

· 基础研究 ·

探讨重组人促红细胞生成素和粒细胞集落刺激因子联合应用对缺氧心肌细胞保护的分子机制

付振虹, 董蔚, 盖鲁粤, 薛浩, 陈韵岱

[摘要]:目的 通过研究促红细胞生成素(EPO)联合应用粒细胞集落刺激因子(G-CSF)对缺氧心肌细胞的影响,探讨其对缺氧心肌细胞发挥保护作用可能的分子机制。**方法** 采用 95% N₂ + 5% CO₂ 气体充分置换的 1% 胎牛血清 DMEM 培养液培养 24 h, 建立缺氧心肌细胞模型。将心肌细胞分为 5 组, 对照组、缺氧组、缺氧 + EPO 组、缺氧 + G-CSF 组和缺氧 + EPO + G-CSF 联合给药组。建立缺氧模型 24 h 后收集 5 组心肌细胞标本。采用 Northern-blot 方法检测各组心肌细胞中的 Bcl-2、Bax、Caspase-3 mRNA 的表达, 采用 Western-blot 方法检测各组心肌细胞中的 Bcl-2、Bax、细胞色素 c(Cyt C)、磷酸化信号转导与转录活化因子 3(p-STAT-3)、Caspase-3 蛋白的表达。**结果** 成功建立了心肌细胞缺氧模型。与缺氧组相比: EPO、G-CSF 和联合给药组明显提高缺氧心肌细胞的存活率, 减少凋亡率和总死亡率 ($P < 0.01$)。与缺氧组相比: EPO 组和 G-CSF 组 Bcl-2 表达增加 ($P < 0.01$), Bax、Caspase-3 表达减少 ($P < 0.01$), 联合治疗组作用最明显, 强于单独药物治疗组 ($P < 0.01$), EPO 和 G-CSF 组之间无明显差异 ($P > 0.05$); Cyt C 表达在 EPO 组、G-CSF 组和联合给药组明显降低 ($P < 0.01$); 三组之间无明显差异 ($P > 0.05$); p-STAT-3 蛋白表达在联合给药组明显增高 ($P < 0.01$)。**结论** EPO 联合 G-CSF 治疗, 可能通过激活线粒体途径和 Janus 激酶/信号转导和转录激活子(JAK/STAT)途径联合发挥更强的抗凋亡作用。

[关键词]: 缺氧; 心肌细胞; 促红细胞生成素; 粒细胞集落刺激因子; 细胞凋亡; JAK/STAT

[中图分类号]: R654.1 **[文献标识码]:** A **[文章编号]:** 1672-1403(2012)04-0227-05

Mechanism of erythropoietin in combination with granulocyte - colony stimulating factor on hypoxia cardiomyocytes

Fu Zhen-hong, Dong Wei, Gai Lu-yue, Xue Hao, Chen Yun-dai.

Department of Cardiology, PLA General hospital, Beijing, 100853, China

Corresponding author: Dong Wei, Email: 301dongw@sina.com

[Abstract]: Objective To evaluate the mechanism of erythropoietin (EPO) in combination with granulocyte - colony stimulating factor (G-CSF) on hypoxia cardiomyocytes protection. **Methods** The air in the cultural medium was changed by 95% N₂ and 5% CO₂ for hypoxia cardiomyocytes. Cardiomyocytes were divided into five groups: normal cardiomyocytes, hypoxia cardiomyocytes, hypoxia cardiomyocytes treated with EPO, hypoxia cardiomyocytes treated with G-CSF, and hypoxia cardiomyocytes treated with EPO in combination with G-CSF. Twenty four hours after hypoxia, cardiomyocytes were collected. Bcl-2, Bax, Caspase-3 mRNA level were determined by Northern-blot analysis and Bcl-2, Bax, cytochrome C, P-STAT-3, Caspase-3 protein level were determined by Western-blot analysis in each group. **Results** Model of hypoxia cardiomyocytes was established successfully. Compared with that in the hypoxia group, the survival rate of hypoxia cardiomyocytes was higher and the apoptotic rate and total necrotic rate were lower significantly in EPO, G-CSF and combination groups ($P < 0.01$), meanwhile, the expression of Bcl-2 was upregulated, Bax and Caspase-3 were downregulated significantly in group EPO, G-CSF and combination ($P < 0.01$), and these changes were more remarkable in the combination group than that in the EPO or G-CSF group. Cytochrome C was much downregulate in EPO, G-CSF and combination group ($P < 0.05$), P-STAT-3 expression was upregulated in combination group ($P < 0.05$). **Conclusion** For hypoxia cardiomyocyte, combination treatment of EPO and G-CSF shows better protective effects by activating both chondriosome and JAK-STAT signaling pathways.

