

· 论 著 ·

## AKT 对低氧模型细胞的促增殖作用\*

潘龙飞<sup>1</sup>, 李丽君<sup>1△</sup>, 余 蕾<sup>2</sup>

(1. 西安交通大学医学院第二附属医院急诊科, 陕西西安 710004; 2. 西安医学院, 陕西西安 710021)

**摘要:**目的 验证转染丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(AKT/PKB)基因对缺氧损伤内皮细胞的生物学作用。方法 首先构建人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的氯化镍(NiCl<sub>2</sub>)模拟低氧模型, Western blot 检测缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )表达以鉴定模型是否构建成功。然后, 分别转染血管内皮生长因子(VEGF)、AKT 及两种基因联合转染模拟低氧模型。继续培养转染后细胞 1、2、3、4 d, 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)试验检测细胞增殖率。结果 转染 VEGF 组、转染 AKT 组、转染 VEGF 与 AKT 双质粒组细胞增殖能力较单纯 NiCl<sub>2</sub> 组(模型组)均有增高, 转染 AKT 组高于单独转染 VEGF 组, 转染 VEGF 与 AKT 双基因组最高。结论 转染 AKT 基因能够促进缺氧损伤的内皮细胞增殖, 单独转染 AKT 比单独转染 VEGF 的作用强, 同时转染 AKT、VEGF 促内皮细胞增殖作用最强。

**关键词:**血管内皮生长因子; 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶; 转基因; 冠心病; 内皮细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.13.001

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)13-1441-03

## Facilitation effects of AKT on cell proliferation in hypoxia model cells\*

Pan Longfei<sup>1</sup>, Li Lijun<sup>1△</sup>, Yu Lei<sup>2</sup>

(1. Department of Emergency, Second Affiliated Hospital, Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710004, China; 2. Xi'an Medical College, Xi'an, Shaanxi 710021, China)

**Abstract:** Objective To verify the biological effect of transfecting serine/threonine kinase(AKT/PKB) gene on hypoxia-injuring epithelial cells. Methods Firstly, the NiCl<sub>2</sub> simulated hypoxia model of human umbilical vein epithelial cells(HUVEC) line was constructed, the expression of hypoxia inducing factor-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ ) was detected by Western blot for identifying the model construction success. Then, VEGF, AKT and both two genes were transfected respectively into the simulated hypoxia model. After continuous culture of transfected cells for 1, 2, 3, 4 d, the cell growth rate was determined by MTT. Results The growth rate in the transfecting VEGF, AKT and dual plasmids were higher than the simple NiCl<sub>2</sub> group(without transfection). The growth rate in the transfecting AKT group was higher than that in the transfecting VEGF group alone, which in the transfecting VEGF and AKT double genes group was highest. Conclusion Transfecting AKT gene could improve the growth of HUVEC with hypoxia injury. Transfecting AKT alone has better effect than transfecting VEGF alone. Transfecting both VEGF and AKT has strongest effect on promoting HUVEC proliferation.

**Key words:** vascular endothelial growth factor; serine/threonine kinase; transgenes; coronary disease; endothelial cells

冠心病治疗如溶栓治疗、介入治疗、外科手术治疗, 目的在于恢复或改善狭窄甚至闭塞的冠状动脉血流、恢复相应区域心肌的血液供应。近年来, 转染基因促进小血管生长和侧支循环形成以实现缺血区的自我搭桥-分子搭桥<sup>[1]</sup>, 成为国内外心血管领域研究热点, 研究较多的有血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、血管紧张素-1(Ang-1)等。有研究发现丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(AKT/PKB, 又称蛋白激酶 B)是体内细胞生存信号转导共同的中继站<sup>[2-4]</sup>, 在众多因子的信号途径中均有高表达和活化, 并发挥了重要作用。本实验构建人脐静脉内皮细胞(human umbilical vascular endothelial cells, HUVEC)的模拟低氧模型, 选用 AKT/PKB、VEGF 两种基因, 然后分别进行转染, 通过检测细胞增殖活性, 研究 AKT 基因对缺氧损伤的内皮细胞的生物学作用, 以寻找一种新的用于分子搭桥的基因。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** pcDNA3.1(+)-VEGF 与 pcDNA3.1(+)-flag-myr-AKT1, 由第四军医大学生物化学教研室惠赠; HUVEC

