

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2010)18-03-0184-05

川芎嗪抑制凝血酶诱导血管内皮细胞组织因子表达的机制

成春英^{1,2}, 孙勇^{1,3}, 文志斌¹, 何晓凡¹, 王谷丰¹, 林国强¹, 蒋海河¹, 唐先明¹, 贺石林¹

(1. 中南大学湘雅医学院, 湖南省长沙市 410078; 2. 湘南学院生理学教研室, 湖南省郴州市 423000;

3. 广州医学院, 广东省广州市 510182)

[关键词] 川芎嗪; 凝血酶; 组织因子; 一氧化氮; 信号转导

[摘要] **目的** 以前的研究已证实川芎嗪对凝血酶诱导人脐静脉内皮细胞株表达组织因子具有抑制效应。本实验进一步探讨一氧化氮及核因子 κ B 途径在其中所发挥的作用机制。**方法** 人脐静脉内皮细胞培养采用 RPMI-1640 完全培养基; 一期凝固法测总促凝活性; 组织因子 mRNA 采用逆转录聚合酶链式反应方法检测; 免疫组织化学染色用于研究核因子 κ B 的移位。**结果** 一氧化氮合酶途径阻断剂硝基左旋精氨酸甲基酯单独和人脐静脉内皮细胞细胞孵育时对细胞表达组织因子 mRNA 和总促凝活性没有明显的影响 ($P > 0.05$); 硝基左旋精氨酸甲基酯、川芎嗪和凝血酶三者共同孵育时, 川芎嗪抑制凝血酶诱导人脐静脉内皮细胞组织因子表达的作用被取消 ($P < 0.05$)。免疫组织化学染色显示人脐静脉内皮细胞经凝血酶处理 45 min 后, 细胞核内棕黄色着色明显, 但人脐静脉内皮细胞经川芎嗪处理 15 min 后, 再加入凝血酶作用 45 min, 核内棕黄色着色则明显减少。**结论** 一氧化氮途径参与了川芎嗪抑制凝血酶诱导血管内皮细胞表达组织因子的作用; 川芎嗪能够通过影响核因子 κ B 的活化来抑制组织因子的表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Mechanisms for Tetraethylpyrazine on the Expression of Tissue Factor Induced by Thrombin in Vascular Endothelial Cells

CHENG Chun-Ying^{1,2}, SUN Yong^{1,3}, WEN Zhibin¹, HE Xiaofan¹, WANG Gu-Feng¹, LIN Guo-Qiang¹, JIANG Haihe¹, TIAN Xianming¹, and HE Shilin¹

(1. Xiangya Medical School, Central South University, Changsha 410078, China; 2. Department of Physiology, Xiangnan University, Chenzhou 423000, China; 3. Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China)

[KEY WORDS] Tetraethylpyrazine; Thrombin; Tissue Factor; Nitrous Oxide; Cell Signal Transduction

[ABSTRACT] **Aim** Previous study demonstrated that tetraethylpyrazine (TMP) had an inhibitory effect on the TF expression induced by thrombin in human umbilical vein endothelium derived cell line human umbilical vascular endothelial cells (HUVEC). However, its mechanisms were not fully understood. In this study, we observed the role of nitric oxide (NO) and transcription factor NF- κ B in the regulation of TMP on tissue factor (TF) expression. **Methods** HUVEC were cultured in RPMI-1640. TF activity was determined with one-stage clotting assay measuring total cellular pro-coagulant activity (PCA). TF mRNA was examined by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Immunohistochemical analysis was performed to evaluate the translocation of NF- κ B. **Results** NG-nitro-L-arginine methylate (L-NAME) is an inhibitor of nitric oxide synthase (NOS), and it alone had no marked effects on PCA and TF mRNA in HUVEC, but L-NAME significantly decrease the inhibitory effects of TMP on PCA increment induced by thrombin ($P < 0.05$). Immunohistochemical analysis demonstrated that NF- κ B translocation from cytoplasm to the nucleus was found after treatment of endothelial cells with thrombin. TMP inhibited thrombin-induced NF- κ B translocation from cytoplasm to the nucleus. **Conclusion** NO pathway participates in the inhibitory effect of TMP on the expression of TF induced by thrombin. TMP can inhibit TF expression induced by thrombin through suppressing NF- κ B activation.

