

• 实验研究 Experimental research •

人血栓调节蛋白基因转染兔内皮祖细胞的体外实验研究

吴志平, 邓 钢, 侯居攀, 赵国峰, 许荣睿, 文 颂, 秦永林,
柏志斌, 滕皋军

【摘要】 目的 探讨人血栓调节蛋白(hTM)基因转染兔内皮祖细胞(EPCs)的可行性及效率,为 hTM 修饰的 EPCs 活体移植预防经皮腔内血管成形术后血管内再狭窄提供实验依据。**方法** 采用基因工程方法构建重组质粒 pcDNA3.1-hTM。梯度离心法分离兔外周血单个核细胞(MNCs),贴壁筛选出 EPCs,通过免疫组化检测其 CD34、vWF、KDR 等内皮系抗原,通过 Dil-ac-LDL 及 FITC-UEA-1 荧光染料双吞实验进一步表征 EPCs pcDNA3.1-hTM 转染 EPCs,转染 48 h 后行细胞免疫荧光染色,72 h 后行 Western 印迹检测比较重组质粒转染组、空载质粒转染组和对照组 hTM 表达水平。转染后分别于第 3、4、5 天采用四氮唑蓝法(MTT)比较各组细胞增殖活性。**结果** 双酶切及基因测序鉴定均证实 pcDNA3.1-hTM 重组质粒构建成功;细胞表面抗原及免疫荧光双标实验表明所培养细胞为 EPCs。转染后的直接免疫荧光实验及 Western 印迹检测证实 hTM 在重组质粒转染组的表达高于对照组;MTT 比色实验示重组质粒转染组、空载质粒组、空白对照组在第 3、4、5 天吸光度值差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 成功构建 pcDNA3.1-hTM 重组质粒,转染兔外周血 EPCs 后可使 EPCs 成功表达 TM,且对 EPCs 的活力、增殖等生物学性质无明显影响。

【关键词】 人血栓调节蛋白;转染;内皮祖细胞

中图分类号:R392 文献标志码:B 文章编号:1008-794X(2013)-09-0750-06

Transfection of human thrombomodulin gene into endothelial progenitor cells: an *in vitro* experiment in rabbits WU Zhi-ping, DENG Gang, HOU Ju-pan, ZHAO Guo-feng, XU Rong-rui, WEN Song, QIN Yong - lin, BAI Zhi - bin, TENG Gao - jun. Department of Radiology, Zhongda Hospital, Southeast University, Jiangsu Provincial Key Laboratory of Molecular Imaging and Functional Imaging, Nanjing 210009, China

Corresponding author: DENG Gang, E-mail: dmm1996@163.com

【Abstract】 Objective To explore the feasibility and efficiency of transfecting human thrombomodulin (hTM) gene into rabbit's endothelial progenitor cells (EPCs) in order to provide experimental evidence for further animal experiments. **Methods** The eukaryotic expression plasmid of hTM gene was constructed. Rabbit's peripheral blood mononuclear cells (MNCs) were isolated. EPCs were isolated from the MNCs by adherence method, which were expanded and characterized by CD34, KDR, vWF, Dil - ac - LDL, FITC - UEA - 1, and then modified with hTM by using X - tremeGENE HP DNA Transfection Reagent. Direct immunofluorescence was performed to observe hTM expression after 48 hours, and the expression of hTM was detected by Western blot after 72 hours. MTT assay was used to evaluate cell survival and proliferation.

Results The recombinant hTM with recombinant plasmid was confirmed by double endonuclease digesting and sequencing. EPCs were characterized by being positive for the endothelial cellmarks of CD34, KDR, vWF and internalization of Dil - Ac - LDL and binding to FITC - UEA - I. The gene expression was significantly improved in the pcDNA3.1 - hTM group compared to control group as

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81171433/H1816),江苏省自然科学基金(BK2010395)

