

葡萄糖对血管内皮细胞小凹蛋白1和血管内皮生长因子表达的影响

桂新春¹, 刘宗汉¹, 刘江华², 戴忠⁴, 谢志忠³, 许金华¹, 张楚君²

(南华大学 1. 生物化学和分子生物学教研室, 2. 附属第一医院内分泌科,

3. 药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001; 4 中南大学药学院, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] 病理学与病理生理学; 葡萄糖对小凹蛋白-1和血管内皮生长因子表达的影响; 免疫印迹方法; 小凹蛋白-1; 血管内皮生长因子; 一氧化氮; 内皮细胞

[摘要] 为了探讨高浓度葡萄糖损伤血管内皮细胞及其对小凹蛋白-1和血管内皮生长因子表达的影响。将人脐静脉内皮细胞株 ECV304 分别培养在对照组和含 5.5 mmol/L、11.1 mmol/L、22.0 mmol/L、33.0 mmol/L 葡萄糖的培养基中。经葡萄糖培养 24 h 后, 噻唑蓝法测定细胞增殖活性, 硝酸还原酶法测定培养上清液中一氧化氮浓度, 免疫组织化学和免疫印迹方法检测细胞中小凹蛋白-1和血管内皮生长因子的表达。结果发现, 随着葡萄糖浓度的增加, 内皮细胞增殖活性呈浓度依赖性抑制($r = -0.776, P = 0.000$); 一氧化氮浓度呈浓度依赖性增加($r = 0.698, P = 0.000$); 小凹蛋白-1和血管内皮生长因子为棕黄色颗粒, 主要分布于胞浆中; 血管内皮生长因子的表达呈浓度依赖性增加($r = 0.645, P = 0.009$); 小凹蛋白-1的表达也呈浓度依赖性增加($r = 0.808, P = 0.000$)。提示高糖可诱导血管内皮细胞的血管内皮生长因子和小凹蛋白-1的表达, 此变化可能与糖尿病患者高糖致血管病变有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Influence of Glucose on Expression of Caveolin-1 and Vascular Endothelial Growth Factors in Vascular Endothelial Cells

GUI Xin-Chun¹, LIU Zong-Han¹, LIU Jiang-Hua², DAI Zhong⁴, XIE Zhi-Zhong³, XU Jin-Hua¹, and ZHANG Chu-Jun²

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, 2. Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, 3. The Institute of Pharmacy and Pharmacology, Nanhua University, Hengyang, Hunan 421001, China; 4. Department of Pharmacology, Central South University, Changsha, Hunan 410078, China)

[KEY WORDS] Caveolin-1; Vascular Endothelial Growth Factors; Nitric Oxide; Endothelial Cells; High Glucose; Immunohistochemistry

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the expression of caveolin-1 and vascular endothelial growth factors(VEGF) in vascular endothelial cells(VEC) induced by high glucose. **Methods** The human umbilical vein endothelial cells(ECV304) were cultured in the media containing glucose 0.0 mmol/L and 5.5, 11.1, 22.0, 33.0 mmol/L respectively. After 24 hour, the proliferation of VEC was determined by a colorimetric 3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The level of nitric oxide (NO) was measured by nitrate reductase method. The localization of caveolin-1 and VEGF protein was examined by immunohistochemistry. Western blot was used to measure the protein level of caveolin-1 and VEGF. **Results** The proliferation of VEC was inhibited in concentration dependent manner ($r = -0.776, P = 0.000$). The level of NO was increased in concentration dependent manner ($r = 0.698, P = 0.000$). Caveolin-1 and VEGF were granular brown substance which located mainly in the cytoplasm. The expression of VEGF was induced by high glucose in concentration dependent manner ($r = 0.645, P = 0.009$). High glucose stimulated caveolin-1 expression in concentration dependent manner($r = 0.808, P = 0.000$). **Conclusion** High glucose could inhibit proliferation of vascular endothelial cells in vitro. High glucose upregulated the expression of VEGF and caveolin-1 on vascular endothelial cells, which might taken part in development of vascular complications in diabetic.

