

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.26.010

银杏叶提取物对过氧化氢刺激下的血管内皮细胞的影响*

王如科 孙源源 韩建一 逍 遥 史怀璋[△]

(哈尔滨医科大学附属第一医院 黑龙江 哈尔滨 150000)

摘要 目的: 探讨银杏叶提取物对血管内皮细胞的保护作用及可能的保护机制。**方法:** 进行血管内皮细胞培养。用过氧化氢(H_2O_2)处理血管内皮细胞建立细胞凋亡模型。将细胞分为四组:空白对照组、 H_2O_2 处理组、单独银杏叶提取物处理组、银杏叶提取物预处理组(提前2h给药后 H_2O_2 处理)。进行MTT检测细胞的相对活力、RT-PCR检测目的基因CHOP的表达、Western Blot分析目的蛋白CHOP的表达等。**结果:** 与对照处理组比较, H_2O_2 处理组细胞凋亡率、CHOPmRNA相对表达及CHOP蛋白表达量明显升高。与 H_2O_2 处理组比较,银杏叶提取物预处理组细胞凋亡指数、CHOPmRNA相对表达及CHOP蛋白表达量明显降低($P<0.05$)。**结论:** 作为一种清除自由基、抗氧化、抗衰老药物,银杏叶提取物可能通过调节CHOP蛋白选择性地抑制过度的内质网应激来保护血管内皮细胞。

关键词: 血管内皮细胞; 自由基清除剂; 内质网应激; 细胞凋亡; 银杏叶提取物

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)26-5038-04

Effects of Ginkgo Biloba Extract on Hydrogen Peroxide-stimulated Vascular Endothelial Cells*

WANG Ru-ke, SUN Yuan-yuan, HAN Jian-yi, XIAO Yao, SHI Huai-zhang[△]

(First affiliated hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the protective effects of the Ginkgo biloba extract on vascular endothelial cells and its possible mechanisms. **Methods:** The endothelial cells of blood vessels were cultured. The endothelial cells apoptosis model was established by treatment with hydrogen peroxide (H_2O_2). Then divide the cells into four groups: blank control group, H_2O_2 -treated group, single ginkgo biloba extract-treated group, ginkgo biloba extract pretreatment group (giving H_2O_2 at 2 h after administration of ginkgo biloba extract). The relative vitality were determined by MTT test cells. The expressions of gene CHOP were detected by RT - PCR, and the CHOP target protein expressions were detected by western blot analysis. **Results:** Compared with the control, the cells apoptosis rate, CHOPmRNA relative expression and CHOP protein expression was significantly increased in the H_2O_2 -treated group. Compared with H_2O_2 -treated group, the cells apoptosis rate, CHOPmRNA relative expression and CHOP protein expression was significantly reduced in the ginkgo biloba extract pretreatment group ($P<0.05$). **Conclusion:** As an antioxidant, free-radical scavenging and anti-aging medicine, Ginkgo biloba extract may protect endothelial cells by regulating CHOP protein and selectively inhibiting excessive endoplasmic reticulum stress.

Key words: Vascular endothelial cells; Radical scavenger; Endoplasmic reticulum stress; Apoptosis; Ginkgo biloba extract

Chinese Library Classification: R285.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)26-5038-04

前言

银杏叶最初作为一种治疗泻痢等症初始记载于《本草品汇精要》(1505年)。目前已广泛应用于临床治疗脑缺血疾病。作为脑保护剂,中药银杏叶提取物具有抗炎、抗氧化、抗衰老等多种生物功效^[1]。之前的研究表明^[2],银杏叶提取物抑制 OX.LDL 刺激的血管内皮细胞炎症蛋白 ICAM-1 表达、NF-KB 通道活化等而减轻细胞凋亡。然而,银杏叶提取物是否可以抑制血管内皮细胞内质网应激的作用机制并未十分明确。本研究采用 H_2O_2 刺激培养获得的血管内皮细胞,通过观察检测血管内皮细胞凋