[Key words]: Hypoxia; Cardiomyocyte; Erythropoietin; Granulocyte - colony stimulating factor; Cell apoptosis; JAK/STAT

基金项目: 国家科技支撑计划(2009BAI86B04)

作者单位: 100853 北京, 中国人民解放军总医院心内科

通讯作者: 董蔚, Email: 301dongw@sina.com

心肌梗死后,心肌细胞持续发生凋亡,心脏收缩和舒张功能持续下降。目前已有细胞因子治疗心肌梗死的报道,其中重组人促红细胞生成素(Erythropoietin, EPO)和重组人粒细胞集落刺激因子(granulocyte - colony stimulating factor, G - CSF)分别应用于急性心肌梗死的治疗^[1-5],取得了一定的实验结果。但是,两种细胞因子联合应用的治疗效果以及发生保护作用的具体机制还有待进一步研究。体外培养的心肌细胞缺氧模型,是细胞水平上研究心肌梗死的重要方法。本实验在乳鼠心肌细胞缺氧模型的基础上,在细胞水平上探讨了两种药物联合发挥心肌细胞保护作用的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 实验采用新生健康 Wistar 乳鼠(0~1 d)40 只,由解放军总医院动物实验中心提供。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基、特级胎牛血清(Gibco 公司)、胰蛋白酶(粉剂, Amresco 公司)、EPO(商品名利血宝,3 000 IU/支),G - CSF(商品名惠尔血,150 ug/支)。兔抗 Bcl - 2、Bax、半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 - 3(caspase - 3)、细胞色素 C(Cytochrome C, Cyt C)多克隆抗体、兔抗 β - Actin 多克隆抗体、磷酸化信号转导与转录活化因子 3(P - STAT - 3)小鼠单克隆抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司)。羊抗兔 IgG/HRP,羊抗小鼠 IgG/HRP,ECL 显色系统(中山公司),Micro BCA Protein 试剂盒(Sigma 公司)。5 - 溴 4 - 氯 - 3 - 吡啶 - β - D - 半乳糖苷(X - gal)(Promega 公司),5,6 - 碳氧荧光素醋酸酯(CFDA 粉剂)、Trizol(Sigma 公司),GeneClean 纯化试剂盒(Bio 101 公司),探针的同位素标记试剂盒(Roche 公司), α - 32P - dCTP(北京市亚辉生物医学工程公司)。其他试剂均为进口公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 乳鼠心肌细胞缺氧模型的构建及不同药物的治疗干预 当日生乳鼠 40 只,取心尖前 1/2 心室肌,采用胰酶消化、重悬细胞,经 100 μ m 孔径的筛网过滤后的细胞悬液以 $1 \times 10^4/cm^2$ 密度接种于 25 cm^2 培养瓶中,37 $^{\circ}C$ 5% CO_2 培养箱中培养。隔日换含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,原代心肌细胞生长 2~3 d,密度达到 80% 以上后可传代。

选择生长状态良好的第二代心肌细胞($>1 \times 10^6/$ 瓶)进行分组干预。将细胞随机分为 5 组。正

常对照组、缺氧组、缺氧加 EPO 5 U/ml 组、缺氧加 G - CSF 30 μ g/L 组、缺氧加 EPO 5 U/ml 加 G - CSF 30 μ g/L 组,每组 6 瓶细胞,采用 95% N_2 + 5% CO_2 气体充分置换的 1% 胎牛血清 DMEM 培养液培养,培养瓶内的空气也用 95% N_2 + 5% CO_2 气体充分置换。缺氧干预后分别加入上述浓度的药物,密封后封口膜密闭,37 $^{\circ}C$ 5% CO_2 培养箱中培养 24 h。24 h 后收集细胞。细胞收集后行 Northern blot 检测和 Western blot 检测。实验重复 3 次。

