

Rho/Rho 激酶通路在 5-羟色胺诱导的大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖中的作用

陈雪彦 刘焕龙¹ 潘振华 苗庆峰 张永健*

(河北医科大学药理教研室, 石家庄 050017; ¹河北医科大学第二医院, 石家庄 050000)

摘要 探讨 Rho/Rho 激酶通路在 5-羟色胺(5-HT)诱导的大鼠肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)增殖中的作用。采用细胞培养、噻唑蓝(MTT)比色法、蛋白质免疫印迹(Western blot)以及反转录聚合酶联反应(RT-PCR)等方法, 研究不同浓度 5-HT (0.01、0.1、1 和 10 $\mu\text{mol/L}$)处理 24 h 后, 大鼠 PASMCs 的增殖程度、增殖细胞核抗原(PCNA)的表达变化以及 Rho 激酶抑制剂法舒地尔对 1 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT 诱导的 PASMCs 增殖的影响, 并通过检测 Rho 激酶(ROCK1) mRNA 表达及肌球蛋白磷酸酶目标亚单位 1 (MYPT1)磷酸化水平反映 1 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT 作用不同时间 Rho 激酶的表达及活化程度。结果显示, 在 0.01~10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, 5-HT 可明显诱导大鼠 PASMCs 增殖($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 还可浓度依赖性地上调 PCNA 的表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。1 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT 作用后明显诱导大鼠 PASMCs 中 MYPT1 磷酸化水平, 在 15 min 时磷酸化水平达最高($P < 0.01$), 也明显诱导了 ROCK1 mRNA 表达升高, 在 30 min 时表达水平达最高($P < 0.01$)。Rho 激酶抑制剂法舒地尔明显抑制了 1 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT 诱导的 PASMCs 的增殖。结果表明 5-HT 明显诱导了大鼠 PASMCs 中 Rho 激酶的表达及激活, 法舒地尔对 5-HT 诱导的 PASMCs 的增殖有明显的抑制作用。说明 Rho/Rho 激酶在 5-HT 诱导的大鼠 PASMCs 增殖中起重要作用。

关键词 Rho 激酶; 5-羟色胺; 法舒地尔; 肺动脉平滑肌细胞; 增殖

肺血管重建是肺动脉高压的主要病理变化特征, 缺氧、各类生长因子、炎性介质等多种因素均与肺血管重建有关, 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)是其中较为重要的一种。5-HT 是一种重要的血管活性物质, 不仅刺激肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PASMCs)收缩, 还可造成其增生和肥大, 并能与多种细胞生长因子发生协同作用, 启动细胞周期, 调节 PASMCs 的增殖与凋亡, 引起肺血管壁增厚和肺动脉高压^[1,2]。研究发现 5-HT 与受体结合后依次激活小 GTPase 结合蛋白、Rac-1、NADPH 氧化酶以及细胞外信号调节激酶 ERK1/2^[3]。也有研究认为, 小 GTPase RhoA 以及其作用底物 Rho 激酶(ROCK)在细胞周期中发挥重要作用^[4]。

Rho 为 Ras 超家族中的一个亚群, 被称为小 G 蛋白超家族, 因具有 GTP 酶活性, 又称为 Rho GTP 酶。哺乳动物 Rho 家族至少有 10 个成员, 包括 Rho (异构体 A 至 E、G)、Rac (异构体 1~3)、Cdc42 和 TC10。激活的 Rho 是 Rho 激酶(ROCK)的直接活化因子, 能与 ROCK 结合。Rho/Rho 激酶信号通路是细胞内重要的信号通路之一, Rho 激酶是一种丝氨酸/

苏氨酸蛋白激酶, Rho 激活后活化 Rho 激酶, 并进一步磷酸化其下游底物肌球蛋白磷酸酶目标亚单位 1 (myosin phosphatase target subunit-1, MYPT1), 从而调节细胞许多生物学功能, 例如细胞迁移, 形态改变以及增殖等调节^[5]。为进一步在细胞水平上对 5-HT 诱导 PASMCs 增殖的机制进行深入研究, 本实验观察了不同浓度 5-HT 作用下大鼠 PASMCs 中 ROCK1 mRNA 的影响, 并观察了 Rho 激酶抑制剂法舒地尔(fasudil)对 5-HT 诱导的 PASMCs 增殖的作用, 深入探讨 Rho/ROCK 通路在 5-HT 诱导的大鼠 PASMCs 增殖中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

