

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.201802004



重组人组织激肽释放酶结合蛋白 抗氧化活性及抗凝活性分析

周玥莹¹, 龙莎¹, 方美娟², 王立强¹

(1. 华侨大学 生物医学学院, 福建 泉州 362021;

2. 厦门大学 药学院, 福建 厦门 361102)

摘要: 探究 Kallistatin 蛋白在体外 3 种细胞模型中的抗氧化活性及其体外抗凝、溶栓活性。首先,在体外构建 HBZY-1, HaCaT, HTR8-s/Vneo 细胞的 H₂O₂、Fe-HQ 氧化应激模型,并将 Kallistatin 蛋白应用于构建的氧化应激模型中。然后,采用多浓度梯度法筛选最佳氧化剂浓度,利用细胞活性实验检测以上 3 种细胞的活性,并进行体外抗凝、溶栓实验考察。结果表明:在 H₂O₂ 模型中,当 Kallistatin 蛋白浓度为 0.6 μmol · L⁻¹ 时,3 种细胞活力与对照组(LD-Hanks 缓冲液)相近,低剂量蛋白组(0.06 μmol · L⁻¹)的细胞活力明显低于高剂量蛋白组细胞;在 Fe-HQ 模型中,不同细胞中 Kallistatin 蛋白剂量的作用不同,Kallistatin 蛋白具有体外抗氧化活性,不同应激条件下不同细胞对蛋白剂量的依赖性不同;体外抗凝、溶栓实验表明此蛋白具有相关活性。

关键词: Kallistatin 蛋白; 氧化应激; 细胞活性; 抗凝; 溶栓

中图分类号: R 944

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2018)05-0732-06

Antioxidant Activity and Anticoagulant Activity Analysis of Recombinant Human Tissue Kallistatin Binding Protein

ZHOU Yueying¹, LONG Sha¹, FANG Meijuan², WANG Liqiang¹

(1. School of Biomedical Sciences, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract: To investigate the anti-oxidative activity and anticoagulant and thrombolytic activity of Kallistatin in three kinds of cell models *in vitro*, H₂O₂ and Fe-HQ oxidative stress models of HBZY-1, HaCaT and HTR8-s/Vneo cells were constructed *in vitro*, and the Kallistatin protein was used in these oxidative stress models. Multi-concentration gradient method was adopt to select the optimal oxidant concentration. CCK experiment was used to detect the activity of three kinds of cells, and the anticoagulant and thrombolytic experiments were carried out *in vitro*. The results shows that in the H₂O₂ model, the viability of three kinds of cell was similar to the control group (LD-hanks buffer) when the concentration of Kallistatin protein was 0.6 μmol · L⁻¹. The cell viability of low-dose protein group (0.06 μmol · L⁻¹) was significantly lower than that of the high dose. In the Fe-HQ model, the effect of Kallistatin protein doses differed in different cells. Thus, Kallistatin protein has antioxidant activity *in vitro*, and it is dose-dependent in different cells under different stress conditions. Furthermore, *in vitro* anticoagulation and thrombolysis experiments showed that this protein has related activity.

Keywords: Kallistatin protein; oxidative stress; cell activity; anticoagulation; thrombolysis

收稿日期: 2018-02-04

通信作者: 王立强(1970-),男,教授,博士,主要从事药剂学和创新药物的研究。E-mail: wlq1599@163.com.

