

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00491

腺病毒介导 vasostatin-1 基因转染表达对大鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用

王 铮,肖明第*,虞 敏,袁忠祥

上海交通大学附属第一人民医院心胸外科,上海 200080

[摘要] **目的:**构建并鉴定携带人嗜铬粒蛋白 A 的 N 端 1~76 片段(CGA₁₋₇₆)即 vasostatin-1(VS-1)基因的腺病毒表达载体,观察重组腺病毒在大鼠心肌细胞中的表达,探讨 VS-1 转基因治疗对心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用。**方法:**(1)利用 CGA₁₋₅₈ cDNA 模板,设计引物,利用 PCR 合成、扩增 CGA₁₋₇₆ 的 cDNA 并将其克隆到腺病毒穿梭质粒 pAdTrack,经 *Pme* I 酶切线性化后与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 在大肠埃希菌 BJ5183 中同源重组。将鉴定正确的同源重组质粒 pAd-VS-1 线性化后转染 QBI-293A 细胞进行包装、扩增得到重组腺病毒颗粒 Ad-VS-1,将该病毒感染大鼠心肌细胞 H9c2 并通过蛋白质印迹法检测其表达。(2)建立心肌细胞缺氧/复氧(H/R)损伤模型,分为 4 组:空白组、H/R 组、空载腺病毒转染+H/R 组、Ad-VS-1 转染+H/R 组;测定各组心肌细胞活力,超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量。**结果:**(1)经 PCR、基因测序、酶切鉴定证实重组质粒 pAd-VS-1 构建成功,将其导入 QBI-293A 细胞,通过蛋白质印迹法证实病毒颗粒 Ad-VS-1 感染心肌细胞后 VS-1 蛋白表达。(2)H/R 组心肌细胞活力和 SOD 含量较空白组明显降低,MDA 增加;而 VS-1 基因转染提高了心肌细胞 H/R 模型心肌细胞活力和 SOD 含量,并降低了 MDA 生成量。**结论:**成功构建 Ad-VS-1,将其感染大鼠心肌细胞后能够表达 VS-1 并对心肌细胞 H/R 损伤具有保护作用,其机制和抗氧化作用有关。

[关键词] Vasostatin-1; 基因重组;腺病毒;缺氧/复氧;心肌保护

[中图分类号] R 542.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)05-0491-05

Protective effect of adenovirus-mediated vasostatin-1 gene transfection on rat cardiomyocyte hypoxia/reoxygenation injury

WANG Zheng, XIAO Ming-di*, YU Min, YUAN Zhong-xiang

Department of Cardiothoracic Surgery, Shanghai First People's Hospital affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China

[ABSTRACT] **Objective:** To construct and identify adenovirus vector containing the chromogranin A 1-76 segment (CGA₁₋₇₆), or vasostatin-1 (VS-1) gene, and to observe its expression in cardiomyocytes of rats, so as to investigate the protective effects of VS-1 transgenic therapy on myocardial hypoxia/reoxygenation (H/R) injury. **Methods:** (1) The primers of CGA₁₋₇₆ cDNA was designed and used for PCR amplification. The products were then cloned into adenovirus shuttle plasmid pAdTrack and linearized by enzyme *Pme* I; the resultant plasmid was co-transfected into *E. coli* BJ5183 cells with adenovirus backbone plasmid pAdEasy-1 for homologous recombination. Then the recombinant plasmid was identified, linearized and packaged with QBI-293A cells to amplify the recombinant adenovirus Ad-VS-1, which was then used to infect H9c2 cardiomyocytes. Western blotting was used to detect the expression of VS-1 protein expression. (2) Myocardial H/R model was established and the cells were divided into 4 groups: blank group, H/R group, mock infection + H/R group, and Ad-VS-1 infection + H/R group. The viability of cardiomyocytes, the activity of superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA) were measured. **Results:** (1) The recombinant plasmid was constructed successfully as confirmed by PCR, sequencing and enzyme digestion. Western blotting confirmed the protein expression of VS-1 in the H9c2 cells. (2) The viability of cardiomyocytes and the activity of SOD in H/R group were obviously lower than those of the blank group; the level of MDA was higher than that of the blank group. Transfection with VS-1 increased the cardiomyocytes viability and SOD activity in the H/R model group and decreased the production of MDA. **Conclusion:** Ad-VS-1 has been successfully constructed, and transfection with it can protect rat cardiomyocytes from H/R injury, which is related to the anti-oxidation process.

