0\pm 3.0^{**}$	$19.0\pm 1.7^{**}$	$13.0\pm 1.6^{**}$	$32.0\pm 3.0^{**\#\#}$

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs 20% FCS group; ##  $P < 0.01$  vs 20% FCS + Tra(50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) group.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ . Mitotically active stage =  $S + G_2/M$ . FCS: fetal calf serum.



**Fig 1** Effect of Tra on expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) in cultured rat vascular smooth muscle cells. Lane a: Marker of protein molecular weight; Lane b: Protein extracts (50  $\mu\text{g}$ ) from cells without serum refeeding analyzed by Western blotting with a polyclonal antibody raised toward MAPK; Lane c: Protein extracts (50  $\mu\text{g}$ ) from cell at 10 min after serum refeeding analyzed by Western blotting with a polyclonal antibody raised toward MAPK; Lane d: Pretreated with Tra 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , protein extracts (50  $\mu\text{g}$ ) from cell at 10 min after serum refeeding analyzed by Western blotting with a polyclonal antibody raised toward MAPK.



**Fig 2** Effect of Tra on expression of  $P34^{cdc2}$  in cultured rat vascular smooth muscle cells. Lane a: Protein extracts (50  $\mu\text{g}$ ) from cells at 24 h without serum refeeding analyzed by Western blotting with a polyclonal antibody raised toward  $P34^{cdc2}$ ; Lane b: Protein extracts (50  $\mu\text{g}$ ) from cells at 24 h after serum refeeding analyzed by Western blotting with a polyclonal antibody raised toward  $P34^{cdc2}$ ; Lane c: Pretreated with Tra 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , protein extracts (50  $\mu\text{g}$ ) from cells at 24 h after serum refeeding analyzed by Western blotting with a polyclonal antibody raised toward  $P34^{cdc2}$ ; Lane d: marker of protein molecular weight.

**3 Tra 抑制 MAPK 和  $P34^{cdc2}$  的激酶活性**

免疫沉淀后, 通过对 MAPK 的特异性底物 MBP 和  $P34^{cdc2}$  的底物 histone H1 的磷酸化测定来反映 MAPK 和  $P34^{cdc2}$  的比活性。结果表明, 在去血清细胞周期同步化后, 血清刺激 10 min, MAPK 的活性增加了 368.0% ( $P < 0.01$ ), Tra 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  对其抑制率分别为 59.3% 和 80.9% ( $P < 0.01$ ), Tra 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  对 MAPK 活性

无明显影响。Tra 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  对未经血清刺激的细胞 MAPK 的基础活性亦能抑制 52.0% ( $P < 0.01$ )。血清刺激后 24 h,  $P34^{cdc2}$  激酶活性升高了 83.1% ( $P < 0.01$ ), Tra 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  对其抑制率分别为 22.6% 和 40.8% ( $P < 0.01$ ), Tra 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  能抑制 16%, 但无统计学意义。Tra 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  对未经血清刺激的细胞内  $P34^{cdc2}$  的基础活性能抑制 28.6% ( $P < 0.05$ ) (表 2)。

Tab 2 Effects of trapidil (Tra) on activities of mitogen activated protein kinase (MAPK) and P34<sup>cdc2</sup> in cultured rat aortic smooth muscle cells

Group	Tra / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	FCS/ %	Activity of MAPK		Activity of P34 <sup>cdc2</sup>
			$^{32}\text{P}$ p mol $\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein	$^{32}\text{P}$ p mol $\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein	
Control	0	0	15.8 $\pm$ 5.1		6.2 $\pm$ 1.6
H	500	0	7.6 $\pm$ 1.5 <sup>**</sup>		4.4 $\pm$ 0.6 <sup>*</sup>
S	0	20	73.9 $\pm$ 17.7 <sup>**</sup>		11.3 $\pm$ 1.7 <sup>**</sup>
L + S	5	20	71.7 $\pm$ 16.6		9.5 $\pm$ 1.8
M + S	50	20	30.1 $\pm$ 5.2 <sup>##</sup>		8.8 $\pm$ 0.9 <sup>##</sup>
H + S	500	20	14.1 $\pm$ 3.9 <sup>##</sup>		6.7 $\pm$ 0.6 <sup>##</sup>

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group; ##  $P < 0.01$  vs S group.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ . S: Stimulated by calf serum; L, M and H: Treated with low, medium and high doses of trapidil, respectively. FCS: Fetal calf serum.