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2016YFE0101700); 国家自然科学基金资助项目(2015J01342)

人组织激肽释放酶结合蛋白(Kallistatin, KAL)是一种内源性的血管生成抑制因子,最早作为一种组织激肽释放酶结合蛋白被发现,能特异性地与组织激肽释放酶(TK)结合而抑制其活性的发挥^[1-2]。许瑞安、林俊生教授率先创造性地利用毕赤酵母表达系统成功分泌表达了有生物活性的 KAL 蛋白,并发现重组 KAL 蛋白对血管内皮细胞的增殖具有抑制作用。氧化应激是指当机体发生多种不良反应时,体内活性酶分泌增多,活性氧、活性氮自由基数量剧增,炎性细胞浸润,氧化与抗氧化作用之间平衡失调,继而引起机体组织损伤的生理变化过程^[3]。Diao 等^[4]发现在高盐诱导的大鼠肾损伤模型中,KAL 蛋白能在 NO 合酶及 NO 水平上大幅降低氧化应激反应程度。同时,有研究发现,在皮下注射基质胶模型大鼠中,KAL 蛋白能明显抑制由乙烯基磷片胶(VEGF)所诱导的血管密度增加,以及减少血红素组分的生成,进而抑制血管生成^[5]。本实验室在前期研究中发现,在肝纤维化模型小鼠中,KAL 可明显抑制 CCl₄ 所导致的纤维化程度。在以上研究的基础上,本文以前期在毕赤酵母表达系统中高表达的重组 KAL 蛋白为研究对象,将肾小球系膜细胞(HBZY-1)、人永生表皮细胞系(HaCaT 细胞)^[6]、人绒毛膜滋养层细胞(HTR8-s/Vneo)^[7] 3 种细胞应用于体外氧化模型实验进一步验证其抗氧化活性,并对其体外抗凝、溶栓活性进行初步研究。

1 实验部分

1.1 实验材料

1) 实验动物. 新西兰白兔 60 只,清洁级,体质量(2±0.5) kg(厦门大学实验动物中心,动物许可证号:SYXK(闽)2013-0007)。

2) 实验仪器. 高速离心机(美国 Beckman 公司)、HD-21-88 型核酸/蛋白质检测仪(上海琪特公司)、超声波清洗机(上海爱阔特清洗设备制造有限公司)、倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司)、CO₂ 恒温细胞培养箱(美国 Thermo 公司)、真空干燥箱(上海和呈仪器制造有限公司)。

3) 实验试剂. 重组人 Kallistatin 蛋白(本实验室制得)、肾小球系膜细胞(HBZY-1)、人永生表皮细胞系(HaCaT 细胞)、人绒毛膜滋养层细胞(HTR8-s/Vneo,购于浙江澳兴生物科技)、H₂O₂(上海丽昂化学有限公司)、羟基喹啉铁复合物(Fe-HQ,上海丽昂化学有限公司)、DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司)、D-Hank's 缓冲液(美国 Sigma 公司)、CCK 溶液(浙江澳兴生物科技有限公司)、PBS(美国 Sigma 公司),其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将 HBZY-1, HaCaT, HTR8-s/Vneo 3 种细胞分别用含有体积分数为 20% 的小牛血清的 DEME 培养基,在 37 °C,体积分数为 5% 的 CO₂,饱和湿度条件下的细胞培养箱中培养 12 h, 以使其贴壁;贴壁后,换成含体积分数为 10% 的小牛血清的新鲜 DEME 培养基传代培养。

1.2.2 氧化应激模型中细胞活性的测定 取对数生长期的 HBZY-1, HaCaT, HTR8-s/Vneo 细胞,接种至 96 孔细胞培养板中,每个孔约含 1.5×10^4 个细胞,加入 150 mL DEME 培养液。将细胞培养板置于 37 °C,体积分数为 5% 的 CO₂ 细胞培养箱中培养 12 h 后,除去培养液,用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液, pH 值为 7.2~7.4 清洗一次。分别加入事先配置的新鲜 H₂O₂ 和 Fe-HQ 溶液,使 HBZY-1 细胞, HaCaT 细胞的 H₂O₂ 模型终浓度为 580, 780, 980, 1 180, 1 380, 1 590, 1 780, 1 980 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, HTR8-s/Vneo 细胞的 H₂O₂ 模型终浓度为 160, 360, 560, 760, 960, 1 160, 1 360, 1 560, 1 760 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 3 种细胞的 Fe-HQ 模型终质量浓度为 400, 600, 800, 1 000, 1 200, 1 400, 1 600, 1 800 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。每个质量浓度设 3 个复孔,处理后的培养板放置于 37 °C,体积分数为 5% 的 CO₂ 的培养箱中继续培养,分别培养至 0.5, 3.0, 6.0 h,于倒置显微镜下观察细胞形态,再进行细胞活性(CCK)实验检测细胞活性。

