

# 成人视网膜前体细胞的体外分离培养和鉴定

胡 洁, 唐仕波, 马 静, 李 斌, 林少芬

(中山大学中山眼科中心//眼科学国家重点实验室, 广东 广州 510060)

**摘 要:**【目的】对成人视网膜前体细胞进行体外分离、培养和鉴定。【方法】成人眼球 12 只,“机械分离联合酶消化法”分离出睫状上皮层的色素性细胞, 10 ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF) +10 ng/mL 表皮生长因子(EGF) 的无血清 DMEM/F12 培养液中培养, 并从三方面鉴定其神经干细胞特性: A. 免疫荧光染色检测神经干细胞特异性抗原神经巢蛋白 Nestin 的表达; B. 自我更新能力: 原代神经球消化传代后, 继续培养观察新神经球的形成; C. 多向分化潜能: 原代细胞培养 4-5 d, 改用含 10 mL/L 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液, 继续培养 7-10 d, 分别用抗神经丝蛋白(NF) 抗体、抗微管相关蛋白-2 (MAP2) 抗体、抗胶质纤维酸性蛋白(GFAP) 抗体、抗视紫质蛋白抗体、抗-微管蛋白抗体以及抗无长突细胞特异性抗体作免疫荧光细胞染色。【结果】0.48% ±0.08% (1 208) 原代细胞在含 bFGF+EGF 无血清培养条件下能保持增殖未分化状态, 形成神经球样结构, 消化传代后 90.1% ±8.3% 的第二代细胞能重新形成新的神经球样结构, 具有自我更新能力; 原代及传代后的神经球均表达神经干细胞特异性抗原 nestin; 在含 10 mL/L 胎牛血清的促分化培养液中, 细胞分别分化为可表达神经细胞、星形神经胶质细胞和感光细胞等特异性抗原的细胞, 表明具有多向分化潜能。【结论】在成人眼睫状体扁平部分离得到具有干细胞特性的视网膜前体细胞, 并在体外成功进行培养鉴定。

关键词: 成人; 眼; 视网膜前体细胞; 细胞培养; 鉴定

中图分类号: R77

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)05-0519-06

## In Vitro Isolation, Culture, and Identification of Retinal Progenitor Cells from Adult Human Eye

HU Jie, TANG Shi-bo, MA Jing, LI Bin, LIN Shao-fen

(Zhongshan Ophthalmic Center, State Key Laboratory of Ophthalmology, SUN Yat-sen University, Guangzhou, 510060, China)

**Abstract:** 【Objective】To isolate, culture, and identify retinal progenitor cells from adult human eyes in vitro. 【Methods】Pigmented epithelia of ciliary body from 12 eyes of adult persons were separated by the combined ways of mechanical tear and trypsinization, and then cultured in the serum-free medium supplemented with 10 ng/mL FGF-2 and 10 ng/mL EGF. Three aspects of experiments have been carried out to determine their characteristics of neural stem cells: A. Expression of the neural stem cell marker nestin by immunofluorescence staining; B. Self-renewal ability: primary neural spheres were dissociated into single cells and recultured for the observation of secondary neurosphere formation; C. Multipotential differentiation ability: primary cells were cultured in serum-free medium for 4-5 days, then the culture medium was replaced with 10 mL/L FBS DMEM/F12 for another 7-10 days before immunofluorescence analysis was performed using lineage-specific antibodies: anti-neurofilaments (NF), anti-microtubule-associated protein-2 (MAP2), anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP), anti-rhodopsin, anti-tubulin and anti-syntaxin. 【Results】0.48% ±0.08% (1 208) of the primary cells were capable of proliferating to form neurospheres in serum-free medium containing EGF+bFGF. 90.1% ±8.3% of dissociated single cells from the primary spheres gave rise to new neural spheres, showing the potential of self-renewal. Both the primary and secondary neurospheres expressed neural stem cell specific marker nestin. While in the differentiation promoting medium containing 10 mL/L FBS DMEM/F12, cells began to differentiate into neural-like cells expressing multiple