本室以前的实验已经观察到川芎嗪能抑制凝

血酶所诱导的人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vascular endothelial cells, HUVEC) 组织因子的表达增加, 但其具体机制仍不清楚^[1]。有报道显示川芎嗪 (tetraethylpyrazine, TMP) 可以抑制血管内皮细胞 (vascular endothelial cell, VEC) 核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 的活化^[2]。一氧化氮 (nitric oxide, NO) 作为一种反应性极强的自由基, 兼有第二信使和神经递质的作用, 同时又是一种效应分子, 它在心血管、神经、免疫等系统中起重要的信息传递作

[收稿日期] 2009-11-25 [修回日期] 2010-01-12

[基金项目] 湖南省教育厅科研基金资助项目 (06C783), 湘南学院科研基金资助项目 (05Y035)

[作者简介] 成春英, 教授, 研究方向为组织因子途径改变及其与心脑血管疾病的关系, E-mail 为 ccy5404041@126.com。孙勇, 硕士, 讲师, 研究方向为组织因子途径与血栓事件的关系, E-mail 为 s051@xyms.net。通讯作者文志斌, 博士, 教授, 长期从事血管生物学研究, 侧重于血管内皮细胞功能改变与心脑血管血栓性疾病发生发展的关系, 以及中草药的防治研究, E-mail 为 wenzhibin2002@xyms.net。

用^[3], 新近发现 NO 可以抑制内毒素诱导的组织因子 (tissue factor, TF) 表达。因此, 本实验探讨 NO 途径是否在 TMP 抑制凝血酶诱导 HUVEC 细胞 TF 表达中参与了信号转导的作用, 并观察 NF- κ B 在 TMP 抑制凝血酶诱导 HUVEC 细胞 TF 表达增加中的转位情况, 为临床防治心脑血管血栓性疾病提供新的思路和方法。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

RPM I-1640 购自美国 Hyclone 公司, 小牛血清购自杭州四季青公司; 胰蛋白酶和 L-NAME 购自 Sigma 公司; 凝血酶、兔脑凝血活酶购自中国医学科学院血液学研究所; TMP 为扬州中宝制药有限公司产品; 乏 F (factor-) 血浆为美国 ADI 公司产品; TF 单抗 (T59-SB7) 由 Morrissey JH 惠赠; Trizol (100 μ L/瓶) 为美国 Gibco 公司产品; 焦磷酸二乙酸 (DEPC) 购自北京鼎国公司; 溴已锭购自 Sigma 公司; DNA 标准分子量 PUC Mix Marker 为 Fermentas 公司产品; 逆转录试剂盒和琼脂糖为美国 Promega 公司产品; TF、内参照物 β -actin 和 Taq DNA 聚合酶购自上海生工生物公司; NF- κ B 多抗和 SABC 免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; 辣根酶标记的山羊抗兔 IgG 购自北京中山生物技术有限公司; DAB 浓缩显色液购自北京中山生物技术有限公司; DNA 标准分子量 PUC Mix Marker 为 Fermentas 公司产品。

1.2 血管内皮细胞培养和细胞冻融液组织因子活性的确认^[1]

