

生长因子介导 5-HD 在肺动脉高压中的抗增生作用

朱海萍 董 莉 陈成水

摘 要 目的 研究 mitoKATP 抑制剂 5-HD 对在体动物低氧性肺动脉高压和各生长因子表达的变化,探讨 5-HD 是否通过某生长因子的信号通路介导抗肺动脉平滑肌细胞增生的机制。方法 雄性 SD 大鼠 24 只,随机分为 3 组:A 组:常氧组;B 组:低氧组;C 组:低氧 + 5-HD 组。右心导管法测肺动脉平均压,ELISA 和免疫组化法检测 PDGF,VEGF,TGF- β_1 ,EGF 的表达。结果 ①低氧组 mPAP 较正常、低氧 + 5-HD 组均有明显升高,有统计学差异($P < 0.01$, $P < 0.05$)。低氧的 RVHI 较正常组明显升高,有统计学差异($P < 0.05$),但与低氧 + 5-HD 组间无统计学差异($P > 0.05$);②ELISA 结果表明 EGF 在低氧、低氧 + 5-HD 组中较正常组均有明显升高,有统计学差异($P < 0.05$)。但低氧与低氧 + 5-HD 组间无明显统计学差异($P > 0.05$)。低氧时 PDGF、VEGF、TGF- β_1 虽较正常组有升高,但无统计学差异($P > 0.05$);③免疫组化示低氧时肺动脉上 TGF- β_1 、EGF、PDGF 较正常组均有明显升高,有统计学差异($P < 0.01$, $P < 0.05$),且在肺动脉平滑肌层表达明显。其中 TGF- β_1 在低氧 + 5-HD 组明显下降,与低氧组间有明显统计学差异($P < 0.05$),与正常组间无明显差异($P > 0.05$)。结论 低氧时 TGF- β_1 表达明显上调,参与了肺动脉高压的形成,而 mitoKATP 拮抗剂 5-HD 可能通过减少 TGF- β_1 的表达发挥抗肺动脉平滑肌细胞的增生,降低肺动脉高压。

关键词 线粒体 ATP 敏感性钾通道 生长因子 肺动脉高压

5-hydroxydecanoate Mediated by Growth-factor on Hypoxia Pulmonary Hypertension by Anti-proliferation. Zhu Haiping, Dong Li, Chen Chengshui. The Respiratory Department in the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To study the mechanism that 5-hydroxydecanoate(5-HD) mediated by growth factor in pulmonary arterial smooth muscle cell anti-proliferation. **Methods** 24 healthy adult male SD rats were randomly divided into three groups: A for normal group; B for hypoxia group; C for hypoxia + mitoKATP inhibitor (5-HD) group. Using immunohistochemical staining and ELISA assay, we measured the expression of PDGF, VEGF, EGF, TGF- β_1 in lung tissue. **Results** ①Hypoxic group's mPAP was significantly increased, with significant difference ($P < 0.01$) than that of the normal group. The hypoxia + 5-HD group's mPAP was decreased significantly ($P < 0.05$). ②ELISA results showed that the expression of EGF in hypoxic and hypoxia + 5-HD group rats was significantly higher than the normal group ($P < 0.05$). However, hypoxia group and hypoxia + 5-HD groups had no significant difference ($P > 0.05$). ③Immunohistochemistry showed that the expression of the TGF- β_1 , EGF and PDGF was located on pulmonary artery smooth muscle layer, and their expression in hypoxia was significantly higher than in normal group, with a significant difference between the normal group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). While the expression of TGF- β_1 in hypoxia + 5-HD group was significantly decreased with significant difference as compared with the hypoxia group ($P < 0.05$), with no significant difference between the normal group ($P > 0.05$). **Conclusion** 5-HD enables the expression of TGF- β_1 in hypoxia group significantly decreased, suggesting that 5-HD might be mediated by TGF- β_1 signaling transduction pathways in pulmonary vascular remodeling.

