

· 基础研究 ·

三种肝保存液低温保存生物人工肝用 C3A 细胞的效果比较*

林 虎¹, 李庆勇¹, 蒋知新¹, 张鋈歆¹, 彭 凌¹, 杜 平¹, 张清华^{1△}, 高 毅²

(1. 解放军第三〇五医院老年病中心, 北京 100017; 2. 南方医科大学珠江医院肝胆二科, 广州 510262)

摘要:目的 比较 UW 液、Celsior 液和 HTK 液 4 °C 常规低温保存生物人工肝用 C3A 细胞的效果。方法 制备好的 C3A 细胞悬液分以下 3 组: UW 液保存组(UW 液组); Celsior 液保存组(CS 液组); HTK 液保存组(HTK 液组)。各组细胞于 4 °C 低温保存 72 h 后, 分别测定细胞存活率及死亡率(流式细胞术), 丙氨酸氨基转移酶(ALT)及乳酸释放, 尿素合成功能及清蛋白分泌功能。结果 UW 液及 Celsior 液比 HTK 液显著提高了 4 °C 低温保存 72 h 的 C3A 细胞的存活率(78.56%±4.67% vs 76.03%±3.53%, 60.54%±3.18%, $P<0.05$); 抑制了 C3A 细胞低温保存时 ALT 释放及乳酸的释放($P<0.05$); 更好地维持 C3A 细胞尿素合成功能[(0.52±0.11)mmol/L vs (0.51±0.06)mmol/L, (0.32±0.05)mmol/L, $P<0.05$]和清蛋白分泌功能[(1.79±0.26)g/L vs (1.75±0.21)g/L, (1.20±0.17)g/L, $P<0.05$]。UW 液同 Celsior 液 4 °C 低温保存 C3A 细胞的效果无差异。结论 同 HTK 液相比, 使用 UW 液或者 Celsior 液 4 °C 保存 C3A 细胞可以明显的提高复温后细胞存活率, 降低低温损伤引起的 ALT 释放和乳酸释放, 有效的保护肝细胞尿素合成功能和清蛋白分泌功能。

关键词: 肝, 人工; UW 液; Celsior 液; HTK 液

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.28.016

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)28-2848-03

The effect comparison of hypothermic UW, Celsior and HTK solution for the storage of C3A hepatocytes*

Lin Hu¹, Li Qingyong¹, Jiang Zhixin¹, Zhang Junxin¹, Peng Ling¹, Du Ping¹, Zhang Qinghua^{1△}, Gao Yi²

(1. Department of Gerontology, the No. 305 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100017, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery (Division II), Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510262, China)

Abstract: Objective To compare the effect of University of Wisconsin solution(UW), Celsior solution(CS) and Histidine-tryptophan-ketoglutarate solution(HTK) for the storage of C3A hepatocytes at 4 °C. **Methods** C3A hepatocytes were divided into the following three groups: UW group, CS group, and HTK group. After 72 h of hypothermic storage, the cell viability and death rate (Flow Cytometry), the alanine aminotransferase(ALT) release and lactic acid production, and the ability of hepatocytes to synthesize urea and secrete albumin were respectively measured. **Results** Compared with that in HTK group, the cell viability(78.56%±4.67% vs 76.03%±3.53%, 60.54%±3.18%, $P<0.05$) of C3A hepatocytes which were stored for 72 h were significantly improved in UW and CS groups. The ALT release and the lactic acid production($P<0.05$) were significantly suppressed in UW and CS groups. The ability of hepatocytes to synthesize urea[(0.52±0.11)mmol/L vs (0.51±0.06)mmol/L, (0.32±0.05)mmol/L, $P<0.05$] and secrete albumin[(1.79±0.26)g/L vs (1.75±0.21)g/L, (1.20±0.17)g/L, $P<0.05$] were better maintained in UW and CS groups. There was no difference between UW and CS group for the effect of storage of C3A hepatocytes. **Conclusion** Compared with HTK solution, the hypothermic storage(4 °C) of C3A hepatocytes in UW or CS solution could obviously improve the cell viability rate, decrease the ALT release and the lactic acid production, and to protect the ability of hepatocytes to synthesize urea and secrete albumin.

