

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2017.01.004

血管内皮生长因子 165 对心肌样细胞增殖的影响*

孙丰年^{1▲} 王彦富² 张慧玲² 郭道通² 韩朝鑫² 李清贤^{2△}(¹ 济宁医学院, 济宁 272067; ² 济宁医学院附属医院, 济宁 272029)

摘要 **目的** 探讨携带血管内皮生长因子 165 (vascular endothelial growth factor 165, VEGF165) 基因的腺病毒 (Ad-VEGF165) 转染至心肌样细胞对其表达 VEGF165 及增殖活性的影响。**方法** 提取、培养、鉴定骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs); 体外诱导 BMSCs 为心肌样细胞。构建携带 VEGF165 基因的腺病毒载体并转染至心肌样细胞; 实验分为 3 组: Ad-VEGF165 转染心肌样细胞作为实验组; 未携带 VEGF165 基因的腺病毒转染心肌样细胞作为空载体组; 未处理的心肌样细胞作为空白对照组。在 1 周内检测各组 VEGF165 的表达及心肌样细胞的增殖活性。**结果** VEGF165 在实验组可正常表达, 与空载体组、对照组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 心肌样细胞增殖活性在实验组中最佳, 显著优于空载体组和对照组 ($P < 0.05$)。**结论** 成功将 Ad-VEGF165 转染至心肌样细胞, 且表达的 VEGF165 可增强心肌样细胞的增殖活性。

关键词 VEGF165; 骨髓间充质干细胞; 心肌样细胞; 心肌梗死

中图分类号: R541.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2017)02-016-06

The influence of vascular endothelial growth factor 165 on myocardial cell proliferation

SUN Fengnian, WANG Yanfu, ZHANG Huiling, LI Xiangting, JIN Qifeng, GUO Daotong, HAN Chaixin, LI Qingxian

(¹ Jining Medical University, Jining 272067, China;

² The Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272029, China)

Abstract: Objective Vascular endothelial growth factor 165 (VEGF165) gene adenovirus was transfected into myocardial cells to investigate the expression of VEGF165 and proliferation activity of influence. **Methods** Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were extracted, cultured and identified. The BMSCs were induced myocardial cells in vitro. The adenovirus vector carrying VEGF165 gene was constructed and transfected into myocardial cells. The experiment was divided into three groups: Ad-VEGF165 was transfected into myocardial cells as the experimental group. No carrying VEGF165 gene adenovirus was transfected into myocardial cells as empty carrier group. Untreated myocardial cells were as blank control group. Within 1 week between groups the expression of VEGF165 and myocardial cells proliferation activity was detected. **Results** The experiments showed that the experimental group VEGF165 could be expressed, and compare with the empty vector group and the control group with statistical significance ($P < 0.05$). The myocardial cells in the experimental group had the best proliferation activity, and significantly better than an empty vector group and the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The Ad-VEGF165 was transfected into myocardial cells, and VEGF165 could enhance the activity of cell proliferation.

Keywords: Vascular endothelial growth factor 165; Bone marrow mesenchymal stem cells; Cardiomyocytes; Myocardial infarction

近年来随着分子生物学的发展, 基因工程和细胞移植在心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 研究

方面一直是非常有前景的治疗策略。细胞移植特别是骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs), 因其易获得、增殖能力强、多向分化潜能等特性, 在 MI 的研究中被认为是理想的种子细胞。血管内皮生长因子 165 (vascular endo-

* [基金项目] 山东省自然科学基金 (ZR2015HM083)

△ [通信作者] 李清贤, E-mail: Liqingxian1956@126.com

▲ 孙丰年, 济宁医学院 2014 级研究生

thelial growth factor 165, VEGF165) 因其具有保护心脏^[1]、促进血管生成作用,在缺血性心脏病领域被广泛研究,并被批准应用于临床^[2]。研究表明构建携带 VEGF165 基因的腺病毒在改善缺血性心衰的心肌收缩力方面具有非常显著的作用^[3];使用 VEGF165 基因修饰 BMSCs 移植治疗 MI 具有一定疗效^[4-6]。最新研究报道,将已分化的心肌样细胞移植治疗小鼠心肌梗死可以显著改善其梗死后心脏功能和心肌收缩力^[7]。本文将携带 VEGF165 基因的腺病毒(Ad-VEGF165)转染至已分化心肌样细胞,探讨对其增殖能力及表达目的蛋白影响的实验研究,旨在为其进一步应用于 MI 治疗提供理论及技术支持。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与腺病毒:雄性 SD 大鼠,4 周龄,体重 80-100g,购自山东省动物实验中心。腺病毒:Ad-VEGF165 由“汉恒生物科技(上海)有限公司”构建合成。

