

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2003)11-06-0512-05

血管紧张素转化酶反义 cDNA 对大鼠心脏成纤维细胞胶原合成的抑制作用

周法光, 吴可贵, 林明, 王向宇, 许昌生, 王华军

(福建医科大学附属第一医院心内科, 福建省高血压研究所, 福建省福州市 350005)

[关键词] 分子生物学; 反义 cDNA 抑制胶原合成; 转染技术; 血管紧张素转化酶; 脂质体; 心脏成纤维细胞; 胶原合成

[摘要] 为研究血管紧张素转化酶反义 cDNA 对心脏成纤维细胞胶原合成的影响, 以脂质体为载体, 用血管紧张素转化酶反义 cDNA 转染体外培养的发发性高血压大鼠心脏成纤维细胞, 测定³H-脯氨酸掺入率以评价对心脏成纤维细胞胶原合成的作用。用反转录聚合酶链反应检测反义基因的表达, 及其对血管紧张素转化酶基因表达的影响, 同时检测细胞血管紧张素转化酶活性的变化。血管紧张素转化酶反义 cDNA 能在心脏成纤维细胞中表达, 在转染后第 4 天达到表达高峰, 至少持续 1 周, 能减少自发性高血压大鼠心脏成纤维细胞的血管紧张素转化酶 mRNA 的表达, 且减少程度与反义 cDNA 的表达水平呈正相关; 转染能减少自发性高血压大鼠心脏成纤维细胞的血管紧张素转化酶活性 (14.23 ± 1.62 比 26.53 ± 2.50 u/10⁵ 个细胞, $P < 0.05$), 但对 Wistar Kyoto 大鼠细胞血管紧张素转化酶活性无明显影响 ($P > 0.05$); 反义 cDNA 明显减少自发性高血压大鼠心脏成纤维细胞³H-脯氨酸掺入率 (4 355.7 ± 75.9 比 6 310.3 ± 98.9 cpm/10⁵ 个细胞, $P < 0.01$), 但对 Wistar Kyoto 大鼠心脏成纤维细胞³H-脯氨酸掺入率无明显影响 ($P > 0.05$)。以脂质体为载体, 血管紧张素转化酶反义核酸能抑制自发性高血压大鼠心脏成纤维细胞过高的基础胶原合成活性。提示血管紧张素转化酶反义核酸在胶原合成增多的相关疾病治疗中有潜在的价值。

[中图分类号] Q78

[文献标识码] A

Angiotensin Converting Enzyme Antisense cDNA Inhibiting the Collagen Synthesis of Cardiac Fibroblasts in Spontaneously Hypertensive Rats

ZHOU Fa-Guang, WU Ke-Gui, LIN Ming, WANG Xiang-Yu, XU Chang-Sheng, and WANG Hua-Jun

(The First Affiliated Hospital, Fujian Medical University, Hypertension Institute of Fujian Province, Fuzhou, Fujian 350005, China)

[KEY WORDS] Angiotensin Converting Enzyme; Liposome; Cardiac Fibroblast; Collagen Synthesis; Transfection; Antisense cDNA

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of angiotensin converting enzyme (ACE) antisense cDNA on the synthesis of collagen of the cardiac fibroblasts (Fbs) from spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar Kyoto rats (WKY). **Methods** In vitro, Fbs from SHR and WKY rats was transferred with target ACE antisense cDNA (AS), ACE tuncated cDNA (TS) and empty vector (control) mediated by liposome. Two days after transfection, the target gene expression and the effect on ACE expression was evaluated with reverse transcription polymerase chain reaction, and the target ACE activity of the cells was tested with test reagent. The collagen synthesis of Fbs was tested with ³H-proline incorporation. **Results** The expression of ACE antisense cDNA could be detected in Fbs, and the expression peak was in the fourth day after transfection, and it was concomitant with the decrease of ACE expression. This was associated with a significant decrease in ACE activity (14.23 ± 1.62 vs 26.53 ± 2.50 u/10⁵ cells, $P < 0.05$) level in target cells and culture medium. However, there was not same effect on Fbs from WKY. AS group had significantly lower ³H-proline incorporation rate in Fbs from SHR than TS and control group (4 355.7 ± 75.9 vs 6 310.3 ± 98.9, 6 529.5 ± 192.5 cpm/10⁵ cells, $P < 0.01$). **Conclusions** ACE antisense cDNA can inhibit the higher basal collagen synthesis in Fbs. Present finding suggests that ACE antisense cDNA will be useful and possible in the gene therapy of higher collagen synthesis related disease and cardiovascular remodeling.