Wistar 大鼠由河北医科大学实验动物中心提供(合格证号: No.711047)。DMEM/F12 培养基和胎牛

收稿日期: 2009-08-19 接受日期: 2009-11-19

河北省卫生厅医学科学研究重点课题指导计划(No.20090306)

* 通讯作者。Tel: 0311-86266821, E-mail: zhangyilm@163.com

血清购自美国 Gibco 公司。MTT 购自德国 Serva 公司。胰蛋白酶购自 Amersco 公司。5-HT 购自美国 Sigma 公司。法舒地尔(fasudil)盐酸盐购自天津红日药业股份有限公司。BCA 蛋白定量试剂盒购自美国 PIERCE 公司。DAB 显色试剂盒购自中衫金桥生物技术有限公司。总 RNA 提取试剂盒和反转录试剂盒均购自美国 Promega 公司。增殖细胞核抗原(PCNA)抗体和 MYPT1 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司。p-MYPT1 抗体购自美国 Upstate 公司。辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠和羊抗兔抗体均购自美国 KPL 公司。ROCK1 PCR 反应引物由上海捷瑞生物工程公司合成。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 PSMCs 培养与鉴定

采用组织块种植法^[6]: 取体重 200 g 左右的 Wistar 雄性大鼠, 麻醉后处死, 无菌取出心肺。迅速分离肺动脉主干及左右肺动脉, D-Hanks 液漂洗, 仔细剥除外膜的纤维脂肪层及内皮细胞, 将剩余的中膜剪成 0.5 mm×1 mm 的小块, 移入培养瓶内, 使其在底部分布均匀, 加入含 20% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养液, 置于 37 °C, CO₂ 培养箱中静置培养。当大部分组织块长出细胞晕, 吸除培养液和组织块, 无菌 D-Hanks 液清洗后, 用 0.125% 胰蛋白酶+0.01% EDTA 消化分散细胞, 进行传代培养。通过三瓶置换法纯化 PSMCs。第 3~6 代细胞用于后续实验。细胞培养过程中, 在倒置显微镜下对细胞形态进行观察, 鉴定采用 α -肌动蛋白免疫细胞化学染色鉴定 PSMCs。

1.3 细胞分组与处理

选择第 3~6 代生长良好的 PSMCs, 消化并制备细胞悬液, 接种于培养板或培养瓶中, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养液培养 1~2 天至细胞融合达 80% 左右时, 换低浓度(0.1%)胎牛血清培养液培养 24 h, 使细胞生长同步化。然后随机分为空白对照组、5-HT (0.01、0.1、1、10 μ mol/L)组, 检测 5-HT 作用 24 h 对 PSMCs 增殖及 PCNA 表达的影响。另取生长良好、已同步化的 PSMCs 随机分为空白对照组、1 μ mol/L 5-HT 刺激 5、15、30、60、120、180 min 不同时间组来观察 ROCK1 mRNA 及 p-MYPT1 表达随时间的变化。另外, 取生长良好、已同步化的 PSMCs 随机分为空白对照组、1 μ mol/L 5-HT 组及法舒地尔 25、50、100 μ mol/L 组, 观察 Rho 激酶抑制剂法舒地尔对 5-HT 所诱导的 PSMCs 增殖的影响。

1.4 MTT 法检测 PSMCs 增殖

取对数生长期的 PSMCs, 消化、计数, 以 2×10^4 个/ml 的密度接种于 96 孔板中, 每孔 200 μ l, 培养 24 h 使细胞完全贴壁。细胞生长同步化, 以终浓度为 0.01、0.1、1、10 μ mol/L 的 5-HT 处理细胞, 每组设 6 个平行孔, 在加入 5-HT 后置培养箱中继续培养 24 h, 每孔加入 20 μ l 5 g/L MTT 溶液, 置培养箱中继续培养 4 h, 吸弃各孔上清液, 每孔加入 200 μ l 二甲基亚砜(DMSO)溶解紫色结晶, 室温震荡 10 min, 置自动酶标仪上于 490 nm 波长条件下测定各孔吸光度值 A。

