

· 基础研究 ·

转染 Akt 基因对心肌细胞 I/R 损伤的机制探讨

张琳¹, 李东野^{1△}, 朱红², 徐通达², 陈丹¹

(江苏省徐州医学院:1. 心血管病研究所;2. 附属医院心内科 221002)

摘要:目的 探讨转染基因 Akt 对心肌细胞缺血/再灌注(I/R)损伤的机制。方法 采用新生 SD 大鼠进行心肌细胞培养,建立模拟心肌 I/R 模型;提取人 Akt 质粒,用阳离子脂质体介导的基因转染法将人 Akt 质粒转染心肌细胞。实验分 5 组:空白对照组(Control 组)、缺血/再灌注损伤对照组(I/R 组)、转染 Akt 基因组(Akt 组)、转染阳离子脂质体空载体组(Vehicle control 组)和 Akt 抑制剂组(Akt blockade 组);各组进行 I/R 后测定乳酸脱氢酶(LDH)活性、四唑盐比色法检测细胞活性、免疫印迹法(Western blot 法)检测细胞内 Akt、低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)蛋白表达。结果 Akt 组较 I/R 组、Vehicle control 组和 Akt blockade 组其 LDH 含量明显减少($P < 0.05$),细胞活性高($P < 0.05$),Akt 与 HIF-1 α 蛋白表达增加($P < 0.05$)。结论 转染 Akt 基因可减少缺血性心脏病心肌细胞 I/R 损伤,对缺血性心脏病具有保护作用。

关键词:蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶;心肌;心肌再灌注损伤

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.23.019

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)23-2338-03

Experimental study of protective effect of cationic liposome mediated transfecting human Akt gene into cardiac myocytes against ischemia/reperfusion in vitro

Zhang Lin¹, Li Dongye^{1△}, Zhu Hong², Xu Tongda², Chen Dan¹

(1. Institute of Angiocardiopathy, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China; 2. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect and mechanism of transfecting human Akt gene against ischemia/reperfusion (I/R) in cardiac myocytes in vitro. **Methods** Cardiac myocytes from new born Sprague-Dawley rats were isolated and cultured in vitro and were randomly divided into five groups: control group, ischemia/reperfusion(I/R) group, Akt group, vehicle control group and Akt blockade group. The levels of lactate dehydrogenase(LDH) and the cell activity in the medium were tested. The expression levels of Akt, HIF-1 α protein were measured by Western blot. **Results** In comparison with I/R group, Vehicle control group and Akt blockade group, the levels of LDH in Akt group were significantly decreased ($P < 0.05$), together with higher cell activity ($P < 0.05$) with the highest protein expression levels of Akt and HIF-1 α were found by western blot ($P < 0.05$). **Conclusion** Transfecting plasmid Akt gene reduces injury in cultured cardiomyocytes against I/R and shows protection effects on ischemic heart disease.

Key words: protein-serine-threonine; myocardium; myocardial reperfusion injury

缺血性心脏病(ischemic heart disease, IHD)在世界范围内广泛存在,全球约有数亿缺血性心脏病患者,在我国其发病率有逐年上升的趋势。缺血性心脏病最常见的病理表现是心肌缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤,并被认为是心肌保护问题的关键。目前主要治疗措施以改善冠状动脉血供、减轻心肌缺氧、治疗冠状动脉硬化为主,主要治疗方式包括药物治疗、冠状动脉搭桥手术治疗以及心导管介入治疗^[1],但其在改善心肌血供的同时仍可能伴随再灌注损伤、心室重构和长期心肌缺血后的“无复流”等问题,所以从基因学角度探索治疗 IHD 的新方法有潜在的价值^[2-4]。蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶(serine/threonine kinase, Akt)基因是磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)信号转导途径中一个重要的下游靶激酶,具有丝-苏氨酸激酶活性,但它在 IHD 时的作用尚不明确^[5]。本研究拟通过转染阳离子脂质体介导的人 Akt 基因到新生大鼠心肌细胞,模拟 I/R 损伤,进而探讨其对 IHD 心肌细胞缺血/再灌注损伤的影响。

1 材料与与方法

1.1 材料 Akt 质粒为郑骏年博士惠赠。DMEM 培养基干粉为美国 Gibco 公司产品。阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 为美国 Invitrogen 公司产品。小牛血清购自杭州四季青生物