成纤维细胞(fibroblasts, Fbs)在细胞外基质的形

成和心血管重塑中起重要的作用。心脏由心肌细胞和非心肌细胞构成, 心肌细胞在空间上构成心脏的主要部分, 但仅占心脏总细胞数的 1/3; 非心肌细胞由内皮细胞、血管平滑肌细胞和成纤维细胞组成。心脏成纤维细胞在刺激因素(高血压、创伤、心肌缺血、坏死)作用下的表型转化和胶原合成增加, 在心血管的组织重构中起关键性作用。由心脏成纤维细

[收稿日期] 2002-07-17 [修回日期] 2003-04-17

[基金项目] 福建省科技项目基金(99-Z-169)资助

[作者简介] 周法光, 男, 1973 年出生, 福建省沙县人, 硕士, 主要从事冠心病分子生物学研究, 现工作单位为福建省厦门市中山医院心脏中心心内科, 电话: 0592-2292026, E-mail: fj_zhou_fg@yahoo.com.cn。吴可贵, 男, 1934 年出生, 福建省仙游县人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事高血压基础及临床研究。林明, 女, 1950 年出生, 上海人, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事心脏病介入临床及基础研究。

胞表型转化而成的肌成纤维细胞(myofibroblast), 是高血压和心肌梗死后的心脏重构时胶原形成的主要细胞, 且有血管紧张素转化酶(angiotensin converting enzyme, ACE)、血管紧张素 1 型受体和转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)的高表达。本文旨在研究血管紧张素转化酶反义核酸对心脏成纤维细胞胶原合成的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物和材料

实验所用动物自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)和京都种 Wistar Kyoto 大鼠(WKY)由本研究所动物室自行繁殖、提供。基础培养基(Gibco 公司)、小牛血清(杭州四季青公司)、胰蛋白酶(DIFCO 公司)、 ^3H -脯氨酸(中国原子能科学研究院)、鼠抗波形蛋白单克隆抗体(北京中山生物技术有限公司)、快速转染试剂盒(Promega 公司)、质粒抽提试剂盒(上海生物工程公司)、核糖核酸抽提试剂盒(上海生物工程公司)、逆转录试剂盒(MBI 公司)、脱氧核糖核酸聚合酶试剂盒(上海生物工程公司)。

1.2 心脏成纤维细胞培养和鉴定

取 24 周龄两种大鼠, 20% 氨甲酸乙酯麻醉后, 无菌操作取出心脏, 置入 D-亨氏液中, 剪去大血管及心房和右心室组织, 游离左心室, 在 D-亨氏液中漂洗 3 次。将左心室剪成体积约 1 mm^3 的组织块, 均匀贴附于 25 mL 螺口培养瓶底, 每瓶约 20~30 个组织块。用组织块翻转干涸法, 将培养瓶翻转 180 度, 使底面朝上, 加入含 20% 小牛血清的基础培养基(内含 100 ku/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素) 3 mL, 移入饱和湿度、5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 二氧化碳培养箱(美国 Revco 公司)中。1 h 后轻轻翻转培养瓶, 让培养液缓慢淹没组织块, 维持静置培养。10~14 d 后, 原代细胞生长至汇合状态即可传代; 实验用 3~5 代细胞。取第 3 代心脏成纤维细胞作爬片, 用鼠抗波形蛋白单克隆抗体, 链菌素亲生物蛋白一过氧化酶法(SP 法), 细胞纯度达 95% 以上用于实验。

1.3 质粒构建

LNSV-ACE-AS(TS) 质粒由 Mohan K. Raizada 博士惠赠。反义质粒 LNSV-ACE-AS, ACE 反义基因位于大鼠 ACE 基因编码区 254~1181 核苷酸, 反义片段位于 ACE 的第一个活性位点, 但单独不能编码活性蛋白质。另一对照质粒 LNSV-ACE-TS 为含 ACE 相同正义序列质粒。经常规方法转化、抽提、EcoR