由西安交通大学药理学教研室惠赠; Lipofect AMINE 2000 脂质体及 DMEM 培养基, 购自 Gibco, 美国; 氯化镍(NiCl<sub>2</sub>)·6H<sub>2</sub>O、鼠抗人 HIF-1 $\alpha$  抗体、山羊抗鼠 IgG、四甲基偶氮唑盐(MTT)粉及二甲亚砜(DMSO), 购自 Sigma, 美国; 鼠抗人 AKT 抗体, 购自 Cell Signaling, 美国; SABC 免疫组织化学试剂盒, 购自博士德公司, 内含兔抗人 VEGF 抗体、生物素化山羊抗兔 IgG、SABC(链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物)及山羊血清封闭液。

## 1.2 方 法

**1.2.1 HUVEC 氯化镍(NiCl<sub>2</sub>)模拟低氧模型的构建方法** 选用对数生长期细胞制备成单细胞悬液, 调整密度为 2×10<sup>5</sup>/mL, 每孔 100  $\mu$ L 接种至 96 孔培养板。将第 3 天处于对数生长期的细胞, 弃原培养液, 换为 DMEM 培养基与 NiCl<sub>2</sub> 的混合液(NiCl<sub>2</sub> 浓度为 200  $\mu$ mol/L)100  $\mu$ L 继续培养 24 h, Western blot 检测缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )验证模型。

**1.2.2 实验分组及基因转染** (1)分组: 将细胞分为 5 组, 正常细胞组(对照组)、模型组(NiCl<sub>2</sub> 组)、NiCl<sub>2</sub> 缺氧细胞转染

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370579)。 作者简介: 潘龙飞(1982~), 医师, 硕士研究生, 主要从事心血管内科、急危重症医学研究。 △ 通讯作者, Tel: 13891828292; E-mail: lilijun3162003@yahoo.com.cn。

VEGF 组 (VEGF 组)、NiCl<sub>2</sub> 缺氧细胞转染 AKT 组 (AKT 组)、NiCl<sub>2</sub> 缺氧细胞转染 VEGF 及 AKT 组 (双质粒组)。(2) 扩增并大量制备质粒, 并与 Lipofect AMINE 2000 脂质体孵育: ①用 20 μL 无血清 DMEM 培养基稀释质粒 0.4 μg, 转染双质粒组加入两种质粒各 0.2 μg; ②用 19.2 μL 无血清 DMEM 培养基稀释 0.8 μL Lipofect AMINE 2000 脂质体, 得到 20 μL 转染液, 保温 5 min; ③将第一步含 0.4 μg 质粒的 20 μL 无血清 DMEM 与含 0.8 μL Lipofect AMINE 2000 脂质体的等体积无血清 DMEM 20 μL 混合成 40 μL 混合液, 在室温下孵育 20 min, 保证质粒与脂质体充分结合。(3) 基因转染: ①直接将上述混合液按分组加入到每孔中, 摇动培养板, 轻轻混匀, 对照组及 NiCl<sub>2</sub> 组加入转染液调整至相同体积; ②在 37 °C, 5% 的 CO<sub>2</sub> 中继续培养 6 h, 更换为 NiCl<sub>2</sub> 浓度为 200 μmol/L 的含有小牛血清的 DMEM 培养液与 NiCl<sub>2</sub> 混合液继续培养。

1.2.3 采用 Western blot 分别验证 VEGF、AKT 蛋白表达 1、2、3、4 d 后, 采用 MTT 试验检测细胞增殖, 检测各组在 490 nm/630 nm 处的吸光度值(OD<sub>490</sub>)。

1.3 统计学处理 使用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析, 所有实验数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示。对实验数据进行单因素的方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HUVEC NiCl<sub>2</sub> 模拟低氧模型的构建 Western blot 可见 HIF-1 $\alpha$  的表达, 说明模型构建成功, 见图 1。

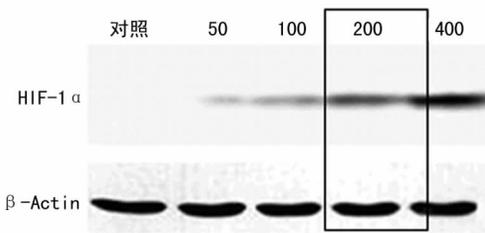
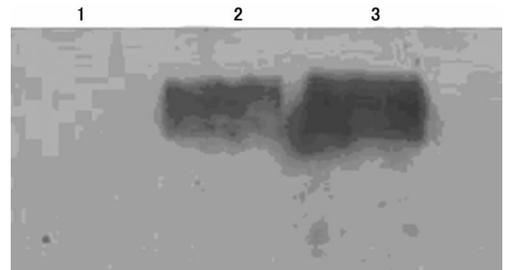


