

Noxa 基因的克隆及其诱导 A549 细胞凋亡的研究*

陈登榜¹, 曹康¹, 杨靖², 潘渠¹, 陈恬¹, 李晋川¹,
王昕¹, 殷建华¹, 邹毅³, 魏常友^{1△}

1. 成都医学院(成都 610083); 2. 湖北医药学院微生物学教研室(十堰 442100);
3. 广东省食品药品监督管理局审评认证中心(广州 510080)

【摘要】 目的 克隆人 *Noxa* 基因,构建真核表达质粒 pcDNA-*Noxa*,将重组质粒 pcDNA-*Noxa* 转染人肺癌 A549 细胞株,并观察重组质粒 pcDNA-*Noxa* 诱导 A549 细胞凋亡的作用。方法 使用 RT-PCR 的方法扩增出 *Noxa* 基因,克隆至真核表达质粒 pcDNA(—),构建出重组质粒 pcDNA-*Noxa*。将重组质粒 pcDNA-*Noxa* 转染人肺癌 A549 细胞株,使用 Western blot 的方法检测 *Noxa* 基因的过表达;使用 Hoechst 33258 染色,观察 A549 细胞的凋亡;使用 MTT 法检测细胞活力。结果 经酶切和测序鉴定,重组质粒 pcDNA-*Noxa* 构建成功。Western blot 检测出 *Noxa* 基因的过表达;Hoechst 33258 染色和 MTT 实验发现,重组质粒 pcDNA-*Noxa* 能明显诱导 A549 细胞出现凋亡现象。结论 本实验初步探索了 *Noxa* 基因的促凋亡作用,为以后进一步深入研究 *Noxa* 基因的促凋亡功能基础。

【关键词】 *Noxa* 克隆 真核表达 凋亡

Apoptosis of A549 Cells Induced by Cloned Noxa Gene CHEN Deng-bang¹, CAO Kang¹, YANG Jing², PAN Qu¹, CHEN Tian¹, LI Jin-chuan¹, WANG Xin¹, YIN Jian-hua¹, ZOU Yi³, WEI Chang-you^{1△}. 1. Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China; 2. Department of Microbiology, Hubei University of Medicine, Shiyan 442100, China; 3. Guangdong Food and Drug Administration Center for Evaluation and Certification, Guangzhou 510080, China

△ Corresponding author, E-mail: 2830297980@qq.com

【Abstract】 **Objective** To clone the *Noxa* gene and to observe the apoptosis of A549 cells transfected with the recombinant plasmid of pcDNA-*Noxa*. **Methods** The *Noxa* gene was obtained by PCR, and was cloned into pcDNA3.1(—). A549 cells were transfected with the recombinant plasmid of pcDNA-*Noxa*. Western blot analysis was performed to determine the overexpression of *Noxa*. A549 cells were stained with Hoechst 33258 to observe the apoptosis. **Results** The recombinant plasmid of pcDNA-*Noxa* was successfully constructed evidenced by endonuclease digestion and sequence analysis. The overexpression of *Noxa* was identified using Western blot analysis. The recombinant plasmid of pcDNA-*Noxa* induced apoptosis of A549 cells. **Conclusion** *Noxa* has exhibited potential pro-apoptotic activity against A549 cells. This study is a foundation for further research into pro-apoptotic activity of *Noxa* gene.

【Key words】 *Noxa* Clone Eukaryotic expression Apoptosis

以手术、化疗和放疗为基础的综合治疗是目前最主要的治疗肿瘤的方式。虽然这些传统的治疗方法已经取得了很大的进展,但达到的效果有限。目前有些常见的肿瘤如肺癌的 5 年生存期仅为 12%、胃癌约 23%、卵巢癌约 40%^[1],所以人们开始寻求新的治疗手段,而选择性诱导肿瘤细胞凋亡便成为治疗恶性肿瘤的理想策略^[2]。随着分子生物学和肿

