

[文章编号] 1674-8115(2011)12-1697-05

· 论著 ·

缺血再灌注损伤后大鼠视网膜细胞凋亡与低氧诱导因子1 α 表达的关系

袁海虹¹, 周薇², 包辉英¹, 谭攀攀², 祝肇荣³, 吴国忠¹

(1. 上海医药高等专科学校药理学教研室, 上海 201318; 2. 上海交通大学医学院药理学教研室, 上海 200025; 3. 上海交通大学医学院附属新华医院眼科, 上海 200092)

[摘要] 目的 研究缺血再灌注损伤后大鼠视网膜细胞凋亡与低氧诱导因子1 α (HIF-1 α)的表达变化并探讨两者的相关性。方法 雄性SD大鼠随机分为正常对照组和缺血再灌注损伤1 d、3 d和5 d组($n=6$)。眼前房灌注生理盐水调节大鼠眼压至110 mmHg并持续50 min, 制作实验性视网膜缺血再灌注损伤模型。制备视网膜切片, 测量内网层(IPL)、内核层(INL)厚度及节细胞层(GCL)细胞数; 采用DNA原位末端标记(TUNEL)法检测视网膜凋亡细胞; 免疫组织化学染色观察损伤后不同时间HIF-1 α 在视网膜细胞中的表达; 采用RT-PCR检测HIF-1 α mRNA的表达。结果 缺血再灌注损伤1 d、3 d和5 d组大鼠的IPL和INL厚度显著小于正常对照组($P<0.01$), GCL细胞少于正常对照组($P<0.05$)。视网膜细胞凋亡位于GCL; 缺血再灌注损伤1 d、3 d和5 d组的细胞凋亡率均明显高于正常对照组, 差异有统计学意义($P<0.01$)。缺血再灌注损伤1 d、3 d、5 d组视网膜GCL的HIF-1 α 蛋白表达阳性细胞比例分别为(47.88±14.71)%、(50.28±13.11)%、(43.09±10.04)%, 与视网膜细胞凋亡率呈正相关($r=0.953$)。缺血再灌注损伤3 d组视网膜细胞HIF-1 α mRNA表达明显高于正常对照组($P<0.05$)。结论 缺血再灌注后大鼠视网膜细胞凋亡与HIF-1 α 的表达均增加, 两者呈正相关; HIF-1 α 的表达可能参与视网膜细胞凋亡。

[关键词] 缺血再灌注; 视网膜; 低氧诱导因子1 α ; 凋亡

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.12.008

[中图分类号] R774.1

[文献标志码] A

Relationship between cell apoptosis and expression of hypoxia-induced factor-1 α in retinal cells after ischemia-reperfusion injury in rats

YUAN Hai-hong¹, ZHOU Wei², BAO Hui-ying¹, TAN Pan-pan², ZHU Zhao-rong³, WU Guo-zhong¹

(1. Laboratory of Pharmacology, Shanghai Institute of Health Sciences, Shanghai 201318, China; 2. Laboratory of Pharmacology, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 3. Department of Ophthalmology, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the changes of cell apoptosis and expression of hypoxia-induced factor-1 α (HIF-1 α) in retinal cells after ischemia-reperfusion injury in rats, and explore the relationship between them. **Methods** Male SD rats were randomly divided into normal control group, 1 d after ischemia-reperfusion injury group, 3 d after ischemia-reperfusion injury group and 5 d after ischemia-reperfusion injury group ($n=6$). Retinal ischemia-reperfusion injury model was induced by perfusing saline into anterior chamber of eye to generate the intraocular pressure of 110 mmHg for 50 min. Retinal sections were prepared, the thickness of inner plexiform layer (IPL) and inner nuclear layer (INL) and the number of cells in ganglion cell layer (GCL) were measured, the retinal cell apoptosis was determined by TUNEL, the expression of HIF-1 α in retinal cells was observed with immunohistochemical staining, and the expression of HIF-1 α mRNA at different time points after injury was detected by RT-PCR. **Results** Compared with normal control group, the thickness of IPL and INL was significantly lower ($P<0.01$), and the number of cells in GCL was significantly smaller in 1 d after ischemia-reperfusion injury group, 3 d after ischemia-reperfusion injury group and 5 d after ischemia-reperfusion injury group ($P<0.05$). Apoptosis of retinal cells occurred in GCL, and the apoptosis rates in 1 d after ischemia-reperfusion injury group, 3 d after ischemia-reperfusion injury group and 5 d after ischemia-reperfusion injury group were significantly higher than that