3 瓶细胞,通过磷脂酰结合蛋白 V (Annexin V) 联合碘化丙啶(PI)双染法,采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。另外 3 瓶细胞收集后行 Northern blot 检测和 Western blot 检测。实验重复 3 次。

1.2.2 Northern blot 检测心肌细胞 Bcl - 2, Bax, Caspase - 3 mRNA 的表达 根据产品说明,采用 Trizol 提取心肌细胞总 RNA 并进行定性与定量鉴定。设计引物(北京赛百盛公司合成):Caspase - 3:5' - ACGGTACGCCAAGAAAAGTGAC - 3'; 5' - TCCTGACTTCGTATTTTCAGGGC - 3'; Bcl - 2:5' - ATGCCAAGGGGAAACACCAGAAT - 3'; 5' - CGGGCGTTCGGTGCTCTCA - 3'; Bax:5' - ATGGACGGGTC - CGGGGAGCA - 3'; 5' - TCAGCCCATCTTCTCCAGA - 3'; GAPDH:5' - AACGACCCCTTCATTGAC - 3'; 5' - TCCACGACATACTCAGCAC - 3'。采用 RT - PCR 方法,扩增产物,测序验证后,标记探针。总 RNA 行甲醛变性琼脂糖凝胶电泳,转膜 24 h 后,以 $5 \times$ SSC 液洗膜后进行紫外交联 6 min。预杂交 2 h 后,42 $^{\circ}C$ 杂交 16 h。洗膜后, - 70 $^{\circ}C$ 放射性自显影 72 h,冲洗胶片,并进行图象扫描分析。内参选用 GAPDH 校准上样量。实验重复 3 次以上,结果进行统计学分析。

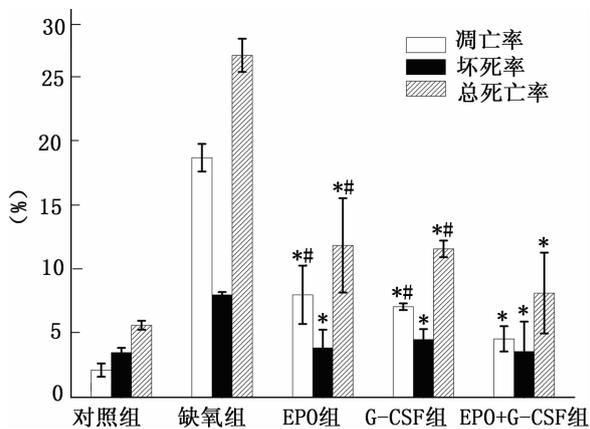
1.2.3 Western blot 检测心肌细胞 Bcl - 2, Bax, Cyt C, STAT - 3, Caspase - 3 蛋白的表达 采用 RIPA 裂解液,充分裂解细胞,收集细胞总蛋白。采用 BCA 蛋白试剂盒(Pierce)测定蛋白浓度。SDS 聚丙烯酰胺电泳,将蛋白从聚丙烯酰胺凝胶转移至硝酸纤维素膜上。用 10% 脱脂牛奶封闭过夜后,加入一抗(1:200)摇床轻摇 4 $^{\circ}C$ 过夜。加入 PBS 稀释的 HRP 标记的二抗(1:2000),室温 1 h。ECL 显色,X 光片曝光,经显影定影后观察结果。结果以 β - Actin 为内参照,用 ALPHAIMAGER 2200 凝胶图象分析系统,进行半定量分析。

1.2.4 数据处理和统计学分析 所有数据均建立数据库,应用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。实验数据计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本

均数比较采用 t 检验, 组内比较采用配对 t 检验, 不同组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 有显著性差异。