瘤学等学科的研究取得一系列的进展,肿瘤生物治疗近年来已成为继肿瘤化疗、放疗和手术治疗之后的第 4 种治疗手段,其中肿瘤基因治疗的发展尤为迅速^[3]。细胞凋亡是一种由基因调控的程序性死亡,是机体的一种非常重要的生理活动,对维持细胞正常生理过程具有非常重要的意义。目前的研究发现细胞凋亡与肿瘤的发生、发展及消退有着非常密切的关系^[4]。*Noxa* 是近年来发现的一个 Bcl-2 家族的成员,具有较为强大的促凋亡作用^[5]。本实验拟克隆人 *Noxa* 基因到真核表达载体 pcDNA3.1(—)中,将重组质粒 pcDNA-*Noxa* 转染人肺癌

* 四川省教育厅面上项目(No. 11ZB170)、四川省卫生厅科研课题(No. 120489)、成都医学院校基金(No. CYZ10-004, No. CYZ11-0059)和成都医学院学科建设项目(No. CYXK2012005)资助

△ 通讯作者, E-mail: 2830297980@qq.com

A549 细胞,观察 *Noxa* 基因对 A549 细胞的促凋亡作用。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pcDNA3.1(-) 购于 Invitrogen 公司; One Step RNA PCR Kit (AMV) 购于 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒 E. Z. N. A Plasmid Miniprep Kit I 购于 Omega 公司;胶回收试剂盒购自上海华舜生物公司生产的 Gel Extraction Min Kit;限制性核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Kpn* I 购于 Fermentas 公司;T4 DNA 连接酶,购自 New England 公司;Noxa 抗体购于 Santa Cruz 公司。感受态大肠杆菌 JM109 为 TaKaRa 公司产品;氨苄青霉素为国产注射用药;DNA marker, 购于 TaKaRa 公司;胰蛋白酶、酵母提取物, 购于 OXOID 公司;其余试剂均为国外或国产分析纯;人卵巢癌细胞株 A2780 和人肺癌细胞株 A549, 购于美国模式培养物集存库(ATCC);DMEM 细胞培养基和胎牛血清、胰酶(Tyrisin), 购自 Gibico 公司;TRIZOL[®] Reagent、脂质体 Lipofectamine[™] 2000 购于 Invitrogen 公司;Hoechst 33258 染色试剂购于 Sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 人卵巢癌 A2780 细胞和人肺癌 A549 细胞的培养 使用含 10% 胎牛血清(FCS)及青霉素(100 IU/mL)和链霉素(100 mg/mL)的 DMEM 培养基;置于 37 ℃、5%CO₂ 孵箱中培养;待细胞贴壁生长约 90% 时,弃上清,用 0.25% 胰酶消化传代。

1.2.2 A2780 细胞总 RNA 的提取 取一瓶人卵巢癌 A2780 细胞中加入顺铂致终浓度 5 μg/mL,并培养 24 h;使用 0.25% 的胰酶 37 ℃ 消化数分钟,离心后将上清丢弃然后加入 Trizol 试剂 500 μL,充分混匀。加入 150 μL 氯仿,用力震荡并室温放置 10 min;4 ℃、13 000 r/min、离心 12 min 后取上层液体移入另一 1.5 mL 的 EP 管。在 EP 管中加入 150 μL 异丙醇,颠倒混匀,放置 10 min 后使用 4 ℃、13 000 r/min、离心 12 min,然后用移液器吸去上清。在沉淀加入 1 mL 75% 乙醇,4 ℃、8 000 r/min、离心 10 min,吸去上清,自然干燥 5 min。

1.2.3 *Noxa* 基因的克隆 根据 Primer Premier 5 软件设计引物如下:上游引物 5'-GCTGAATTCGAGATGCCTGGGAAGAAGG-3',下游引物 5'-GATGGTACCTCAGGTTTCCTGAGCAGAAGAG-3'。上游引物 5' 端增加了 *EcoR* I 酶切位点,下游引物

5' 端增加了 *Kpn* I 酶切位点。引物由 TaKaRa 公司合成。RT-PCR 反应条件为:50 ℃ 15 min 后 94 ℃ 4 min,94 ℃ 30 s,55 ℃ 40 s,72 ℃ 1 min(30 个循环)最后 72 ℃ 延伸 10 min。