人脐静脉血管内皮细胞株 HUVEC 购自武汉大学国家典型培养物保藏中心。在 RPM I-1640 完全培养基 (内含 10% 胎牛血清, 1 000 u/L 青霉素, 1 000 u/L 链霉素), 50 mL 培养瓶中培养, 贴壁生长至融合状态, 用 1.25 g/L 的胰酶消化传代, 选择生长良好的 HUVEC 细胞, 用胎盼蓝染色法计数拒染率, 用瑞特-姬姆萨染色观察细胞形态。同时, 为确定 HUVEC 细胞冻融液的促凝活性来自 TF, 从以下两个方面加以证实: 以乏 F 血浆代替正常人混合血浆; 在细胞冻融液中加入不同浓度 TF 单抗作用 30 min, 然后操作以下细胞冻融液促凝活性的检测。

1.3 细胞冻融液促凝活性的检测

采用一期凝固法测促凝活性 (pro-coagulant activity, PCA)^[1]。HUVEC 细胞培养后, 于 37 $^{\circ}$ C 与 -80 $^{\circ}$ C 间反复冻融 3 次, 以获取细胞冻融液。取冻

融液 100 μ L 加入正常人混合血浆 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 温育 3 min, 然后加入 0.025 mol/L CaCl₂ 100 μ L, 记录凝固时间 (PT)。取 56 $^{\circ}$ C 处理过的兔脑凝血活酶 (富含 TF 与磷脂), 用生理盐水作不同浓度稀释后, 测定 PT。将 PT 35 s 定义为 200 mU, 以 PT 为横轴, 兔脑凝血活酶的活性为纵轴建立标准曲线, 待测细胞冻融液 PCA 即可从标准曲线中求得。

1.4 组织因子 mRNA 的检测

采用 RT-PCR 法。取生长良好的 HUVEC 细胞, 提取细胞总 RNA 在 260 nm 及 280 nm 波长下读取 A 值, 通过其比值判断 RNA 的纯度 ($A_{260}/A_{280} > 1.8$), 并计算 RNA 的浓度, 以 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳检查 RNA 的完整性, 剩余 RNA 置于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱内保存。以改良的逆转录法合成 cDNA 进行 PCR 扩增。取 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 用紫外透射仪检测, 在凝胶成像分析系统上扫描定量。读取各条带的积分 A 值。根据目的片段及 β -actin 条带的 A 比值分析目的片段的表达水平。

1.5 一氧化氮途径与川芎嗪抑制凝血酶诱导人脐静脉内皮细胞组织因子表达的关系

取生长良好的 HUVEC 细胞随机分成 6 组: 对照组、凝血酶组、TMP 组、硝基左旋精氨酸甲基乙酯 (NG-nitro-L-arginine methylate, L-NAME) 组和凝血酶 + TMP 组和凝血酶组 + TMP + L-NAME 组。取细胞冻融液测 PCA; 并取细胞 mRNA 进行 RT-PCR, 以观察 NO 途径在 HUVEC 细胞 TF 表达中的作用。

1.6 免疫组织化学染色检测核因子 κ B 的转位

将处理后的细胞用 PBS 洗 2 次, 浸入 95% 乙醇中固定 15 min, PBS 漂洗 2 min \times 3 次, 3% 过氧化氢作用 20 min 以灭活内源性过氧化酶, PBS 漂洗 3 min \times 2 次, 用 10% 山羊血清 37 $^{\circ}$ C 封闭 30 min, 倾去血清, 滴加兔抗 NF- κ B 多抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜。PBS 漂洗 5 min \times 3 次后, 用生物素辣根过氧化物酶复合物方法进行免疫组织化学染色: 滴加生物素化羊抗兔 IgG 及生物素辣根过氧化物酶复合物, DAB 显色, 封片后镜检。

1.7 统计学分析

用 Instat 储存和分析数据。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较用 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析与 *q* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 组织因子活性确认

以标准 TF 促凝活性作对照, 加正常人混合血

浆至经凝血酶处理 HUVEC 细胞冻融液中, PCA 明显增高,但以乏 F (factor) 血浆代替正常人混合血浆时, PCA 变化不明显。在细胞冻融液中加入不同浓度 TF 单抗作用 30 m in 发现 PCA 随 TF 单抗浓度的增加而减少,直至 PCA 被完全中和;非特异性单抗无作用,说明细胞冻融液的 PCA 活性来自 TF 而非其他促凝蛋白。