2 结果

2.1 流式细胞仪检测结果 存活率: 各组细胞之间差异显著 ($P < 0.01$), 正常心肌细胞存活率最高, 缺氧心肌细胞存活率最低。EPO 组、G-CSF 组低于联合给药组, EPO 组和 G-CSF 组未见显著差异 ($P > 0.05$)。凋亡率: 各组细胞之间差异显著 ($P < 0.01$), 正常心肌细胞凋亡率最低, 缺氧心肌细胞凋亡率最高, 干预组中, 联合治疗组凋亡率最低, 明显低于单独给药组 ($P < 0.01$), EPO 组和 G-CSF 组未见显著差异 ($P > 0.05$)。坏死率: 各组细胞与缺氧心肌细胞相比差异显著 ($P < 0.01$), 其余各组之间接近, 未见显著差异。总死亡率: 各组细胞之间差异显著 ($P < 0.01$), 正常心肌细胞总死亡率最低, 缺氧心肌细胞总死亡率最高。EPO 组、G-CSF 组高于联合给药组, EPO 组和 G-CSF 组未见显著差异 ($P > 0.05$)。5 组细胞中, 凋亡细胞占总死亡细胞的比例分别为 37.83%、70.05%、67.42%、61.03%、56.07%, 各组与缺氧组比较差异显著 ($P < 0.001$), 其中, EPO 组、G-CSF 组高于联合给药组, EPO 组和 G-CSF 组未见显著差异 ($P > 0.05$)。见图 1。



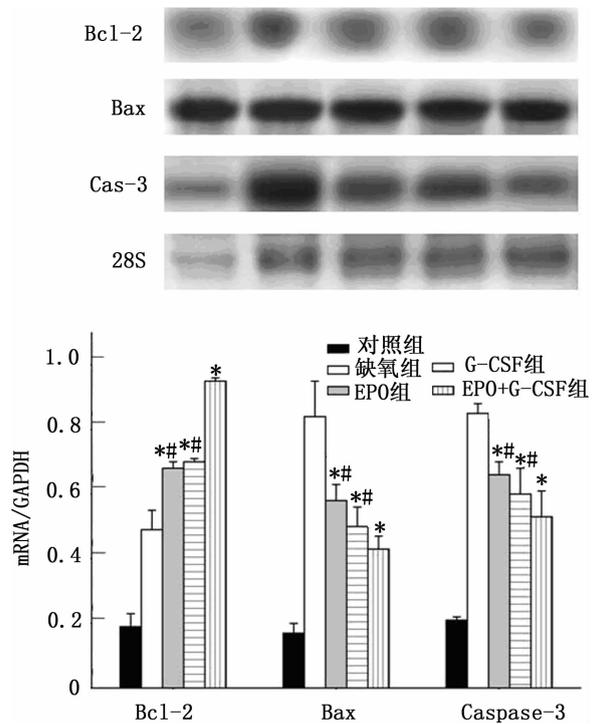
注: 与缺氧组比较 * $P < 0.01$,

与 EPO + G-CSF 组比较 # $P < 0.01$ 。

图 1 缺氧后 24 h 后流式细胞仪检测结果

2.2 联合给药对乳鼠缺氧心肌细胞 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 mRNA 表达影响 Bcl-2 mRNA: 对照组表达明显低于其余 4 组表达 ($P < 0.01$)。缺氧组表达增加, 但是低于 3 组药物干预组 ($P < 0.01$)。EPO 组和 G-CSF 组表达明显增加, 2 组间无显著

差异 ($P > 0.05$)。联合治疗组表达增加最多, 明显高于单独药物干预组 ($P < 0.01$)。Bax mRNA: 对照组中仅有少量的表达, 明显低于其余 4 组 ($P < 0.01$)。缺氧组表达最高, 明显高于 3 组药物干预组 ($P < 0.01$), EPO 组和 G-CSF 组表达接近 ($P > 0.05$), 高于联合治疗组 ($P < 0.01$)。Caspase-3 mRNA: 对照组中几乎没有的表达, 明显低于其余 4 组表达量 ($P < 0.01$)。缺氧组表达最高 ($P < 0.01$), EPO 组和 G-CSF 组表达接近 ($P > 0.05$), 高于联合治疗组 ($P < 0.01$)。见图 2。



