

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2007)15-11-0834-05

U937 源性泡沫细胞形成中组织因子途径抑制物 2 的表达定位及变化规律

朱颖¹, 罗心平¹, 朱军¹, 梁旺², 马端²

(1. 复旦大学附属华山医院心内科, 上海市 200040; 2. 复旦大学分子医学教育部重点实验室, 上海市 200032)

[关键词] 病理学与病理生理学; 动脉粥样硬化; U937 源性泡沫细胞; 组织因子途径抑制物 2

[摘要] 目的 研究 U937 源性泡沫细胞形成过程中组织因子途径抑制物 2 的表达定位及变化规律。方法 采用沉淀法提取人血浆低密度脂蛋白, 硫酸铜氧化制备氧化型低密度脂蛋白, 与 U937 单核细胞共同孵育, 建立泡沫细胞模型, 同时体外培养人脐静脉内皮细胞, 加入 U937 泡沫细胞中共同培养, 观察内皮细胞对泡沫细胞形成的影响。采用双重细胞免疫荧光定位组织因子途径抑制物 2 蛋白, 时间免疫分辨荧光定量组织因子途径抑制物 2 蛋白, 逆转录聚合酶链反应和荧光定量聚合酶链反应检测泡沫细胞内组织因子途径抑制物 2 基因的动态变化。结果 组织因子途径抑制物 2 主要定位于 U937 单核细胞胞质中, 与组织因子有相似的分布。氧化型低密度脂蛋白作用于 U937 细胞 6 h 后组织因子途径抑制物 2 蛋白和基因表达水平持续增高, 6 h 达至峰值而后表达持续降低。氧化型低密度脂蛋白作用于人脐静脉内皮细胞后组织因子途径抑制物 2 蛋白表达增加, 24 h 时达至峰值。加入内皮细胞可改善氧化型低密度脂蛋白抑制 U937 细胞表达组织因子途径抑制物 2 的作用。结论 U937 泡沫细胞形成过程中, 体外培养的人源性单核细胞 U937 上存在组织因子途径抑制物 2 的表达抑制, 而与人脐静脉内皮细胞共同培养可改善这种异常。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Location and Expression of Tissue Factor Pathway Inhibitor-2 in U937 Cells Treated with Oxidized Low Density Lipoprotein

ZHU Ying¹, LUO Xin-Ping¹, ZHU Jun¹, LIANG Wang², and MA Duan²

(1. Department of Cardiology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China; 2. Key Laboratory of Molecular Medicine Ministry of Education, Fudan University, Shanghai 200032, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; U937 Cell-Derived Foam Cell; Tissue Factor Pathway Inhibitor-2

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the location and expression of tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) in U937 cell-derived foam cells. **Methods** Foam cell model was established by incubating the human monocytic leukemia (U937) cells with oxidized low density lipoprotein (ox-LDL). Double immunofluorescence was used to detect the location of TFPI-2 protein. Human umbilical vein endothelial cells (hUVEC) were incubated with U937, the effects of the expression of TFPI-2 on U937 cell-derived foam cells were observed. The expression of TFPI-2 protein was examined by time-resolved fluorimunoassay (TR-FIA). The expression of TFPI-2 mRNA was examined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and real-time PCR. **Results** TFPI-2 protein distributed mainly in the cytoplasm of U937 cells. U937 cells were incubated with ox-LDL, the mRNA and protein of TFPI-2 peaked at 6 hours, then the levels of TFPI-2 decreased in a time dependent manner. After being added hUVEC, the expression of TFPI-2 in U937 increased. **Conclusion** Ox-LDL reduced the expression of TFPI-2 in U937 cells, incubated with hUVEC can modify the inhibitive effect.

