

## 西罗莫司对大鼠血管平滑肌细胞增殖、起始识别复合物 1 表达的影响及机制探讨

王 倩<sup>1,2</sup>, 舒茂琴<sup>2\*</sup>

1. 第二军医大学长海医院心血管内科, 上海 200433
2. 第三军医大学西南医院心内科, 重庆 400038

**[摘要]** **目的** 探讨西罗莫司对体外培养的大鼠血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖、起始识别复合物 1(ORC1)表达的影响及机制。**方法** 细胞随机分为对照组和实验组, 每组 3 瓶/孔, 血清饥饿法培养细胞 24 h 使其同步化。对照组采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养, 实验组采用含 10  $\mu\text{mol/L}$  西罗莫司+10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养。继续培养 0~48 h, 采用免疫细胞化学法检测增殖细胞核抗原(PCNA)表达, 电子显微镜观察细胞超微结构, RT-PCR 法检测 ORC1 mRNA 的表达, 蛋白质印迹法检测 P53、cyclin D1、cyclin A 和 ORC1 蛋白的表达。**结果** 与对照组相比, 实验组 48 h PCNA 阳性表达率降低[(20 $\pm$ 2.1)% vs (80 $\pm$ 3.0)%,  $P<0.05$ ], P53 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ ); 细胞核有固缩的迹象; 实验组 cyclin D1 蛋白表达轻微升高 ( $P>0.05$ ), 48 h cyclin A 蛋白的表达下降 ( $P<0.05$ )。对照组 ORC1 mRNA 的表达在 0~12 h 升高, 24~48 h 降低, 高峰期在 12 h。实验组细胞 ORC1 mRNA 的表达始终处于高水平。与同时间对照组比较, 实验组 48 h ORC1 mRNA 的表达升高 ( $P<0.05$ )。蛋白质印迹分析结果与之相似。**结论** 西罗莫司抑制 VSMCs 增殖, 同时促进其凋亡; 其作用环节可能是通过阻止细胞由  $G_0/G_1$  期向 S 期转化, 诱导细胞处于静止状态; ORC1 的作用环节位于西罗莫司作用点的上游, 进一步支持 ORC1 参与细胞复制起始过程。

**[关键词]** 西罗莫司; 血管平滑肌细胞; 细胞增殖; 起始识别复合物 1

**[中图分类号]** R 331.32 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)09-0960-05

### Effect of sirolimus on cell proliferation and expression of origin recognition complex 1 in vascular smooth muscle cells of rats

WANG Qian<sup>1,2</sup>, SHU Mao-qin<sup>2\*</sup>

1. Department of Cardiovasology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

**[Abstract]** **Objective** To study the effect and mechanism of sirolimus on cell proliferation and expression of origin recognition complex 1 (ORC1) in rat vascular smooth muscle cells (VSMCs) *in vitro*. **Methods** VSMCs were randomly divided into two groups, three bottles/well per group; synchronization of cells was achieved by serum starvation. Control group was cultured in DMEM with 10% FBS, and experimental group was cultured in DMEM with 10  $\mu\text{mol/L}$  sirolimus plus 10% FBS. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) protein was analyzed by immunocytochemistry, VSMC ultramicrostructure was observed under electron microscope, and expressions of P53, cyclin D1, cyclin A, and ORC1 mRNA and protein were displayed by RT-PCR and Western blotting analysis during 0-48 h of culture. **Results** Compared with control group, the positive rate of PCNA protein in experimental group was significantly decreased after 48 h culture [(20 $\pm$ 2.1)% vs [80 $\pm$ 3.0)%,  $P<0.05$ ], P53 protein expression was significantly increased ( $P<0.05$ ), with evidence of pyknosis. The expression of cyclin D1 was slightly increased in the experimental group ( $P>0.05$ ), and the expression of cyclin A was significantly decreased after 48 h culture ( $P<0.05$ ). ORC1 mRNA expression in the control group was increased during 0-12 h and decreased during 24-48 h, with the expression peaked at 12 h. In the experimental group ORC1 mRNA expression was kept at a high level, with the expression at 48 h being significantly higher than that in the control group ( $P<0.05$ ); similar results were also found for ORC1 protein expression. **Conclusion** Sirolimus can inhibit the proliferation of VSMCs and promote their apoptosis. The inhibition of VSMCs proliferation may be through preventing cell transformation of  $G_0/G_1$  phase to S phase and keeping cells at resting phase. The effect of ORC1 in cell cycle occurs at the upstream of sirolimus, which further supports that ORC1 participates in the initiation process of DNA replication.