亡关键蛋白的活性及蛋白间的关系,以证明银杏叶提取物可抑制过度的内质网应激从而保护血管内皮细胞。

1 材料与方法

1.1 实验细胞及试剂

血管内皮细胞 ECV-30、金纳多(德国威玛舒培博士大药厂注射液每毫升标定含银杏黄酮甙 9.6 mg,萜类 2.4 mg(银杏内酯,白果内酯))、 H_2O_2 (北京化工厂)、DMEM/F12 完全培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶(Hyclong 公司)、无血清培养添加剂、双抗、小鼠抗大鼠单克隆抗体、抗 CHOP 抗体(Sigma 公

* 基金项目:吴阶平医学基金项目(320.6750.12189)

作者简介:王如科(1984-),男,硕士研究生,研究方向:脑血管介入治疗,电话:18249514917,E-mail:wangru.ke@163.com

△ 通讯作者:史怀璋(1971-),男,博士生导师,教授,研究方向:脑血管介入治疗,电话:0415-58885945,E-mail:huaizhangshi@163.com

(收稿日期:2014-03-04 接受日期:2014-03-30)

司)、倒置显微镜、细胞流式仪、酶标仪等等。

1.2 研究方法

1.2.1 细胞培养 当细胞生长铺满 25 cm² 培养瓶底时,将瓶内旧培养液倒掉,PBS 液清洗细胞 2~3 次。加入 1 mL 左右 0.25 %胰酶,孵育 2 min,镜下见细胞皱缩变圆、细胞间隙增大时,加入含 10 %胎牛血清的完全培养液 2 mL 以终止胰酶的作用,用 1 mL 进口长枪头反复轻轻敲打细胞,使之从瓶壁脱落成细胞悬液。用 1 mL 进口长枪头转移至 1.5 mL EP 管内,1500 转/分钟离心 5 分钟,均匀铺板,待细胞达融合状态时用于实验。

1.2.2 MTT 检测血管内皮细胞活性 将 3 个培养瓶中的血管内皮细胞经消化、细胞计数、浓度稀释,以每孔 3000 个细胞、每孔 100 μ L,分别分为 6、9、12 组均匀接种到 3 个 96 孔板上,每组设置 8 个复孔,周边空白孔加等量 PBS 液进行封闭以消除边缘效应,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养,24 h 后每孔加 100 μ L 条件培养液,继续 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养,2 h 后每孔加 10 μ L MTT,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养,4 h 后倒掉 96 孔板中的液体,吸干残余液体,每孔加 100 μ L 二甲基亚砜,用酶标仪测定各孔 OD 值。

1.2.3 RT-PCR 1) 总的 RNA 的抽提取条件因素处理的细胞,加入裂解液室温放置 5 min 使其完全溶解,利用柱子法提取总的 RNA;2) 逆转录合成 cDNA 随机引物 1 μ L、dNTP(2.5mM each)10 μ L、RNA 酶抑制剂 1 μ L、样品 RNA 5 μ L 混合加蒸馏水至 22 μ L 70 $^{\circ}$ C 5 min 使 RNA 充分变性,然后立即放入冰浴利于引物与模板的结合 加入 M-MLMV 逆转录酶 1 μ L、10 $\times$ RT 缓冲液 2 μ L 42 $^{\circ}$ C 65 min 94 $^{\circ}$ C 5 min 合成 cDNA;3) 使用改良后的 TaKaRa Ex Taq HS 进行操作: 第一步预变性 95 $^{\circ}$ C 30 秒 20 $^{\circ}$ C/秒 1 个循环。第二步 PCR 反应 95 $^{\circ}$ C 5 秒 20 $^{\circ}$ C/秒 60 $^{\circ}$ C 20 秒 20 $^{\circ}$ C/秒 40 个循环。第三步融解 95 $^{\circ}$ C 0 秒 20 $^{\circ}$ C/秒 65 $^{\circ}$ C 15 秒 20 $^{\circ}$ C/秒 95 $^{\circ}$ C 0 秒 0.1 $^{\circ}$ C/秒 1 个循环。第四步降温 50 $^{\circ}$ C 30 秒钟 2.2 $^{\circ}$ C/秒 1 个循环;4) CHOP 基因进行 Realtime PCR 反应,反应结束后确认 RealTime PCR 的扩增曲线和融解曲线,进行 PCR 定量时制作标准曲线并分析数据。