[基金项目] 上海市自然科学基金(11ZR1419300); 上海交通大学医学院自然科学基金(09XJ21079); 上海市教委科研创新项目(10YZ241)(Natural Science Foundation of Shanghai, 11ZR1419300; Natural Science Foundation of Shanghai Jiaotong University School of Medicine, 09XJ21079; Innovation Program of Shanghai Education Committee, 10YZ241)。

[作者简介] 袁海虹(1977—), 女, 讲师, 硕士; 电子信箱: yuanhaihong@126.com。

[通信作者] 吴国忠, 电子信箱: guozhongwu@hotmail.com。

in normal control group ($P < 0.01$). The rates of positive expression of HIF-1 α in GCL of retina in 1 d after ischemia-reperfusion injury group, 3 d after ischemia-reperfusion injury group and 5 d after ischemia-reperfusion injury group were $(47.88 \pm 14.71)\%$, $(50.28 \pm 13.11)\%$ and $(43.09 \pm 10.04)\%$ respectively, which were in line with the tendency of apoptosis of retinal cells ($r = 0.953$). The expression of HIF-1 α mRNA in 3 d after ischemia-reperfusion injury group was significantly higher than that in normal control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Both cell apoptosis and expression of HIF-1 α in retinal cells increase after ischemia-reperfusion injury in rats, and there is a positive correlation between them. The expression of HIF-1 α may play an important role in retinal cell apoptosis.

[Key words] ischemia reperfusion; retina; hypoxia-induced factor-1 α ; apoptosis

视网膜是机体代谢最活跃的组织,对氧高度敏感。眼部供血、供氧不足导致视网膜缺氧,视神经纤维轴浆流中断,继而靶源性神经营养因子供给中断,激活诱导凋亡的基因,促发视网膜细胞凋亡^[1]。低氧诱导因子1 α (hypoxia-induced factor-1 α , HIF-1 α)是重要的缺氧调节因子。HIF-1 α 可调控促红细胞生成素、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、糖酵解酶以及信号转导等多种生理过程^[2-4]。目前,HIF-1 α 在肿瘤的血管形成、细胞凋亡、耐药以及心脑血管缺血性疾病等方面的研究已成为关注热点^[5-9]。有关视网膜细胞内HIF-1 α 表达及HIF-1 α 参与低氧诱导视网膜细胞凋亡的证据,尚未见报道。本研究观察大鼠视网膜急性缺血再灌注损伤后视网膜细胞凋亡及HIF-1 α 的表达,应用免疫组织化学技术定量分析HIF-1 α 蛋白表达,探讨氧化应激诱导的视网膜细胞凋亡与HIF-1 α 表达的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

清洁级雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠,体质量250~350 g,由上海交通大学医学院实验动物中心提供。动物生产许可证号为SCXK(沪)2004-0001。主要实验仪器和药物:恒温干燥箱(THELCO,美国);自动切片机(LEITZ,德国);显微镜(LEICA,德国);实时定量PCR仪(INVITROGEN,美国);TUNEL原位细胞凋亡检测试剂盒(Roche,德国);DNA/RNA蛋白质共提取试剂盒(OMEGA,美国);RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas,美国);HIF-1 α 抗体(mouse monoclonal IgG antibody)购自美国Novus Biologicals公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组 SD大鼠双眼屈光介质清,瞳孔等大、等圆,对光反应好,眼底无异常。将实验动物随机分为正常对照组和缺血再灌注损伤1 d、3 d、5 d组,每组6只动物。每只动物进行单眼实验。