**[Key words]** sirolimus; vascular smooth muscle cells; cell proliferation; origin recognition complex 1

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(9):960-964]

**[收稿日期]** 2011-07-29 **[接受日期]** 2011-08-30

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30470727). Supported by National Natural Science Foundation of China(30470727).

**[作者简介]** 王 倩, 硕士. E-mail: qianqianwang2046@163.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 023-68765671, E-mail: Shumaoqin@sina.com

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 的过度增殖是高血压、动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS)、经皮冠状动脉成形术 (percutaneous coronary angiography, PTCA) 后再狭窄等病理过程的基本事件。细胞增殖通过 DNA 复制实现, 起始识别复合物 (origin recognition complex, ORC) 是启动真核细胞 DNA 复制的关键因子<sup>[1]</sup>, ORC1 是其最大的亚基和功能基因。本课题组前期研究显示 siRNA 干扰造成 ORC1 基因沉默可使 VSMCs 停留在静止状态 ( $G_0/G_1$  期)<sup>[2]</sup>。增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、P53 分别是反映细胞增殖、凋亡状态的传统指标。细胞周期蛋白 (cyclin) D1 主要在细胞周期的  $G_1$  期起作用, 调节  $G_1/S$  期的过渡, 而 cyclin A 产生于细胞周期的  $G_0/S$  转换阶段, 其含量逐渐增高直至分裂前期 (M 期)。

西罗莫司 (sirolimus) 又名雷帕霉素 (rapamycin), 是临床上广泛使用的药物涂层支架的主要成分之一, 对预防和缓解 PTCA 术后再狭窄具有良好的作用<sup>[3]</sup>, 其抑制 VSMCs 增殖的机制比较复杂。西罗莫司和 ORC1 均参与 VSMCs 的增殖过程, 但在细胞周期中的作用环节不同, 前者可能使细胞阻滞在  $G_1 \sim S$  期, 后者可能参与 DNA 复制启动 ( $G_0 \sim G_1$  期)。西罗莫司对细胞增殖研究的报道较多, 但对 ORC1 表达影响的研究甚少。本实验拟探讨西罗莫司对 VSMCs 增殖、ORC1 表达的影响及机制, 试图明确两者在细胞周期进程中的作用环节, 为寻找更好的抗细胞增殖药物或方法提供实验依据。

## 1 材料和方法

1.1 材料 SD 大鼠, 雌雄不限, 120~150 g, 购自第三军医大学动物所。西罗莫司购自 CST 公司, 以二甲基亚砜 (DMSO) 配制成 1 mmol/L 的储存液,  $-80^\circ\text{C}$  冰箱保存, 使用前稀释至工作浓度。兔抗大鼠 ORC1 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司, 山羊抗兔 HRP-IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司, Tripure 试剂购自 Roch 公司, RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物技术有限公司, ORC1 引物和  $\beta$ -actin 引物购自上海基康生物技术有限公司。

1.2 细胞培养及分组 采用组织块贴壁法培养 SD 大鼠原代 VSMCs。细胞随机分为对照组和实验组, 每组 3 瓶/孔。血清饥饿法培养 24 h, 使其同步化。对照组加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液, 实验组加入含 10  $\mu\text{mol/L}$  西罗莫司+10% FBS 的 DMEM 培养液, 混匀, 放入  $\text{CO}_2$  孵箱中继续培养。

1.3 免疫细胞化学检测 PCNA 蛋白表达 按免疫

组化试剂盒 (购自武汉博士德生物工程有限公司) 说明书操作, 检测各组培养 48 h 细胞 PCNA 蛋白的表达。随机取 3 个视野, 计算 PCNA 阳性表达百分率。实验重复 3 次。在光镜下观察各组细胞 PCNA 的表达情况, 阳性表达 PCNA 的细胞核呈棕褐色, 阴性表达 PCNA 的细胞核呈蓝色。