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2013.09.012

作者单位:210009 南京 东南大学附属中大医院放射科 江苏省分子影像与功能影像实验室

通信作者:邓 钢 E-mail: dmm1996@163.com

demonstrated by direct immunofluorescence and Western Blot analysis. The difference of survival rate was not significant among pcDNA3.1-hTM group, pcDNA3.1 (+)-neo group and untransfected group through MTT analysis. **Conclusion** The recombinant plasmid of pcDNA3.1-hTM can be successfully and effectively transfected into rabbit's peripheral blood EPCs by using X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent, and the transfection causes no significant changes in viability and proliferation capacity of EPCs. (J Intervent Radiol, 2013, 22: 750-755)

【Key words】 human thrombomodulin; transfection; endothelial progenitor cell

血管腔内再狭窄是经皮腔内血管成形术(percutaneous transluminal angioplasty, PTA)后的常见并发症,研究显示 PTA 术后半年的再狭窄发生率可高达 30%以上^[1]。随着对 PTA 术后再狭窄发生的病理过程的研究,人们认识到内皮层的功能失调及损伤在整个 PTA 术后再狭窄的过程中作为始动因素起着重要的作用^[2]。因此,早期修复受损的血管内皮意义重大。由于内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)具有促进新生血管形成、定向归巢到受损内皮处修复受损内皮的特性^[3],因而成为干细胞移植治疗心血管疾病的理想细胞之一。随着干细胞移植治疗研究的深入,功能基因修饰 EPC 治疗血管类疾病成为研究的热点^[4-5]。血栓调节蛋白(thrombomodulin, TM)是血管内皮细胞表面的一种跨膜糖蛋白,是蛋白 C 系统的重要效应器,具有强大的抗凝功能^[6]。本实验拟探讨具有内源性抗凝作用的 EPCs 对 PTA 术后血管再狭窄的预防作用,首先通过构建人血栓调节蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1-hTM,继而将重组质粒转染至兔 EPCs,检测其在 EPCs 上的表达并观察转染过程对 EPC 增殖能力及活性的影响,为进一步动物实验提供理论依据。

1 材料与方法

实验采用健康雄性新西兰大白兔 20 只,体重 2.5 ~ 3.5 kg,由南京金陵种兔场提供。

主要试剂及设备:转染试剂 X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent、限制性内切酶 *Hind*Ⅲ、*Eco*R I (Roche, 瑞士);T4DNA 连接试剂盒(TaKaRa, 日本);内皮细胞基础培养液(EBM-2)、四氮唑蓝(MTT)鼠抗兔 vWF、KDR 单抗及异硫氰酸荧光素标记的鼠抗兔 CD34 单抗、羊抗鼠二抗 IgG(北京博奥森生物技术有限公司);CO₂ 培养箱(Herabius 公司, 德国);倒置相差显微镜(Axiovert 25 CFL, 德国);酶标仪(Bio-Rad Model-680, 美国);超净工作台(吴江市生物净化设备厂);PVDF 膜(Millipore, 美国);

ECL Plus 发光试剂盒(Thermo, 美国);凝胶成像仪(ChemiDoc XRS+ System, Bio-RAD, 美国)。

1.1 pcDNA3.1-hTM 重组质粒的构建、扩增及鉴定

取新鲜人外周血 20 ml, 碱裂解法提取总 DNA 作为模板行聚合酶链反应(PCR)。设计的上游引物为 5'-CAGAAGCTTATGCTTGGGGTCCTGG-3'; 下游引物为 5'-GTCGAATTCTCAGAGTCTCTGCGGC-3', 分别在上下游引物中引入 *Hind*Ⅲ、*Eco*R I 酶切位点。根据戴毅等^[7]方法构建 pcDNA3.1-hTM 重组质粒。分别用 *Hind*Ⅲ、*Eco*R I 双酶切电泳初步鉴定。进一步测序鉴定(北京六合华大基因科技股份有限公司)。