1.2.4 Western Blot Analysis 检测 CHOP 蛋白表达水平 将血管内皮细胞在 10 cm 培养皿中进行培养,用 H₂O₂ 300 μ mol/L 处理,分别于培养 8 h 后经消化、低速离心收集细胞、加蛋白裂解液、低温高速离心收集好蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度,计算出蛋白加样量。紧接着进行 Western,其实验步骤简述如下: 配分离胶、配浓缩胶、样品和上样缓冲液混合后经 100 $^{\circ}$ C 水浴 5 分钟变性、安装电泳槽进行电泳(恒压 80 V 跑浓缩胶,恒压 120 V 跑分离胶)、转膜、5 % 封闭液 4 $^{\circ}$ C 2 h、摇床孵育 - 抗过夜、TPBS 洗膜 3 遍(每次 5 min)、摇床孵育二抗 1 h、显影,将蛋白图像扫描到电脑上。

1.2.5 细胞流式 细胞先用 PBS 清洗 3 遍;胰酶消化后,收集至流式管。依次加入 400 mL 连接缓冲液、悬浮细胞及 5 μ L 异硫氰酸荧光素标记的钙磷脂结合蛋白 V (Annexin V-FITC)、碘化丙啶(PI)进行 Annexin V.PI 染色,轻微震荡,室温避光反应 15 min,应用流式细胞仪检测。

1.2.6 统计学方法 采用 SPSS13.0 软件进行数据录入及分析,计量资料用均数 $\pm$ 标准差表示,组间比较采用单因素方差分析,组间差异采用 t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 实验结果显示

细胞凋亡率随 H₂O₂ 浓度的升高而增加,当 H₂O₂ 300 μ mol/L 作用 24 h 时(P<0.05)细胞损伤率近 50 %,为理想造模条件(图 1)。综合考虑选用 H₂O₂ 300 μ mol/L 为最佳造模刺激条件^[3]。而银杏叶提取物在 0.4 g/L 时细胞毒性损伤率与对照组一致,所以选择 0.4 g/L 为作用浓度(图 2)。实验结果现示单纯 300 μ mol/L H₂O₂ 处理时内皮细胞损伤率过半(P<0.05),而银杏叶预处理组内皮细胞损伤明显减少(P<0.05),接近正常对照组(图 3)。

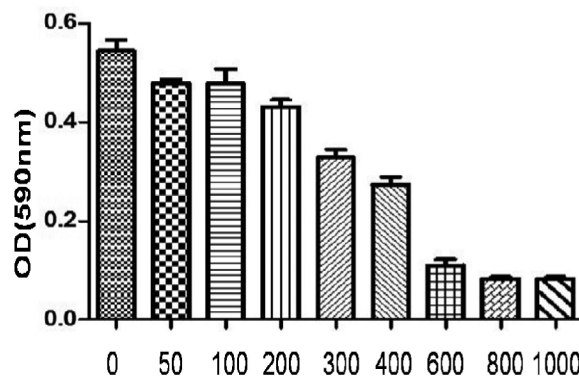


图 1 不同浓度的 H₂O₂ 对血管内皮细胞毒性损伤 OD 值变化(H₂O₂ 浓度: μ mol/L)

Fig. 1 Different concentrations of H₂O₂ poisonous to the cells of vascular endothelial injury OD value changes
Note:concentration: μ mol/L

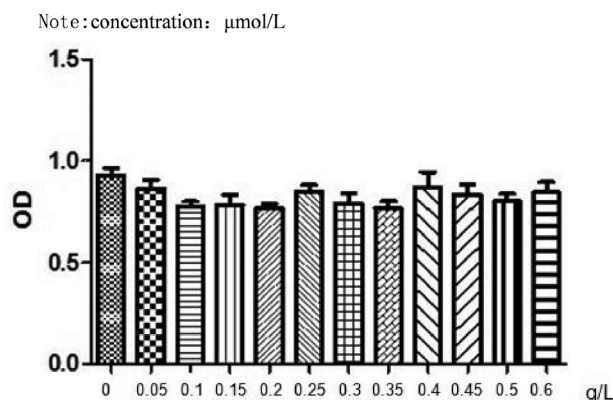


图 2 不同浓度的银杏叶提取物对血管内皮细胞毒性损伤 OD 值变化
Fig. 2 Effects of different concentrations of ginkgo biloba extract on vascular endothelial cell toxic injury OD value changes

