

· 论 著 ·

Klotho 水平与小鼠月龄相关并抑制其骨髓源性内皮祖细胞衰老*

姜 靖, 黄 岚, 赵晓辉, 喻 杨

(第三军医大学新桥医院心血管内科, 重庆 400037)

摘要:目的 观察不同月龄小鼠骨髓源性内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs) 数量和部分生物学功能以及外周血抗衰老蛋白 klotho(Kl)表达水平,探讨 Kl 对体外培养的老龄小鼠 EPCs 数量和功能的影响。方法 采用 Western-blot 法测定不同月龄小鼠外周血 Kl 水平;以密度梯度离心法获取老龄小鼠单个核细胞与不同浓度的 Kl 孵育,分别采用 acLDL-DiI 和 FITC-lectin 荧光双阳性细胞计数、MTT 分析和改良的 Boyden 小室法来检测其数量、增殖、迁移能力的变化。结果 不同月龄小鼠 EPCs 数量和功能以及外周血 Kl 水平均与月龄呈负相关;不同月龄小鼠 Kl 表达水平与外周血 EPCs 数量及其增殖和迁移等生物学功能具有相关性;体外培养中 Kl 可呈浓度依赖性上调 EPCs 的数量及其迁移能力、增殖能力。结论 月龄增加可导致小鼠内皮祖细胞数量和功能下降,并下调肾脏和外周血 Kl 水平;Kl 可增加体外培养的小鼠内皮祖细胞的数量,改善其功能。

关键词:衰老; Klotho ; 内皮祖细胞; 小鼠

中图分类号: R365. 329

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2009)24-3111-04

Klotho relates with months of mice and its anti-senescence effects on bone marrow derived endothelial progenitor cells*

JIANG Jing, HUANG Lan, ZHAO Xiao-hui, et al.

(Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the function change of bone marrow-derived endothelial progenitor cells(EPCs) and Klotho(Kl)level in different aging mice, and to observe Kl influence on part biological function of aging mice cultured in vitro. **Methods** Using Western-blot to detect the peripheral blood Kl level of different age mice, getting mononuclear cells from aging mice bone marrow, using chemical analysis after 7 days culture, EPCs of aging mice (twenty-month old) were incubated with different concentrations Kl, measured as acLDL-DiI and FITC-UEA-1 double positive cell. Using MTT analysis and improved Boyden chamber method to detect EPCs proliferation and migration activity. **Results** The peripheral Kl level was impaired in aging mice as well as the number and part functional activities of EPCs such as proliferation and migration adhesion, Kl promoting bone marrow stem cells of aging mice cultured in vitro differentiated into EPC, and Kl strengthening EPCs proliferating function and migrating ability by concentration dependence. **Conclusion** It is suggested that the Kl level of mice is correlated with age and the functions of EPCs.

Key words: senescence; Klotho; endothelial progenitor cells; mice

Klotho (Kl) 基因是 Kuro 等^[1]在 1997 年发现的与衰老相关的新基因。Kl 基因在小鼠中的表达缺失导致类似于人类衰老的各种表型变化,如动脉内膜增厚、中膜钙化、动脉硬化和骨质疏松、肺气肿、糖和能量代谢异常等;Kl 基因的过度表达,外周血中 Kl 蛋白增加,可抑制细胞衰老,预防衰老相关疾病如动脉粥样硬化(AS)等的发生,明显延长小鼠的寿命。这些研究表明 Kl 有着巨大的抗衰老效应,所以,作者认为研究 Kl 蛋白在预防、治疗衰老相关疾病中的作用具有重要的价值。