Key words Mitochondrial ATP-sensitive potassium channel; Growth factor; Pulmonary artery hypertension

肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)的增生与迁移是肺动脉高压血管重建的重要特征。研究表明 PDGF, VEGF, TGF- β_1 , EGF 等促进了肺动脉平滑肌细胞, 内皮细胞等的增生^[1], 同时抑制了抗血管形成因子的分泌, 使增生与凋亡失衡, 促进肺血管重建。考虑

与 HIF-1 α 及线粒体上的钾通道如电压门控性钾通道(voltage-gated potassium channel, Kv), 钙离子激活性钾通道(calcium-activated K⁺ channel, K_{Ca2+})等密切相关^[2]。5-HD 是线粒体 ATP 敏感性钾通道(mitochondrial ATP-sensitive potassium channel, mitoKATP)的特异性抑制剂^[3], 已证实 5-HD 协抗 HPASMCs 的 mitoKATP 的开放, 防止氧自由基(ROS)的产生, 抑制 PASMCs 的增生, 促进凋亡^[4], 具体机制不明。本研究的目的就是通过 5-HD 在蛋白水平上

基金项目:浙江省自然科学基金重点项目(Z208100)

作者单位:325000 温州医学院附属第一医院呼吸科

通讯作者:陈成水, 电子信箱:ccs@hosp1.ac.cn

对 PDGF, VEGF, EGF, TGF - β_1 表达的变化, 探讨 5 - HD 是否通过某个或某些生长因子的信号通路介导了抗肺动脉平滑肌细胞增生的机制。

材料与方 法

1. 实验动物和试剂: 健康成年 SD 大鼠 24 只, 雄性, 体重 $200 \pm 20\text{g}$, 购自温州医学院实验动物中心, 5 - 羟基基酸盐 (5 - hydroxydecanoate, 5 - HD) Sigma 公司 ; EGF (R709) 兔源的多克隆抗体, PDGF - B (L48) 兔源的多克隆抗体为 Bioworld 公司, TGF - β_1 , VEGF 兔源的多克隆抗体均为美国 Santa 公司, 大鼠的 EGF, PDGF, VEGF, TGF - β_1 的 ELISA 试剂盒为武汉华美生物有限公司。PMSF, BCA 蛋白定量试剂盒系美国 Pierce 公司, PV - 9001 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒均为北京中杉金桥生物技术有限公司。其他常规化学试剂均为国产分析纯。

2. 低氧肺动脉高压模型的建立与分组: 24 只 SD 大鼠, 随机分 3 组, 每组 8 只: A: 常氧组; B: 低氧组; C: 低氧 + 5 - HD 组。将大鼠置于开孔式常压低氧舱内, 入舱前皮下注射 PBS 0.1ml/d , 每天低氧 8h, 连续 4 周, 测氧仪连续监测, 保持舱内氧浓度为 $10.0\% \pm 0.5\%$, 无水氯化钙吸收水蒸气, 钠石灰吸收 CO_2 , 控制 CO_2 浓度低于 3.0% 。5 - HD 干预方法: 大鼠在如上环境低氧 1 周后, 改皮下注射 PBS 为 5 - HD 为 $5\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 连续 3 周。

3. 肺动脉平均压 (mean pulmonary artery pressure, mPAP) 的测定: 5% 水合氯醛腹腔注射麻醉后, 采用右心导管法, 右锁骨中线做一切口, 将导管从右颈外静脉插入右心室到肺动脉, 记录右心室和肺动脉压力波, 测定肺动脉平均压。

4. 标本采集: 测完压力后, 分别剪下右下肺, 左下肺, 及心脏。取右下叶肺, 滤纸吸干, 称取约 250mg 后, 预冷的 PBS 冲洗残留血液, 滤纸吸干, 放入含 $1\% \text{ NP} - 40 + 1\text{mmol/L PMSF}$ 的 PBS 中^[5], 充分匀浆后, 4°C 离心 $10000\text{g} \times 4\text{min}$, 取上清夜, 留取少量标本进行 BCA 法测定蛋白含量, 余分装置 -70°C 冰箱保存。以上操作均在 4°C 冰上进行。左下肺 PBS 冲洗后, 置 4% 多聚甲醛固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 切成 $4\mu\text{m}$ 厚的切片。PBS 洗去血迹, 滤纸吸干, 剪去右心房, 分离出右心室 (RV) 和左心室 + 室间隔 (LV + S), 分别称重, 计算 $\text{RV}/(\text{LV} + \text{S})$ 的比率作为右心室肥厚的指数。