目前研究表明, 各种致动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的危险因素均可诱导组织因子(tissue factor, TF)的大量表达和释放。TF 可启动外源性凝血途径、诱导动脉局部血栓形成、促进血管平滑肌细胞增殖^[1,2]和泡沫细胞形成, 在 As 的发病机制中占有重要地位。组织因子途径抑制物 2(tissue factor

pathway inhibitor-2, TFPI-2)是体内 TF 的天然抑制物之一, 它具有抑制凝血过程, 减少细胞外基质降解, 抑制血管新生等作用^[3-5], 推测其可能发挥干扰泡沫细胞的形成、稳定粥样斑块的作用。目前国内外在这方面仍缺乏系统性研究, 本研究在 U937 源性泡沫细胞模型上观察了 TFPI-2 的定位及变化规律。

[收稿日期] 2007-08-13

[修回日期] 2007-11-02

[作者简介] 朱颖, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, E-mail 为 clearunny1983@yahoo.com.cn。通讯作者罗心平, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病的诊断及治疗, E-mail 为 luoxp@medmail.com.cn。马端, 教授, 博士研究生导师。

1 材料和方法

1.1 氧化型低密度脂蛋白的制备

参照文献[6], 分离、制备氧化型低密度脂蛋白

(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL), 以硫代巴比妥酸反应物质(thiobarbituric acid-reactive substance, TBARS)含量来鉴定 ox-LDL 的氧化程度。

1.2 U937 泡沫细胞模型的建立

U937 细胞株购自上海中科院细胞库。正常生长的 U937 细胞培养于含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、20 mmol/L HEPES 及 125 mg/L L-glutamine 的 RPMI 1640 培养基中, 培养条件为 37℃、5% CO₂。2~3 天换液传代, 取处于对数生长期的细胞进行实验。细胞换液后, 调细胞密度为 15×10^7 个/L 与终浓度为 80 mg/L ox-LDL 孵育 48 h^[7], 建立 U937 泡沫细胞模型。采用油红 O 染色观察脂质堆积与泡沫细胞形成。倒置显微镜下观察结果, 胞质内出现红染颗粒为染色阳性, 在 CIS-1000 细胞扫描分析系统下照相。

1.3 脂质抽提及测定

低速离心收集细胞, 以 PBS 冲洗 3 次, 加入异丙醇 0.5 mL, 在 CQ250 超声波清洗器(上海超声波仪器厂)上每次震动 10 s, 共 3 次, 以 1000 r/min 离心 15 min。吸取上清, 试剂盒(北京中生公司)测定总胆固醇(total cholesterol, TC)及游离胆固醇(free cholesterol, FC)含量。胆固醇酯(esterified cholesterol, EC)含量为总胆固醇含量与游离胆固醇含量之差, 再计算细胞内 TC 和 FC 含量。

1.4 时间分辨免疫荧光定量检测组织因子途径抑制物 2 蛋白

在诱导 U937 单核细胞向泡沫细胞演化过程中, 每 6~12 h 采集细胞蛋白裂解液和无血清培养上清。采用时间分辨免疫荧光(time-resolved fluorimunoassay, TRFIA)检测细胞内 TFPI-2 蛋白含量的变化。采用平衡夹心法建立 TFPI-2-TRFIA: 在包被有 TFPI-2 单抗的 96 孔微孔板上, 每孔依次加入 25 μ L TFPI-2 参考标准品或样品、200 μ L 反应缓冲液。25℃振荡孵育 1 h 后, 洗涤液洗涤 2 次; 再加 200 μ L Eu3+ -TFPI-2 单抗(1:50 稀释), 25℃振荡孵育 1 h 后, 洗涤液洗涤 6 次; 再加增强液 200 μ L, 25℃振荡反应 5 min, 荧光检测。全部过程均在 Auto DELFIA 1235 上自动完成, 并绘制标准曲线。

1.5 双重细胞免疫荧光定位组织因子途径抑制物 2 蛋白

收集 U937 细胞, 冰 PBS 洗 3 次。室温 4% 甲醛固定 20 min, 冰 PBS 洗 3 次。一抗(采用本实验室制备 TFPI-2 兔抗小鼠多抗和 TF 小鼠抗人单抗)37℃孵育 1 h, 4℃过夜, 冰 PBS 洗 3 次, 加入异硫氰基荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记兔抗小鼠