工程研究所。5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromodeoxyuridine, BrdU)购自 Sigma 公司。低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)兔多克隆 IgG 抗体购自 Santa Cruz 公司。心肌肌钙蛋白 I(cardiac troponin I, cTnI)抗体购自 Upstate 公司。异硫氰酸荧光素标记羊抗兔二抗购自武汉博士德生物公司。兔抗山羊二抗购自北京中杉金桥生物公司。Akt 抑制剂 LY294002 购自上海康成生物公司。新生 SD 大鼠由徐州医学院实验动物中心提供。

1.2 心肌细胞培养 无菌操作取出新生 SD 大鼠心脏, D-Hank's 液洗去残血,分离出附着组织,剪成约 1 mm × 1 mm × 1 mm 心肌碎块,反复漂洗,加入 0.125% 胰蛋白酶和 0.08% I 型胶原酶溶液分次消化成心肌细胞悬液,用含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养液悬浮分散细胞,接种到 50 mL 培养瓶中, CO₂ 孵箱(5% CO₂, 37 °C)培养 90 min 后将培养液转移(差速贴壁)至明胶处理过的培养孔板中,加 BrdU 浓度至 0.1 mol/L,放入培养箱中 37 °C、5% CO₂ 常规培养,48 h 后第 1 次更换培养液。细胞贴壁后以 cTnI 免疫荧光鉴定计算心肌细胞比例。

1.3 模拟心肌 I/R 损伤 心肌细胞生长至铺满培养板 80% 时,以缺氧、无糖、缺钙的 D-Hank's 液模拟缺血,预先用高纯

氮气饱和 D-Hank's 液。用以氮气饱和的模拟缺血溶液置换正常培养液,放入缺氧培养箱中 4 h 即为缺血,再以含 20% 血清的正常培养液置换缺血溶液,开放培养于正常培养箱中 12 h 即为再灌注。

1.4 基因转染(Lipofectamine 法) 参照 Lipofectamine 试剂盒说明进行。方法如下:以 2×10^5 个/孔接种心肌细胞于 24 孔板,待细胞状态稳定后更换无血清、无抗生素 DMEM 培养液。当转染达 3 倍时加阳离子脂质体-Akt-无血清、无抗生素 DMEM 混合溶液,其中每孔含 $0.8 \mu\text{g}$ 质粒 DNA、 $2.4 \mu\text{L}$ 阳离子脂质体,6 h 后换含 10% 血清的培养基继续培养 42 h 进入下一步实验。

1.5 实验分组 实验分 5 组,(1)空白对照组(Control 组):不转基因,常氧培养 64 h;(2)模拟 I/R 损伤对照组(I/R 组):不转基因,常氧培养 48 h 后模拟 I/R 损伤,即缺氧 4 h 复氧 12 h;(3)转染 Akt 基因组(Akt 组):以阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 为载体转染 Akt 基因,常氧培养 48 h 后模拟 I/R 损伤,即缺氧 4 h 复氧 12 h;(4)转染阳离子脂质体空载体组(Vehicle control 组):不转基因,转染阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 空载体,常氧培养 48 h 后模拟 I/R 损伤,即缺氧 4 h 复氧 12 h;(5)Akt 抑制剂组(Akt blockade 组):以阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 为载体转染 Akt 基因同时加入 Akt 抑制剂,常氧培养 48 h 后模拟 I/R 损伤,即缺氧 4 h 复氧 12 h,每组重复 6 次。

1.6 细胞损伤指标的观察 (1)乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)活性:收集培养板上清液(即培养液)约 $200 \mu\text{L}$,按试剂盒说明进行操作,752 紫外分光光度仪检测吸光度值。(2)四唑盐比色法检测细胞活性:按试剂盒说明进行操作。在酶标仪上测 490 nm 处各孔吸光度值(optical density,OD 值)。以正常对照组 OD 值均数为对比计算细胞存活率:细胞存活率=各孔 OD 值/正常组 OD 值均数 $\times 100\%$ 。

1.7 Western blot 法检测 Akt、HIF-1 α 蛋白含量 心肌细胞弃培养液,加入预冷的细胞裂解液,用细胞刮刀将细胞收集行超声破碎。Lowry 法测定蛋白质浓度。分别取组织总蛋白 $60 \mu\text{g}$ 行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。以半干(湿)电转移法转膜 1 h,将蛋白转至硝酸纤维素膜上, 4°C 牛血清蛋白封闭硝酸纤维素膜过夜,先后与一抗、二抗、碱性磷酸酶标记链霉抗生物素蛋白孵育,反复洗膜,四唑氮蓝/5-溴-4-氯-3-吡啶-磷酸显色。