收稿日期: 2006-05-30

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目(30125041); 广东省教育厅“千百十”工程优秀人才培养基金(Q02027)

作者简介: 胡洁(1968-), 女, 广东广州人, 博士, 讲师, 2003-2005 赴澳大利亚国立大学从事博士后研究工作; 唐仕波, 博士生导师, 教授 通讯作者. E-mail: tangsb@mail.sysu.edu.cn

neuron-derived markers such as NF, MAP2, GFAP and rhodopsin, which corresponded to neurons, glia, and rod photoreceptors, respectively. This indicated their multipotentiality. 【Conclusions】 Retinal progenitor cells with the characteristics of neural stem cells from adult human ciliary body were isolated and cultured successfully in vitro.

Key words: adult human; eye; retinal progenitor cells; cell culture; identification

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(5):519-524]

随着角膜病、白内障等感染性和屈光间质混浊性致盲眼病的有效控制, 视网膜变性疾病已成为世界范围内的主要致盲眼病之一, 其根本病变在于感光细胞的丧失和凋亡。目前对这类疾病的治疗在感光细胞的再生和视功能重建等根本问题上一直未能取得突破。近年兴起的成体干细胞研究为此提供了新思路: 如能利用成年患者自身固有的成体干细胞/前体细胞对病变的组织进行替代、修复和功能重建, 既可以排除异体移植引起的免疫排斥反应又能避免应用胚胎干细胞所带来的道德伦理上的争论, 在临床上具有诱人的应用前景<sup>[1,2]</sup>。研究表明: 传统观点来看不可再生的成熟中枢神经系统中同样存在神经干细胞/神经前体细胞(neural stem cell, NSC / neural progenitor cell, NPC)<sup>[3-6]</sup>。目前, 国外学者已相继在鱼类、鸡类和成年啮齿类动物中分离出视网膜前体细胞<sup>[7-10]</sup>, 但对人类视网膜, 国内外多着眼于胚胎眼干细胞的体外培养和诱导分化<sup>[11-13]</sup>, 对成年人眼的相关研究, 国内尚未见报道。本研究拟在我们以往原位寻找和证实了成人睫状体区存在视网膜前体细胞的基础上(详见另文), 首次采用“机械分离与酶消化联合应用”的方法, 探讨在体外对成年人眼的视网膜前体细胞进行分离培养的有效途径, 并对其干细胞特性作了进一步的鉴定, 这将为下一步研究该类细胞的体外扩增、基因修饰、诱导分化打下基础, 为寻求视网膜变性疾病的治疗新途径提供实验和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验试剂

视网膜干细胞无血清培养液: DMEM/F12 培养基液(1:1, 美国 GIBCO 公司),  $1 \times 10^6$  (美国 GIBCO 公司), 10 ng/mL bFGF, 10 ng/mL EGF (美国 GIBCO 公司), 10 ng/mL 人白血病抑制因子(human leukemia inhibitory factor, hLIF) (美国 Sigma 公司), 25  $\mu$ g/mL 谷氨酰胺(L-glutamine, 美国 GIBCO 公司), 100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL

链霉素(北京华美生物工程公司)。视网膜干细胞含血清培养液: 上述无血清培养液中加入 10 mL/L 胎牛血清(杭州四季青家畜配种站), 但不含(basic fibroblast growth factor (bFGF) 和(epidermal growth factor(EGF)等生长因子。