众所周知,AS 的发生及发展与衰老密切相关,并以内皮损伤为关键环节,故而内皮损伤的修复在预防 AS 发生中必有重要价值。近年来,以内皮祖细胞(EPCs)为基础的细胞疗法修复血管损伤已经成为研究热点之一。EPCs 是能特异地归巢于血管新生组织并分化增殖为成熟内皮细胞的一群干/祖细胞,是中胚层卵黄囊血岛原血干细胞(Hemangioblast)向内皮细胞分化过程中的一个过渡阶段,即血管内皮细胞的前体细胞。EPCs 的数量和活性受到多种因素的影响,陈剑飞等^[2]研究证实大鼠骨髓源性 EPCs 的数量和功能与衰老关系密切。若 Kl 能够抑制 EPCs 的衰老,则可能为预防 AS 的发生找到新的希望。有研究证实在 Klotho 基因变异的小鼠,随着机体的逐渐衰老,骨髓、外周血 EPCs 数量会明显降低^[3],提示 Klotho

蛋白表达与 EPCs 关系密切,可能通过抑制 EPCs 衰老预防 AS 的发生。为此,本研究观察了 Kl 对体外培养的小鼠 EPCs 数量及功能的影响,为 Kl 在干/祖细胞治疗领域中的应用提供部分实验依据。

1 材料与方法**1.1 实验分组**

1.1.1 测定不同月龄小鼠外周血 Kl 水平及 EPCs 和功能 C57BL/6 雄性小鼠购自重庆医科大学实验动物中心。按照月龄分为 2、12、20 个月 3 组,每组各 5 只。

1.1.2 观察 Kl 对体外培养的 EPCs 的影响 体外培养老龄小鼠骨髓源性 EPCs,分为对照组、Kl 处理组。Kl 处理组按照 Kl 终浓度分为 0.1、1、10ng/mL 3 个亚组。

1.2 主要材料和设备 DMEM-L 培养基(Sigma 公司,美国);优级胎牛血清(Hyclone 公司,美国);FITC 标记的荆豆凝集素 I(FITC-UEA-I)购自 Vector 公司;DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白(acLDL-DiI),购于 Molecular Probe 公司;小鼠淋巴细胞分离液(中国医学科学院生物医学工程研究所);FITC-Sca-1、PE-VEGFR-2 抗体,购自 e-Bioscience 公司;二苯基四氮唑溴盐(MTT)购自晶美生物医学公司;改良 Boyden 小室购于 Costar 公司;VEGF(PEPROTECH 美国);Klotho 蛋白购自

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30800480/C140401);第三军医大学留学回国人员基金资助项目(2009XHJ12)。

R&D 公司,使用前用内皮选择性培养基稀释;羊抗鼠 Klotho 抗体购自 R&D 公司;蛋白印记杂交系统(Chemicon 公司 美国);倒置荧光显微镜 (Leica, 德国);37℃ 恒温细胞培养箱 (QUEUE, 美国);密度梯度离心机 (LXJ-II 型, 上海医用分析仪器厂);电泳转膜装置(美国 Bio-Rad 公司);图像扫描仪(EPSON 彩色图像扫描仪)。

1.3 小鼠骨髓源性 EPCs 的培养及鉴定^[4] 取小鼠的股骨和腓骨,超净台下以 0.01M PBS 冲洗骨髓,用小鼠淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离骨髓单个核细胞,按照 4×10^6 的密度接种于含有 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,每 3~4 天换液,PBS 清洗去除非贴壁细胞。贴壁细胞用流式细胞仪法鉴定,将 1×10^6 个细胞悬于 100 μ L PBS 中,加入 FITC-Sca-1 和 PE-VEGFR-2 抗体各 10 μ L,以测定管所测定的双色荧光标记细胞比例减去同型对照管所测定的双色荧光标记细胞比例,作为实际双色荧光标记阳性细胞比例。每份标本至少计数 10 000 个细胞($n=6$)。同时用激光共聚焦显微镜鉴定 UEA 和 LDL 双染色阳性细胞为正在分化的 EPCs,用 image pro plus 图像分析软件对每孔细胞进行计数(5 个随机 \times 400 视野, $n=5$),计算双阳性细胞比例。

