

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.16.006

siRNA 沉默 ARC 对低氧下大鼠肺动脉平滑肌细胞活力的影响^{*}

张 婕¹,金 泉¹,吴素玲¹,管 明^{2△}
(1.浙江省杭州市儿童医院内二科 310014;2.浙江大学医学院附属杭州市第一人民医院耳鼻喉科 310006)

[摘要] **目的** 利用小干扰 RNA(siRNA)技术干扰大鼠肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)含胱冬肽酶富集功能域的凋亡抑制因子(ARC)的表达,验证 ARC 在 PASMCs 活力变化中的作用。**方法** 体外培养 PASMCs,分为常氧组、缺氧组、siRNA-Negative+缺氧组、siRNA-ARC+缺氧组。采用 CCK-8 法检测细胞活力情况,免疫荧光染色法及 Western blot 检测 ARC 在 PASMCs 中的表达,RT-PCR 法分别检测 caspase-3、Fadd、Bcl-2、Bad mRNA 表达。**结果** 低氧下 PASMCs 活力较常氧下增加,并呈时间依赖性;与 siRNA-Negative+缺氧组比较,siRNA-ARC+缺氧组的 PASMCs 活力受到抑制;siRNA-ARC+缺氧组 PASMCs 的 caspase-3、Bad、Fadd mRNA 表达较 siRNA-Negative+缺氧组增加,而 Bcl-2 mRNA 表达较 siRNA-Negative+缺氧组减少($P<0.05$)。**结论** ARC 参与调控低氧下大鼠 PASMCs 生长,对 PASMCs 活力具有一定的增强作用,可能是促凋亡因子及抗凋亡因子共同作用的结果。

[关键词] 低氧;含胱冬肽酶富集功能域的凋亡抑制因子;大鼠肺动脉平滑肌细胞;细胞活力
[中图分类号] R392.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)16-2723-05

Effects of ARC siRNA on growth of rat pulmonary artery smooth muscle cells under hypoxic condition^{*}
ZHANG Jie¹,JIN Quan¹,WU Suling¹,GUAN Ming^{2△}
(1. The Second Department of Internal Medicine, Hangzhou Children's Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310014, China; 2. Department of Otorhinolaryngology, Hangzhou First People's Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310006, China)

[Abstract] **Objective** To observe whether ARC is involved in the growth of pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs) under hypoxic condition through interfering the expression of apoptosis repressor with caspase recruitment domain (ARC) by siRNA. **Methods** PASMCs were cultured in vitro and divided into four groups: the normoxic group (under normoxia condition), the hypoxia group (under hypoxia condition), the siRNA-Negative+hypoxia group (transfected with siRNA-Negative under hypoxia condition) and the siRNA-ARC+hypoxia group (transfected with siRNA-ARC under hypoxia condition). The viability of the PASMCs was detected by CCK-8 assay. The expression level of ARC in PASMCs was measured by immunofluorescent staining and Western blot. The expression levels of caspase-3, Fadd, Bcl-2 mRNA and Bad mRNA were detected by RT-PCR. **Results** Compared with underlying normoxia condition, the viability of the PASMCs under hypoxic condition was increased in a time-dependent manner. Compared with the siRNA-Negative+hypoxia group, the cell viability and expression level of Bcl-2 mRNA in the siRNA-ARC+hypoxia group was decreased, while the expression levels of caspase-3, Bad and Fadd mRNA in the siRNA-ARC+hypoxia group were increased ($P<0.05$). **Conclusion** ARC is involved in the regulation of the growth of PASMCs in rats under hypoxia, and may have a certain enhancement effect on the activity of PASMCs, which may be the result of the combination effect of pro-apoptotic factors and anti-apoptotic factors.

[Key words] hypoxia; apoptosis repressor with caspase recruitment domain; rat pulmonary arterial smooth muscle cells; cell viability

低氧性肺动脉高压是一种慢性进行性疾病,其中低氧是该病发生的最主要原因。肺动脉血管收缩、肺血管重构及微血管损伤是低氧性肺动脉高压的主要发病机制^[1-2]。肺动脉平滑肌细胞(pulmonary arterial smooth muscle cells, PASMCs)是肺动脉壁的主要构成细胞。PASMCs 的增殖和凋亡平衡影响肺血管的厚度,是肺血管重塑的主要机制之一^[3]。研究低氧性肺动脉高压的发病机制,寻找更有效安全的治疗方法一直是研究的热点。