血管病变是糖尿病患者的主要并发症及致死、致残的主要原因。血管内皮受损被认为是糖尿病血管病变(diabetic angiopathy, DA)发生的前提,是动脉

粥样硬化发生的始动环节。引起内皮细胞损伤的因素很多,高血糖是公认的损伤因素和致糖尿病血管病变的危险因素。但糖尿病患者血糖升高导致血管内皮损伤和血管病变的发生、发展机制仍然不清。小凹(Caveolae)是细胞膜上的一种特殊囊泡状凹陷结构,小凹蛋白1(caveolin-1)是形成细胞膜小凹结构的主要分子基础。文献[1,2]报道,将血管平滑肌细

[收稿日期] 2003-10-24 [修回日期] 2004-01-13

[作者简介] 桂新春,硕士研究生,联系电话为 13017169381, E-mail 为 guixch@hotmail.com。刘宗汉,教授,硕士研究生导师,研究方向为生物活性物质结构与功能。刘江华,副教授,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向为糖尿病血管并发症。

胞与低密度脂蛋白共同孵育 96 h, 小凹蛋白 1 的 mRNA 和蛋白表达明显升高。在高糖条件下, 血管内皮细胞小凹蛋白 1 的表达是否发生变化未见报道。本实验旨在研究高浓度葡萄糖对培养的血管内皮细胞的损伤作用及小凹蛋白 1 和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factors, VEGF) 的表达变化。

1 材料和方法

1.1 试剂

M199 培养基购于 Hyclone 公司, 胎牛血清是天津 H & Y 生物公司产品, D-葡萄糖(分析纯)购自汕头市光华化学厂, 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯四氮唑溴蓝[3-(4, 5-dimethyl thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide, MTT] 是 Sigma 公司产品, 一氧化氮(nitric oxide, NO) 检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所, 兔抗人小凹蛋白 1 IgG 购于 Santa Cruz 公司, 兔抗人血管内皮生长因子 IgG, 兔抗人肌动蛋白(β -actin) IgG, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 以及免疫组织化学试剂盒均购于武汉博士德生物工程有限公司, 聚偏二氟乙烯膜由 Ameshame 公司提供, 其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 细胞培养和实验分组

人脐静脉内皮细胞株 ECV304, 购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。用含 10% 胎牛血清的 M199 培养基培养, 同时加入 100 u/L 链霉素和 100 u/L 青霉素, 在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养, 用 0.125% 胰蛋白酶进行消化传代。在每次实验中, 待细胞融合前用无血清的 M199 培养 24 h 进行同步化处理, 在换条件培养基前, 用台盼蓝染色, 判断细胞活性, 保证实验所用细胞的活细胞数占细胞总数的 97% 以上, 再换用含 10% 胎牛血清的不同浓度葡萄糖的 M199 条件培养基。实验分为对照组(不加葡萄糖)、含 5.5 mmol/L 葡萄糖、含 11.1 mmol/L 葡萄糖、含 22.0 mmol/L 葡萄糖和含 33.0 mmol/L 葡萄糖 5 组。

1.3 噻唑蓝法测定葡萄糖对内皮细胞生长活性的影响

将细胞制成密度 1×10^8 个/L 的细胞悬液, 接种在 96 孔培养板中(200 μ L/孔), 待细胞融合前按上面分组处理。培养 24 h 后, 各孔加入 5 mg/L 的 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯四氮唑溴蓝 20 μ L, 继续培养 4 h, 终止培养, 小心吸净孔内培养基, 每孔加入 150 μ L 的二甲基亚砷原液, 振摇 10 min, 待蓝紫色

结晶完全溶解后, 用酶联免疫仪于 490 nm 波长测各孔吸光度值(absorbance, A)。另设 33 mmol/L 甘露醇组作为渗透压对照。根据各组的吸光度值按公式处理组 A \div 对照组 A 值 $\times 100\%$ 计算细胞生长率。

1.4 一氧化氮测定

将细胞制成密度 1×10^8 个/L 的细胞悬液, 接种在 24 孔培养板中(600 μ L/孔) 进行培养, 取上清液测定一氧化氮含量, 测定步骤按一氧化氮试剂盒操作说明进行, 最后用酶联免疫仪于 550 nm 波长测定一氧化氮吸光度值。根据公式(样品管吸光度-空白管吸光度) \div (标准管吸光度-空白管吸光度) \times 标准品浓度 \times 样品稀释倍数换算出 NO 含量(μ mol/L)。