1.2 EPCs 的分离、培养、扩增

采取健康新西兰大白兔外周血约 20 ml, 肝素钠抗凝, 磷酸盐缓冲液(PBS)1:1 稀释, 加至等体积淋巴细胞分离液中, 密度梯度离心 2 500 g, 30 min, 吸取中间白色云雾层单个核细胞(mononuclear cell, MNC)置 15 ml 离心管, 加 PBS 液 10 ml, 混合液 1 000 g 离心 10 min, 重复 2 次。所得细胞以 EBM-2 培养基重悬接种于包被了人纤维粘连蛋白(FN)25 cm²的培养瓶内培养, 置 5% CO₂, 37℃培养箱培养, 每 4 d 更换培养液。培养过程中以倒置显微镜进行动态观察, 待 EPCs 铺满瓶底, 用胰蛋白酶消化传代培养。

1.3 EPCs 表征检测

1.3.1 免疫组化 EPCs 铺满瓶底后, 接种至预置 2 cm × 2 cm 载玻片的 6 孔板中, 细胞贴壁后, 取出爬满 EPC 的盖玻片, 分别行 CD34、vWF、VEGFR-2 的免疫组化检测。

1.3.2 细胞荧光染色 选取生长良好的原代细胞, 培养至第 6 天进行荧光化学检测。在培养细胞中加入 10 μg/ml 的乙酰化低密度脂蛋白(Dil-ac-ldl, Sigma, 美国), 置于培养箱中 37℃孵育 4 h; 吸去液体, 4%多聚甲醛固定 30 min; 10 μg/ml 的异硫氰酸荧光素标记的荆豆凝集素(FITC-UEA-1, Sigma, 美国)室温放置 1 h; 100 ng/ml 4', 6-二脒基-2-苯基

吖啶 (DAPI) 复染 10 min 后行荧光显微镜观察照相。Dil-ac-ldl 和 FITC-UEA-1 双荧光阳性的细胞被认为是 EPCs。

1.4 重组质粒 pcDNA3.1-hTM 转染 EPCs

待培养瓶中的 EPCs 原代细胞生长至 80% 的融合度时弃旧培养基, PBS 洗涤 1 次, 更换 6 ml 新培养基准备转染。转染试剂与重组质粒的比例为 3 μ l : 1 μ g, 转染操作按 X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent 说明书进行。EP 管配制重组质粒-转染试剂复合体: 每管加入无血清培养基 600 μ l, 取 6 μ g 重组质粒加入该无血清培养基, 另外移取 18 μ l 转染试剂加入该培养基 (加入过程避免未稀释的转染试剂接触 EP 管壁), 将混合液轻摇混匀, 20 $^{\circ}$ C 静置 20 min, 将该重组质粒-转染试剂复合体逐滴加入培养瓶中, 轻摇培养瓶使转染复合体均匀分散。

1.5 重组质粒的表达检测

1.5.1 直接免疫荧光法检测 hTM 表达 将实验分为重组质粒转染组、空载质粒转染组和空白对照组。在传代后第 5 天, 取生长良好的 P1 代 EPCs 分成三组 ($n = 3$), 分别取 pcDNA3.1-hTM 重组质粒、空载质粒、PBS 按照前述方法进行转染。转染 48 h 后行免疫荧光检测, 荧光显微镜观察照相。

1.5.2 Western 印迹检测 TM 表达 重组质粒转染 EPCs 72 h 后, 收集并裂解细胞, 离心后收集上清行 SDS-PAGE 电泳分离、转膜、封闭、孵育一抗、二抗, ECL 化学发光显影检测 TM (CD141), GAPDH 作为内参照。

1.6 MTT 法检测细胞活力

将重组质粒转染组、空载质粒转染组及空白对照组的 EPCs 以 10^4 /孔的密度接种于 96 孔板中, 每组设 18 个复孔, 分别于转染 48、72、96 h 后每组取 6 孔以 MTT 法检测在 490 nm 下的吸光度值。

1.7 统计学方法

使用 SPSS18.0 软件进行统计学分析, 三组 EPCs 间 MTT 吸光度值采用单因素方差分析, 两组数据比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒的扩增、提取、鉴定

用新鲜人外周血提取基因组 DNA, PCR 方法扩增 hTM 基因, 产物行琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 1 所示, 目的条带位于 1 700 bp, 与理论值相符; 进一步基因序列比对显示纯化后 hTM 序列符合理论预测序列。重组质粒用 *Hind* III、*Eco* R I 双酶切鉴