### 1.2 组织取材和细胞培养

源自“广东省眼库”的新鲜猝死健康成人眼球 12 只, 均于死后 6~10 h 内取材。无菌条件下眼球浸于含 400 U/mL 庆大霉素的生理盐水中 30 min, 消毒 D-Hanks 液(美国 GIBCO 公司)冲洗 3 次, 沿前后径将眼球切开, 小心去除晶状体、虹膜后, 眼科显微有齿镊从眼球后极部将 RPE 连同巩膜提起, 利用玻璃体向下的重力作用慢慢由后向前越过锯齿缘, 将视网膜神经上皮层与视网膜色素上皮细胞分离的同时, 也将睫状上皮层从基质血管层中钝性分离, 然后再沿锯齿缘处将睫状上皮与视网膜分开, 彻底干净游离出睫状上皮(包括色素睫状上皮和无色素上皮层), 避免混有视网膜组织。加入含 0.1 mL/L EDTA 的 0.5 mL/L 胰蛋白酶(德国 TRYPIN 公司), 置含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内 37 消化 15 min, 含 100 mL/L FBS 的 DMEM/F12 培养液(1:1, 美国 GIBCO 公司)终止胰酶的消化, 900 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入含 10 ng/mL bFGF+10 ng/mL EGF(美国 GIBCO 公司)的无血清 DMEM/F12 培养液, 按  $5 \times 10^3$  个/mL 的密度将细胞分别接种于多聚赖氨酸(10  $\mu$ g/mL)(美国 Sigma 公司)包被的 24 孔培养板或盖玻片上, 置 37  $\pm$  5%CO<sub>2</sub> 培养箱中, 24 h 后半量换液, 以除去没有贴壁的细胞, 以后隔天换液 1 次, 倒置显微镜下观察 24 孔培养板中细胞的贴壁和生长情况并在 40 $\times$ 镜下计算每 100 个细胞中出现神经球的个数, 重复 3 个视野/孔, 共观察 5 个孔, 并计算均数作为神经球的出现率。

### 1.3 培养的原代细胞其神经干细胞特性的鉴定

#### 1.3.1 表达神经干细胞特异性抗原 Nestin 的检测

免疫荧光染色: 贴壁生长于盖玻片上的原代细胞: 经冷丙酮固定 5 min, 固定前后均 0.01 mol/L PBS 冲洗 2 次, 每次 5 min; 100 mL/L 过氧化

氢阻断内源性过氧化物酶 3 min 后 PBS 冲洗 3 次; 滴加特异性一抗(小鼠抗人 Nestin 单克隆抗体, 浓缩型, 1 50, 美国 BD Biosciences 公司), 4、100%的湿房中孵育过夜, PBS 冲洗 3 次; (4) 滴加已稀释的 FITC 标记得羊抗鼠 IgG 抗体(抗)(美国 Sigma 公司), 置避光处室温下湿度为 100%的湿房中孵育 1 h, PBS 冲洗 3 次; 荧光显微镜下观察结果并拍照。荧光波长为 393 nm。阴性对照用 0.01 ml/L PBS 代替一抗。

1.3.2 细胞自我更新能力的检测 原代细胞培养 4-5 d 后, 选取 24 孔培养板中逐渐增大呈球状的细胞团, 滴入 0.5 mL/L 胰蛋白酶(内含 0.1 mL/L EDTA) 消化液一滴覆盖其上, 倒置显微镜下观察细胞圆缩松散后, 立即加含 100 mL/L FBS 的 DMEM/F12 培养液终止反应。将细胞移至多聚赖氨酸(10  $\mu$ g/mL) 包被的盖玻片上, 轻轻吹打, 确保为分散的单细胞; 另按 1 个/孔的密度接种到 96 孔板、无血清 DMEM/F12 培养液中继续培养, 24 h 后半量换液, 以后隔天换半量。5-7 d 后当单细胞再次生长呈球状细胞团时, 计算出现神经球的培养孔数, 然后按上述方法将细胞团重新消化打散再种植, 如此消化传代 2-3 次后, 免疫荧光染色法检测细胞克隆团 Nestin 的表达, 方法见 1.3.1。

1.3.3 细胞多向分化潜能的检测 原代取材培养接种在盖玻片上的细胞在含 10 ng/mL bFGF+10 ng/mL EGF 的无血清条件下培养 4-5 d 后, 改用含 10 mL/L FBS 的 DMEM/F12 培养液, 继续培养 7-10 d, 倒置显微镜下观察。当细胞出现神经细胞样结构后, 取出盖玻片分别用抗 Nestin 抗体、抗神经丝蛋白 Neurofilament protein, NF) 抗体(北京中山生物技术有限公司)、抗微管相关蛋白-2