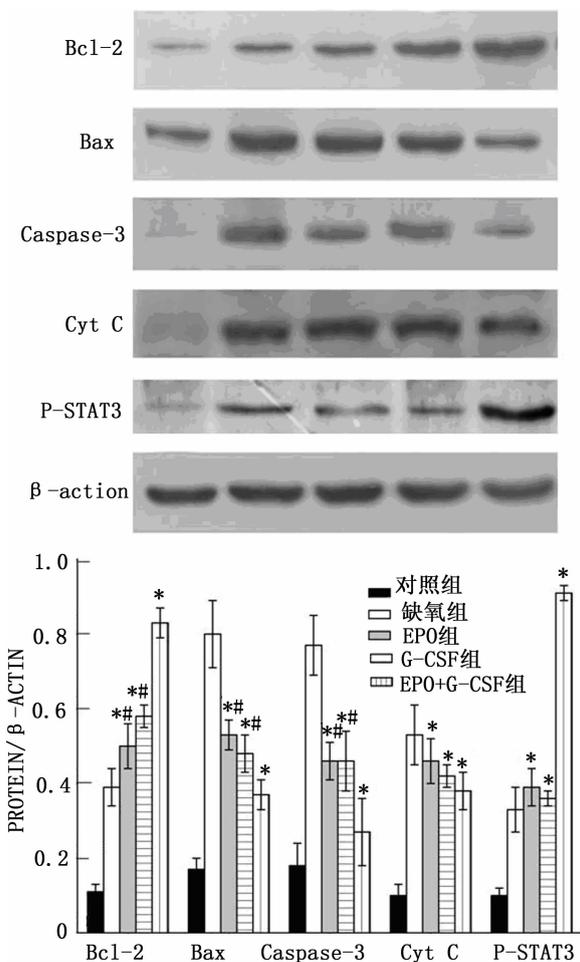
注: 与缺氧组比较 * $P < 0.01$,

与 EPO + G-CSF 组比较 # $P < 0.01$ 。

图 2 EPO 联合 G-CSF 对缺氧心肌细胞 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 mRNA 表达的影响

2.3 联合给药对缺氧心肌细胞 Bcl-2、Bax、Cyt C、P-STAT-3 和 Caspase-3 蛋白表达的影响 Bcl-2: Bcl-2 的表达各组表达排列为: 对照组 < 缺氧组 < EPO 组和 G-CSF 组 < 联合治疗组, EPO 组和 G-CSF 组两组间无显著差异 ($P > 0.05$), 其余各组间均有显著差异 ($P < 0.01$)。Bax: 对照组中仅有少量的表达, 明显低于其余 4 组 ($P < 0.01$)。缺氧组表达最高, 明显高于 3 组药物干预组 ($P < 0.01$), EPO 组和 G-CSF 组 Bax 表达接近 ($P > 0.05$), 高于联合治疗组 ($P < 0.01$)。Cyt C: 对照组中几乎没有表达, 明显低于其余 4 组 ($P < 0.01$)。缺氧组表

达明显高于 EPO 组、G - CSF 组和联合治疗组 ($P < 0.01$)。3 个药物治疗组之间未见明显差异 ($P > 0.05$)。P - STAT - 3: 对照组中几乎没有蛋白的表达, 明显低于其余 4 组 ($P < 0.01$)。缺氧组、EPO 组和 G - CSF 组表达接近 ($P > 0.05$)。联合治疗组表达增高 ($P < 0.01$)。Caspase - 3: 对照组表达很少, 与联合治疗组比较未见明显差异 ($P > 0.05$)。缺氧组蛋白表达最高 ($P < 0.01$), EPO 组和 G - CSF 组表达接近 ($P > 0.05$), 但是明显高于联合治疗组 ($P < 0.01$)。见图 3。



注: 与缺氧组比较 * $P < 0.01$,

与 EPO + G - CSF 组比较 # $P < 0.01$ 。

图 3 EPO 联合 G - CSF 对心肌细胞 Bcl - 2、Bax、Caspase - 3、Cyt C 和 P - STAT3 蛋白表达的影响

3 讨论

急性心肌梗死后, 心肌细胞凋亡细胞数目多, 累及范围广, 造成有功能的心肌细胞数量持续减少, 引起心脏收缩和舒张功能的减退和心室重塑, 是心肌梗死后疾病进展的主要机制之一。研究显示, EPO