定, 酶切产物行凝胶电泳, 分别约 1 700 bp 和 5 400 bp 处获得 2 条均匀条带 (图 2), 证明 hTM 片段插入到 pcDNA3.1(+)-neo 质粒中, 符合预期结果。

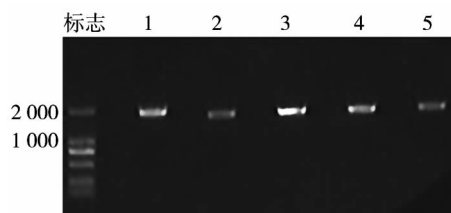


图 1 hTM PCR 结果

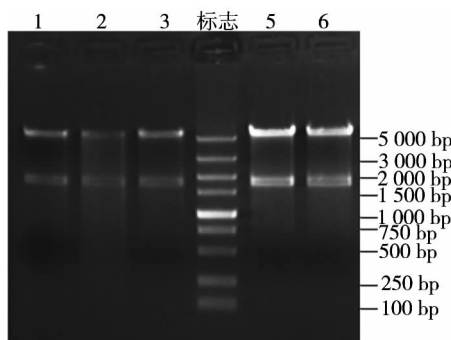


图 2 pcDNA3.1-h 双酶切结果

2.2 兔外周血来源的 EPCs 鉴定

2.2.1 EPCs 形态变化 取兔外周血单个核细胞 (MNCs) 置于 EBM-2 培养基环境中 3 ~ 4 d 换液, 贴壁分离得到 EPCs, 倒置相差显微镜下动态观察 EPCs 在生长过程中的形态变化。细胞于第 3 天时贴壁生长, 呈小圆形 (图 3a); 培养第 9 天时部分细胞呈梭形改变 (图 3b); 培养至 18 d 时, 细胞呈典型的铺路石样 (图 3c)。

2.2.2 EPCs 表征

2.2.2.1 内皮抗原免疫组化表征: 本实验采用内皮系抗原 CD34、KDR、vWF 标记 EPCs, 结果显示细胞 CD34、KDR、vWF 呈阳性或强阳性染色 (图 4a ~ 4c)。

2.2.2.2 免疫荧光实验: 图 5 显示 Dil-ac-ldl、FITC-UEA-1 双标实验阳性。

3 重组质粒的表达检测

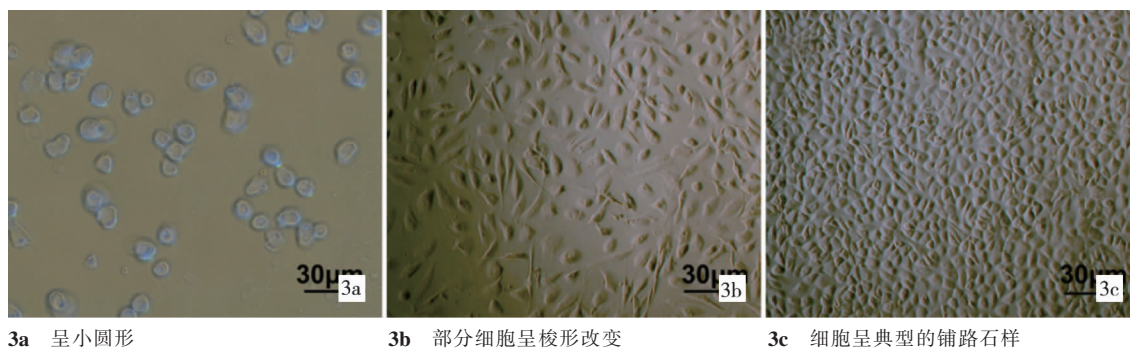
3.1 直接免疫荧光检测

图 6 显示重组质粒转染 EPCs 48 h 后抗 TM 各组中的表达情况, 结果表明重组质粒转染组 TM 表达水平高于空载质粒转染组及空白对照组。

3.2 Western 印迹检测

结果显示重组质粒转染组 CD141 表达明显高于对照组 (图 7a ~ 7b), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3.3 MTT 比色实验结果

