

[文章编号] 1007-3949(2006)14-01-0045-05

·实验研究·

肝细胞生长因子对糖基化终产物诱导内皮细胞凋亡的影响

周一军¹, 张锦¹, 王佳贺²

(中国医科大学附属第一医院 1. 内分泌科, 2. 感染科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 内科学; 肝细胞生长因子对细胞凋亡的影响; 流式细胞术; 糖基化终产物; 肝细胞生长因子; 细胞凋亡; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨糖基化终产物对内皮细胞的凋亡作用, 以及肝细胞生长因子对内皮细胞凋亡的影响。方法 体外培养人脐静脉内皮细胞, 予不同浓度糖基化终产物及肝细胞生长因子干预, 分为实验对照组及 100 mg/L、200 mg/L、400 mg/L 糖基化终产物组和 400 mg/L 糖基化终产物 + 100 μg/L 肝细胞生长因子组, 采用四甲基偶氮唑蓝比色法测定各组内皮细胞生长抑制率, 通过吖啶橙荧光染色观察细胞形态学变化, 流式细胞术测定 Annexin V-FITC/PI 双染标记的细胞凋亡率, 检测肝细胞生长因子对糖基化终产物诱导内皮细胞凋亡的影响; 蛋白免疫印迹法分析各组凋亡基因 Bax、Bcl-2 蛋白的表达及酶联反应法测定细胞凋亡蛋白酶 3 的活性。结果 肝细胞生长因子能明显降低糖基化终产物对内皮细胞生长的抑制作用 ($P < 0.01$); 糖基化终产物诱导培养的内皮细胞出现明显的凋亡形态学改变, 在一定浓度范围内, 内皮细胞凋亡率与糖基化终产物的浓度和作用时间呈依赖关系, 肝细胞生长因子干预后可显著降低不同时间的内皮细胞凋亡率 ($P < 0.05$); 肝细胞生长因子作用内皮细胞抗凋亡基因 Bcl-2 表达明显升高 ($P < 0.01$), 而促凋亡基因 Bax 表达无明显变化 ($P > 0.05$); 细胞凋亡蛋白酶 3 活性显著降低 ($P < 0.05$)。结论 糖基化终产物诱导内皮细胞凋亡, 而肝细胞生长因子抑制糖基化终产物诱导的内皮细胞凋亡, 其作用机制可能是上调抗凋亡基因 Bcl-2 水平、抑制细胞凋亡蛋白酶 3 的激活。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Hepatocyte Growth Factor on the Apoptosis of Endothelial Cells Induced by Advanced Glycosylation End Products

ZHOU Yi-Jun¹, ZHANG Jin¹, and WANG Jia-He²

(1. Department of Endocrinology and Metabolism, 2. Department of Infectious Diseases, First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Advanced Glycosylation End Products; Hepatocyte Growth Factor; Cell Apoptosis; Atherosclerosis; Bcl-2; Caspase-3

[ABSTRACT] Aim To investigate inhibiting effect of hepatocyte growth factor (HGF) on endothelial apoptosis induced by advanced glycosylation end products (AGE) and its possible mechanism. Methods Human umbilical vein endothelial cells (hUVEC) were cultured in vitro and intervened by different concentration of AGE and HGF. The cell inhibiting rates of each group in different time course (12, 24, 48 and 72 h) were measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, the early stage apoptosis was detected by flow cytometry with Annexin V-FITC/PI double staining, morphology of cell apoptosis was observed by acridine orange fluorescence staining, and the expression of apoptosis-associated genes Bax and Bcl-2 were detected by western blotting. The activity of caspase-3 was detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Results Morphological observation indicated that high AGE induced characteristic apoptotic changes in hUVEC. Within a certain concentration range, hUVEC apoptosis inducing rates by AGE were both in concentration- and time-dependent manner. HGF significantly inhibited the apoptosis of hUVEC induced by AGE ($P < 0.05$). High AGE significantly increased Bax protein, but not Bcl-2, whereas HGF significantly promoted the expression of Bcl-2 ($P < 0.01$) and decreased the activity of caspase-3 ($P < 0.05$) without affecting Bax level. Conclusions AGE can induce the apoptosis of endothelial cells in vitro. HGF effectively attenuate high AGE-induced apoptosis through upregulating Bcl-2 gene expression and inhibiting caspase-3 activation.