1.8 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件对数据进行分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组之间差异的比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 培养心肌细胞形态学 心肌组织消化后所有细胞均为圆形,培养 12 h 后可以见到梭形细胞,细胞逐渐增大;24 h 可以见到多角形细胞,并开始见到细胞搏动;48 h 细胞形态为多角形或梭形,有聚集生长趋势(图 1)。95% 以上细胞自律搏动,频率 50~130 次/min;大部分细胞相互连接,呈现同步搏动。心肌肌钙蛋白 I 免疫荧光检测心肌细胞为梭形或多角形,纯度为 95%,台盼蓝染色示活细胞数大于 96%(图 2)。

2.2 LDH 活性 C 组 LDH 含量(98.64 ± 3.34)U/L 较 B 组(207.21 ± 10.69)U/L、D 组(209.73 ± 9.04)U/L 和 E 组(235.50 ± 8.93)U/L 明显降低, $P < 0.05$ 。

2.3 MTS 比色法检测细胞活性 C 组细胞活性[(57.77 ± 3.74)%]
明显高于 B 组[(41.70 ± 3.01)%]
、D 组[($40.64 \pm$

2.91]%)
和 E 组[(39.54 ± 2.25)%]
,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

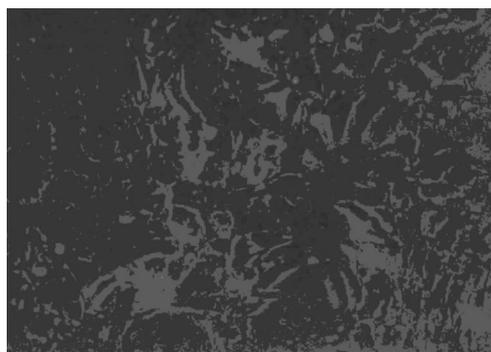


图 1 常氧状态培养心肌细胞($\times 200$)

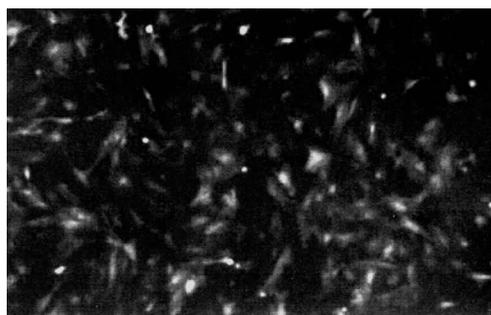
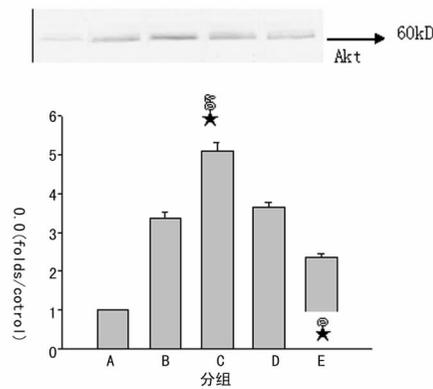
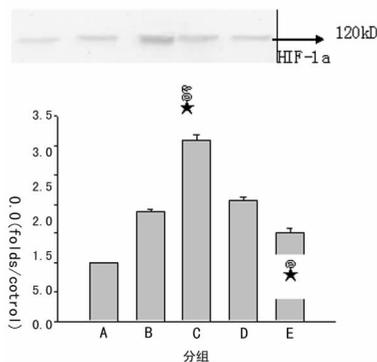


图 2 心肌肌钙蛋白 I(cTnI)鉴定心肌细胞纯度(倒置荧光显微镜 $\times 200$)



*: $P < 0.05$, 与 B 组比较; @: $P < 0.05$, 与 D 组比较; &: $P < 0.05$, 与 E 组比较。

图 3 Western blot 法检测各组 Akt 蛋白表达



*: $P < 0.05$, 与 B 组比较; @: $P < 0.05$, 与 D 组比较; &: $P < 0.05$, 与 E 组比较。

图 4 Western blot 法检测各组 HIF-1 α 蛋白表达

2.4 Western blot 法检测 Akt、HIF-1 α 蛋白表达情况 各组均可见相对分子质量为 60×10^3 的条带,说明 Akt 蛋白在以上 5 组均有表达,C 组较 A、B、D、E 组蛋白表达增加,组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。B、D 组蛋白表达差异无统计学意义,组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$) (图 3)。