1.2.3 KAL 蛋白抗氧化作用的测定 根据细胞活性实验,将 HBZY-1 细胞、HaCaT 细胞、HTR8-s/Vneo 细胞分别作用于不同质量浓度的 H₂O₂ 和 Fe-HQ 模型中^[6],并接种至 96 孔细胞培养板中,每个孔约含 2.5×10^4 个细胞。然后,加入 100 mL 的 DEME 培养液,并将细胞培养板置于 37 °C,体积分数为 5% 的 CO₂ 细胞培养箱中培养 12 h。最后,先加入 KAL 蛋白,5 min 后,再加入 H₂O₂ 及 Fe-HQ 溶液,使高、低剂量蛋白组终浓度分别为 0.60, 0.06 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 设置 LD-Hanks 缓冲液为阴性对照组,模型组

浓度依据细胞活性测定结果设定,分别选择相应时间点统计蛋白剂量对细胞活力的影响。

1.2.4 细胞活性检测方法 CCK-8 实验 按照每孔 1 000 个的量在 96 孔板中接种生长期活细胞($150 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$),在 37°C ,体积分数为 5%的 CO_2 中预培养 24 h,并且向每个孔中加入 1 L 的 CCK 溶液($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 37°C 孵育 4 h.若存在时间间隔,可向孔中加入 $1 \mu\text{L}$, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 HCl 溶液或质量分数为 1%的 SDS 溶室温条件下暂存.将培养板在培养箱预培养 24 h,检测组波长设置为 450 nm,对照组波长为 390 nm,空白组条件除细胞数量外与检测组相同,用酶标仪检测每孔吸光值,细胞活性通过细胞相对增殖率(RGR)进行比较。

$$\text{RGR}(\text{细胞活性}) = \frac{\text{检测孔吸光度} - \text{空白孔吸光度}}{\text{对照孔吸光度} - \text{空白孔吸光度}} \times 100\%$$

1.2.5 KAL 蛋白体外抗凝活性考察 设置质量分数为 0.9%生理盐水为空白对照组,尿激酶($833.5 \mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1}$)为阳性对照组,实验组为生理盐水配制的 KAL 蛋白溶液($0.6, 0.4, 0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).取灭菌试管 15 支,分别加入蛋白溶液 1.0 mL,新西兰兔肌注异氟烷,待完全麻醉后心脏取血,新鲜血液立即以每支 1.0 mL 量加入灭菌试管;震荡混匀后于 37°C 恒温水浴中静置 3 h,每组设置 3 个平行组.3 h 后将栓块取出,用质量分数为 0.9%的 NaCl 溶液洗净,滤纸吸去多余水分,观察拍照,各自称量。

1.2.6 KAL 蛋白体外溶栓活性考察 设置质量分数为 0.9%生理盐水为空白对照组,蚓激酶($50.01 \mu\text{kat} \cdot \text{kg}^{-1}$)为阳性对照组,实验组为生理盐水配制的 KAL 蛋白溶液($0.6, 0.4, 0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).取新西兰白兔 30 只,随机分成 5 组,每组 6 只.新西兰兔耳缘静脉取血,新鲜血液立即以每支 1.0 mL 量加入灭菌试管,静置 2 h 至血液凝固,各管对应加入蛋白溶液 1.0 mL.于 37°C 恒温振荡,观察各试管栓块的大小变化,每组设置 3 个组.18 h 后将栓块取出,用质量分数为 0.9%的 NaCl 溶液洗净,滤纸吸去多余水分,观察称量。