1.5 免疫印迹检测 PCNA 和 p-MYPT1 表达

按 1.3 方法处理后, 消化分离细胞, 加入 RIPA 细胞裂解液(pH 7.5, 50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 5 mol/L Na₂EDTA, 0.5% NP-40, 0.5% Triton X-100, 0.1% SDS, 10% 甘油, 1 mmol/L Na₃VO₄, 2 mmol/L NaF, 30 μ g/ml PMSF, 10 μ g/ml 抑蛋白酶肽), 重悬细胞, 超声 2 min, 冰上放置 1 h, 使细胞充分裂解。4 °C 12 000 g 离心 10 min, 吸取上清液, 分装, -20 °C 保存, BCA 法蛋白质定量。10 μ g 等量蛋白上样, SDS 聚丙烯酰胺凝胶(分离胶 10%, 浓缩胶 5%)电泳分离, 电转至 PVDF 膜上(4 °C, 2 h), 室温下含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h, 加入一抗(1:200 稀释), 4 °C 过夜, 次日 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 然后加入相应辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000 稀释), 37 °C, 1 h。TBST 洗膜 3 次, TAB 显色。凝胶成像仪照相, Bio1D 软件进行灰度值测定, PCNA 的相对含量用其灰度值与 GAPDH 的灰度值比值来表示。MYPT1 的活化用 p-MYPT1/MYPT1 来表示。

1.6 RT-PCR 检测 ROCK1 mRNA 表达

按 1.3 方法处理后, 消化分离细胞, 按照总 RNA 提取试剂盒和反转录试剂盒操作步骤提取纯化 RNA, 并反转录成 cDNA, 进行 PCR 反应, 实验重复 3 次。引物序列如下: ROCK1: 5'-GGAAACGCTCCGAG-ACACTG-3' (有义), 5'-CTGGGATTTGCTGAA-GGTAAG-3' (反义), 产物长度 201 bp; β -肌动蛋白: 5'-CCAAGGCCAACC GCGAGAAGATGAC-3' (有义), 5'-AGGGTACATGGTGGT GCGCCAGAC-3' (反义), 产物长度 587 bp。PCR 反应条件如下: ROCK1 的扩增条件: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 40 s, 53 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 90 s, 72 °C 延伸 7 min, 共 35 个循环; β -肌动蛋白的扩增条件: 95 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 40 s, 58 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 90 s, 72 °C 延伸 10 min, 共 35 个循环。扩增产物进行 15 g/L 琼脂糖电

泳, Gold view 显色, 紫外透射反射仪观察扩增产物条带的大小及亮度, 凝胶成像系统拍照, Bio1D 软件进行图象分析, 测定产物条带的灰度值, 计算目标产物与 β -肌动蛋白的比值, 作为各扩增产物 mRNA 的相对表达量。

1.7 统计方法

采用 SPSS 15.0, Origin 7.5 软件进行数据分析及图象处理。实验数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, Dunnett t 检验进行比较, 以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 5-HT 诱导大鼠 PSMCs 增殖试验

分别加入不同浓度的 5-HT 作用于大鼠 PSMCs 24 h 后进行 MTT 检测, 结果表明, 与空白对照组相比, 0.01、0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT 组 A 值均明

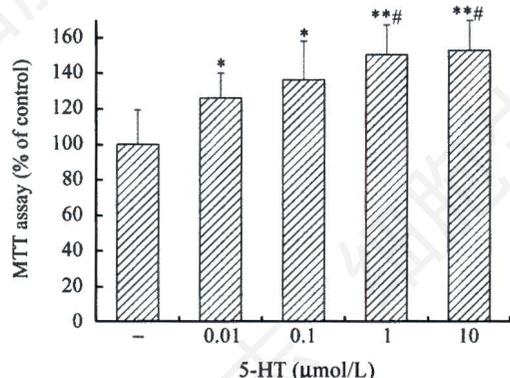


Fig.1 Effect of 5-HT on the proliferation of rat PSMCs, evaluated by MTT assay

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT group.