图 1 Western blot 检测 HIF-1 $\alpha$  表达

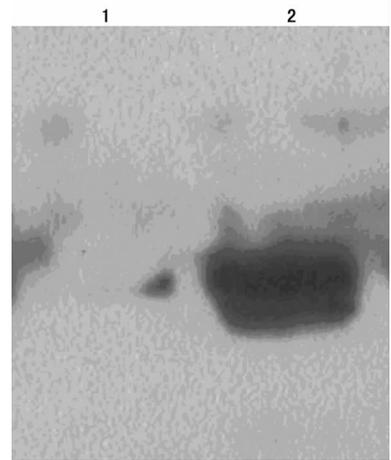
2.2 转染 VEGF、AKT 对低氧模型细胞的生物学作用 (1) Western blot 检测 VEGF 的表达: 用 VEGF 抗体作 Western blot 检测, 转染 pcDNA3.1(+)-VEGF 质粒细胞提取的总蛋白、转染质粒后上清中蛋白表达量显著高于对照组(图 2), 说

明 VEGF 质粒成功转染。(2) Western blot 检测 AKT 表达: 用 AKT 抗体作 Western blot, 转染 pcDNA3.1(+)-flag-myr-AKT1 质粒细胞提取总蛋白表达量显著高于对照组(图 3), 说明 AKT 质粒成功转染。(3) 采用 MTT 法检测各组细胞生存率: VEGF 组、AKT 组、双质粒组, 细胞增殖能力与 NiCl<sub>2</sub> 组 (模型组) 比较均有增高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); AKT 组细胞增殖能力与 VEGF 组比较有增高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 双质粒组细胞增殖能力与 VEGF 组、AKT 组比较均有增高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见表 1。



1: 对照组; 2: 转染质粒细胞提取总蛋白; 3: 转染质粒后上清中蛋白。

图 2 Western blot 检测 VEGF 表达



1: 对照组; 2: 转染质粒细胞提取的总蛋白。

图 3 Western blot 检测 AKT 的表达

表 1 MTT 分析各组细胞增殖活性 ( $\bar{x} \pm s, n=12, OD_{490}$ )

组别	1 d	2 d	3 d	4 d
对照组	0.277 ± 0.004 *	0.431 ± 0.005 *	0.611 ± 0.005 *	1.191 ± 0.009 *
NiCl <sub>2</sub> 组	0.201 ± 0.005	0.204 ± 0.007	0.177 ± 0.014	0.158 ± 0.021
VEGF 组	0.219 ± 0.004 *	0.273 ± 0.010 *	0.317 ± 0.011 *	0.425 ± 0.025 *
AKT 组	0.241 ± 0.006 *△	0.316 ± 0.008 *△	0.381 ± 0.012 *△	0.600 ± 0.028 *△
双质粒组	0.260 ± 0.003 *△#	0.352 ± 0.010 *△#	0.456 ± 0.017 *△#	0.800 ± 0.026 *△#

\*:  $P < 0.01$ , 与 NiCl<sub>2</sub> 组比较; △:  $P < 0.01$ , 与 VEGF 组比较; #:  $P < 0.01$ , 与 AKT 组比较。

3 讨 论

冠心病是严重危害人类健康的一类疾病, 其发生的主要机制是冠状动脉狭窄或者痉挛导致相应支配区域心肌供血相对或绝对不足, 进而导致心肌细胞的凋亡、坏死, 且以心肌梗死心肌细胞坏死最为严重<sup>[5-6]</sup>。传统的药物、介入以及外科手术治疗等策略, 其根本目的都在于恢复或改善狭窄甚至闭塞的冠状动脉血流、恢复相应区域心肌的血液供应, 降低心肌细胞损害;

然而, 上述治疗方法均不能充分保证全部缺血坏死心肌微循环的改善或者重建<sup>[7]</sup>。因此, 有必要探索新的方法, 能够在实施上述治疗方法时弥补其不足, 或独立应用时能够有效发挥诱导血管形成、改善血供的作用。

1998 年 Folkman<sup>[1]</sup> 提出了分子搭桥的概念, 即将具有促血管形成的蛋白或多肽经过载体包装并注射或灌注到目标区域, 或者采用特定方法转染某些基因, 以刺激缺血区小血管生