1.2.7 统计分析 采用 SPSS 软件统计学处理实验数据,以 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 表示,并用最小显著性差异法(LSD)法验证作两两对比, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 细胞活性分析

2.1.1 H_2O_2 对不同细胞氧化应激反应 3 种细胞对 H_2O_2 氧化应激的反应结果,如图 1(a)所示.由图 1(a)可知:不同浓度的 H_2O_2 模型中,3 种细胞氧化应激的结果不同.3 种细胞对高浓度的 H_2O_2 反应不同,HTR8-s/Vneo 细胞活性在高浓度时低于其余两种细胞;HBZY-1,HaCaT,HTR8-s/Vneo 3 种细胞细胞活性短时间内随 H_2O_2 浓度变化的情况基本一致,均随浓度的增加呈下降趋势,故选择 6 h 作为研究时间点.后续实验 H_2O_2 模型组浓度选定 HBZY-1 为 $1180 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,HaCaT 为 $1590 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,HTR8-s/Vneo 为 $1160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.1.2 Fe-HQ 对不同细胞氧化应激反应 3 种细胞对 Fe-HQ 氧化应激的不同反应结果,如图 1(b)所示.由图 1(b)可知:不同浓度的 Fe-HQ 模型中,3 种细胞氧化应激的结果差别较大.HTR8-s/Vneo 细

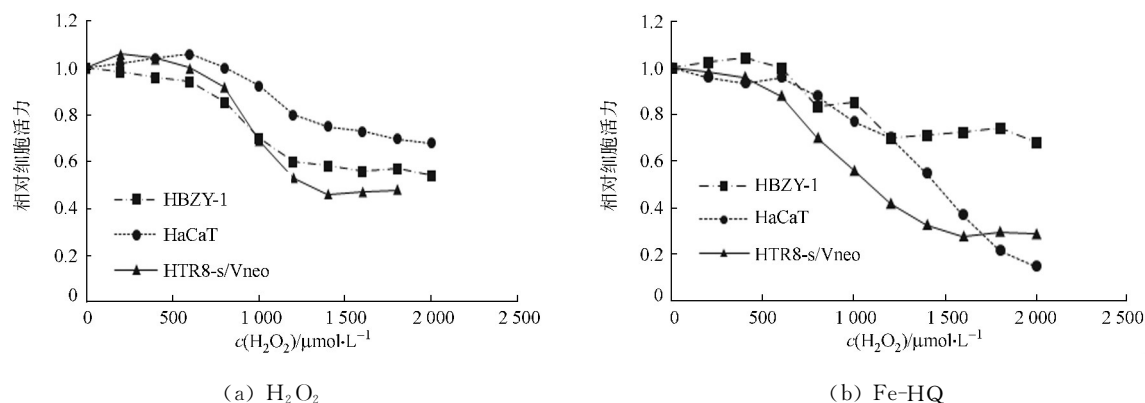


图 1 3 种细胞对氧化应激反应的细胞活力的变化

Fig. 1 Changes of cell viability of three kinds of cells in oxidative stress response

胞对铁过载造成的损伤反应最为灵敏, HBZY-1 细胞反应最差. 比较不同浓度下的细胞活性, 选择 32 h 作为研究时间点. 后续实验 Fe-HQ 模型组的浓度选定 HBZY-1 为 $1\ 200\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, HaCaT 为 $1\ 200\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, HTR8-s/Vneo 为 $800\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.2 KAL 蛋白的抗氧化作用

2.2.1 作用于 H_2O_2 氧化应激模型 KAL 蛋白剂量对 HBZY-1 细胞活力的影响结果, 如图 2(a) 所示. 由图 2(a) 可知: 与对照组相比, 相较于 30 min, 作用时间为 6 h 时, 高剂量蛋白组对细胞的保护作用有统计学意义 ($P < 0.01$), 细胞活性较高, 而低剂量组作用不明显. KAL 蛋白剂量对 HaCaT 细胞活力的影响结果, 如图 2(b) 所示. 由图 2(b) 可知: 作用时间为 6 h 时, 高剂量蛋白组对 HaCaT 细胞的保护作用有统计学意义 ($P < 0.01$), 细胞活性明显高于低剂量组.