含胱冬肽酶富集功能域的凋亡抑制因子(apoptosis repressor with caspase recruitment domain, ARC)是一种高效及多功能的调节内外源性凋亡的抗凋亡

^{*} 基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2015KYB294)。 作者简介:张婕(1988—),主治医师,博士,主要从事抗凋亡因子 ARC 的研究。 △ 通信作者,E-mail:guanming2000@163.com。

蛋白^[4]。ARC 可以拮抗由细胞毒性药物、放射性损伤、氧化应激反应、缺氧、细胞内 Ca²⁺ 平衡失调、内质网应激等引起的凋亡^[5]。由于 ARC 对于 PSMCs 生长与肺血管重塑的影响并不明确,本研究主要通过干扰 ARC 的表达,探讨是否影响下游反应元件的激活,最终通过一系列内外源性抗凋亡因子的表达,使得机体适应外界环境的变化。因此,本研究通过小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)技术,体外干扰 PSMCs ARC 的表达,检测细胞活力变化,讨论 ARC 在 PSMCs 生长中的作用,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 胎牛血清、DMEM 培养基、0.25% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA)消化液购于美国 HyClone 公司;OPTI-MEM 购于美国 Gibco 公司;青、链霉素(100×)购于上海碧云天生物技术公司;RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Lipofectamine 2000 购于美国 Invitrogen 公司;4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)购于(H+L)索莱宝公司;FITC 标记山羊抗兔 IgG 购于美国 BD 公司;BCA 蛋白定量试剂盒购于南京维森特生物技术公司;吐温 20(Tween-20)购于上海生工生物工程公司;聚偏氟乙烯(PVDF)膜购于美国 Millipore 公司;α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)抗体、β-actin 抗体、ARC 抗体购于美国 Santa Cruz 公司;CCK-8 购于北京普鲁顿公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 PSMCs 的分离、培养及分组 大鼠 PSMCs 的培养和鉴定采用胶原酶 I 消化法^[9]。取 SD 大鼠,超净台内处死,取肺组织,分离肺内动脉血管于磷酸盐缓冲液(PBS)中。分离出血管中膜,用眼科剪将血管中膜剪碎,放入预先盛有含 0.2% 胶原酶 I 的离心管中离心,弃上清液后将沉淀组织重悬于 5 mL 含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,取细胞悬液,置于培养皿中于培养箱中孵育。一般约 1 周平滑肌细胞可从组织块中爬出,待细胞即将融合时,进行消化传代,取 2~3 代细胞进行实验。将 PSMCs 分成以下 4 组:常氧组、低氧组、ARC-siRNA+低氧组、Negative-siRNA+低氧组。

1.2.2 免疫荧光染色法检测 ARC、caspase-3 表达 将生长状态良好的 PSMCs 细胞接种至 12 孔板中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养过夜后,弃去培养基。取细胞 PBS 洗涤 1 次,多聚甲醛固定细胞,室温孵育 10 min。PBS 洗涤 3 次,加入含 0.2% Triton X-100,室温静置 30 min。PBS 洗涤 3 次,加入约 40 μL 一抗(ARC 1:1 000、caspase-3 1:1 000、α-SMA 1:200 稀释),4℃孵育过夜。除去未结合的一抗,PBS 洗涤后加入二抗,静置 30 min, PBS 洗涤。随后用 DAPI 染核 5 min, PBS 洗涤,用尖镊子将玻片取出,晾干,载玻片上滴一滴封片液。荧光显微镜下观察,拍照。

1.2.3 siRNA 转染细胞 PSMCs 接种于 6 孔板中,待细胞长至 70% 融合时,弃培养基,用 PBS 洗 3

次,无血清培养基洗 2 次,加入新的无血清培养基,将 Lipofectamine2000、ARC-siRNA (ARC-siRNA 1、2、3)或阴性对照序列(Negative-siRNA)分别加入细胞中,充分混匀,培养 48 h 后,换液,进行后续实验。ARC 的 3 个 siRNA oligo 序列见表 1。

表 1 各 siRNA 序列		
干扰基因	方向	序列(5'-3')
ARC-siRNA1	正向引物	CGGAAACGGCUGGUAGAAATT
	反向引物	UUUCUACCAGCCGUUCCGTT
ARC-siRNA2	正向引物	GAGUAUGAAGCCUUGGAUGTT
	反向引物	CAUCCAAGGCUUCAUACUCTT
ARC-siRNA3	正向引物	CCCAGCAAACUGUGAGCAUTT
	反向引物	AUGCUCACAGUUUGCUGGGTT
Negative-siRNA	正向引物	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	反向引物	ACGUGACACGUUCGAGAATT