注:空白对照组 A 0.2924 $\pm$ 0.0123 银杏提取物 0.2 g/L 组 B 0.2863 $\pm$ 0.0123 银杏叶提取物 0.4 g/L 组 C 0.2856 $\pm$ 0.0416 H₂O₂ 组 D 0.1062 $\pm$ 0.0215 银杏叶提取物 0.2 g/L + H₂O₂ 组 E 0.1343 $\pm$ 0.0164 银杏叶提取物 0.4 g/L + H₂O₂ 组 F 0.2591 $\pm$ 0.0810。

Note: Blank control group A 0.2924 $\pm$ 0.0123 Ginkgo biloba extract 0.2 g/L group B 0.2863 $\pm$ 0.0123 Ginkgo biloba extract 0.4 g/L group C 0.2856 $\pm$ 0.0416 H₂O₂ group D 0.1062 $\pm$ 0.0215 Ginkgo biloba extract 0.2 g/L + H₂O₂ group E 0.1343 $\pm$ 0.0164 Ginkgo biloba extract 0.4 g/L + H₂O₂ group F 0.2591 $\pm$ 0.0810.

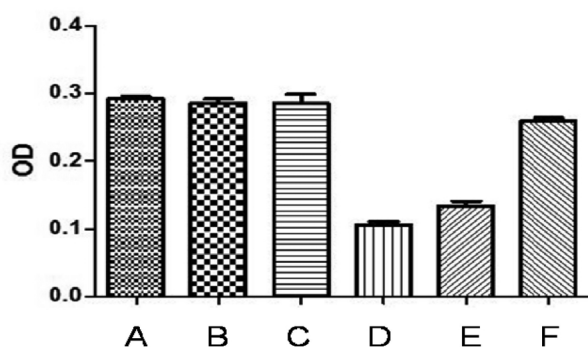


图3 各条件因素对血管内皮细胞毒性损伤 OD 值变化

Fig. 3 Conditions factors on vascular endothelial cell toxic injury OD value changes

2.2 RT-PCR 结果

H_2O_2 300 $\mu\text{mol/L}$ 处理时血管内皮细胞时, 8 h 时 CHOPmRNA 表达最高, 4 h、12 h 时较低但仍高于正常对照组 (图 4)。单纯银杏叶提取物处理时未见明显升高, 银杏叶预处理组稍增高。都比 H_2O_2 处理组明显下降 ($P < 0.05$) (图 5)。

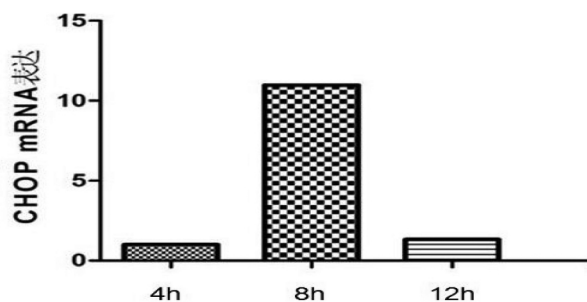
图4 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理血管内皮细胞后 CHOPmRNA 表达变化

Fig. 4 Processing CHOPmRNA expression changes after vascular endothelial cells

注: 空白对照组 A 1.02 ± 0.12 单纯银杏叶提取物组 B 1.03 ± 0.24 H_2O_2 组 C 36.21 ± 1.35 银杏叶提取物 + H_2O_2 组 D 8.20 ± 1.38 。

Note: Blank control group A 1.02 ± 0.12 Pure ginkgo biloba extract group B 1.03 ± 0.24 H_2O_2 group C 36.21 ± 1.35 Ginkgo biloba extract 0.4 g/L + H_2O_2 group D 8.20 ± 1.38 。