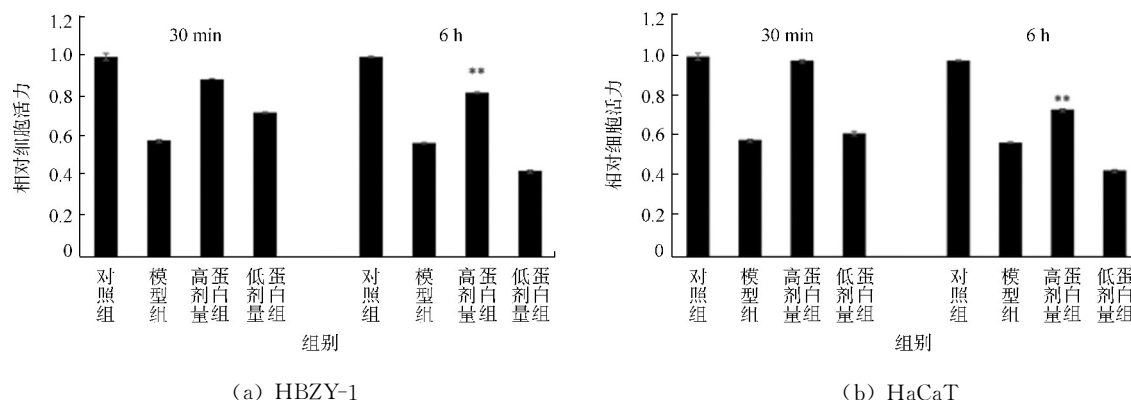


图 2 KAL 蛋白剂量对细胞活力的影响

Fig. 2 Effect of KAL protein dose on cell viability

KAL 蛋白剂量对 HTR8-s/Vneo 细胞活力的影响结果, 如图 3 所示. 由图 3 可知: 相较于 30 min, 作用时间为 6 h 的高剂量蛋白组对细胞的保护作用变化不大, 低剂量蛋白组细胞活性有所下降; 与模型组相比, 作用时间为 6 h 时, 高、低剂量蛋白组细胞活性差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$).

2.2.2 作用于 Fe-HQ 氧化应激模型 在 HBZY-1, HaCaT, HTR8-s/Vneo 3 种细胞的铁过载模型中, KAL 蛋白剂量对细胞活力的影响结果, 如图 4 所示. 由图 4 可知: 与模型组对比, 高剂量蛋白组的 HBZY-1 细胞活力下降, 低剂量蛋白组细胞活性基本无变化, 对细胞氧化应激反应的保护作用没有统计学意义 ($P > 0.05$); 在 HaCaT 细胞中, 高剂量蛋白组对铁过载造成的损伤表现出促进作用, 而低浓度蛋白组对细胞损伤则表现出显著的保护作用, 有统计学意义 ($P < 0.05$), 且蛋白组与模型组差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); KAL 蛋白的高、低剂量组对 HTR8-s/Vneo 细胞活性都有明显的保护作用, 而低剂量蛋白组作用有统计学意义 ($P < 0.01$).