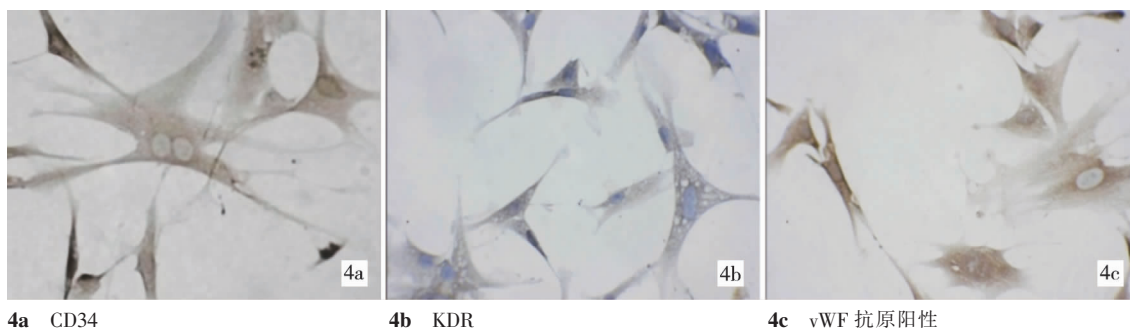


3a 呈小圆形

3b 部分细胞呈梭形改变

3c 细胞呈典型的铺路石样

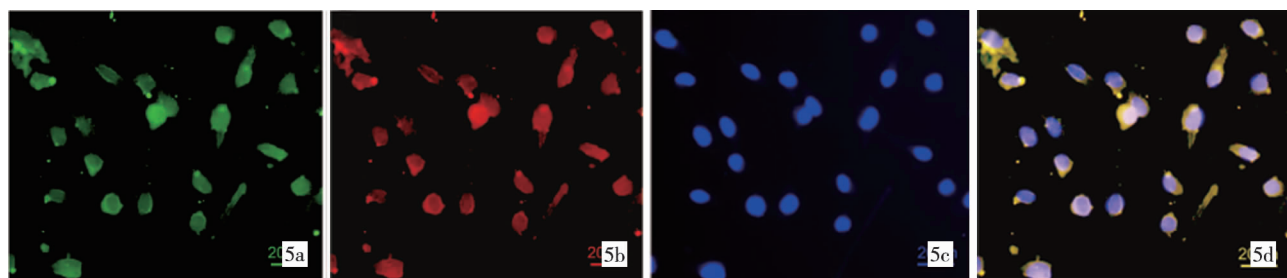
图 3 倒置相差显微镜下观察 EPCs 的形态



4a CD34

4b KDR

4c vWF 抗原阳性

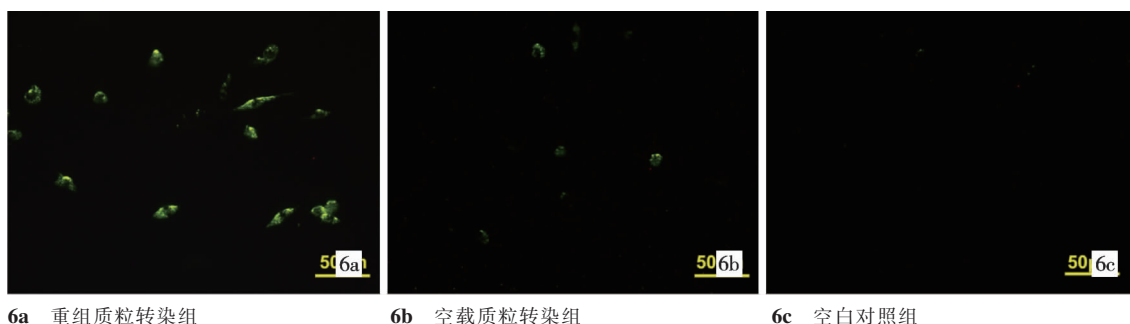
图 4 细胞抗原免疫组化表征($\times 400$)