5. ELISA 法检测肺组织中的 PDGF, EGF, VEGF, TGF - β_1 的蛋白表达: 其中: PDGF 检测的范围是 $0.32 \sim 20\text{ng/ml}$; VEGF 检测的范围是 $1.6 \sim 100\text{pg/ml}$; EGF 检测的范围是 $7.8 \sim 500\text{pg/ml}$; TGF - β_1 检测的范围是 $0.8 \sim 50\text{ng/ml}$ 。按照双抗

体夹心 ELISA 试剂盒的说明书进行操作, 酶联仪在 450nm 波长依序测量各孔的光密度 (OD 值), 换算成相应的浓度。肺组织中的各 ELISA 值/蛋白浓度即为校正的单位浓度的 ELISA 值。

6. 免疫组化法检测: 按照 PV - 9001 二步法说明书进行。其中 PDGF, VEGF, EGF, TGF - β_1 各一抗稀释浓度均为 $1:100$, 用 PBS 液代替一抗作做性对照。显微镜下观察肺血管的染色情况, 其中细胞胞质呈棕黄色为阳性表达, 观察中小肺动脉上各生长因子的平均吸光度 (A) = 累积吸光度 (IOD)/面积 (area), 作为该蛋白表达的相对值。

7. 统计学处理: 所有数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 以 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 多组间比较用单因素的方差分析, 两两比较用 $LSD - t$ 检验。各生长因子与肺动脉平均压两两进行直线相关分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异有显著统计学意义。

结 果

1. 肺动脉平均压和 $\text{RV}/(\text{LV} + \text{S})$ 结果: 低氧组 mPAP 较正常组、低氧 + 5 - HD 组均有明显升高, 有明显统计学差异 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 而正常组与低氧 + 5 - HD 组间无明显统计学的差异 ($P > 0.05$)。

低氧组、低氧 + 5 - HD 组的 RVHI 较正常组均明显升高, 有明显统计学差异 ($P < 0.05$), 但低氧与低氧 + 5 - HD 组间无明显统计学差异 ($P > 0.05$) (表 1)。

表 1 各组大鼠间 mPAP 的水平和 RVHI 的比值 [$\bar{x} \pm s(n)$]

组别	mPAP	RV/(LV + S)
A	$9.87 \pm 0.87(6)$	$0.260 \pm 0.03018(6)$
B	$16.10 \pm 1.20(7)^{**}$	$0.291 \pm 0.01375(9)^{*}$
C	$11.85 \pm 1.03(7)^{***}$	$0.291 \pm 0.02330(8)^{*}$

n 为样本量; 与 A 组相比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; B 与 C 组相比较, $^{***}P < 0.01$

2. ELISA 法检测结果: 4 个生长因子中, EGF 在低氧时明显升高, 较正常组有明显差异 ($P < 0.05$); 与低氧 + 5 - HD 无统计学差异 ($P > 0.05$)。PDGF、VEGF、TGF - β_1 在低氧时虽有升高, 但较正常组均无统计学差异 ($P > 0.05$) (表 2)。

表 2 ELISA 法检测肺组织匀浆 VEGF, PDGF, EGF, TGF - β_1 的表达 [$\bar{x} \pm s(n)$]

组别	PDGF (ng/mg)	VEGF (pg/mg)	EGF (pg/mg)	TGF - β_1 (ng/mg)
A	$21.07 \pm 7.52(6)$	$11.44 \pm 5.86(5)$	$97.52 \pm 38.56(6)$	$3.36 \pm 1.80(6)$
B	$23.06 \pm 5.46(7)$	$15.49 \pm 10.57(7)$	$160.83 \pm 52.63(7)^{*}$	$4.57 \pm 1.96(7)$
C	$19.21 \pm 4.39(6)$	$10.34 \pm 7.61(7)$	$154.17 \pm 38.79(7)^{*}$	$3.83 \pm 1.45(7)$