1.4 EPCs 数量检测 密度梯度离心法分离骨髓源性单个核细胞,培养 4d 后贴壁细胞双染鉴定,计数 3 个随机 200 倍视野 acLDL-Dil 和 UEA-I 双染阳性细胞。

1.5 小鼠骨髓源性 EPCs 增殖能力的测定 培养 7d 后,以 0.25% 含胰蛋白酶消化贴壁细胞,并接种到包被有人纤维连接蛋白 96 孔培养板中,在 37℃、5%CO₂ 的培养箱中培养 48h 后每孔加入 MTT10 μ L(5g/L),室温下孵育 6h;加入二甲基亚砜 150 μ L/孔,于微量振荡器充分振荡 10min,置酶标仪于波长 490nm 处测 OD 值。

1.6 小鼠骨髓源性 EPCs 迁移能力的测定 培养 7d 后,以 0.25% 含胰蛋白酶消化贴壁细胞,重悬后在显微镜下计数消化的贴壁细胞数量。将含 50ng/mL VEGF 的培养液按照每小室 25 μ L 加入改良的 Boyden 的下室,上室注入含 2 104 个 EPCs 的内皮细胞选择性培养基 50 μ L,将改良的 Boyden 小室置于 37℃、5%CO₂ 的培养箱中培养 6h 后。随机选择 3 个 400 显微镜视野计数迁移到低层的细胞数量。

1.7 Western-blot 检测小鼠外周血 K1 蛋白表达 2% 戊巴比妥钠麻醉小鼠后,摘除眼球采集外周血,提取外周血血浆总蛋白并测定其浓度;制备 8% 分离胶和 5% 积层胶,按预定程序加样,每样品加 20 μ L,将电泳装置与电源接上,用 80V 电压电泳,当染料前沿进入分离胶后再加电压至 120V,继续电泳至溴酚蓝至分离胶底部,关闭电源;将包含目的蛋白的凝胶转膜,200mA 电流在 4℃ 下,90 min;将硝酸纤维滤膜置抗小鼠 K1 抗体溶液中(浓度 1:1 000)在摇床上摇晃 1h,然后置 4℃ 冰箱中过夜;加入辣根过氧化物酶标兔抗羊 IgG 抗体溶液(浓度 1:500),并进行化学发光显色,在 ChemiImageTM 5500 型凝胶成像扫描仪下扫描。采用 Image-Pro Plus5.1 图像软件测定 Klotho 条带的光密度值,以 β -actin 蛋白的光密度值进行标准校正,计算 Klotho 蛋白与内参照的相对吸光度值,作为其表达的相对含量。

2 结 果

2.1 月龄对 EPCs 数量及生物学功能的影响 EPCs 的培养及鉴定:细胞培养第 4 天,可以观察到细胞增多增大并伸展呈椭圆形、短梭形细胞,有少量细胞突起。培养 7d 后,长梭形细胞较前明显增多,并呈簇状生长,有一定方向性,形成细胞克

隆。流式细胞仪检测贴壁细胞表面表达干细胞标志物及内皮细胞特异性标志物,贴壁细胞(51.3 \pm 6.2)% 表达干细胞抗原 Sca-1, $n=6$;(64.2 \pm 3.5)% 的贴壁细胞表达内皮细胞特异性抗原 VEGFR-2, $n=6$ 。经 acLDL-Dil 和 FITC-lectin 荧光双染,倒置荧光显微镜下观察到贴壁细胞摄取 acLDL-Dil 呈红色,见图 1。贴壁细胞与 UEA-1 结合呈绿色,见图 2。黄色荧光细胞为 UEA-I 和 DiLDL 双染色阳性细胞,见图 3。被认为是正在分化的 EPCs($n=5$)。培养细胞双染阳性数为(86.2 \pm 4.8)%($n=5$)。

2.2 月龄对小鼠骨髓源性 EPCs 数量的影响 倒置荧光显微镜下计数 5 个随机 \times 400 视野内的 EPCs 数量,发现随着月龄的增长,EPCs 数量逐渐减少,2、12、20M 月龄小鼠 EPCs 数量分别为(51.2 6.28)、(39.8 4.27)、(28.0 4.90)个/视野(\times 400)。