1.2.2 大鼠视网膜急性缺血再灌注模型制作 大鼠腹腔注射3%戊巴比妥钠(40 mg/kg)全身麻醉后,眼局部滴复方利多卡因注射液表面麻醉,将大鼠固定于鼠板上。散瞳后,左眼前房内插入5号灌注针头,针头连接乳酸钠林格氏液输液瓶,调整液面高度,产生约110 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)静水压,维持此眼内压50 min后,逐渐关闭输液,拔出针头,检眼镜检查视网膜动脉搏动,证实视网膜恢复供血,再灌注发生。

1.2.3 视网膜切片制备及分析 正常对照组大鼠及缺血再灌注损伤1 d、3 d、5 d组大鼠经麻醉后,取眼球,3.7%甲醛溶液固定,去角膜、晶状体和玻璃体后,常规乙醇梯度脱水,二甲苯透明,浸蜡,包埋,平行于眼球剖面通过视神经作连续切片,苏木精-伊红(HE)染色。每只动物取2张切片,每张切片采用LEICA数码相机在LEICA显微镜40倍物镜下以视神经为中心对称取6个部位(3个部位/侧)摄片,采用Image-Pro Plus(IPP)图像分析系统进行分析。测量内网层(inner plexiform layer, IPL)和内核层(inner nuclear layer, INL)厚度,双盲计数节细胞层(ganglion cell layer, GCL)细胞数。

1.2.4 视网膜细胞凋亡的检测 采用TdT介导的dUTP缺口末端标记技术(TUNEL)。取各组视网膜组织蜡块,切片脱蜡后按试剂盒说明对视网膜组织切片进行染色,阳性凋亡细胞核呈棕色染色。显微镜下以视盘为中心向两侧随机计数5个视野的阳性细胞数,计算阳性细胞百分比,以平均值表示细胞凋亡率。

1.2.5 免疫组织化学检测 采用MaxVision二步法进行染色。将各组视网膜组织石蜡切片脱蜡,切片置于0.01 mol/L、pH6.0的枸橼酸盐缓冲液内,微波抗原修复15 min,室温冷却20 min,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗3次,滴加3%过氧化氢室温下孵育10 min以阻断内源性过氧化物酶活性,PBS漂洗3次,然后滴加抗HIF-1 α 抗体(1:100),4℃孵育过夜,PBS漂洗3次,羊抗鼠/兔IgG抗体-HRP多聚体室温孵育

15 min, PBS 漂洗 3 次,DAB 显色,苏木精复染,常规梯度乙醇脱水,中性树胶封片观察。阴性对照以 PBS 代替一抗进行上述染色。每张切片采用 LEICA 数码相机在 LEICA 显微镜 40 倍物镜下摄片,用 IPP 图像分析系统进行分析。

1.2.6 RT-PCR 检测 取大鼠视网膜组织约 10 mg,加入蛋白裂解液 500 μ L、 β -巯基乙醇 10 μ L 后超声波破碎组织;其余步骤按 OMEGA 公司 DNA/RNA 蛋白质共提取试剂盒说明书进行。各实验组总 RNA 经紫外分光光度计测定浓度, -70 $^{\circ}$ C 保存备用。采用 Fermentas 公司 RevertAid First Strand cDNA Synthesis 试剂盒进行 PCR。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;然后进行 50 个循环反应(95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s)。基因的表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$,其中 $\Delta\Delta Ct$ =(待测样品目的基因 Ct 平均值 - 待测样本 THY 基因 Ct 平均值) - (对照样品目的基因 Ct 平均值 - 对照样本 THY 基因 Ct 平均值),THY 为参照。HIF-1 α 基因引物序列见表 1。