和 G - CSF 可以减少心肌梗死后心肌细胞的凋亡, 改善心功能, 延缓疾病进展^[6-8]。

EPO 对体外培养的心肌细胞具有促进细胞生存、抑制细胞凋亡等保护作用^[9]。EPO 能抑制心肌细胞凋亡关键效应酶 caspase - 3 的活化, 明显降低心肌细胞凋亡率, 对心肌细胞具有以抗凋亡为主的保护效应, EPO 可以促进骨髓间充质干细胞向梗死部位迁移, 促进血管生成和减少梗死面积^[10]。动物实验显示, G - CSF 可以通过促进干细胞向梗死心肌归巢, 抑制心肌细胞凋亡, 促进血管新生, 从而改善心功能和防止左室重塑达到治疗急性心肌梗死的作用^[4, 11]。

关于细胞因子联合治疗急性心肌梗死的实验研究目前报道较少, 现有的报道多为 EPO 或 G - CSF 与干细胞联合作用对心肌梗死的研究^[10, 12]。本课题组的前期研究显示 EPO 联合 G - CSF 治疗^[13], 可以改善缺血心肌细胞的存活, 进一步的研究显示, 联合治疗可以改善大鼠心肌梗死模型的左室功能^[14]。本研究在前期研究的基础上, 进一步探讨了联合治疗发挥心肌细胞保护作用的分子机制。

心肌细胞凋亡主要通过死亡受体途径、线粒体途径和有丝分裂原激活蛋白激酶 (MAPKs) 途径实现。前 2 种致凋亡信号通过 2 条主要途径激活 Caspases 而引起心肌细胞凋亡。Caspase - 3 是凋亡过程中的关键酶, 具有促进细胞凋亡的作用。以往研究显示, EPO 和 G - CSF 可以减少心肌细胞凋亡, 因此, 我们选取了以 Caspase - 3 为核心的两条通路上的蛋白包括: JAK - STAT - Bcl - 2/Bax - Caspase - 3 和 Bcl - 2/Bax - CytC - Caspase - 3 进行了研究。

JAK - STAT 途径在发挥心肌保护作用的机制中占有重要的地位。凋亡发生后, 外界给予的保护性蛋白与细胞膜上的配体结合, 可以促进 JAK 的磷酸化, 磷酸化的 JAK 触发 STAT 蛋白的激活形成二聚体, 易位到细胞核内, 结合到特异的 DNA 反应单元上, 发挥抗凋亡作用。本研究中, 我们探讨了 EPO 和 G - CSF 联合作用对 JAK - STAT 通路及其下游相关蛋白的表达水平的影响, 结果显示, EPO 和 G - CSF 单独治疗, 增加了抗凋亡基因 Bcl - 2 的表达, 减少了促凋亡基因 Bax 和凋亡关键酶 Caspase - 3 的表达, 联合治疗对上述基因的表达的改变程度高于单独治疗组。EPO 和 G - CSF 单独治疗对 P - STAT - 3 表达影响较小, 联合治疗能够增加 P - STAT - 3 的表达, 进一步证实了联合治疗放大了 JAK - STAT 途径上相应蛋白的表达, 发挥更显著的

心肌保护作用。

线粒体途径属于“内源性凋亡通路”，在钙超载、缺氧、缺血和活性氧等因子存在下，线粒体释放 Cyt C，当释放入细胞质后，与凋亡蛋白酶激活因子 (Apaf-1) 连接，并与 procaspase-9 聚集，导致 procaspase-9 的分解和活化。活化的 Caspase-9 可激活 Caspase-3 而导致细胞凋亡^[15]。本研究结果显示，EPO、G-CSF 单独治疗和联合治疗可以使 Cyt C 蛋白表达减少，其上游的 Bcl-2 表达增加，Bax 表达减少，下游的 Caspase-3 表达减少。提示单独治疗和联合治疗可以通过线粒体途径发挥抗心肌细胞凋亡的作用，联合治疗的保护作用更明显。