(microtubule-associated protein 2, MAP2) 抗体(1 800, 美国 Santa Cruz 公司)、抗胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体(北京中山生物技术有限公司)、抗视紫质蛋白(rodpsin) 抗体(浓缩型, 1 200, 美国 New Markers 公司)、抗-微管蛋白( $\alpha$ -tubulin) 抗体(1 200, 美国 ICNSanta Cruz 公司) 以及抗无长突细胞特异性抗体(syntaxin, 即用型, 美国 Gene 公司) 作免疫荧光细胞检测, 方法见 1.3.1, 通过了解这些不同类型神经细胞的存在, 以判断细胞具有向多种神经细胞分化的能力。

## 2 结果

### 2.1 人视网膜前体细胞在条件培养液作用下的体外生长特性

原代细胞刚取材接种时呈圆形、形态较小、含色素、较致密, 在含 10 ng/mL bFGF+10 ng/mL EGF 的无血清 DMEM/F12 培养液中培养 3-4 h 后部分细胞开始贴壁生长(图 1A); 24-48 h 后已贴壁的部分细胞胞体增大、变亮, 但多数细胞未贴壁, 悬浮死亡。培养 5-7 d, 0.48%  $\pm$  0.08% (1 208) 的原代细胞分裂成神经球(neurospheres) 样的细胞团(图 1B), 细胞饱满呈生长旺盛的状态, 有的细胞处于由一个分裂为两个的状态, 细胞间边界不清(图 1C)。而另一些含色素但体积没有变大的细胞, 2-3 d 后逐渐减少死亡。原代细胞或细胞团连续培养 10-14 d 后, 如不传代, 细胞出现表面粗糙、饱满度下降、透亮度减低等老化现象。本实验细胞连续传代 3-4 代后开始出现活力下降、增殖能力减弱等现象而最终死亡。

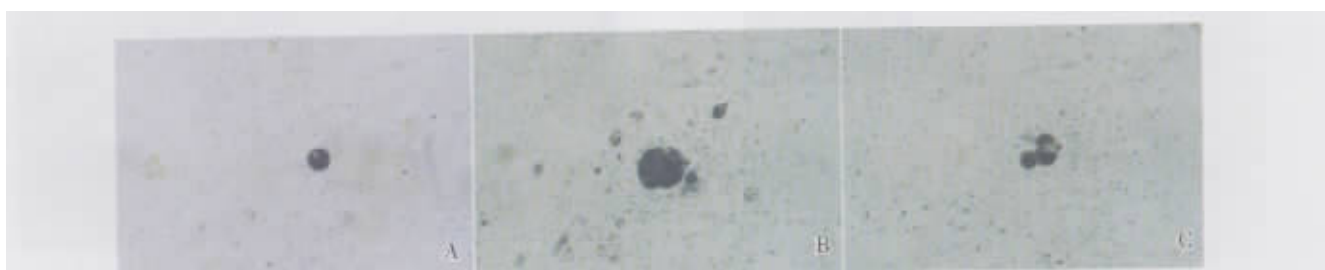


图 1 原代培养的视网膜前体细胞

Fig.1 Primary culture of retinal progenitor cells

A. Single cell obtained from pars plana of the ciliary body in serum free medium supplemented with EGF (10 ng/mL) and FGF2(10 ng/mL) for 3-4 h, 200  $\times$  B. Primary neurosphere formed in 5-7 d, 200  $\times$  C. Small spheres continued to grow in size and consisted of a mixture of cells of pigmented and lightly pigmented cells, 200  $\times$

