

肾上腺髓质素对缺氧复氧诱导的大鼠近端肾小管上皮细胞凋亡的影响及其机制

苏晓乐 乔晞 李荣山 王艳红 刘新艳

【摘要】 目的 探讨肾上腺髓质素(ADM)对缺氧复氧(HR)诱导的大鼠近端肾小管上皮细胞(NRK-52E)凋亡的影响及其机制。方法 体外培养的 NRK-52E 细胞,随机分为 4 组:正常对照组、HR 组、空质粒 + HR 组、ADM 质粒 + HR 组。采用 Fugene HD 转染试剂,将 pcDNA3.1-myc-his B 空质粒和 ADM 真核表达质粒分别转染至 NRK-52E 细胞内,应用免疫细胞化学的方法检测转染效率,转染成功 48 h 后制作 HR 模型。锥虫蓝摄取法进行细胞计数并计算细胞存活率,分光光度法检测上清液中乳酸脱氢酶(LDH)含量评价细胞活力;Annexin V 和 PI 染色结合流式细胞仪技术检测细胞凋亡率;RT-PCR 法检测 ADM、Bax、Bcl-2、Fas 的 mRNA 表达;Western 印迹法检测活性半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3、8、9(Caspase-3、8、9)的蛋白表达。结果 HR 组 ADM 的表达显著高于正常对照组($P < 0.05$)。ADM 质粒 + HR 组的 ADM 表达显著高于空质粒 + HR 组($P < 0.05$)。与正常对照组相比,HR 组活细胞计数和细胞存活率显著降低,LDH 含量及细胞凋亡率显著升高,Bax、Bcl-2、Fas、活性 Caspase-3、8、9 表达显著上调,Bax 上调更明显,故 Bax/Bcl-2 升高(均 $P < 0.05$)。与 HR 组相比,ADM 质粒 + HR 组活细胞计数和细胞存活率显著升高,LDH 含量及细胞凋亡率显著降低,Bax、Fas、活性 Caspase-3、8、9 表达显著下调,Bcl-2 表达进一步上调,Bax/Bcl-2 降低(均 $P < 0.05$)。空质粒 + HR 组和 HR 组比较,上述各指标差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 ADM 在 NRK-52E 细胞中的高表达可以减轻 HR 诱导的细胞凋亡,其机制至少部分是通过抑制线粒体通路和死亡受体通路实现的。

【关键词】 肾上腺髓质素; 再灌注损伤; 细胞凋亡; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶

Effect of adrenomedullin on rat renal tubular epithelial cell apoptosis induced by hypoxia - reoxygenation and its mechanism SU Xiao-le, QIAO Xi, LI Rong-shan, WANG Yan-hong, LIU Xin-yan. Department of Nephrology, The Second Hospital, Shanxi Medical University, Shanxi Kidney Disease Institute, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: LI Rong-shan, Email: rongshanli@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of adrenomedullin on rat renal tubular epithelial cell line (NRK - 52E) apoptosis induced by hypoxia - reoxygenation (HR) injury and its mechanism. **Methods** NRK-52E cells were cultured and randomly allotted to the following 4 groups: control group, HR group, empty plasmid + HR group, ADM + HR group. NRK - 52E cells were transfected with pcDNA3.1 - myc - his B empty vector or pcDNA3.1 - ADM by transfection complex comprising optimal proportion of plasmid and Fugene HD reagents. Cells were counted by trypanblau and cell survival rate was computed. The concentration of lactate dehydrogenase (LDH) was detected by spectrophotometric method to evaluate cell vitality. The apoptotic rate of NRK-52E cells was measured by flow cytometry. The transfer efficiency was detected by immunocytochemistry. The mRNA

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2013.05.007

基金项目: 山西省高校科技研究开发项目(200811071)

作者单位: 030001 太原, 山西医科大学第二医院肾内科 山西省肾脏病研究所

通信作者: 李荣山, Email: rongshanli@yahoo.com.cn

expressions of ADM, Bax, Bcl-2 and Fas were determined by Semi-quantitative RT-PCR, and active caspase -3, 8, 9 protein expression were examined by Western blotting. **Results** Compared with control group, the expression of ADM significantly increased in HR group ($P < 0.05$). The expression of ADM significantly increased in ADM + HR group than that in empty plasmid + HR group. Compared with control group, in HR group, the living cell counts and cell survival rate significantly decreased; the LDH concentration in media, apoptotic rate and the levels of Bax, Bcl-2, Bax/Bcl-2, Fas, active Caspase -3, 8, 9 significantly increased (all $P < 0.05$). Compared with HR group, in ADM + HR group, the living cell counts and cell survival rate significantly increased; the LDH concentration in media, the cell apoptotic rate and the levels of Bax, Bax/Bcl-2, Fas, active Caspase-3,8,9 significantly decreased, while Bcl-2 was promoted (all $P < 0.05$). The above indexes had no differences between empty plasmid + HR group and HR group (all $P > 0.05$). **Conclusion** The increased expression of ADM can inhibit NRK-52E apoptosis induced by HR, and the mechanism might be achieved by inhibiting mitochondrial and death receptor-mediated apoptotic pathways.