长和侧支循环形成来实现缺血区的自我搭桥,以增加灌注不足或不完全血运重建区域心肌的血流,改善心脏功能,治疗冠心病。近年来研究较多的用于分子搭桥的因子有 VEGF、Ang-1、成纤维细胞生长因子(FGF)、肝细胞生长因子(HGF)、HIF-1 $\alpha$ 、一氧化氮(NO)等。

通过大量文献研究,发现上述众多因子在生存反应中均有 AKT/PKB 的高表达和活化<sup>[8-18]</sup>。例如 PI3K/AKT 在 VEGF 信号途径被激活,从而诱导抗凋亡蛋白(如:Bcl-2、Bcl-13、Bcl-16、Bcl-XL、Bcl-A1、Bcl-AL13、Bcl-XIAP)的表达上调、抑制 P53、Fas、Bax、Bad 蛋白的表达,进而抑制细胞凋亡;Ang-1 结合酪氨酸激酶受体(Tie-2)后通过激活 PI3K/AKT 信号途径抑制内皮细胞凋亡,诱导内皮细胞迁移和管腔形成<sup>[13,19]</sup>;FGF 通过激活 PI3K/AKT 信号途径促血管内皮再生、趋化,促进血管侧支循环建立和改善内皮细胞依赖性血管舒张<sup>[8-9,20-21]</sup>;HGF 与其原癌基因编码的跨膜蛋白 c-met 受体结合后,激活 P38 和 PI3K/AKT 信号途径增加凋亡抑制因子 Bcl-2 的表达,减少 Caspase-3 的活性以对抗缺氧所致的内皮细胞凋亡<sup>[14-15]</sup>;HIF-1 $\alpha$  激活后启动控制细胞存活和新生血管形成的基因表达,受 PI3K/AKT 和酪氨酸激酶信号途径调控,进而促进新生血管形成<sup>[16-17]</sup>;外源的 NO 主要通过 PI3K/AKT 和 P38MAPK 信号途径调节信号转导因子和转录激活因子 3(STAT3)的活性,在血管损伤和移植排斥中起保护作用<sup>[18]</sup>。

AKT 又称蛋白激酶 B(PKB),是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,是体内重要的凋亡抑制蛋白,它可以诱导各种编码抗凋亡蛋白基因表达或是通过信号耦联而抑制凋亡发生。PI3K-AKT/PKB 是体内细胞生存信号转导共同的中继站,许多生长因子在生存反应中刺激细胞生长均有 AKT/PKB 的高表达和活化。它诱导各种编码抗凋亡蛋白基因表达,或是直接通过信号耦联而不依赖转录方式抑制凋亡发生<sup>[2-4]</sup>。是参与促进新生血管生成的主要酶,是包括细胞代谢、凋亡在内多种细胞进程的重要调节因子,能调节内皮细胞生存、迁移、内皮管腔形成等<sup>[22-24]</sup>。

因此,本研究首先设计了细胞实验,选择 NiCl<sub>2</sub> 构建了 HUVEC 模拟低氧模型。NiCl<sub>2</sub> 是常用的缺氧模拟化合物,被广泛应用于低氧模型的构建<sup>[25-26]</sup>。Ni<sup>2+</sup> 作用于细胞,可与酶的功能位结合,抑制 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 与 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性,导致 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> 泵及 Ca<sup>2+</sup> 泵的活性受到抑制<sup>[27]</sup>。而组织器官严重缺氧细胞损伤的主要病理、生理机制正是细胞内 ATP 减少所导致的 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> 泵及 Ca<sup>2+</sup> 泵活性受抑制,进而导致细胞内 Na<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup> 增多,K<sup>+</sup> 减少<sup>[28]</sup>。Na<sup>+</sup> 增多可以促进水进入细胞,导致细胞水肿。K<sup>+</sup> 减少将导致蛋白质包括酶功能抑制,进而导致合成代谢障碍;酶的生成减少,将进一步影响 ATP 的生成和离子泵的功能。Ca<sup>2+</sup> 增多可抑制线粒体的呼吸功能;可激活磷脂酶,使膜磷脂分解,引起溶酶体的损伤及其水解酶的释出;还可以激活一种蛋白酶使黄嘌呤脱氢酶转变成黄嘌呤氧化酶,从而增加自由基的生成,加重细胞损伤。构建模型后,通过 Western blot 检测 HIF-1 $\alpha$ ,鉴定 NiCl<sub>2</sub> 模拟低氧的效果。HIF-1 $\alpha$  是一种由缺氧诱导产生的、可以激活缺氧反应基因转录的 DNA 结合蛋白,是目前发现的惟一在特异性低氧状态下发挥活性的异源二聚体转录因子,是机体缺氧反应信号转导的共同通路<sup>[29-30]</sup>。本研究结果显示,HIF-1 $\alpha$  表达上调,证明模型构建成功。然后,选用 VEGF 作为对照,分别进行转染,通过检测细胞增殖活性,验证假设。经过对数据统计学分析发现,