1.2.4 pcDNA3.1-*Noxa* 质粒的构建 RT-PCR 产物经酶切后,使用 T4 连接酶与 pcDNA3.1(-) 质粒连接,转化大肠杆菌 JM109 后经氨苄青霉素平板筛选。然后使用酶切鉴定重组质粒。最后将鉴定好的重组 pcDNA3.1-*Noxa*,送上海生工公司测序。

1.2.5 重组质粒 pcDNA3.1-*Noxa* 转染 A549 细胞 将 A549 细胞分为 3 组,一组为空白对照组;一组转染质粒 pcDNA3.1(-);另一组转染重组质粒 pcDNA3.1-*Noxa*。转染过程为:取 4 μg 质粒加入 250 μL 无血清和双抗 DMEM 细胞培养基中,混匀;室温放置 5 min。另取 10 μL Lipofectamine[™] 2000 加入 250 μL 无血清和双抗 DMEM 细胞培养基中,混匀;室温放置 5 min。将以上分别含有质粒的细胞培养基和含有脂质体的细胞培养基加到一起,充分混匀形成转染复合物,室温放置 20 min。每孔细胞板中加入 500 μL 转染复合物,最后加入 1.5 mL 无血清和双抗的 DMEM 培养液,轻轻摇匀后放入 CO₂ 细胞培养箱中培养。

1.2.6 Western bolt 鉴定 *Noxa* 基因在 A549 细胞的过表达 分别收集以上 3 组 A549 细胞至 EP 管中;每 EP 管细胞中加入 50 μL RIPA 裂解液,混匀。室温放置 15 min。12 000×g 离心 15 min(4 ℃)后弃沉淀,在样品中加入 2×SDS loading buffer,煮沸 3 min 后进行 SDS-PAGE 缓冲系统电泳。100 V 电压转膜 20 min。后将转膜后的 PVDF 膜经 5% 牛奶的封闭液过夜后加入 Noxa 抗体,37 ℃ 振摇 1 h;然后加入二抗(稀释度为 1:10 000)后 37 ℃ 振摇 1 h。在暗室中在 PVDF 膜上放上胶片,放置一定时间,将胶片放入洗片机中,观察结果。将重复 3 次的实验结果,使用 Quantity One 4.6.2 软件计算各条带的灰度值。统计各组数据后以各条带的相对灰度值(条带灰度与相应的 β-actin 的比值,以相应条带的 β-actin 的相对灰度值为 1)为纵坐标作图。

1.2.7 Hoechst 染色观察细胞凋亡 将以上 3 组细胞(空白对照组、转染质粒 pcDNA3.1 组和转染重组质粒 pcDNA3.1-*Noxa* 组)培养 48 h 后吸去培养液,加入 40 g/L 甲醛溶液,固定 15 min;再吸去甲醛溶液,用生理盐水洗 3 遍。然后在 6 孔板中每孔加入 1 μL Hoechst 33258 染色液,37 ℃ 10 min;最后用生理盐水冲洗 3 遍后在荧光显微镜下使用紫外激发光

观察并拍照。从每组中随机抽取 5 张未经剪切处理的原始照片,统计每张照片中有明显凋亡现象的细胞数,以各组凋亡细胞数为纵坐标作图。

1.2.8 MTT 法检测细胞活力 将以上 3 组细胞(空白对照组、转染质粒 pcDNA3.1 组和转染重组质粒 pcDNA3.1-*Noxa* 组)分别于 24 h 和 48 h 后在每个孔分别加入 20 μ L 的 MTT(5 mg/mL)。37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 4 h;然后吸去培养基,每个孔中加入 100 μ L DMSO,振荡混匀 10 min,置酶标仪上使用 570 nm 紫外光测定 OD 值。以空白对照组的 OD 值为 100%,以各组与空白对照组的 OD 值的比值为相对 OD 值。在完全相同的实验条件下每组细胞 3 个复孔,重复 2 次实验。

1.3 统计学方法

各组数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间比较使用单因素方差分析法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增 *Noxa* 基因

