

小鼠子宫内表面蛋白的二维电泳研究

叶天民 彭鼎佳 肖佳 杨树标

摘要 目的 运用生物素标记表面蛋白联合二维电泳技术发现小鼠子宫内腔上皮表面胚胎着床相关表面蛋白。方法 对孕第1天(不接受胚胎阶段)和第4天(接受胚胎阶段)小鼠宫腔注入生物素进行标记,将抽提纯化后的表面蛋白进行二维电泳比较,发现的差异表达点用质谱进行分析确定,并用免疫组化方式进行验证。结果 发现20个差异表达超过3倍的蛋白,其中接受胚胎阶段高表达蛋白13个,不接受胚胎阶段高表达蛋白7个。并用质谱发现确定了 aminopeptidase N (APN)、annaxinA₂ 和 intergrin β 1 等蛋白。通过免疫组织化学方法验证了二维电泳的结果。结论 笔者通过生物素标记小鼠子宫内腔上皮表面,并联合二维电泳发现了一些在接受胚胎着床阶段和不接受胚胎阶段差异表达的表面蛋白以及一些和胚胎着床相关的重要蛋白。

关键词 小鼠 表面蛋白 二维电泳

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.09.020

Identify the Mouse Uterine Epithelial Surface Protein by Two-dimensional Electrophoresis. Ye Tianmin, Peng Dingjia, Xiao Jia, et al. Center of Reproductive Medicine, The University of Hong Kong - Shenzhen Hospital, Guangdong 518053, China

Abstract Objective To identify mouse uterine epithelial surface proteins by biotin labeled with two-dimensional electrophoresis (2DE). **Methods** Biotin solution was infused into the day one (pre-receptive) and day 4 (receptive) pregnant mice uterine cavity. The extracted and purified surface proteins from two group mice were compared by 2DE and identified by tandem mass spectrometry (MS/MS). The comparable protein expression was further confirmed by immunohistochemical study. **Results** A total of 20 proteins were identified, whose expression were three times than the other group. There were 13 proteins high-expressed in the receptive mouse and 7 proteins in the pre-receptive mouse. The proteins such as APN, annaxinA₂, intergrin β 1 etc. were identified by MS/MS. Immunohistochemical study was applied to confirm the protein expression pattern. **Conclusion** We had compared the proteome of biotin-labeled endometrial luminal epithelial surface between pre-receptive and receptive stage and identified a set of proteins specifically expressed in these stages. Some of them were demonstrated to be related to blastocyst attachment.

Key words Mouse; Surface protein; 2DE

不孕症是当今困扰人类生殖繁衍的一大问题。虽然目前已经拥有了体外受精等辅助生殖技术,且适宜着床的内膜、优质胚胎的选择等问题均已得到解决,但临床上许多胚胎移植以后仍然难以成功妊娠。其中的主要症结之一在于胚胎的着床问题。而不管对人类还是哺乳动物而言,着床是在一定的时间才能发生的,这段时间称之为着床窗。对人类而言,子宫内腔上皮细胞对于胚胎处于开放接受状态的时间仅在着床窗那几天,一般认为是在排卵后的6~10天。对小鼠而言,着床窗一般在排卵后的4~5天。一旦错过了这个时间,着床将不能发生。

哺乳动物的生殖过程中,胚胎着床是一个非常重

要的事件。而且在哺乳动物的不同物种之间,着床的几个基本的步骤都是非常类似的,主要包括定位、黏着和侵入。定位指囊胚于内膜表面不稳定的黏着。此后,黏着步骤指囊胚滋养细胞开始具有黏着能力并黏于子宫内腔表面。接下来滋养细胞突破内腔上皮层,侵入内膜的间质,即侵入过程。这些步骤是在母体甾体性激素的调控下完成的,并且需要胚胎和子宫之间和谐而精密的对话。该系列对话是由诸多分子通路所介导的,包括性激素、细胞因子、生长因子、黏着分子和脂质等^[1]。而在子宫内腔上皮处于对胚胎接受的着床窗时,上皮细胞的基膜、桥粒、细胞骨架及细胞质会发生改变和变化。所以笔者预测子宫腔上皮细胞表面的一些蛋白对于胚胎的定位和黏着是非常至关重要的。