与 A 组相比较, $^{*}P < 0.05$

3. 免疫组化结果:正常肺组织中主要由支气管上皮细胞,肺泡Ⅱ型上皮细胞,内皮细胞等分泌和表达 PDGF、VEGF、EGF、TGF- β_1 。本试验结果发现低氧时在肺动脉平滑肌细胞和内皮细胞上高度表达 Δ TGF- β_1 、PDGF、EGF 与正常组有明显差异($\Delta P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),但与低氧+5-HD 组相比,只有 TGF-

β_1 的表达明显下降,有统计学差异($P < 0.05$),与正常组无统计学差异($P > 0.05$)。EGF 在低氧时明显升高,与正常组有统计学差异($P < 0.05$),但与低氧+5-HD 组无统计学差异($P > 0.05$)(表 3,第 140 页彩图 7)。

表 3 免疫组化检测肺动脉 PDGF、VEGF、EGF、TGF- β_1 的表达[平均吸光度 A%, $\bar{x} \pm s(n)$]

组别	PDGF	VEGF	EGF	TGF- β_1
A	6.99 $\pm$ 1.13(6)	6.81 $\pm$ 1.68(9)	6.65 $\pm$ 1.30(7)	4.29 $\pm$ 0.83(5)
B	8.61 $\pm$ 1.64(7) *	7.34 $\pm$ 1.57(8)	9.52 $\pm$ 2.12(6) *	6.46 $\pm$ 0.86(8) **
C	7.52 $\pm$ 1.04(7)	7.74 $\pm$ 2.57(11)	8.09 $\pm$ 1.87(12)	4.79 $\pm$ 1.50(8) Δ

与 A 组相比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; B 与 C 组相比较, $\Delta P < 0.05$

4. ELISA 的 EGF,免疫组化的 EGF、TGF- β_1 与肺动脉平均压的相关性分析:结果表明,ELISA 的 EGF 与免疫组化的 EGF、TGF- β_1 与 mPAP 呈直线正相关,其 P 分别为 0.015、0.006、0.015, r 分别为 0.547、0.595、0.563。

讨 论

目前,线粒体 ATP 敏感性钾通道(mitoKATP)的开放与线粒体膜电位和细胞凋亡密切相关,备受重视。缺血或者低氧时,mitoKATP 被激活而开放,引起线粒体膜电位去极化,氧自由基(ROS)产生增多,除了低氧外,在非低氧的情况下如 Ang-Ⅱ 和凝血酶刺激血管平滑肌细胞,通过 ROS 依赖性的 PI₃K 途径或者是 PKC 促进 HIF-1 α mRNA 的转录^[6]。HIF-1 α 的上调又促进了其靶向基因 VEGF 等的表达,表明 ROS 与生长因子之间存在密切关联的。离体肺动脉高压模型已证实 5-HD 通过拮抗或者逆转 mitoKATP 的特异性开放剂二氮嗪的作用,防止氧自由基的产生,降低肺动脉高压^[7]。且 PDGF、VEGF、EGF、TGF- β_1 等生长因子在 PAH 中高度表达,那么 5-HD 是否通过 ROS 依赖性的信号通路介导各生长因子发挥抗 PSMCs 增生呢? 且 mitoKATP 与哪个生长因子关系密切,参与肺动脉血管重建呢?

综上所述考虑 5-HD 可能与 VEGF 相关,但本试验中并未发现 VEGF 在 5-HD 组中明显下降,且 ELISA 结果中 VEGF、PDGF 在低氧时无明显升高。虽然 PDGF 和 VEGF 水平的升高及其信号通路在肺动脉高压形成中起着重要的作用。PDGF 通过诱导 PSMCs 和成纤维细胞的增生和迁移,且主要在小的肺动脉的内皮细胞和 PSMCs 内表达^[8]; VEGF 特异性的促进内皮细胞分化和增生,正常时主要由肺泡Ⅱ