RT-PCR 扩增出的产物经 10 g/L 琼脂糖电泳,可见大小约 180 bp 的片段,与预期一致,见图 1。

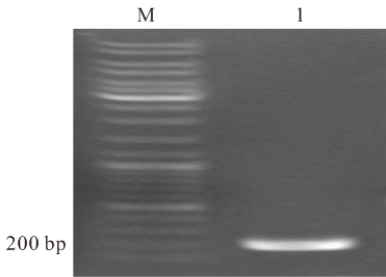


图 1 *Noxa* 基因的扩增
Fig 1 Amplification of *Noxa* gene

M: DNA marker; 1: RT-PCR product of *Noxa* gene

2.2 重组质粒酶切鉴定

重组质粒 pcDNA3.1-*Noxa* 使用 *EcoR* I / *Kpn* I 双酶切后,琼脂糖电泳可见大小约 180 bp 的片段,见图 2。

2.3 DNA 测序鉴定

测序结果表明构建出的真核表达重组质粒 pcDNA3.1-*Noxa* 完全与预期一致。将重组质粒 pcDNA3.1-*Noxa* 中的 *Noxa* 基因在 GenBank 上进行核酸 Blast 比对,证实所克隆出的 *Noxa* 基因准确无误。

2.4 *Noxa* 基因在 A549 细胞中的过表达

使用 Western blot 检测了 *Noxa* 基因的过表达。在大小约为 7×10^3 处,转染了重组质粒

pcDNA3.1-*Noxa* 的 A549 细胞有一条非常明显的条带,而空白对照组和转染质粒 pcDNA3.1(-) 组的 A549 细胞该处条带很弱,说明转染了重组质粒 pcDNA3.1-*Noxa* 的 A549 细胞确实能过表达 *Noxa* 基因。将重复 3 次的实验结果统计各组条带的相对灰度值,结果表明转染了 pcDNA3.1-*Noxa* 重组质粒组相比另外 2 组差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。

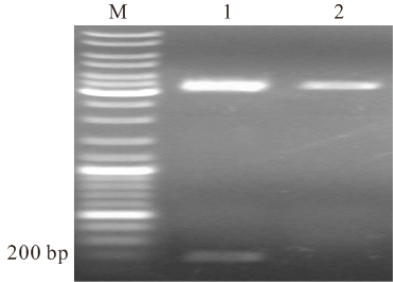


图 2 酶切鉴定重组质粒 pcDNA3.1-*Noxa*

Fig 2 Identification of recombinant plasmid pcDNA3.1-*Noxa*

M: DNA marker; 1: pcDNA3.1-*Noxa* digested by *EcoR* I / *Kpn* I; 2: pcDNA3.1(-) digested by *EcoR* I / *Kpn* I

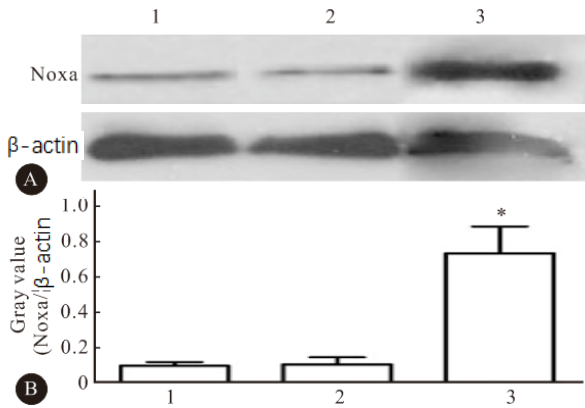


图 3 Western blot 检测 *Noxa* 基因在 A549 细胞中的过表达

Fig 3 Western blot analysis of *Noxa* overexpression in A549 cells

A: The representative Western blot analysis of *Noxa* overexpression in A549 cells; B: The relative value of Western blot analysis of *Noxa*. * $P < 0.05$, vs. other two groups. 1: Control cells of A549; 2: A549 cells transfected with pcDNA3.1(-); 3: A549 cells transfected with pcDNA3.1-*Noxa*