1.1.2 试剂 DMEM/F12 培养基、1 × PBS、0.25% 胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;青-链霉素、肝素购自北京 solarbio 公司;兔 IgG1 同型对照抗体购自美国 Bioss Inc 公司;兔抗大鼠 CD31-PE、兔抗大鼠 CD45-FITC 购自美国 Bioss Inc 公司;小鼠 IgG2a 同型对照抗体、小鼠抗大鼠 CD90-PerCP 购自德国 Miltenyi Biotec 公司;小鼠 IgG1 同型对照抗体、小鼠抗大鼠 CD44-FITC 购自美国 Bio-Rad 公司;SD 大鼠骨髓间充质干细胞成骨、成脂诱导分化培养基购自美国 Cyagen 公司;CCK-8 检测试剂盒购自日本 Dojindo 公司;人 VEGF165 酶联免疫试剂盒购自美国 Abcam 公司;5-氮杂胞苷(5-AZA)、碱性成纤维细胞生长因子、胎牛血清购自美国 Sigm 公司;逆转录试剂盒、SYBR Green PCR 试剂盒购自广州复能基因公司;引物:由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成(表 1)。

表 1 基因上游、下游引物序列

基因	上游引物	下游引物
ACTN-2	ATTTGCGACCACTGGGATAG	GCTCTCTTGGCAAACCTCCAG
Cx43	AACAGTCTGCCTTTTCGCTGT	GGGCACAGACACGAATATGA
GATA4	TCTCACTATGGCCACAGCAG	GGAGATGGATAGCCTTCTGG
cTnT	CCCTCAAAGACAGGATCGAA	CTGTTCTCTCTCTCTCACC
GAPDH	AAGGGCTCATGACACAGTC	ACTGGATGCAGGGATGATGT

1.2 实验方法

1.2.1 BMSCs 的提取、培养 颈椎脱位法处死 4 周龄 SD 大鼠并置于 75% 乙醇消毒 5min;超净台中分离 SD 大鼠股骨,剃净置于 9cm 培养皿中。手术剪迅速剪开骨端,10ml 注射器抽吸无血清培养基反复冲洗骨髓腔,直至变白。将冲洗液置于 15ml 离心管,1200r/min 离心 8min,弃上清。将沉淀用含 10% 胎牛血清的培养基重悬后加入培养瓶中,置入细胞培养箱培养。24h 半量换液,2~3d 全量换液;倒置荧光显微镜观察细胞生长状态,当细胞融合至 90% 左右时,1:2 传代。

1.2.2 BMSCs 的鉴定 1) 诱导分化能力:将 3 代 BMSCs 接种于六孔板(10⁵ 个/孔),按照成骨、成脂诱导说明书进行成骨、成脂诱导。2) 流式细胞术检测:BMSCs 表面抗原:取生长状态良好的 3 代 BMSCs(1 × 10⁶ cells/ml) 100μl,分别加入荧光素标记的抗体(CD31-PE、CD44-FITC、CD45-FITC、CD90-PerCP)和相对应的同型对照抗体,混匀,4° 避光孵育 30min。洗涤 2 次,上流式细胞仪检测。

1.2.3 BMSCs 诱导分化为心肌样细胞 取生长状态良好的 3 代 BMSCs,接种于 6 孔板(10⁵ 个/孔),使用含有 5-氮杂胞苷(5-AZA, 10μM)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF, 10ng/ml) 无胎牛血清(FBS)的培养基培养 24h 后, PBS 冲洗,使用含 bFGF(10ng/ml)、5% FBS 的培养基继续培养 3 周,每 2~3d 换液 1 次^[8]。倒置荧光显微镜观察 BMSCs 分化状态。