[收稿日期] 2008-09-01

[接受日期] 2009-01-27

[作者简介] 王 铮, 博士生. E-mail: kings-wang-sh@hotmail.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-63240090-3031; E-mail: washinton_1_1@hotmail.com

[KEY WORDS] vasostatin-1; gene recombination; adenovirus; hypoxia/reoxygenation; myocardial protection

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(5): 491-495]

Vasostatin-1(VS-1)是在应激状态下由嗜铬粒蛋白 A(chromogranin A, CGA)通过组织特异性加工程序产生的 N 端 1~76 水解多肽片段(CGA₁₋₇₆)^[1]。近期,离体心灌注实验证明 VS-1 预灌注具有明显的内皮保护、肾上腺素能抑制、心肌负性肌力以及抗心肌缺血-再灌注损伤等作用^[2]。VS-1 因其对心肌缺血性疾病的巨大潜在临床价值,正受到研究者的日益关注。为了深入研究 VS-1 在心肌细胞、血管内皮细胞以及组织细胞间的具体作用和信号转导机制,初步探讨 VS-1 转基因治疗在预防心肌缺血-再灌注损伤方面的可行性,我们采用 AdEasy™ 系统成功构建携带人 VS-1 基因的重组腺病毒,探讨了 VS-1 转基因治疗在心肌细胞缺氧/复氧(H/R)损伤中的作用,为今后 VS-1 基因导入预防心脏细胞缺血-再灌注损伤的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 大鼠心肌细胞系 H9c2 细胞购自中国科学院上海细胞库;腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1、穿梭质粒 pAdTrack、脂质体 Lipofectamine™2000、T₄ DNA 连接酶、蛋白酶 K、大肠埃希菌 BJ5183、DH5 α 及 QBI-293A 细胞均购自 Invitrogen 公司;限制性内切酶 *Pac*I、*Pme*I、*Xba*I 和 *Kpn*I 购自 New England Biolabs 公司;DNA 凝胶回收试剂盒、Highspeed 质粒大量抽提试剂盒购自 Qiagen 公司;Taq DNA 聚合酶、质粒小量抽提试剂盒、质粒纯化试剂盒购自上海中科开瑞生物芯片科技服务有限公司;DMEM、胎牛血清购自 Gibco 公司;常规细胞培养体系为含 15% 热灭活新鲜胎牛血清的 DMEM 培养液(37℃, 5% CO₂);pcDNA-CGA₁₋₅₈ 由广东省人民医院心血管研究所单志新老老师惠赠;丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 VS-1 全长 cDNA 的设计、合成和筛选 根据 GenBank 中 CGA₁₋₇₆ 基因序列,基于已有 pcDNA-CGA₁₋₅₈ 基因序列,设计引物以添加 CGA₅₉₋₇₆ 基因序列,同时在引物 5' 端分别加上 *Kpn*I 和 *Xba*I 的酶切位点和相应的保护碱基。上游引物序列:5'-GGG GTA CCA TGC GCT CCG CCG CTG TCC T-3';下游引物序列:5'-CGA GAT CTC TGC TGA TGT GCC CTC TCC TTG GCG CCT TGG AGA GCG AGG TCT TGG AGC TCC TTC AGT AAA TTC TGA TGT CT-3'。PCR 扩增条件:95℃ 5 min;95℃ 30 s,58℃ 30

s,72℃ 30 s,共 25 个循环;最后 72℃ 延伸 8 min。PCR 扩增产物以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,经鉴定条带的位置正确后,参照质粒纯化试剂盒操作说明,进行回收、纯化。

