

nox5 表达异常对缺血性心肌病患者循环 EPCs 功能的影响

李 虹 刘 强 白小涓 王宁夫

摘 要 **目的** 探查缺血性心肌病患者循环内皮祖细胞(endothelial progenitor cells,EPCs)功能是否异常,了解活性氧(reactive oxygen species,ROS)和 ROS 生成的相关基因 nox5 表达对 EPCs 功能的影响。**方法** 入选缺血性心肌病患者及健康对照组各 7 例,测定外周血 EPCs 数量、增殖、迁移、成血管能力的改变,检测 nox5 蛋白及 mRNA 的表达,进一步沉默 nox5 表达,检测对 EPCs 功能及 ROS 产量的影响。**结果** 与健康对照组比较,缺血性心肌病患者循环 EPCs 数目、增殖、迁移能力等未见异常;但体外培养过程中内皮系表面标志 KDR 的表达减少,体外成血管能力下降,伴随 nox5 蛋白及 mRNA 表达增加、活性氧生成增加;沉默 nox5 表达可降低细胞内 ROS 产量,改善 EPCs 成血管能力。**结论** 本研究提示,缺血性心肌病患者循环 EPCs 体外成血管能力异常,细胞内 ROS 生成增加,ROS 生成的相关基因 nox5 蛋白及 mRNA 表达上调;沉默 nox5 表达可降低细胞内 ROS 产量并改善 EPCs 功能。

关键词 内皮祖细胞 nox5 缺血性心肌病 活性氧

Effects of Nox5 Expression Disorders on Circulatory Endothelial Progenitor Cells Ability in Patients with Ischemic Cardiomyopathy. Li Hong, Liu Qiang, Bai Xiaojuan, Wang Ningfu. Department of Cardiology, The First People's Hospital of Hangzhou, Zhejiang 310006, China

Abstract Objective To detect if circulatory endothelial progenitor cells (EPCs) of ischemic cardiomyopathy(ICM) were in an anomalous position, and to find if the mRNA and protein expression of nox5, as a irreplaceable gene that related to the production of reactive oxygen species (ROS), has effects on EPCs function. **Methods** 7 patients of ICM and 7 healthy people as control, were taken peripheral venous blood to isolate mononuclear cells, then CD34⁺/KDR⁺ cells were counted. Proliferation, migration and vascularization of EPCs cultured *in vitro* were detected, together with protein and mRNA expression of nox5. Further studies were done to investigate if silencing nox5 gene expression would improve EPCs function and decrease ROS production. **Results** There was no significant difference in quantity, proliferation and migration between ICM group and control. KDR expression and vascularization ability declined in ICM group, accompanied by increasing gene expression of nox5 and ROS production. Silencing nox5 gene expression decreased ROS production and improved EPCs vascularization ability of ICM patients. **Conclusion** The study found circulatory EPCs of ICM patients may have dysdifferentiation to endothelial cells, together with protein expression of nox5 increased and ROS production elevated. Silencing nox5 gene expression decreased ROS production and made EPCs vascularization ability better.

Key words Endothelial progenitor cells; Nox5; Ischemic cardiomyopathy; Reactive oxygen species

缺血性心肌病(ischemic cardiomyopathy,ICM)是指由于长期心肌缺血导致心肌局限性或弥漫性纤维化,从而产生心脏收缩和(或)舒张功能受损,引起心脏扩大或僵硬、充血性心力衰竭、心律失常等一系列临床表现的临床综合征。ICM 是发达和发展中国家重要的死亡原因^[1]。目前 ICM 治疗的瓶颈在于如何

有效重建损毁的心肌微血管网。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells,EPCs)可以介导成体的血管发生,被认为是成体重建血管的最有希望的措施^[2]。但 EPCs 研究时间尚短,有关 ICM 患者 EPCs 功能状态及基因表达的相关研究很少,也缺乏系统性,这使得 EPCs 的临床应用受到很大限制。由此本课题组进行了如下研究,探查 ICM 患者外周血 EPCs 的功能异常、活性氧(ROS)及活性氧生成的相关基因 nox5 表达异常对 EPCs 功能的影响。

对象与方法

1. 缺血性心肌病入选及排除标准:入选标准①经冠状动

基金项目:杭州市卫生科技计划资助项目(重点 2009)