5a EPC 结合 FITC-UEA-1, 呈绿色

5b EPC 摄取 Dil-ac-Ldl, 呈红色

5c 细胞核 DAPI 染色, 呈蓝色

5d 5a ~ 5c 融合图像

图 5 免疫荧光双标实验结果 ($\times 200$)

6a 重组质粒转染组

6b 空载质粒转染组

6c 空白对照组

图 6 三组 TM 蛋白的表达

MTT 法分别检测重组质粒转染组、空白质粒转染组、空白对照组第 3、4、5 天的吸光值(表 1), 单因素方差分析显示各组间差异无统计学意义($n = 6, P > 0.05$)

3 讨论

内皮层的功能失调被认为是 PTA 术后再狭窄

发生、发展过程的始动因素^[2]。大量研究表明 EPCs 在维持血管内皮的完整性中起重要的作用, 其数量减少或功能失调是心血管事件的危险因素^[8]。Shi 等^[9]通过经颈内静脉门腔分流术(transjugular intrahepatic portosystemic shunt, TIPS)动物实验证实移植 EPCs 于支架上可改善其通畅率。Ma 等^[10]在动脉粥样硬化的兔模型中植入 EPCs, 发现 EPCs 可预

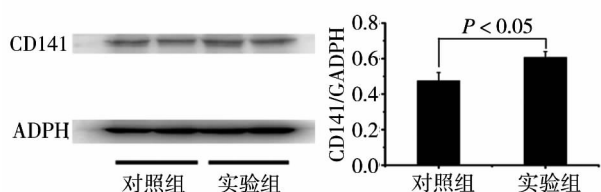


图 7 Western 印迹结果(左)和 TM 表达的相对量(右)

表 1 MTT 法测得各组的吸光度值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	吸光度值		
	3 d	4 d	5 d
基因转染组	0.170 ± 0.075	0.264 ± 0.034	0.363 ± 0.045
空载质粒组	0.182 ± 0.052	0.265 ± 0.074	0.361 ± 0.028
空白对照组	0.175 ± 0.009	0.267 ± 0.075	0.365 ± 0.072
F 值	2.48	0.184	2.268
P 值	0.14	0.84	0.16

防动脉粥样硬化斑块形成。随着分子生物学及基因工程技术的发展,为了增强单纯干细胞移植的效果,基因治疗联合干细胞治疗成为新兴的治疗策略,即以干细胞作为基因载体,运送基因到特定位置,强化相关功能基因在目标位置的表达而发挥相应的生物学效应。Cui 等^[11]将一定量 eNOS 基因修饰的 EPC (eNOS-EPC)、绿色荧光蛋白修饰的 EPC (GFP-EPC) 或 PBS 经尾静脉分别注入球囊扩张导致的小鼠血管损伤模型,结果表明三组模型在抑制内膜增生方面,eNOS-EPC 组显著高于 GFP-EPC 组及 PBS 组,提示基因修饰 EPC 抑制 PTA 术后血管内膜的病理增生、远期的再狭窄比单纯的 EPC 移植有优势。干细胞生长因子基因(HGF)、结合珠蛋白基因^[12-13]修饰 EPCs 的实验均表明,相比单纯的干细胞移植,功能基因修饰干细胞的治疗策略由于可体现或强化相关功能基因的生物学作用而更具优势。

基因联合干细胞治疗的重要一环是载体干细胞的选择。EPCs 具有定向归巢于缺血缺氧、血管损伤组织,促进内皮修复及新生血管形成的特性^[14-15],且由于其来源的多样性、制备的简单性而成为干细胞治疗理想的备选细胞之一。本实验通过从兔外周血中分离得到 MNCs,以选择性培养基 EBM-2 贴壁筛选培养出 EPCs,动态观察其形态学变化,并以内皮系标志物 CD34、KDR、vWF 表征所培养的 EPC 细胞^[16],进一步以 Dil-ac-LDL、FITC-UEA-1 免疫荧光双标实验表征所培养的细胞,其形态学结构、细胞抗原、功能结构符合已报道的 EPCs 的特征。