IgG(1:500 稀释)与 TF 单抗结合, 四甲基异氰酸罗达明(tetramethylrhodamine isothiocyanate, TRITC)标记山羊抗兔 IgG(1:100 稀释)与 TFPI-2 多抗结合, Hoechst33258 染核, 37℃孵育 1 h, 冰 PBS 洗 3 次, 制成细胞涂片, 以明胶封片。避光保存, 于激光扫描共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.6 逆转录聚合酶链反应和实时荧光定量聚合酶链反应检测组织因子途径抑制物 2 mRNA

低速离心收集细胞, 按 Trizol Reagent 操作指南提取细胞总 RNA。取总 RNA 2 μ g, 常规进行逆转录反应, 进行 PCR 循环(95℃变性 30 s \rightarrow 55℃复性 30 s \rightarrow 72℃延伸 40 s, 共 40 个循环, 末次 72℃延伸 7 min)。TFPI-2 上游引物 5'-CGA TGC TTG CTG GAG GAT AGA-3', 下游引物 5'-GCG A AG CTT TGG CAT CTT CTT T-3', 扩增产物长度为 396 bp。 β -actin 上游引物 5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA G-3', 下游引物 5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3', 扩增产物长度 312 bp。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 紫外灯下观察结果, 凝胶电泳分析系统扫描并照相。

实时荧光定量 PCR 定量分析 TFPI-2 mRNA 水平, 以 β -actin 作为内参。将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增(95℃孵育 5 min, 95℃变性 30 s \rightarrow 55℃复性 30 s \rightarrow 72℃延伸 40 s, 共 40 个循环), 之后 95℃变性 15 s \rightarrow 60℃复性 15 s \rightarrow 95℃退火 15 s, 制备溶解曲线。通过 Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System 软件获得 CT 值。CT 值是 PCR 扩增过程中, 荧光信号开始由本底进入指数增长阶段时的拐点所对应的循环次数。CT 值经过计算获得 TFPI-2 mRNA 相对于内参 β -actin 的表达水平。

1.7 统计学处理

用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氧化型低密度脂蛋白的鉴定

人血浆分离低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL), 经 5% 琼脂糖电泳证实为单一条带。新鲜 LDL 的 TBARS 值为 3.81 ± 0.53 mmol/g, ox-LDL 的 TBARS 值为 31.95 ± 2.93 mmol/g, 两者相比差异显著($P < 0.05$), 提示 ox-LDL 内脂质被有效氧化。经脂蛋白电泳证实, ox-LDL 电泳迁移率升高(图 1), 提示 LDL 已被有效氧化, 可用于后续实验。

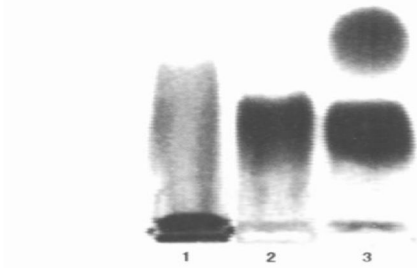


图 1. 琼脂糖电泳 1 为氧化型低密度脂蛋白, 2 为低密度脂蛋白, 3 为血浆。

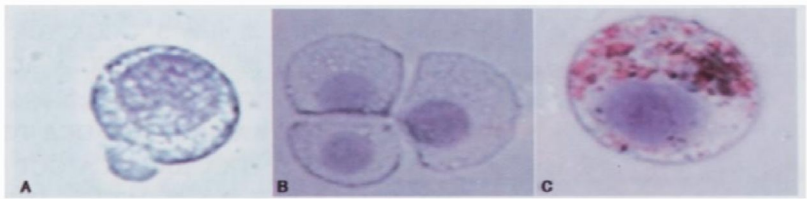


图 2. U937 源性泡沫细胞模型(×400) A 为正常 U937 细胞, B 为 U937 泡沫细胞, C 为 U937 泡沫细胞油红 O 染色。

表 1. 各组细胞胆固醇含量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

分 组	FC (mg/g)	TC (mg/g)	CE/TC
正常组	15.64 ± 1.23	20.68 ± 3.12	24.39%
80 mg/L LDL	16.73 ± 1.12 ^b	22.74 ± 1.00 ^b	26.42%
60 mg/L ox-LDL	20.47 ± 4.09 ^a	34.71 ± 4.25 ^a	45.71%
80 mg/L ox-LDL	23.13 ± 2.34 ^a	49.51 ± 2.04 ^a	53.28%
120 mg/L ox-LDL	30.71 ± 5.10 ^a	66.78 ± 4.19 ^a	54.01%