iv 酶切鉴定, 用质粒大量抽提试剂盒获取符合转染要求的 DNA(图 1, Figure 1)。

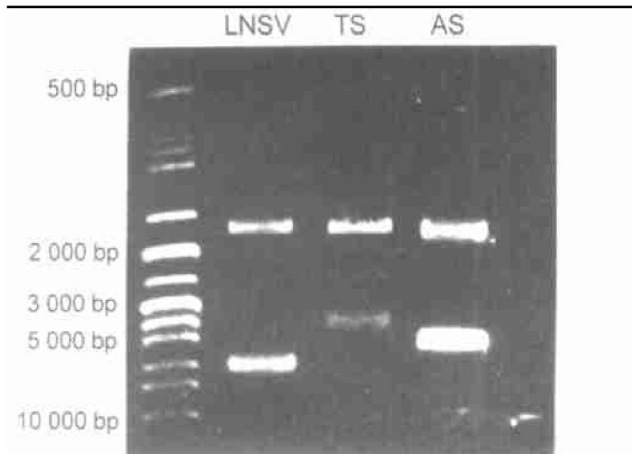


图 1. 质粒 LNSV-ACE-AS(TS) 和 LNSV 限制性内切酶鉴定
质粒抽提后经 EcoR iv 酶切, 正义、反义、对照质粒酶切片段分别为 1.6、2.3、3.2 kb, 1.6、1.69、3.8 kb, 1.6、4.2 kb。

Figure 1. Restriction enzyme analysis of LNSV-ACE-AS(TS) and LNSV

1.4 体外转染成纤维细胞

实验分为自发性高血压大鼠组和 WKY 组两大组, 每组又分为反义基因治疗组、正义基因对照组和空白对照组。反义组为反义质粒 LNSV-ACE-AS 加脂质体干预, 正义组为正义质粒 LNSV-ACE-TS 加脂质体干预, 空白对照组仅加等量培养基干预。第 1 天接种成纤维细胞 2×10^4 /孔于 24 孔板, 第 2 天进行转染, 此时细胞应约 60%~70% 融合。400 μL 高糖基础营养培养基中加入 2 μL 快速转染试剂, 0.5 μg 反义(正义) DNA, 振荡混匀, 室温放置 15 min, 加入培养板中, 1 h 后加入含 15% 小牛血清的高糖基础营养培养基 600 μL , 第 3 天, 更换为含 15% 小牛血清的高糖基础营养培养基, 进行以下实验。

1.5 反义基因表达的检测

分别抽提细胞总 RNA, 逆转录为 cDNA, 以磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参照, 上、下游引物序列分别为: 5'-GCTGGGGCTCACCTGAAGGG-3' 和 5'-GGATGACCTTGCCACAGCC-3'; 血管紧张素转化酶上、下游引物序列分别为 5'-GCAGCTCTTCGCTGACAGCTAT-3' 和 5'-GTACTGTGGACAGCTGGTCCAT-3'; 反义 cDNA 上、下游引物序列分别为 5'-GCCTCTGAGCTAT-TCCAGAAGTAG-3' 和 5'-GCGTCGACACCAACATCCGAGGAGAA-3'; 正义 cDNA 上、下游引物序列分别为 5'-GCCTCTGAGCTATTCAGAAGTAG-3' 和 5'-ATCGTGACCCGCGTGCAGTCTTAAT-3'。反应程序

为 94 °C 3 min 变性 → 94 °C 1 min → 58 °C 1 min → 72 °C 1 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 7 min。聚合酶链反应体系: cDNA 3 μL, 10× 缓冲液 4 μL, 10 mmol/L dNTP 混合物 1.2 μL, 引物各 12.5 pmol/L, DNA 聚合酶 2 u, 加灭菌去离子水至总体积 40 μL。聚合酶链反应产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳同时检测。电泳图像用紫外荧光成像分析系统专用软件行半定量分析。

1.6 血管紧张素转化酶活性的检测

吸弃各孔培养液, 每 5 孔细胞收集在一起, 细胞计数后, 用 PBS 洗 2 次, 加入预冷的 PBS (pH 7.4) 0.5 mL, 移入 1 mL 离心管中。测定前解冻, 匀浆, 离心 (4 °C, 13 000 r/min, 20 min), 取上清。ACE 测定采用紫外分光光度法 (7520 型紫外分光光度仪, 上海), 以 FAPGG 为底物, 观察波长在 340 nm 的吸光度值变化。