TM 是蛋白 C 系统的重要效应器。成熟的 TM 包含 557 个氨基酸,从 N 末端到 C 端包含 5 个功能区,依次是凝集素样结构域、6 个重复排列的表皮生

长因子样结构域、富含丝苏氨酸结构域、跨膜区、胞质区^[17],其中 4 ~ 6 区的表皮生长因子样结构负责结合凝血酶及蛋白 C 的激活,是 TM 抗凝生物活性的核心。由于其与凝血酶的激活、灭活密切相关而具有强大的抗凝功能,是内皮细胞主要抗凝活性物质^[18]。有研究者以内皮 TM 基因敲除鼠为模型,发现凝血系统由于缺乏抑制因素 TM 而过度激活,从而在整个血循环中导致自发而且致命的血栓形成^[19]。TM 除表达于血管内皮,还表达于平滑肌细胞、血小板、单核细胞及心肌细胞,这提示其生物学活性并不局限于抗凝功能。随着对 TM 研究的深入,涉及的生物学作用越来越多,诸如抗炎、抗动脉粥样硬化、调节细胞增殖与细胞间粘附、影响肿瘤代谢^[20-22],因而 TM 基因成为基因联合干细胞治疗策略极具潜力的功能基因之一。

本实验利用碱裂解法裂解新鲜人外周血细胞提取基因组 DNA,采用戴毅等^[7]方法构建出 pcDNA3.1-hTM 质粒并将重组质粒转染到兔 EPCs,紫外分光光度计测得重组质粒其在波长 260/280 nm 的吸光度值为 1.88,证明我们得到的重组质粒纯度较高,为实验的进行提供了保障。MTT 比色结果的方差分析显示,转染过程中各组间 EPCs 细胞的细胞活力差异无统计学意义($n = 6, P > 0.05$)。直接细胞免疫荧光实验表明,重组质粒转染组 TM 的表达量显著高于空载质粒转染组及空白对照组。进一步 Western 印迹实验表明,重组质粒转染组的 TM 表达量显著高于对照组($n = 3, P < 0.05$),本实验为后续的动物实验提供了良好的实验基础。

本实验也存在一些缺陷。尽管重组质粒转染组 TM 的表达显著高于对照组,但其绝对量相差并不大,原因可能与质粒转染效率低下有关。目前所用的转染载体大致可分为两类,一类是病毒性载体,另一类是非病毒性载体,二者均有其自身的优点及局限性。前者虽然转染效率较高,但因潜在的致癌性、免疫原性、所携外源基因大小有要求等使其应用受到一定限制;后者多为阳离子聚合物、脂质体及其衍生物,多具有一定的细胞毒性,且易被细胞内外的水解酶水解。本实验所采用的转染试剂为以脂质体为主的混合转染试剂-X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent,实验结果显示其转染效率不是特别理想。构建新型的转染载体,提高基因转染效率,是本实验研究的重要方向。