Key words: liver, artificial; university of wisconsin solution; celsior solution; histidine-tryptophan-ketoglutarate solution

大量功能好的肝细胞是生物人工肝支持系统(bioartificial liver support system, BALSS)的核心^[1], 所以探索出一种可靠的肝细胞低温保存方法, 建立一个肝细胞库是 BALSS 推广的基础^[2]。UW 液(University of wisconsin solution)、CS 液(Celsior solution)和 HTK 液(Histidine-tryptophan-ketoglutarate solution)是目前较常用的供肝保存液, 但供肝的保存混杂有缺血再灌注损伤的影响, 不能完全反应对肝细胞的保存效果^[3]。C3A 细胞是一种人源性高分化肝肿瘤细胞, 具备氨基清除和清蛋白分泌等功能, 以 C3A 细胞为生物材料的体外肝辅助装置(extracorporeal liver-assist device, ELAD)系统已经进入了 III 期临床试验^[4]。但 C3A 细胞分别于 UW 液、CS 液、HTK 液低温保存后细胞存活率及功能有无差异, 是否满足 BLASS 的需要未见相关文献报道。因此, 本研究分别采用 UW 液、CS 液和 HTK 液于 4 °C 常规低温保存生物人工肝用 C3A 细胞 72

h, 以比较其保存效果。

1 材料与方法

1.1 材料 C3A 细胞(ATCC, 美国); DMEM/F-12 培养基、优级胎牛血清(FBS)、青霉素/链霉素溶液(×100)、0.25% 胰酶及 PBS 缓冲液(Invitrogen, 美国); UW 液(Bristol-myers quibb); 50 mL 培养瓶、6 孔培养板(Costar Corning); 氯化铵(Sigma); 人清蛋白 ELISA 试剂盒(R&D, 美国), Mode1450 型酶标仪(Bio-Rad, 美国); CK2 型倒置显微镜(Olympus, 日本); Live/Dead 试剂盒(Invitrogen, 美国); 乳酸测定试剂盒(Boehringer Mannheim), Du530 型分光光度仪(Beckman, 德国); DXC800 型全自动生化仪及 FACScan 型流式细胞仪(Beckman coulter, 美国); MIR-151 型微电脑程控低温培养箱-10.1~60.1 °C 及 MCO-175 型二氧化碳培养箱(SANYO, 日本); 海尔智能温度记录仪-100.1~120.1 °C。超净工作台(北京昌平

长城空气净化工程公司)。

1.2 分组 C3A 细胞悬液分 3 组 ($n=8$): UW 液保存组 (UW 液组)、Celsior 液保存组 (CS 液组)、HTK 液保存组 (HTK 液组)。

1.3 细胞培养 取 C3A 细胞约 1×10^6 个, 接种到 50 mL 培养瓶, 所用培养基为 DMEM/F-12 加 10% FBS 及 1% 青霉素/链霉素溶液; 将培养瓶置于 37°C 、5% CO_2 、100% 湿度的培养箱内培养; 每 24 h 换液 1 次, 倒置显微镜观察直至内壁长满。

1.4 低温保存及复温 倾去培养瓶内的培养基, PBS 液洗涤 3 次后分别置换为 5 mL UW 液、CS 液和 HTK 液, 于 4°C 保存 72 h 后, 将保存液液置换为培养基 5 mL, 培养 30 min。

1.5 复温后指标测定 取一瓶细胞, 吸出培养基, 0.25% 胰酶消化, 制备成浓度约 1×10^6 /mL 细胞悬液。(1) 取细胞悬液 1 mL, 加到 1 mL 含 4 mmol/L 氯化铵培养液的 6 孔培养板中, 培养箱内培养 24 h 后, 取上清, 1 000 r/min 离心 20 min, 测定尿素的浓度、丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 浓度、人清蛋白含量 (按人清蛋白 ELISA 试剂盒说明)。(2) 取细胞悬液 1 mL, 按照三磷酸腺苷 (ATP) 试剂盒的说明, 于全自动酶标仪测定细胞内 ATP 含量。(3) 剩余的细胞悬液于 1 000 r/min 离心 2 min, 沉淀细胞按 Live/Dead 试剂盒说明, 于流式细胞仪测定细胞存活率、死亡率。