2.3 月龄对小鼠骨髓源性 EPCs 功能的影响 随着月龄的增加,小鼠骨髓源性 EPCs 的黏附功能呈逐渐下降趋势,其中 12 M 小鼠与 2 M 小鼠相比其 EPCs 黏附功能明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$),20 M 小鼠与 12 M 小鼠相比,其 EPCs 黏附功能显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$);与此类似小鼠骨髓源性 EPCs 的增殖能力也随着月龄的增加而降低,2、12、20M 相邻组间两两比较,均有明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$),提示月龄对小鼠骨髓源性 EPCs 的增殖功能有显著性负相影响,见表 1。

表 1 不同月龄小鼠骨髓源性 EPCs 功能差异性比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

项目	2M	12M	20M
黏附能力	17.000 \pm 2.24	14.000 \pm 1.58 Δ	8.400 \pm 1.14 \blacktriangle
迁移能力	10.600 \pm 2.97	7.800 \pm 1.30	5.000 \pm 1.22 Δ
增殖能力	0.592 \pm 0.023	0.529 \pm 0.032 Δ	0.467 \pm 0.022 Δ

相邻组间比较, \blacktriangle : $P<0.01$;相邻组间比较, Δ : $P<0.05$ 。

2.4 月龄对小鼠外周血 K1 蛋白水平的影响 本实验中,采用 Western-blot 法检测不同月龄小鼠外周血 K1 蛋白水平,结果显示 2、12、20M 月龄小鼠外周血 K1 蛋白相对吸光密度平均值分别为(0.322 \pm 0.023)、(0.249 \pm 0.018)、(0.118 \pm 0.010),即外周蛋白水平随着月龄的增加而显著性降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 4。

2.5 小鼠 K1 水平与骨髓源性 EPCs 数量及生物学功能相关性分析 分析显示不同月龄小鼠外周血 K1 蛋白水平均与 EPCs 的数量 0.741、迁移能力 0.760、增殖和黏附功能 0.768,则具有强相关性,差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.6 K1 对老龄小鼠骨髓源性 EPCs 迁移功能的影响 为了观察 K1 对 EPCs 迁移能力的影响,作者进行了 Boyden 小室实验。发现在不同浓度 K1 作用下,迁移的 EPCs 数量浓度依赖性增加(0.1ng/mL K1 vs 对照组,6.0 \pm 0.7 vs 4.8 \pm 0.4, $P<0.01$);(1.0ng/mL K1 vs 0.1ng/mL K1,8.8 \pm 1.1 vs 6.0 \pm 0.7, $P<0.05$);(10ng/mL K1 vs 对照组,10.6 \pm 0.9 vs 8.8 \pm 1.1, $P<0.01$) ($n=5$)。提示 K1 可以诱导 EPCs 迁移,并且 10ng/mL K1 对 EPCs 的诱导迁移作用明显强于 0.1ng/mL K1 和 1.0ng/mL K1。

2.7 K1 对老龄小鼠骨髓源性 EPCs 增殖功能的影响 小鼠骨髓单个核细胞培养 7d 获得的 EPCs,采用不同浓度的 K1 处理 48h,MTT 分析显示,K1 浓度依赖性增强 EPCs 增殖能力。

0.1、1、10ng/mL K1 处理组的 A 值分别为 (0.518±0.015)、(0.559±0.023) 和 (0.632±0.037), 均明显高于对照组 (0.502±0.014), 差异有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), $n=5$ 。10 ng/ml K1 处理组的 A 值明显高于 1 ng/mL K1 处理组 ($P<0.05$), 而 1ng/mL K1 处理组的 A 值明显高于 0.1ng/mL K1 处理组 ($P<0.05$)。

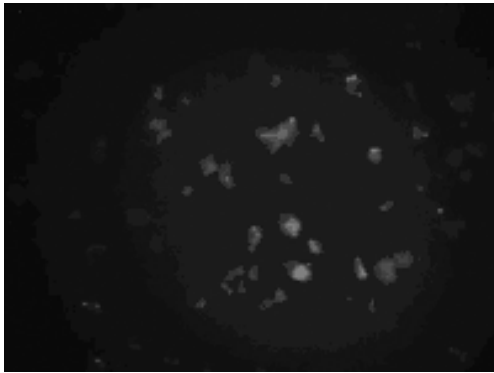


图 1 小鼠骨髓源性 EPCs acLDL-DiI 双染鉴定 (×400)