[收稿日期] 2005-04-30 [修回日期] 2005-11-23

[作者简介] 周一军, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为糖尿病动脉粥样硬化发病机制的研究, E-mail 为 zhoudoctor@163.com。张锦, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化和糖尿病临床和基础研究。王佳贺, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为炎症与动脉粥样硬化。

糖尿病血管病变是糖尿病患者致残或致死的重要原因。血管内皮细胞受损在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 等心血管疾病过程中起着重要作用, 是 As 的始动因素^[1]。内皮细胞凋亡比死亡更易导致 As 的形成, 因为覆盖在血管壁的凋亡细胞影响内皮依赖性舒张功能及内皮细胞再生。研究发现,

高糖环境下形成的糖基化终产物(advanced glycosylation end products, AGE)可诱导内皮细胞凋亡^[2], AGE与糖尿病血管病变有密切的关系。肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是最强的促血管内皮细胞生长因子,它还能促进血管内皮细胞损伤的修复^[3]。实验证实, HGF 还能够抑制高糖所诱导的血管内皮细胞凋亡^[4]。本研究以 AGE 诱导人脐静脉内皮细胞凋亡为模型,探讨 HGF 干预对内皮细胞凋亡的影响及其相关机制,为保护内皮细胞,防治 As 开辟新途径。

1 材料与方 法

1.1 材 料

重组人 HGF(rhHGF)(美国 R&D 公司), 兔抗人 Bax、Bcl-2 单克隆抗体(Santa Cruz 公司); RPMI-1640 细胞培养基、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司), 新生小牛血清(Hyclone 公司); 人血清白蛋白(HSA)、D-葡萄糖、二甲基亚砷(DMSO)(美国 Sigma 公司); 四甲基偶氮唑蓝(MMT)、吖啶橙(Amresco 公司); Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒、细胞凋亡蛋白酶 3 活性检测试剂盒(美国 BD 公司)。

1.2 糖基化终产物的制备

参照文献[5]略作修改。0.5 g 人血清白蛋白(HSA), 3.0 g D-葡萄糖, 1 000 μg 青霉素, 500 μg 庆大霉素溶于 0.5 mol/L PBS(pH7.4) 10 mL 中, 0.22 μm 微孔膜过滤除菌, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温避光孵育 90 天。孵育结束以无菌的 pH7.4 的 PBS 透析, 除去未结合的葡萄糖。以同样条件, 不含 D-葡萄糖的孵育液培养的 HSA 作为对照。制备的 AGE 修饰的人血清白蛋白(AGE-HSA)经荧光分光光度法鉴定, AGE 含量为 78.2 kU/g, HSA 对照样本为 2.36 kU/g。

1.3 血管内皮细胞培养及分组

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, hUVEC)株购自上海中科院细胞研究所。生长于含 10% 灭活小牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度孵箱内培养。2~3 天换液一次, 细胞经传代, 待细胞生长至亚汇合状态时, 改用无血清培养基孵育。实验分组: 对照组为培养基中加入 200 mg/L HSA; AGE 组分别在培养基中加入 AGE-HSA, 终浓度分别为 100、200 及 400 mg/L; 干预组为 400 mg/L AGE-HSA + 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ rhHGF。每个实验重复 3 次。

1.4 四甲基偶氮唑蓝比色法测定细胞活性

取对数生长期细胞制成 $3 \times 10^5/\text{L}$ 的细胞悬液,

接种于 96 孔培养板内, 每孔 100 μL , 4 h 细胞贴壁后, 按上述实验处理分组, 每组设 8 个复孔, 调零孔加 100 μL 培养液, 继续培养 12、24、48 及 72 h, 结束前 4 h 每孔吸去上清液, 加 0.5 g/L MMT 100 μL 培养 4 h, 调零孔不加 MMT, 吸去全部上清液, 然后每孔加 200 μL DMSO, 震荡摇匀, 使结晶充分溶解, 酶联免疫检测仪测每孔吸光度(A)值(检测波长 570 nm)。细胞抑制率 = (1 - 实验组 A 值/对照 A 值) \times 100%。

1.5 吖啶橙荧光染色观察凋亡细胞

将严格清洗、浸酸、消毒的洁净盖玻片放置于 6 孔培养板中, 加入内皮细胞单细胞悬液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h, 内皮细胞爬于盖玻片后, 经不同处理后, 捞出盖玻片, PBS 液漂洗细胞 3 次, 每次 3 min, 吸吖啶橙溶液滴于盖玻片上, 直接反转, 放于洁净载玻片上, 荧光显微镜观察, 摄片。