1.2.4 CCK-8 法检测细胞活力 收集细胞,将转染 48 h 的细胞用胰蛋白酶-EDTA 消化,稀释细胞使其浓度为 3×10⁷/L。分别取 100 μL 于 96 孔板培养,每组设 3 个复孔,常氧培养过夜贴壁。在常氧或低氧条件下将各组细胞分别培养 0、24、48、72 h 后,按 1:10 体积比混合 CCK-8 和无血清 DMEM 培养基,取 100 μL 加入待测孔中,37℃、5% CO₂ 孵育 1 h;用微板分光光度计测定 450 nm 波长下的吸光度(A)值。实验重复 3 次。

1.2.5 Western blot 收集各组细胞,加入细胞裂解液,在冰上静置裂解 20 min;4℃ 10 000×g 离心 5 min,取上清液,加入 2×十二烷基硫酸钠(SDS)凝胶上样缓冲液水浴(100℃)变性 10 min,样本备用或分装冻存。取 20 μg 蛋白样品,10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳,100 V 转移至 PDVF 膜,封闭液中封闭 1 h;加入一抗[分别为 ARC 抗体(1:1 000)、β-actin 抗体(1:500)]室温孵育 2 h;洗膜;放入辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 室温孵育 1 h;PBST 洗膜,在暗室中加 ECL 发光试剂,X 射线胶片曝光 1~2 min 后显影、定影,杂交信号在图像分析系统中进行光密度扫描。应用管家基因 β-actin 作为内参,其余目的蛋白与目的比值对目的蛋白相对表达水平。实验重复 3 次。

表 2 各基因 RT-PCR 引物			
目的基因	方向	序列(5'-3')	产物大小 (bp)
caspase-3	正向引物	CTGGACTGCGGTATTGAGAC	104
	反向引物	CCGGGTGCGGTAGAGTAAGC	
Fadd	正向引物	ACAATGTGGGGAGAGACTGG	111
	反向引物	CCCTTACCCGATCACTCAGG	
Bad	正向引物	AGGCTTGAGGAAGTCCGATC	496
	反向引物	TTGTGCGATCTGTGTTGCAG	
Bcl-2	正向引物	GGTGAAC TGGGGGAGGATTG	102
	反向引物	AGAGCGATGTTGTCCACCAG	
GADPH	正向引物	GCAAGAGAGAGGCCCTCAG	74
	反向引物	TGTGAGGGAGATGCTCAGTG	

1.2.6 RT-PCR TRIzol 一步法提取各组细胞总

RNA,按照反转录试剂盒说明书步骤,合成 cDNA。紫外吸收法测定总 RNA 在 260 nm 和 280 nm 处 A 值,计算其浓度和纯度。用 PCR 扩增目的片段。以 GADPH mRNA 表达水平作为内参。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 10 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 50 s,循环 35 次。PCR 产物在 1.5%~1.8%的琼脂糖凝胶上电泳,条带经紫外显色灰度扫描。各基因 RT-PCR 引物见表 2。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件分析数据,计量资料 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较分别采用 SNK-q 法或 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 siRNA 在 PSCMCs 中抑制 ARC 表达的效率检测 常氧下,免疫荧光染色发现 ARC 在 PSCMCs 的细胞核和细胞质内均存在表达,见图 1。常氧下,ARC-siRNA 干扰后,ARC 在 PSCMCs 中的表达水平经 RT-qPCR 检测,结果显示:相对于对照细胞(未转染 siRNA,常氧,ARC 表达水平设为 100%),ARC-siRNA1,ARC-siRNA2,ARC-siRNA3 作用后,ARC mRNA 的表达水平分别为 $(46.8\pm 3.0)\%$ 、 $(42.6\pm 6.9)\%$ 、 $(50.7\pm 10.0)\%$,其中 ARC-siRNA 2 抑制 ARC 表达的效率最高(图 2A)。Western blot、免疫荧光染色检测 ARC-siRNA2 干扰,ARC 在 PSCMCs 的表达水平,结果发现 ARC 在 ARC-siRNA2 干扰后的细胞中表达较对照细胞显著下降(图 2B、C)。因此最终选取 ARC-siRNA2 来进行后续实验。