1.2.4 qPCR 检测心肌样细胞特异性因子的表达 使用 Trizol 试剂提取 BMSCs 和心肌样细胞的总 RNA,将提取的总 RNA 使用逆转录试剂盒根据说明书获得 cDNA,通过使用管家基因(GAPDH)作为对照分析心肌样细胞特异性因子(ACTN-2, Cx43, GATA4, cTnT)的表达。反应条件为:预变性 95℃ 10min;变性 95℃ 10s;退火 60℃ 20s;延伸 72℃ 30s,45 个循环;溶解曲线分析 72℃ ~ 95℃ 0.5℃/6s;降温 25℃ 30s,使用 2^{-ΔΔCt} 法评估相关基因的表达水平。

1.2.5 Ad-VEGF165 感染心肌样细胞 将培养于 6 孔板内已诱导 3 周的心肌样细胞,以 MOI 值为 80 进行腺病毒感染,实验分为 3 组:Ad-VEGF165 感染已分化的心肌样细胞作为实验组;未携带 VEGF165 基因的腺病毒感染已分化的心肌样细胞作为空载体组;已分化的心肌样细胞作为空白对照

组。在感染 24、36h 后倒置荧光显微镜下观察实验组、空载体组荧光分布情况,评估腺病毒对已分化的心肌样细胞的感染效率。

1.2.6 心肌样细胞表达 VEGF165 及其活性的影响 取 3 组心肌样细胞分别接种于 96 孔板(10⁴ 个/孔),每组设 3 个复孔,收集 1 周内各孔上清液,ELISA 法检测心肌样细胞表达 VEGF165 的情况;另取已分为 3 组的心肌样细胞接种于 96 孔板,每组设 3 个复孔,于培养后 1 ~ 7d 分别使用 CCK-8 法检测心肌样细胞的活性。

1.3 统计学分析

数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析,计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较:若资料方差齐,采用 LSD-*t* 检验;若资料方差不齐,采用 Tamhane's T2 检验,*P* < 0.05 具有统计学意义。

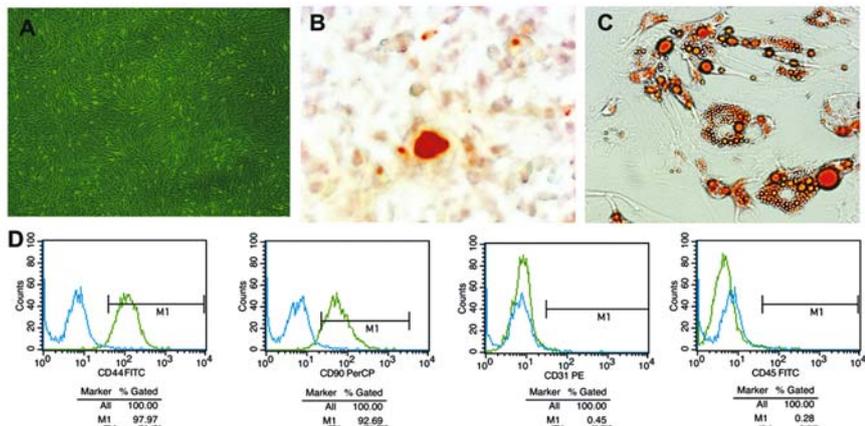
2 结果

2.1 BMSCs 提取、培养、鉴定

倒置相差显微镜下观察,接种 12h BMSCs 可见部分贴壁生长,呈细长梭形,24h 首次半量换液,随培养时间延长,细胞局部形成集落,细胞群呈旋风样排列,1 周左右即可达到 80% 融合(图 1A)。BMSCs 成骨、成脂诱导分化成功(图 1B-C);流式细胞术检测细胞表面抗原检测包封 BMSCs 的细胞表型: CD44:97.97%;CD90:92.69%;CD31:0.45%;CD45:0.28%,均符合 BMSCs 细胞特性(图 1D)。