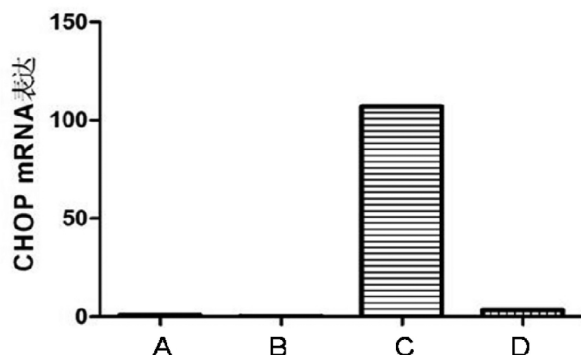


图5 各条件因素处理血管内皮细胞 8 h 后 CHOPmRNA 表达变化

Fig. 5 Conditions factors dealing with endothelial cells after 8 h CHOPmRNA expression changes

2.3 相关蛋白表达的 Western blot 结果

各组均可检测到 CHOP 表达。 H_2O_2 处理组中 CHOP 在刺

激 8 h 时 CHOP 蛋白表达量明显升高, 银杏叶预处理组其显著下降, 接近空白对照组和单独银杏叶处理组的 CHOP 的表达量 (图 6)。

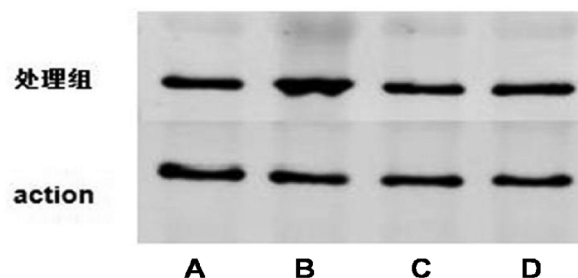


图6 各处理组 8 h 时 CHOP 蛋白表达情况

Fig. 6 Each treatment group CHOP protein expression in 8 h

注: 空白对照组 A H_2O_2 组 B 单纯银杏叶提取物组 C 银杏叶提取物 + H_2O_2 组 D。

Note: Blank control group A H_2O_2 group B Pure ginkgo biloba extract group C Ginkgo biloba extract + H_2O_2 group D。

2.4 细胞流式检测三组间 ROS 表达情况

银杏叶预处理组 ROS 表达与正常对照组无明显差异, 而 H_2O_2 300 $\mu\text{mol/L}$ 处理组 ROS 表达明显高于 ($P < 0.05$) 正常对照组和银杏叶预处理组两组 (图 7)。

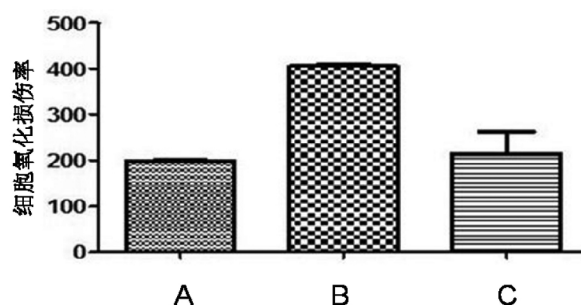


图7 细胞流式检测三组间 ROS 表达情况

Fig. 7 Cells flow detection ROS expression between the three groups

注: 对照组 A 218 ± 22.15 H_2O_2 组 B 416 ± 73.04 银杏叶提取物 + H_2O_2 组 C 313.667 ± 39.13 。

Note: Blank control group A 218 ± 22.15 H_2O_2 group B 416 ± 73.04 Ginkgo biloba extract 0.4 g/L + H_2O_2 group C 313.667 ± 39.13 。

3 讨论

内皮细胞的凋亡与动脉粥样硬化、动脉狭窄、血管支架成型术后再狭窄密切相关^[4]。而活性氧自由基是内皮细胞凋亡的主要原因之一, H_2O_2 是机体产生的活性氧, 在过氧化条件下能分解成氧自由基, 通过对生物膜中多不饱和脂肪酸的过氧化引起细胞损伤^[20,22], 最终形成动脉粥样硬化、出现和加重动脉狭窄、增加血管支架成型术后再狭窄发生率。据此本实验建立了以 H_2O_2 为处理因素的血管内皮细胞损伤模型。

银杏叶提取物作为一种新型清除自由基、抗氧化、抗衰老药物, 其中银杏内酯 B 的生理活性最强, 是迄今发现最强的血小板活化因子拮抗剂^[9], 可在临床上用于治疗血栓、急性胰腺炎和心血管疾病, 还可用于转移性癌症的治疗, 对细胞损伤也有

