

[文章编号] 1007-3949(2011)19-09-0721-06

· 实验研究 ·

E1A 激活基因阻遏子对抗肿瘤坏死因子 α 引起的血管内皮细胞炎性损伤

段岩^{1,2}, 李杰², 陶杰², 游洋², 栾波², 刘少伟², 张效林², 闫承慧², 韩雅玲²

(1. 辽宁医学院, 辽宁省锦州市 121001; 2. 沈阳军区总医院心血管病研究所, 辽宁省沈阳市 110840)

[关键词] E1A 激活基因阻遏子; 血管内皮细胞; 炎性损伤; 核因子 κ B

[摘要] 目的 探讨 E1A 激活基因阻遏子表达对血管内皮细胞病理性炎症反应的生物学作用及机制。方法 以 E1A 激活基因阻遏子过表达和基因沉默的人动脉血管内皮细胞为细胞模型, 应用肿瘤坏死因子 α 刺激, ELISA 检测白细胞介素 6 的变化, Rhodamin-Phalloidin 检测肌动蛋白骨架 F-actin 分布, 应用 Transwell 小室和 Biotin 标记的 BSA 检测单层内皮细胞通透性改变。进一步通过免疫荧光染色和 Western blot 检测细胞内核因子 κ B 蛋白表达和转位情况。结果 ELISA 检测发现, E1A 激活基因阻遏子基因过表达显著抑制肿瘤坏死因子 α 刺激引起血管内皮细胞白细胞介素 6 的表达及分泌增加。同时, 细胞 F-actin 应力纤维的形成和细胞单层通透性增加受到明显抑制。相反, E1A 激活基因阻遏子基因沉默组白细胞介素 6 分泌较对照组明显增多。细胞 F-actin 应力纤维形成、细胞单层通透性显著增加。免疫荧光和 Western blot 分析证实, 肿瘤坏死因子 α 刺激后, E1A 激活基因阻遏子过表达组核因子 κ B 出现短时的入核现象并迅速出核, 对应蛋白出现相应的表达变化, 而 E1A 激活基因阻遏子基因沉默组核因子 κ B 表达持续增高且发生明显的入核转位现象。结论 E1A 激活基因阻遏子可通过减少核因子 κ B 的表达对抗肿瘤坏死因子 α 刺激引起的血管内皮细胞炎症反应和细胞通透性增加, 对抗细胞病理性损伤发生。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Protection of Cellular Repressor of E1A Stimulated Genes Against TNF- α -Mediated Inflammatory Injury of Vascular Endothelial Cells

DUAN Yan^{1,2}, LI Jie², TAO Jie², YOU Yang², LUAN Bo², LIU Shao-Wei², ZHANG Xiao-Lin², YAN Cheng-Hui², and HAN Ya-Ling²

(1. Liaoning Medical College, Jinzhou, Liaoning 121001, China; 2. Department of Cardiovascular Disease, General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang, Liaoning 110840, China)

[KEY WORDS] Cellular Repressor of E1A Stimulated Gene; Vascular Endothelial Cells; Inflammatory Injury; Nuclear Factor- κ B

[ABSTRACT] **Aim** To clarify the pathological effects and mechanisms of cellular repressor of E1A stimulated gene (CREG) on tumor necrosis factor- α (TNF- α) stimulated vascular endothelial cell (VEC) injury. **Methods** CREG overexpressed (VC) and knocked-down (VS) human artery VEC were produced and cells were exposed to TNF- α (10 μ g/L). Interleukin-6 (IL-6) secretion from cells was determined by enzyme immunolinked assay (ELISA). Filamentous actin (F-actin) stress fibre were detected by Rhodamin-Phalloidin staining. Endothelial permeability was detected by measuring the flux of biotin labeled albumin across the EC monolayers. Nuclear factor- κ B (NF- κ B) expressions and translocation were examined by Western blot analysis and immunofluorescence. **Results** After TNF- α stimulation, ELISA showed that IL-6 expression and secretion in VS cells was markedly increased as well as F-actin cytoskeleton rearrangement. Meanwhile, the permeability of VS cells was detected enhanced obviously. Conversely, overexpression of CREG inhibited the secretion of IL-6, F-actin stress fibre formation and hyperpermeability induced by TNF- α in VC cells.