## 2.2 细胞表达神经干细胞特异性抗原 Nestin

原代培养的神经球(neurospheres, 图 2), nestin 免疫荧光染色呈阳性(小图)。阴性对照不显荧光, 说明无非特异性反应存在。

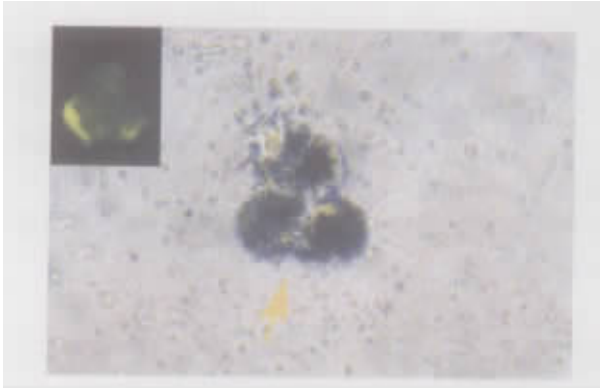


图 2 原代培养神经球 nestin 免疫荧光染色

Fig.2 Nestin immunofluorescence staining of primary spheres

Primary sphere, 200  $\times$ ; Insert: Immunofluorescence analysis revealed that the primary spheres were nestin- positive, 400  $\times$

## 2.3 细胞的自我更新能力

原代神经球消化成单细胞, 在含 10 ng/mL bFGF+10 ng/mL EGF 的无血清 DMEM/F12 培养液中培养 5-7 d, 90.1%  $\pm$  8.3% 的单细胞又逐渐增殖分裂、重新形成第二代的神经球(secondary neurospheres), 免疫荧光染色法检测 Nestin 表达呈阳性(图 3), 表明细胞具有自我更新能力。但连续多次传代后, 细胞再形成神经球的能力明显下降, 到第四代仅有 2.3%  $\pm$  0.4% 的单细胞能增殖生成新的神经球。

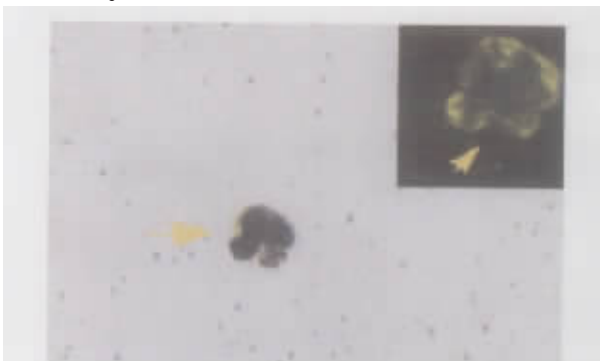


图 3 传代(2nd 代)培养神经球 nestin 免疫荧光染色

Fig.3 Nestin immunofluorescence staining of secondary spheres

Secondary sphere, 200  $\times$ ; Insert: Immunofluorescence analysis revealed that the secondary spheres were nestin- positive, 400  $\times$

## 2.4 细胞的多向分化潜能

细胞在含 10 ng/mL bFGF+10 ng/mL EGF 的无血清 DMEM/F12 培养液中原代培养 5 d 后, 改用 1 mL/100 mL FBS 的 DMEM/F12 培养液, 第 3 d 细胞开始“出芽”, 长出小突起, 第 7-10 天细胞突起增长成条状, 呈典型的神经元形态(图 4A, B)。免疫荧光细胞染色显示部分细胞及胞突表达神经细胞特异性抗原 NF、MAP2(图 5A, C); 部分表达神经胶质细胞抗原 GFAP(图 5B); 少许细胞表达视杆细胞特异性抗原 rhodopsin(图 5D), 而  $\alpha$ -微管蛋白( $\alpha$ -tubulin)、无长突细胞特异性抗原(syntaxin)均未见表达, 阴性对照不显荧光, 说明无非特异性反应存在。同时这些细胞的 nestin 染色呈阴性, 说明细胞分化成熟。