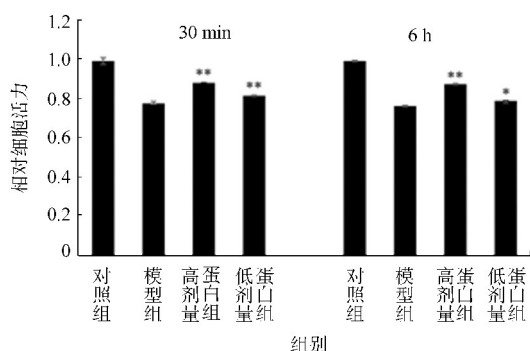


图 3 KAL 蛋白剂量对 HTR8-s/Vneo 细胞活力的影响

Fig. 3 Effect of KAL protein dose on HTR8-s/Vneo cell viability

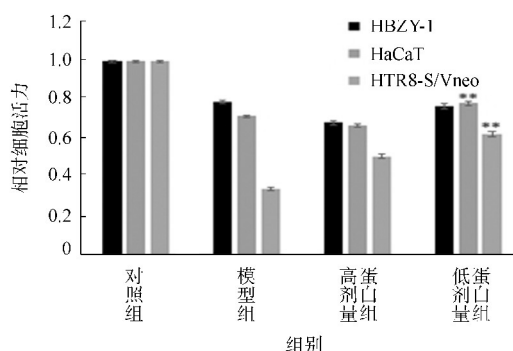


图 4 KAL 作用于细胞 Fe-HQ 氧化应激模型时对细胞活力的影响

Fig. 4 Effect of KAL on cell viability in HaCaT's Fe-HQ oxidative stress model

2.3 KAL 蛋白的体外抗凝作用

3 h 后血栓称量结果, 如图 5 所示. 由图 5 可知: 不同浓度的 KAL 蛋白给药组较阴性对照组抗凝效

果不同.随着 KAL 蛋白剂量的增加,蛋白的抗凝活性逐渐增加.与阴性对照组生理盐水相比,高剂量 KAL 蛋白组抗凝效果有统计学意义($P>0.05$),与阳性对照组尿激酶相比,高剂量 KAL 蛋白组抗凝效果差异不明显.

血栓拍照结果,如图 6 所示.由图 6 可知:血栓大小明显变化,进一步验证高剂量 KAL 蛋白具有抗凝活性.

2.4 KAL 蛋白的体外溶栓作用

6 h 之后,血栓阴性对照组的质量为(0.5015 ± 0.0007) g, 蚓激酶组的质量为(0.0820 ± 0.0059) g, 浓度分别为 0.2, 0.4, 0.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KAL 组质量分别为(0.2928 ± 0.0038), (0.1933 ± 0.0046), (0.0192 ± 0.0106) g. KAL 组血栓较阴性对照组均有不同程度溶解.不同浓度 KAL 蛋白较阴性对照组溶栓效果差异均具有统计学意义($P<0.05$),与阳性对照组相比,当 KAL 浓度为 0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,溶栓效果差异不明显;浓度为 0.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,溶栓效果明显,但低于蚓激酶.

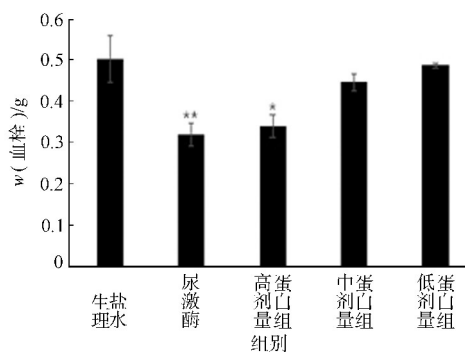
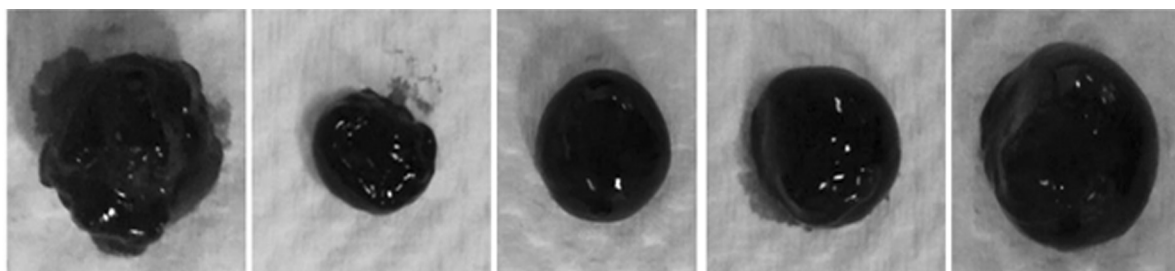