保护作用,能直接清除如 H_2O_2 、OH $^-$ 、 O_2 等活性氧,同时可以减轻脂质沉积,作为治疗脑缺血的有效药物已被普遍接受并应用,但其对血管内皮细胞保护的具体机制仍不是十分清楚。本实验的研究结果显示银杏叶提取物对血管内皮细胞的保护作用与其抑制内质网介导的细胞凋亡相关。我们采用 AnnexinV-PI 染色检测经 H_2O_2 刺激的血管内皮细胞,发现 H_2O_2 处理组血管内皮细胞凋亡明显增加,银杏叶提取物预处理组中,血管内皮细胞凋亡率则明显降低,证明银杏叶提取物对血管内皮细胞具有明显的保护作用。本实验中我们也发现了内皮细胞经 H_2O_2 刺激后由内质网应激诱导的 CHOP 蛋白表达量增加,而银杏叶提取物能阻断这种变化。证明银杏叶提取物可能通过调节 CHOP 蛋白的表达来阻断细胞凋亡。为银杏叶提取物对脑缺血的治疗作用提供了新的证据。但是我们只简单地证实银杏叶提取物调节由内质网应激引起的 CHOP 蛋白的表达,内质网应激途径尚未能详尽探讨。

内质网在细胞内具有重要的生理功能,包括负责正确折叠蛋白质的合成转运、信号肽识别和糖基化修饰、钙离子的储存和调节等。内质网应激由多种原因引起,如氧自由基侵袭、脂质沉积、酸碱失衡、缺血及药物等。这些刺激因素引起内质网到胞浆和胞核的信号转导,最终导致对细胞存活的适应或凋亡的一种亚细胞器病理变化叫做内质网应激(endoplasmic reticulum stress ERS),即是未折叠或者错误折叠蛋白在内质网腔内蓄积引发的未折叠蛋白质反应^[6,17,18];过强或持续的应激信号刺激时,内质网不能恢复稳态,此时内质网应激反而将从促细胞生存相转换为促细胞凋亡相,现有研究表明:内质网应激诱导的细胞信号转导通路主要包括 3 条:即 PERK (protein kinase R-like ER kinase)通路^[7]、ATF6(activating transcription factor 6)通路^[8,16]、IRE1 (inositol-requiring enzyme 1)通路^[9],IRE1、ATF6 及 PERK 的活化均可诱导 CHOP 基因表达^[10]。CHOP 蛋白上调使抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调,激活 caspase-12,活化的 caspase-12 激活下游 caspase-3 等启动细胞凋亡^[11,19]。

以往研究证实 H_2O_2 引起的氧化损伤可诱发过度的内质网应激^[12],而过度的内质网应激导致 CHOP 及其他许多不同蛋白的过度表达。CHOP 是导致凋亡的重要的凋亡蛋白酶,它可以诱导 Caspase 家族活化,特别是可以活化 Caspase-3。有研究表明,Caspase-3 活化与 H_2O_2 诱导的血管内皮细胞的凋亡相关^[13,21]。本实验中, H_2O_2 组 CHOP 活性显著升高,细胞大量凋亡,而银杏叶提取物预处理组可抑制 H_2O_2 引起的 CHOP 活性的升高。结果显示银杏叶提取物可以通过抑制 CHOP 的过表达而抑制细胞凋亡,从而减轻 H_2O_2 对其的损伤。证明银杏叶提取物可以通过调节内质网应激途径来对血管内皮细胞起到保护作用。

目前有研究通过敲除 CHOP 基因片段^[14]来抑制内质网过度应激,一定程度上抑制了内质网应激、细胞凋亡。但是这存在争议,必须提出一定程度上多元抑制剂可能对细胞造成毁灭性打击。同时基因片段敲除的细胞,导致其发育缺陷从而不能适应周围环境。最近的研究主要找一些中间调解物的特异性抑制剂^[15],从而抑制细胞凋亡,改善预后。

简言之, H_2O_2 引过度的内质网应激产生细胞凋亡,而银杏叶提取物预处理可抑制过度的内质网应激引起的细胞凋亡,起到保护血管内皮细胞的作用。我们虽然对银杏叶提取物对血管