型上皮细胞表达,低氧时 VEGF 在血管平滑肌细胞表达明显增多,并与血管壁增厚相关^[9]。但 Katayose 和 Berg JT 曾先后分别通过杂交、RT-PCR 技术检测肺实质细胞中 PDGF-B mRNA 的水平,结果都发现 PDGF-B mRNA 水平在低氧 6h 时升高分别 1.6 和 2 倍,1 天达到高峰期,3 天后 PDGF-B mRNA 水平均降至正常水平,同时 VEGF mRNA 的水平在低氧时并没有明显的变化。考虑这与血管壁的压力及剪切力等相关^[10,11],同时与实验室条件及所选取的肺动脉不同有关,大、小肺动脉对低氧的反应是迥然不同的,因为低氧抑制了远端的 PSMCs 的增生^[12]。而本研究中免疫组化结果示低氧时肺动脉平滑肌层的 PDGF 表达明显升高,与 ELISA 结果有所差异,考虑是与选择的对象有关,分析软件时是以肺动脉为观察对象的。这也进一步证实了 PDGF 在低氧肺动脉高压中起重要作用。且 5-HD 组中 PSMCs 的 PDGF 与低氧组无差异,所以未能证实 5-HD 是通过 PDGF 的通路介导抗 PSMCs 增生的作用。本研究无论 ELISA 还是免疫组化,结果均示 EGF 在低氧组明显升高,提示 EGF 在低氧时高度表达,通过促进上皮细胞,内皮细胞,平滑肌细胞,成纤维细胞等的增生和分化,参与了肺动脉高压的形成机制。同时 5-HD 组中 EGF 也是高表达的,因此 EGF 可能没有介导 5-HD 降低肺动脉高压。并且目前尚未有相关的研究。

TGF- β 超家族包括 TGF- β_1 、TGF- β_2 、TGF- β_3 等,它们在细胞外基质中合成后,在体内都主要是以无活性的形式存在的,需要凝血酶,整合蛋白(a5 β 6),离子辐射等被激活后才能发挥重要的生理作用^[13]。而本实验中的 ELISA 试剂盒是没有用盐酸来激活的,故检测的是体内以潜在形式存在的 TGF-

β 超家族,包括 $\text{TGF} - \beta_1$, $\text{TGF} - \beta_2$, $\text{TGF} - \beta_3$ 或者是 $\text{BMP}^{[14]}$ 。且正常生理条件下, $\text{TGF} - \beta_1$ 主要分布在支气管上皮细胞,而肺泡 II 型上皮细胞,巨噬细胞,并且肺动脉的内皮细胞及血管下的间质细胞中也有表达。本研究提示低氧时 PSMCs 尤其是血管外的间质细胞中的 $\text{TGF} - \beta_1$ 高度表达,证实了 $\text{TGF} - \beta_1$ 参与肺血管重建。 $\text{TGF} - \beta_1$ 主要促进间质来源的细胞分化增生和诱导胶原在间质细胞的表达。同时减少了细胞周期依赖性激酶的抑制剂(如 p27 和 p57)的表达,诱导凋亡,另外可能通过减少 $\text{VEGFR} - 2$ 的表达来抑制了内皮细胞的迁移和增生,即通过自分泌或者旁分泌的机制参与肺动脉高压的血管重建^[13]。此外试验表明 5-HD 使低氧时 $\text{TGF} - \beta_1$ 的水平明显下降,推测 5-HD 可能参与了 $\text{TGF} - \beta_1$ 的信号传导通路,介导 PAH 的形成,具体机制不清楚,目前尚未有报道。研究表明低氧时 $\text{TGF} - \beta_1$ 表达显著增加,它上调了 NOx4 和氧自由基的表达,通过 Smad2/3 信号传导通路,调节肺动脉平滑肌细胞增生,是肺动脉重构的重要调控因子^[15]。因此 5-HD 是否通过 ROS 相关的信号通路介导,尚有待进一步证实。同时某些生长因子如 PDGF, EGF, $\text{TGF} - \beta_1$, $\text{TGF} - \alpha$ 和细胞因子 $\text{TNF} - \alpha/\beta$, 白介素 - 1 等会诱导 VEGF 的表达^[16],已经证实人胆管细胞癌中 $\text{TGF} - \beta_1$ 会刺激 VEGF 基因的转录^[17],即各生长因子之间存有“cross-talk”,那么是否其他的生长因子特别是 VEGF 也干预了 $\text{TGF} - \beta_1$ 的信号传导通路来介导抗 PSMCs 的增生降低 PAH? 据研究,5-HD 并不是 mitoKATP 的特异性拮抗剂,它是乙酰 CoA 合酶的一种底物,在体内代谢会迅速转变为 5-HD + CoA,成为线粒体呼吸链的一种底物抑制呼吸^[18]。所以 5-HD 是否会通过其他的作用机制参与降低肺动脉高压? 尚有待进一步证实。