表 1 HIF-1 α mRNA 引物序列

Tab 1 Primer sequences of HIF-1 α mRNA

基因	引物序列
HIF-1 α	上游: 5'-CACTGGTGGCTCACCAAGTCTA-3' 下游: 5'-GGAGCTGTGAATGTGCTGTGA-3'
THY	上游: 5'-CAAGCTCCAATAAAACTATGAATGTG-3' 下游: 5'-GGAAGTGTGTTGAACCAGCAG-3'

1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件分析。采用单因素方差分析;对细胞凋亡率与 HIF-1 α 蛋白表达作相关性分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

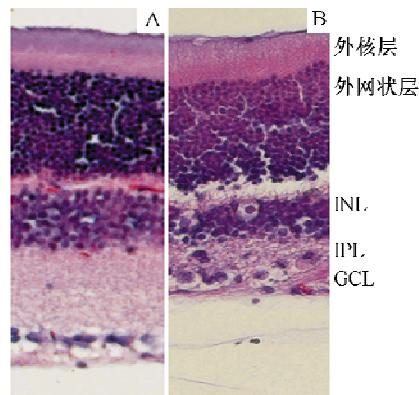
2.1 视网膜病理改变

HE 染色结果显示正常对照组大鼠视网膜层次结构清晰;GCL 细胞排列紧密,细胞染色均匀,核呈圆形,核仁清晰;缺血再灌注损伤组大鼠视网膜变薄(图 1)。缺血再灌注损伤 1 d、3 d、5 d 组大鼠 IPL、INL 厚度和 GCL 层细胞数目与正常对照组比较,均显著减小($P < 0.05$)(表 2);GCL 层细胞排列稀疏,染色不均。

2.2 各组视网膜细胞凋亡率比较

TUNEL 法检测凋亡细胞呈胞核染色,阳性细胞主要表现为细胞核呈棕黄色,阴性细胞呈蓝色;部分可由于核固缩,扭曲、破裂而失去正常形态,并可见凋亡小体。正常对照组未见或少见凋亡细胞;缺血

再灌注损伤 1 d、3 d、5 d 组细胞凋亡率分别为($23.55 \pm 5.76\%$)、($54.08 \pm 4.71\%$)、($48.79 \pm 8.70\%$),明显高于正常对照组的($4.25 \pm 1.92\%$)($P < 0.01$)(图 2)。



A. 正常对照组; B. 缺血再灌注损伤 3 d 组。

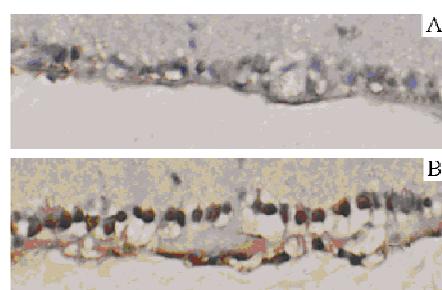
图 1 大鼠急性视网膜缺血再灌注损伤后视网膜变化 HE 染色 $\times 40$
Fig 1 Change of retina after acute ischemia-reperfusion injury in rats HE staining $\times 40$

表 2 大鼠急性视网膜缺血再灌注损伤后 IPL、INL 厚度和 GCL 细胞数的变化($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Thickness of IPL and INL and number of cells in GCL of retina after acute ischemia-reperfusion injury in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	INL 厚度/ μ m	IPL 厚度/ μ m	GCL 细胞数/(个/mm)
正常对照组	39.75 ± 2.76	69.15 ± 6.93	76.86 ± 24.45
缺血再灌注损伤组			
1 d	$14.03 \pm 5.22^{\text{②}}$	$19.17 \pm 7.66^{\text{②}}$	$30.77 \pm 22.06^{\text{②}}$
3 d	$35.04 \pm 1.93^{\text{②}}$	$40.44 \pm 10.14^{\text{②}}$	$51.17 \pm 11.40^{\text{①}}$
5 d	$27.06 \pm 6.99^{\text{②}}$	$45.12 \pm 7.36^{\text{②}}$	$59.16 \pm 17.63^{\text{①}}$

① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$ 与正常对照组比较。



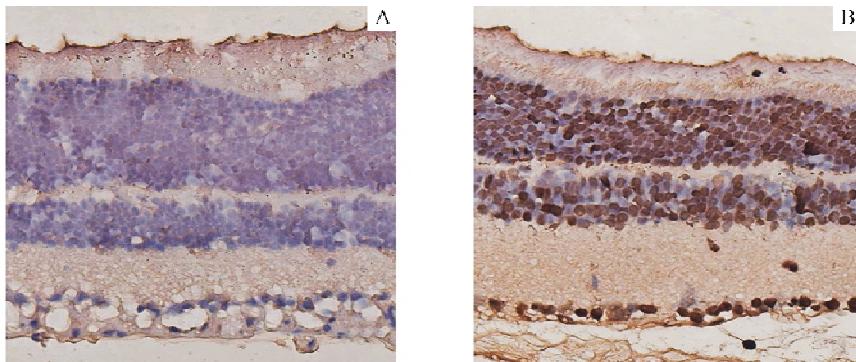
A. 正常对照组; B. 缺血再灌注损伤 3 d 组。

图 2 大鼠急性视网膜缺血再灌注损伤后视网膜细胞的凋亡 TUNEL $\times 40$
Fig 2 Retinal cell apoptosis after acute ischemia-reperfusion injury in rats TUNEL $\times 40$

2.3 各组视网膜细胞 HIF-1 α 蛋白的表达

正常对照组大鼠视网膜几乎没有 HIF-1 α 蛋白表达;缺血再灌损伤各组大鼠视网膜各层棕黄色阳

性细胞明显增多,GCL 改变最显著,棕色颗粒分布于视网膜细胞质和细胞核内(图 3)。缺血再灌注损伤 1 d、3 d、5 d 组视网膜 GCL 的 HIF-1 α 蛋白表达阳性细胞比例分别为($47.88 \pm 14.71\%$)%、($50.28 \pm 13.11\%$)%、($43.09 \pm 10.04\%$)%,显著高于正常对照组的($6.52 \pm 2.32\%$)%($P < 0.01$),与视网膜细胞凋亡表现一致,两者呈正相关($r = 0.953$)。



A. 正常对照组；B. 缺血再灌注损伤 3 d 组。

Fig 3 Expression of HIF-1 α in retinal cells after acute ischemia-reperfusion injury in rats detected by immunohistochemistry $\times 40$

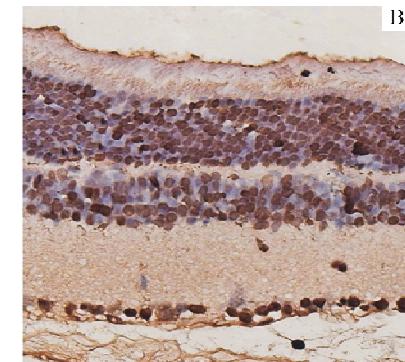
3 讨 论

视网膜缺血再灌注损伤是目前临幊上常见的眼病,主要发生于急性闭角性青光眼、视网膜中央动静脉栓塞、糖尿病视网膜病等视网膜血管阻塞所引起的缺血性眼病。有效挽救缺血视网膜组织的措施是早期恢复血液再灌注;然而临幊上发现在恢复供血后,却出现明显的功能障碍,甚至发生不可逆性损伤。因此,研究缺血再灌注后视网膜慢性病理性改变更具临幊意义。本实验结果显示:视网膜 INL 及 IPL 厚度明显变小,GCL 细胞数减少;TUNEL 法检测显示损伤 1 d 后视网膜细胞发生凋亡,3 d 后凋亡细胞数达到高峰,表明视网膜缺血再灌可引发视网膜细胞凋亡。视网膜再灌注时,视网膜组织恢复氧供的同时也使氧自由基爆发性增多并发生脂质过氧化,膜结构进一步损伤,组织水肿加重,神经纤维和线粒体高度肿胀。同时,还发生神经营养因子运输障碍,兴奋性氨基酸和各种细胞因子释放,钙离子内流,不但直接产生细胞毒性,还激活各种凋亡基因而引起细胞凋亡^[1]。