各组均可见相对分子质量为 120×10^3 的条带,说明 HIF-1 α 蛋白在以上 5 组均有表达,C 组较 A、B、D、E 组蛋白表达增加,组间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。B、D 组蛋白表达差异无统计学意义,组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$) (图 4)。

3 讨 论

IHD 是由于冠状动脉循环改变引起冠状动脉血流和心肌需求之间不平衡而导致的心肌损害,其最常见的病理表现是心肌 I/R 损伤。1987 年,Staal 和 Hartley^[6] 发现小鼠的白血病病毒 Akt8 可以引起水貂肺上皮细胞系 CCL-64 出现恶性转化灶,随后在这个逆转录病毒中找到了一个癌基因,命名为 Akt。1991 年,3 个独立的研究小组分别宣布找到了 Akt 基因,相对分子质量约为 60×10^3 ,Akt 分子约由 480 个氨基酸残基组成,是 PI3K 信号转导途径中一个重要的下游靶激酶,具有丝-苏氨酸激酶活性,与蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 和蛋白激酶 C (PKC) 在结构上很相似,故又被命名为蛋白激酶 B (PKB) 或 A/C 相关的激酶 (RAC)^[7]。目前发现在哺乳动物中 Akt 存在 3 种亚型:PKB α /Akt1、PKB β /Akt2 和 PKB γ /Akt3^[8],分别定位于 14q32、19q13 和 1q44。这 3 种亚型在氨基酸序列上大约有 80% 的同源性,属于 cAMP 依赖的 AGC (蛋白激酶 A/蛋白激酶 G/蛋白激酶 C) 蛋白激酶超家族。Akt1 在几乎所有组织中均表达,但它在脑、心、肺中高表达,Akt2 在肌肉和棕色脂肪组织中高表达,Akt3 在脑组织中高表达。激活的 Akt 可以通过不同的底物对细胞的生长、增殖、分化及代谢进行调控。1995 年,Akt 作为 PI3K 经多种生长因子活化后的下游靶点的发现^[9],以及糖原合成酶激酶-3 (glycogen synthase kinase-3, GSK3) 作为第一个 Akt 底物的发现^[10],分别揭示了 Akt 在生长因子介导的细胞存活和胰岛素信号通路中的重要作用。激活的 Akt 可以通过不同的底物对细胞的生长、增殖、分化及代谢进行调控^[11-12]。但是,Akt 基因能否保护心肌细胞抗 I/R 损伤及其机制尚不十分清楚。

HIF-1 α 是机体维持氧自稳平衡的核心调控因子^[13]。在缺血性心脏疾病的病理生理机制中,缺氧是一个关键成分。缺氧引发广泛的细胞应答,包括蛋白的加工修饰及基因表达改变^[14-16]。HIF-1 α 作为一种转录因子,低氧时在组织细胞中广泛表达,调节多种下位靶基因的转录:诱导糖酵解基因的表达,促进无氧代谢;诱导血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达,促进血管生成;诱导一氧化氮合酶、血红素氧化酶的表达,发挥扩张血管的作用;激活促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 基因的表达,使红细胞生成增加,提高携氧能力,从而使低氧的组织细胞保持氧含量稳定并处于耐低氧状态。PI3K/Akt 信号转导通路可调节 HIF-1 α 蛋白的表达和转录活性^[17]。有研究显示 PI3K/Akt 的激活对缺氧时 HIF-1 α 的表达和活化起重要作用。缺氧 (8% O₂) 培养的肝细胞经胰岛素处理,可通过 PI3K/Akt 途径使 HIF-1 α 蛋白表达增加大约 6 倍^[18]。化学缺氧 (用去铁胺模拟缺氧) 不仅通过 PI3K/Akt 途径诱导 HeLa 细胞表达 HIF-1 α 蛋白,还可进一步促进 VEGF 的基因转录。现已证实 PKB/Akt 对于血管的形

成有重要作用,例如:PKB/Akt 在促血管生成素 1 和血管内皮生长因子刺激下激活,阻止内皮细胞凋亡,PKB/Akt 磷酸化后激活内皮型一氧化氮合酶,导致新生血管形成,促进 VEGF 诱导的内皮细胞迁移^[19]。低氧的一个重要调节因子为 HIF-1 α ,该因子除被低氧诱导外,胰岛素、生长因子也可诱导。HIF-1 α 诱导血管形成基因的转录,如 VEGF 和易化葡萄糖转运载体^[20-22]。