1.5 免疫组织化学检测小凹蛋白 1 和血管内皮生长因子

将消毒灭菌并标记好的医用盖玻片放入已灭菌的 6 孔板中, 细胞制成密度 1×10^8 个/L 的细胞悬液, 每孔接种 2 mL 培养。取出盖玻片, 磷酸盐缓冲液洗涤, 4% 多聚甲醛室温固定 20 min, 3% 过氧化氢-甲醇封闭内源性过氧化物酶, 磷酸盐缓冲液洗涤后加入一抗(兔抗人小凹蛋白-1 IgG 按 1:300 稀释, 兔抗人血管内皮生长因子 IgG 按 1:100 稀释), 按链酶亲和素-生物素-过氧化物酶技术的染色试剂盒操作说明进行操作, 3, 3'-二氨基联苯胺显色, 苏木素复染, 常规脱水透明封片, 同时进行以磷酸盐缓冲液代替一抗的质量控制。阳性部分为棕黄色颗粒。最后对各组进行灰度值测定, 以背景灰度值与阳性灰度值之差作为每组灰度值。

1.6 免疫印迹方法检测小凹蛋白-1 和血管内皮生长因子的表达

将细胞制成密度 1×10^8 个/L 的细胞悬液, 取 5 mL 接种于 75 cm² 的培养瓶, 培养终止时, 从 CO₂ 培养箱中取出培养瓶, 磷酸盐缓冲液洗涤 2 次, 加入 100 μ L 细胞裂解液(三羟甲基氨基甲烷 50 mmol/L, 氯化钠 150 mmol/L, 乙二胺四乙酸 1 mmol/L, 苯甲基磺酰氟 1 mmol/L, 抑蛋白酶肽 2 mg/L, 聚乙二醇辛基苯基醚 1%, 叠氮钠 0.02%, 去氧胆酸钠 0.1%, pH 8.0), 冰浴条件下裂解细胞。4℃, 10 kr/min 离心 10 min, 弃除沉淀, 吸取少量上清液进行蛋白定量。取相同蛋白量上样, 10% 分离胶分离, 进行不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转聚偏二氟乙烯膜, 5% 脱脂牛奶封闭聚偏二氟乙烯膜, 再分别与一抗(兔抗人小凹蛋白 1 的多克隆抗体按 1:500 稀释, 兔抗人血管内皮生长因子的多克隆抗体按 1:300 稀释, 兔抗人肌动蛋白的多克隆抗体按 1:500 稀释) 和二抗(辣根过

氧化酶标记的羊抗兔按 1:2 000 稀释) 室温孵育 2 h 和 1 h, 利用化学发光法进行显色反应。结果用 AlphaMagerTM2200 图像分析系统对胶片扫描并进行平均密度值(average density values, ADV) 测定, 以 ADVcaveolir 1/ADV β -actin, ADVVEGF/ADV β -actin 进行半定量分析。

1.7 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异的显著性用 SPSS11.0 统计软件作单因素方差分析和相关性检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 葡萄糖对内皮细胞增殖的影响

内皮细胞经不同浓度葡萄糖培养 24 h 后, 随着葡萄糖浓度的增加, 内皮细胞增殖明显下降, 并呈浓度依赖性($r = -0.776, P = 0.000$) (表 1, Table 1)。

表 1. 葡萄糖对内皮细胞增殖活性的影响

Table 1. The effect of glucose on the proliferation of endothelial cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

浓度分组	生长率
0.0 (对照组)	100%
5.5 mmol/L 葡萄糖	92% \pm 11%
11.1 mmol/L 葡萄糖	79% \pm 4%
22.0 mmol/L 葡萄糖	69% \pm 12% ^b
33.0 mmol/L 葡萄糖	33% \pm 12% ^c
33.0 mmol/L 甘露醇	88% \pm 11% ^a

a: $P > 0.05$, b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.2 葡萄糖对内皮细胞生成一氧化氮的影响

内皮细胞经不同浓度葡萄糖培养 24 h 后, 随着葡萄糖浓度的增加, 内皮细胞生成一氧化氮明显增加, 从 62.0 \pm 8.3 μ mol/L 升高至 110.9 \pm 8.4 μ mol/L 并呈浓度依赖性($r = 0.698, P = 0.000$), 而 11.1 mmol/L 葡萄糖组最高, 为 115.7 \pm 4.9 μ mol/L (表 2, Table 2)。