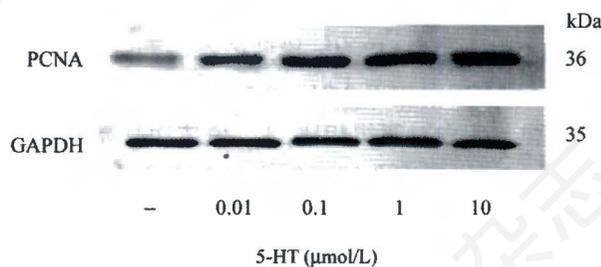


Fig.2 Effect of 5-HT on the PCNA expression of rat PSMCs, evaluated by Western blot assay

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT group.

显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。说明 4 种浓度的 5-HT 均能显著促进大鼠 PSMCs 增殖, 且有明显的浓度依赖性 (图 1)。

2.2 5-HT 对大鼠 PSMCs 中 PCNA 表达的影响

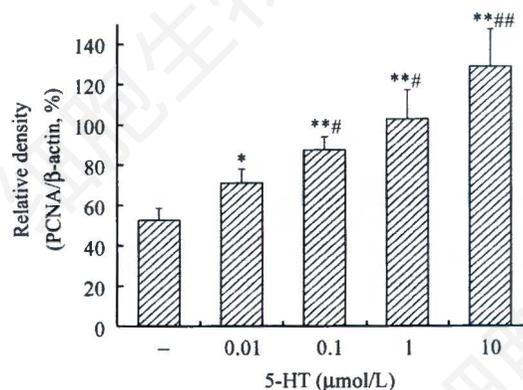
Western 印迹检测结果显示, 以蛋白质标准为参照确定 PCNA (36 kDa)、GAPDH (35 kDa) 的位置, 各组均在相应蛋白质的位置出现了棕色的阳性条带。灰度值测定结果表明, 与空白对照组相比, 0.01、0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT 组 PCNA 阳性条带明显加深, 与 GAPDH 条带的灰度比值显著增加, 说明 PCNA 相对表达量明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 图 2)。

2.3 5-HT 作用不同时间对大鼠 PSMCs 中 ROCK1 mRNA 表达的影响

RT-PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳及半定量分析表明, 与空白对照组相比, 1 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT 作用后在 15~180 min 内明显诱导大鼠肺平滑肌细胞中 ROCK1 mRNA 表达水平升高, 且在 30 min 时表达水平达最高 ($P < 0.01$), 随后有不同程度的下降, 但仍高于 5-HT 作用前的水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 说明 5-HT 对大鼠 PSMCs 中 ROCK1 mRNA 的表达有明显的诱导作用 (图 3)。

2.4 5-HT 作用不同时间对大鼠 PSMCs 中 Rho 激酶活化标志 p-MYPT1 表达的影响

ROCK 活化后, 进一步磷酸化其下游底物 MYPT1, 因此, p-MYPT1 的表达水平代表了 ROCK 的活化程度。Western 印迹结果显示, 1 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT 作用 5~180 min 内明显升高了 MYPT1 的磷酸化水平, 15 min 左右磷酸化水平最高 ($P < 0.01$), 随后有不同程度的下降, 但仍高于 5-HT 作用前的水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 说明 5-HT 对大鼠 PSMCs 中 ROCK 的活化有明显的诱导作用 (图 4)。