[收稿日期] 2011-04-06

[基金项目] 国家自然科学基金(30770793, 30971218, 81070097); 辽宁省自然科学基金(20092088)

[作者简介] 段岩, 硕士研究生, 研究方向为心血管疾病的基础与临床, E-mail 为 dy0113@sina.com。游洋, 博士研究生, 研究方向为心血管疾病的基础与临床, E-mail 为 pctercgmma@163.com。通讯作者韩雅玲, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管疾病的基础、临床及介入治疗, E-mail 为 hanyl@126.com。

Moreover, immunofluorescence and Western blot showed that NF- κ B transiently translocated into the nuclei of VC cells, followed by quick exportation into the cytoplasm. Corresponding changes in the pattern of its expression was also observed. However, the expression of NF- κ B in CREG knocked-down VS cells was more sustainably elevated and retained in the nuclei. **Conclusions** CREG can inhibit NF- κ B expression, combat TNF- α -induced inflammatory responses and the hyperpermeability of VEC, and thereby antagonize pathological cellular injury.

血管内皮损伤和功能障碍是高血压、糖尿病、动脉粥样硬化和冠状动脉介入治疗后再狭窄等多种血管疾病的早发病理过程。以血管内皮损伤和功能障碍作为干预靶点已成为当前血管疾病防治研究的热点之一。人 E1A 激活基因阻遏子 (CREG) 基因是一个维持血管组织成熟分化稳态的重要调控因子。本室前期研究证明, CREG 基因在成熟血管内皮细胞 (VEC) 中呈现高丰度表达; 而在急性球囊损伤和高脂喂养动脉粥样硬化动物模型等急慢性病理性损伤 VEC 中, CREG 基因的表达显著降低。外源性转染 CREG 基因可以促进体外培养的人 VEC 增殖、迁移等生物学功能。相反, 通过基因沉默的方法抑制了 VEC 中 CREG 的表达后, 细胞自发性凋亡现象明显增加。因此, 推测 CREG 可能是维持 VEC 生理稳态的重要调控因子之一, 但其在病理性血管内皮损伤中是否具有生物学效应及机制尚未阐明。

本研究通过应用外源性炎症因子 TNF- α 刺激体外培养的 VEC, 以制备血管内皮病理性损伤的细胞学模型。并进一步通过逆转录病毒转染的方法, 在 VEC 中特异性地增加 CREG 蛋白和沉默 CREG 蛋白的表达, 初步了解 CREG 蛋白对 VEC 在 TNF- α 病理损伤时的生物学效应及相关机制。

1 材料和方法

1.1 材料

抗 hCREG 多克隆抗体、人 IL-6 ELISA 检测盒购自美国 R&D 公司, 小鼠 NF- κ B p65 单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术公司, Rhodamin-Phalloidin、NF- κ B 阻断剂 PDTC 购自 Sigma 公司。

1.2 细胞培养

人动脉 VEC 购自 ATCC, 我室已长期保存有感染 pLNCX-CREG 逆转录病毒的 CREG 过表达 VEC 细胞株命名为 VC、感染 pLNCX-shRNA-CREG 病毒的 CREG 沉默 VEC 细胞株命名为 VS、正常人动脉 VEC 为对照组命名为 VE^[1], 以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基进行培养, 每 3 天进行传代。

1.3 免疫荧光观察细胞肌动蛋白骨架 F-actin

将三组 VEC 接种于清洁灭菌的盖玻片上, 待生

长融合约 30% 后, 用 37℃ PBS 洗涤 3 次; 用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 再用 37℃ PBS 洗涤 3 次; 0.05% Triton X-100 通透 1 h, 37℃ PBS 洗涤 3 次; 加入 10% BSA 封闭 1 h, 37℃ PBS 洗涤 3 次。之后用 100 μ g/L Rhodamin-Phalloidin 进行 F-actin 染色, 4℃ 孵育过夜, PBS 反复冲洗, DAPI 染细胞核, 30% 甘油-PBS 封片, 在荧光倒置显微镜下观察 F-actin 的分布变化。

1.4 免疫荧光观察细胞 NF- κ B 信号表达

将细胞培养在清洁灭菌的盖玻片上至 30% 融合后用 37℃ PBS 洗涤 3 次, 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 0.05% Triton X-100 室温通透 1 h, 37℃ PBS 洗涤 3 次, 5% 山羊血清封闭 20 min, 弃掉血清加入小鼠 NF- κ B p65 单克隆抗体 (1:100), 4℃ 孵育过夜, PBS 洗涤 3 次, 加入山羊抗小鼠荧光标记二抗 (1:300), 室温避光孵育 2 h, PBS 洗涤 3 次, DAPI 染细胞核, 30% 甘油-PBS 封片, 在荧光倒置显微镜下观察、照像。