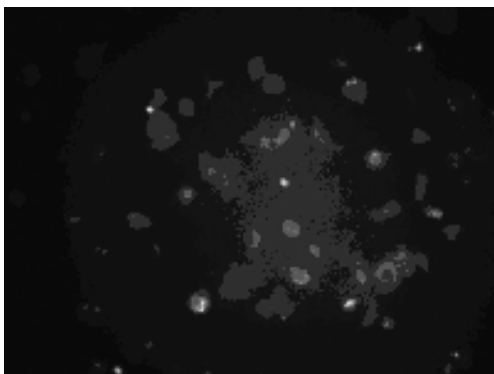


图 2 小鼠骨髓源性 EPCs FITC-lectin 双染鉴定 (×400)

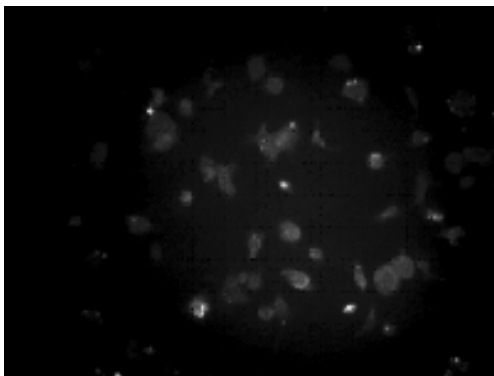


图 3 小鼠骨髓源性 EPCs acLDL-DiI 与 FITC-lectin 双染鉴定 (×400)

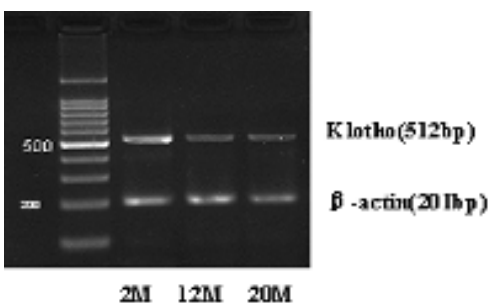


图 4 不同月龄小鼠肾脏 K1 mRNA 表达

3 讨 论

多种心血管危险因素包括高龄、高血压和冠心病, 可以导致动脉弹性功能减低和血管内皮功能障碍。在血管内皮损伤之后, EPCs 能归巢至损伤血管内皮局部, 加快损伤血管再内皮化, 抑制病理性新生内膜形成, 在血管内皮损伤修复中起着重要的作用。很明显, EPCs 的数量和生物学功能是参与血管内皮损伤的关键因素。而除吸烟、高血压、高血糖等危险因素之外, 月龄也是 AS 的发生发展的独立影响因素之一, AS 与月龄密切相关。

本实验发现, 在其他条件相同的情况下随月龄的增长, 骨髓 EPCs 数量减少并且黏附功能和增殖能力明显减退, 提示衰老与 EPCs 数量及功能下降相伴相随。虽然现代医学的发展日新月异, 但人类仍然对衰老的机制并不十分了解。K1 作为一种抗衰老基因引起了人们的广泛关注^[5]。Xiao 等^[6]检测了来源于人群 0~91 岁不同年龄段的 112 份血清标本, 发现随着年龄的增加, 分泌型 K1 蛋白表达下降, 推测 K1 基因可能是人类衰老的调节剂。本实验分别采用 Western-blot 法测定了 2、12、20M 月龄小鼠外周血 K1 蛋白的水平, 结果显示, 随着月龄的增加, 二者均呈现显著性下降, 与 Xiao 等^[6]的研究结果相符。

衰老使机体各方面机能必然下降, 这与其他机体功能的变化是一致的。但 K1 毕竟是一种特殊的基因, 它的缺失可直接导致小鼠出现类似于人类衰老综合征的异常表现, 说明 K1 失活或者突变部分上与衰老的发生至少有部分关系。那么, 目前还无法直接判断是衰老导致了正常小鼠 K1 水平的下降, 还是 K1 水平的下降部分参与了衰老或者是衰老相关疾病的发生。