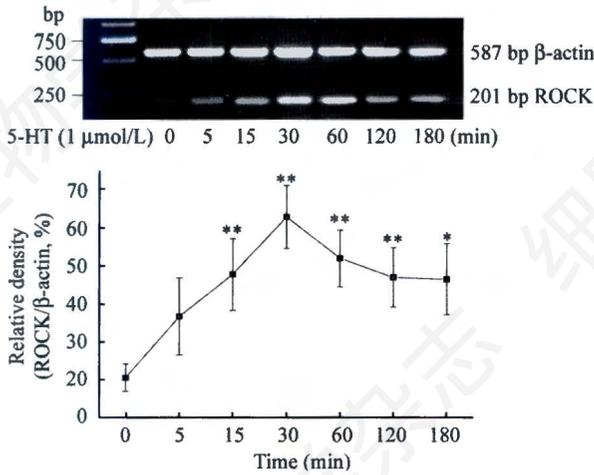


Fig.3 Effect of 5-HT on ROCK1 mRNA expression of rat PSMCs, evaluated by RT-PCR

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

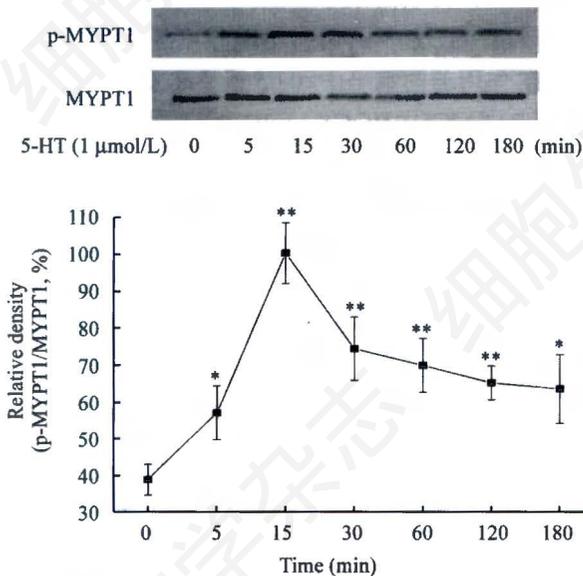


Fig.4 Effect of 5-HT on the activation of ROCK as measured by p-MYPT1 expression

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

2.5 Rho 激酶抑制剂法舒地尔对 5-HT 诱导的大鼠 PSMCs 增殖的影响

MTT 实验结果表明, 1 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT 能明显促进大鼠 PSMCs 增殖, 与空白对照组比, 5-HT 组 A 值明显提高($P < 0.01$)。与 1 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT 组比, 法舒地尔 25、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 各组 A 值均有不同程度下降, 说明其浓度依赖性地抑制了 5-HT 诱导的大鼠 PSMCs 的增殖($P < 0.01$, 图 5)。

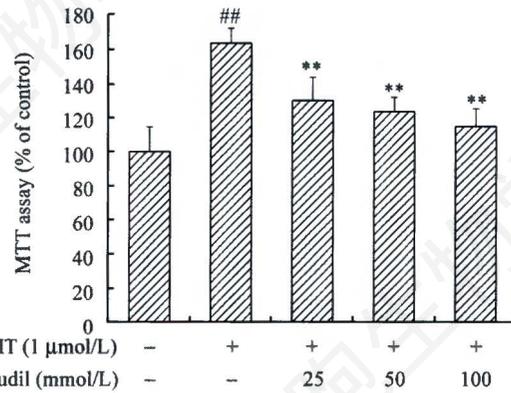


Fig.5 Inhibitory effect of fasudil on 5-HT-induced proliferation of rat PSMCs, evaluated by MTT assay

$P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs 1 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT group.

3 讨论

PASMCs 既是肺血管收缩的效应细胞, 也是增殖和迁移引起肺血管构型重建的细胞基础。肺血管重建是肺动脉高压的主要病理学特征, 缺氧、血管紧张素 II、内皮素-1、生长因子、炎症细胞因子等多种因素均与肺血管重建有关, 5-HT 是其中较为重要的一种。5-HT 作为一种重要的血管活性物质, 通过相应的 5-HT 受体或转运体(5-HTT)诱发细胞内相关信号转导机制, 启动细胞周期, 调节 PSMCs 的增殖与凋亡, 引起肺血管壁增厚和肺动脉高压^[7,8]。以往研究证明在野百合碱诱导的动物肺动脉高压模型中 5-HT 含量明显增高, 5-HT 受体表达显著增加^[9]。近来研究发现, ROCK 在血管紧张素 II、5-HT 等诱导的血管平滑肌细胞增殖中发挥重要作用^[10,11]。然而, 5-HT 诱导大鼠 PSMCs 增殖的作用以及在此过程中 Rho/ROCK 的激活及其信号途径还未详细阐明。故本文从 Rho/ROCK 信号途径出发, 在细胞水平对 5-HT 诱导的大鼠 PSMCs 的增殖及其机制进行了深入研究。

本实验首先通过 MTT 法研究了不同浓度的 5-HT 对大鼠 PSMCs 增殖的影响。结果表明在大鼠 PSMCs 中加入 0.01、0.1、1 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-HT 后, 与空白对照组相比, A_{490} 值依次升高, 并具有显著性。这说明在 0.01~10 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, 5-HT 对大鼠 PSMCs 有明显的促增殖作用, 且随 5-HT 浓度的升高而增强, 有一定的浓度依赖性。但 1 $\mu\text{mol/L}$ 与 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT 浓度组的 A_{490} 值无显著性差异, 提示 5-HT 浓度达到 1 $\mu\text{mol/L}$ 后, 对大鼠 PSMCs 的促增殖