2.5 *Noxa* 基因对人肺癌 A549 细胞的促凋亡作用

使用 Hoechst 33258 染色,在荧光显微镜下观察细胞的凋亡现象:凋亡的细胞核出现肿胀、染色变深、致密和核碎裂。转染了重组质粒 pcDNA3.1-*Noxa* 的 A549 细胞出现了明显的细胞凋亡现象,而对照组和转染质粒 pcDNA3.1(-) 组的 A549 细胞很少出现凋亡。统计结果表明,转染 pcDNA3.1-*Noxa* 重组质粒组与另外 2 组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 4。

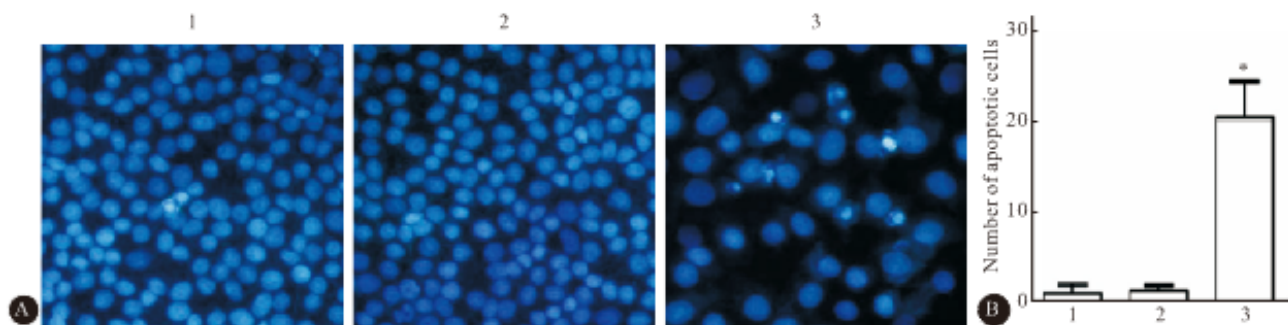


图 4 A549 细胞 Hoechst 染色。×400

Fig 4 Hoechst staining of A549 cells. ×400

A: The representative Hoechst staining of Noxa overexpression in A549 cells; B: The number of apoptotic cells. 1: A549 cells untreated; 2: A549 cells transfected with pcDNA3.1(-); 3: A549 cells transfected with pcDNA3.1-Noxa. * $P < 0.05$, vs. other two groups

2.6 MTT 法检测细胞活力

MTT 实验结果表明 pcDNA3.1(-) 组的细胞的生长没有受到抑制;而 pcDNA3.1-Noxa 组出现了细胞生长抑制现象,24 h 和 48 h 相对 OD 值降低,与另外 2 组相比,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 5。

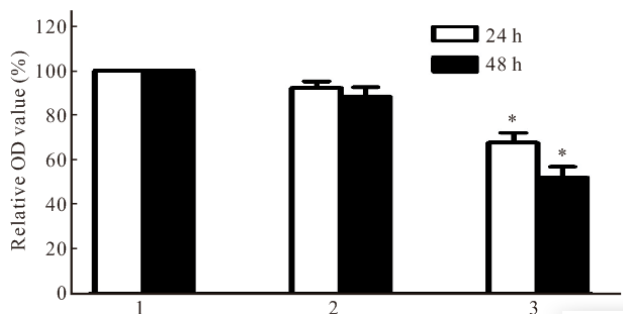


图 5 MTT 检测细胞活力

Fig 5 Cell viability of A549 cells determined by MTT

1: Untreated group; 2: pcDNA3.1(-) group; 3: pcDNA3.1-Noxa-treated group. * $P < 0.05$, vs. other two groups

3 讨论

人的 Noxa 基因位于染色体 18p21,大小为 4 301 bp,其 ORF 长 165 bp,编码 54 个氨基酸,含有 1 个 BH3 结构域和 1 个线粒体定位域^[6]。BH3 域一般为 28~37 号氨基酸,线粒体定位域为 41~50 号氨基酸。Noxa 是位于 p53 下游介导细胞凋亡的一个非常重要的调节因子。当细胞出现 DNA 损伤时,修复机制就会启动来对损伤的 DNA 进行修复。DNA 的损伤非常严重以致于无法完成修复工作时, p53 就会开始激活 Puma、Noxa、Bim 等 Bcl-2 家族分子的转录来诱导细胞出现凋亡,所以诱导上调 Noxa 的表达主要是通过 p53 途径。不过, Noxa 诱导的细胞凋亡还可以通过 p53 非依赖途径,比如