1.3 pAdTrack-VS-1 穿梭载体的构建、筛选和鉴定 先将 PCR 回收产物和 pAdTrack 穿梭载体分别经 *Kpn*I 和 *Xba*I 双酶切线性化,并分别回收其酶切产物,再经 T₄ DNA 连接酶进行连接反应,37℃ 连接过夜,将目的基因正向插入穿梭质粒 pAdTrack 的 *Kpn*I/*Xba*I 多克隆位点之间,构建成 pAdTrack-VS-1 连接产物。连接产物转化感受态大肠埃希菌 DH5 α ,于卡那霉素 LB 培养板随机挑取单克隆菌落,提取穿梭质粒,进行酶切鉴定和 PCR 扩增鉴定(程序同前)。经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳观察,取 PCR 扩增鉴定正确的单克隆菌液,送上海英骏生物技术有限公司进行序列测定。

1.4 pAd-VS-1 的构建、筛选和鉴定 将 500 ng 经 *Pme*I 线性化的 pAdTrack-VS-1 质粒和 100 ng 腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 共同电转导(2 500 V, 200 Ω , 25 μ F) 20 μ l 的 BJ5183 感受态菌后,加入 500 μ l SOC 培养液于 37℃、150 r/min 摇匀 20 min 后,分别取 30 μ l 及 70 μ l 菌液涂于 2 块含 25 μ g/ml 卡那霉素的 LB 平板上。20 h 后共挑选 10 个最小的克隆,在卡那霉素 LB 培养基中培养过夜,少量抽提质粒,将选定的重组体作 PCR 后(程序同前)进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定质粒,确定上述重组体中均含有大小约 282 bp 的基因片段。重组 DNA 转化大肠埃希菌 DH5 α ,挑克隆,再经质粒小量提取和 *Pac*I 酶切进一步鉴定后,分别大量制备重组质粒 pAd-VS-1。取 20 μ g 质粒用 *Pac*I 酶切,酚/氯仿抽提纯化,乙醇沉淀。取纯化质粒 DNA 5 μ g,溶于 50 μ l 无菌水中,备用。

1.5 Ad-VS-1 的包装、扩增和纯化 将原代 QBI-293A 细胞增殖培养,按 1.5 \times 10⁶/皿接种于 60 mm 的细胞培养皿进行转染。采用脂质体 Lipofectamine™2000 介导线性化的 pAd-VS-1 进行细胞转染,7~9 d 时 CPE(细胞病变效应)细胞达到细胞总量的 80% 以上,出现片状葡萄串样脱壁浮起。收集细胞,反复冻融 3 个循环,收取原始病毒液,命名为 Ad-VS-1。将 QBI-293A 细胞培养于 250 ml 培养瓶中,至约 90% 细胞融合,进行转染病毒冻融液,待 3 d 后 CPE 现象明显时,反复冻融 3 次,收取转染病毒冻融液。采用 CsCl₂ 梯度离心法纯化病毒,进行重组腺病毒滴

度测定。用 TCID₅₀ 方法测定病毒滴度,按 Karber 公式计算。 $\lg TCID_{50} = L + d(s - 0.5)$,其中 L = 最高稀释度的对数;d = 稀释对数之间的差;s = 阳性管比率总和。后加入 10% 甘油, -70℃ 保存备用。

1.6 Ad-VS-1 在心肌细胞 H9c2 中的转染和表达
心肌细胞 H9c2 传至 60 mm 的细胞培养皿中,次日长至约 70% 融合,换新鲜的完全培养液 4.5 ml 培养 4~5 h。根据测定得到的病毒滴度,稀释病毒保存液,以 100 MOI 感染 1、2、3、5、7 d。并设空白组(未加病毒)、对照空白腺病毒 100 MOI 感染 H9c2 作平行对照。按上述方案感染后,提取感染后细胞培养上清,Bradford 法定量,每孔取 30 μg 蛋白做 10% SDS-PAGE 分离,半干移至硝酸纤维素膜上,室温下 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入抗 VS-1 抗体(1:500),4℃ 过夜,辣根过氧化物酶标记 II 抗(1:1500),室温下孵育 1 h,用化学发光法显色,活体成像仪显像。以 β-actin 为内参照,实验分别重复 3 次。