1.4 电子显微镜观察细胞超微结构 采用透射电镜 (荷兰, 飞利浦 TECNAI10) 技术, 观察各组作用 48 h 细胞超微结构的变化。常规消化、收集细胞, 缓慢加入  $4^\circ\text{C}$  预冷的 2.5% 戊二醛 4 ml, 切勿吹散细胞团块,  $4^\circ\text{C}$  固定 2 h。用 1% 四氧化锇在  $4^\circ\text{C}$  固定 30 min, 脱水、包埋、制备超薄切片。

1.5 蛋白质印迹法检测 P53、cyclin D1、cyclin A、ORC1 蛋白的表达 常规收集 6、12、24、48 h 各组细胞, 按上海申能博彩生物科技有限公司的 RIPA 使用说明提取细胞总蛋白。用考马斯亮蓝法定量蛋白, 12% 积层胶电泳电压 50 V 左右, 6% 分离胶电泳电压 60~65 V。一抗 1:200 稀释, 同时加入  $\beta$ -actin。二抗 1:2500, 显影后清水漂洗, 再定影。背景洗涤。实验重复 3 次。

1.6 RT-PCR 法检测 ORC1 mRNA 的表达 自培养 6、12、24、48 h 常规消化收集细胞。提取各组细胞总 RNA, RNA 检测合格, 按以下条件进行反转录反应:  $37^\circ\text{C}$  水浴 55 min,  $95^\circ\text{C}$  水浴 10 min。按以下条件进行 PCR 扩增:  $95^\circ\text{C}$  预变性 3 min;  $95^\circ\text{C}$  变性 30 s,  $57^\circ\text{C}$  退火 30 s,  $72^\circ\text{C}$  延伸 1 min, 共 35 个循环;  $72^\circ\text{C}$  温育 7 min;  $4^\circ\text{C}$  结束反应。立即电泳或  $4^\circ\text{C}$  保存。100 V, 40 mA 电泳, 待样品条带至胶面 1/2 位置为止。采用凝胶分析软件 Quantity One 4.2.1 测定实验结果中各个条带的光密度值, 以  $\beta$ -actin 为内参, 计算 ORC1 表达强度。实验重复 3 次。

1.7 统计学处理 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析, 检验水平 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 PCNA 蛋白的表达 结果 (图 1) 可见, 与同时时间对照组比较, 实验组 48 h PCNA 阳性表达率降低, 差异有统计学意义 [ $(20 \pm 2.1)\%$  vs  $(80 \pm 3.0)\%$ ,  $P < 0.05$ ]。

2.2 细胞超微结构的变化 电镜下可见, 无血清培养 24 h 后细胞核边缘较规则, 细胞表面突起较少, 部分染色质边集, 核膜增厚。对照组细胞加入含 10% FBS 的 DMEM 培养 48 h 后, 核边缘不规则, 核仁明显, 细胞表面突起增多, 细胞器丰富, 线粒体嵴增多; 实验组细胞加入含 10  $\mu\text{mol/L}$  西罗莫司+10% FBS

的DMEM培养48h后,核边缘较规则,细胞表面突起减少,部分染色质边集于核膜下,呈块状或新月状。见图2。

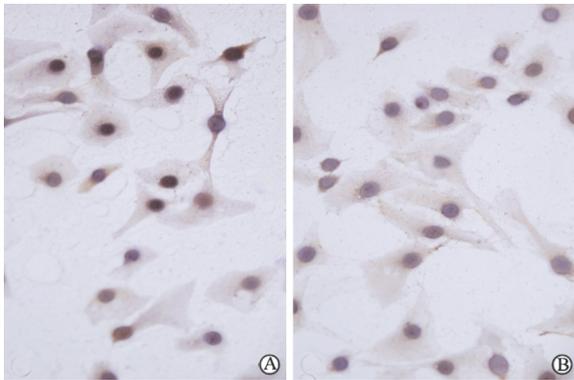


图1 各组VSMCs培养48h PCNA的表达

Fig 1 Expression of PCNA in control group and experimental group after 48 h culture(SP staining)

VSMCs: Vascular smooth muscle cells; PCNA: Proliferating cell nuclear antigen. A: Control group; B: Experimental group. Original magnification: ×200

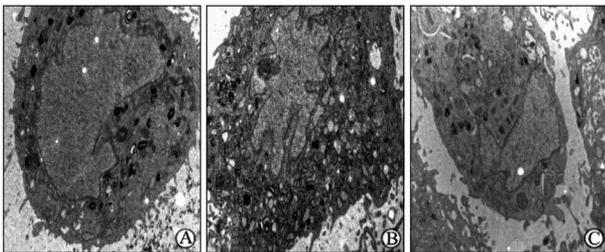


图2 电子显微镜下观察各组VSMCs超微结构

Fig 2 Ultrastructure of VSMCs in control group and experimental group under electron microscope