缺氧诱导因子 1 α 和转录因子 E2F1 等可以不通过 p53 而直接激活 Noxa 的表达,从而诱导细胞出现凋亡^[7,8]。目前,有报道称异位表达的 Noxa 基因能诱导乳腺癌细胞凋亡,但对肿瘤组织周围的正常细胞并没有毒性^[9]。这说明 Noxa 用于基因治疗具有一定的肿瘤靶向性,因此基于 Noxa 为靶点的基因治疗方案有良好的应用前景。

细胞发生的凋亡的机制是非常复杂的。目前研究者比较明确的两种细胞凋亡的途径,分别是内源性途径和外源性途径。外源性途径是通过由于细胞外的“死亡配体”与细胞上的“死亡受体”结合,从而激活了 Caspase-8;而内源性途径由 DNA 损伤等因素激活了 Caspase-9。而 Caspase-8 和 Caspase-9 激活之后,将导致下游的 Caspase 激活,比如 Caspase-3 和 Caspase-7 等,从而导致细胞凋亡^[10]。有研究发现: Noxa 能激活细胞释放线粒体中的细胞色素 C,导致 Caspase-9 和 Caspase-3 激活,从而使细胞出现凋亡^[11,12]。

综上所述,我们成功构建了重组真核表达质粒 pcDNA3.1-Noxa。转染该质粒到人肺癌 A549 细胞中,通过 Western blot 检测到了 Noxa 基因在人肺癌 A549 细胞株中的过表达。使用 Hoechst 33258 染色,在荧光显微镜下观察到了细胞的凋亡现象;用 MTT 法证实了 Noxa 基因确实可以抑制 A549 细胞的生长。本实验初步探索了 Noxa 基因的促凋亡作用,为以后进一步深入研究 Noxa 基因的促凋亡功能基础。

参 考 文 献

- 1 Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* Cancer statistics, 2007. CA Cancer J Clin, 2007; 57(1): 43-66. (下转第 726 页)

- 2007;21(3):247-248.
- 2 Neugebauer V, Lücke T, Schaible HG. Differential effects of N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptor antagonists on the responses of rat spinal neurons with joint input. *Neurosci Lett*,1993;155(1):29-32.
 - 3 Ma QP, Woolf CJ. Noxious stimuli induce an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent hypersensitivity of the flexion withdrawal reflex to touch; implications for the treatment of mechanical allodynia. *Pain*,1995;61(3):383-390.
 - 4 Foreman RD. Mechanisms of cardiac pain. *Annu Rev Physiol*, 1999;61:143-167.
 - 5 Kellgren J. Observations on referred pain arising from muscle. *Clin Sci*,1938;3:175-190.
 - 6 Jou CJ, Farber JP, Qin C, *et al.* Afferent pathways for cardiac-somatic motor reflexes in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp*

Physiol,2001;281(6):R2096-R2102.

- 7 Kream RM, Kato T, Shimonaka H, *et al.* Substance P markedly potentiates the antinociceptive effects of morphine sulfate administered at the spinal level. *Proc Natl Acad Sci USA*,1993;90(8):3564-3568.
- 8 Wu ZZ, Guan BC, Li ZW, *et al.* Sustained potentiation by substance P of NMDA-activated current in rat primary sensory neurons. *Brain Res*,2004;1010(1-2):117-126.
- 9 Traub RJ, Zhai Q, Ji Y, *et al.* NMDA receptor antagonists attenuate noxious and nonnoxious colorectal distention-induced Fos expression in the spinal cord and the visceromotor reflex. *Neuroscience*,2002;113(1-2):205-211.