1.7 体外心肌细胞 H/R 模型建立和实验分组
H/R 模型采用 Biometrix 公司的厌氧盒进行。主要步骤如下:将空载腺病毒或 Ad-VS-1 转染的 H9c2 细胞均分至培养皿,培养第 5 天依次装入厌氧盒中,接着快速放入厌氧包和氧气指示条,扣紧厌氧盒盖,放入 CO₂ 培养箱中。当厌氧指示条由蓝色变为无色时,说明盒中是无氧状态,计时 60 min,后开盖正常培养 120 min。实验分组:随机分为 4 组(每组 4 皿):空白组、H/R 对照组、空载腺病毒(100 MOI)转染+H/R 组、VS-1(100 MOI)转染+H/R 组。

1.8 心肌细胞活力、细胞内 SOD 活性和 MDA 含量测定
采用 MTT 法测定各组细胞吸光度(D)值,根据下列公式计算心肌细胞活力:心肌细胞活力(%) = 实验组的 D 值/空白对照组的 D 值 × 100%。
12.5 g/L 的胰蛋白酶消化收集细胞,计数细胞数达到 1 × 10¹⁰ /L 以上,根据试剂盒说明,用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性,硫代巴比妥显色法测 MDA 含量。

1.9 统计学处理
所有数据应用 SPSS 13.0 软件包进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据比较用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较用 SNK 法。

2 结果

2.1 重组穿梭质粒 pAdTrack-VS-1 的酶切鉴定
pAdTrack-VS-1 经 *Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切,1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,可见 282 bp 的插入片段。然后进行 PCR 扩增鉴定,PCR 产物长度也为 282 bp。基

因测序表明插入的目的基因序列正确。

2.2 pAd-VS-1 的酶切鉴定
重组腺病毒载体 pAdTrack-VS-1 用 *Pac* I 分别酶切重组 pAdTrack-VS-1 和空骨架载体 pAdEasy-1,前者得到约 30 kb 和 4.5 kb 两个片段,提示 pAdTrack-VS-1 和骨架质粒 pAdEasy-1 的重组发生在右臂与左臂区(图 1)。然后分别以稀释后的重组 pAd-VS-1 和空骨架载体为模板对重组 VS-1 基因片段进行 PCR 鉴定,产物电泳后在 pAd-VS-1 见 282 bp 的条带,而空 pAdEasy-1 组缺失(图 2)。

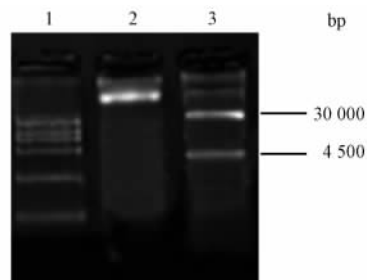


图 1 重组腺病毒质粒经 *Pac* I 酶切产物的琼脂糖凝胶电泳实验

Fig 1 Electrophoresis of enzyme digested product of pAd-VS-1 recombinant plasmid by *Pac* I

1:DNA marker; 2:pAdEasy-1; 3:pAdTrack-VS-1

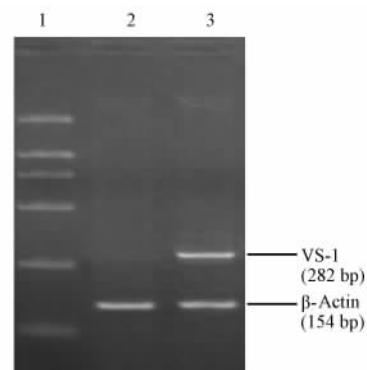


图 2 重组腺病毒质粒的 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳实验

Fig 2 Electrophoresis of PCR product of pAd-VS-1 recombinant plasmid

1:DNA marker; 2:pAdEasy-1; 3:pAd-VS-1

2.3 Ad-VS-1 的包装、扩增和滴度测定
重组腺病毒质粒转染 QBI-293A 细胞后 5~6 d 开始出现 CPE,并逐渐增加;在质粒转染后 7~9 d,CPE 细胞可达到 80%~90%,此时收获病毒(图 3)。

将构建的重组病毒子二次感染 QBI-293A 细胞,并出现 CPE,表明 QBI-293A 细胞包装成功。感染 4~6 d 后,收集细胞,用 PBS 悬浮,反复冻融获得重组病毒粗提液。经多轮感染、扩增、纯化后,最终