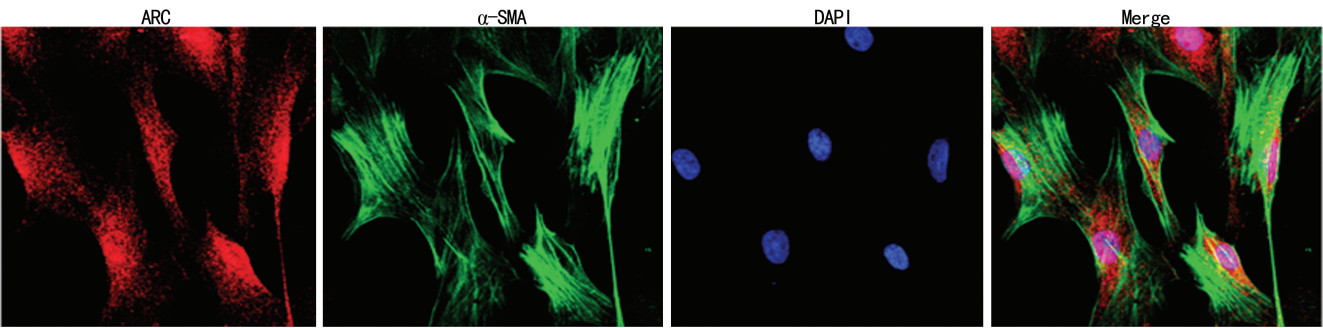
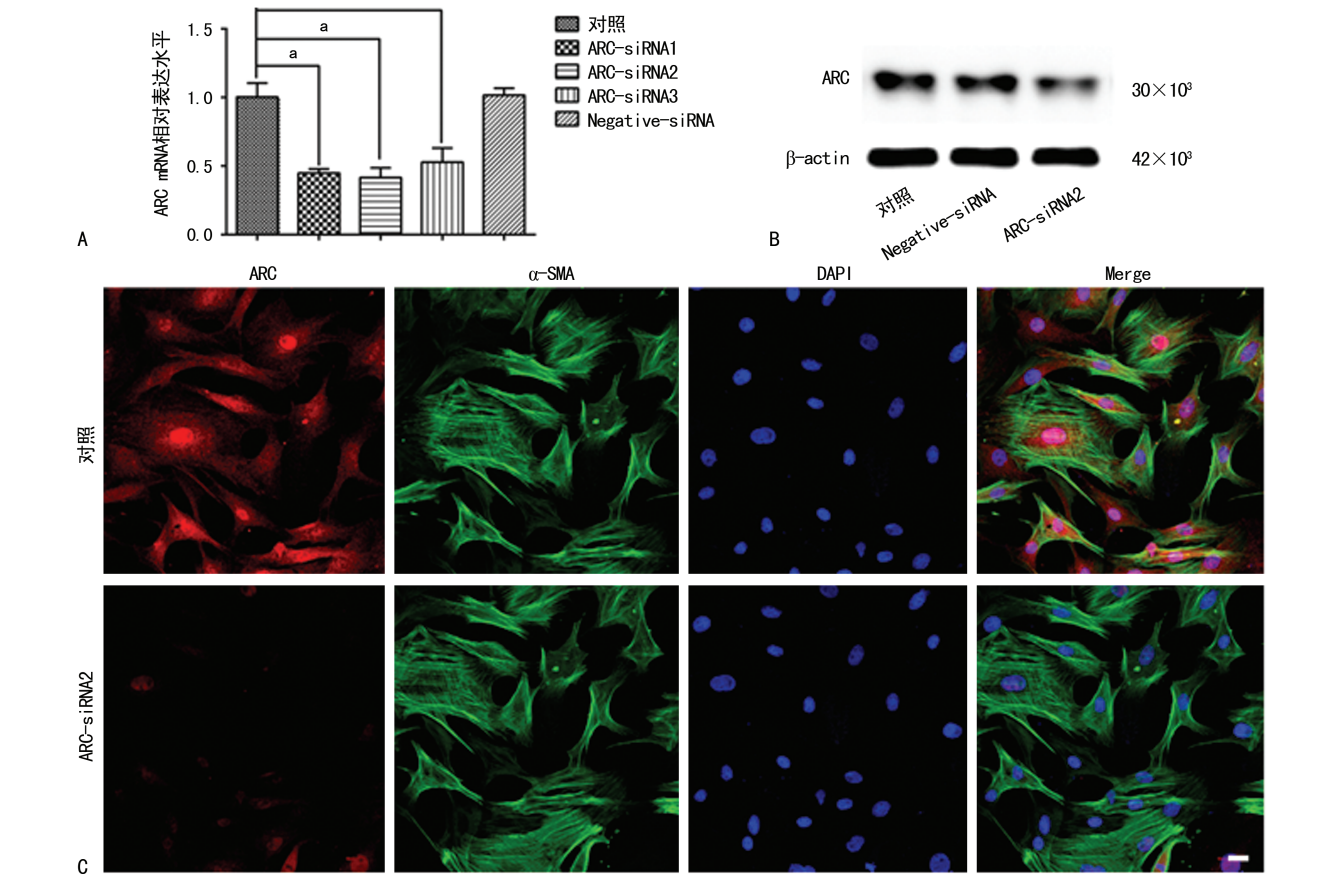