(2013-03-06 收稿,2013-05-14 修回)

编辑 汤 洁

(上接第 716 页)

- 2 袁 铸, 严 飞, 赵新宇等. 小鼠凋亡相关新基因 PNAS-4 真核表达载体的构建、表达及体外抗肿瘤作用. *细胞与分子免疫学杂志*,2007;23(12):1140-1143.
- 3 Cohen SM, Lippard SJ. Cisplatin:from DNA damage to cancer chemotherapy. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*,2001;67:93-130.
- 4 张 明, 辛晓燕, 李红梅. hTERT 启动子驱动的 TRAIL 诱导宫颈癌细胞的凋亡作用. *细胞与分子免疫学杂志*,2007;23(7):638-644.
- 5 Oda E, Ohki R, Murasawa H, *et al.* Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*,2000;288(5468):1053-1058.
- 6 Lee SH, Soung YH, Lee JW, *et al.* Mutational analysis of Noxa gene in human cancers. *APMIS*,2003;111(6):599-604.
- 7 Huang DC, Strasser A. BH3-only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*,2000;103(6):839-842.
- 8 Kim JY, Ahn HJ, Ryu JH, *et al.* BH3-only protein noxa is a

mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia inducible factor 1 alpha. *J Exp Med*,2004;199(1):113-124.

- 9 Suzuki S, Nakasatom, M, Shibue T, *et al.* Therapeutic potential of proapoptotic molecule Noxa in the selective elimination of tumor cells. *Cancer Sci*,2009;100(4):759-769.
- 10 施一公. 细胞凋亡的结构生物学研究进展. *生命科学*,2010;22(3):224-228.
- 11 Schuler M, Maurer U, Goldstein JC, *et al.* p53 triggers apoptosis in oncogene-expressing fibroblasts by the induction of Noxa and mitochondrial Bax translocation. *Cell Death Differ*, 2003;10(4):451-460.
- 12 Milosevic J, Hoffarth S, Huber C, *et al.* The DNA damage-induced decrease of Bcl-2 is secondary to the activation of apoptotic effector caspases. *Oncogene*, 2003; 22(44):6852-6856.

(2013-01-06 收稿,2013-04-08 修回)

编辑 汤 洁

(上接第 721 页)

- 2 Devaraj S, Singh U, Jialal I. The evolving role of C-reactive protein in atherothrombosis. *Clin Chem*,2009;55(2):229-238.
- 3 Gagliardi AC, Miname MH, Santos RD. Uric acid: a marker of increased cardiovascular risk. *Atherosclerosis*,2009;202(1):11-17.
- 4 Kim SY, Guevara JP, Kim KM, *et al.* Hyperuricemia and coronary heart disease: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*,2010;62(2):170-180.
- 5 Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, *et al.* A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc*,2007;2(3):481-485.
- 6 Calabró P, Willerson JT, Yeh ET. Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation*,2003;108(16):1930-1932.
- 7 Kang DH, Park SK, Lee IK, *et al.* Uric acid-induced C-reactive protein expression: implication on cell proliferation and nitric oxide production of human vascular cells. *J Am Soc Nephrol*,2005;16(12):3553-3562.

- 8 Forte L, Cimmino G, Loffredo F, *et al.* C-reactive protein is released in the coronary circulation and causes endothelial dysfunction in patients with acute coronary syndromes. *Int J Cardiol*,2011;152(1):7-12.

- 9 Papezikova I, Pekarova M, Lojek A, *et al.* The effect of uric acid on homocysteine-induced endothelial dysfunction in bovine aortic endothelial cells. *Neuro Endocrinol Lett*,2009;30(Suppl 1):112-115.
- 10 Yu MA, Sánchez-Lozada LG, Johnson RJ, *et al.* Oxidative stress with an activation of the renin-angiotensin system in human vascular endothelial cells as a novel mechanism of uric acid-induced endothelial dysfunction. *J Hypertens*, 2010; 28(6):1234-1242.
- 11 齐 卡, 冯 哲, 洪 权等. 尿酸通过诱导线粒体钙稳态失衡介导内皮细胞炎症反应. *山东医药*,2010;50(20):15-18.
- 12 Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and *in vivo* monitoring of ROS. *Circulation*,2003;108(16):1912-1916.

(2013-03-06 收稿,2013-06-19 修回)

编辑 沈 进