1.6 统计学处理 所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS13.0 软件分析, 不同组样本均数比较采用 one-way ANOVA, 多重比较采用 LSD 检验 (方差不齐时采用 Dunnett's T3 检验), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同组低温保存 72 h 后细胞存活率、死亡率 新鲜细胞的存活率是 $(94.96 \pm 2.16)\%$, 死亡率是 $(5.04 \pm 2.16)\%$ 。低温保存 72 h 后, 细胞存活率较新鲜细胞降低, UW 液组细胞存活率显著高于 HTK 液组 ($P < 0.001$), 同 CS 组无差异; 细胞死亡率较新鲜细胞增加, UW 液组细胞死亡率显著低于 HTK 液组 ($P < 0.001$), 但同 CS 液组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1、图 1~4。

表 1 不同组低温保存 72 h 后细胞存活率和死亡率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	细胞存活率	细胞死亡率
UW 液组	78.56 ± 4.67	21.44 ± 4.67
CS 液组	76.03 ± 3.53	23.97 ± 3.53
HTK 液组	$60.54 \pm 3.18^* \#$	$39.46 \pm 3.18^* \#$

*: $P < 0.05$, 与同时时间点 UW 液组比较; #: $P < 0.05$, 与同时时间点 CS 液组比较。

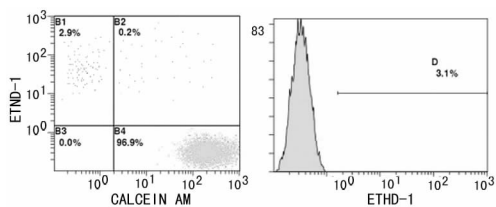


图 1 新鲜细胞流式图

低温保存 72 h 后流式细胞仪测定细胞存活率和死亡率。Calcein AM/Ethidium homodimer-1 双染, Calcein AM 可将存活细胞染成绿色, Ethidium homodimer-1 可与死亡细胞核结合, 呈红色。流式细胞仪分析, 获得 4 个象限的直方图和峰状图。直方图 B4: Calcein AM+ 表示正常细胞; B1: Ethidium ho-

modimer-1+ 表示死亡细胞; B2 与 B3: (An-PI+) 表示操作过程中损伤的细胞。峰状图: Ethidium homodimer-1 阴性和阳性百分比 (细胞存活率和死亡率)。

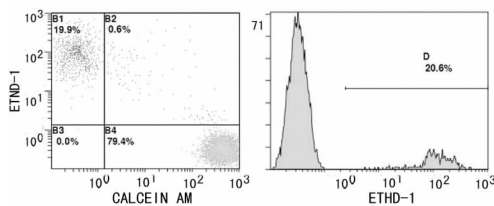


图 2 UW 液组流式图

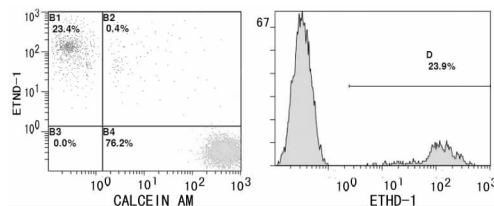


图 3 CS 液组流式图

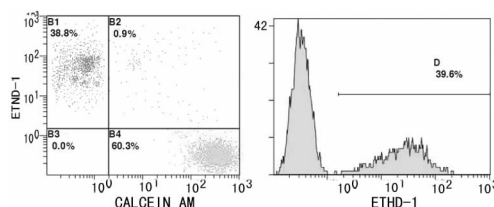


图 4 HTK 液组流式图

2.2 不同组低温保存 72 h 后细胞 ALT 与乳酸释放 新鲜细胞释放的 ALT 是 (3.45 ± 0.66) U/L, 乳酸释放是 (2.55 ± 1.04) $\mu\text{g}/10^6$ cells。低温保存 72 h 后, 细胞 ALT 释放及乳酸释放较新鲜细胞增加, 但 UW 液组、CS 液组乳酸脱氢酶 (LDH) 释放及乳酸释放均显著低于 HTK 液组 ($P < 0.01$), UW 液组同 CS 液组 ALT 释放 ($P = 0.459$) 及乳酸释放 ($P = 0.935$) 无差异。见表 2。