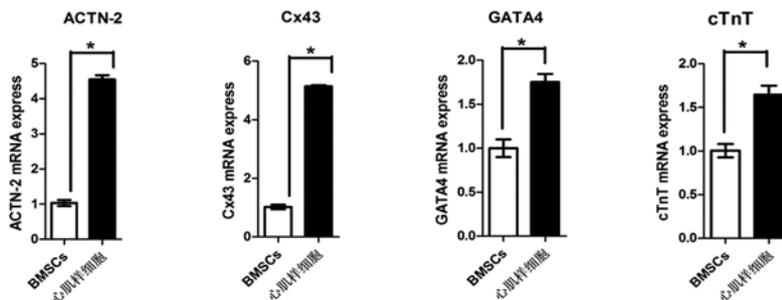
2.2 BMSCs 分化为心肌样细胞及 qPCR 检测特异性因子的表达

经过 5-AZA 处理后,BMSCs 逐步分化为心肌样细胞。在使用 5-AZA 处理时,部分细胞脱落,剩余细胞增殖。1 周后,大约 30% 的剩余细胞已完成扩增并呈“短棒样”、“珠样”结构。3 周后细胞间互相连接并出现肌管样结构,细胞呈梭形,具有显著的方向性(图 3 A)。qPCR 检测心肌样细胞特异性因子的表达显示,经 5-AZA 处理后的已分化心肌样细胞(ACTN-2, Cx43, GATA4, cTnT) mRNA 水平均高于未处理的 BMSCs 见图 2。



注:A. 3 代 BMSCs(40 ×); B. 诱导 BMSCs 分化为成骨细胞(茜素红染色,400 ×); C. 诱导 BMSCs 分化为脂肪细胞(油红 O 染色,400 ×); D. BMSCs 流式细胞表型(CD44;CD90;CD31;CD45)直方图

图 1 BMSCs 提取、培养、诱导分化

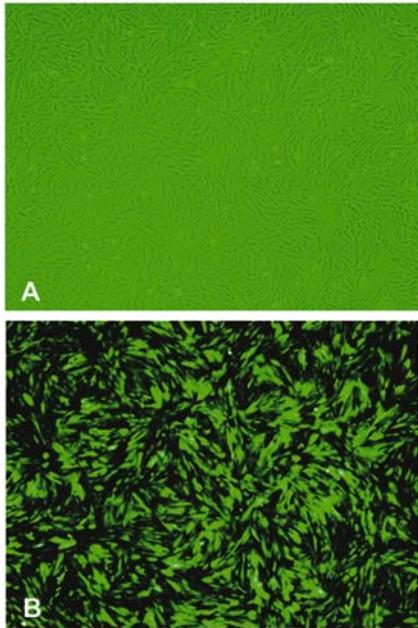


注: * *P* < 0.05

图 2 qPCR 检测特异性因子的表达

2.3 Ad-VEGF165 转染心肌样细胞

Ad-VEGF165 转染心肌样细胞, 24h 后 GFP 表达率可达 70% (图 3 B), 且与未携带 VEGF165 基因腺病毒感染的心肌样细胞表达绿色荧光蛋白无明显差异。

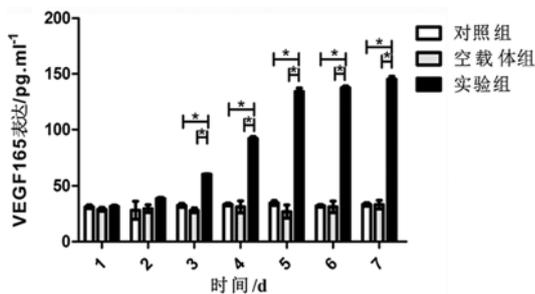


注: A. 心肌样细胞; B. 倒置荧光相差显微镜下观察 GFP 的表达

图 3 心肌样细胞及携带 VEGF165 基因腺病毒感染心肌样细胞(40×)

2.4 转染后心肌样细胞 VEGF165 的表达

ELISA 检测 VEGF165 表达, 发现空白对照组及空载体组呈低表达, 实验组呈高表达, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$). 进一步比较可看出, 3 组在第 2 天时 VEGF165 表达无显著性差异 ($P > 0.05$), 2d 后出现显著性差异 ($P < 0.05$) 见图 4。



注: * $P < 0.05$

图 4 心肌样细胞在不同时相点 VEGF165 的表达.

2.5 转染后心肌样细胞的增殖活性

通过 CCK-8 法检测 3 组细胞增殖活性, 发现转染后心肌样细胞的增殖活性要优于对照组及空

载体组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明 VEGF165 对心肌样细胞活性具有一定的促进作用。见图 5。