1.7 胶原合成的测定 —— ³H-脯氨酸掺入法

成纤维细胞以 3×10^4 接种于 24 孔培养板, 转染后第 3 天更换新培养液 (无血清, 含 0.15 mmol/L 抗坏血酸), 24 h 后加入 2 mCi/L ³H-脯氨酸, 再孵育 24 h, 取细胞进行测定, 每次 3 复孔, 重复 4 次。测定方法: 0.25% 胰酶消化, 在 0.45 μm 微孔滤膜上负压抽滤, 生理盐水和 10% 三氯醋酸冲洗滤膜, 室温晾干后置入液体闪烁杯中, 加入 2, 5-二苯基二噁唑/1, 4-双(5 苯基-2 噁唑基) 苯/二甲苯闪烁液 4 mL, 静置过夜后, 在液体闪烁计数器 (Tri carb 2300 型, 美国

Pakard 公司) 上进行放射性强度测定。

1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较用多个样本均数比较的 ANOVA 方差分析, $P < 0.01$ 示有极显著差异。

2 结果

2.1 质粒的鉴定

LNSV-ACE-AS(TS) 为反转录病毒载体的质粒, 含 3 个 EcoR I 酶切位点, AS 为 1.1 606、775, TS 为 1.1 606、225, EcoR I 完全酶切后, AS 为 1.6、1.7、3.8 kb, TS 为 1.6、2.3、3.2 kb, 空载体 LN 为 1.6、4.2 kb (图 1, Figure 1)。

2.2 反义 cDNA 表达情况

反义基因转染组及对照各组细胞于干预后 48 h、3 d、4 d、7 d 中止干预, 逆转录-聚合酶链反应检测反义核酸的表达。结果发现, SHR 组和 WKY 组反义核酸在转染后 48 h 就有少量表达, 第 4 天达高峰, 第 7 天仍有表达。而在正义组和对照组, 未检测到反义基因的表达 (图 2, Figure 2)。电泳图像用紫外荧光成像分析系统专用软件分析。每次实验重复 3 次。结果以 OD_{AS}/OD_{GAPDH} 绘制曲线图 [OD: 光密度 (optical density)] (图 2, Figure 2)。

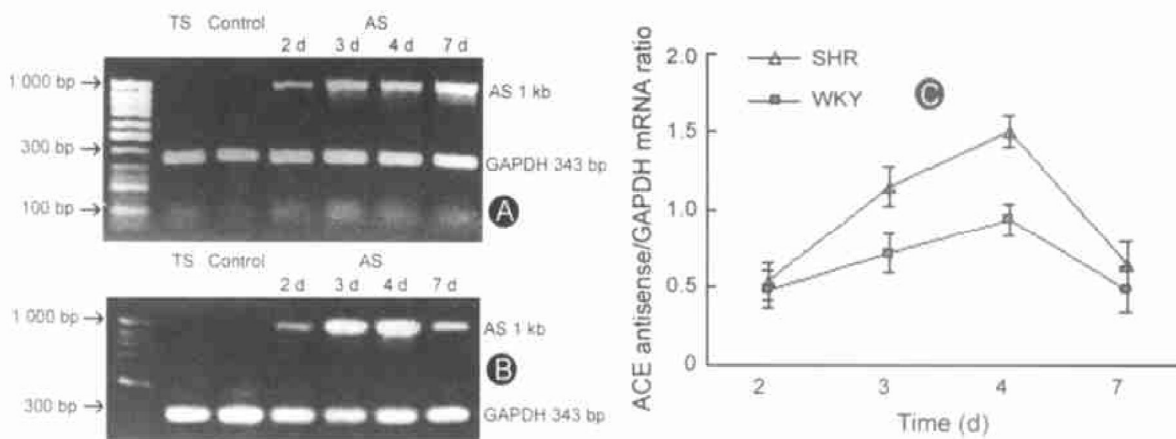


图 2. 血管紧张素转化酶反义 cDNA 转染后表达 A: 在自发性高血压大鼠表达; B: 在 WKY 大鼠表达; C: 血管紧张素转化酶反义 cDNA mRNA 与 GAPDH 比值。表达强度以电泳结果 OD 值比值表示, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $n = 3$, 各组间经 ANOVA 分析, $P < 0.05$ 。

Figure 2. Time course of the expression of ACE antisense cDNA after transfection in fibroblasts