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与正常组比较。

2.3 组织因子途径抑制物 2 蛋白在 U937 源性泡沫细胞中的定位

双重细胞免疫荧光证实, TFPI-2 主要定位于 U937 源性泡沫细胞胞质中, 且和 TF 有相类似的分布情况(图 3)。

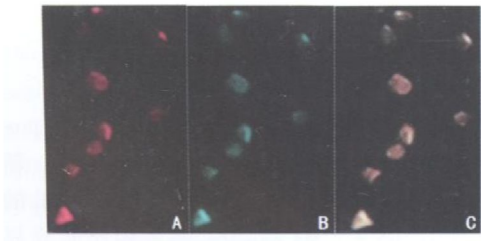


图 3. 双重免疫荧光标记组织因子途径抑制物 2 蛋白在 U937 细胞中的定位 (×400) A 为 TRITC 标记组织因子途径抑制物 2 蛋白, 红色荧光; B 为 FITC 标记组织因子蛋白, 绿色荧光; C 为在 U937 源性泡沫细胞中组织因子和组织因子途径抑制物 2 蛋白有相似定位, 黄色荧光。

2.2 U937 源性泡沫细胞模型的鉴定

80 mg/L ox-LDL 组 CE/TC 值大于 50%, 而 80 mg/L LDL 组和 60 mg/L ox-LDL 组 CE/TC 值均低于 50%, 120 mg/L ox-LDL 组 CE/TC 值虽大于 50% (表 1), 但光镜下观察发现细胞凋亡比例显著增多, 无法用于下一步实验。故选择将 80 mg/L ox-LDL 与 U937 细胞孵育 48 h, 光镜下观察发现细胞质内出现大量的红染颗粒或脂质空泡(图 2)。提示 U937 细胞与 80 mg/L ox-LDL 孵育 48 h 后, 成功建立人类单核细胞源性泡沫细胞模型。

2.4 U937 单核细胞形成泡沫细胞过程中组织因子途径抑制物 2 蛋白的动态变化

U937 细胞与 ox-LDL 孵育诱导分化为巨噬细胞过程中, TFPI-2 蛋白表达量明显增高, 6 h 达致峰值; 而共同孵育 6~48 h 期间, TFPI-2 蛋白表达量持续降低, 且一直低于正常水平(图 4)。

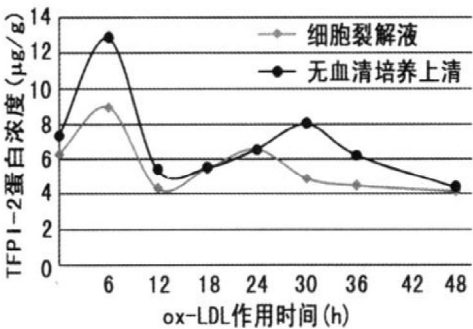


图 4. U937 细胞形成泡沫细胞过程中组织因子途径抑制物 2 蛋白的动态变化

2.5 U937 单核细胞形成泡沫细胞过程中组织因子途径抑制物 2 mRNA 的动态变化

RT-PCR 结果发现, TFPI-2 mRNA 在 ox-LDL 作用 0、12、24、36 及 48 h 过程中持续上调。实时荧光定量 PCR 结果发现, U937 细胞与 ox-LDL 孵育诱导分化巨噬细胞过程中, TFPI-2 mRNA 表达量在 6 h 达至