作者单位:310006 杭州市第一人民医院心血管内科(李虹、王宁夫);310009 杭州,浙江大学医学院附属第二医院老年病科(刘强);110001 沈阳,中国医科大学附属第一医院(白小涓)

通讯作者:王宁夫,电子信箱:rainbowheart2003@126.com

脉造影检查结果为阳性;②纽约心脏病学会(NYHA)心功能分级为Ⅱ~Ⅳ级;③超声心动图检查提示左心室内径增大(左心室舒张末期容积 $>6.0\text{cm}$),左心室射血分数(LVEF) $<50\%$;④年龄 ≥ 18 岁,性别不限;⑤首次确诊,既往未经任何相关药物治疗或未曾规律持续治疗;⑥患者本人知情同意。(2)研究排除标准:①合并室壁瘤、恶性心律失常、急性左心力衰竭者;②合并严重肝、肾功能不全者;③低血压($<90/60\text{mmHg}$)或未控制的高血压($>180/110\text{mmHg}$);④严重电解质紊乱未纠正者;⑤排除其他心脏病或其他原因引起的心脏扩大和心力衰竭(如瓣膜性心脏病、先天性心脏病、肥厚型心肌病、甲状腺功能亢进症、贫血、自身免疫性疾病等);⑥半年内有急性心肌梗死、急性脑血管病史或者严重创伤或重大手术、感染或急性炎症性疾病;⑦合并糖尿病、重度阻塞性肺气肿、恶性肿瘤、关节及神经系统疾病;⑧孕妇及哺乳期妇女;⑨精神病患者。

2. 分组:选择2007年1月~2009年12月于笔者医院心内科住院的缺血性心脏病患者7例,笔者医院体检中心体检证实的健康人7例作为对照组。

3. 材料:EGM-2培养液购于Lonza Bioscience;FITC-CD34小鼠抗人单克隆抗体、PE-VEGF-2(KDR)小鼠抗人单克隆抗体购自BD公司;胎牛血清购于Gibco;Ficoll、FITC-UEA-1购自Sigma;羧花青染料标记乙酰化低密度脂蛋白(Dil-ac-LDL)购自美国Molecular Probe;Trizol reagent及RT-PCR试剂盒购自美国Invitrogen;nox5兔抗人多克隆抗体购自美国Santa Cruz;二苯基四氮唑溴盐(MTT)购自华美生物工程公司;双氢乙酰乙酸二氯荧光黄(DCFH-DA);Invitrogen公司;纤维连接蛋白(Fibronectin)购自Chemicon公司;化学发光试剂盒购自Amersham Biosciences。流式细胞仪:美国BD公司;改良的Boyden小室:江苏海门麒麟医用仪器厂。

4. 方法:(1)外周血EPCs水平的测定:外周静脉血2ml,肝素抗凝。密度梯度离心法分离单个核细胞,收集 1×10^6 个细胞重悬于 $100\mu\text{l}$ 的PBS中,加入FITC-CD34单克隆抗体、PE-KDR单克隆抗体,同型对照为FITC标记和PE标记的小鼠IgG,对细胞进行标记,经避光孵育、洗涤后上机分析。采用BD公司的FACS Calibur流式细胞仪以CellQuest软件进行流式细胞分析。在前向角和侧向角散射光双参数点图上对淋巴细胞群设窗,共收集细胞10000个,检测CD34和KDR双阳性($\text{CD34}^+/\text{KDR}^+$)的细胞百分率。(2)外周血EPCs的分离培养、鉴定、分组及siRNA干扰:1)EPCs分离及培养:严格无菌条件下取清晨空腹肘静脉血30ml,收集于含肝素的离心管中,加入等体积PBS液,充分混匀,沿管壁缓缓将稀释的抗凝血加入盛有Ficoll淋巴细胞分离液的离心管中(抗凝血与淋巴细胞分离液体积比2:1), $400g$ 离心30min,吸出乳白色单个核细胞层,PBS洗涤离心2次后,细胞沉淀重悬于EGM-2培养基中,以 $1 \times 10^6/\text{cm}^2$ 接种于培养板(预先用 $5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Fibronectin于 37°C 包被3h)中,置 37°C , 5% CO_2 培养箱培养。第4天换液,洗去非贴壁细胞,以后每周换液1~2次,培养至21