## 讨 论

平滑肌细胞增生是动脉粥样硬化和血管成形术后管腔再狭窄的发生发展中的重要事件。寻找有效药物拮抗这种病理性细胞增生已成为当前心血管药理学研究的热点之一。

本实验发现, Tra 5, 50 和 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  能抑制血清刺激后培养的 VSMC 的 S 期细胞所占的比例, 并呈剂量依赖性, 这说明 Tra 能抑制 VSMC 的 DNA 的合成, 高剂量的 Tra 能减小 G<sub>2</sub> + M 细胞的比例, 这揭示高剂量 Tra 能抑制细胞的有丝分裂。3 个剂量的 Tra 能剂量依赖性地抑制血清刺激后培养细胞的有丝分裂增殖指数。上述作用在未给血清刺激的细胞中消失, 提示 Tra 对 VSMC 的作用并非细胞毒性 (cytotoxic effect) 而是抑制细胞生长的作用 (cytostatic effect)。

研究细胞周期调控模式揭示, 在不同期相之间转换中, 若干关卡 (checkpoint) 的调控有特殊的生物学意义<sup>[3]</sup>。其中以 G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>-S, G<sub>2</sub>-M 期相间的转换最为重要。G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> 为进入细胞周期的启动时期, G<sub>1</sub>-S 位于 G<sub>1</sub> 期末, 此刻 DNA 合成开始, G<sub>2</sub>-M 为 M 期初始, 此时染色体开始凝集。P34<sup>cdc2</sup> 是一编码分子量 34kD 的丝氨酸/苏氨酸的蛋白激酶, 在 G<sub>1</sub>-S 和 G<sub>2</sub>-M 的 checkpoint 转换中起重要作用, 其底物 histone H1 以细胞周期依赖的方式进行磷酸化<sup>[13]</sup>。本研究发现细胞周期同步化后, 血清刺激 24 h 后 P34<sup>cdc2</sup> 的表达及酶活性明显增高, Tra 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  对 P34<sup>cdc2</sup> 表达无明显影响, 但 Tra 500 和 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  能明显抑制 P34<sup>cdc2</sup> 的活性, 这表明 Tra 对 P34<sup>cdc2</sup> 的影响是一种磷酸化调节的短时酶失活的过程, 不涉及该酶基因翻译, 另外 Tra 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  能明显抑制未给血清刺激的细胞的基础 P34<sup>cdc2</sup> 激酶

活性, 但 Tra 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  不影响未给血清刺激的 VSMC 的细胞周期, 这说明在细胞周期的调节中 P34<sup>cdc2</sup> 并非唯一的调控细胞周期的细胞周期基因编码的蛋白激酶, 其它如 cdk2, 其在 G<sub>1</sub>-S 的转换中也有重要地位, 我们的初步预试验发现 Tra 能抑制 cdk2 的表达, 但其对 cdk2 蛋白激酶的活性的影响还不清楚, 需进一步实验方能明确。

与 P34<sup>cdc2</sup> 相似, MAPK 也是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 其中一个重要的亚型 P44<sup>mapk1</sup> 与 P34<sup>cdc2</sup> 有 33% 氨基酸同源性。它接收上游信号 (如生长因子等) 被激活后, 磷酸化下游底物如转录因子 c-jun, c-myc 和 Elk-1 等, 后者作用于一些次级翻译基因 5' 端的调控元件, 如 AP-1, AP-2, NF, cAMP 等, 启动和促进蛋白质基因的转录和表达, 促使细胞由静止的 G<sub>0</sub> 期进入 G<sub>1</sub> 期, 引起细胞增殖<sup>[14]</sup>。本实验发现细胞周期同步化后, 血清刺激 10 min 就能诱发 MAPK 的表达和活性的明显升高。Tra 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  能抑制其蛋白的表达和活性的升高, 而且对未给血清刺激的 VSMC 的 MAPK 活性也有明显抑制作用。提示 Tra 能直接抑制 MAPK 活性, 而不是仅作用于 MAPK 信号转导的上游。Tra 的这种作用作用不仅在于影响 MAPK 的翻译过程, 而且影响 MAPK 的 mRNA 翻译后的苏氨酸和酪氨酸残基的磷酸化。

本工作对 Tra 对培养的大鼠血管平滑肌细胞的细胞周期的影响及其可能的机制进行了初步研究, 从细胞周期方面阐述了 Tra 抑制 VSMC 增殖的可能机制, 为将 Tra 用于临床防治动脉粥样硬化和再狭窄提供理论基础。当然, 其中很多环节有待于进一步研究, 如 Tra 对众多 cyclin 的作用, 对 P21, P16 等细胞周期蛋白抑制因子的作用等等。