VSMCs: Vascular smooth muscle cells. A: VSMCs were cultured by serum starvation for 24 h; B: Control group (VSMCs were cultured in 10% FBS for 48 h); C: Experimental group (VSMCs were cultured in 10 μmol/L sirolimus plus 10%FBS for 48 h). Some chromatin was assembled to the membrane of nucleus, forming masses or crescent in experimental group. Original magnification: ×6 200

2.3 凋亡因子P53蛋白的表达 各组培养12、48h检测细胞P53蛋白的表达,结果见图3。可见,与同时间对照组比较,实验组P53蛋白的表达升高,差异有统计学意义(P<0.05)。

2.4 各组细胞cyclin D1、cyclin A的表达变化 各组培养12、48h检测cyclin D1、cyclin A蛋白的表达结果见图4。可见,与同时间对照组比较,实验组cyclin D1蛋白表达轻微升高但差异无统计学意义(P>0.05),而48h时cyclin A蛋白的表达下降,差异有统计学意义(P<0.05)。

2.5 各组细胞ORC1 mRNA的表达变化 对照组

细胞在10% FBS刺激下,ORC1 mRNA表达在6~12h逐渐升高,而24~48h明显下降,高峰期在12h。实验组细胞ORC1 mRNA的表达始终处于高水平,与同时间对照组比较,实验组48h ORC1 mRNA的表达明显升高,差异有统计学意义(P<0.05)。见图5。

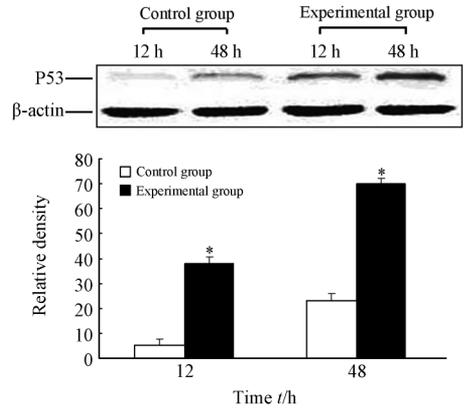


图3 蛋白质印迹法检测各组培养12h和48h P53蛋白的表达

Fig 3 Western blotting analysis of P53 protein expression in VSMCs of control group and experimental group after 24 h and 48 h culture

\* P<0.05 vs control group. n=3, x̄±s

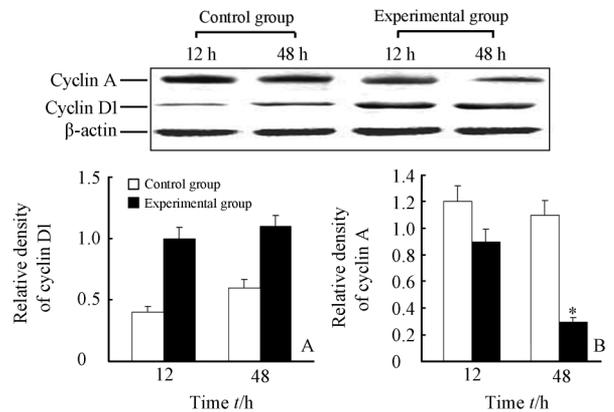


图4 蛋白质印迹法检测各组培养12h和48h cyclin D1(A)、cyclin A(B)蛋白的表达

Fig 4 Western blotting analysis of cyclin D1(A) and cyclin A(B) protein expression in VSMCs of control group and experimental group at 12 h and 48 h culture

\* P<0.05 vs control group. n=3, x̄±s

2.6 各组细胞ORC1蛋白的表达变化 对照组细胞在10% FBS刺激下,ORC1蛋白表达在6~12h明显升高,而12~48h明显下降,高峰期在12h。实验组细胞ORC1蛋白的表达始终处于高水平,与同时间对照组比较,实验组48h ORC1蛋白的表达明显升高,差异有统计学意义(P<0.05)。见图6。