天。2)EPCs的鉴定:采用如下方法:①荧光显微镜法:将培养的细胞在含有Dil-ac-LDL的培养液中孵育24h,然后用4%中性甲醛 4°C 固定10min,PBS漂洗后加FITC-UEA-1($10\text{mg}/\text{L}$)1h,在荧光显微镜下同时显示双荧光阳性的细胞为正在分化的EPC。不加Dil-ac-LDL和FITC-UEA-1的同批培养细胞作空白对照;②流式细胞技术:细胞以0.125%胰酶消化后,制成 1×10^9 个/升的单个细胞悬液,加入FITC-CD34、PE-VEGF-2(KDR)及同型对照抗体, 4°C 避光孵育30min,流式细胞仪分析细胞CD34、VEGFR-2(KDR)的表达。3)EPCs分组及siRNA干扰:分为健康对照组、缺血性心肌病组、缺血性心肌病干扰组。缺血性心肌病干扰组对培养的缺血性心脏病患者的EPCs进行nox5的siRNA干扰,以沉默nox5的mRNA表达。以NCBI GenBank提供的人nox5(No. NM_024505)mRNA编码区序列为模板,由上海吉玛生物制药公司设计并化学合成非特异性siRNA和3对nox5 siRNA,根据预实验结果选择干扰效果最佳1对,具体序列为5'-CUUCGACUGCAGCUUCAUCUU-3'及5'-GAUGAAGCUG-CAGUCGAAGUU-3'。按照Lipofectamine TM 2000说明书进行nox5 siRNA Lipofectamine TM 2000混合物制备,经过优化实验,最终选用siRNA浓度为 $100\text{nmol}/\text{L}$,最佳干扰时间为36h。(3)外周血EPCs的功能测定:1)MTT法测定细胞活力:0.125%胰蛋白酶消化收集贴壁细胞,培养基重悬,制备成细胞悬液,每孔 $200\mu\text{l}$ 接种到包被纤维连接蛋白的96孔培养板,每孔加 $10\mu\text{l}$ MTT($5\text{mg}/\text{ml}$),培养4h后,吸弃上清液,再加入二甲亚砜($150\mu\text{l}$ /孔),于微量振荡器充分振荡10min,置酶标仪490nm处测A值。2)细胞迁移能力:0.125%胰蛋白酶消化收集贴壁细胞,EGM-2培养基制备成细胞悬液。于下室内加入 $600\mu\text{l}$ EGM-2培养基,上室加入细胞悬液 $200\mu\text{l}$,置于 5% CO_2 , 37°C 培养箱中孵育24h,擦去滤膜上面未移动的细胞,甲醇固定,Giemsa染色,显微镜下随机选择5个视野($\times 200$),计算迁移到底层的细胞数。3)体外成血管能力的检测:0.125%胰蛋白酶消化收集贴壁细胞,EGM-2培养基制备成细胞悬液,等量接种于包被有纤维连接蛋白的培养板上,倒置显微镜下观察新生血管生成情况。新生血管定义为形成管状结构,长为宽的4倍,通过倒置显微镜($\times 200$)随机选择10个视野观察,用Adobe Photoshop分析每个视野总的新生血管数后取其均值。(4)ROS检测:DCFH-DA可被细胞内活性氧氧化为二氯荧光黄(DCF)发出绿色荧光,用DCFH-DA作为探针流式细胞仪检测细胞内DCF的平均荧光强度,可相对定量细胞内活性氧水平。消化收集细胞,冰PBS洗3次。加入 $10\mu\text{mol}/\text{L}$ 的DCFH-DA避光反应30min,PBS洗3次,流式细胞仪比较两组平均荧光强度。(5)nox5的mRNA及蛋白表达检测:1)RT-PCR检测nox5的mRNA表达:Trizol试剂(Gibco)提取细胞总RNA,紫外分光光度计检测RNA量和纯度。所用RNA的A260/A280均在1.8~2.0之间。用AMV反转录酶将RNA反转录为cDNA。以cDNA为模板进行PCR扩增反应,PCR特异性引物序列为:上游5'-CTGAAG-