HIF-1 是缺氧条件下广泛存在的细胞缺氧反应信号蛋白,它由 α 亚基和 β 亚基组成, α 亚基决定其生物活性。HIF-1 α 表达严格受细胞氧浓度的调节。缺氧条件下,HIF-1 多聚羟化酶失活,HIF-1 α 能迅速与 HIF-1 α 聚合形成有活性的 HIF-1 二聚体,通过与

2.4 各组视网膜细胞 HIF-1 α mRNA 的表达

正常对照组视网膜节细胞中 HIF-1 α mRNA 相对表达量为 1.01 ± 0.18 ,缺血再灌注损伤 1 d 组 HIF-1 α mRNA 的表达下降至 0.82 ± 0.31 ,损伤 3 d 组升高至 1.29 ± 0.19 ,损伤 5 d 组恢复至 0.91 ± 0.11 。缺血再灌注损伤 3 d 组 HIF-1 α mRNA 表达量与正常对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



A. 正常对照组；B. 缺血再灌注损伤 3 d 组。

Fig 3 Expression of HIF-1 α in retinal cells after acute ischemia-reperfusion injury in rats detected by immunohistochemistry $\times 40$

靶基因上的缺氧反应元件结合而诱导靶基因的表达,影响低氧时血红蛋白合成、血管生成、代谢过程(葡萄糖转运、糖原合成、糖酵解等)以及信号转导等多种生理过程,具有重要的生物学功能^[2-4]。HIF-1 特别是 HIF-1 α 在缺氧相关疾病中的作用越来越受到重视,目前 HIF 在肿瘤的血管形成、细胞凋亡、耐药以及心脑血管缺血性疾病等方面的研究已成为关注的研究热点^[5-9],一些小分子 HIF 抑制剂(如 DX-52-1, quinocarmycin 类似物)正用于肿瘤临床 I 期试验^[10,11]。但 HIF-1 α 与视网膜缺氧相关疾病的关系鲜有报道,仅有 Tezel 等^[12]报道青光眼供体眼的视网膜与视神经乳头中 HIF-1 α 免疫染色显著增多,HIF-1 α 免疫荧光所定位的区域与视野缺损有着相似的空间关系。Chavez 等^[13]发现 HIF-1 α 及其靶基因在糖尿病大鼠的神经纤维中表达增加,揭示缺氧信号诱导 HIF-1 α 表达可能是视网膜神经变性的病理学机制。本研究提示缺血缺氧情况下视网膜中 HIF-1 α 表达显著增强,其中视网膜缺血再灌损伤 3 d 后 GCL 中 HIF-1 α 阳性细胞率和 mRNA 表达最高,与损伤后视网膜细胞凋亡率呈正相关。以上结果提示低氧能激活 HIF-1 α 高表达,HIF-1 α 可能诱导视网膜细胞凋亡及后续视功能减退;因此,阻断 HIF-1 信号通路的药物或方法将有助于视网膜缺血性疾病治疗。但 HIF-1 α 如何被激活以及激活后诱导视网膜细胞凋亡的途径及

分子调控机制并不清楚,亟待进一步研究解决。

本研究结果显示大鼠视网膜急性缺氧再灌损伤后,视网膜厚度变薄,细胞发生凋亡,且HIF-1 α 表达增强。本研究结果提示低氧能激活HIF-1 α 高表达,后者可能诱导视网膜节细胞凋亡及后续视功能减退,为今后以HIF-1 α 靶点的生物治疗运用于氧依赖性视网膜疾病提供了一定的理论依据。