1.5 Western blot 检测 CREG 和 NF- κ B 蛋白表达

采用 BCA 法测定细胞蛋白的浓度, 并进行 10% SDS-PAGE、转至 PVDF 膜上、5% 脱脂奶粉封闭、一抗二抗结合、显色。一抗分别为抗 hCREG 多克隆抗体 (1:2000) 和小鼠 NF- κ B p65 单克隆抗体 (1:1000), 二抗为 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG (1:2000)。按 ECL 试剂盒说明书进行显影。

1.6 ELISA 测定细胞分泌 IL-6 水平

将三组 VEC 分别设置空白对照组、给药组、阻断组, 在 30 mm 培养皿中培养融合至 90% 左右, 弃去培养基, 无菌 PBS 洗涤 3 次, 空白对照组加无血清 DMEM 1 mL (以最少的液体覆盖细胞表面), 给药组加入以无血清 DMEM 配制的 TNF- α 10 μ g/L 溶液 1 mL, 阻断组加入以无血清 DMEM 配制的 TNF- α 10 μ g/L、PDTC 500 mmol/L 的溶液 1 mL (阻断剂提前 30 min 加入)。置 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱继续培养 12 h 后收集上清, 进行 IL-6 的 ELISA 检测。实验前以细胞计数结果校对上样量, 使上样量保持一致, 根据 ELISA 试剂盒说明书进行。紫外透射仪读取结果, 每次实验读数取 3 个, 此实验重复 3 次。

1.7 Transwell 小室和 Biotin 标记的 BSA 检测单层

内皮细胞通透性

参照 Essler 等建立的方法,用示踪剂 Biotin 白蛋白检测 VEC 单层通透性变化。将三组 VEC 接种在 Transwell chamber 多聚碳脂滤膜的弥散模型中,每个小室铺 66×10^4 个细胞。待细胞贴壁融合后,细胞单层用 PBS 洗 2 遍,空白对照组上室加入以无血清 DMEM 培养基配成的 Biotin 白蛋白 250 $\mu\text{g/L}$ 溶液 400 μL , 给药组加入以无血清 DMEM 配制的 TNF- α 10 $\mu\text{g/L}$ 、Biotin 白蛋白 250 $\mu\text{g/L}$ 的溶液 400 μL , 阻断组加入以无血清 DMEM 配制的 TNF- α 10 $\mu\text{g/L}$ 、PDTC 500 mmol/L、Biotin 白蛋白 250 $\mu\text{g/L}$ 的溶液 400 μL (阻断剂提前 30 min 加入)。下室均加 2.5 mL PBS。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱继续培养 12 h 后,从下室取 PBS 样品。96 孔板用包板液包被、加入样品、封闭样品、抗原抗体反应、显色液显色,然后加入 2 mol/L H_2SO_4 50 μL 终止反应,酶标仪检测 Biotin 白蛋白吸光度的变化。

1.8 统计学方法

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CREG 蛋白的表达

VC 组 CREG 蛋白表达量与 VE 组相比增加了 40.9%, 而 VS 组 CREG 蛋白的表达则较 VE 组减少了 63.7% (图 1)。

2.2 CREG 过表达可稳定 TNF- α 刺激后 F-actin 的排列

正常细胞 F-actin 主要分布于细胞周边,VS 组

纤维应力丝明显少于 VE 组。给予 10 $\mu\text{g/L}$ TNF- α 刺激 15 min 时,F-actin 开始缩短变粗向细胞中央回缩;30 min 时,VE 组、VS 组 F-actin 基本全部回缩至细胞中央,而周边少见纤维应力丝,而 VC 组细胞已开始呈相反趋势,F-actin 在中央减少,周边分布增多;1 h 时 VE 组细胞中央的 F-actin 开始减少,周边增多,至 2 h 恢复正常,而 VS 组细胞虽然变化趋势与 VE 组相似,但恢复明显迟于 VE 组,同时,在此过程中 VC 组细胞 F-actin 已于 1 h 时恢复至正常。说明在 TNF- α 短时炎性刺激过程中,CREG 对于细胞炎性应激反应具有对抗作用,能减少炎症反应时的细胞损伤、尽早恢复细胞形态(图 2)。