参考文献

- 1 Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. Hypoxia - induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ Res*, 2006, 99(7): 675 - 691
- 2 Jeffery TK, Wanstall JC. Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. *Pharma Therap*, 2001, 92(1): 1 - 20
- 3 Liu YG, Sato T, Seharaseyon J. Mitochondrial ATP - dependent potassium channels. Viable candidate effectors of ischemic preconditioning. *Ann NY Acad Sci*, 1999, 874: 27 - 37
- 4 胡红玲, 汪涛, 徐永健, 等. Diazoxide 对低氧大鼠肺动脉平滑肌细胞内氧自由基的变化及细胞增殖的作用. *中国病理生理杂志*. 2007, 23(10): 2002 - 2006
- 5 Le Cras TD, Spitzmiller RE, Albertine KH, *et al.* VEGF causes pulmonary hemorrhage, hemosiderosis, and air spaces enlargement in neonatal mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 287(1): L134 - L142
- 6 Page EL, Robitaille GA, Pouyssegur J, *et al.* Induction of hypoxia - inducible factor - 1 alpha by transcriptional and translational mechanism. *J Bio Chem*, 2002, 277(50): 48403 - 48409
- 7 Qinghua Hu, Tao Wang, Zhengxiang Zhang, *et al.* 5 - Hydroxydecanoate inhibits proliferation of hypoxic human pulmonary artery smooth muscle cells by blocking mitochondrial KATP channels. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2007, 28(10): 1531 - 1540
- 8 Perros F, Montani D, Dorfmüller P, *et al.* Platelet - derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 178(1): 81 - 88
- 9 卢献灵, 何建国. 肺动脉高压的炎症发病机制. *中华结核和呼吸杂志*, 2009, 32(11): 862 - 865
- 10 Katayose D, Ohe M, Yamauchi K, *et al.* Increased expression of PDGF A - and B - chain genes in rat lungs with hypoxic pulmonary hypertension. *Am Physiol*, 1993, 264(2), L100 - L106
- 11 Berg JT, Breen EC, FU Z, *et al.* Alveolar hypoxia increases gene expression of extracellular matrix proteins and platelet - derived growth factor - B in lung parenchyma. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 158(6): 1920 - 1928
- 12 Stiebellehner L, Frid MG, Reeves JT, *et al.* Bovine distal pulmonary arterial media is composed of a uniform population of well - differentiated smooth muscle cells with low proliferative capabilities. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 285(4): L819 - L828
- 13 Richter A, Yeager ME, Zaiman A, *et al.* Impaired transforming growth factor - β signaling in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004, 170(12): 1340 - 1348
- 14 Ambalavanan N, Nicola T, Hagood J, *et al.* Transforming growth factor - β signaling mediates hypoxia - induced pulmonary arterial remodeling and inhibition of alveolar development in newborn mouse lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295(1): L86 - L95
- 15 Sturrock A, Cahill B, Hoidal JR, *et al.* Transforming growth factor - beta 1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species - dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 290(4): L661 - 673
- 16 Oue TA, Yoneda A, Shima H, *et al.* Increased vascular endothelial growth factor peptide and gene expression in hypoplastic lung in nitrofen induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *Pediatr Surg Int*, 2002, 18(4): 221 - 226
- 17 Benckert C, Jonas S, Cramer T. Transforming growth factor β 1 stimulates vascular endothelial growth factor gene transcription in human cholangiocellular carcinoma cells. *Cancer res*, 2003, 63(5): 1083 - 1092
- 18 Halestrap AP, Clarke SJ, Khaliulin I. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1767(8): 1007 - 1031

(收稿: 2010 - 03 - 11)

(修回: 2010 - 06 - 15)