获得病毒滴度为 3.0×10^9 pfu/ml。

2.4 Ad-VS-1 在心肌细胞 H9c2 中的表达 蛋白质印迹结果显示,以 200 MOI 感染 48 h 后心肌细胞内即有 VS-1 蛋白表达,在约 32 000 处可看到条带;100 MOI 感染时,1 d 即可见到 VS-1 蛋白表达,感染 5 d 时达高峰,感染后 7 d 仍有明显高表达(图 4);提示 VS-1 基因在大鼠心肌细胞 H9c2 中可正常表达,并可分泌至细胞外。

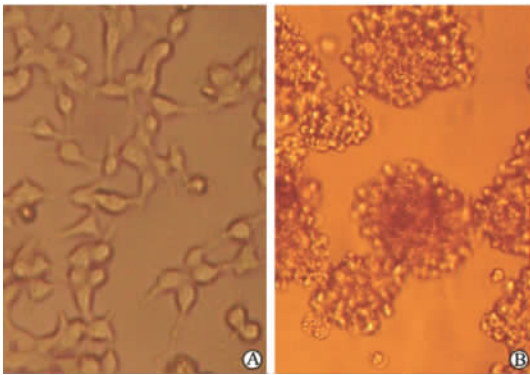


图 3 Ad-VS-1 感染前后的细胞病变效应
Fig 3 Comparison of cytopathic effects after Ad-VS-1 infection

A: Normal QBI-293A cells; B: QBI-293A cells with CPE. Original magnification: $\times 400$

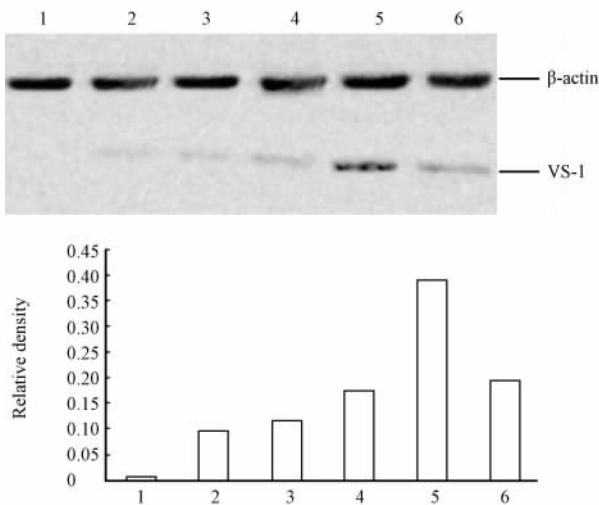


图 4 重组腺病毒转染后心肌细胞 VS-1 蛋白表达
Fig 4 Expression of VS-1 in cardiomyocytes after Ad-VS-1 infection

1: Mock adenovirus infection group; 2-6: Ad-VS-1 infection groups 1 d, 2 d, 3 d, 5 d, 7 d

2.5 VS-1 基因转染对 H/R 心肌细胞活力、SOD 活性和 MDA 含量的影响 心肌细胞在 H/R 之后损害较大,和对照组相比,MTT 法检测的 D 值明显降

低($P < 0.01$)。转染空腺病毒后,受损程度没有明显改善,但转染 VS-1 重组腺病毒后,心肌细胞受损程度明显减轻,D 值明显升高(与空白对照相比 $P < 0.01$)。H/R 损伤组 SOD 的生成量明显低于正常对照组($P < 0.01$),MDA 的生成量明显高于正常对照组($P < 0.01$),转染空腺病毒后,SOD 活性和 MDA 生成量同受损组相比没有明显变化,但转染 Ad-VS-1 后,随着内皮细胞活力的改善,SOD 的生成量明显增加,MDA 的生成量有所减少,和受损对照组相比均有统计学意义($P < 0.01$)。详见表 1。