通过相关性分析发现不同月龄小鼠外周血 K1 蛋白水平均与 EPCs 的数量、迁移、增殖、黏附功能以及端粒酶活性有强相关性 ($P<0.01$), 提示 K1 可能与 EPCs 的衰老有关。将浓度分别为 0.1、1、10 ng/mL K1 与体外培养的老鼠骨髓源性 EPCs 共孵育, 观察 EPCs 诱导分化、增殖、黏附能力的变化后发现。(1) K1 促进体外培养的老鼠骨髓源性 EPCs 的诱导分化, 可浓度依赖性增加粘贴在细胞培养板上的 EPCs 数量。表明 K1 与骨髓干细胞分化成为 EPCs 相关, 可能有利于体内 EPCs 的动员, 促进更多的干细胞分化为 EPCs, 提高 EPCs 的数量, 促进损伤血管的修复。由于老鼠本身的 EPCs 数量极少, K1 的这种促进分化、提高动员的作用显得更为重要。(2) K1 促进体外培养的老鼠骨髓源性 EPCs 的迁移能力, EPCs 的迁移能力与其归巢、修复损伤血管密切相关。本实验采用不同浓度的 K1 诱导体外培养的老鼠骨髓源性 EPCs, 发现低至 0.1ng/mL 的 K1 即可明显诱导小鼠骨髓源性 EPCs 迁移, 随着 K1 浓度增高, 其诱导小鼠骨髓源性 EPCs 迁移的作用增强。说明 K1 对小鼠骨髓源性 EPCs 同样有强大的趋化活性, 且这种趋化活性也呈浓度依赖性, 提示 K1 可能对老鼠骨髓源性 EPCs 归巢有促进作用。(3) K1 促进体外培养的老鼠骨髓源性 EPCs 的增殖能力, EPCs 的分裂增殖能力与其促新生血管生成能力及再内皮化损伤血管的能力关系密切。在多种危险因素存在的时候, 或者没有危险因素只是单纯月龄的增加足可下调 EPCs 的增殖能力。研究证明, 某些细胞因子如 VEGF、hEGF 和 IGF-1 等可促进 EPCs 分裂增殖^[7]; 此外, 某些药物如他汀类药物和血管紧张素转换酶抑制剂类药物 (ACEI)^[8] 等, 某些激素如雌激素也可促进 EPCs 分裂增殖^[9]。Lataillade 等^[10]的研究发现, 在缺乏细胞因子的条件下, SDF-1 可增加 S+G(2)/M 期 CD34⁺ 细胞百分比并维持

它们成活;与细胞因子协同,SDF-1 可增加外周血 CD34 和 CD34(high)CD38(low)细胞的扩增并增加它们的集落形成,提示 SDF-1 可促进骨髓干/祖细胞分裂增殖。但这些研究均未涉及衰老 EPCs。

本实验采用不同浓度的 K1 蛋白处理老龄小鼠骨髓源性 EPCs,发现 K1 可浓度依赖性增强老龄小鼠骨髓源性 EPCs 分裂增殖能力。表明 K1 可用于 EPCs 的体外扩增,并提示 K1 可能有促进老龄小鼠中新生血管生成和再内皮化损伤血管的作用。