本研究通过阳离子脂质体介导可以稳定地把 Akt 基因转入心肌细胞,使 LDH 含量降低,损伤的心肌细胞活力提高,Akt 与 HIF-1 α 蛋白表达增加,而脂质体空载体组及 Akt 抑制剂组均无保护作用,表明了心肌细胞通过转染 Akt 基因,提高了心肌细胞抗缺血、损伤能力,考虑 Akt 通过诱导促进 HIF-1 α 下游保护性基因的表达抗心肌细胞模拟 I/R 损伤,具体机制还有待进一步研究。

总之,应用 Akt 基因治疗缺血性心脏病,或将是一种有效的治疗手段,尤其是对于那些冠状动脉弥漫性狭窄、复发性难治性心绞痛、耐受能力差、合并多种危险因素等不适合用传统治疗方法重建血液循环的冠心病患者,这是现在和将来的一个重要的研究方向。

参考文献:

- [1] 张晔,王旭开,杨成明,等. 重组人生长激素影响急性心肌梗死大鼠心功能的实验研究[J]. 重庆医学,2008,37(6): 590-594.
- [2] Vincent KA, Jiang C, Boltje I, et al. Gene therapy progress and prospects: therapeutic angiogenesis for ischemic cardiovascular disease [J]. Gene Ther, 2007, 14(10): 781-789.
- [3] Traktuev DO, Tsokolaeva ZI, Shevelev AA, et al. Urokinase gene transfer augments angiogenesis in ischemic skeletal and myocardial muscle [J]. Mol Ther, 2007, 15(11): 1939-1946.
- [4] Asai J, Takenaka H, Kusano KF, et al. Topical sonic hedgehog gene therapy accelerates wound healing in diabetes by enhancing endothelial progenitor cell mediated microvascular remodeling [J]. Circulation, 2006, 113(20): 2413-2424.
- [5] Samuel SM, Thirunavukkarasu M, Penumathsa SV, et al. Akt/FOXO3a/SIRT1 mediated cardioprotection by N-tyrosol against ischemic stress in rat in vivo model of myocardial infarction: switching gears toward survival and longevity [J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(20): 9692-9698.
- [6] Staal SP, Hartley JW. Thymic lymphoma induction by the AKT8 murine retrovirus [J]. J Exp Med, 1988, 167(3): 1259-1264.
- [7] Jones PF, Jakubowicz T, Pitossi FJ, et al. Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second messenger subfamily [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(10): 4171-4175.
- [8] Hanada M, Feng J, Hemmings BA. Structure, regulation and function of PKB/AKT- α major therapeutic target [J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1697(1/2): 3-16.
- [9] Franke TF, Yang SI, Chan TO, et al. The (下转第 2348 页)

头孢菌素类药物作为一种半抗原,与体内蛋白质结合形成抗原,引起 I 型变态反应,导致过敏性休克^[9],且该类药物间存在交叉过敏反应,近年对头孢他啶引起过敏性休克报道不断^[10-11],因此在使用该类药物时,要仔细询问患者的用药史和过敏史,以避免和减少此类 ADR 事件发生。另 1 例系氯波比利致椎体外系症状。患者因胃炎,口服氯波比利,0.68 mg/次,3 次/天,服药 3 d 后,患者出现吞咽困难、张口、斜视、颈项强直、头部自主摆动等症状,经询问病史,患者既往无癫痫、抽搐及外伤史,考虑为氯波比利所致的椎体外系症状,经停药住院治疗 3 d 后,痊愈出院。氯波比利为高选择性的多巴胺受体拮抗剂,偶见椎体外系反应^[12],目前仅有 3 例出现椎体外系 ADR 的报道^[13-14]。

ADR 的发生受多种因素影响,要求医生、护士、药师 3 方应掌握药品的正确用法用量,注射剂应选择适宜溶媒及药物浓度,使用时应规范药品配制和输液操作。医生、护士、药师多学科通力合作的 ADR 监测队伍,确定各级、各科室 ADR 监测责任人是搞好 ADR 监测工作的组织保证。完善的 ADR 监测体系,能够及时发现及报送 ADR,减少和避免 ADR 的发生,促进临床安全、有效、经济、合理用药。

参考文献:

- [1] 金丹,杨乐,杨月明,等. 2006 年全国老年人严重药品不良反应报告分析[J]. 中国药物警戒,2010,7(2):112-115.
- [2] 刘航,吕劲,龙盛泽,等. 头孢噻利治疗社区获得性肺炎临床研究[J]. 重庆医学,2009,38(9):2333.
- [3] 肖律,钟强,谢娇. 385 例药物不良反应报告分析[J]. 中国

现代应用药学,2010,27(2):181-184.