GCTGTAGAGGCACCATGAG - 3', 下游 5' - GTCAGCTGGTC-CAGCTTCTCGTCAG - 3'。扩增条件为: 94℃ × 20s; 60℃ × 20s; 72℃ × 30s, 循环 35 次。扩增产物的长度为 475bp, 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后凝胶成像分析系统分析。GAPDH 吸光度作为内对照。2) Western blotting 检测 nox5 的蛋白表达: RIPA Buffer 裂解液提取总蛋白, 考马斯亮兰法测蛋白含量, 调整蛋白浓度。煮沸变性 5min, 15% SDS - PAGE 电泳后半干转印仪转膜, 5% 脱脂奶粉的 TBST (0.05% 的 Tween - 20) 封闭 1h, 1: 100 稀释的一抗 4℃ 孵育过夜, 辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1.5h, 洗膜后化学发光法显色, 以 β - actin 为内对照。

表 1 两组一般资料的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	舒张压(mmHg)	收缩压(mmHg)	体重指数(kg/m ²)	总胆固醇(mmol/L)	低密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	三酰甘油(mmol/L)
健康对照组	74.11 ± 8.04	129.88 ± 12.75	23.11 ± 2.28	6.57 ± 1.01	3.53 ± 0.38	1.52 ± 0.25
缺血性心肌病组	68.15 ± 7.25	138.12 ± 14.02	22.79 ± 3.54	7.21 ± 1.42	4.01 ± 0.49	1.60 ± 0.39

2. 外周血 EPCs 的数目: CD34⁺/KDR⁺ 的细胞通常被认为是正在分化的 EPCs, 缺血性心肌病组与健康对照组 CD34⁺/KDR⁺ 的细胞百分率未见差异 (0.082 ± 0.008 vs 0.091 ± 0.009, $P > 0.05$)。

3. 外周血 EPCs 鉴定: (1) 形态观察: 分离所得的外周血单个核细胞在培养第 3 ~ 4 天可见部分贴壁细胞呈梭形; 自第 6 ~ 7 天起出现多个集落, 中央为圆形细胞, 周边为放射状梭形细胞; 培养至 14 ~ 21 天, 细胞紧密融合生长, 呈现“铺路石”样的成熟内皮细胞形态特征 (图 1)。(2) 荧光显微镜初步鉴定, 两组细胞能摄取 Dil - ac - LDL (呈红色), 并能与 FITC - UEA - 1 结合 (呈绿色), 其中双染阳性 (呈黄色)

5. 统计学方法: 数据由 SPSS 12.0 统计软件包处理。计量资料统计结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 样本均数的比较采用 t 检验和方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 基线资料: 两组年龄 (69.6 ± 17.4 岁 vs 65.2 ± 15.2 岁, $P > 0.05$)、性别构成比 (男性 57.1% vs 女性 42.9%, $P > 0.05$) 未见差异。缺血性心肌病组血压、血脂水平 (总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、三酰甘油)、体重指数未见统计学差异 (表 1)。

的细胞被认为是正在分化的 EPCs (图 2)。(3) 运用流式细胞仪检测培养至第 7 天的细胞, 缺血性心肌病组和健康对照组表达血管内皮祖细胞表面标记 CD34 的阳性细胞率分别为 (77.5 ± 3.5)% vs (75.3 ± 3.9)% ($P > 0.05$), 表达内皮细胞表面标记 KDR 的阳性细胞率分别为 (9.53 ± 2.8)% vs (9.96 ± 2.5)% ($P > 0.05$), 两组未见差异; 培养至 21 天, 表达 CD34 的阳性细胞率分别为 (10.1 ± 2.7)% vs (5.6 ± 1.4)% ($P < 0.05$), 表达 KDR 的阳性细胞率分别为 (53.6 ± 4.5)% vs (63.9 ± 5.2)% ($P < 0.05$), 缺血性心肌病组内皮细胞表面标志的表达低于健康对照组, 但内皮祖细胞表面标志的表达则高于对照组 (图 3)。