本研究观察了月龄对小鼠外周血 K1 水平和 EPCs 的影响,并初步探讨了 K1 与 EPCs 数量和部分生物学功能之间的关系,为 K1 在干/祖细胞治疗领域中的应用提供了部分实验依据,这为保护内皮功能,预防和治疗 AS 提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Kuro OM, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing[J]. *Nature*, 1997, 390(1):45.
- [2] 陈剑飞,黄岚,晋军,等. 年龄对骨髓内皮祖细胞功能的影响及意义[J]. *四川医学*, 2006, 27(5):441.
- [3] Shimada T, Takeshita Y, Murohara T, Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging klotho mouse[J]. *Circulation*, 2004, 110(9):1148.
- [4] 崔斌,黄岚,耿召华,等. 人循环内皮祖细胞的分离培养和诱导分化[J]. *重庆医学*, 2006, 35(5):420.
- [5] Kuro M, Klotho and aging[J]. *Biochim Biophys Acta (BBA)*, 2009, 1790(10):1049.
- [6] Xiao NM, Zhang YM, Zheng Q, et al. Klotho is a serum factor related to human aging[J]. *Chin Med J*, 2004, 117(5):742.
- [7] Tang JM, Wang JN, Kong X, et al. Vascular endothelial growth factor promotes cardiac stem cell migration via the PI3K/Akt pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2009, 315(20):3521.
- [8] Dimitris Tousoulis, Ioannis Andreou, Charalambos Antoniadis, et al. Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: Therapeutic implications for cardiovascular diseases[J]. *Atherosclerosis*, 2008, 201(2):236.
- [9] Zhao XH, Huang L, Yin YG, et al. Estrogen induces endothelial progenitor cells proliferation and migration by estrogen receptors and PI3K-dependent pathways[J]. *Microvas Res*, 2008, 75(1):45.
- [10] Lataillade JJ, Clay D, Dupuy C. Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival [J]. *Blood*, 2000, 95(3):756.

(收稿日期:2009-06-05)

(上接第 3110 页)

房组织中,主要表达于心肌细胞的胞质。在风心病窦性心率组、阵发性房颤组、持续性房颤组中,两种细胞因子的表达逐渐增强,差异有显著性。羟脯氨酸含量测定法检测发现,3 组心房组织胶原含量逐渐增加,差异有显著性;并且两种细胞因子的表达量与胶原含量均呈正相关。本研究表明风心病患者心房组织中 bFGF 和 TGF- β_1 表达上调可能是胶原合成增加致心房纤维化发生的分子机制之一,在风心病房颤的发生和维持中可能起重要作用。

本研究以临床风心病患者右心房肌为研究对象,用免疫组织化学方法检测了 bFGF 和 TGF- β_1 在风心病右心房中的表达,发现二者在风心病房颤胶原代谢及房颤持续中有重要作用,为进一步阐明风心病胶原增生的发生和调控机制,为预防和逆转风心病心肌胶原增生为基础的房颤心房纤维化提供了理论依据及新的思路,但房颤心房纤维化发生的具体分子机制及信号传导调控网络需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on [J]. *Nature*, 2002, 415(3):219.
- [2] 肖骅,雷寒. 转化生长因子- β_1 在心房颤动患者心房纤维化中的作用研究进展[J]. *重庆医学*, 2007, 36(20):2105.
- [3] Xu J, Cui G, Esmailian F, et al. Atrial extracellular matrix remodeling and the maintenance of atrial fibrillation[J]. *Circulation*, 2004, 109(3):363.
- [4] 白秉学,徐东刚,范明,等. 碱性成纤维细胞生长因子的研究进展[J]. *国外医学遗传学分册*, 2004, 27(4):197.
- [5] Khan R, Sheppard R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia[J]. *Immunology*, 2006, 118(1):10.
- [6] Nattel S, Shiroshita-Takeshita A, Cardin S, et al. Mechanisms of atrial remodeling and clinical relevance[J]. *Curr Opin Cardiol*, 2005, 20(1):21.
- [7] 张愚,屈文东,黄华. bFGF 及 TGF- β_1 在实验性肝硬化中的免疫组化研究[J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2005, 14(1):40.
- [8] 邓世雄,谭明红. TGF- β_1 及 bFGF 在扩张型心肌病中的表达及其意义研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2003, 28(1):62.
- [9] Lim H, Zhu YZ. Role of transforming growth factor-beta in the progression of heart failure[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63(22):2584.
- [10] 任崇雷,刘维永,张近宝,等. 风湿性心脏病乳头肌中生长因子的表达及其意义[J]. *中华风湿病学杂志*, 2000, 4(5):274.

(收稿日期:2009-05-21 修回日期:2009-08-03)