2.2 硝基左旋精氨酸甲基乙酯对川芎嗪抑制凝血酶诱导人脐静脉内皮细胞细胞组织因子表达的活性的影响

NO 合酶阻断剂 L-NAME 单独和 HUVEC 细胞孵育 8 h 对细胞 PCA 无明显影响 ($P > 0.05$); 但 L-NAME 与凝血酶 + TMP 共孵育后, PCA 比凝血酶 + TMP 组有所增加 ($P < 0.01$), 与凝血酶组相比差异有显著性 ($P < 0.05$ 表 1)。

表 1 硝基左旋精氨酸甲基乙酯对川芎嗪抑制凝血酶诱导人脐静脉内皮细胞细胞组织因子活性的影响

分 组	凝固时间 (s)
对照组	7.6 ± 0.72 ^c
凝血酶组	31.5 ± 1.48 ^a
TMP 组	6.6 ± 0.22 ^c
L-NAME 组	6.8 ± 0.36 ^c
TMP+ 凝血酶组	14.2 ± 0.44 ^{abc}
TMP+ L-NAME+ 凝血酶组	24.5 ± 1.12 ^{ac}

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$ 与 TMP+ L-NAME+ 凝血酶组相比; c 为 $P < 0.05$ 与凝血酶组相比。

2.3 硝基左旋精氨酸甲基乙酯对川芎嗪抑制凝血酶诱导人脐静脉内皮细胞细胞组织因子 mRNA 表达的影响

凝胶电泳条带经成像分析系统分析后发现,凝血酶 + TMP+ L-NAME 组的光密度介于凝血酶组和凝血酶 + TMP 组之间,与凝血酶组相比,差异具有显著性意义 ($P < 0.05$),与凝血酶 + TMP 组相比,差异也具有显著性意义 ($P < 0.05$ 图 1 和表 2),说明 L-NAME 能部分拮抗 TMP 对凝血酶诱导 HUVEC 细胞 TF mRNA 的表达。

2.4 川芎嗪和凝血酶对核因子-κB 在细胞内移位的影响

未经凝血酶处理的对照组 HUVEC 细胞,滴加兔抗人 NF-κB 多抗后,细胞核内未见棕黄色着色,说明没有 NF-κB 的核内转移 (图 2A); HUVEC 细胞经凝血酶处理 45 m in 后,一抗用牛血清白蛋白稀液替代 NF-κB 多抗,未见棕黄色着色;而滴加 NF-

κB 多抗后可观察到细胞核内有明显的棕黄色着色 (图 2B)。TMP 对照组,细胞核内基本上未见棕黄色染色说明没有 NF-κB 的核内转移 (图 2C); TMP 处理 HUVEC 细胞 15 m in 后,再加入凝血酶作用 45 m in 结果发现核内棕黄色着色较单独用凝血酶组有所减少 (图 2D)。

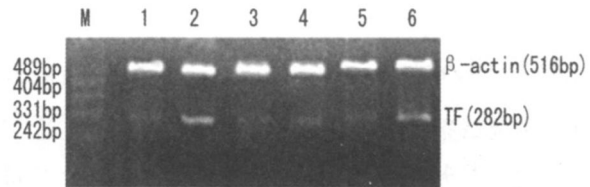


图 1 硝基左旋精氨酸甲基乙酯对 TMP 抑制凝血酶诱导 TF mRNA 表达的影响 1 为对照组, 2 为凝血酶组, 3 为 TMP 组, 4 为 L-NAME 组, 5 为 TMP+ 凝血酶, 6 为 TMP+ 凝血酶 + L-NAME 组。

表 2 硝基左旋精氨酸甲基乙酯对川芎嗪和凝血酶表达组织因子 mRNA 的影响 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