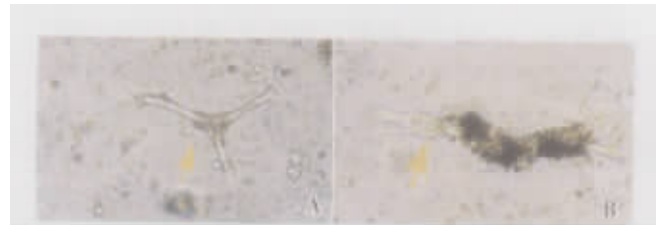


图 4 原代视网膜前体细胞在含血清条件培养液中分化出现神经细胞样结构

Fig.4 Primary retinal progenitor cells cultured in 10 mL/L FBS DMEM/F12 media

A-B: Cells were differentiated into spheres with neuronal morphology in the presence of 1 mL/100 mL FBS media without exogenous growth factors, 400  $\times$

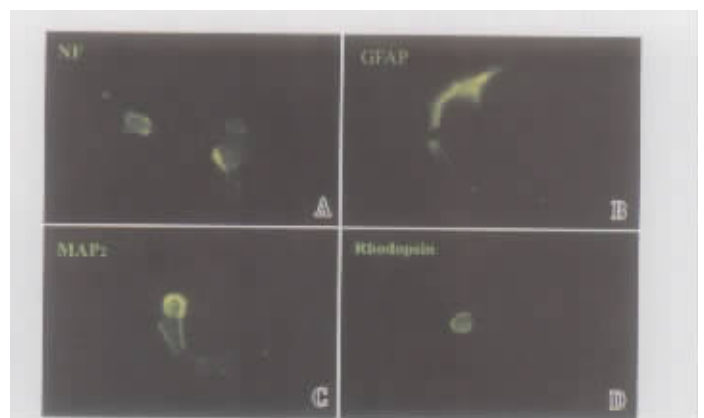


图 5 免疫荧光染色检测分化细胞表达不同的神经细胞和星形神经胶质细胞抗原

Fig.5 Immunofluorescence analysis of the expression of different neural markers in the differentiated cells

A. a neuronal marker: NF, 400  $\times$ ; B. an astrocytic marker: GFAP; C. another neuronal marker: MAP2; D. a rod-photoreceptor marker: rhodopsin, 400  $\times$

### 3 讨论

#### 3.1 视网膜前体细胞的取材和培养

组织学上睫状体从内到外由无色素睫状上皮、色素睫状上皮、基质、睫状肌、睫状体上腔组成。存在于睫状体色素上皮层的视网膜前体细胞由于数量少、部位隐匿,给取材带来一定的困难。本实验开始曾尝试采用 Ahmad 等<sup>[9]</sup>的酶消化两步法:先用含 200 U/mL 胶原酶和 100 U/mL 透明质酸酶的 HBSS(Hank's balanced salt solution)液将无色素睫状上皮与色素睫状上皮分离;再用 2.5 mL/L 胰蛋白酶 1 mmol/L EDTA 和 20  $\mu$ g/mL DNaseI 消化色素睫状上皮细胞,结果发现消化的时间和程度难以控制:时间太短,细胞不易脱落,数量少;时间稍长就易过度消化到富含血管和结缔组织的基质层,所获细胞中夹杂大量血细胞、纤维细胞和色素颗粒,使前体细胞的存活率明显下降。后来,我们根据睫状体无色素上皮细胞与色素上皮细胞之间连接紧密、不易分离,以及玻璃体与视网膜锯齿缘、睫状体扁平部粘连牢固的特点,采用“机械分离联合酶学消化法”的方法:即利用玻璃体向下的重力作用慢慢将无色素和色素睫状上皮从基质血管层中机械分离出来,然后再将获得的睫状上皮层单独用酶进一步消化成单细胞进行培养,取得成功。由于所获细胞成分较纯(主要是无色素和色素睫状上皮细胞),避免了基质层血细胞和纤维细胞的干扰,细胞存活率高,而且所夹杂的无色素上皮细胞不易贴壁,1~2 d 后自动淘汰死亡,另一些已贴壁的睫状色素上皮细胞,在无血清的培养液中难以存活,2~3 d 后也逐渐减少死亡,从而筛选出较纯的细胞。