综上所述,本实验成功构建了 pcDNA3.1-hTM 重组质粒,并将其成功转染至兔 EPCs 中。实验结果

证实兔 EPCs 中 TM 高表达, 且对 EPCs 的活力、增殖等生物学性质无明显影响。本实验为进一步的动物实验提供了重要的实验依据。

参考文献

- [1] Amighi J, Schillinger M, Dick P, et al. De novo superficial femoropopliteal artery lesions: peripheral cutting balloon angioplasty and restenosis rates—randomized controlled trial[J]. Radiology, 2008, 247: 267 - 272.
- [2] Denes L, Entz L, Jancsik V. Restenosis and therapy [J]. Int J Vasc Med, 2012; 406236.
- [3] Larsen K, Cheng C, Tempel D, et al. Capture of circulatory endothelial progenitor cells and accelerated re-endothelialization of a bio-engineered stent in human ex vivo shunt and rabbit denudation model[J]. Eur Heart J, 2012, 33: 120 - 128.
- [4] Griesse DP, Ehsan A, Melo LG, et al. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy [J]. Circulation, 2003, 108: 2710 - 2715.
- [5] Kaur S, Harikrishnan VS, Shenoy SJ, et al. Transfection of endothelial nitric oxide synthase gene improves angiogenic efficacy of endothelial progenitor cells in rabbits with hindlimb ischemia[J]. J Clin Experiment Cardiol, 2011, 2: 1 - 6.
- [6] Weiler H, Isermann BH. Thrombomodulin [J]. J Thromb Haemost, 2003, 1: 1515 - 1524.
- [7] 戴毅, 陈辉, 邹琳, 等. 含人血栓调节蛋白基因重组质粒的构建和表达[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20: 83 - 86.
- [8] Werner N, Kosiol S, Schiegle T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes[J]. N Engl J Med, 2005, 353: 999 - 1007.
- [9] Shi HJ, Cao AH, Chen J, et al. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt with an autologous endothelial progenitor cell seeded stent: a porcine model[J]. Acad Radiol, 2010, 17: 358 - 367.
- [10] Ma ZL, Mai XL, Sun JH, et al. Inhibited atherosclerotic plaque formation by local administration of magnetically labeled endothelial progenitor cells (EPCs) in a rabbit model [J]. Atherosclerosis, 2009, 205: 80 - 86.
- [11] Cui B, Huang L, Fang Y, et al. Transplantation of endothelial progenitor cells overexpressing endothelial nitric oxide synthase enhances inhibition of neointimal hyperplasia and restores endothelium-dependent vasodilatation[J]. Microvasc Res, 2011, 81: 143 - 150.
- [12] Song MB, Yu XJ, Zhu GX, et al. Transfection of HGF gene enhances endothelial progenitor cell (EPC) function and improves EPC transplant efficiency for balloon-induced arterial injury in hypercholesterolemic rats[J]. Vasc Pharmacol, 2009, 51: 205 - 213.
- [13] Park SJ, Baek SH, Oh MK, et al. Enhancement of angiogenic and vasculogenic potential of endothelial progenitor cells by haptoglobin[J]. FEBS Lett, 2009, 583: 3235 - 3240.
- [14] Tateishi - Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial[J]. Lancet, 2002, 360: 427 - 435.
- [15] Bailey AS, Jiang S, Afentoulis M, et al. Transplanted adult hematopoietic stems cells differentiate into functional endothelial cells[J]. Blood, 2004, 103: 13 - 19.
- [16] Timmermans F, Plum J, Yöder MC, et al. Endothelial progenitor cells: identity defined? [J]. J Cell Mol Med, 2009, 13: 87 - 102.
- [17] Li YH, Kuo CH, Shi GY, et al. The role of thrombomodulin lectin-like domain in inflammation[J]. J Biomed Sci, 2012, 19: 34.
- [18] Góralczyk K, Soszyńska K, Haus O, et al. The influence of lovastatin on thrombomodulin gene expression in vascular endothelial cells—in vitro study [J]. Folia Histochem Cytobiol, 2009, 47: 43 - 45.
- [19] Isermann B, Hendrickson SB, Zogg M, et al. Endothelium-specific loss of murine thrombomodulin disrupts the protein C anticoagulant pathway and causes juvenile-onset thrombosis[J]. J Clin Invest, 2001, 108: 537 - 546.
- [20] Ito T, Maruyama I. Thrombomodulin: protectorate God of the vasculature in thrombosis and inflammation [J]. J Thromb Haemost, 2011, 9 (suppl 1): 168 - 173.
- [21] Li YH, Shi GY, Wu HL. Thrombomodulin in the treatment of atherothrombotic diseases[J]. Front Biosci (Schol Ed), 2009, 1: 33 - 38.
- [22] Horowitz NA, Blevins EA, Miller WM, et al. Thrombomodulin is a determinant of metastasis through a mechanism linked to the thrombin binding domain but not the lectin-like domain [J]. Blood, 2011, 118: 2889 - 2895.

(收稿日期:2013-02-01)

(本文编辑:侯虹鲁)