2.3 葡萄糖对内皮细胞小凹蛋白 1 和血管内皮生长因子表达的影响

2.3.1 免疫组织化学检测结果 各组灰度值测定结果见表 3 (Table 3)。可见小凹蛋白 1 定位于胞膜和胞浆, 阳性部分为棕黄色颗粒, 其灰度值呈浓度依赖性增加($r = 0.576, P < 0.001$); 血管内皮生长因子定位于胞膜和胞浆, 阳性部分为棕黄色颗粒, 与小凹蛋白 1 一样, 其灰度值呈浓度依赖性增加($r = 0.523, P < 0.01$)。

表 2. 内皮细胞上清液中一氧化氮含量的测定

Table 2. The NO content in different supernatant conditioned media of endothelial cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

葡萄糖浓度 (mmol/L)	一氧化氮浓度 (μ mol/L)
0.0 (对照组)	62.0 \pm 8.3
5.5	67.4 \pm 10.3
11.1	115.7 \pm 4.9 ^c
22.0	91.6 \pm 9.3 ^c
33.0	110.9 \pm 8.4 ^c

c: $P < 0.01$, 与对照组比较。

表 3. 葡萄糖影响内皮细胞小凹蛋白 1 和血管内皮生长因子

Table 3. The effects of glucost on expression of caveolir 1 and VEGF in endothelial cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

葡萄糖浓度	小凹蛋白 1	VEGF
0.0 (对照组)	18.5 \pm 1.7	20.2 \pm 3.6
5.5	22.4 \pm 3.4	25.4 \pm 6.3
11.1	25.4 \pm 3.4 ^b	27.4 \pm 10.0
22.0	33.25 \pm 4.8 ^c	35.7 \pm 1.7 ^c
33.0	25.8 \pm 1.5 ^c	30.2 \pm 5.0 ^b

b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$ 与对照组比较

2.3.2 免疫印迹法检测结果 血管内皮细胞经葡萄糖培养 24 h 后, 随葡萄糖浓度升高, 小凹蛋白 1 的表达呈浓度依赖性增加($r = 0.808, P = 0.000$) (图 1, Figure 1); 血管内皮生长因子的表达也呈浓度依赖性增加($r = 0.645, P = 0.009$) (图 2, Figure 2)。

3 讨论

糖尿病血管病变是糖尿病并发症的主要表现, 高血糖是各型糖尿病的共同特征, 也是糖尿病血管病变的危险因子。以往研究报道, 高浓度葡萄糖抑制血管内皮细胞的增殖并加速内皮细胞的死亡^[3], 本研究进一步证实了高浓度葡萄糖可抑制血管内皮细胞增殖, 且葡萄糖浓度越高其抑制作用越明显。

一氧化氮是心血管系统一个重要、有效的调节因子, 有调节血管张力, 抑制血小板和白细胞粘附、内皮细胞迁移和增殖, 及血管内皮保护等作用, 当血管内皮受损影响一氧化氮的释放时将导致内皮功能障碍。有关糖尿病中一氧化氮的代谢一直存在争论。文献[4]报道, 高糖抑制人冠状动脉内皮细胞一氧化氮的产生, 但 Graier 等^[5]研究显示高血糖使内皮细胞一氧化氮合成酶的活性增强, 一氧化氮合成增多。研究发现, 细胞培养液中随葡萄糖浓度升高, 一氧化氮的产生也增加, 提示高糖促进内皮细胞一

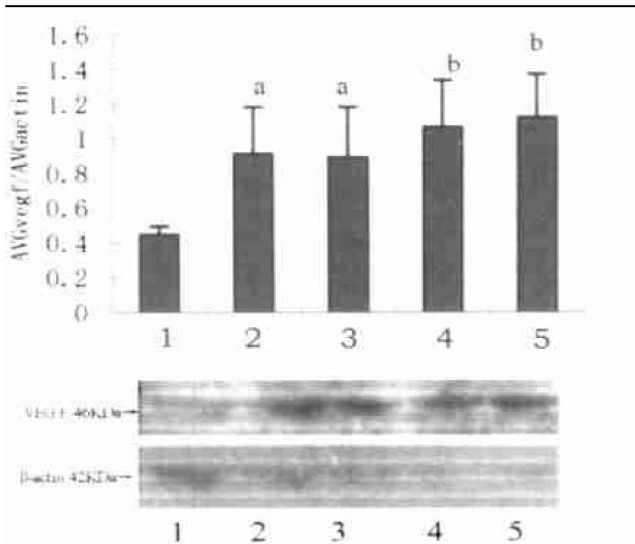


图 1. 葡萄糖培养 24 h 血管内皮细胞小凹蛋白 1 的表达变化 1 为对照组, 不含葡萄糖; 2 为 5.5 mmol/L 葡萄糖组; 3 为 11.1 mmol/L 葡萄糖组; 4 为 22.0 mmol/L 葡萄糖组; 5 为 33.0 mmol/L 葡萄糖组。a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$ 与对照组比较。