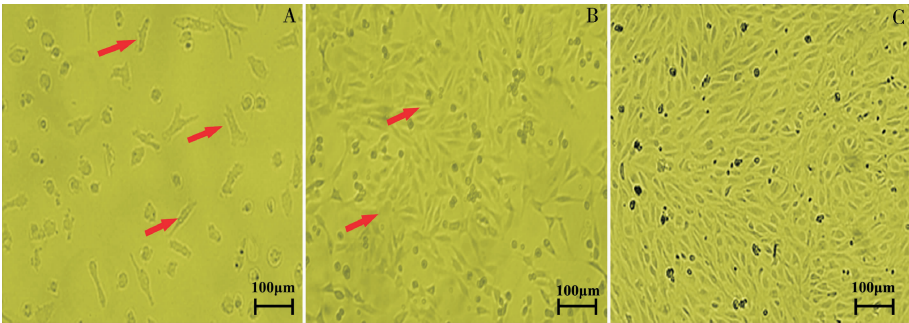


图 1 EPCs 培养过程形态变化 (× 100)
A. 培养 4 天; B. 培养 7 天; C. 培养 21 天

4. EPCs 功能测定: 与健康对照组比较, 缺血性心肌病组外周血 EPCs 增殖、迁移能力有下降趋势, 但未见差异; 成血管能力则显著下降, 干扰组成血管能力高于缺血性心肌病组, 与健康对照组无显著差异

(表 2)。

5. EPCs 的 ROS 水平: 与健康对照组比较, 缺血性心肌病组 ROS 产量明显增高 (209.1 ± 50.3 vs 276.8 ± 59.4, $P < 0.05$), 干扰组活性氧水平显著低

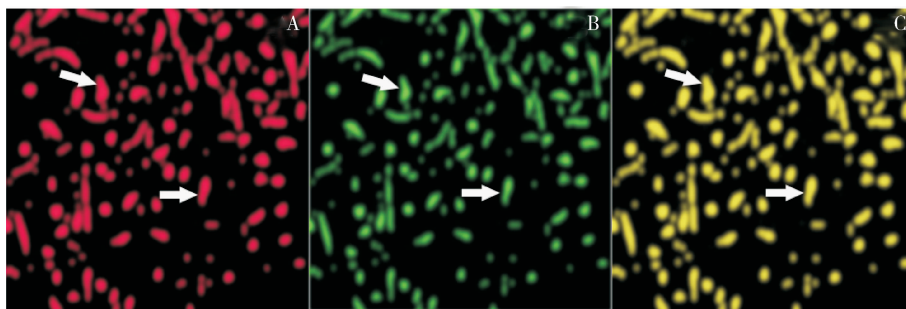


图2 荧光显微镜体外培养的细胞($\times 200$)

A. 为能摄取 Dil - ac - LDL 的细胞,呈现红色;B. 能与 FITC - UEA - 1 结合的细胞,呈现绿色;
C. 双染阳性的细胞,呈黄色,认为是正在分化的 EPCs

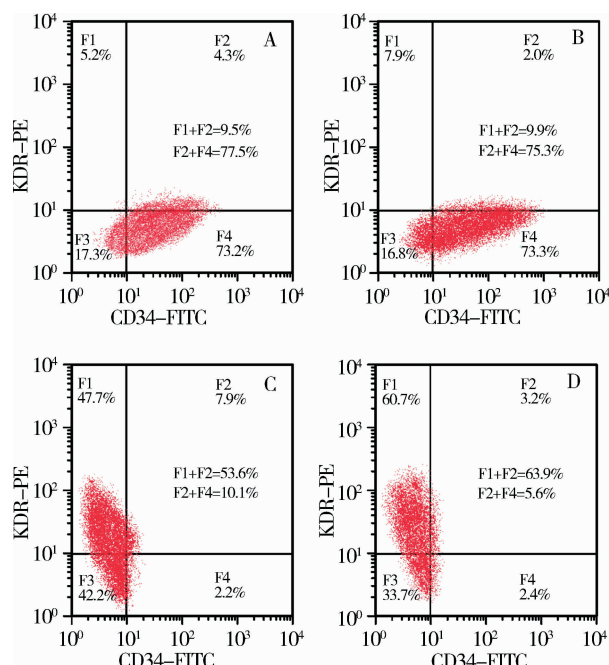


图3 流式细胞仪检测内皮祖细胞表面标志变化

A. 第7天缺血性心肌病组;B. 第7天健康对照组;
C. 第21天缺血性心肌病组;D. 第21天健康对照组

表2 外周血 EPCs 功能测定($\bar{x} \pm s$)