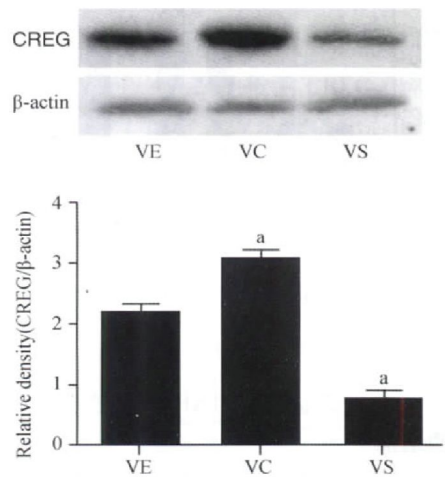


图 1. Western blot 检测血管内皮细胞 CREG 蛋白表达 ($n = 5$) a 为 $P < 0.05$, 与 VE 组比较。

Figure 1. The CREG expression of VEC was analyzed by Western blot

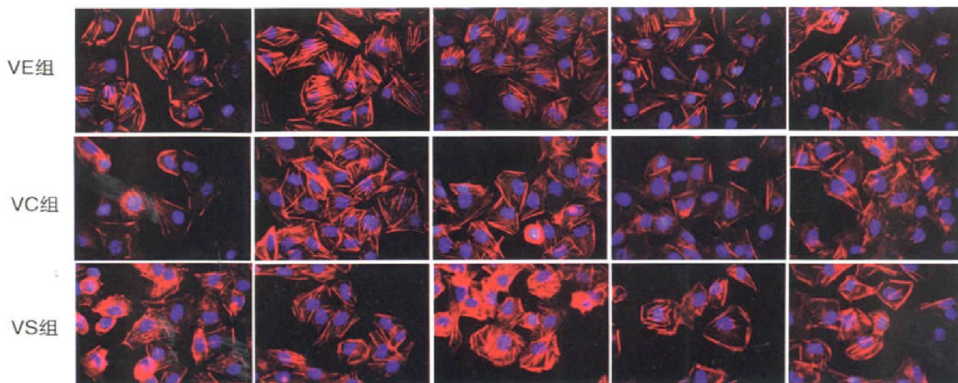


图 2. 免疫荧光观察 TNF- α 刺激后细胞肌动蛋白骨架 F-actin 的表达变化 ($n = 3, 630 \times$)

Figure 2. Immunofluorescence staining of F-actin induced by TNF- α

2.3 CREG 过表达可减少 TNF-α 刺激后 IL-6 的分泌

空白对照组 IL-6 分泌量在 VC < VS < VE, 但三者间无显著差异; 10 μg/L TNF-α 刺激 12 h 后, 三组细胞 IL-6 分泌量均有明显升高, 呈 VS > VE > VC 趋势; 给予 PDTC 后三组细胞 IL-6 分泌量均有明显降低, 下降幅度呈 VS > VE > VC 趋势。充分说明在炎症刺激时, NF-κB 的表达极大促进 IL-6 分泌, CREG 高表达可以通过阻断 NF-κB 的表达而对抗炎症刺激对细胞的损伤, 使 IL-6 分泌减少 (图 3)。

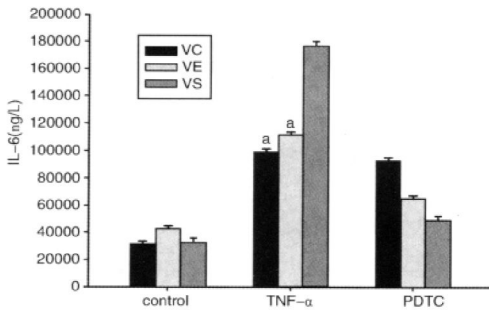


图 3. ELISA 检测细胞上清中 IL-6 分泌量 (n = 3) a 为 P < 0.05, 与 VS 组比较。

Figure 3. The secretion of IL-6 in the medium was measured by ELISA

2.4 CREG 过表达抑制 TNF-α 刺激后细胞单层通透性的增加

正常情况下, VC 组细胞单层通透性稍高于 VE 组和 VS 组, TNF-α 刺激后 VC 组细胞单层通透性相对于其他两组并无明显变化; 相反, VS 组通透性显著增高, 说明 CREG 高表达明显有利于维持细胞状态的稳定性, 减少细胞间连接断裂, 从而减少血管渗漏 (图 4)。