Figure 1. Effect of glucose on caveolin-1 protein expression in endothelial cells

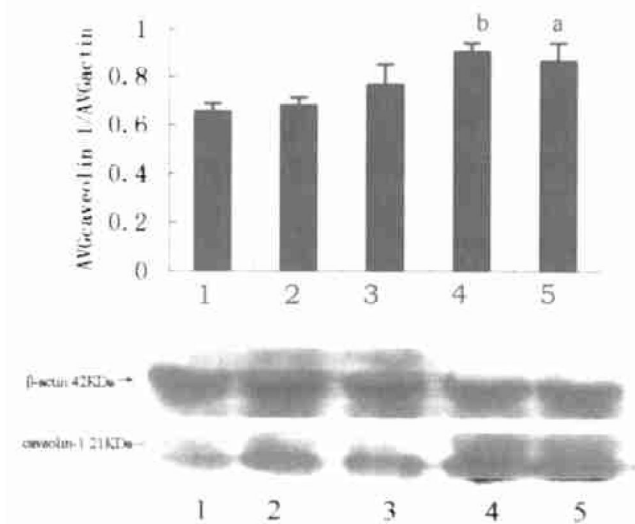


图 2. 葡萄糖培养 24 h 血管内皮细胞的血管内皮生长因子表达的变化 1 为对照组, 不含葡萄糖; 2 为 5.5 mmol/L 葡萄糖组; 3 为 11.1 mmol/L 葡萄糖组; 4 为 22.0 mmol/L 葡萄糖组; 5 为 33.0 mmol/L 葡萄糖组。a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$ 与对照组比较。

Figure 2. Effect of glucose on VEGF protein expression in vascular endothelial cells

氧化氮的生成。其可能机制是下调内皮型一氧化氮合酶的 mRNA, 上调诱导型一氧化氮合酶的 mRNA 而促进一氧化氮生成^[6]。近年来发现血管内皮生长因子是肝素型二聚体糖蛋白, 也称血管通透性因子, 是一个高度特异的强烈的血管内皮促分裂因子和血管生成因子, 以旁分泌和自分泌方式通过至少两个明确的具有酪氨酸激酶活性的受体: 血管内皮生长

因子受体 1 和血管内皮生长因子受体 2, 特异地作用于靶细胞—血管内皮细胞, 促进内皮细胞增殖, 加速受损血管内皮细胞的修复^[7,8]。在大多数涉及血管新生的疾病中, 高浓度的血管内皮生长因子可能对疾病的进展起促进作用^[9]。Jozkowicz 等^[10]研究发现, 一氧化氮能增加人血管平滑肌细胞中血管内皮生长因子的合成, 同时血管内皮生长因子又能刺激血管内皮细胞中一氧化氮的产生^[11]。近来研究表明, 高糖能增加人腹膜血管内皮细胞的血管内皮生长因子的表达^[12]。本研究发现, 在高糖条件下, 内皮细胞一氧化氮产生增多的同时, 血管内皮生长因子表达也增加。这种内生性的血管内皮生长因子表达增加常常不足以恢复受损内皮细胞的完整性^[13], 只是减轻损伤的血管内皮细胞的功能障碍。

小凹是细胞信号在细胞膜区域的一个重要枢纽, 是对细胞外信号分子的识别、分隔、传导的一个中心区域。小凹蛋白 1 的作用与小凹的胞饮、胞吐、细胞信号转导等功能密切相关, 是研究小凹结构和功能的标志蛋白和工具^[1,2,14]。在正常情况下, 小凹蛋白 1 象分子伴侣一样, 结合并灭活一些细胞内信号传导分子, 是底物广泛的蛋白激酶活性抑制分子^[14], 在内皮细胞增殖过程中小凹蛋白 1 的表达下调^[8]。文献^[15]报道, 一氧化氮能使人脐静脉内皮细胞小凹蛋白 1 表达呈现时间和浓度依赖性增加。Labrecque 等^[8]研究发现血管内皮生长因子可上调人脐静脉内皮细胞小凹和小凹蛋白 1 的表达。本研究结果显示, 在高糖条件下, 内皮细胞一氧化氮产生增多, 血管内皮生长因子表达增加, 同时血管内皮细胞小凹蛋白 1 的表达也增加。文献^[11]报道, 血管内皮生长因子通过血管内皮生长因子受体 1 促进一氧化氮的产生, 小凹蛋白 1 通过血管内皮生长因子受体 2 调控血管内皮生长因子的信号通路^[8], 小凹蛋白 1 通过内皮型一氧化氮合酶调节一氧化氮的生成^[16]。由此可见, 高糖对内皮细胞的损伤过程中, 一氧化氮、血管内皮生长因子和小凹蛋白 1 可能存在互相调节, 相互依存的关系。