#### 3.2 培养细胞的神经干细胞特性的鉴定

对于神经前体细胞的鉴定,关键在于检验其是否具有神经干细胞的重要特性<sup>[9-10]</sup>:A 表达特异性抗原 Nestin;B 自我更新能力;C 多向分化潜能。本实验显示所取材培养的细胞均有上述三大特征:原代培养的神经球对 Nestin 抗体呈阳性反应,表明其组成是终末未分化、神经外胚层来源的幼稚细胞;将神经球消化成单细胞传代培养,又可迅速增殖生成下一代神经球,显示细胞具有“自我更新”的特点;将培养液中的生长因子换成 10 ml/L FBS 后,无论是原代细胞还是传代后形成的神

经球均长出神经细胞样突起,并能表达 NF、MAP2 或 GFAP 等神经细胞或神经胶质细胞特异性抗原,说明细胞具有向神经元和神经胶质细胞双系分化的“多向潜能”的特性。

神经干细胞与神经前体细胞的区别在于前者具有永生化的无限自我更新能力和分化潜能,而后者则自我更新和分化潜能有限<sup>[14]</sup>。本实验所获得的细胞传代 3~4 代后,其活性明显下降,自我更新能力由原代的 90.1%  $\pm$  8.3%,到第四代下降到仅有 2.3%  $\pm$  0.4%;且在含血清的促分化培养液中细胞分化成表达神经细胞、神经胶质细胞和感光细胞抗原的成熟细胞而未能分化出所有视网膜 6 种神经细胞。这可能是我们的研究对象——成人眼球,其细胞自身的内在基因调控和所处的微环境相对于胚胎期的视网膜干细胞有很大差别,从而限制了其无限更新和多向分化的潜能,同时也表明成人眼睫状体中存在的是具有干细胞特性而又相对于干细胞较为成熟的视网膜前体细胞。此外,EGF 是决定视网膜干细胞向感光细胞分化的重要因子<sup>[15]</sup>,培养液中含有过的 EGF 可能对神经球部分分化为感光细胞(rhodopsin 阳性细胞)有一定的诱导作用。寻找影响干细胞分化出不同类型终末细胞的关键因素并对其进行调控,使前体细胞向所需要的特定细胞类型分化是我们要进一步深入探讨的问题;同时不断改进培养技术和条件,在体外形成可稳定扩增传代的细胞株也是今后需要继续研究的课题。

#### 参考文献:

- [1] FELDMANN R E J R, MATTERN R. The human brain and its neural stem cells postmortem: from dead brains to live therapy [J]. *Int J Legal Med*, 2005,7(1): 1- 11.
- [2] 姚晓梨,张成,刘卫彬,等.成人骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞及与凋亡的关系[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2004,25(6):516- 520.
- [3] FRICKER RA, CARPENTER MK, WINKLER C, et al. Site-specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain [J]. *J Neurosci*, 1999, 19(6): 5990- 6005.
- [4] ARVIDSSON A, COLLIN T, KIRIK D, et al. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke [J]. *Nat Med*, 2002, 8(4):963- 970.
- [5] ARLOTTA P, MAGAVI S S, MACKLIS J D. Induction of adult neurogenesis: molecular manipulation of neural