内皮细胞的保护作用及其机制做了初步探究,但其是否还有稳定动脉斑块、减轻蛛网膜下腔出血后脑损伤和抑制微血栓形成等作用,这仍需进一步深入研究银杏叶提取物的作用机制,才能为其在临床的应用提供更可靠的科学依据。

参考文献(References)

- [1] Ma Li-na, Chen Dong-bei, Qi Ruo-mei, et al. Ginkgo lactone B the protective effect and molecular mechanism research of endothelial cells[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2013, 29(2): 189-193
- [2] Li R, Chen B, Wu W, et al. Ginkgolide B suppresses intercellular adhesion molecule-1 expression via blocking nuclear factor-kappa B activation in human vascular endothelial cells stimulated by oxidized low-density lipoprotein[J]. Pharmacol Sci, 2009, 110(3): 362-369
- [3] Gao Meng-meng, Sun Gui-bo, Sun Xiao-bo, et al. Red clover flavonoids on the vascular endothelial cells induced by H_2O_2 damage protection[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2013, 29(2):201-207
- [4] Wang Y K. Curculigoside attenuates human umbilical vein endothelial cell injury induced by H_2O_2 [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 132: 233-239
- [5] Akiba S, Chiba M, Mukaida Y, et al. The leaf extract of Ginkgo Biloba L suppresses oxidized LDL stimulated fibronectin production through an antioxidant action in rat mesangial cells[J]. Br Pharmacol, 2004, 142(3): 419-424
- [6] Sebastián Bernales, Marisol Morales Soto, Emma McCullagh. Unfolded protein stress in the endoplasmic reticulum and mitochondria: a role in transgenerational [J]. Frontiers in Aging Neuroscience, 2012, 4(5): 1-13
- [7] H P Harding, Y. Zhang, D. Ron. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase [J]. Nature, 1999, 397(6716): 271-274
- [8] D. Ron and P. Walter. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007, 8(7): 519-529
- [9] M. Calfon, H. Zeng, F. Urano, et al. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA [J]. Nature, 2002, 415(6867): 92-96
- [10] Tabas, I., and Ron, D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress[J]. Nat. Cell Biol, 2011, 13(7):184-190
- [11] Puthalakath H, O'Reilly LA, Kelly Huntington ND, et al. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim [J]. Cell, 2007, 129: 1337-1349
- [12] Ding W, Yang L, Zhang M, et al. Reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress contributes to aldosterone-induced apoptosis in tubular epithelial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 418(3): 451-456
- [13] Hermann C, Zeiher A M, Dimmeler S. Shear stress inhibits H_2O_2 -induced apoptosis of human endothelial cells by modulation of the glutathione redox cycle and nitric oxide synthase [J]. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biol, 1997, 17: 3588-3592
- [14] Zhaohui He, Robert P. Ostrowski. CHOP Silencing Reduces Acute Brain Injury in the Rat Model of Subarachnoid Hemorrhage [J]. Stroke, 2012, 43: 484-490