表 1 各组实验末心肌细胞活力(MTT 法)、SOD 活性和 MDA 含量的比较

Tab 1 Comparison of cardiomyocyte vitality, SOD activity and MDA content in each group

Group	MTT(D)	SOD		MDA
		$z_B / (U \cdot ml^{-1})$	$c_B / (nmol \cdot ml^{-1})$	
Control	0.80 ± 0.05	183.15 ± 8.61	3.19 ± 0.32	
H/R	$0.41 \pm 0.06^{**}$	$131.77 \pm 3.37^{**}$	$6.96 \pm 0.82^{**}$	
Blank vector+H/R	$0.43 \pm 0.08^{**}$	$132.49 \pm 4.39^{**}$	$6.45 \pm 0.72^{**}$	
Ad-VS-1+H/R	$0.73 \pm 0.07^{\Delta\Delta}$	$178.32 \pm 5.72^{\Delta\Delta}$	$3.70 \pm 0.52^{\Delta\Delta}$	

** $P < 0.01$ vs control; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs H/R group

3 讨论

心肌缺血-再灌注损伤是心血管疾病的主要病理过程之一,发病突然且过程反复,往往导致心肌细胞严重的坏死、凋亡,从而引发心功能损害和劳动力损失,造成巨大的社会经济、心理负担^[3]。虽然药物溶栓、动脉旁路移植术以及经皮冠状动脉腔内血管成形术(PTCA)等内、外科治疗能使狭窄或阻塞血管再通,但治疗本身具有延后性,且可能加剧再灌注损伤并导致心肌细胞功能、结构破坏加重^[4]。因此有效解决心肌缺血-再灌注损伤的关键环节之一在于对缺血性疾病的预防性治疗。

最新的研究表明,对大鼠离体心脏的缺血-再灌注模型预先灌注含有 VS-1 的液体能通过激活 $G_i\alpha$ 蛋白-eNOS-NO-cGMP-PKG、PI3K-Akt 和抑制 p38MAPK 等信号通路触发级联效应,于心肌局部产生缺血预适应样抗心肌缺血-再灌注损伤的心肌保护^[5-7]和血管内皮保护作用^[8-9]。虽然目前尚无研究明确 VS-1 的心肌保护作用究竟来源于对心肌细胞、内皮细胞还是对两者的共同作用,但其预防性治疗途径还是给冠心病等心脏缺血性疾病的抗缺血-再灌注损伤治疗带来了诱人的临床应用前景。

本研究将 VS-1 基因重组腺病毒制备同心脏保

护作用和信号转导机制的研究密切联系在一起,通过将携带 VS-1 目的基因的重组腺病毒转染心肌,实现 VS-1 蛋白在细胞、组织局部高浓度表达。结合体外心肌细胞缺血-再灌注模型,我们进一步研究了 VS-1 转基因治疗的抗心肌缺血-再灌注损伤的可行性和机制。

我们将 Ad-VS-1 转染大鼠 H9c2 心肌细胞,通过蛋白质印迹检测发现感染滴度为 3.0×10^9 pfu/ml 的 Ad-VS-1 在 100 MOI 感染 1 d 即可见到 VS-1 蛋白表达,随着时间的延续表达不断增强,感染 5 d 时达高峰,感染后 7 d 仍有明显高表达。

通过设立心肌细胞培养的空白组、H/R 对照组、空载转染+H/R 组和 VS-1 转染+H/R 组进行比较,我们进一步探讨了 VS-1 抗 H/R 损伤的作用及其机制。H/R 损伤病理生理学机制之一就是自由基的过量产生^[10-11]。在正常情况下,机体氧自由基同体内 SOD 等清除氧自由基系统处于动态平衡^[12-13]。当组织细胞缺血、缺氧时,SOD 等氧自由基清除系统功能降低或丧失,生成系统潜在增大。一旦恢复血供与氧供,氧自由基便爆发性急剧堆积,并以不同方式造成蛋白质、核酸、脱氧核糖核酸和线粒体的脂质过氧化产物如 MDA,破坏细胞膜结构的完整性,钙跨膜内流与超负荷,最终导致细胞损伤或死亡^[14-15]。