转染 AKT 基因能够促进缺氧损伤的内皮细胞增殖,单独转染 AKT 组细胞增殖能力高于单独转染 VEGF 组,同时转染 AKT 与 VEGF 双质粒组高于单独转染 VEGF 或 AKT 组。分析其机制,可能是因为 AKT 存在于众多促血管形成因子通路,通过多个通路对细胞的生长、增殖、分化及代谢进行调控,同时诱导各种编码抗凋亡蛋白基因表达或是通过信号耦联而抑制凋亡发生,导致缺氧损伤细胞凋亡减少<sup>[2-4]</sup>,间接促进细胞增殖。要明确这些机制以及 AKT 的抑制细胞凋亡作用,需进一步实验研究。

#### 参考文献:

- [1] Folkman J. Angiogenic therapy of human heart[J]. Circulation, 1998, 97(7): 628-629.
- [2] Pugazhenti S, Nesterova A, Sable C, et al. AKT/PKB up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein [J]. Biol Chem, 2000, 275 (15): 10761-10766.
- [3] Meier R, Alessi DR, Cron P, et al. Mitogenic activation phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase B $\beta$ [J]. Biol Chem, 1997, 272(48): 30491-30497.
- [4] Bijur GN, Jope RS. Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation[J]. J Neurochem, 2003, 87(6): 1427-1435.
- [5] Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are Independent contributing variables of infarct size in rats[J]. Lab Invest, 1996, 74(1): 86-107.
- [6] 马中富, 马虹, 叶任高. 急性心肌梗死猝死患者心肌细胞凋亡的研究[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(3): 137-141.
- [7] 潘龙飞, 李丽君, 余蕾. 超声及超声微泡介导基因转染的可行性研究[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2012, 33(5): 661-663.
- [8] Dimmeler S, Zeiher AM. Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression[J]. Circ Res, 2000, 87(6): 434-439.
- [9] Chen CH, Poucher SM, Lu J, et al. Fibroblast growth factor 2: from laboratory evidence to clinical application[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2004, 2(1): 33-43.
- [10] Hedman M, Hartikainen J, Syvänen M, et al. Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT) [J]. Circulation, 2003, 107(21): 2677-2683.
- [11] 卢英民, Elabaz M, Oberte R, 等. 携带血管内皮生长因子的蛋白涂层支架预防冠状动脉球囊扩张后再狭窄的预防[J]. 临床心血管病杂志, 2002, 18(5): 223-225.
- [12] 程燕子, 刘启功, 廖德荣, 等. 血管内皮生长因子拮抗内皮细胞凋亡的实验研究[J]. 临床心血管病杂志, 2007, 23(5): 368-371.
- [13] Davis S, Aldrich TH, Jones PF, et al. (下转第 1446 页)

- multiple myeloma in younger patients[J]. *Blood*, 2009, 114(27):5436-5443.
- [2] Nadal E, Giné E, Bladé J, et al. High-dose therapy/autologous stem cell transplantation in patients with chemosensitive multiple myeloma: predictors of complete remission[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2004, 33(1):61-64.
- [3] Bashir Q, Shah N, Parmar S, et al. Feasibility of autologous hematopoietic stem cell transplant in patients aged  $\geq$  70 years with multiple myeloma[J]. *Leuk Lymphoma*, 2012, 53(1):118-122.
- [4] Chong YP, Kim S, Ko OB, et al. Poor outcomes for IgD multiple myeloma patients following high-dose melphalan and autologous stem cell transplantation: a single center experience[J]. *J Korean Med Sci*, 2008, 23(5):819-824.
- [5] Blade J, Cibeira MT, Fernandez DC, et al. Multiple myeloma[J]. *Ann Oncol*, 2010, 21 Suppl 7:S313-319.
- [6] Morabito F, Gentile M, Ciolli S, et al. Safety and efficacy of bortezomib-based regimens for multiple myeloma patients with renal impairment: a retrospective study of Italian Myeloma Network GIMEMA[J]. *Eur J Haematol*, 2010, 84(3):223-228.
- [7] Piro E, Molica S. A systematic review on the use of bortezomib in multiple myeloma patients with renal impairment: what is the published evidence? [J]. *Acta Haematol*, 2011, 126(3):163-168.
- [8] Roussou M, Kastiris E, Migkou M, et al. Treatment of patients with multiple myeloma complicated by renal failure with bortezomib-based regimens[J]. *Leuk Lymphoma*, 2008, 49(5):890-895.
- [9] Ludwig H, Drach J, Graf H, et al. Reversal of acute renal failure by bortezomib-based chemotherapy in patients with multiple myeloma[J]. *Haematologica*, 2007, 92(10):1411-1414.
- [10] Chanan-Khan AA, Kaufman JL, Mehta J, et al. Activity and safety of bortezomib in multiple myeloma patients with advanced renal failure: a multicenter retrospective study[J]. *Blood*, 2007, 109(6):2604-2606.
- [11] Zhang Q, Bai H, Wang CB, et al. Bortezomib combined with autologous peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation for therapy of patients with multiple myeloma[J]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2011, 19(5):1234-1236.
- [12] Schmidt-Hieber M, Blau IW, Trensche R, et al. Reduced-toxicity conditioning with fludarabine and treosulfan prior to allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2007, 39(7):389-396.