分 组	TF mRNA
对照组	0.36 ± 0.11 ^c
凝血酶组	0.88 ± 0.17 ^a
TMP 组	0.33 ± 0.08 ^c
L-NAME 组	0.35 ± 0.07 ^c
TMP+ 凝血酶组	0.51 ± 0.14 ^{abc}
TMP+ L-NAME+ 凝血酶组	0.72 ± 0.05 ^{ac}

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$ 与 TMP+ L-NAME+ 凝血酶组相比; c 为 $P < 0.05$ 与凝血酶组相比。

3 讨论

心脑血管疾病对人类健康的危害日益严重,防治血栓栓塞性疾病及其并发症已成为临床研究迫切需要解决问题。血栓的形成主要与体内凝血-抗凝、纤溶-抗纤溶以及血小板等多系统功能改变有关,而这些系统功能的改变都与 VEC 功能障碍存在着密切联系。

VEC 除屏障、物质转运、非特异性免疫功能和参与血管新生外,还对血液流变学、血管通畅、血管运动、凝血、抗凝及纤溶具有重要调节作用^[4]。在正常生理情况下,VEC 具有抗血栓形成特性;在病理条件下,由于各种刺激对 VEC 功能的影响,致使其众多分泌因子的表达发生变化,从而导致 VEC 凝血网络稳态失衡,使机体呈现病理状态。如果此时血管内皮受损,往往导致血栓形成。其中应特别注

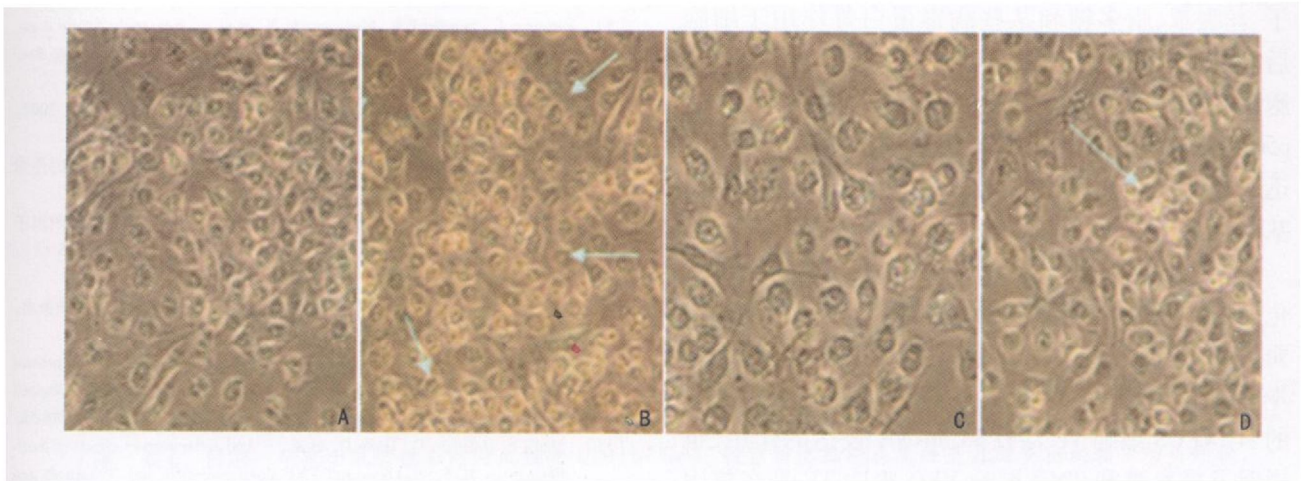


图 2 免疫组化显示核因子 κ B 的核内转移情况 (100 \times) A 为对照组, B 为凝血酶组, C 为 TMP 组, D 为凝血酶 + TMP 组。箭头所指棕黄色染色为胞内 NF- κ B。

意的是血管内皮细胞 TF 的表达。在正常情况下,血管内的大多数细胞并不表达 TF,只有 VEC 和单核细胞微量地表达 TF。但在受到体内外因素刺激时可诱生性地大量表达 TF。