峰值, 而 6~48 h 期间 TFPI-2 mRNA 表达量降低, 且一直低于正常水平。实时荧光定量 PCR 结果与蛋白水平的变化相一致(图 5 和 6)。

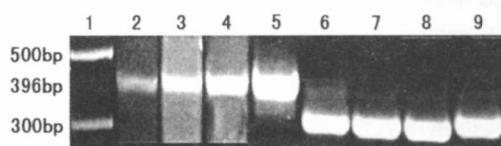


图 5. 逆转录聚合酶链反应检测 U937 细胞形成泡沫细胞过程中组织因子途径抑制物 2 mRNA 的表达变化 1 为 Marker, 2 为 12 h, 3 为 24 h, 4 为 36 h, 5 为 48 h, 6-9 为 β -actin。

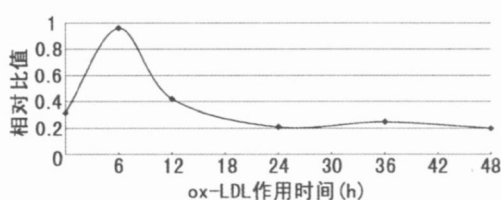


图 6. 实时荧光定量聚合酶链反应检测 U937 细胞形成泡沫细胞过程中组织因子途径抑制物 2 mRNA 的表达变化

2.6 氧化型低密度脂蛋白对人脐静脉内皮细胞组织因子途径抑制物 2 蛋白和 mRNA 的影响

hUVEC 与 80 mg/L ox-LDL 共同孵育, 24 h 后 TFPI-2 蛋白表达量达至峰值; 24~48 h 期间 TFPI-2 蛋白表达量逐渐降低(图 7), 而 TFPI-2 mRNA 水平持续增高(图 8)。

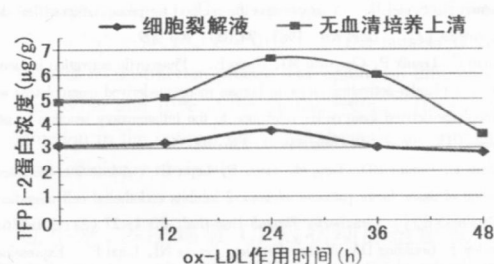


图 7. 氧化型低密度脂蛋白对人脐静脉内皮细胞组织因子途径抑制物 2 蛋白表达的影响

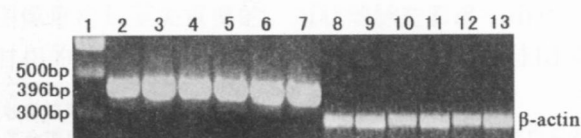


图 8. 氧化型低密度脂蛋白对人脐静脉内皮细胞组织因子途径抑制物 2 mRNA 表达的影响 1 为 Marker, 2 和 8 为 0 h, 3 和 9 为 6 h, 4 和 10 为 12 h, 5 和 11 为 24 h, 6 和 12 为 36 h, 7 和 13 为 48 h。

2.7 人脐静脉内皮细胞对 U937 泡沫细胞形成过程中组织因子途径抑制物 2 表达的影响

U937 细胞与 hUVEC 共同培养时, U937 细胞 TFPI-2 蛋白的表达量与 U937 细胞单独培养组比较明显上调; 随着 ox-LDL 氧化损伤时间的延长, 共培养组 U937 细胞 TFPI-2 蛋白的表达下调, 但仍高于 U937 单独培养组 ($P < 0.05$)。在 hUVEC 与 U937 共同培养组及 hUVEC 单独培养组中, 随着 ox-LDL 氧化损伤, hUVEC TFPI-2 蛋白的表达量呈小幅增加后减少的变化过程 ($P < 0.05$)。无 ox-LDL 氧化损伤时, 共培养组 hUVEC TFPI-2 蛋白表达量较其单独培养组小幅增加, 但并无统计学差异; ox-LDL 氧化损伤后, 共同培养组 hUVEC TFPI-2 蛋白表达下调, 反而低于 hUVEC 单独培养组, 但仍无统计学差异(表 2)。RT-PCR 检测发现, U937 细胞和 hUVEC 共同培养 48 h 后 TFPI-2 mRNA 水平分别较其单独培养组明显上调(图 9)。