图 1 ARC 在 PACMCs 中表达(荧光显微镜×800)



A: ARC mRNA 表达量被 ARC-siRNA1、ARC-siRNA2、ARC-siRNA3 转染后所抑制;B: Western blot 结果显示 ARC 表达水平在 ARC-siRNA2 干扰后显著下降;C:免疫荧光结果显示 ARC 表达水平在 ARC-siRNA2 干扰后显著下降。*: $P<0.05$

图 2 ARC-siRNA 抑制 ARC 在 PSCMCs 中的表达(荧光显微镜×400)

2.2 ARC 对低氧下 PSMCs 细胞活力的影响
CCK-8 法检测细胞活力结果显示低氧明显促进 PSMCs 活力($P<0.01$),且呈时间依赖性,各组在 0 h 时 A 值差异无统计学意义($P>0.05$)。在低氧情况下,ARC-siRNA+低氧组的 A 值较 Negative-siRNA+低氧组明显减弱,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

2.3 低氧下 PSMCs 中 caspase-3 表达水平变化及与 ARC 的关系 为了进一步研究 ARC 对低氧下 PSMCs 活力影响的机制,笔者采用免疫荧光染色检

测了 caspase-3 在低氧作用后表达水平变化。免疫荧光染色结果显示,低氧作用 48 h,低氧组 caspase-3 阳性细胞较常氧组显著增加[(22.4±5.2)% vs. (5.5±1.8)%]。用 ARC-siRNA 下调 ARC 表达,再低氧作用 48 h,免疫荧光染色结果显示 ARC-siRNA 组与 Negative-siRNA 组比较,caspase-3 阳性细胞显著增加[(50.1±5.8)% vs. (17.2±4.1)%]。结果表明,ARC 干扰后,PSMCs 对低氧敏感度增加,可能与 caspase-3 表达增加有关。见图 3。

表 3 CCK-8 法测量不同分组下 PSMCs 细胞活力情况($\bar{x}\pm s$,A 值)

组别	0 h	24 h	48 h	72 h
常氧组	0.259±0.003	0.261±0.002	0.258±0.002	0.262±0.003
低氧组	0.260±0.002	0.568±0.006 ^a	0.697±0.008 ^a	0.825±0.010 ^a
Negative-siRNA+低氧组	0.261±0.003	0.572±0.005 ^a	0.687±0.007 ^a	0.817±0.011 ^a
ARC-siRNA+低氧组	0.259±0.003	0.455±0.005 ^{ab}	0.582±0.006 ^{ab}	0.665±0.007 ^{ab}