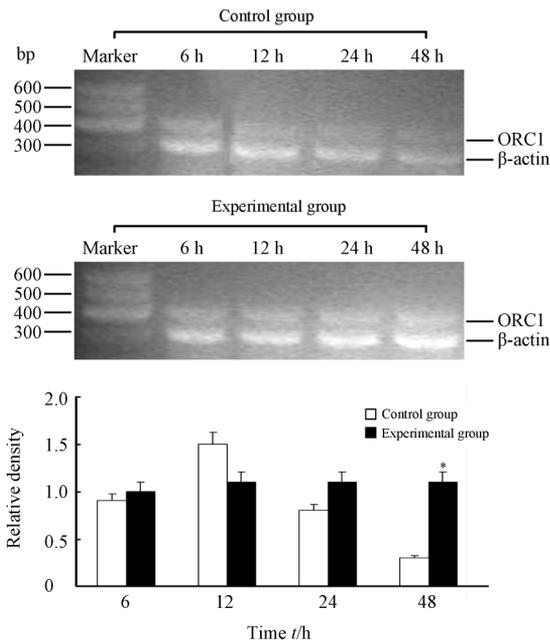


图 5 RT-PCR 检测各组培养 6、12、24、48 h VSMCs ORC1 mRNA 表达的变化

Fig 5 Expression of ORC1 mRNA in VSMCs of control group and experimental group VSMCs at 6 h, 12 h, 24 h and 48 h culture

\*  $P < 0.05$  vs control group.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

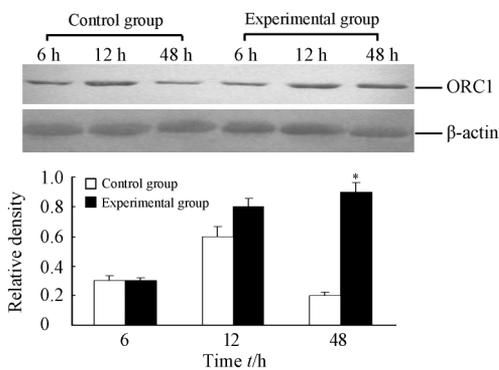


图 6 各组培养 6、12 和 48 h VSMCs ORC1 蛋白的表达

Fig 6 Expression of ORC1 protein in VSMCs of control group and experimental group at 6 h, 12 h and 48 h culture

\*  $P < 0.05$  vs control group.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

### 3 讨论

VSMCs 是具有增殖潜能的真核细胞,处于分化状态( $G_0$ 或  $G_1$ 期)的 VSMCs 在受到环境因子刺激时能正常增殖;但进入增殖状态(如  $G_1/S$ 期)的细胞若被阻滞,其再次增殖时可能引起有丝分裂的不稳定(单倍体或多倍体形成)。因此,探讨西罗莫司和 ORC1 在细胞增殖过程中的作用点哪个位于上游、哪个能更好地将细胞抑制在其增殖周期的早期阶段

是很有必要的。

PCNA 是一种仅在增殖细胞合成和表达的 DNA 聚合酶  $\delta$  的辅助蛋白,其表达和合成与细胞增殖周期相关,主要表达于细胞的 G 期和 S 期,可准确反映细胞的增殖状况<sup>[4]</sup>。PCNA 表达的高低与细胞的增殖能力呈正相关,也是检测肿瘤增殖能力的可靠指标,随着对 ORC 研究的深入,有人提出 ORC 相关复制因子可作为肿瘤增殖的新型生物标记<sup>[5]</sup>。本研究发现西罗莫司可使细胞 PCNA 的表达明显降低,提示西罗莫司对细胞的增殖有抑制作用。

细胞凋亡是受基因控制的一种主动性细胞自杀过程,受凋亡相关基因的调控。P53 基因是凋亡相关因子。本实验发现,西罗莫司作用于 VSMCs 48 h 细胞 P53 蛋白表达升高,提示西罗莫司促进 VSMCs 凋亡。凋亡的超微结构变化主要表现为细胞体缩小,胞质浓缩、核固缩、染色质边集,形成典型的凋亡小体等。但有些细胞并无凋亡小体形成,而仅仅发生核固缩和胞质浓缩。本研究结果显示,西罗莫司作用于 VSMCs,使细胞呈现核固缩的迹象,进一步提示西罗莫司有促进 VSMCs 发生凋亡的能力。