蛋白质组学技术是目前一项研究蛋白质有效而常用的方法。在笔者的研究中,并没有将整块子宫内腔组织消化和蛋白提取处理后再进行分析,而是瞄准了

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(2015A030310470)

作者单位:518053 香港大学深圳医院生殖医学中心及生育调控重点实验室(叶天民、彭鼎佳、杨树标);510632 广州,暨南大学附属第一医院临床研究院(肖佳)

通讯作者:叶天民,电子邮箱:yetm@hku-szh.org

腔上皮细胞表面的蛋白质进行蛋白质组学的研究;因为,着床的早期阶段就是在腔上皮表面发生。在本研究中,笔者将孕第1天(不接受胚胎阶段)及孕第4天(接受胚胎阶段)的小鼠腔上皮表面进行了生物素结合标记,然后提取表面蛋白后进行二维电泳及质谱分析。最后再进行免疫组化验证。

材料与方 法

1. 生物素标记小鼠子宫内腔腔上皮表面:本研究所有健康雌性及雄性 ICR 和 GFP 小鼠由香港大学实验动物中心提供。所有实验均得到香港大学实验动物伦理学委员会批准。将成年 6~8 周 ICR 雌性小鼠分别与正常雄性及行输精管结扎术后的绝育雄性小鼠放在同一笼中过夜。第 2 天检查雌性小鼠的阴道是否有白色精液栓。有栓的小鼠视为成功交配,此天为孕第 1 天或者假孕第 1 天。将与绝育雄鼠交配后假孕第 1 天及与正常雄性小鼠交配后孕第 4 天的 ICR 小鼠进行麻醉。行开腹手术,暴露子宫,每侧宫角处注射 25 μl 生物素标志物(0.25 mg/ml,美国 Thermo 公司),关腹腔缝合后放回笼内。1h 后,将小鼠处死,取出子宫后用眼科镊分离出子宫内膜后用磷酸缓冲液(PBS)冲洗 3 次。

2. 生物素标记蛋白的纯化提取:分离出的小鼠子宫内腔腔组织,用液氮处理后捣碎,用生物素标记表面蛋白提取试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司)中的裂解液溶解,离心后取上清液。根据试剂盒的实验步骤提取目标蛋白质,进行后续的二维电泳。

3. 二维双向电泳及质谱分析:二维电泳参考其他文献的方法^[2]。第一维电泳时每次上样量为 30 μg,胶条为 7cm IPG 胶(非线性,pH 值 3~10,美国 Bio-Red 公司),之后第二维电泳用 12.5% 的 SDS-PAGE 胶进行分离,每一组均用 5 个样本进行二维电泳。然后进行标准银染。胶样用 ImageScan 的扫描仪(美国

Amersham Biosciences 公司)进行高清扫描,得到的图片运用 Image Master 2D Elite 4.01 软件(美国 Amersham Biosciences 公司)进行对比分析。经过软件标准化分析后,有差异表达的蛋白对应的胶上的点用刀片切出后进行质谱分析^[3]。

4. 免疫组化:小鼠内膜组织经过固定、石蜡包埋之后,进行常规石蜡切片制片。切片上组织厚度为 5 μm。切片经脱蜡后进行处理。GFP 小鼠囊胚组内膜直接加上羊抗兔二抗(1:500)(丹麦 Dako 公司)处理 0.5h,然后用 ABC(生物素-辣根过氧化物酶)处理,最后用 DAB 显色。其他组织切片则用传统免疫组化的抗原修复、过氧化氢处理,加一抗(1:100)、二抗(1:500)后用 ABC + DAB 法显色。其中一抗为兔抗鼠 APN 和 integrin β1(美国 Santa Cruz 公司),二抗为羊抗兔 IgG(丹麦 Dako 公司)。