2.3 血管紧张素转化酶基因在自发性高血压大鼠和 WKY 细胞表达的差异

在未干预的细胞, 自发性高血压大鼠细胞 ACE 的表达比 WKY 细胞约高 50% (图 3, Figure 3)。

2.4 反义核酸对血管紧张素转化酶基因表达的影响

分别在转染后第 2、3、4、5、7 天用逆转录-聚合酶链反应方法检测血管紧张素转化酶基因的表达。

结果显示,自发性高血压大鼠反义治疗组在各个时间均能减少血管紧张素转化酶基因的表达,且在第4天减少最显著,达50%。而在自发性高血压大鼠正义组、对照组和WKY组,血管紧张素转化酶基因表达无明显影响(图4, Figure 4)。

2.5 反义核酸对心脏成纤维细胞血管紧张素转化酶活性的影响

自发性高血压大鼠对照组血管紧张素转化酶活性比WKY组高65.5% (26.53 ± 2.49 比 14.52 ± 1.7 u/10⁵ 个细胞, P < 0.001)。与对照组相比,自发性高血压大鼠反义组血管紧张素转化酶活性下降约45% (14.23 ± 1.62 比 26.53 ± 2.50 u/10⁵ 个细胞, P < 0.05), 正义组和对照组血管紧张素转化酶活性差异无显著性(25.03 ± 2.29 比 26.53 ± 2.49 u/10⁵ 个细胞, P > 0.05)。WKY各组间差异无显著性。

2.6 反义核酸对心脏成纤维细胞³H-脯氨酸掺入率的影响

自发性高血压大鼠对照组³H-脯氨酸掺入率比WKY高61.7% (6310.3 ± 98.9 比 3840.5 ± 67.3 cpm/10⁵ 个细胞, P < 0.001) [cpm: 每分钟记数(counts per minute)]。自发性高血压大鼠反义组³H-脯氨酸掺入率较对照组减少31% (4355.7 ± 75.9 比 6310.3 ± 98.9cpm/10⁵ 个细胞, P < 0.01), 正义组与对照组

相比差异无显著性(6529.5 ± 192.5 比 6310.3 ± 98.9 cpm/10⁵ 个细胞, P > 0.05)。在WKY各组,³H-脯氨酸掺入率无显著差异。

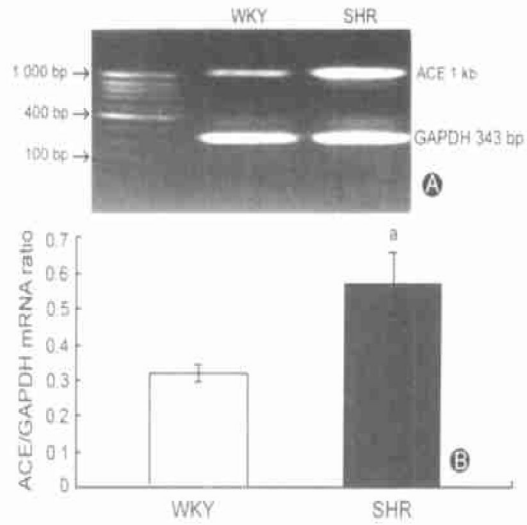


图3. 血管紧张素转化酶在自发性高血压大鼠和WKY大鼠心脏成纤维细胞中的表达差异 A: 电泳条带; B: 血管紧张素转化酶和GAPDH逆转录-聚合酶链反应产物电泳后OD值之比, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, n = 3, 各组间采用ANOVA分析, a: P < 0.01, 自发性高血压大鼠与WKY大鼠比较。