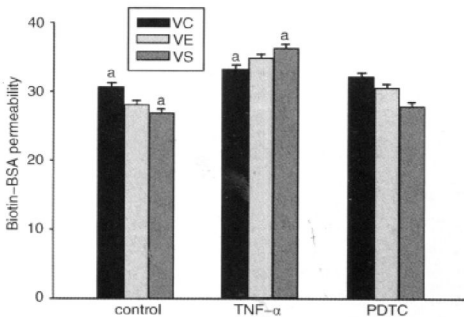


图 4. Transwell 检测细胞单层通透性的变化 (n = 4) a 为 P < 0.05, 与 VE 组比较。

Figure 4. VEC monolayer permeability was measured by Biotin-albumin

2.5 TNF-α 刺激后细胞 NF-κB 蛋白的表达

正常 VEC NF-κB 有少量表达; 当给予 10 μg/L TNF-α 刺激 15 min 后, NF-κB 表达开始增多, 以 VS 组改变最为明显, 其次是 VE 组。而 VC 组在 30 min 时 NF-κB 即开始明显减少, VE 组在 1 h 有所减少, VS 组则是 2 h 时才开始减少。推测 CREG 过表达可能调控 NF-κB 信号表达, 使细胞在炎症损伤过程中减少受损时间 (图 5)。

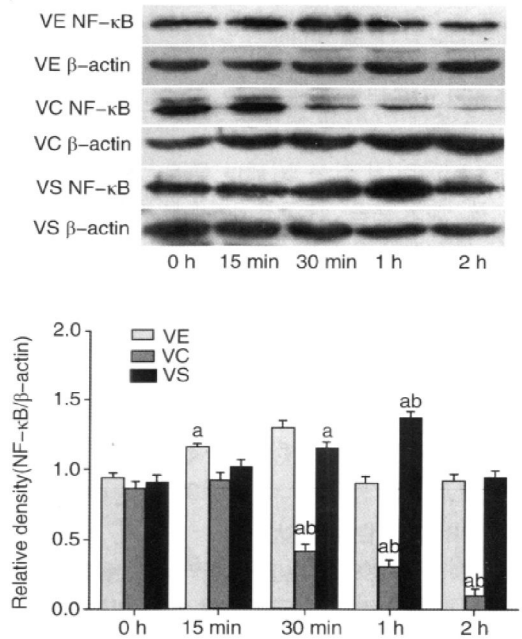


图 5. Western blot 检测 VEC 在 TNF-α 刺激不同时间点的 NF-κB 蛋白表达 (n = 5) a 为 P < 0.05, 同一处理条件下与 0 h 时比较; b 为 P < 0.05, 同一时间点与 VE 组比较。

Figure 5. The NF-κB expression of VEC induced by TNF-α was determined by Western blot

2.6 CREG 可以调控 NF-κB 核内外转录表达

正常细胞 NF-κB 仅在细胞核外表达。给予 10 μg/L TNF-α 刺激 15 min 时, VE 组、VS 组 NF-κB 迅速入核, 而 VC 组细胞核内少有表达; 30 min 时, 三组细胞 NF-κB 基本全部在核内表达; 1 h 时 VE 组、VC 组 NF-κB 绝大多数在核内表达, VS 组开始出核, 仅有 50% 在核内表达; 2 h 时, VE 组、VC 组核内表达已明显转变为核外表达, 而 VS 组再次入核, NF-κB 基本全部在核内表达。在整个核转录过程中, VC 组均没有极其明显的起伏变化。提示在 TNF-α 短时炎症刺激过程中, CREG 对 NF-κB 这一经典的促炎信号有抑制其核转录的作用 (图 6)。