1.6 流式细胞术检测早期凋亡

分别收集不同时间的各组细胞, 细胞浓度约 $5 \times 10^9/\text{L}$, 1 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 弃上清。加入预冷 PBS 洗 2 次, 轻轻震荡使细胞重悬于 200 μL 1 \times Binding Buffer, 加入 10 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI, 轻轻混匀, 室温避光 15 min。加入 300 μL 1 \times 结合缓冲液, 1 h 内流式细胞仪检测早期凋亡细胞数, 用 CELL Quest 软件对结果进行分析。

1.7 Western blotting 检测

经上述处理后收集细胞, 冷 PBS 洗 2 次, 加入预冷细胞裂解液裂解细胞, 超声破碎, 提取物冰上孵育 30 min, 12 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min, 上清液蛋白浓度经考马斯亮蓝法定量。每组取 20 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离, 转移到硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉的 TBST 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜, 加入一抗(兔抗人 Bax、Bcl-2 单抗, 1:400)室温振荡 3 h, TBST 洗膜 10 min \times 3 次, 辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG 室温孵育 1 h, 常规洗膜, 化学发光试剂显色。QWIN 图像分析系统进行蛋白条带扫描和灰度分析。

1.8 细胞凋亡蛋白酶 3 活性检测

收集细胞, 1 500 r/min 离心 10 min, PBS(pH7.4) 洗 1 次, 3 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。4 $^{\circ}\text{C}$ 50 μL 细胞裂解液重悬细胞, 冰浴 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 10 min, 保留上清。加 50 μL 2 \times 反应缓冲液/DTTMix 及 DEVD-fmk 1 mL, 冰浴 30 min, 加 1 mmol/L DEVD-PNA 5 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h, 加样至 96 孔培养板, 酶联免疫检测仪测 A 值, 检测波长为 405 nm。

1.9 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, SNK 检验两两比较。以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 细胞生长抑制率

AGE-HSA 对 hUVEC 的生长抑制率随作用时间

延长和浓度的升高而增加 ($P < 0.01$)。当 AGE-HSA 浓度为 400 mg/L 时, rhHGF 处理后不同时间的细胞生长抑制率显著降低 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1. 不同时间各组血管内皮细胞生长抑制率的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

分 组	12 h	24 h	48 h	72 h
AGE 组 100 mg/L	3.1% \pm 1.3%	5.2% \pm 1.6%	13.4% \pm 1.4%	20.5% \pm 1.5%
200 mg/L	10.4% \pm 1.6%*	18.9% \pm 1.8%*	45.2% \pm 1.3%*	52.3% \pm 1.4%*
400 mg/L	19.1% \pm 0.6%	45.5% \pm 6.0% ^b	68.6% \pm 5.0% ^b	78.4% \pm 6.1%
bAGE + rhHGF 组	15.3% \pm 0.4%	31.7% \pm 2.2% ^c	56.4% \pm 4.4% ^c	68.1% \pm 5.2% ^c

a 为 $P < 0.01$, 与 100 mg/L AGE 组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 200 mg/L AGE 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 400 mg/L AGE 组比较。

2.2 细胞形态学改变

倒置显微镜下, 正常对照组细胞呈单层铺路石状紧密排列, 细胞为多角形, 细胞增殖快。AGE 组细胞数随 AGE-HSA 浓度的增加及作用时间的延长而减少, 细胞皱缩变圆、脱落漂浮, 悬浮培养液中, 细胞增殖受抑制。加入 rhHGF 处理后皱缩和脱落的

细胞量减少。荧光显微镜下, 正常对照组 hUVEC 未发生凋亡时, 细胞核呈均匀黄绿色荧光, 颜色稍淡; AGE 组早期凋亡细胞胞质固缩, 核致密浓染, 呈亮绿色; 晚期凋亡细胞胞核碎裂呈颗粒状, 固缩核染色质边集; 加入 rhHGF 干预后核浓染、固缩及核碎裂的细胞较 AGE 组明显减少(图 1)。

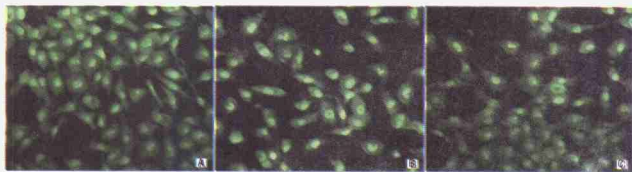


图 1. 人脐静脉内皮细胞吖啶橙荧光染色的形态学改变 ($\times 400$) A 为对照组, B 为 400 mg/L AGE-HSA 组, C 为 400 mg/L AGE-HSA + 100 μ g/L rhHGF 组。