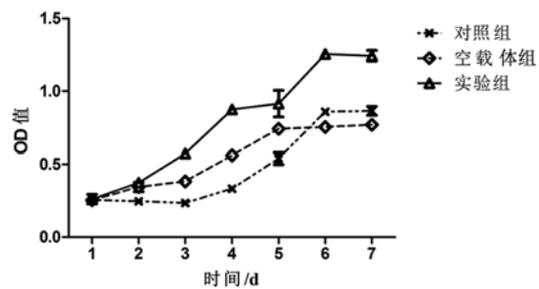


图 5 Ad-VEGF165 心肌样细胞在不同时相点的增殖活性

3 讨论

MI 主要是由于心脏局部血管供血障碍导致其供应区域的心肌组织出现代谢障碍而导致的一系列综合征。应用干细胞移植有可能取代受损心肌细胞并建立新的血管来供应血运^[9]; 当前关于 MI 基础研究的热点主要是促进移植的 BMSCs 对 MI 的作用即将未分化的 BMSCs 体外转染目标生长因子或种植于某种生物材料上, 移植至具有心梗的动物模型中, 检测其对 MI 的治疗作用, 然而大量动物实验及临床试验并没有得到满意的临床效果^[10-12], 主要原因可能是 BMSCs 在病变部位分化为心肌细胞的能力较弱, 不能提供足够的新生心肌细胞进行损伤后修复^[13]。最新研究表明: BMSCs 诱导分化后的心肌样细胞在心脏功能改善上要比移植 BMSCs 具有更显著的作用^[7]。

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF), 作为一种特殊的细胞内皮分裂素, 因其具有血管再生作用, 近些年来在医学领域被广泛研究^[14]。然而, VEGF165 为小分子蛋白, 因其半衰期短^[15], 导致不完全的血管再生^[16], 限制其进一步应用。基因工程可以克服这一障碍, 在治疗缺血性心脏病方面, 携带 VEGF165 的基因载体不仅可以增强血管再生^[17]、改善心脏功能^[3], 还可以促进细胞增殖、下调细胞因子诱导的内皮激活和下游的炎症反应^[18]。故我们构建 Ad-VEGF165 使其可以克服其自身半衰期短导致的不完全血管再生, 然后基因修饰心肌样细胞。实验中我们发现 VEGF165 在心肌样细胞中是可以正常表达的, 与空载体组和对照组比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 另外我们使用 CCK-8 法检测 VEGF165

对心肌样细胞增殖活性, 2d 后发现细胞增殖活性明显优于空载体组和对照组 ($P < 0.05$), 提示心肌样细胞表达 VEGF165 后, 可以增强心肌样细胞的增殖活性, 有助于心肌样细胞的生存。

在这个实验中, 研究的主要目的是探讨 Ad-VEGF165 基因修饰已分化心肌样细胞后对其目的蛋白的表达及细胞增殖活性的影响。实验中顺利提取、培养 BMSCs; 使用流式细胞术鉴定 BMSCs 表面抗原, 并可将其诱导为脂肪细胞、成骨细胞和心肌样细胞。构建的 Ad-VEGF165 载体感染至已分化的心肌样细胞, ELISA 检测目的蛋白 VEGF165 的表达, 通过 CCK-8 法检测细胞增殖活性。研究证实感染后心肌样细胞的 VEGF165 的表达及增殖活性均优于对照组和空载体组。说明我们构建的 Ad-VEGF165 心肌样细胞不仅可以正常表达 VEGF165, 且对其细胞活性具有一定的促进作用。但实验中对 Ad-VEGF165 心肌样细胞在细胞活性以及目的蛋白表达方面未进行长期 (2w、3w、4w) 的观察研究, 也未将其与正常心肌细胞或心衰心肌细胞共培养研究其相互作用, 同时也未进行动物实验。故在相关方面还需进一步研究, 为今后其在 MI 治疗方面的体内细胞移植及体外验证提供更全面的实验和理论依据。

参考文献:

- [1] Zhu H, Jiang X, Li X, et al. Intramyocardial delivery of VEGF165 via a novel biodegradable hydrogel induces angiogenesis and improves cardiac function after rat myocardial infarction [J]. *Heart and Vessels*, 2015, 31 (6): 963-975. DOI: 10.1007/s00380-015-0710-0.
- [2] Henry TD, Annex BH, McKendall GR, et al. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis [J]. *Circulation*, 2003, 107 (10): 1359-1365. DOI: 10.1161/01.cir.0000061911.47710.8a.
- [3] Katz MG, Fargnoli AS, Kendle AP, et al. Gene therapy in cardiac surgery: clinical trials, challenges, and perspectives [J]. *Ann Thorac Surg*, 2016, 101 (6): 2407-2416. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2015.12.004.
- [4] 常影, 李树岩, 董明慧. 骨髓间充质干细胞联合 VEGF 基因移植对 AMI 心肌细胞凋亡的影响 [J]. *中国临床床研究*, 2012, 25 (5): 420-423.
- [5] 陈国祥, 华平, 熊利华, 等. 腺病毒介导的肝细胞生长因子/血管内皮生长因子双基因转染骨髓间充质干细胞移植治疗心肌梗死 [J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16 (10): 1841-1845. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8225.2012.10.029.
- [6] 高峰, 张近宝, 周凯, 等. 血管内皮生长因子基因修饰骨髓间充质干细胞移植心肌梗死大鼠: 高压氧干预促进治疗性血管生成 [J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16 (27): 5011-5016. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2012.27.014.
- [7] Winters AA, Bou-Ghannam S, Thorp H, et al. Evaluation of multiple biological therapies for ischemic cardiac disease [J]. *Cell Transplant*, 2016, 25 (9): 1591-1607. DOI: 10.3727/096368916X691501.
- [8] Rahimi M, Zarmani AH, Mohseni-Kouchesfehiani H, et al. Comparative evaluation of cardiac markers in differentiated cells from menstrual blood and bone marrow-derived stem cells in vitro [J]. *Mol Biotechnol*, 2014, 56 (12): 1151-1162. DOI: 10.1007/s12033-014-9795-4.
- [9] Li Y, Hiroi Y, Ngoy S, et al. Notch1 in bone marrow-derived cells mediates cardiac repair after myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2011, 123 (8): 866-876. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.947531.
- [10] Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, et al. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium [J]. *Nature*, 2004, 428 (6983): 668-673. DOI: 10.1038/nature02460.
- [11] Scherschel JA, Soonpaa MH, Srouf EF, et al. Adult bone marrow-derived cells do not acquire functional attributes of cardiomyocytes when transplanted into peri-infarct myocardium [J]. *Mol Ther*, 2008, 16 (6): 1129-1137. DOI: 10.1038/mt.2008.64.
- [12] Murry C E, Soonpaa M H, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts [J]. *Nature*, 2004, 428 (6983): 664-668. DOI: 10.1038/nature02446.
- [13] Zhang GW, Liu XC, Li-Ling J, et al. Mechanisms of the protective effects of BMSCs promoted by TMDR with heparinized bFGF-incorporated stent in pig model of acute myocardial ischemia [J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15 (5): 1075-1086. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2010.01070.x.
- [14] Yä-Herttuala S, Martin JF. Cardiovascular gene therapy [J]. *Lancet*, 2000, 355 (9199): 213-222. DOI: 10.1016/S0140-6736(99)04180-X.
- [15] Hughes GC, Biswas SS, Yin B, et al. Therapeutic angiogenesis in chronically ischemic porcine myocardium: comparative effects of bFGF and VEGF [J]. *Ann Thorac Surg*, 2004, 77 (3): 812-818. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2003.09.060.

(下转第 24 页)

过程中,肺的组织细胞发生改变,出现凋亡和坏死^[12]。凋亡或坏死的组织细胞对于机体而言,成为可致病的终毒物,其 DNA 中所含的非甲基化 CpG,成为 TLR9 受体的配子^[5]。同理,自体组织细胞异化的 DNA 片段中的 CpG 诱发了 TLR9 mRNA 的过量表达,形成更多的 TLR9 受体。由于 TLR9 受体的变化是继发于肺组织细胞的凋亡坏死之后的破碎的 DNA 片段,故其 mRNA 的表达迟于 TLR2、TLR4 mRNA 的表达。本文结果显示,4h 组 TLR2、TLR4 mRNA 的表达就已高于对照组,而 TLR9 mRNA 的表达仅在 8h 组时才出现升高,也说明了这一点。

矽肺的发生是一个漫长进程,肺巨噬细胞分泌的与肺纤维化有关的细胞因子对矽肺的发生至关重要^[13]。本文作为较短时间的染尘实验,虽然证明了在矽尘致肺纤维化过程中出现了 TLR2、4、9 mRNA 表达水平的上调,但其在实际矽肺发生发展中作用的大小及受体激活后到肺纤维化相关细胞因子生成之间的具体信号转导途径,尚有待于进一步研究。本文 2h 组 TLR2、4、9 mRNA 的表达与对照组相比,差异均无统计学意义,可能与肺脏强大的代偿能力有关。

参考文献:

[1] 王辉,陈雪芬,魏路清. 肺纤维化发病机制新进展 [J]. 武警后勤学院学报(医学版),2013,22(1):69-73. DOI:10.3969/j.issn.2095-3720.2013.01.029.