组别	增殖 A_{490}	迁移细胞数 ($\times 200$)	新生血管数 ($\times 200$)
健康对照组	0.218 ± 0.058	12.8 ± 4.2	28.6 ± 6.8
缺血性心肌病组	0.191 ± 0.047	10.1 ± 2.7	$13.6 \pm 3.7^*$
缺血性心肌病干扰组	0.203 ± 0.045	1238 ± 3.9	$27.7 \pm 5.6^{\#}$

与健康对照组比较, $^* P < 0.05$; 与缺血性心肌病组比较, $^{\#} P < 0.05$

于缺血性心肌病组 (210.2 ± 48.6 vs 276.8 ± 59.4 , $P < 0.05$)。

6. EPCs 的 nox5 表达:与健康对照组比较,缺血性心肌病组 nox5 的 mRNA、蛋白表达上调,100nmol/

L siRNA 干扰 36h 后可明显降低缺血性心肌病组 nox5 的 mRNA、蛋白表达(图4)。

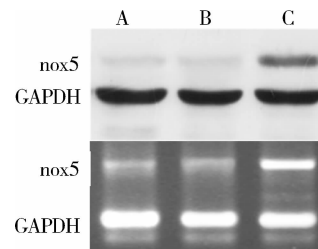


图4 体外培养的循环内皮祖细胞 nox5 的蛋白及 mRNA 表达

A. 健康对照组;B. 缺血性心肌病干扰组;C. 缺血性心肌病组

讨 论

缺血性心肌病(ischemic cardiomyopathy, ICM)临床表现类似于扩张性心肌病,是长期严重的冠状动脉缺血造成的,一旦确诊,预后很差,5 年生存率低于 60%^[1]。迄今临床仍缺乏有效的治疗手段。心肌微血管网损毁是缺血性心肌病临床治疗困难的重要原因。促进心肌微血管新生,重建心肌微血管网,是未来治疗缺血性心肌病的关键手段。内皮祖细胞(EPCs)是血管内皮细胞的前体细胞,是参与成体血管发生的关键细胞,被认为是实现缺血性心肌病微血管新生的最有前景的方式^[2,3]。探明缺血性心肌病患者 EPCs 存在的异常及可能的原因,是临床成功应用 EPCs 治疗缺血性心肌病的前提和基础。然而 EPCs 的相关研究仅短短的 10 余年,目前有针对性的心力衰竭患者的 EPCs 的研究,有应用 EPCs 等干细胞治疗急性心肌梗死后心功能不全的研究,但缺乏专门针对 ICM 患者外周血来源的 EPCs 数量、功能、基因表达异常等各方面的研究资料^[4,5]。本研究发现:缺血性心肌病患者外周血 EPCs 体外成血管能力显著减弱,此结果提示缺血性心肌病患者 EPCs 出

现成血管能力的受损,这意味着缺血性心肌病患者心肌微血管受损后缺乏有效的修复机制。本研究中,缺血性心肌病组未见 EPCs 数量、增殖、迁移能力的异常。这与目前有些文献研究的结果相反。如 Fortini 等^[6]研究显示:心力衰竭病人的外周血 EPCs 数目是增加的。考虑原因可能为:①上述研究入选人群为多种原因所致的心力衰竭患者,如扩张性心肌病、肥厚型心肌病、高血压性心脏病、缺血性心肌病等。而上述疾病存在显著的异质性,其病理生理机制迥异,可能对实验结果有一定影响;②上述研究未排除疾病应用药物的影响,如他汀类、血管紧张素转化酶抑制剂等,但多项研究提示这些药物可促进骨髓 EPCs 的动员和缺血区的归巢。本研究以缺血性心肌病为特定的观察人群,并排除了治疗药物的影响,可能更为准确的反映了缺血性心肌病患者外周血 EPCs 的状态。本研究中,与健康对照组比较,缺血性心肌病组外周血 EPCs 增殖及迁移能力仅有下降趋势,未见差异;同时细胞表面标志分析发现,缺血性心肌病组体外培养的 EPCs 内皮细胞系表面标志 KDR 表达减少,而内皮祖细胞系表面标志 CD34 表达增高,可能提示:①研究样本量小,扩大样本量可能会出现增殖迁移能力等的差异;②缺血性心肌病外周血 EPCs 出现分化异常,分化为内皮细胞的能力受损,导致体外成血管能力下降,损毁的微血管重建障碍。