结 果

1. 标记不接受胚胎阶段及接受胚胎阶段小鼠子宫内腔腔表面蛋白:图 1 为进行免疫组化染色后的小鼠子宫内腔腔组织切片,被生物素标记的子宫内腔腔表面有染色,而对照组未见染色。

2. 不接受胚胎阶段及接受胚胎阶段小鼠子宫内腔腔表面蛋白的二维电泳:将生物素标记的小鼠子宫内腔腔表面蛋白进行分离纯化后,进行了二维电泳,图 2 为两个不同阶段小鼠子宫内腔腔表面蛋白二维电泳胶的扫描图。通过 Imagemaster 软件进行分析后,笔者共发现了 47 个差异表达超过 2 倍的蛋白,其中接受胚胎阶段高表达蛋白 29 个,不接受胚胎阶段高表达蛋白 18 个;在这里面发现 20 个差异表达超过 3 倍的蛋白,其中接受胚胎阶段高表达蛋白 13 个,不接受胚胎阶段高表达蛋白 7 个(表 1)。图 3 显示了其中部分差异表达蛋白的放大胶点图。

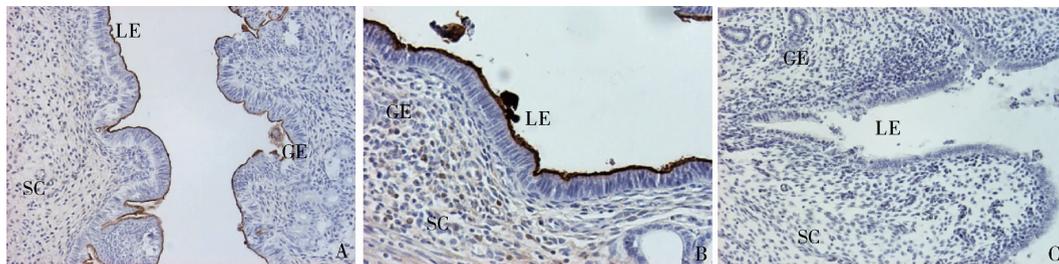


图 1 生物素免疫组化染色后的小鼠内膜组织学图像(×200)

A. 经生物素标记后孕第 1 天小鼠子宫内腔腔组织中的免疫染色; B. 经生物素标记后孕第 4 天小鼠子宫内腔腔组织中的免疫染色; C. 对照组,未经生物素标记的小鼠子宫内腔腔组织; LE. 腔上皮; GE. 腺上皮; SC. 间质细胞

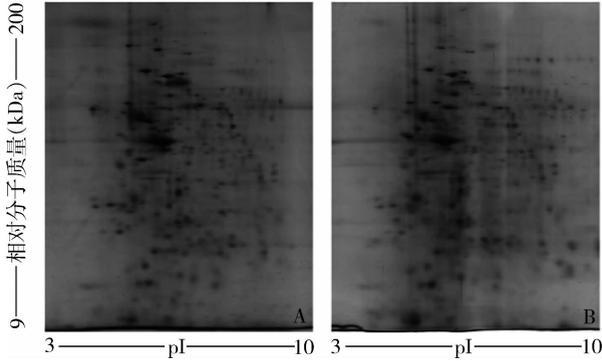


图2 孕第1天和第4天小鼠子宫内腔上皮表面蛋白二维电泳胶扫描图

小鼠子宫内腔上皮表面蛋白经过抽提和纯化后第一维用pH值3~10的IPG胶条进行等电聚焦,第二维用SDS-PAGE胶进行电泳,胶进行银染显色
A. 孕第1天;B. 孕第4天

3. 差异表达蛋白的质谱分析:将二维电泳中发现的差异表达蛋白进行切胶后提取纯化,并进行质谱分析,差异表达超过3倍的蛋白质,详见表1。

4. 部分差异表达蛋白的免疫组化染色:为了验证二维电泳发现差异表达蛋白的结果,检测子宫内膜组织的 *intergrin β1* 和 *AP-N* 的表达,笔者对孕第1天和孕第4天的小鼠子宫内膜组织切片进行免疫组化染色。*intergrin β1* 在孕第1天小鼠子宫内膜表面的表达明显高于孕第4天小鼠(图3A、B), *AP-N* 在孕第4天小鼠子宫内膜表面的表达明显高于孕第1天小鼠(图3C、D),这些结果与二维电泳中发现的结果一致。