综上所述, 高糖导致内皮细胞一氧化氮的产生增加及血管内皮生长因子和小凹蛋白 1 的表达上调, 可能是导致糖尿病性血管病变的原因之一。

[参考文献]

- 严鹏科, 廖端芳, 杨永宗. Caveolin-1 表达对血管平滑肌细胞胆固醇转运的调节作用. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10: 379-383
- 王蓉蓉, 严鹏科, 廖端芳, 万腊得, 严奉祥, 杨永宗. 囊泡—囊泡素 1 在清道夫受体 AI 转基因小鼠动脉粥样硬化发生中的作用. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10: 461-464
- Su Jin, Tian Haoming, Liu Rui, Liang Jinzhong. Inhibitive effects of glucose

- and free fatty acids on proliferation of human vascular endothelial cells in vitro. *Chinese Medical Journal*, 2002, **115**: 1 486-490
- [4] Yao Xian Ding, Vaziri D, Coulson ND, Coulson R, Kamanna VS. Effects of simulated hyperglycemia, insulin, and glucagon on endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000, **279**: E11-E17
- [5] Graier WF, Posch K, Wascher TC, Kostner GM. Role of superoxide anions in changes of endothelial vasoactive response during acute hyperglycemia. *Horm Metab Res*, 1997, **29**: 622-626
- [6] Luo WB, Dong L, Wang YP. Effect of magnesium lithospermate B on calcium and nitric oxide in endothelial cells upon hypoxia/reoxygenation. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, **23**: 930-936
- [7] 刘启功, 汪道文, 陆再英. 血管内皮生长因子在冠心病中的应用前景. *中国动脉硬化杂志*. 2001. 9: 356-360
- [8] Labrecque L, Royal I, Sruprenant DS, Patterson C, Gingras D, B•liveau R. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol. *MBC*, 2003, **14**: 334-347
- [9] Zachary I, Mathur A, Herttuala SY, Martin J. Vascular protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**: 1 512-520
- [10] Jozkowicz A, Cooke JP, Guevara I, Huk I, Funovics P, Pachinger O, et al. Genetic augmentation of nitric oxide synthase increase the vascular generation of VEGF. *Cardiovasc Res*, 2001, **54**: 773-783
- [11] Dunk C, Ahmed A. Vascular endothelial growth factor receptor-2-mediated mitogenesis is negatively regulated by vascular endothelial growth factor receptor-1 in tumor epithelial cell. *Am J Pathol*, 2001, **158**: 265-273
- [12] Seo MJ, Oh SJ, Kim SI, Cho KW, Jo I, Schaub T. High glucose dialysis solutions increase synthesis of vascular endothelial growth factors by peritoneal vascular endothelial cells. *Perit Dial Int*, 2001, **21**: s35-40
- [13] 陈小萍, 顾洪, 秦永文. 血管内皮细胞生长因子治疗缺血性疾病的研究现状. *国外医学-心血管疾病分册*, 2000, **27**: 10-12
- [14] Engelman JA, Lee RJ, Kamezis A, Bearss DJ, Webster M, Siegel P. Reciprocal regulation of neu tyrosine kinase activity and caveolin-1 protein expression in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 1998. **273**: 20 448-455
- [15] Michael S, Goligorsky. Endothelial cell dysfunction and nitric oxide synthase. *Kidney Intern*, 2000, **58**: 1 360-376
- [16] Ghosh S, Gachhui R, Crooks C, Wu C, Lisanti MP, Stuehr DJ. Interaction between caveolin-1 and the reductase domain of endothelial nitric oxide synthase. Consequences for catalysis. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 22 267-271
- (此文编辑 曾学清, 胡必利)