Figure 3. Abundance difference of ACE mRNA in fibroblasts from SHR and WKY

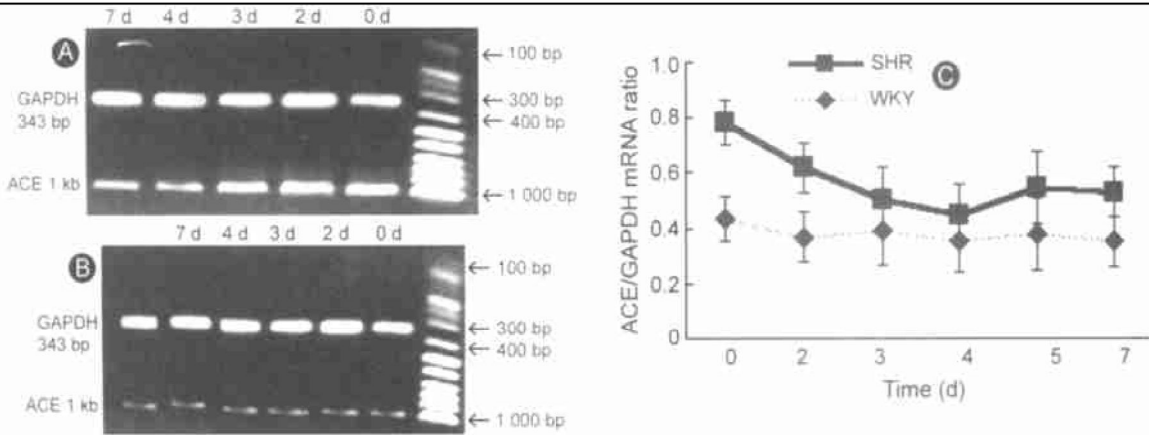


图4. 血管紧张素转化酶反义cDNA转染后对成纤维细胞血管紧张素转化酶表达的影响 A: 自发性高血压大鼠; B: WKY大鼠; C: 转染后不同时间逆转录-聚合酶链反应产物OD值之比, n = 3, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

Figure 4. Effect of ACE antisense cDNA on the expression of angiotensin converting enzyme in fibroblasts

3 讨论

结缔组织的自稳调节是指细胞外基质和细胞成分的自我调节,即细胞运动、分化、增殖、凋亡和结构蛋白增殖和退缩的自主决定,心脏纤维化是自稳态调节失衡的结果,高血压和心肌梗死后、内皮损伤后纤维化增加是自稳态失衡的结果,这其中血管紧张素转化酶活性的增加起了关键作用^[1]。除抑制Fbs

增殖外,血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI)还抑制胶原合成,其可能机制包括:阻断局部血管紧张素(ANG II)生成、缓激肽生成,或/和促进一氧化氮、前列腺素生成。ANG II通过血管紧张素1型受体促进体外培养Fbs的胶原合成^[2]。也有研究显示,ACE阻断剂对胶原合成的抑制作用与ANG II生成减少无关,因

为用卡托普利能减少 40 周龄自发性高血压大鼠 iv/Ⅲ型胶原的比例,而赖诺普利则无此种作用^[3]。本研究在细胞水平用特异性阻断 ACE 的反义 cDNA 抑制 ACE 的表达,以探讨阻断 ACE 表达后对 Fbs 胶原合成的影响,也就是要阐述 ACE 在 Fbs 基础胶原合成中的作用。体外细胞培养能减少在体情况下多种影响因素,如血液动力学因素、其它激素调节系统(如缓激肽-前列腺素和肾上腺素能系统)等对心脏胶原代谢的影响。而且,许多生长因子,包括 TGF- β_1 、血小板衍生生长因子、胰岛素样生长因子,均能刺激成纤维细胞介导的胶原合成^[4,5]。

自发性高血压大鼠 Fbs ACE mRNA 表达比 WKY 高 50%,ACE 活性比 WKY 高 65.5%,基础胶原合成率比 WKY 高 61.7%,这证实自发性高血压大鼠 Fbs ACE 活性和基础胶原合成率要高于 WKY,即自发性高血压大鼠心脏的纤维化不仅与较高的血压有关,也与本身更高的肾素-血管紧张素系统活性和 ACE 高表达有关。有研究显示自发性高血压大鼠体外培养的 Fbs 比 WKY Fbs 有更高的 iv、Ⅲ型胶原和纤维粘连蛋白的合成活性^[6]。

本研究显示在减少自发性高血压大鼠 Fbs ACE mRNA 表达约 50% 后,ACE 活性减少约 45%,自发性高血压大鼠 Fbs ³H-脯氨酸掺入率下降 31%,也就是说基础胶原合成率减少了。而在对 ACE 表达无影响的正义组和对照组,则无此作用。说明 Fbs 胶原合成率与 ACE 的表达和活性呈正相关关系,ACE 是 Fbs 基础胶原合成影响因素之一,ACEI 对 Fbs 和心脏纤维化的抑制作用是通过 ACE 而引起的。