讨 论

到目前为止,胚胎的滋养层是如何黏着于可接受

表1 不接受胚胎阶段及接受胚胎阶段小鼠子宫内膜表面差异蛋白列表

蛋白名称	在胚胎着床中可能存在的作用
在内膜接受胚胎阶段高表达的蛋白	
alpha-1 - antitrypsin 1-2	此家族蛋白在胚胎着床早期均为高表达 ^[4]
alpha-2 - macroglobulin	调节巨细胞功能和胎儿免疫保护 ^[5]
neprilysin	调节阿片肽类功能,后者对于子宫内膜间质细胞蜕膜化和胚胎着床起重要作用 ^[6]
aminopeptidase N	消化血管形成中的相关多肽。调节子宫内膜微环境 ^[7]
transthyretin	在小鼠胚胎着床前上调 ^[8]
murinoglobulin	在小鼠胚胎着床处表达 ^[9]
antithrombin - III	在正常受孕女性月经分泌中期的表达高于不孕女性 ^[10]
plasminogen	此蛋白受体在小鼠胚胎表面有表达与胚胎着床相关 ^[11,12]
kininogen - 1	硫基蛋白酶抑制剂,此蛋白酶在胚胎着床中功能激活 ^[13]
annexin A	在胚胎着床阶段高表达 ^[14]
vitronectin	一种细胞黏附分子,是 <i>integrin</i> 家族的配体,对于胚胎着床起重要作用 ^[15]
serotransferrin	生育中重要的免疫调节蛋白 ^[16]
apolipoprotein A - I	一种细胞黏附分子,是 <i>integrin</i> 家族的配体,对于胚胎着床起重要作用 ^[15]
在内膜不接受胚胎阶段高表达的蛋白	
mucin 4	异位妊娠子宫内中膜中高表达 ^[17]
adenyl cyclase associated protein 1	在小鼠孕2天小鼠子宫内膜有表达 ^[18]
spectrin beta chain	在异位妊娠子宫内中膜表达高于正常受孕子宫 ^[17]
collagen alpha-1 (VI) chain	在胚胎着床处的表达水平降低 ^[19]
integrin beta-1	抑制该蛋白表达不影响体外小鼠胚胎着床 ^[20]

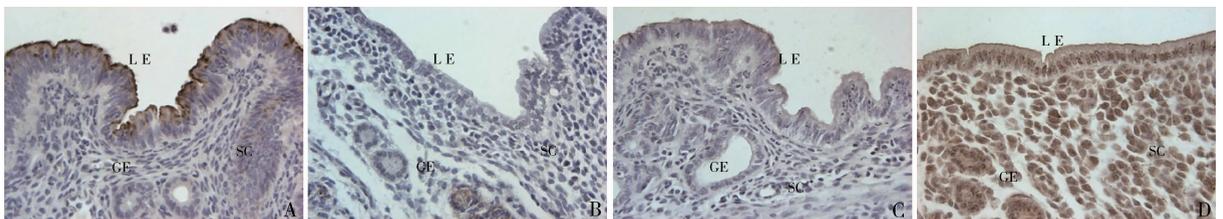


图3 差异表达蛋白中 *intergrin β1* 和 *AP-N* 组织学图像(×400)

A. *intergrin β1* 孕第1天小鼠子宫内膜组织中的表达; B. *intergrin β1* 孕第4天小鼠子宫内膜组织中的表达;
C. *AP-N* 孕第1天小鼠子宫内膜组织中的表达;D. *AP-N* 孕第4天小鼠子宫内膜组织中的表达;
LE. 腔上皮;GE. 腺上皮;SC. 间质细胞