本实验中,H/R 组与空白组相比 SOD 活性明显降低,MDA 水平显著升高,说明脂质过氧化较剧烈,细胞受到严重损伤,与文献^[16]报道一致。在 VS-1 基因转染组,细胞活力和 SOD 活性较 H/R 对照组明显增高,MDA 含量降低,提示 VS-1 得到有效表达,其抗 H/R 损伤作用可能与显著降低细胞脂质过氧化,提高心肌细胞清除自由基作用有关。最终本研究成功构建携带目的基因的重组腺病毒,在大鼠心肌细胞有效表达 VS-1,并且被证实具有抗心肌细胞 H/R 损伤的作用,其机制与抗氧化自由基密切相关,为今后的研究奠定基础。

(志谢 pcDNA-CGA₁₋₅₈ 由广东省人民医院心血管研究所单志新老师惠赠,在此特致谢意!)

[参考文献]

- [1] Helle K B. The granin family of uniquely acidic proteins of the diffuse neuroendocrine system: comparative and functional aspects[J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*,2004,79:769-794.
- [2] Helle K B. Vasostatins,multifunctional peptides with homeostatic potentials[J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr*

- Physiol*,2007,147:19-24.
- [3] Burke A P,Virmani R. Pathophysiology of acute myocardial infarction[J]. *Med Clin North Am*,2007,91:553-572.
- [4] Khabbaz K R,Levitsky S. The impact of surgical and percutaneous coronary revascularization on the cardiac myocyte[J]. *World J Surg*,2008,32:361-365.
- [5] Cappello S,Angelone T,Tota B,Pagliaro P,Penna C,Rastaldo R,et al. Human recombinant chromogranin A-derived vasostatin-1 mimics preconditioning via an adenosine/nitric oxide signalling mechanism[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*,2007,293:H719-H727.
- [6] Cerra M C,De Iuri L,Angelone T,Corti A,Tota B. Recombinant N-terminal fragments of chromogranin-A modulate cardiac function of the Langendorff-perfused rat heart[J]. *Basic Res Cardiol*,2006,101:43-52.
- [7] Pagliaro P,Cappello S,Rastaldo R,Penna C,Angelone T,Corti A,et al. Protection against ischemia/reperfusion injuries by vasostatin-1 in the isolated rat heart[J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*,2007,147:23-24.
- [8] Petrache I,Verin A D,Crow M T,Birukova A,Liu F,Garcia J G. Differential effect of MLC kinase in TNF α -induced endothelial cell apoptosis and barrier dysfunction[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*,2001,280:L1168-L1178.
- [9] Ferrero E,Scabini S,Magni E,Foglieni C,Belloni D,Colombo B,et al. Chromogranin A protects vessels against tumor necrosis factor alpha-induced vascular leakage[J]. *FASEB J*,2004,18:554-556.
- [10] Sun H Y,Wang N P,Kerendi F,Halkos M,Kin H,Guyton R A,et al. Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*,2005,288:H1900-H1908.
- [11] Toledo-Pereyra L H,Lopez-Neblina F,Toledo A H. Reactive oxygen species and molecular biology of ischemia/reperfusion [J]. *Ann Transplant*,2004,9:81-83.
- [12] Kirshenbaum A,Singal R K. Changes in antioxidant enzymes in isolated cardiac myocytes subjected to hypoxia-reoxygenation [J]. *Lab Invest*,1992,67:796-803.
- [13] Kessler-Icekson G,Sperling O,Rotem C,Wasserman L. Cardiomyocytes cultured in serum-free medium. Growth and creatine kinase activity[J]. *Exp Cell Res*,1984,155:113-120.
- [14] Ladilov Y,Efe O,Schafer C,Rother B,Kasseckert S,Abdallah Y,et al. Reoxygenation-induced rigor-type contracture[J]. *J Mol Cell Cardiol*,2003,35:1481-1490.
- [15] McCord J M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury[J]. *N Engl J Med*,1985,312:159-163.
- [16] Vanden Hoek T L,Becker L B,Shao Z,Li C,Schumacker P T. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes[J]. *J Biol Chem*,1998,273:18092-18098.

[本文编辑] 孙 岩