表 2. U937 细胞和人脐静脉内皮细胞共同培养对其组织因子途径抑制物 2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$, mg/g)

作用时间	U937 细胞	hUVEC	共同培养组	
			U937 细胞	hUVEC
0 h	6.291 \pm 1.272	3.110 \pm 0.125	8.106 \pm 0.971 ^a	3.335 \pm 0.110
24 h	4.065 \pm 0.551	3.713 \pm 0.683 ^b	6.219 \pm 1.704 ^a	3.622 \pm 0.246 ^b
48 h	4.163 \pm 1.110	2.835 \pm 0.462 ^b	5.982 \pm 1.392 ^a	2.540 \pm 0.267 ^b

a 为 $P < 0.05$, 与 U937 细胞单独培养组比较; b 为 $P < 0.05$, 与未氧化损伤组比较。

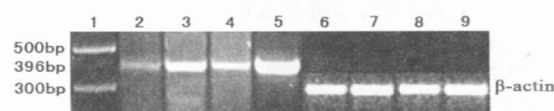


图 9. U937 细胞和人脐静脉内皮细胞对组织因子途径抑制物 2 mRNA 表达的影响 1 为 Marker, 2 和 6 为 U937 细胞单独培养, 4 和 8 为 hUVEC 细胞单独培养, 3、5、7 和 9 为 hUVEC 细胞和 U937 细胞共同培养。

3 讨论

动脉粥样硬化(As)是一种慢性血管炎性病变, 是影响人类健康的最严重最常见的疾病之一。As 的发生过程中涉及到单核细胞及血管平滑肌细胞的迁移、凋亡、增殖及分化等细胞活动, 这些细胞活动均有细胞外基质的参与, 而 TFPI-2 作为一种丝氨酸蛋白酶抑制剂, 在细胞外基质的重塑和稳定中发挥重要作用, 直接参与 As 的过程。

随着对 As 机制研究的深入,巨噬细胞源性泡沫细胞在 As 治疗中的地位日益受到重视。这种病变的巨噬细胞是 As 的特征性细胞,也是脂纹和动脉粥样硬化形成的初始阶段。从这个角度上讲,对病灶处巨噬细胞行早期干预可能会成为未来防治 As 的一条新思路。TFPI 是一类含 Kunitz 结构域、能抑制多种蛋白酶的家族,包括 TFPI-1 和 TFPI-2,目前 TFPI-1 已经有较多的研究,而对于 TFPI-2 研究则尚处于起步阶段。研究发现,它对 TF-FVIIa 复合物、FXIa 和组织蛋白酶 G 有弱抑制作用,部分抑制凝血过程;可抑制部分基质金属蛋白酶(MMP)活性,减少细胞外基质的降解^[3-5]和抑制血管新生^[2,8],是一种作用广泛的蛋白抑制剂,TFPI-2 与细胞的浸润、基质的降解及重塑,动脉粥样硬化斑块的形成、斑块的不稳定等方面都有密切联系,显现出了潜在的治疗价值^[9,10]。然而目前对 TFPI-2 与 As 关系的研究尚不深入,本研究旨在探讨 TFPI-2 在单核源性泡沫细胞形成过程中变化规律及作用机制,以了解 TFPI-2 与 As 形成早期的作用机制。