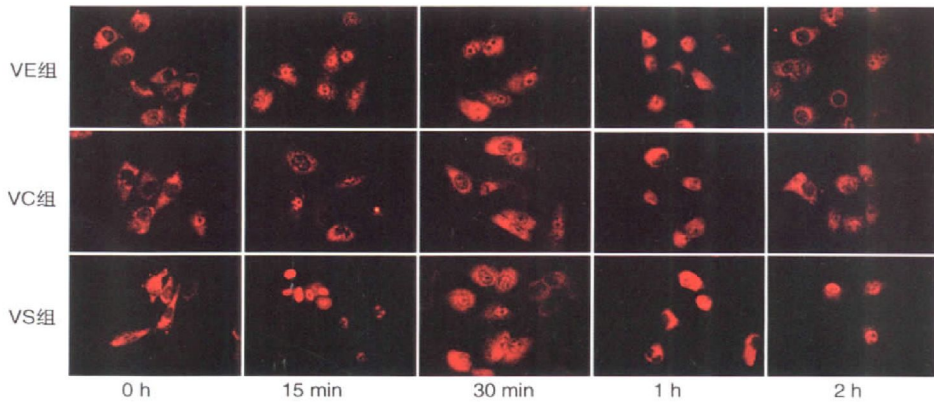


图 6. 免疫荧光观察 TNF- α 刺激后细胞 NF- κ B 核转录变化 ($n=3$, $630\times$)

Figure 6. Immunofluorescence staining of NF- κ B nuclear translocation induced by TNF- α

3 讨论

血管内皮在血液与组织间的溶质、激素、白细胞等物质交换方面起主要作用,因此,血管内皮作为一道天然屏障,如何对其调控并加以保护在当前血管疾病防治研究领域中日益受到高度重视。经调查研究显示,老龄化、吸烟、炎症、创伤、高糖、高脂等危险因素均可导致如高血压、糖尿病、动脉粥样硬化等多种心血管疾病,而 TNF- α 由于能引起血管氧化应激、血管重塑、血栓形成、细胞通透性增高、凋亡、血管炎症,在这些疾病的血管内皮损伤过程中起着重要作用^[2,3]。越来越多的研究发现,动脉粥样硬化是一个炎症反应过程,且贯穿于动脉粥样硬化发生与发展的全部阶段^[4,5]。进一步研究发现,NF- κ B 作为一种重要的核转录因子,是多个信号通路的交汇点,其作为经典的促炎信号在血液循环或局部血管 TNF- α 产物生成中起正反馈调节作用。TNF- α 活化 NF- κ B 转录,调节炎症、氧化应激、内皮功能障碍时 NF- κ B 相关基因的表达,而其诱导凋亡和促炎过程是通过调节细胞骨架改变细胞形态^[6],细胞骨架改变则会相应的使血管内皮通透性增高。而在内皮细胞中,NF- κ B 又可诱导 TNF- α 、IL-6^[7]、单核细胞化学吸引物质和黏附因子的表达,因此推测,NF- κ B 可通过影响血管内皮通透性进而导致血管内皮损伤、血管渗漏增加,引起相应的炎症反应^[8]。

CREG 是 1998 年利用酵母双杂交技术从 HeLa 细胞 cDNA 文库中克隆出的一种新的转录调控相关因子^[9],我室前期研究表明,CREG 参与了血管平滑肌细胞表型调控,可抑制其增殖并诱导其分化、维持其稳态、对抗血管损伤导致血管平滑肌细胞稳态失衡后的过度增殖^[10-12],同时抑制其凋亡^[13];CREG

过表达还可促进体外培养的人动脉内皮细胞增殖和迁移,并抑制凋亡^[14,15]。据此推测 CREG 作为一种血管活性蛋白参与了血管生理条件下稳态的调控,也有可能病理损伤过程中作为一种保护性因素参与其中。

本研究表明,CREG 过表达可能通过调控 NF- κ B 信号表达,抑制 TNF 介导的细胞通透性改变,进而减少 TNF- α 对内皮细胞的损伤干扰,稳定细胞骨架,减少炎症标志物 IL-6 的分泌,使细胞在炎症损伤过程中降低受损程度,尽快恢复自我保护。Western blot 及免疫荧光观测到的 F-actin 和 NF- κ B 在短时 TNF- α 刺激时,三组细胞骨架重排及信号表达均分别成一致的变化趋势:CREG 过表达在细胞炎症环境中无论是促炎信号的入核转位还是细胞形态均无显著变化,相反,CREG 沉默在这一过程中呈迅速受损、恢复迟缓的趋势。其中应力纤维的形成,可使细胞迅速变形,细胞连接断裂,引起后续的通透性发生变化。随后,从长时相的细胞通透性及炎症反应上可见,TNF- α 刺激后,各组细胞通透性均发生改变,以 VS 组变化最为明显,VC 组虽在正常状态下通透性稍有增高,但炎症刺激时则变化幅度最小。给予 NF- κ B 信号阻断后通透性明显降低,VS 组降低幅度最大。相应的,各组细胞同时时间点分泌的 IL-6 显著增高,VS 组最为突出,VC 组则变化幅度最小;同时可见,给予 NF- κ B 信号阻断后 IL-6 分泌量明显减少,VS 组降低幅度最大。说明正是因为 VS 组 NF- κ B 信号表达最多,所以阻断效果最彻底、最明显,从另一角度可判断 CREG 正是通过减少 NF- κ B 的表达而对抗炎症刺激对细胞的损伤。