那么缺血性心肌病 EPCs 受损的可能机制是什么? 现有研究提示:心血管疾病尤其是心肌缺血、心力衰竭等,与活性氧(ROS)损伤密切相关^[7,8]。缺血性心肌病 EPCs 的 ROS 表达情况如何? 其功能受损是否与 ROS 损伤相关呢? 本研究提示:与健康对照组比较,缺血性心肌病患者外周血 EPCs 的 ROS 表达显著增高。

细胞内的 ROS 生成主要依赖 NADPH 氧化酶。NADPH 氧化酶家族包括 7 个成员,其中已经分离出的,血管及内皮 ROS 生成相关的 4 个成员是 nox1、2、4、5。nox5 发现的时间较短,研究较少,已有的研究提示 nox5 可能主要调节细胞增殖、细胞因子的生成等。nox5 的主要特点是:作用方式与其他的家族成员有显著区别,其激活并不依赖于 NADPH 氧化酶的其他亚单位(如 p22phox)^[9]。本研究观察了外周血 EPCs 的 nox5 的 mRNA 和蛋白表达。结果显示:与健康对照组比较,缺血性心肌病组外周血 EPCs 的 nox5

的 mRNA 及蛋白表达增加,在沉默 nox5 表达后,EPCs 活性氧生成显著下降,同时伴随成血管能力的改善。此结果提示 nox5 表达上调可能是缺血性心肌病细胞内 ROS 异常增高的主要原因,ROS 增高可导致 EPCs 功能受损,沉默 nox5 表达有助于缺血性心肌病 EPCs 功能的改善。

本研究最终提示,缺血性心肌病患者外周血 EPCs 细胞内 ROS 生成增加,体外成血管能力受损,nox5 表达上调是 ROS 增加的重要原因,沉默 nox5 表达可减低细胞内 ROS 产量,改善 EPCs 功能。但本研究病例数偏少,尚需进一步阐明 nox5 表达异常与 EPCs 功能改变的细胞内通路,为成功实现 EPCs 临床治疗缺血性心肌病奠定一定的理论基础。

参考文献

- 1 Lourenso C, Saraiva F, Martins H, *et al.* Ischemic versus non - ischemic cardiomyopathy - are there differences in prognosis? Experience of an advanced heart failure center[J]. *Rev Port Cardiol*, 2011, 30(2):181 - 197
- 2 Ferrari R, Beltrami CA, Tavazzi L. Concerns and hopes for stem cell therapy in cardiology: focus on endothelial progenitor cells[J]. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2010, 10(3):216 - 223
- 3 Napoli C, Hayashi T, Cacciatore F, *et al.* Endothelial progenitor cells as therapeutic agents in the microcirculation: an update[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 215(1):9 - 22
- 4 Tousoulis D, Andreou I, Tsiatas M, *et al.* Effects of rosuvastatin and allopurinol on circulating endothelial progenitor cells in patients with congestive heart failure: the impact of inflammatory process and oxidative stress[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 214(1):151 - 157
- 5 Kumar AH, Caplice NM. Clinical potential of adult vascular progenitor cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(6):1080 - 1087
- 6 Fortini C, Toffoletto B, Fucili A, *et al.* circulating stem cell vary with nyha stage in heart failure patients[J]. *J Cell Mol Med*, 2010;3
- 7 Costa VM, Carvalho F, Bastos ML, *et al.* Contribution of catecholamine reactive intermediates and oxidative stress to the pathologic features of heart diseases[J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(15):2272 - 2314
- 8 Kawahara T, Jackson HM, Smith SM, *et al.* Nox5 forms a functional oligomer mediated by self - association of its dehydrogenase domain [J]. *Biochemistry*, 2011, 50(12):2013 - 2025
- 9 Montezano AC, Burger D, Ceravolo GS, *et al.* Novel Nox homologues in the vasculature: focusing on Nox4 and Nox5[J]. *Clin Sci Lond*, 2011, 120(4):131 - 141

(收稿:2011 - 07 - 12)

(修回:2011 - 07 - 27)