胚胎状态子宫内膜并进而完成着床尚不明确。近些年,一些比较蛋白质组学研究运用于小鼠或人类子宫内膜组织的着床相关蛋白的发现和研^[10, 21-24]。这些研究都是对子宫内膜组织的全部细胞蛋白质组学的研究。在笔者的研究中,集中发现了子宫内腔上皮细胞表面蛋白的差异表达,这样降低了其他蛋白的信息干扰,集中发现与胚胎黏着有关的蛋白。

为了发现和胚胎黏着相关的蛋白,选取接受胚胎阶段和不接受胚胎阶段的内膜的子宫内腔上皮细胞进行蛋白质组学比较。其中的表面蛋白用生物素进行了标记。而且这种标记是不可穿透性的。只有细胞表面的蛋白才会被标记,并且用免疫染色进行了确认,在图 1A 和 B 的子宫内膜表面可以见到一层标志物生物素的染色。对于生物素的浓度和作用时间都进行了预实验(这部分数据没有展示)。笔者发现 30min 的标记时间和 0.25mg/ml 的生物素浓度可以得到最佳的效果。因为如果用过大的生物素浓度或者过长的标记时间都会见到内膜间质部出现生物素的踪迹。一般 4~5 只小鼠的标记蛋白足够用于一个样本的后续实验。

经过抽提纯化后的蛋白通过二维电泳进行分离比较。经过 ImageMaster 软件的分析,笔者发现了在接受胚胎阶段有 12 个蛋白高表达,在不接受胚胎阶段有 7 个蛋白高表达(均 >2 倍的表达水平)。初步看来蛋白酶活性抑制剂相关蛋白表达升高,可能与滋养细胞侵入阶段溶解相关细胞有关。因为滋养细胞侵入和肿瘤的浸润不完全相同,滋养细胞的侵入需要调控侵入时溶解细胞的数量和深度有关。因为,没有控制的滋养细胞侵入和胎盘植入有相关性。这方面的蛋白在孕期猪的子宫内膜也有明显表达。kininogen-1 是巯基蛋白酶抑制剂,此蛋白酶在人类胚胎着床中功能激活^[13]。类似的 alpha-1-antitrypsin 1-2 也是分泌性蛋白酶抑制剂,在水牛的早期胚胎着床阶段有高表达^[4]。alpha-2-macroglobulin 是一个广谱的蛋白酶抑制剂,和小鼠胚胎着床前定位有关^[25]。在差异表达的蛋白中,已经有研究报道过 vitronectin 和胚胎着床的有关,它是 integrin $\alpha v \beta 3$ 的配体,后者是囊胚黏着阶段的重要相关蛋白,也是内膜容受性的重要标记^[15]。在小鼠着床中,如果 integrin 受体被阻断,着床点的数量会显著减少^[26]。Annexin A₂ 也是曾经报道过的胚胎着床相关蛋白,在人类子宫内膜中,annexin A₂ 在内膜接受胚胎着床期高

表达而在接受胚胎着床的前期为低表达;这些结果说明 annexin A₂ 在胚胎着床中有相关的功能作用^[14]。近年来,annexin A₂ 在生殖领域的研究在不断深入。目前发现,annexin A₂ 在胚胎着床中的作用是通过 RhoA 的激活和蛋白的调节而产生的^[27]。

在不接受胚胎的阶段发现的高表达蛋白中,很多都是与免疫活性和细胞结构有关。其中有些蛋白如 mucin-4 和 spectrin beta-chain 在异位妊娠女性的子宫内膜中有高表达^[17]。mucin-4 是 mucin 家族中的一员,是细胞黏附的抑制剂,它在子宫内膜上皮表面的缺失是囊胚黏着的重要前提^[28]。而且 mucin-4 的表达下调是受到性激素调控的^[29]。其他蛋白在此阶段的表达已经有相关文献报道过。例如, collagen alpha-1(VI) chain 在胚胎着床前和着床后均有高表达。

综上所述,笔者通过生物素标记小鼠子宫内腔上皮表面,并联合二维电泳发现了一些在接受胚胎着床阶段和不接受胚胎阶段差异表达的表面蛋白,并发现了一些和胚胎着床相关的重要蛋白。