2.3 细胞凋亡情况

当浓度小于 400 mg/L 时, AGE-HSA 作用后 hUVEC 早期凋亡率随 AGE-HSA 浓度增加而升高, 而且随时间延长呈增加趋势 ($P < 0.01$)。当 AGE-HSA 浓度为 400 mg/L, 作用 12~48 h 时, hUVEC 早期凋亡率呈增加趋势, 但作用时间大于 48 h 时, 随时间延

长, 细胞死亡以晚期凋亡、坏死为主, 早期凋亡率反而下降(表 2)。加入 100 μ g/L rhHGF 处理后使 400 mg/L AGE-HSA 诱导的不同时间的早期凋亡细胞和晚期凋亡、坏死细胞明显降低 ($P < 0.05$), 见表 2 和图 2。

表 2. 不同时间各组血管内皮细胞早期凋亡率的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

分 组	12 h	24 h	48 h	72 h
对照组	1.1% \pm 1.5%	2.2% \pm 1.4%	4.4% \pm 1.6%	6.9% \pm 1.5%
AGE 组 100 mg/L	3.9% \pm 1.3%	6.6% \pm 1.6%	10.9% \pm 1.4%	16.3% \pm 1.6%
200 mg/L	9.6% \pm 1.6%	14.6% \pm 1.8%	25.6% \pm 1.3%	32.6% \pm 1.4%
400 mg/L	20.8% \pm 0.6%	35.6% \pm 2.0%	51.4% \pm 1.3%	44.5% \pm 2.1%
AGE + rhHGF 组	12.3% \pm 0.4%*	23.6% \pm 2.2%*	36.3% \pm 1.4%*	27.5% \pm 2.4%*

a 为 $P < 0.05$, 与 400 mg/L AGE 组比较。

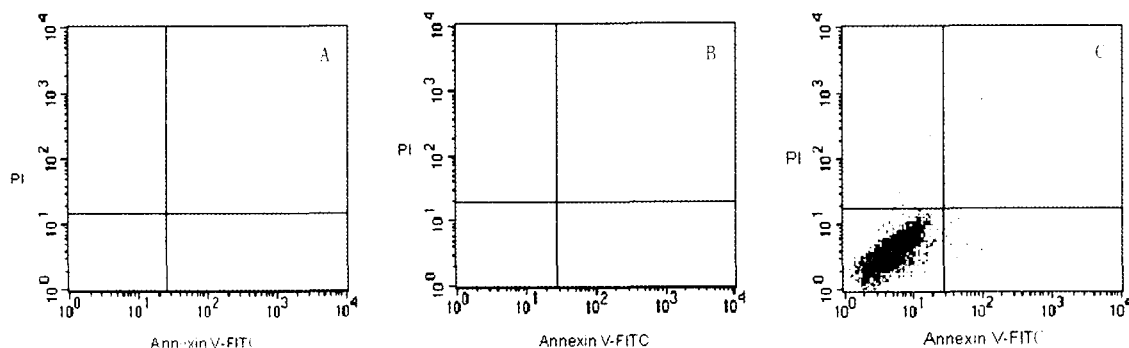


图 2. Annexin V-FITC/PI 双染检测人脐静脉内皮细胞的早期凋亡 A 为对照组, B 为 400 mg/L AGE-HSA 组, C 为 400 mg/L AGE-HSA + 100 μ g/L rhHGF 组。

2.4 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达

经 AGE-HSA(100、200 及 400 mg/L)作用 48 h,随着 AGE-HSA 浓度的增加,hUVEC 凋亡过程中 Bax 蛋白表达与对照组比较呈上调趋势($P < 0.01$),而 Bcl-2 蛋白表达无显著性差异($P > 0.05$);加入 rhHGF 后 Bcl-2 蛋白表达上调($P < 0.01$),Bax 蛋白表达降低,但无统计学意义($P > 0.05$)。见图 3。



图 3. 各组内皮细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达 ($n = 4$) 1 为对照组, 2 为 100 mg/L AGE-HSA 组, 3 为 200 mg/L AGE-HSA 组, 4 为 400 mg/L AGE-HSA 组, 5 为 400 mg/L AGE-HSA + 100 μ g/L rhHGF 组。