图 5 体外抗凝实验结果

Fig. 5 *In vitro* anticoagulation test results



(a) 生理盐水 (b) 尿激酶 (c) 高剂量蛋白组 (d) 中剂量蛋白组 (e) 低剂量蛋白组

图 6 体外抗凝实验拍照结果

Fig. 6 *In vitro* anticoagulant experiment photo results

3 讨论

体外构建 HBZY-1, HaCaT, HTR8-s/Vneo 3 种细胞的 H_2O_2 , Fe-HQ 氧化应激模型,将 Kallistatin 蛋白分别应用于构建的氧化应激模型中.研究蛋白预处理对不同氧化剂引起的 3 种细胞凋亡的保护作用,进而探究 KAL 蛋白的抗氧化活性.分析结果可知,在 H_2O_2 氧化应激模型中,KAL 蛋白对 3 种由 H_2O_2 氧化应激造成的细胞损伤均有保护作用,且作用具有剂量依赖性,KAL 蛋白在较高浓度(0.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)时能有效保护 3 种细胞免受 H_2O_2 氧化应激造成的损伤;而在 Fe-HQ 模型中,KAL 对铁过载模型的作用存在量效关系^[8],剂量关系与过氧化氢模型相反,低剂量组相较与高剂量组作用显著.综上所述可知,KAL 蛋白作为一种新型抗氧化剂,能在体外水平起到一定的抗氧化作用.

细胞类型、氧化应激模型的不同会导致蛋白抗氧化活性的差异,体内多种生理机制的共同作用引起细胞对不同浓度蛋白对产生差异性反应.KAL 蛋白抗氧化作用可能跟其能抑制 p38 促分裂素原的活化,抑制 TNF- α 、血管紧张素诱导的活性氧(ROS)形成,抑制血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)的表达及降低 I κ B α 磷酸化水平相关,而这些机理的内在联系则需要更深入的研究及探索^[9-12].

研究发现,大豆多肽^[13]、水蛭素、单环刺蝥纤溶酶^[14]等多种物质同时具有抗氧化和抗凝、溶栓活性.血栓形成一般来源于血管壁内皮细胞的损伤,血液中血小板、凝血因子、纤维蛋白的活化、形成,血流异常 3 方面;而在体外细胞实验中,KAL 蛋白能通过降低氧化应激来减少内皮细胞的凋亡或损伤.在此基础上,本课题组开展了 KAL 蛋白的体外抗凝、溶栓实验,并证实它具有抑制、降解纤维蛋白的能力,但具体作用机理仍有待研究.

实验进一步验证了重组人 KAL 蛋白在体外可表现出较强的抗氧化活性,有利于深入探究其抗纤维化作用,并今后抗纤维化药物的开发提供思路;而其抗凝、溶栓活性的发现,将为新型溶栓药物的开发提供思路,致力于开发多途径调控作用的溶栓药物^[14-16].