参考文献

- Namiki T, Ito J, Kashiwazaki N. Molecular mechanisms of embryonic implantation in mammals: lessons from the gene manipulation of mice [J]. *Reprod Med Biol*, 2018, 17(4): 331-342
- Lau AT, Chiu JF. Proteomic and biochemical analyses of in vitro carcinogen-induced lung cell transformation: synergism between arsenic and benzo(a)pyrene[J]. *Proteomics*, 2006, 6(5): 1619-1630
- Li XQ, Zhang SL, Cai Z, et al. Proteomic identification of tumor-associated protein in ovarian serous cystadenocarcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2009, 275(1): 109-116
- Kandasamy S, Jain A, Kumar R, et al. Molecular characterization and expression profile of uterine serpin (SERPINA14) during different reproductive phases in water buffalo (*Bubalus bubalis*) [J]. *Anim Reprod Sci*, 2010, 122(1-2): 133-141
- Gustafsson C, Mjosberg J, Matussek A, et al. Gene expression profiling of human decidual macrophages: evidence for immunosuppressive phenotype [J]. *PLoS One*, 2008, 3(4): e2078
- Tamm K, Room M, Salumets A, et al. Genes targeted by the estrogen and progesterone receptors in the human endometrial cell lines HEC1A and RL95-2 [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2009, 7: 150
- Forde N, Spencer TE, Bazer FW, et al. Effect of pregnancy and progesterone concentration on expression of genes encoding for transporters or secreted proteins in the bovine endometrium [J]. *Physiol Genomics*, 2010, 41(1): 53-62
- Diao H, Xiao S, Cui J, et al. Progesterone receptor-mediated up-regulation of transthyretin in preimplantation mouse uterus [J]. *Fertil Steril*, 2010, 93(8): 2750-2753
- Croy BA, He H, Esadeg S, et al. Uterine natural killer cells: in-