2.5 细胞凋亡蛋白酶 3 的活性

400 mg/L AGE-HSA 作用 48 h, 细胞凋亡蛋白酶 3 活性为 0.214 ± 0.034 , 对照组为 0.075 ± 0.026 , 细胞凋亡蛋白酶 3 活性明显增高($P < 0.01$);随着时间的延长,活性增加;加入 rhHGF 干预 48 h, 细胞凋亡蛋白酶 3 活性为 0.116 ± 0.031 , 活性明显降低($P < 0.05$)。

3 讨论

血管内皮细胞的过度凋亡在 As 形成过程中可能发挥触发、维持与加速作用^[6]。内皮细胞凋亡不但使血管内皮防止血脂沉积的屏障作用、局部抗凝和纤溶机制减弱,而且凋亡的内皮细胞具有致凝作用,这些因素造成血管壁局部血栓形成,加速 As 发

展。AGE 是蛋白质的氨基组与糖的醛基组发生的非酶性糖化、氧化反应的终末期产物。正常机体内存在少量 AGE 修饰蛋白,可通过与单核/巨噬细胞等细胞表面的 RAGE 相互作用而被清除、降解。糖尿病、慢性肾功能衰竭患者体内 AGE 水平明显高于正常人群,体内滞留的 AGE 在糖尿病慢性并发症大血管病变、慢性肾功能衰竭血液透析的远期并发症如 As 的发生、发展中具有重要作用^[7]。有研究表明 AGE 通过 AGE 受体(RAGE)介导诱导血管内皮细胞的凋亡^[2]。内皮细胞受到 AGE 刺激后,激活核转录因子(NF- κ B),单核巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子 α 增加,诱导内皮细胞凋亡;另外也可通过特异性核转录因子调节凋亡基因^[8]。

本研究以 AGE-HSA 作用于体外人脐静脉内皮细胞,结果发现 AGE 对血管内皮细胞生长有明显的抑制作用,其抑制率具有明显 AGE 浓度依赖性和作用时间依赖性。通过吖啶橙染色,荧光显微镜观察到典型的凋亡细胞的形态特征,说明 AGE 抑制人血管内皮细胞生长的作用主要通过诱导细胞凋亡实现的。应用流式细胞术检测发现,AGE 诱导血管内皮细胞的凋亡率在一定浓度范围内随浓度升高和作用时间延长而升高,具有浓度与时间依赖性。当浓度为 400 mg/L,作用时间超过 48 h 时,细胞死亡以坏死为主,凋亡率反而下降,提示 AGE 能够引起内皮细胞活性明显降低和通过凋亡途径诱导内皮细胞凋亡。因此,保护内皮细胞、防止 AGE 诱导其过度凋亡具有积极的抗 As 作用。

HGF 最初被认为是肝细胞中最强的促有丝分裂物质,促进肝细胞的增殖。现在认为它也是特异性内皮生长因子之一。HGF 是最强促内皮细胞刺激因子^[9,10]。此外,HGF 还能促进内皮细胞的运动和内皮细胞损伤的修复^[3]。在内皮细胞和血管平滑