本研究结果发现,在体外培养的人源性单核细胞 U937 上存在有 TFPI-2 表达,其蛋白主要分布于胞质,且于 TF 有相似的分布。在 U937 泡沫细胞形成过程中,TFPI-2 蛋白和基因水平均降低,提示在巨噬细胞异常摄取脂质形成泡沫细胞形成过程中,存在 TFPI-2 的相对缺乏。推断作为单核细胞损伤的结果,TFPI-2 蛋白和基因水平的降低,可能又推动 As 病理发展。同时, hUVEC 作为 As 损伤处 TFPI-2 的另一主要来源,本研究观察了在 hUVEC 氧化损伤情况下,TFPI-2 基因和蛋白水平的变化情况。发现 TFPI-2 基因表达持续上调,而在 ox-LDL 损伤早期, hUVEC 中的 TFPI-2 蛋白表达保护性地上调,而后期可能存在阻碍 TFPI-2 表达的机制,从而导致 TFPI-2 蛋白水平下调。众所周知,内皮细胞受损,单核细胞迁入内皮细胞下是 As 早期事件之一,顾希望通过在体外共同培养内皮细胞和单核细胞以模拟该环境,研究证实内皮细胞分泌的多种因子促使 U937 细胞 TFPI-2 蛋白水平保护性上调,而随氧化损伤时间增加, U937 细胞 TFPI-2 蛋白水平降低,但共同培养组

仍高于 U937 单独培养组;而 hUVEC 细胞与 U937 共同培养时 TFPI-2 蛋白表达量小幅增加;在 ox-LDL 氧化损伤后 TFPI-2 蛋白的表达则显著下调,甚至低于 hUVEC 单独培养组。值得注意的是,在共同培养的情况下 TFPI-2 的基因水平平均上调。所以推测是否在氧化损伤过程中存在某种为阐明的机制阻碍了 TFPI-2 的基因表达,从而造成基因和蛋白水平表达差异的现象。

本研究表明 U937 泡沫细胞形成过程中存在 TFPI-2 表达的抑制,而与 hUVEC 共同培养可改善该抑制作用。TFPI-2 在 As 早期病理发展过程中的动态改变的影响及机制是我们下一步积极研究的内容,以明确 TFPI-2 在 As 病理形成中的地位和存在的潜在治疗价值。

[参考文献]

- [1] Steffell J, Akhmedov A, Greutert H, Luscher TF, Tanner FC. Tissue factor in cardiovascular disease: Molecular mechanism and clinical implication [J]. *Circulation*, 2006, **113**: 722-731.
- [2] Chand HS, Du X, Ma D, Inzunza HD, Kamei S, Foster D, et al. The effect of human tissue factor pathway inhibitor-2 on the growth and metastasis of fibrosarcoma tumors in athymic mice [J]. *Blood*, 2004, **103** (3): 1 069-077.
- [3] Siegling S, Thyzel E, Brinkmann T, Prohaska W, Glahn J, Gotting C, et al. Genetic variations in the human TFPI-2 gene and its promoter region by denaturing high performance liquid chromatography [J]. *Thromb Res*, 2004, **113**: 341-343.
- [4] Kast C, Wang ML, Whiteway M. The ERK/MAPK pathway regulates the activity of the human tissue factor pathway inhibitor-2 promoter [J]. *Biol Chem*, 2003, **278** (9): 6 787-794.
- [5] Du X, Chitmd HS, Kiesel W. Human tissue factor pathway inhibitor-2 does not bind or inhibit activated matrix metalloproteinase-1 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, **1 621** (3): 242-245.
- [6] Wieland H, Seidel D. A simple specific method for precipitation of low density lipoproteins [J]. *Lipid Res*, 1983, **94** (3): 904-909.
- [7] Dentan C, Lesnik P, Chapman MJ, Ninio E. Phagocytic activation induces formation of platelet-activating factor in human monocytederived macrophages and in macrophage-derived foam cells: relevance to the inflammatory reaction in atherogenesis [J]. *Eur J Biochem*, 1996, **236**: 48-55.
- [8] Ivanciu L, Gerard RD, Tang H, Lupu F, Lupu C. Adenovirus-mediated expression of tissue factor pathway inhibitor-2 inhibits endothelial cell migration and angiogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, **27** (2): 310-316.
- [9] Crawley J, Goulding DA, Val*rie Ferreira, Severs NJ, Lupu F. Expression and localization of tissue factor pathway inhibitor-2 in normal and atherosclerotic human vessels [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (2): 218-224.
- [10] Price GC, Thompson SA, Kam PC. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor [J]. *Anaesthesia*, 2004, **59** (5): 483-492.

(此文编辑 文玉珊)