- precursors in situ [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2003, 991(2): 229- 236.
- [6] JIN K, SUN Y, XIE L, et al: Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 24(1): 171- 189.
- [7] AHMAD I. Stem cells: new opportunities to treat eye diseases [J]. *Invest Ophthalmol Visual Sci*, 2001, 42(6): 2743- 2747.
- [8] PERRON M, KANEKAR S, VETTER ML, et al. The genetic sequence of retinal development in the ciliary margin of the xenopus eye [J]. *Dev Biol*, 1998, 199(2): 185- 200.
- [9] AHMAD I, TANG L, PHAM H. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye [J]. *Bioch Bioph Res Comm*, 2000, 270(3): 517- 521.
- [10] TROPEPE V, COLES B L, CHIASSON B J, et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye [J]. *Science*, 2000, 287(54): 2032- 2036.
- [11] YANG P, SEILER M G, ARAMANT R B, et al. In vitro isolation and expansion of human retinal progenitor cells [J]. *Exp Neurol*. 2002,177(1):326- ,331.
- [12] 马 静, 唐仕波, 罗 燕, 等. 条件培养液对人视网膜前体细胞分化的诱导[J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2006, 1(41):65- 68.
- [13] 俞海燕, 沈 丽, 陈 雪, 等. 体外培养人胚胎来源视网膜干细胞的诱导分化[J]. *中华眼科杂志*, 2004, 7 (40): 448- 452.
- [14] COLES BL, ANGENIEUX B, INOUE T, et al. Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(44): 15772- 15777.
- [15] LILLIEN L. Changes in retinal cell fate induced by overexpression of EGF receptor [J]. *Nature*, 1995, 377 (6545): 158- 162.

(编辑 刘清海)

(上接第 518 页 from page 518)

而发挥心脏保护作用。另一方面, 血管紧张素-(1-7)受体可能存在不同的亚型, 不同剂量的血管紧张素-(1-7)可能与不同受体亚型结合, 发挥的作用也就可能不同。

## 参考文献:

- [1] FERREIRA A J, SANTOS R A, ALMEIDA A P. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion [J]. *Hypertension*, 2001, 38 (3): 665- 668.
- [2] FERREIRA A J, SANTOS R A, ALMEIDA A P. Angiotensin-(1-7) improves the post-ischemic function in isolated perfused rat hearts [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2002, 35(9):1083- 1090.
- [3] 何建桂, 廖新学, 马 虹, 等. 血管紧张素-(1-7)与血管紧张素 在心肌缺血再灌注损伤中的作用[J]. *临床心血管病杂志*, 2003, 19 (10): 615- 617.
- [4] 廖新学, 何建桂, 马 虹, 等. 血管紧张素-(1-7)对大鼠心肌缺血再灌注的影响[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2003, 24 (5): 451- 454.
- [5] NEVES L A, ALMEIDA A P, KHOSLA M C, et al. Effect of angiotensin-(1-7) on reperfusion arrhythmias in isolated rat hearts [J]. *Braz J Med Biol Res*, 1997, 30 (6): 801- 809.
- [6] GONZALES S, NORIEGA G O, TOMARO M L, et al. Angiotensin-(1-7) stimulates oxidative stress in rat kidney [J]. *Regul Pept*, 2002, 106(1-3): 67- 70.
- [7] HEITSCH H, BROVKOVYCH S, MALINSKI T, et al. Angiotensin-(1-7)-stimulated nitric oxide and superoxide release from endothelial cells [J]. *Hypertension*, 2001, 37 (1): 72- 76.
- [8] OUDOT A, VERGELY C, ECARNOT-LAUBRIET A, et al. Pharmacological concentration of angiotensin-(1-7) activates NADPH oxidase after ischemia-reperfusion in rat heart through AT1 receptor stimulation [J]. *Regul Pept*, 2005, 127(1-3): 101- 110.
- [9] KIMURA S, ZHANG G X, NISHIYAMA A, et al. Role of NAD(P)H oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in cardioprotection of ischemic reperfusion injury by angiotensin [J]. *Hypertension*, 2005, 45(5): 860- 866.
- [10] HARDT S E, SADOSHIMA J. Negative regulators of cardiac hypertrophy [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 63(3): 500- 509.
- [11] TONG H, IMAHASHI K, STEENBERGEN C, et al. Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway is cardioprotective [J]. *Circ Res*, 2002, 90(4): 377- 379.
- [12] BULLARD A J, GOVEWALLA P, YELLON D M. Erythropoietin protects the myocardium against reperfusion injury in vitro and in vivo [J]. *Basic Res Cardiol*, 2005, 100(5): 397- 403.

(编辑 黄小延)