[2] 潘有禄,黄文海,沈正荣,等. 肺纤维化发生机制及治疗研究进展[J]. 中国药学杂志,2012,47(23):1873-1876.

[3] Luna-Gomes T, Santana PT, Coutinho-Silva R. Silica-induced inflammasome activation in macrophages: role of ATP and P2X7 receptor [J]. Immunobiology, 2015, 220(9):1101-1106. DOI:10.1016/j.imbio.2015.05.004.

[4] 余杰,毛丽君,赵金垣. 二氧化硅通过肺泡巨噬细胞的识别反应启动肺内炎症损伤的机制[J]. 中国工业

医学杂志,2015,28(4):265-269.

[5] 杨玉荣,余锐萍,梁宏德. Toll-NF-κB 信号途径及其介导的功能 [J]. 细胞生物学杂志,2007,29(4):483-486. DOI:10.3969/j.issn.1674-7666.2007.04.006.

[6] 何维. Toll 样受体和天然免疫 [J]. 第二军医大学学报,2002,23(10):1054-1056. DOI:10.3321/j.issn:0258-879X.2002.10.004.

[7] 张兆强,夏秀杰,赵星辉,等. 石雕作业工人职业危害知晓度及防护行为调查 [J]. 济宁医学院学报,2014,37(1):41-43. DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2014.01.013.

[8] Zhang N, Zhang J, Cao Z, et al. Effect of pulse high-volume hemofiltration on Toll-like receptor in patients with severe sepsis [J]. Exp Ther Med, 2016, 12(3):1377-1382. DOI:10.3892/etm.2016.3473.

[9] Ansari AR, Ge XH, Huang HB, et al. Effects of lipopolysaccharide on the histomorphology and expression of toll-like receptor 4 in the chicken trachea and lung [J]. Avian Pathol, 2016, 45(5):530-537. DOI:10.1080/03079457.2016.1168923.

[10] 吴丹,滕伟禹. 大鼠实验性脑出血后脑组织 TLR2、NF-B/p65 及 caspase-3 表达变化的研究 [J]. 中风与神经疾病杂志,2010,27(6):484-488.

[11] Zhang Y, Karki R, Igwe OJ. Toll-like receptor 4 signaling: A common pathway for interactions between prooxidants and extracellular disulfide high mobility group box 1 (HMGB1) protein-coupled activation [J]. Biochem Pharmacol, 2015, 98(1):132-143. DOI:10.1016/j.bcp.2015.08.109.

[12] 金玉兰,袁聚祥,姚三巧,等. 矽肺患者肺灌洗液巨噬细胞自噬与凋亡分析 [J]. 环境与职业医学,2012,29(12):757-759.

[13] 高衍新,王瑞. 矽尘致肺纤维化机制及细胞因子在矽肺纤维化中的作用 [J]. 中国工业医学杂志,2008,21(1):31-35. DOI:10.3969/j.issn.1002-221X.2008.01.013.

(收稿日期 2016-8-09)

(责任编辑:石俊强)

(上接第 20 页)

[16] Salimath A S, Phelps E A, Boopathy A V, et al. Dual delivery of hepatocyte and vascular endothelial growth factors via a protease-degradable hydrogel improves cardiac function in rats [J]. PLoS One, 2012, 7(11):e50980. DOI:10.1371/journal.pone.0050980.

[17] Zhang H, Yuan YL, Wang Z, et al. Sequential, timely and controlled expression of hVEGF165 and Ang-1 effectively improves functional angiogenesis and cardiac function

in vivo [J]. Gene Ther, 2013, 20(9):893-900. DOI:10.1038/gt.2013.12.

[18] Kupatt C, Hinkel R, Vachenaer R, et al. VEGF165 transfection decreases postischemic NF-kappa B-dependent myocardial reperfusion injury in vivo: role of eNOS phosphorylation [J]. FASEB J, 2003, 17(6):705-707. DOI:10.1096/fj.02-0673fje.

(收稿日期 2016-11-02)

(责任编辑:石俊强)