本研究通过对两条通路上的关键因子的 mRNA 和蛋白表达水平的观察，在转录和翻译水平首次证实了在缺氧心肌细胞中，EPO 联合 G-CSF 治疗，明显增强了 P-STAT-3、Bcl-2 的表达，减少了 Bax、Cyt C 的表达，更有效的激活 JAK-STAT 通路，抑制线粒体通路，通过对两条通路的共同作用，抑制了下游 Caspase-3 前体活化为 Caspase-3，减少了凋亡关键酶的生成，抑制了心肌细胞的凋亡。本研究显示，二者联合作用，发挥了更大的抗心肌细胞凋亡作用，明显优于任何一种的保护作用，有利于心肌梗死后，保留存活心肌细胞，减少梗死面积，减轻左室重塑，改善心功能。

参考文献：

- [1] Zhang D, Zhang F, Zhang Y, *et al.* Erythropoietin enhances the angiogenic potency of autologous bone marrow stromal cells in a rat model of myocardial infarction [J]. *Cardiology*, 2007, 108(4): 228-236.
- [2] Kawachi K, Iso Y, Sato T, *et al.* Effects of erythropoietin on angiogenesis after myocardial infarction in porcine [J]. *Heart Vessels*, 2012, 27(1):79-88.
- [3] Camici GG, Stallmach T, Hermann M, *et al.* Constitutively overexpressed erythropoietin reduces infarct size in a mouse model of permanent coronary artery ligation [J]. *Methods Enzymol*, 2007, 435: 147-155.
- [4] Angeli FS, Smith C, Amabile N, *et al.* Granulocyte colony stimulating factor in myocardial infarction with low ejection fraction [J]. *Cytokine*, 2010, 51(3): 278-285.
- [5] Kanlop N, Thommasorn S, Palee S, *et al.* Granulocyte colony

-stimulating factor stabilizes cardiac electrophysiology and decreases infarct size during cardiac ischaemic/reperfusion in swine [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2011, 202(1):11-20.

- [6] Furlani D, Klopsch C, Gabel R, *et al.* Intracardiac erythropoietin injection reveals antiinflammatory potential and improved cardiac functions detected by Forced Swim Test [J]. *Transplant Proc*, 2008, 40(4):962-966.
- [7] Sato T, Suzuki H, Kusuyama T, *et al.* G-CSF after myocardial infarction accelerates angiogenesis and reduces fibrosis in swine [J]. *Int J Cardiol*, 2008, 127(2): 166-173.
- [8] Baldo MP, Davel AP, Damas-Souza DM, *et al.* The anti-apoptotic effect of granulocyte colony-stimulating factor reduces infarct size and prevents heart failure development in rats [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2011, 28(1):33-40.
- [9] Angeli FS, Amabile N, Burjonrappa S, *et al.* Prolonged therapy with erythropoietin is safe and prevents deterioration of left ventricular systolic function in a porcine model of myocardial infarction [J]. *J Card Fail*, 2010, 16(7):579-589.
- [10] Brunner S, Huber BC, Weinberger T, *et al.* Migration of bone marrow-derived cells and improved perfusion after treatment with erythropoietin in a murine model of myocardial infarction [J]. *J Cell Mol Med*, 2012,16(1):152-159.
- [11] Cho SW, Gwak SJ, Kim IK, *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor treatment enhances the efficacy of cellular cardiomyoplasty with transplantation of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in infarcted myocardium [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340(2): 573-582.
- [12] Zimmet H, Porapakkham P, Porapakkham P, *et al.* Short- and long-term outcomes of intracoronary and endogenously mobilized bone marrow stem cells in the treatment of ST-segment elevation myocardial infarction: a meta-analysis of randomized control trials [J]. *Eur J Heart Fail*, 2012, 14(1): 91-105.
- [13] 付振虹,董蔚,盖鲁粤. 促红细胞生成素联合粒细胞集落刺激因子对小鼠缺氧心肌细胞的保护作用 [J]. *第三军医大学学报*,2009,31(6),541-544.
- [14] 付振虹,董蔚,盖鲁粤,等. 促红细胞生成素联合粒细胞集落刺激因子治疗大鼠急性心肌梗死 [J]. *南方医科大学学报*,2011,31(1),17-22.
- [15] 杨贵英,闵苏. 缺血再灌注心脑细胞凋亡与线粒体三磷酸腺苷敏感性钾通道 [J]. *中国体外循环杂志*,2008,6(1), 62-65.

(收稿日期: 2012-03-23)

(修订日期:2012-04-27)