- sights into their cellular and molecular biology from mouse modelling [J]. *Reproduction*, 2003, 126(2): 149 – 160
- 10 Hannan NJ, Stephens AN, Rainczuk A, *et al.* 2D – DiGE analysis of the human endometrial secretome reveals differences between receptive and nonreceptive states in fertile and infertile women[J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(12): 6256 – 6264
 - 11 Carroll PM, Richards WG, Darrow AL, *et al.* Preimplantation mouse embryos express a cell surface receptor for tissue – plasminogen activator[J]. *Development*, 1993, 119(1): 191 – 198
 - 12 Affalo ED, Sod – Moriah UA, Potashnik G, *et al.* Differences in the implantation rates of rat embryos developed in vivo and in vitro: possible role for plasminogen activators[J]. *Fertil Steril*, 2004, 81(Suppl 1): 780 – 785
 - 13 Kawato H, Tabata T, Minoura H, *et al.* Factor XIII gene expression in endometrial stromal cells during decidualisation [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2009, 21(7): 840 – 847
 - 14 Wang B, Ye TM, Lee KF, *et al.* Annexin A₂ acts as an adhesion molecule on the endometrial epithelium during implantation in mice [J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0139506
 - 15 Armant DR, Kaplan HA, Mover H, *et al.* The effect of hexapeptides on attachment and outgrowth of mouse blastocysts cultured in vitro: evidence for the involvement of the cell recognition tripeptide Arg – Gly – Asp[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83(18): 6751 – 6755
 - 16 Anderson DJ, Abbott AF, Jack RM. The role of complement component C3b and its receptors in sperm – oocyte interaction[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(21): 10051 – 10055
 - 17 Mettler L, Salmassi A, Schollmeyer T, *et al.* Comparison of c – DNA microarray analysis of gene expression between eutopic endometrium and ectopic endometrium (endometriosis) [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2007, 24(6): 249 – 258
 - 18 Yang H, Lei C, Zhang W. Expression of galectin – 3 in mouse endometrium and its effect during embryo implantation [J]. *Reprod Biomed Online*, 2012, 24(1): 116 – 122
 - 19 Hurst PR, Gibbs RD, Clark DE, *et al.* Temporal changes to uterine collagen types I, III and V in relation to early pregnancy in the rat [J]. *Reprod Fertil Dev*, 1994, 6(6): 669 – 677
 - 20 Shiokawa S, Yoshimura Y, Nagamatsu S, *et al.* Function of beta 1 integrins on human decidual cells during implantation [J]. *Biol Reprod*, 1996, 54(4): 745 – 752
 - 21 Burnum KE, Tranguch S, Mi D, *et al.* Imaging mass spectrometry reveals unique protein profiles during embryo implantation [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(7): 3274 – 3278
 - 22 Parmar T, Gadkar – Sable S, Savardekar L, *et al.* Protein profiling of human endometrial tissues in the midsecretory and proliferative phases of the menstrual cycle [J]. *Fertil Steril*, 2009, 92(3): 1091 – 1103
 - 23 Dominguez F, Garrido – Gomez T, Lopez JA, *et al.* Proteomic analysis of the human receptive versus non – receptive endometrium using differential in – gel electrophoresis and MALDI – MS unveils stathmin 1 and annexin A₂ as differentially regulated [J]. *Hum Reprod*, 2009, 24(10): 2607 – 2617
 - 24 Li J, Tan Z, Li M, *et al.* Proteomic analysis of endometrium in fertile women during the prereceptive and receptive phases after luteinizing hormone surge [J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(3): 1161 – 1163
 - 25 Esadeg S, He H, Pijnenborg R, *et al.* Alpha – 2 macroglobulin controls trophoblast positioning in mouse implantation sites [J]. *Placenta*, 2003, 24(10): 912 – 921
 - 26 Illera MJ, Cullinan E, Gui Y, *et al.* Blockade of the alpha (v) beta (3) integrin adversely affects implantation in the mouse [J]. *Biol Reprod*, 2000, 62(5): 1285 – 1290
 - 27 Garrido – Gomez T, Dominguez F, Quinonero A, *et al.* Annexin A₂ is critical for embryo adhesiveness to the human endometrium by RhoA activation through F – actin regulation [J]. *FASEB J*, 2012, 26(9): 3715 – 3727
 - 28 Aplin JD, Meseguer M, Simon C, *et al.* MUC1, glycans and the cell – surface barrier to embryo implantation [J]. *Biochem Soc Trans*, 2001, 29(Pt 2): 153 – 156
 - 29 Idris N, Carraway KL. Carraway, Regulation of sialomucin complex/ Muc4 expression in rat uterine luminal epithelial cells by transforming growth factor – beta: implications for blastocyst implantation [J]. *J Cell Physiol*, 2000, 185(2): 310 – 316
- (收稿日期:2018 – 12 – 04)
(修回日期:2018 – 12 – 11)
-
- (上接第 89 页)
- 15 Fujishima S, Gando S, Daizoh S, *et al.* Japanese Association for Acute Medicine Sepsis Registry (JAAM SR) Study Group. Infection site is predictive of outcome in acute lung injury associated with severe sepsis and septic shock [J]. *Respirology*, 2016, 21(5): 898 – 904
 - 16 Bartko J, Schoergenhofer C, Schwameis M, *et al.* Dexamethasone inhibits endotoxin – induced coagulopathy in human lungs [J]. *J Thromb Haemost*, 2016, 14(12): 2471 – 2477
 - 17 Ramli J, CalderonArtero P, Block RC, *et al.* Novel therapeutic targets for preserving a healthy endothelium: strategies for reducing the risk of vascular and cardiovascular disease [J]. *Cardiol J*, 2011, 18(4): 352 – 363
 - 18 Cox LA, Van Eijk LT, Ramakers BP, *et al.* Inflammation – induced increases in plasma endocan levels are associated with endothelial dysfunction in humans in vivo [J]. *Shock*, 2015, 43(4): 322 – 326
 - 19 Uehara Y, Murata Y, Shiga S, *et al.* NSAIDs diclofenac, indomethacin, and meloxicam highly upregulate expression of ICAM – 1 and COX – 2 induced by X irradiation in human endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 479(4): 847 – 852
- (收稿日期:2018 – 12 – 09)
(修回日期:2018 – 12 – 27)