## 参 考 文 献

- 1 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis, a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362**: 801
- 2 Bauters C, Isner JM. The biology of restenosis. *Prog Cardiovasc Dis*, 1997, **40**: 107
- 3 Nasmyth K, Hunt T Dams and sluices. *Nature*, 1993, **366**: 634
- 4 Lu G, Beuerman RW, Zhao S, *et al*. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 induce activation of MAP kinase and SAP kinase in human neuroma fibroblasts. *Neurochem Int*, 1997, **30**: 401
- 5 Kuratsu J, Ushio Y. Antiproliferative effect of trapidil, a platelet-derived growth factor antagonist, on a glioma cell line *in vitro*. *J Neurosurg*, 1990, **73**: 436
- 6 Cheng Y, Gong PL, Zeng FD, *et al*. Inhibitory effect of trapidil on proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells induced by endothelin-1. *Acta Pharmacol Sin*, 1998, **19**: 254
- 7 Ross R. The smooth muscle cell II growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol*, 1971, **50**: 172
- 8 Melamed MR, Lindmo T, Mendelsohn ML. Flow Cytometry and Sorting. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons, 1990, 455
- 9 Lee MG, Norbury CJ, Spurr NK, *et al*. Regulated expression and phosphorylation of a possible mammalian cell cycle control protein. *Nature*, 1988, **333**: 676
- 10 Ueki K, Matsuda S, Tobe K, *et al*. Feedback regulation of mitogen-activated protein kinase activity of c-Raf-1 by insulin and phorbol ester stimulation. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 15756
- 11 Frodin M, Perldi P, Obberghen EV. Cyclic AMP activates the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 6207
- 12 Bradbury EM, Inglis RJ, Matlews HR. Control of cell division by very lysine rich Histone (F1) phosphorylation. *Nature*, 1974, **247**: 257
- 13 Lucas JJ, Szepesi A, Domenico J, *et al*. Differential regulation of the synthesis and activity of the major cyclin dependent kinases, p34<sup>cdc2</sup>, p33<sup>cdk2</sup>, and p34<sup>cdk4</sup>, during cell cycle entry and progression in normal human T lymphocytes. *J Cell Physiol*, 1995, **165**: 406
- 14 Pelech S, Sanghera JS. Mitogen-activated protein kinase: versatile transducers for cell signaling. *Trends Biochem Sci*, 1992, **17**: 233

## EFFECTS OF TRAPIDIL ON EXPRESSION AND ACTIVITIES OF MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE(MAPK) AND P34<sup>cdc2</sup> KINASE IN CULTURED RAT AORTIC SMOOTH MUSCLE CELLS

Cheng Yan(Cheng Y), Liu Ping(Liu P), An Guoshun(An GS)<sup>1</sup>,  
Zeng Fandian(Zeng FD) and Tang Chaoshu(Tang CS)<sup>1</sup>

(Institute of Clinical Pharmacology, Tongji Medical University, Wuhan 430030;

<sup>1</sup>Institute of Cardiovascular Research, Beijing Medical University, Beijing 100083)

**ABSTRACT** **AIM:** To study the effects of trapidil on cell cycle of cultured rat aortic vascular smooth muscle cells (VSMC) and on the expression and activities of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and P34<sup>cdc2</sup> kinase in cultured cells. **METHODS:** The cell cycle distribution was measured by flow cytometry. The expression of MAPK and P34<sup>cdc2</sup> were assayed by Western blotting. MAPK activity and P34<sup>cdc2</sup> activity were assayed by phosphorylation of their specific substrates myelin basic protein (MBP) and Histone H1 after immunoprecipitation. **RESULTS:** Pretreatment with trapidil (Tra), the S phase in the cell cycle distribution and the mitotically active stage of the cells were markedly decreased. The enhancement of MAPK expression was markedly suppressed by Tra, but the expression of P34<sup>cdc2</sup> was not affected by Tra. The MAPK and P34<sup>cdc2</sup> activities were inhibited by Tra. **CONCLUSION:** Tra affects cell cycle by its inhibitory effect on the kinase activities of MAPK and P34<sup>cdc2</sup>, and its inhibitory effect on the expression of MAPK.

**KEY WORDS** trapidil; vascular smooth muscle; immunoblotting; protein kinase; immunoprecipitation