^a: $P<0.05$,与常氧组比较;^b: $P<0.05$,与 Negative-siRNA+低氧组比较

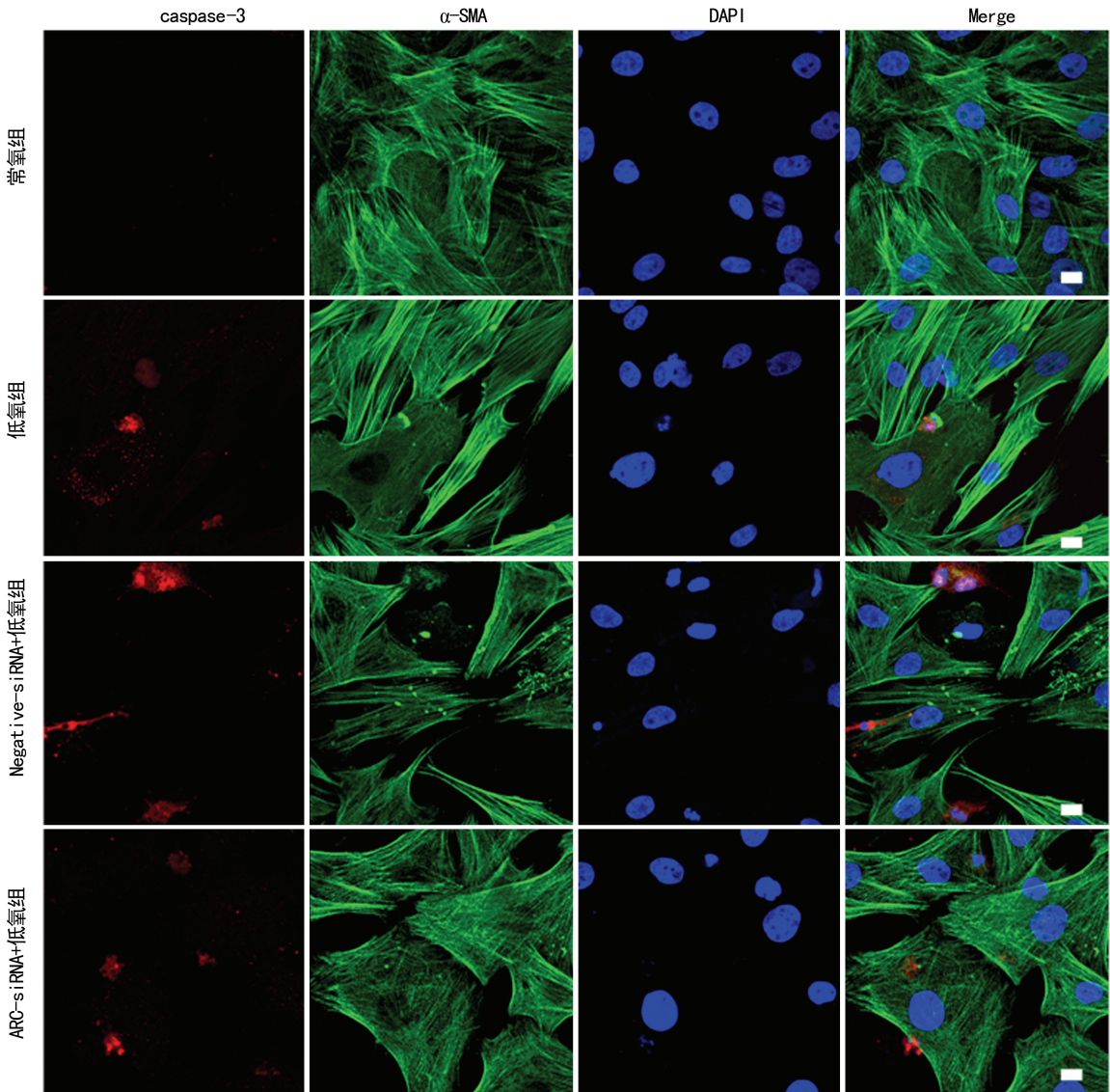
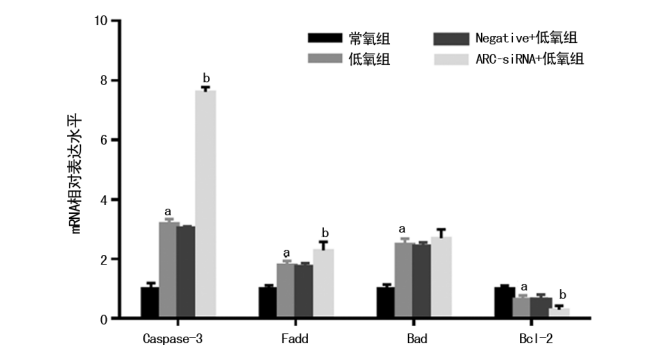


图 3 ARC 表达抑制后低氧条件下 PSMCs 中 caspase-3 表达水平变化(荧光显微镜×800)

2.4 低氧下 PSMCs 凋亡通路中多种凋亡因子表达水平及与 ARC 的关系 低氧作用 48 h 后,低氧组 caspase-3 mRNA 表达水平较常氧组显著增加,且内源性促凋亡因子 Bad、Fadd 表达显著增加,抗凋亡因子 Bcl-2 表达显著下降,差异均有统计学意义($P<0.05$)。ARC-siRNA+低氧组与 Negative-siRNA+低氧组比较,caspase-3 和 Fadd 表达均显著增加,Bcl-2 表达则显著下降($P<0.05$),而 Bad 表达无明显变化($P>0.05$),见图 4。