肌细胞中的局部 HGF 系统(HGF 和其受体 c-met)已在机体内得到证实。Morishita 等研究发现 HGF 能够抑制高糖环境下内皮细胞的程序性死亡(凋亡),促进血管内皮细胞再修复,起到抗 As 的作用^[4]。在实验中发现高浓度 AGE 条件下,血管内皮细胞数目明显减少,加入 rhHGF 后,AGE 对内皮细胞凋亡作用明显减弱。目前尚不完全清楚 HGF 抑制内皮细胞凋亡、促进内皮细胞生长的机制,可能是通过激活 Bag-1、Bcl-xL、Bcl-2 来实现的^[11,12]。研究发现 Bag-1 基因与 HGF 受体 c-met 和抑制凋亡基因 Bcl-2 均有结合能力,当 Bag-1 和 Bcl-2 结合可促进 Bcl-2 的抑制细胞凋亡作用,并推测 HGF 的特异信号可通过 Bag-1 促进 Bcl-2 的抑制细胞凋亡功能^[13]。本研究结果发现,AGE 不改变 Bcl-2 蛋白的表达但上调促凋亡基因 Bax 蛋白的表达,并增强细胞凋亡蛋白酶 3 的活性。Bax 高表达可通过线粒体通路从胞浆向线粒体转运,促进线粒体内膜跨膜电位下降,细胞凋亡启动因子细胞色素 c 从线粒体内释放,后者激活细胞凋亡蛋白酶 9、增强细胞凋亡蛋白酶 3 的水解活性,进而诱导内皮细胞凋亡^[14];而 rhHGF 可明显增强 Bcl-2 表达,抑制细胞凋亡蛋白酶 3 的活性。HGF 可能通过 Bcl-2 表达增强阻抑 Bax 从胞浆向线粒体转运,抑制细胞凋亡蛋白酶 3 的激活,从而抑制内皮细胞的凋亡^[15]。有关 HGF 抗凋亡的确切机制,有待于进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease[J]. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-126
- [2] 郑超, 文格波, 曹仁贤, 刘江华, 黄雄友. 糖基化终末产物对人脐静脉内皮细胞凋亡及其受体表达的影响[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2003, **19** (2): 115-118
- [3] Morishita R, Nakamura S, Hayashi S, Aoki M, Matsushita H, Tomita N, et al. Contribution of a vascular modulator, hepatocyte growth factor (HGF), to the pathogenesis of cardiovascular disease[J]. *Atheroscler Thromb*, 1998, **4** (3): 128-134
- [4] Morishita R, Nakamura S, Nakamura Y, Aoki M, Moriguchi A, Kida I, et al. Potential role of endothelium-specific growth factor, hepatocyte growth factor, on endothelial damage in diabetes mellitus[J]. *Diabetes*, 1997, **46** (8): 138
- [5] Gopalkrishnapillai B, Nadanathangam V, Kamakar N, Anand S, Magesh A. Evaluation of autofluorescent property of hemoglobin-advanced glycation end product as a long-term glycemic index of diabetes[J]. *Diabetes*, 2003, **52** (4): 1 041-046
- [6] 黄颖, 陈运贞. 过氧化体增殖物激活型受体抑制氧化型脂蛋白致血管内皮细胞凋亡[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (4): 419-422
- [7] Miyata T, Wada Y, Cai Z, Iida Y, Horie K, Yasuda Y, et al. Implication of an increased oxidative stress in the formation of advanced glycosylation end products in patients with end-stage renal failure[J]. *Kidney Int*, 1997, **51** (4): 1 170-181
- [8] Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycosylation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 1999, **84** (5): 489-497
- [9] Nakamura Y, Morishita R, Nakamura S, Aoki M, Moriguchi A, Matsumoto K, et al. A vascular modulator, hepatocyte growth factor, is associated with systolic blood pressure[J]. *Hypertension*, 1996, **28** (3): 409-413
- [10] Nakamura Y, Morishita R, Higaki J, Kida I, Aoki M, Moriguchi A, et al. Hepatocyte growth factor (HGF) is a novel member of endothelium-specific growth factors: additive stimulatory effect of HGF with basic fibroblast growth factor, but not vascular endothelial growth factor[J]. *J Hypertens*, 1996, **14** (8): 1 067-072
- [11] Yamamoto K, Morishita R, Hayashi SI, Matsushita H, Nakagami H, Moriguchi A, et al. Contribution of Bcl-2, but not Bcl-xL and Bax, to antiapoptotic actions of hepatocyte growth factor in hypoxia-conditioned human endothelial cells[J]. *Hypertens*, 2001, **37** (7): 1 341-348
- [12] Wang X, Zhou YS, Kim HP, Sprig RP, Zamegar R, Ryter SW, et al. Hepatocyte growth factor protects against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in endothelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2004, **279** (7): 5 237-243
- [13] Antoku K, Maser RS, Scully WJ Jr, Delach SM, Johnson DE. Isolation of Bcl-2 binding proteins that exhibit homology with BAG-1 and suppressor of death domains protein[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **286** (5): 1 003-010
- [14] Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K, Yoshimura SI, Taniyama Y, Aoki M, et al. Phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase downstream of bax-caspase-3 pathway leads to cell death induced by high D-glucose in human endothelial cells[J]. *Diabetes*, 2001, **50** (4): 1 472-481
- [15] Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K, Taniyama Y, Aoki M, Yasusaki K, et al. Hepatocyte growth factor prevents endothelial cell death through inhibition of bax translocation from cytosol to mitochondrial membrane[J]. *Diabetes*, 2002, **51** (8): 2 064-611

(此文编辑 文玉珊)