细胞周期是指真核细胞有丝分裂进行细胞增殖的循环过程,主要由  $G_0$ 期、 $G_1$ 期、S 期、 $G_2$ 期和 M 期组成。在细胞周期的网络调控体系中,细胞周期蛋白的时相特异性积累与分解是确保细胞周期有序变更的基础,其中 cyclin D1 主要在细胞周期的  $G_1$ 期起作用,调节  $G_1/S$ 期的过渡;cyclin A 在细胞周期  $G_1/S$ 、 $G_2/M$ 期转换均起重要作用<sup>[6]</sup>。Cyclin D1 在  $G_1$ 早期合成, $G_1$ 后期达高峰,进入 S 期前降解。细胞在生长因子的刺激下, $G_1$ 期 cyclin D1 与其伴侣分子 CDK4 或 CDK6 结合后进入细胞核,并被激活形成 cyclin D1 与 CDK4/6 的复合物,使下游蛋白磷酸化,从而启动细胞 DNA 复制,细胞通过  $G_1$ 期进入 S 期<sup>[7]</sup>。Cyclin A 作为细胞周期正调控因子,与 CDK2 结合,形成活性激酶复合物(cyclin A/CDK2),导致 pRb 磷酸化,释放出转录因子 E2F,从而引起一系列与 S 期相关因子的转录,使细胞由  $G_1$ 期进入 S 期,启动 DNA 合成,促进细胞增殖<sup>[7]</sup>。本研究发现,西罗莫司作用于 VSMCs 可使 cyclin D1 蛋白的表达轻微升高,而 cyclin A 蛋白的表达显著降低。提示西罗莫司可能是通过阻止细胞由  $G_0/G_1$ 期向 S 期转化,诱导细胞处于静止状态。

胡新华等<sup>[8]</sup>利用 RNA 干扰技术特异性沉默西罗莫司靶蛋白基因,发现 VSMCs  $G_0/G_1$ 期向 S 期转化受阻,细胞的分裂、增殖受到限制,凋亡机制启动,更多细胞停滞在  $G_0/G_1$ 期,与本研究结果一致。Rosner 等<sup>[9]</sup>发现西罗莫司对 PTCA 术后再狭窄增生的

VSMCs的抑制作用与正常 VSMCs的抑制作用一致,均使细胞由 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期向 S期的进程受阻,而对 G<sub>2</sub>期、M期没有影响。以上结果提示,西罗莫司抑制 VSMCs增殖可能是通过抑制 PCNA 蛋白的表达,同时上调 P53 蛋白表达,促进细胞凋亡,阻止细胞由 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期向 S期转化,使细胞主要停留在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期,引起 cyclin D1 表达轻微升高、cyclin A 表达显著下降。

国外研究报道,在血清饥饿状态下即静止期,ORC1 表达非常低,血清刺激 0~3 h 后,ORC1 表达低,血清刺激 6~12 h 后,ORC1 开始上升,当血清刺激 12 h,ORC1 表达高峰,12 h 后,ORC1 表达逐渐减少<sup>[10]</sup>。Mehra 等<sup>[11]</sup>发现人类恶性疟原虫 ORC1 在滋养体和裂殖体阶段有大量表达,且能阻止疟原虫成熟与发育,是启动真核生物 DNA 复制的必要因子。我们前期研究发现,ORC1 在 G<sub>1</sub>期增加,在 S期降解,ORC1 的过度表达改变了 DNA 合成的模式,推测 ORC1 在细胞周期中参与调控 DNA 复制的启动过程<sup>[12]</sup>。本研究结果显示 ORC1 在细胞处于静止期表达弱,12 h 表达明显增加,其后逐渐减少。在增殖活跃期,ORC1 表达明显,在静止期 ORC1 表达弱或检测不到,与国外报道结果一致。

ORC1 的周期性变化是由遍在蛋白-26S 蛋白酶体抑制剂介导的,ORC1 属于 S 期特异性的遍在蛋白。蛋白酶体特异性抑制剂 MG132 能使低水平的 ORC1 迅速增加。用阿菲迪霉、羟基脲或胸腺嘧啶脱氧核苷处理后的处于 S 期的细胞,其 ORC1 浓度非常低,一旦诱导剂被阻断,处于 S 早期的细胞又会开始合成 DNA 但无 ORC1 表达增加,说明程序性 ORC1 的降解早于 S 早期,聚集在 G<sub>1</sub>期的 ORC1 对 DNA 合成无明显影响。因此,ORC1 与细胞周期进程密切相关,是启动细胞周期从 G<sub>0</sub>期进入 G<sub>1</sub>/S 期必不可少的因子。ORC1 的迅速降解或清除能有效地预防细胞周期的再次启动<sup>[13]</sup>。最近,有报道称 ORC1 除了作为 DNA 复制起始因子之外,可能还具有调节染色体聚集和分离、细胞分裂、细胞周期和生长、细胞代谢的作用<sup>[14-15]</sup>。