- [5] Knittel T, Kobold D, Dudas J, et al. Role of the Ets-1 transcription factor during activation of rat hepatic stellate cells in culture[J]. *Am J Pathol*, 1999, 155(1): 1841-1849
- [6] Znoyko I, Trojanowska M, Reuben A. Collagen binding $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 1\beta 1$ integrins play contrasting roles in regulation of Ets-1 expression in human liver myofibroblasts[J]. *Mol Cell Biochem*, 2006, 282(1-2): 89-99
- [7] Ozaki I, Mizuta T, Zhao G, et al. Induction of multiple matrix metalloproteinase genes in human hepatocellular carcinoma by hepatocyte growth factor via a transcription factor Ets-1 [J]. *Hepatol Res*, 2003, 27(4): 289-301
- [8] Mouly E, Chemin K, Nguyen HV, et al. The Ets-1 transcription factor controls the development and function of natural regulatory T cells[J]. *J Exp Med*, 2010, 207(10): 2113-2125
- [9] Barembaum M, Bronner ME. Identification and dissection of a key enhancer mediating cranial neural crest specific expression of transcription factor, Ets-1[J]. *Dev Biol*, 2013, 382(2): 567-575
- [10] Jantarotnotai N, Ling A, Cheng J, et al. Upregulation and expression patterns of the angiogenic transcription factor ets-1 in Alzheimer's disease brain[J]. *J Alzheimers Dis*, 2013, 37(2): 367-377
- [11] Lee KH, Koh SA, Kim JR. Hepatocyte growth factor-mediated gastrin-releasing peptide induces IL-8 expression through Ets-1 in gastric cancer cells[J]. *Oncol Res*, 2013, 20(9): 393-402
- [12] Kato M, Dang V, Wang M, et al. TGF- β induces acetylation of chromatin and of Ets-1 to alleviate repression of miR-192 in diabetic nephropathy[J]. *Sci Signal*, 2013, 6(278): ra43
- [13] Dong Z. Acetylation of Ets-1 is the key to chromatin remodeling for miR-192 expression[J]. *Sci Signal*, 2013, 6(278): pe21
- [14] Evangelista AM, Deschamps AM, Liu D, et al. miR-222 contributes to sex-dimorphic cardiac eNOS expression via ets-1 [J]. *Physiol Genomics*, 2013, 45(12): 493-498
- [15] Mizui M, Isaka Y, Takabatake Y, et al. Transcription factor Ets-1 is essential for mesangial matrix remodeling[J]. *Kidney Int*, 2006, 70(2): 298-305
- [16] Czuwara-Ladykowska J, Shirasaki F, Jackers P, et al. Fli-1 inhibits collagen type I production in dermal fibroblasts via a Sp1-dependent pathway[J]. *Biol Chem*, 2001, 276(24): 20839-20848
- [17] Li JC, Lau AS. A role for mitogen-activated protein kinase and Ets-1 in the induction of interleukin-10 transcription by human immunodeficiency virus-1 Tat[J]. *Immunology*, 2007, 121(3): 337-348
- [18] Liu S, Liang Y, Huang H, et al. ERK-dependent signaling pathway and transcriptional factor Ets-1 regulate matrix metalloproteinase-9 production in transforming growth factor-beta1 stimulated glomerular podocytes[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2005, 16(4-6): 207-216
- [19] Abrahamsen CT, Pullen MA, Schnackenberg CG, et al. Effects of angiotensins II and IV on blood pressure, renal function, and PAI-1 expression in the heart and kidney of the rat [J]. *Pharmacology*, 2003, 66(2): 26-30
- [20] Kosaka T, Miyajima A, Shirotake S, et al. Ets-1 and hypoxia inducible factor-1 α inhibition by angiotensin II type-1 receptor blockade in hormone-refractory prostate cancer[J]. *Prostate*, 2010, 70(2): 162-169

(上接第 5041 页)

- [15] Javeed Iqbal, Paul N. Meyer, Lynette M. Smith, et al. BCL2 Predicts Survival in Germinal Center B-cell-like Diffuse Large B-cell Lymphoma Treated with CHOP-like Therapy and Rituximab[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17: 7785-7795
- [16] Shen J, Chen X, Hendershot L, et al. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals[J]. *Dev Cell*, 2002, 3: 99-111
- [17] Liu XA, Song J, Jiang Q, et al. Expression of the hyperphosphorylated tau attenuates ER stress-induced apoptosis with upregulation of unfolded protein response[J]. *Apoptosis*, 2012, 17: 1039-1049
- [18] Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress[J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13: 184-190
- [19] L E Dalton, H J Clarke, J Knight, et al. The endoplasmic reticulum stress marker CHOP predicts survival in malignant mesothelioma[J]. *British Journal of Cancer*, 2013, 108: 1340-1347
- [20] Yokoyama M. Oxidant stress and atherosclerosis [J]. *Current Opin Pharmacol*, 2004, 4: 110-119
- [21] Xu Z R, Hu L, Cheng L F, et al. Dihydrotestosterone protects human vascular endothelial cells from H₂O₂-induced apoptosis through inhibition of caspase-3, caspase-9 and p38 MAPK [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 643: 254-259
- [22] Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature molecular and cellular mechanisms[J]. *Hypertension*, 2003, 42: 1075-1081