由肝细胞合成的凝血酶原激活后形成凝血酶,它是参与凝血反应各个环节的关键酶。近年来的研究证明,它还具有十分重要的非凝血功能^[5]。凝血酶受体是一种具有独特作用方式的受体,属 G 蛋白偶联家族。凝血酶主要通过 PAR1、PAR3 和 PAR4 发挥生物学作用^[5,6]。凝血酶除具有直接促凝作用外,还有许多细胞效应,如激活血小板使其粘附聚集,并释放血栓素 A、血小板源性生长因子 (PDGF) 和许多凝血物质;刺激 VEC 产生前列环素、内皮素、血小板活化因子和纤溶酶原激活物;促进血管平滑肌细胞增殖等。凝血酶的细胞学效应均由位于细胞表面的凝血酶受体所介导。现已发现在血小板、巨噬细胞,动脉内皮细胞和血管平滑肌细胞等多种细胞表面有凝血酶受体存在。凝血酶激活凝血酶受体后,其信号转导途径包括:有丝分裂原激活蛋白激酶 (MAPK) 途径、Janus 激酶/信号转导子与转录激动子 (JAK-STAT) 途径、应激活化蛋白激酶 (SAPK) 途径、酪氨酸蛋白激酶 (TPK) 受体途径、PKC 途径和 PTK 途径等^[7]。研究表明,凝血酶刺激 VEC 和单核细胞表达 TF 与钙/钙调素 (Ca^{2+} /CaM) 和蛋白激酶 C (PKC) 途径有关^[8]。

我国中医药研究表明,中药川芎嗪具有很好的抗血栓作用。TMP 抗血小板凝集,并对已凝集的血小板有降解作用;此外, TMP 还有抑制血栓素的合成、拮抗内皮素、改善组织微循环、扩张冠状动脉血

管、抑制平滑肌细胞和成纤维细胞增生、抗氧化、抗瘢痕形成、促进骨折愈合和造血干细胞/祖细胞增殖、还有一定的调节免疫的作用^[9]。TMP 临床应用广泛,但其作用的分子机制仍有待进一步研究。NO 是近些年国内外医学领域研究最多的热点之一。它是由 NO 合酶 (NO synthase, NOS) 氧化 L 精氨酸产生的。在生物体内, NO 与血管内皮细胞结构和功能调节密切相关,它不仅参与血压调整、血管通透性调节、防止白细胞粘附和血小板聚集等生理过程,而且还参与休克、高血压、动脉粥样硬化、血管狭窄和阻塞等诸多重要病理过程的发生和发展^[3]。NO 的抗血栓形成作用除与抑制血小板聚集有关外,还可通过抑制 VEC 生成 TF 来影响凝血系统^[3]。本实验选用 NOS 的抑制剂 L-NAME,以减少 NO 的合成,结果显示 L-NAME 可部分地阻抑 TMP 抑制凝血酶升高 HUVEC 细胞 PCA 的作用,说明 NO 途径在其中发挥了信号转导作用。同时也证明 NO 途径可能不是唯一的信号转导途径,因为 L-NAME 不能阻断凝血酶的全部作用,说明还有其它的途径和机制参与,其具体途径和机制尚待进一步的研究。

随着对信号传导通路以及核基因调控水平的不断深入研究,发现 TF 基因属于早期反应基因,其基因 5' 侧翼序列区非常复杂,包括多种转录因子结合的共有序列,如 NF- κ B、AP-1、AP-2、EGR-1 等,而且部分是多拷贝的,其中 NF- κ B 是细胞表达 TF 主要的最后环节之一。NF- κ B 属于 NF- κ B/Rel 家族,主要有 p50/p65 组成。静息细胞中 NF- κ B 的 p65 亚基与 I κ B 蛋白结合,覆盖 p50 蛋白的核定位信号,使 NF- κ B 与 I κ B 形成三聚体以非活性形式存在于细胞