[参考文献]

- [1] Sato T, Oku H, Tsuruma K, et al. Effect of hypoxia on susceptibility of RGC-5 cells to nitric oxide [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(5): 2575–2586.
- [2] Zhang P, Wang YS, Hui YN, et al. Inhibition of VEGF expression by targeting HIF-1 α with small interference RNA in human RPE cells[J]. Ophthalmologica, 2007, 221(6): 411–417.
- [3] Lee JW, Bae SH, Jeong JW, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) alpha: its protein stability and biological actions[J]. Exp Mol Med, 2004, 36(1): 1–12.
- [4] Hansen AE, Kristensen AT, Law I, et al. Hypoxia-inducible factor s-regulation, role and comparative aspects in tumourigenesis [J]. Vet Comp Oncol, 2011, 9(1): 16–37.
- [5] Schoppmann SF, Fenzl A, Schindl M, et al. Hypoxia inducible factor-1 alpha correlates with VEGF-C expression and lymphangiogenesis in breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2006, 99(2): 135–141.
- [6] 丁磊,陈孝平,王海平.肝癌和癌旁组织中HIF-1 α 基因蛋白的表达及其临床意义[J].肝胆外科杂志,2004,12(1):32–35.
- [7] Abbate A, Scarpa S, Santini D, et al. Myocardial expression of surviving, an apoptosis inhibitor, in aging and heart failure. An experimental study in the spontaneously hypertensive rat [J]. Int J Cardiol, 2006, 111(3): 371–376.
- [8] 罗开俊,陶陶,邓进,等.局灶性脑缺血再灌注后大鼠脑组织HIF-1 α 表达的观察[J].第三军医大学学报,2008,30(18):1733–1735.
- [9] Khan MN, Bhattacharyya T, Andrikopoulos P, et al. Factor inhibiting HIF (FIH-1) promotes renal cancer cell survival by protecting cells from HIF-1 α -mediated apoptosis [J]. BJC, 2011, 104(7): 1151–1159.
- [10] Hewitson KS, Schofield CJ. The HIF pathway as a therapeutic target [J]. Drug Discov Today, 2004, 9(16): 704–711.
- [11] Paul SAM, Simons JW, Mabjeesh NJ. HIF at the crossroads between ischemia and carcinogenesis [J]. J Cell Physiol, 2004, 200(1): 20–30.
- [12] Tezel G, Wax MB. Increased retinal expression of hypoxia inducible factor-1alpha: correlation with functional damage in postmortem glaucomatous eyes with the expression of adaptive and pathogenic proteins in isolated retina exposed to hypoxia [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42(1 Suppl): S410.
- [13] Chavez JC, Almhanna K, Berti-Mattera LN. Transient expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha and target genes in peripheral nerves from diabetic rats [J]. Neurosci Lett, 2005, 374(3): 179–182.

[收稿日期] 2011-03-14

[本文编辑] 张哲康

(上接第 1675 页)

- [10] Poltonen J, Hsiao LL, Jaakkola S, et al. Activation of collagen gene expression in keloids: co-localization of type I and VI type and transforming growth factor-beta1 mRNA [J]. J Invest Dermatol, 1991, 97(2): 240–248.
- [11] Xi-Qiao W, Ying-Kai L, Chun Q, et al. Hyperactivity of fibroblasts and functional regression of endothelial cells contribute to microvesSEL occlusion in hypertrophic scarring [J]. Microvasc Res, 2009, 77(2): 204–211.

- [12] Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJ, et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis [J]. J Biol Chem, 1999, 274(17): 11721–11726.
- [13] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. Cell, 1997, 88(2): 277–285.

[收稿日期] 2011-06-15

[本文编辑] 王淑平