表 2 不同组低温保存 72 h 后细胞 ALT 与乳酸释放 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ALT 释放 (U/L)	乳酸释放 ($\mu\text{g}/10^6$ cells)
UW 液组	5.73 ± 1.09	10.48 ± 1.13
CS 液组	6.08 ± 0.78	10.39 ± 1.85
HTK 液组	$8.25 \pm 1.12^* \#$	$17.89 \pm 3.54^* \#$

*: $P < 0.05$, 与同时时间点 UW 液组比较; #: $P < 0.05$, 与同时时间点 CS 液组比较。

表 3 不同组低温保存 72 h 后细胞尿素合成与清蛋白分泌 ($\bar{x} \pm s$)

分组	尿素合成 (mmol/L)	清蛋白分泌 (g/L)
UW 液组	0.52 ± 0.11	1.79 ± 0.26
CS 液组	0.51 ± 0.06	1.75 ± 0.21
HTK 液组	$0.32 \pm 0.05^* \#$	$1.20 \pm 0.17^* \#$

*: $P < 0.05$, 与同时时间点 UW 液组比较; #: $P < 0.05$, 与同时时间点 CS 液组比较。

2.3 不同组低温保存 72 h 后细胞尿素合成功能及清蛋白分泌功能 新鲜细胞尿素合成是 (0.99 ± 0.20) mmol/L, 清蛋白分泌是 (2.23 ± 0.33) g/L。低温保存 72 h 后, 细胞尿素合成功能

能下降,但 UW 液组尿素合成功能优于 HTK 液组($P=0.002$),同 CS 液组无差别($P=0.917$);细胞清蛋白分泌功能下降,但 UW 液组清蛋白分泌优于 HTK 液组($P<0.01$),同 CS 液组无差异($P=0.724$)。见表 3。

3 讨论

BALSS 要代替肝脏,除细胞材料必须具有肝脏特异性功能外,还需要大量肝细胞,即约 10^9 个数量级才有临床意义。为了满足临床对肝细胞数量的需求,传统上采取传代培养或者微载体高密度培养的方法,但其工作量大、易污染、费用高且肝细胞经多次传代后活性下降。所以探索一种可靠的肝细胞低温保存方法,建立一个肝细胞库以克服肝细胞多次传代培养的缺点,是短期内获得大量肝细胞的较好方法^[5]。本文分别采用 UW 液、CS 液和 HTK 液 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 常规低温保存生物人工肝用 C3A 细胞 72 h,使用流式细胞仪分析发现 UW 液组细胞存活率显著高于 HTK 液组,细胞死亡率则相反;同时发现 UW 液组的反应细胞损伤程度的 ALT 释放及反应低温代谢水平的乳酸释放显著低于 HTK 液组;UW 液组的肝细胞尿素合成功能和清蛋白分泌功能优于 HTK 液组,但同 CS 液组相比无差别,具体可能的原因分析如下。