a: $P<0.05$,与常氧组比较;b: $P<0.05$,与 Negative-siRNA+低氧组比较

图 4 ARC 表达抑制后低氧条件下凋亡因子表达水平变化

3 讨 论

低氧性肺动脉高压是由低氧血症引起的肺动脉压力升高,是一种慢性进行性疾病,其主要病理特征为肺动脉压力持续增高、肺动脉壁的增厚及血管肌化,目前其治疗手段和效果有限,预后极差,常导致患者右心力衰竭而死亡^[1]。其中低氧是该病发生的最主要原因。肺动脉血管收缩、肺血管重构及微血管损伤是低氧性肺动脉高压的主要发病机制^[2]。低氧性肺血管重建是低氧性肺动脉高压的主要病理改变,PASMCs 是构成肺动脉壁的主要细胞,PASMCs 增殖和凋亡失衡是肺血管重塑的主要机制,而细胞活力的变化能从侧面说明反映细胞增殖凋亡情况。

ARC 是 1998 由 KOSEKI 等^[4]首次发现并命名是一种高效及多功能的调节内外源性凋亡途径的抗凋亡因子。ARC 含有两个功能区域: CARD 和 P/E, CARD 区同凋亡因子 caspase 的 CARDS 区及凋亡受体蛋白 RAIDD 和 Apaf-1 具有同源性。ARC 通过与 caspase 或其受体蛋白之间的相互作用来调节凋亡信号,维持其线粒体膜电位的稳定,抑制线粒体释放活性氧^[5]。在心肌细胞缺血再灌注模型中,ARC 缺陷的小鼠,心肌细胞损伤更加显著^[6-7]。而过表达 ARC 可保护心肌因缺血再灌注引起的损伤^[8-9]。ARC 参与细胞程序性死亡、凋亡、迁移等行为的调控,维持线粒体膜电位的稳定^[5,10-13]。

本研究发现 ARC 在 PSMCs 表达,对于低氧性肺动脉高压研究显示,低氧促进 PSMCs 活力,凋亡

减少,增殖增加^[14],在肺血管重塑中发挥着重要作用,这与本研究的研究结果相符。本研究用转染法将外源性 siRNA 导入 PSMCs 构建 ARC 干扰模型,在经过体外转染 PSMCs 并做筛选后,选定转染效率最好的靶点 2(ARC-siRNA2),采用免疫荧光来检查转染结果,结果显示 ARC 表达显著降低,说明转染模型构建成功。研究结果显示 ARC 对 PSMCs 活力可能具有一定的增强作用,低氧下 PSMCs 细胞活力较常氧下增加。低氧下,当 ARC 受到抑制时,细胞活力受抑制;本研究显示这一结果可能与多种因子相互作用有关,当 ARC 表达被抑制时,促凋亡因子 caspase-3 和 Fadd 表达显著增加,抗凋亡因子 Bcl-2 的表达降低,而促凋亡因子 Bad 无明显变化。

参考文献

[1] TUDER R M, ARCHER S L, DORFMÜLLER P, et al. Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension[J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 62 (25): D4-12.

[2] LEOPOLD J A, MARON B A. Molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(5): 761.

[3] GURBANOV E, SHILIANG X. The key role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of pulmonary hypertension[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2006, 30(3): 499-507.

[4] KOSEKI T, INOHARA N, CHEN S, et al. ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(9): 5156-5160.

[5] LUDWIG-GALEZOWSKA A H, FLANAGAN L, REHM M. Apoptosis repressor with caspase recruitment domain, a multifunctional modulator of cell death[J]. J Cell Mol Med, 2011, 15(5): 1044-1053.

[6] LI Y, GE X, LIU X. The cardioprotective effect of postconditioning is mediated by ARC through inhibiting mitochondrial apoptotic pathway[J]. Apoptosis, 2009, 14(2): 164-172.

[7] GUSTAFSSON A B, SAYEN M R, WILLIAMS S D, et al. TAT protein transduction into isolated perfused hearts: TAT-apoptosis repressor with caspase recruitment domain is cardioprotective[J]. Circulation, 2002, 106(6): 735-739.

[8] CHATTERJEE S, BISH L T, JAYASANKAR V, et al. Blocking the development of postischemic cardiomyopathy with viral gene transfer of the apoptosis repressor with caspase recruitment domain [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003, 125(6): 1461-1469.

[9] GOLOVINA V A, BLAUSTEIN M P. Preparation of primary cultured mesenteric artery smooth muscle cells for fluorescent imaging and physiological studies [J]. Nat Protoc, 2006, 1(6): 2681-2687.