综上所述,CREG 作为一种可以调节内皮细胞自稳态的阻遏子基因,其大量表达可有效抑制 TNF-

α 炎性刺激对内皮细胞的病理性损伤并及时实现自我修复。但其长时相的对抗慢性炎症损伤的研究仍需进一步完善深入。这一功能可用于动脉粥样硬化及冠状动脉介入治疗后再狭窄的预防治疗,通过细胞内源性修复减少患者病痛,既减少二次损伤又节省医疗资源,对未来心血管病的防治有重要参考意义。

[参考文献]

- [1] 陶杰. CREG 基因调控人动脉内皮细胞迁移和增殖的作用及其机制研究 [D]. 重庆: 第四军医大学, 2009.
- [2] Zhang H, Park Y, Wu J, et al. Role of TNF- α in vascular dysfunction [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2009, 116 (3): 219-230.
- [3] 沈诚, 范士志, 陈建明, 等. JAK/STAT 通路对缺血再灌注心肌 NF- κ B 和 TNF- α 表达的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2006, 16 (7): 985-991.
- [4] Mizuno Y, Jacob RF, Mason RP. Inflammation and the development of atherosclerosis: Effects of lipid-lowering therapy [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2011, 18 (5): 351-358.
- [5] 刘淼, 纪求尚, 张运, 等. 不同炎症标志物对冠状动脉病变的预测价值 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18 (9): 725-728.
- [6] Mathew SJ, Haubert D, Kronke M, et al. Looking beyond death: a morphogenetic role for the TNF signalling pathway [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122 (Pt 12): 1 939-946.
- [7] 马丽萍, 秦永文, 郑兴, 等. 白细胞介素 6 水平与冠状动脉病变的相关性分析 [J]. *中国现代医学杂志*, 2003, 13 (22): 106-109.
- [8] 牛红心, 刘章锁, 龙海波. 罗格列酮对高糖诱导的血管内皮细胞炎症的抑制作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18 (4): 265-268.
- [9] McGuire TR, Kazakoff PW, Hoie EB, et al. Antiproliferative activity of shark cartilage with and without tumor necrosis factor- α in human umbilical vein endothelium [J]. *Pharmacotherapy*, 1996, 16 (2): 237-244.
- [10] Han Y, Cui J, Tao J, et al. CREG inhibits migration of human vascular smooth muscle cells by mediating IGF-II endocytosis [J]. *Exp Cell Res*, 2009, 315 (19): 3 301-311.
- [11] Han Y, Deng J, Guo L, et al. CREG promotes a mature smooth muscle cell phenotype and reduces neointimal formation in balloon-injured rat carotid artery [J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 78 (3): 597-604.
- [12] Han Y, Guo L, Yan C, et al. Adenovirus-mediated intra-arterial delivery of cellular repressor of E1A-stimulated genes inhibits neointima formation in rabbits after balloon injury [J]. *J Vasc Surg*, 2008, 48 (1): 201-209.
- [13] Han Y, Wu G, Deng J, et al. Cellular repressor of E1A-stimulated genes inhibits human vascular smooth muscle cell apoptosis via blocking P38/JNK MAP kinase activation [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48 (6): 1 225-235.
- [14] 王占胜, 韩雅玲, 康建, 等. CREG 促进人动脉内皮细胞 VEGF 分泌和单层通透性增加 [J]. *中国病理生理学杂志*, 2011, 27 (1): 37-41.
- [15] 陶杰, 闫承慧, 郭鹏, 等. E1A 激活基因细胞阻遏子蛋白在人脐静脉内皮细胞凋亡中的作用 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13 (37): 7 281-285.

(此文编辑 文玉珊)