作用可能进入平台期。PCNA 又称为周期蛋白,是存在于细胞核内的一种蛋白质,在细胞增殖和 DNA 合成方面起主要的作用^[12]。研究表明,PCNA 表达在 G₁ 晚期显著增加,在 S 期达到高峰, G₂/M 期迅速降低, M 期和静止期达到最低水平^[13,14]。PCNA 的高表达反映了细胞处于高度增殖状态。本实验通过 Western 印迹检测 PCNA 的表达,结果表明 5-HT 能明显促进 PCNA 的表达。由此可见,5-HT 促进 PCNA 的高表达,加速 PSMCs 由 G₁ 期向 S 期转化,进而明显促进 PSMCs 增殖,这一过程可能与 Rho/ROCK 信号通路有关,但具体机制有待于进一步研究。

Rho/ROCK 信号通路是细胞内重要的信号通路之一,RhoA 是 Ras 单体 GTP 酶超家族的一员,能结合并水解鸟苷酸,使其在活性型(GTP 结合)与失活型(GDP 结合)之间循环。ROCK 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员,是 Rho 的下游靶效应分子。ROCK 活化后,进一步磷酸化其下游底物 MYPT1,使其失活,失活的肌球蛋白磷酸酶不能将肌球蛋白轻链(MLC)脱磷酸化,使得细胞浆内磷酸化 MLC 水平提升,肌动蛋白-肌球蛋白交联增加,从而促进肌动蛋白微丝骨架的聚合,影响细胞的收缩、粘附、增殖、凋亡、迁移等生物学行为和功能^[15]。因此,p-MYPT1 的表达水平代表了 ROCK 的活化程度。本实验观察了 1 μmol/L 5-HT 作用不同时间大鼠 PSMCs 中 ROCK1 的表达及激活,结果表明 5-HT 明显诱导了 ROCK1 mRNA 的表达,也明显提高了 MYPT1 的磷酸化水平,说明 Rho/ROCK 通路在 5-HT 诱导的大鼠 PSMCs 增殖中发挥重要作用。

法舒地尔为 ROCK 抑制剂,与 ATP 竞争 ROCK 催化区的 ATP 结合位点,从而通过竞争性拮抗作用阻断了 ROCK 的活性,阻断了 Rho/ROCK 信号通路。因此,为进一步研究 Rho/ROCK 通路在大鼠 PSMCs 增殖中的作用,本实验还观察了法舒地尔对 5-HT 诱导的 PSMCs 增殖的影响。MTT 实验结果表明,法舒地尔浓度依赖性的抑制了 5-HT 诱导的大鼠 PSMCs 的增殖。进一步说明 Rho/ROCK 信号通路在 5-HT 诱导的大鼠 PSMCs 增殖中发挥重要作用。

参考文献(References)