3.1 从渗透压成分分析 UW 液中添加了羟乙基淀粉、密三糖和乳糖醛酸等非渗透性保护剂,而 CS 液和 HTK 液以甘露醇为非渗透性保护剂,另外 Celsior 液含有乳糖醛酸。羟乙基淀粉、低分子右旋糖酐和甘露醇等是比较常用的非渗透性保护剂,具体保护机制目前仍然不明确,可能是与冻存过程中减少细胞内冰晶形成及复苏时减轻由于渗透压改变引起的细胞肿胀有关。另外大量的研究显示低温保存液中添加膜稳定剂糖类物质可提高复温后肝细胞存活率:(1)Miyamoto 等^[6]发现在冻存介质中添加葡萄糖(单糖)、海藻糖(双糖)、麦芽糖(三糖)或者长链糖均可明显提高复温后肝细胞的存活率,减轻肝细胞冻存损伤。(2)海藻糖是一种双糖,Katzen 等^[7]在 10%二甲亚砜(DMSO)基础上添加不同浓度的海藻糖— $156\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存原代人肝细胞 7 d。结果显示,同单用 10% DMSO 相比,添加海藻糖可以明显提高复苏后肝细胞存活率 $[(62.9\pm 13)\%,(46.9\pm 11)\%,P<0.01]$,更好的维持清蛋白分泌、尿素合成能力及 I 相、II 相细胞代谢能力,降低 LDH、AST 释放;海藻糖的最合适浓度是 0.2 mmol/L 。(3)Limaye 和 Kale^[8]在 10% DMSO 基础上分别添加海藻糖和抗氧化剂过氧化氢酶于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或者 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存人胎肝细胞发现,海藻糖和过氧化氢酶均明显提高了冻存复苏后肝细胞的存活率及生物转化功能,而且两者于 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 可产生协同作用, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 未观察到协同效应。综上,UW 液中联合应用羟乙基淀粉、密三糖和乳糖醛酸等非渗透性保护剂及同 CS 液和 HTK 液相比,可能更适合肝细胞的低温保存。

3.2 从缓冲系统分析 UW 液以磷酸盐为缓冲系统防止细胞酸中毒,UW 液的 pH 值为 7.4;而 HTK 液则加入了强有力的酸碱缓冲系统—组氨酸缓冲系统,其中 CS 液的组氨酸含量较低同时含有 OH^- 以防止细胞内酸中毒,CS 液和 HTK 液的 pH 值分别为 7.3、7.2。尽管组氨酸有强大的缓冲能力,可以有效地减轻 H^+ 的聚集,解除糖酵解的抑制,使 ATP 和乳酸有较大的生成率,但 Bahde 等^[9]发现使用 HTK 液低温保存鼠肝,复温后因大量氧自由基产生,可引起大量肝细胞凋亡。而组氨酸则增加肝细胞凋亡的发生,通过减少组氨酸含量,使用 N-乙酰组氨酸替代优化 HTK 液可明显减轻肝细胞的凋亡指数。从抗氧化剂和能量底物分析,UW 液含谷胱甘肽及别嘌呤醇等抗

氧化剂,CS 液含谷胱甘肽,HTK 液无抗氧化剂。大量研究发现,在低温保存液添加生物抗氧化剂^[10](如还原性谷胱甘肽^[11]、N-乙酰半胱氨酸^[12]、过氧化氢酶^[8]等),可以提高冻存肝细胞存活率,减轻低温保存复温后大量氧自由基生成引起的细胞凋亡。综上,HTK 液的强大酸碱缓冲系统—组氨酸缓冲系统可能并不是很适宜肝细胞的低温保存,同时 UW 液、Celsior 液含有抗氧化的还原性谷胱甘肽可能是对肝细胞的低温保存效果优于 HTK 液的原因。

总之,同 HTK 液相比,使用 UW 液或者 CS 液 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存肝细胞可明显的提高复温后 C3A 细胞存活率,降低低温损伤引起的 ALT 释放和乳酸释放,有效的保护 C3A 肝细胞尿素合成功能和清蛋白分泌功能。UW 液或者 Celsior 液 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 C3A 肝细胞仍然可以满足 BLASS 的需要,但不宜超过 72 h。

参考文献:

- [1] Demetriou AA, Brown RS Jr, Busuttil RW, et al. Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure[J]. *Ann Surg*, 2004, 239(5): 660-667.
- [2] Fiegel HC, Kaufmann PM, Bruns H, et al. Hepatic tissue engineering: from transplantation to customized cell-based liver directed therapies from laboratory[J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(1): 56-66.
- [3] Ambros JT, Herrero-Fresneda I, Borau OG, et al. Ischemic preconditioning in solid organ transplantation: from experimental to clinics[J]. *Transpl Int*, 2007, 20(3): 219-229.
- [4] Filippi C, Keatch SA, Rangar D, et al. Improvement of C3A cell metabolism for usage in bioartificial liver support systems[J]. *J Hepatol*, 2004, 41(4): 599-605.
- [5] 龚独辉,潘明新,姚坤厚,等. 苦参碱联合 DMSO 大规模冻存人胎肝细胞的实验研究[J]. *广东医学*, 2009, 30(4): 512-514.
- [6] Miyamoto Y, Suzuki S, Nomura K, et al. Improvement of hepatocyte viability after cryopreservation by supplementation of long-chain oligosaccharide in the freezing medium in rats and humans[J]. *Cell Transplant*, 2006, 15(10): 911-919.
- [7] Katzen E, Vondran FW, Schwartlander R, et al. Cryopreservation of primary human hepatocytes: the benefit of trehalose as an additional cryoprotective agent[J]. *Liver Transpl*, 2007, 13(1): 38-45.
- [8] Limaye LS, Kale VP. Supplementation of conventional freezing medium with a combination of catalane and trehalose results in better protection of surface molecules and functionality of hematopoietic cells[J]. *J Hematother Stem Cell Res*, 2003, 12(5): 553-564.
- [9] Bahde R, Palmes D, Gemsa O, et al. Attenuated cold storage injury of rat livers using a modified HTK solution[J]. *J Surg Res*, 2008, 146(1): 49-56.
- [10] Guha M, Kumar S, Choubey V, et al. Apoptosis in liver during malaria: role of oxidative stress and implication of mitochondrial pathway[J]. *FASEB J*, 2006, 20(8): 1224-1226.

较长时间的 AT1R 阻断可能参与了 ARBs 组 AT2R 表达的提高、提前。Yang 等^[9]发现 AT1R 表达在 IR 后立即增加,AT2R 并未受影响。Horiuchi 等^[5]发现 AMI 后梗死区和非梗死区术后 1 d AT2R 受体密度即增加,7 d 时更进一步上调。

3.3 ATR 与心肌重塑 I 型和 III 型胶原的合理比例对维护间质网络的结构与功能完整具有重要的意义,也能较好地反映心肌纤维化程度^[10]。ACEI、ARBs 药物干预的动物实验、大型临床实验研究表明此二类药物对心脏的保护作用已经得到认同^[11]。IR 术后 Ang II 通过 AT1R 介导了胶原的沉积、间质的重塑,而当 AT1R 被阻断后,反馈性升高的 Ang II 与 AT2R 结合抑制了 AT1R 的心脏重塑作用。提示在整个心室重塑的进展变化中,由于 AT2R 表达的量及增加、衰减的变化规律,AT2R 在心室重塑中的作用是有限的、次要的;而促进胶原沉积作用的 AT1R 的持续被阻断才是在 ARBs 抑制心室重塑中起主要作用。以至于在作者的实验中看到虽然 ARBs 组术后 14、28 d 时 AT2R 的表达已经衰减到难以检出的程度,ARBs 组由于 AT1R 的持续被阻断,IR 后期心脏的重塑仍处于持续被抑制状态,并不因可能具有抑制效应的 AT2R 的衰减而开始发生心室重塑。AT2R 可能具有与 AT1R 相拮抗的生物学功能^[12]。另外,IR 术前 AT1R 的相对较长时间的阻断对于术后胶原沉积的抑制作用是不可忽视的,缙沙坦在内的 ARBs 一类药物相对起效较为缓慢,要达到 AT1R 的充分阻断需要一个体内代谢过程,故实验中 ARBs 组术后观察到的胶原沉积抑制效应是与术前的持续 AT1R 的阻断密不可分的,且 ARBs 逆转已发生的心室重塑和抑制心室重塑是有区别的。本研究与大部分的文献报道相一致。而 Xu 等^[13]发现:MI 后心脏重塑,血动力学、心脏功能的病理生理中 AT2R 不是重要的调节,AT2R 只是在 AT1R 被阻断后才抑制心肌细胞肥大,成纤维细胞增生,而出现心脏保护作用,Booz 等^[14]认为,心血管重塑与 AT1R、AT2R 的分布比例有关,甚至可能与性别相关^[15]。因此可以推测:在抑制间质重塑中,AT1R 的阻断起主要作用,AT2R 的激活起辅助作用。