(收稿日期:2012-12-01 修回日期:2013-02-22)

(上接第 1443 页)

- Isolation of angiotensin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning[J]. *Cell*, 1996, 87(7):1161-1169.
- [14] 段海峰. 骨髓间充质干细胞携带肝细胞生长因子治疗心肌缺血的实验研究及其相关的机制探讨[D]. 北京:中国人民解放军军事医学科学院, 2004.
- [15] 王志刚, 欧惠芳, 黄一东, 等. 心腔内注射腺病毒携带肝细胞生长因子转染大鼠急性缺血心肌的实验研究[J]. *中国心血管病研究杂志*, 2004, 2(7):560-562.
- [16] 徐菲菲, 刘秀华, 蔡莉蓉. 缺氧诱导因子-1 $\alpha$  在缺氧预处理预防心肌细胞损伤中的作用[J]. *生理学报*, 2004, 56(5):609-614.
- [17] Paul SA, Simons JW, Mabeesh NJ. HIF at the crossroads between ischemia and carcinogenesis[J]. *J Cell Physiol*, 2004, 200(1):20-30.
- [18] Emanuelli C, Salis MB, Van Linthout S, et al. Akt/protein kinase B and endothelial nitric oxide synthase mediate muscular neovascularization induced by tissue kallikrein gene transfer[J]. *Circulation*, 2004, 110(12):1638-1644.
- [19] 谢荣禄, 尹瑞兴. 碱性成纤维细胞生长因子与冠心病关系的研究进展[J]. *中国实用内科杂志*, 1999, 19(9):561-563.
- [20] 刘莹, 孙立军, 宦怡, 等. 外源性碱性成纤维生长因子对犬急性心肌梗死后血管生成作用[J]. *实用放射学杂志*, 2003, 19(5):385-388.
- [21] Dimmeler S, Zeiher AM. Akt takes center stage in angiogenesis signaling[J]. *Circ Res*, 2000, 86(1):4-5.
- [22] 刘秀华. 缺血后处理内源性心脏保护的研究进展[J]. *生理学报*, 2007, 59(5):628-634.
- [23] Fujita M, Asanuma H, Hirata A, et al. Prolonged transient acidosis during early reperfusion contributes to the cardioprotective effects of postconditioning[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292(4):H2004-2008.
- [24] 王立峰. 一种新的低氧应激反应基因 NDRG2 的确定及其功能的初步研究[D]. 西安:第四军医大学, 2006.
- [25] Salnikow K, Su W, Blagosklonny MV, et al. Carcinogenic metals induce hypoxia-inducible factor-stimulated transcription by reactive Oxygen species-independent mechanism[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(13):3375-3378.
- [26] 孙应彪, 朱玉真. 镍对小鼠外周血红细胞膜 ATPase 活性的影响[J]. *中国工业医学杂志*, 2002, 15(6):355-356.
- [27] 金惠铭. 病理生理学[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社, 1996.
- [28] Rosenkilde MM, Schwartz TW. The chemokine system—a major regulator of angiogenesis in health and disease[J]. *APMIS*, 2004, 112(7/8):481-495.
- [29] Zukowska Z, Grant DS, Lee EY. A novel mechanism for ischemic angiogenesis[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2003, 13(2):86-92.
- [30] Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis[J]. *Circ Res*, 2002, 90(12):1243-1250.

(收稿日期:2012-09-08 修回日期:2013-01-25)