- [1] Eddahibi S, Chaouat A, Morrell N, *et al.* Polymorphism of the serotonin transporter gene and pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease, *Circulation*, 2003, 108(15): 1839-1844
- [2] Seuwen K, Magnaldo I, Pouyssegur J. Serotonin stimulates DNA synthesis in fibroblasts acting through 5-HT_{1B} receptors coupled to a Gi-protein, *Nature*, 1988, 335(6187): 254-256
- [3] Lee SL, Simon AR, Wang WW, *et al.* H₂O₂ signals 5-HT-induced ERK MAP kinase activation and mitogenesis of smooth muscle cells, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 281(3): L646-L652
- [4] Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K. Regulation and functions of Rho associated kinase, *Exp Cell Res*, 2000, 261(1): 44-51
- [5] Brown JH, Del Re DP, Sussman MA. The Rac and Rho hall of fame: a decade of hypertrophic signaling hits, *Circ Res*, 2006, 98(6): 730-742
- [6] Li B, Yang L, Shen J, *et al.* The antiproliferative effect of sildenafil on pulmonary artery smooth muscle cells is mediated via upregulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and degradation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation, *Anesth Analg*, 2007, 105(4): 1034-1041
- [7] Perros F, Dorfmueller P, Humbert M. Current insights on the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension, *Semin Respir Crit Care Med*, 2005, 26(4): 355-364
- [8] 李 军, 王大为, 秦玉明, 等. Tenascin 在野百合碱诱导肺动脉高压大鼠右心室结构重建中的表达及意义, *中国现代医学杂志*, 2006, 16(12): 1761-1765
- [9] Kanai Y, Hori S, Tanaka T, *et al.* Role of 5-hydroxytryptamine in the progression of monocrotaline induced pulmonary hypertension in rats, *Cardiovasc Res*, 1993, 27(9): 1619-1623
- [10] Guilluy C, Eddahibi S, Agard C, *et al.* RhoA and Rho kinase activation in human pulmonary hypertension: role of 5-HT signaling, *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 179(12):1151-1158
- [11] Ohtsu H, Mifune M, Frank GD, *et al.* Signal-crosstalk between Rho/ROCK and c-Jun NH₂-terminal kinase mediates migration of vascular smooth muscle cells stimulated by angiotensin II, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(9): 1831-1836
- [12] 刘 洁, 崔泽实, 罗 阳, 等. Cyclin G₂ 抑制胃癌细胞增殖的实验研究. *中国现代医学杂志*, 2007, 17(1): 36-43
- [13] Pierron G, Puvion Dutilleul F. Localization of the newly initiated and processed ribosomal primary transcripts during the mitotic cycle in Physarum polycephalum, *Exp Cell Res*, 1996, 229 (2): 407-420
- [14] Miyata M, Ito M, Sasajima T, *et al.* Development of monocrotaline- induced pulmonary hypertension is attenuated by a serotonin receptor antagonist, *Lung*, 2000, 178(2): 63-73
- [15] Liu Y, Suzuki YJ, Day RM, *et al.* Rho kinase-induced nuclear translocation of ERK1/ERK2 in smooth muscle cell mitogenesis caused by serotonin, *Circ Res*, 2004, 95(6): 579-586

Rho/ROCK Signal Pathway in 5-HT-induced Proliferation of Rat Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells

Xue-Yan Chen, Huan-Long Liu¹, Zhen-Hua Pan, Qing-Feng Miao, Yong-Jian Zhang*

(Department of Pharmacology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;

¹The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract To explore the effects of Rho/ROCK signal pathway in 5-hydrocrotaline (5-HT)-induced proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs). PASMCs were cultured using the explant technique. The proliferation of PASMCs induced by 5-HT (0.01, 0.1, 1 and 10 $\mu\text{mol/L}$) and the inhibitory effect of fasudil on 5-HT-induced proliferation of PASMCs were evaluated by MTT assay. The expression of PCNA and the phosphorylation of myosin phosphatase target subunit-1 (MYPT1) were detected by Western blot analysis. Meanwhile, the mRNA expression of ROCK1 was evaluated by RT-PCR. The results of MTT assay suggested that 5-HT, from 0.01 to 10 $\mu\text{mol/L}$, significantly induced proliferation of rat PASMCs ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Similarly, Western blot analysis of PCNA indicated that the expression of PCNA was also higher in 5-HT groups than that in control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The results of Western blot and RT-PCR analysis suggested that 1 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT caused phosphorylation of MYPT1, with a peak at 15 min ($P < 0.01$) and induced significantly upregulation of ROCK1 mRNA expression, with a peak at 30 min ($P < 0.01$). The proliferation of PASMCs induced by 5-HT was inhibited by pretreatment of PASMCs with fasudil ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Thus, the results in this study suggested that 5-HT mediated ROCK1 mRNA expression and activation, fasudil inhibited 5-HT-induced proliferation of PASMCs obviously. So we concluded that Rho/ROCK signal pathway played an important role in 5-HT-induced proliferation of rat PASMCs.

Key words Rho kinase; 5-hydrocrotaline; fasudil; pulmonary artery smooth muscle cells; proliferation

Received: August 19, 2009 Accepted: November 19, 2009

This work was supported by the Health Department of Hebei Province (No.20090306)

*Corresponding author. Tel: 86-311-86266821, E-mail: zhangyjlm@163.com