- [4] 张振霞,吴萍,李玉珍,等. 121 例药品不良反应报告分析[J]. 中国药事,2008,22(4):350-352.
- [5] 阎爱荣,彭芳辰. 10 种中药注射液的不良反映及相关因素分析[J]. 中国医院药学杂志,2008,28(9):765-766.
- [6] 李双. 我院 177 例药品不良反应报告分析[J]. 中国新药杂志,2010,19(8):725-728.
- [7] 孙定人,齐平,靳颖华. 药物不良反应[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2003:125-126.
- [8] 张峻,傅文,王继堃. 医疗机构在药物警戒中的地位与作用[J]. 中国药房,2009,20(2):81-83.
- [9] 顾继红,高杏. 注射用头孢他啶引起过敏性休克 1 例[J]. 抗感染药学,2006,3(1):35.
- [10] 陈东欣. 头孢他啶致过敏性休克 1 例[J]. 中国药物警戒,2010,7(6):381.
- [11] 李运景. 头孢他啶致过敏性休克 1 例[J]. 抗感染药学,2007,4(4):174.
- [12] 孙定人,齐平,靳颖华. 药物不良反应[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2003:598.
- [13] 韦又嘉. 氯波比利片致椎体外系反应 2 例[J]. 中国药物警戒,2010,7(4):251.
- [14] 陆国忠,刘银生. 氯波比利锥体外系不良反应 1 例[J]. 药物流行病学杂志,2003,12(5):275.

(收稿日期:2011-01-10 修回日期:2011-03-18)

(上接第 2340 页)

protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase [J]. Cell,1995,81(5):727-736.

- [10] Cross DA, Alessi DR, Cohen P, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B [J]. Nature,1995,378(6559):785-789.
- [11] Dunn EF, Fearn R, Connor JH. Akt Inhibitor Akt-IV blocks virus replication through an Akt-independent mechanism [J]. J Virol,2009,83(22):11665-11672.
- [12] Maddika S, Ande SR, Wiehac E, et al. Akt-mediated phosphorylation of CDK2 regulates its dual role in cell cycle progression and apoptosis [J]. J Cell Sci,2008,121(Pt 7):979-988.
- [13] Hedborg F, Fischer-Colbrie R, Ostlin N, et al. Differentiation in neuroblastoma; diffusion-limited hypoxia induces neuro-endocrine secretory protein 55 and other markers of a chromaffin phenotype [J]. PLoS One, 2010, 5(9): e12825.
- [14] Dai Y, Xu M, Wang Y, et al. HIF 1 alpha induced VEGF overexpression in bone marrow stem cells protects cardiomyocytes against ischemia [J]. J Mol Cell Cardiol,2007,42(6):1036-1044.
- [15] Muinck ED, Nagy N, Tirziu D, et al. Protection against myocardia-ischemia reperfusion injury by the angiogenic Masterswitch protein PR 39 gene therapy: the roles of

HIF1alpha stabilization and FGFR1 signaling [J]. Antioxid Redox Signal,2007,9(4):437-445.

- [16] Tong K, Xie YJ, Wang YG, et al. Construction and identification of adenovirus vector for double mutant human hypoxia inducible factor-1 alpha gene [J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao,2007,27(4):445-447.
- [17] De Gasperi R, Sosa MA, Dracheva S, et al. Presenilin-1 regulates induction of hypoxia inducible factor-1 α ; altered activation by a mutation associated with familial Alzheimer's disease [J]. Mol Neurodegener,2010,5:38.
- [18] Kietzmann T, Samoylenko A, Roth U, et al. Hypoxia-inducible factor-1 and hypoxia response elements mediate the induction of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by insulin in primary rat hepatocytes [J]. Blood,2003,101(3):907-914.
- [19] Giovanni T, Silvia S, Annamaria C. Hepatic steatosis, low-grade chronic inflammation and hormone/growth factor/adipokine imbalance [J]. World J Gastroenterol,2010,16(38):4773-4783.
- [20] Zhu XY, Zhang XZ, Xu L, et al. Transplantation of adipose derived stem cells overexpressing hHGF into cardiac tissue [J]. Biochem Biophys Res Commun,2009,379(4):1084-1090.

(收稿日期:2011-01-09 修回日期:2011-03-22)