参考文献:

- [1] 黄晓平,王晓,董浩,等.重组人 kallistatin 蛋白在毕赤酵母中的高效表达及生物活性分析[J].生物工程学报,2010,26(2):249-255. DOI:10.13345/j. cjb. 2010. 02. 004.
- [2] 徐炉李.重组人 Kallistatin 蛋白的发酵罐制备技术及抗肝纤维化相关生物活性研究[D].厦门:华侨大学,2012.
- [3] 刘晔,齐荔红,王硕丰,等.肝星状细胞 HSC-T6 体外肝纤维化模型的建立[J].药学实践杂志,2005,23(6):339-342. DOI:10.3969/j. issn. 1006-0111. 2005. 06. 006.
- [4] DIAO Yong,ZHAO Xiaofeng,LIN Junsheng,*et al.* Protection of the liver against CCl₄-induced injury by intramuscular electrotransfer of a kallistatin-encoding plasmid[J]. World Journal of Gastroenterology,2011,17(1):111-117. DOI:10.3748/wjg. v17. i1. 111.
- [5] 郑晨娜,段训威,贾东方,等.重组人组织激肽释放酶结合蛋白对小鼠溃疡性结肠炎的抗炎作用[J].药科学报,2016,51(7):1077-1082. DOI:10.16438/j. 0513-4870. 2015-1167.
- [6] MOUAWAD J, SAADEH F, TABOSH H, *et al.* The photoprotective effects of 2-benzoyl-3-phenylquinoxaline 1,4-dioxide against UVB-induced damage in HaCaT cells[J]. Medical Oncology, 2016, 33(8):21-23. DOI: 10.1007/s12032-016-0802-4.
- [7] ZHANG Ting,ZHAO Chun,LUO Liang,*et al.* High concentration of taurocholic acid induced apoptosis in HTR-8/SVneo cells via overexpression of ERp29 and activation of p38[J]. Placenta,2014,35(7):496-500. DOI:10.1016/j. placenta. 2014. 03. 023.
- [8] CHAO Julie,TILLMAN D M,WANG Maoyin,*et al.* Identification of a new tissue-kallikrein-binding protein[J]. Biochem J,1986,239(2):325-331. DOI:10.1042/bj2390325.
- [9] CAO Sheng,YAQOUB U,DAS A,*et al.* Neuropilin-1 promotes cirrhosis of the rodent and human liver by enhancing PDGF/TGF-beta signaling in hepatic stellate cells[J]. Journal of Clinical Investigation, 2010, 120(7):2379. DOI: 10.1172/JCI41203.
- [10] SHIAU A L,TEO M L,CHEN S Y,*et al.* Inhibition of experimental lung metastasis by systemic lentiviral delivery of Lallistatin[J]. BMC Cancer,2010,10:245-253. DOI:10.1186/1471-2407-10-245.
- [11] BERRES M L,KOENEN R R,RUELAND A,*et al.* Antagonism of the chemokine Ccl5 ameliorates experimental liver fibrosis in mice[J]. Journal of Clinical Investigation,2010,120(11):4129-4140. DOI:10.1172/JCI41732.
- [12] TSE D,SUN Xueying,JIANG Hongchi,*et al.* Adeno-associated virus-mediated expression of kallistatin suppresses local and remote hepatocellular carcinomas[J]. Journal of Gene Medicine,2008,10(5):508-517. DOI:10.1002/jgm.1180.
- [13] 王希春. 固态发酵高溶栓活性豆豉及其抗氧化特性的研究[D]. 无锡:江南大学,2008.
- [14] 初金鑫,蔡文娣,韩宝芹,等.单环刺螈纤溶酶 UFE-1 的性质和溶栓活性[J].天然产物研究与开发,2010,4(22):661-664. DOI:10.3969/j. issn. 1001-6880. 2010. 04. 028.
- [15] SHEN Bo,GAO Lin,HSU Y,*et al.* Kallistatin attenuates endothelial apoptosis through inhibition of oxidative stress and activation of Akt-eNOS signaling[J]. Am J Physiol Heart Circ physiol, 2010, 299(5):1419-1427. DOI: 10.1152/ajpheart. 00591. 2010.
- [16] MIAO R Q,AGATA J,CHAO L,*et al.* Kallistatin is a new inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. Blood, 2002,100(9):3245-3252. DOI: 10.1182/blood-2002-01-0185.

(责任编辑:钱筠 英文审校:刘源岗)