浆^[10-11]。许多免疫刺激因子如细胞因子、生长因子、丝裂源、脂多糖和某些病毒蛋白等作用于细胞后,通过一个或多个信号转导途径激活蛋白激酶,致胞浆 NF- κ B 三聚体复合物中的 κ B 磷酸化而解离, p50 亚单位上的核定位信号得以暴露, NF- κ B 活化,迅速发生核易位,与特异性 κ B 序列结合而启动靶基因转录^[12-13]。

本实验观察到凝血酶可以明显诱导 NF- κ B 活化,从胞浆移到胞核,而 TMP 则可抑制这种位移,进而抑制 TF 的表达。免疫组织化学的实验结果进一步验证了本室先前做的关于 TMP 抑制凝血酶诱导的 HUVECS 细胞 TF 活性和 mRNA 表达的作用,也说明了凝血酶和 TMP 影响 VEC 表达 TF 是在核因子水平上实现的。

[参考文献]

- [1] 成春英,孙勇,文志斌,等. 川芎嗪对凝血酶诱导血管内皮细胞组织因子表达的影响[J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(8): 1743-747.
- [2] 任新瑜,阮秋蓉,朱大和,等. 川芎嗪抑制血管紧张素 II 诱导的平滑肌细胞 NF- κ B 激活和骨形成蛋白-2 表达降低[J]. 生理学报, 2007, 59(3): 339-344.
- [3] Yang Y, Loscalzo J. Regulation of tissue factor expression in human microvascular endothelial cells by nitric oxide [J]. *Circulation*, 2000, 101(18): 2144-148.
- [4] Hathcock J. Vascular biology—the role of tissue factor [J]. *Semin Hematol* 2004, 41(1 Suppl 1): 30-34.
- [5] Patterson C, Stouffer GA, Madananchi N, et al. New tricks for old dogs: nonthrombotic effects of thrombin in vessel wall biology [J]. *Circ Res* 2001, 88(10): 987-997.
- [6] 张盛洁,曹江. 蛋白酶活化受体与肿瘤[J]. 实用肿瘤杂志, 2009, 24(3): 302-305.
- [7] 胡榕,吴可贵. 凝血酶及其受体在血管平滑肌细胞增殖中的作用[J]. 高血压杂志, 2004, 12(4): 283-286.
- [8] 朱发明,文志斌,何晓凡,等. 凝血酶对大鼠星形胶质细胞组织因子活性表达的影响及其机制[J]. 中国应用生理学杂志, 2000, 16(1): 6-9.
- [9] 周江. 川芎有效成分及其药理作用研究概况[J]. 浙江中医杂志, 2007, 42(10): 615-616.
- [10] Fan C, Li Q, Zhang Y, et al. I κ B α and I κ B β possess injury context-specific functions that uniquely influence hepatic NF- κ B induction and inflammation [J]. *J Clin Invest* 2004, 113(5): 746-55.
- [11] Shalit I, Halperin D, Haite D, et al. Anti-inflammatory effects of oxifloxacin on IL-8, IL-1 β and TNF- α secretion and NF κ B and MAP-kinase activation in human monocytes stimulated with *Aspergillus fumigatus* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2006, 57(2): 230-235.
- [12] 高咏梅,朱广瑾. 核转录因子 NF- κ B 在血管内皮细胞组织因子表达中的作用[J]. 中国医学科学院学报, 2001, 23(3): 251-254.
- [13] Luzzo G, Santamaria M, Biasucci LM, et al. Persistent activation of nuclear factor kappa-B signaling pathway in patients with unstable angina and elevated levels of C-reactive protein: evidence for a direct proinflammatory effect of azide and lipopolysaccharide-free C-reactive protein on human monocytes via nuclear factor kappa-B activation [J]. *J Am Coll Cardiol* 2007, 49(2): 185-194.

(此文编辑 李小玲)