综上所述,IR 术后 AT2R 呈一过性表达。AT2R 定位于心内膜下层的成纤维细胞膜、部分心肌细胞膜、心肌间质的成纤维细胞膜。AT2R 可能对抗 AT1R 的部分作用,在心肌间质重塑中 AT1R 的阻断起主要作用,AT2R 的激活可能起部分次要作用。

参考文献:

- [1] Nakajima M, Hutchinson H, Fujinaga M, et al. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(23): 10663-10667.
- [2] Akishita M, Horiuchi M, Yamada H, et al. Accentuated vascular proliferation and altered remodeling after injury in mice lacking angiotensin II type 2 receptor[J]. Circulation, 1997, 96(Suppl 1): I-547.
- [3] Monike SU, Muscha S, Martin P, et al. The angiotensin

AT2-Receptor Mediates Inhibition of Cell Proliferation in Coronary Endothelial Cells[J]. J Clin Invest, 1995, 95(2): 651-657.

- [4] Sabri A, Levy BI, Poitevin P, et al. Differential roles of AT1 and AT2 receptor subtypes in vascular trophic and phenotypic changes in response to stimulation with angiotensin II [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17(2): 257-264.
- [5] Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent Progress in Ang II Iotensin II Type 2 Receptor Research in the Cardiovascular System [J]. Hypertension, 1999, 33(2): 613-621.
- [6] Akishita M, Iwai M, Wu L, et al. Inhibitory Effect of Angiotensin II Type 2 Receptor on Coronary Arterial Remodeling After Aortic Banding in Mice [J]. Circulation, 2000, 102(14): 1684-1689.
- [7] Fabrice B, Cooper ME, Caney RM, et al. Vascular expression of angiotensin type 2 receptor in the adult rat; influence of angiotensin II infusion [J]. J Hypertension, 2001, 19(6): 1075-1081.
- [8] Sun Y, Weber KT. Angiotensin II receptor binding following myocardial infarction in the rat [J]. Cardiovasc Res, 1994, 28(11): 1623-1628.
- [9] Yang Z, Bove CM, French BA, et al. Antiotensin II type 2 receptor overexpression preserves left ventricular function after myocardial infarction [J]. Circulation, 2002, 106(1): 106-111.
- [10] Alberts B, Bray D, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell [M]. 3rd ed. New York: Garland Publishing, 1994.
- [11] Mankad S, d'Amato TA, Reichek N, et al. Combined Angiotensin II Receptor Antagonism and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition Further Attenuates Postinfarction Left Ventricular Remodeling [J]. Circulation, 2001, 103(23): 2845-2850.
- [12] 景涛, 王海东, 何国祥, 等. 条件表达 AT2R 基因对体外培养血管平滑肌细胞骨桥蛋白 mRNA 表达的影响 [J]. 重庆医学, 2007, 36(11): 1045-1048.
- [13] Xu J, Carretero OA, Liu YH, et al. Role of AT2 Receptors in the Cardioprotective Effect of AT1 Antagonists in Mice [J]. Hypertension, 2002, 40(3): 244-250.
- [14] Booz GW. Cardiac angiotensin AT2 receptor: what exactly does it do [J]. Hypertension, 2004, 43(6): 1162-1163.
- [15] Sampson AK, Moritz KM, Jones ES, et al. Enhanced angiotensin II type 2 receptor mechanisms mediate decreases in arterial pressure attributable to chronic low-dose angiotensin II in female rats [J]. Hypertension, 2008, 52(4): 666-671.

(收稿日期: 2011-04-14 修回日期: 2011-06-08)

(上接第 2850 页)

- [11] Stevenson DJ, Morgan C, McLellan LI, et al. Reduced glutathione levels and expression of the enzymes of glutathione synthesis in cryopreserved hepatocyte monolayer cultures [J]. Toxicol In Vitro, 2007, 21(3): 527-532.
- [12] Martin H, Abadie C, Heyd B, et al. N-acetylcysteine par-

tially reverses oxidative stress and apoptosis exacerbated by Mg-deficiency culturing conditions in primary cultures of rat and human hepatocytes [J]. J Am Coll Nutr, 2006, 25(5): 363-369.

(收稿日期: 2011-04-09 修回日期: 2011-05-03)