参考文献

- [1] DING Z M, XIAO Y, WU X, et al. Progression and regression of hepatic lesions in a mouse model of NASH induced by dietary intervention and its implications in pharmacotherapy[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9(3): 410-422.
 - [2] YASAKA K, AKAI H, KUNIMATSU A, et al. Deep learning for staging liver fibrosis on CT: a pilot study [J]. *Eur Radiol*, 2018, 9(6): 1228-1242.
 - [3] MUNTONI S, ROJKIND M, MUNTONI S. Colchicine reduces procollagen Ⅲ and increases pseudocholinesterase in chronic liver disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(23): 2889-2894.
 - [4] YING H Z, CHEN Q, ZHANG W Y, et al. PDGF signaling pathway in hepatic fibrosis pathogenesis and therapeutics (Review) [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 7879-7889.
 - [5] WEBER O, MERCER A A, FRIEBE A, et al. Therapeutic immunomodulation using a virus--the potential of inactivated orf virus[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2013, 32(4): 451-460.
 - [6] WENG S C, CHOU C J, LIN L C, et al. Immunomodulatory functions of extracts from the Chinese medicinal fungus *Cordyceps cicadae* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2002, 83(1/2): 79-85.
 - [7] ZHU R, ZHENG R, DENG Y Y, et al. Ergosterol peroxide from *Cordyceps cicadae* ameliorates TGF- β 1-induced activation of kidney fibroblasts[J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(3): 372-378.
 - [8] SUN Y F, WINK M, WANG P, et al. Biological characteristics, bioactive components and antineoplastic properties of sporoderm-broken spores from wild *Cordyceps cicadae* [J]. *Phytomedicine*, 2017, 36(12): 217-228.
 - [9] COELHO N M, MCCULLOCH C A. Mechanical signaling through the discoidin domain receptor 1 plays a central role in tissue fibrosis[J]. *Cell Adh Migr*, 2018, 3(1): 1-15.
 - [10] LU M Y, CHEN C C, LEE L Y, et al. N(6)-(2-Hydroxyethyl)adenosine in the medicinal mushroom *cordyceps cicadae* attenuates Lipopolysaccharide-stimulated pro-inflammatory responses by suppressing TLR4-Mediated NF- κ B signaling pathways[J]. *J Nat Prod*, 2015, 78(10): 2452-2460.
 - [11] BIRJANDI S Z, PALCHEVSKIY V, XUE Y Y, et al. CD4(+)CD25(hi)Foxp3(+) cells exacerbate bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. *Am J Pathol*, 2016, 186(8): 2008-2020.
 - [12] TANABE K, TAURA K, KOYAMA Y, et al. Migration of splenic lymphocytes promotes liver fibrosis through modification of T helper cytokine balance in mice[J]. *J Gastroenterol*, 2015, 50(10): 1054-1068.
 - [13] HESSE M, MODOLELL M, LA FLAMME A C, et al. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism[J]. *J Immunol*, 2001, 167(11): 6533-6544.
 - [14] PESCE J T, RAMALINGAM T R, MENTINK-KANE M M, et al. Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis[J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5(4): e1000371.
- (收稿日期: 2019-03-11 修回日期: 2019-04-25)
-
- (上接第 2727 页)
- [10] TEMPLIN A T, SAMARASEKERA T, MEIERD T, et al. Apoptosis repressor with caspase recruitment domain ameliorates amyloid-induced beta-cell apoptosis and JNK pathway activation [J]. *Diabetes*, 2017, 66(10): 2636-2645.
 - [11] VOROBJEV K, MITCHELL A S, SMITH I C, et al. The effect of ARC ablation on skeletal muscle morphology, function, and apoptotic signaling during aging [J]. *Exp Gerontol*, 2018, 101: 69-79.
 - [12] HA H J, PARK H H. Molecular basis for the effect of the L31F mutation on CARD function in ARC[J]. *FEBS Lett*, 2017, 591(18): 2919-2928.
 - [13] ZHANG J, WU Z, GUAN M, et al. Inhibition of ARC promoting the apoptosis of rat pulmonary arterial smooth muscle cells after serum deprivation in vitro[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(4): 3869-3876.
 - [14] MAO S Z, FAN X F, XUE F, et al. Intermedin modulates hypoxic pulmonary vascular remodeling by inhibiting pulmonary artery smooth muscle cell proliferation[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2014, 27(1): 1-9.
- (收稿日期: 2019-03-18 修回日期: 2019-04-18)