血管紧张素转化酶高活性导致 Fbs 胶原合成增多的机制与 Ang Ⅱ和 TGF- β_1 有关。研究发现,纤维化组织和心肌梗死后瘢痕中 ACE 主要由肌成纤维细胞产生^[7],肌成纤维细胞比成纤维细胞体积要大,含更多的蛋白成分、粗面内质网和 α -平滑肌型肌动蛋白肌丝,也就是说存在成纤维细胞的激活过程,其中 Ang Ⅱ起了一定的作用,Ang Ⅱ能促进 Fbs 和肌成纤维细胞 TGF- β_1 的表达^[8]。新近的研究显示,TGF- β_1 能诱导 Fbs 分化为肌成纤维细胞,同时伴随 ACE 表达的增高。正是 Ang Ⅱ和 TGF- β_1 的相互正反馈作用导致 Fbs 合成胶原增多,ACE 表达的增加是其中的关键因素。本研究用 ACE 反义 cDNA 既能抑制 Fbs ACE 表达,又能抑制 Fbs 基础胶原合成,也证明了这一点。

血管紧张素转化酶反义 cDNA 对 WKY Fbs 胶原合成无明显影响,具体机制尚不明了。以往的研究

显示,WKY 体外培养的 Fbs 对缓激肽所致前列腺素 I₂ 的生成,以及前列腺素 I₂ 阻断胶原合成的作用要大于自发性高血压大鼠 Fbs^[9],也就是说自发性高血压大鼠对缺血或损伤的潜在反应要强于 WKY,或许基因表达的内在差异是其中可能的原因之一。

非病毒性基因转移的缺点是低转染率和短暂表达,但是短暂表达可用于治疗急性疾病,脂质体为载体的优点是方法的简便性和安全性。动物实验表明,动脉损伤后新生内膜的形成中,血管平滑肌细胞增殖是一个早期和短暂的事件,局部基因治疗是阻断血管平滑肌细胞增殖的一种手段。而且,在损伤血管局部作用时,基因表达的效率增加 10 倍以上^[10]。反义治疗具有传统药物治疗所不具备的优点。如 ACEI 作用于内皮细胞后 30 min 即会增加 ACE mRNA 的表达,在 24 h 达高峰,并可持续 48 h,此作用与 ACE 活性相一致,这与长期应用 ACEI 导致血浆中 ACE 活性升高相吻合。在本实验中,反义治疗组自发性高血压大鼠细胞 ACE 的 mRNA 表达水平和活性均是下降的,因为反义治疗作用的环节是在转录水平。

血管紧张素转化酶反义 cDNA 能在血管平滑肌细胞和 Fbs 有效表达,能特异性阻断 ACE 的活性,抑制血管平滑肌细胞增殖和 Fbs 胶原合成,ACE 反义 cDNA 对高血压心血管重构、经皮冠状动脉腔内成形术后再狭窄的治疗具有潜在价值。

[参考文献]

- [1] Weber KT. Fibrosis and hypertensive heart disease. *Current Opinion in Cardiology*, 2000, **15**: 264-272
- [2] Villarreal FJ, Kim NN, Ungab GD, Printz MP, Dillmann WH. Identification of functional angiotensin Ⅱ receptors on rat cardiac fibroblasts. *Circulation*, 1993, **88**: 2 849-861
- [3] Yang CM, Kandaswamy V. Changes in collagen phenotypes during progression and regression of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*, 1997, **36**: 236-245
- [4] Fine A, Goldstein RH. The effect of transforming growth factor- β on cell proliferation and collagen formation by lung fibrosis. *J Biol Chem*, 1997, **262**: 3 897-902
- [5] Goldstein RH, Poliks CF. Stimulation of collagen formation by insulin and insulin-like growth factor-1 in culture of human lung fibroblasts. *Endocrinology*, 1989, **124**: 964-970
- [6] Philips N, Jimenez SA. Collagen and fibronectin expression in cardiac fibroblasts from hypertensive rats. *Cardiovasc Res*, 1994, **28**: 1 342-347
- [7] Katwa LC, Ratajska A. Angiotensin converting enzyme and kinase Ⅱ like activities in cultured valvular interstitial cells of the rat heart. *Cardiovasc Res*, 1995, **29**: 57-64
- [8] Campbell SE, Katwa LC. Angiotensin Ⅱ stimulated expression of transforming factor- β in cardiac fibroblast and myofibroblasts. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, **29**: 1 947-948
- [9] Yu H, Printz MP. Prostacyclin release by rat cardiac fibroblasts: inhibition of collagen expression. *Hypertension*, 1997, **30**: 1 047-053
- [10] Akshita M, Gal D, Isner JM. Increased gene expression after liposome-mediated arterial gene transfer associated with intimal smooth muscle cell proliferation. *J Clin Invest*, 1994, **93**: 652-661

(此文编辑 曾学清)