在真核细胞中,ORC1 的量在 G<sub>1</sub>期升高,在 S 期降低。理论上,若西罗莫司的作用环节在 ORC1 的上游,则西罗莫司作用期间可抑制 ORC1 的表达;若西罗莫司作用位点位于 ORC1 的下游,则 ORC1 的表达升高。本研究结果提示 ORC1 在细胞周期中的作用环节位于西罗莫司作用位点的上游,进一步支持 ORC1 参与 VSMCs DNA 复制的启动过程,为临床上更好地预防和治疗 AS、PCI 术后再狭窄等血管

增生性疾病提供了实验依据。

(志谢 感谢解放军 252 医院心血管内科江明宏老师在细胞原代培养、免疫组织化学检测等方面给予的大力指导。)

## [参考文献]

- [1] DePamphilis M L, Blow J J, Ghosh S, Saha T, Noguchi K, Vassilev A. Regulating the licensing of DNA replication origin in metazoa[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2006, 18:231-239.
- [2] Shu M Q, Qin Y L, Jiang M H. RNA interference targeting ORC1 gene suppresses the proliferation of vascular smooth muscle cells in rats[J]. *Exp Mol Pathol*, 2008, 84:206-212.
- [3] 张鲁锋,肖 锋,李 简,王 进,石志辉,李春英.局部缓释雷帕霉素抑制静脉移植血管内膜增生[J]. *中华医学杂志*, 2006, 86:1706-1710.
- [4] 黄再捷.增殖细胞核抗原表达与鼻咽癌放射敏感性关系的研究[J]. *医学临床研究*, 2011, 28:236-237.
- [5] Semple J W, Duncker B P. ORC-associated replication factors as biomarkers for cancer[J]. *Biotechnol Adv*, 2004, 22:621-631.
- [6] 杨兰泽,高 静,米建强,谢顺清,杨冬梅.胃癌及癌前病变组织中幽门螺杆菌感染与 P53、p21WAF1、PCNA、cyclin A 蛋白表达的相关性研究[J]. *实用癌症杂志*, 2007, 22:129-133.
- [7] Stacey D W. Cyclin D1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15:158-163.
- [8] 胡新华,张 强,杨 军,杨德华,刘程伟,张志深. RNA 干扰沉默雷帕霉素靶蛋白基因表达对血管平滑肌细胞增殖活性的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2006, 23:1181-1184.
- [9] Rosner D, McCarthy N, Bennett M. Rapamycin inhibits human in stent restenosis vascular smooth muscle cells independently of pRB phosphorylation and P53[J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 66:601-610.
- [10] Ohta S, Tatsumi Y, Fujita M, Tsurimoto T, Obuse C. The ORC1 cycle in human cells: II. Dynamic changes in the human ORC complex during the cell cycle[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278:41535-41540.
- [11] Mehra P, Biswas A K, Gupta A, Gourinath S, Chitnis C E, Dhar S K. Expression and characterization of human malaria parasite *Plasmodium falciparum* origin recognition complex subunit 1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 337:955-966.
- [12] 江明宏,舒茂琴,覃跃龙. ORC1 与大鼠血管平滑肌细胞 DNA 复制的关系及意义探讨[J]. *第三军医大学学报*, 2006, 28:543-545.
- [13] Méndez J, Zou-Yang X H, Kim S Y, Hidaka M, Tansey W P, Stillman B. Human origin recognition complex large subunit is degraded by ubiquitin-mediated proteolysis after initiation of DNA replication[J]. *Mol Cell*, 2002, 9:481-491.
- [14] Scholefield G, Veening J W, Murray H. DnaA and ORC: more than DNA replication initiators[J]. *Trends Cell Biol*, 2011, 21:188-194.
- [15] Sasaki T, Gilbert D M. The many faces of the origin recognition complex[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19:337-343.

[本文编辑] 孙 岩