【Key words】 Adrenomedullin; Reperfusion injury; Apoptosis; Caspase

急性肾损伤(AKI)是临床上常见的急、危、重症,有较高的发病率和病死率,缺血再灌注损伤(IRI)是其主要病因,有效防治肾脏 IRI 至关重要。IRI 诱导肾损伤的机制复杂,细胞凋亡是其主要机制之一^[1]。肾上腺髓质素(ADM)是降钙素基因相关肽及其超家族中的一员,能减轻心脏及肝脏 IRI,其机制与抑制心肌细胞及肝细胞凋亡有关^[2-3]。静脉注射 ADM 治疗急性心肌梗死的临床试验已经开始实施^[4]。肾脏是 ADM 的重要靶器官,研究显示 ADM 在肾脏 IRI 中起保护作用^[5-6],其机制是否与抑制细胞凋亡有关尚不清楚。本研究拟在细胞水平观察 ADM 对缺氧复氧(HR)诱导的 NRK-52E 细胞凋亡的影响,并探讨其机制。

材料和方法

1. 材料与试剂: NRK-52E 细胞株(上海生物细胞所), pcDNA3.1 - myc - his B 空质粒(大连 Takara), 大鼠 pcDNA3.1-ADM 真核表达质粒由本实验室前期制备^[7], Fugene HD 转染试剂盒(美国罗氏), ADM 兔抗大鼠多克隆抗体、即用型 SABC 试剂盒、DAB 显色剂(武汉博士德), RT-PCR 试剂盒(大连 Takara), 引物设计与合成(北京赛百盛), Caspases-3、8、9 兔抗大鼠多克隆抗体、小鼠抗大鼠 β -actin 单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG(美国 Santa Cruz), Trizol(美国 Invitrogen), LDH 测试盒(南京建成), ECL 试剂盒(美国 Pierce), BCA 试剂盒(江苏碧云天), 凋亡检测试剂盒(南京凯基)。

2. 细胞培养及细胞转染: NRK-52E 细胞于含 10%胎牛血清的 DMEM-F12 培养液中培养(37℃、5%CO₂、95%空气、饱和湿度的三气培养箱),待生长达 70%~80%融合时加入无血清培养基同步化 12 h, 然后进行转染。按说明书将 300 μ l 转染复合物(其中质粒 DNA 与 Fugene HD 转染试剂分别按 3 μ g:12 μ l 的比例混合)静置 15 min 后加入 25 cm² 的培养瓶,以含 10%胎牛血清的培养基孵育 48 h。

3. 实验分组及 HR 模型的建立: 将 NRK-52E 细胞随机分为 4 组: 正常对照组、HR 组、空质粒 + HR 组、ADM 质粒 + HR 组。正常对照组为常规体外培养的 NRK52-E 细胞, HR 组、空质粒 + HR 组和 ADM 质粒 + HR 组参照文献方法制备 HR 模型^[8]: 弃原培养液,换 N₂ 饱和 30 min 后的无氧液,置入 95% N₂ + 1% O₂ + 4% CO₂ 缺氧环境 1 h; 缺氧后换用含 10%胎牛血清的 DMEM-F12 培养液,置入 95%空气 + 5%CO₂ 复氧 1.5 h 后收集细胞。

4. 免疫细胞化学法测定转染效率: 在构建 HR 模型前,随机选取空质粒 + HR 组和 ADM 质粒 + HR 组的 NRK-52E 细胞,免疫细胞化学方法检测 ADM 表达。采用 SABC 法,六孔板内置无菌盖玻片爬片,按 SABC 试剂盒说明进行 ADM 免疫细胞化学染色,兔抗大鼠 ADM 一抗浓度为 1:100, DAB 显色,苏木素复染。采用 Image Pro Plus 图像分析软件,以平均吸光度(A)值表示蛋白质的相对表达量。

5. 锥虫蓝摄取法进行细胞计数并计算细胞存活率,分光光度法检测培养基中的 LDH 含量并评

价细胞活力:胰酶消化细胞,加入 0.4% 锥虫蓝溶液后进行活细胞计数。细胞存活率计算公式:细胞存活率(%) = 未染细胞总数 / (已染细胞总数 + 未染细胞总数) × 100%。收集培养液上清,按 LDH 试剂盒说明书配置反应液,置入分光光度仪以波长 440 nm 检测吸光度值,根据公式计算 LDH 含量 (U/L) = (测定管 A 值 - 空白管 A 值) / (标准管 A 值 - 空白管 A 值) × 标准管浓度 (2 μmol/L) × 1000 ml。

6. 流式细胞仪检测细胞凋亡率:0.25% 胰酶消化收集各组细胞,磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 2 次,将细胞重悬于 300 μl 结合缓冲液,分别加入 5 μl Annexin V 试剂和 PI 混匀,混匀后室温避光反应 15 min 后上机。

7. RT-PCR 法检测各组 NRK-52E 细胞 ADM、Bcl-2、Bax、Fas 的 mRNA 表达:用 Trizol 提取各组细胞总 RNA,紫外分光光度仪测定总 RNA 的质量,取 1 μg 进行反转录,分别进行 ADM、Bcl-2、Bax、Fas 的 PCR 扩增。ADM 上、下游引物分别为 5'-AAGAAGTGGAAGTGGGCT-3' 和 5'-TGGCTTGAAGACACCAGAGT-3',产物大小为 410 bp; Bcl-2 上、下游引物分别为 5'-ATGCCAAGGGGAAACACCAGAAT-3' 和 5'-CGGGCGTTCGGTGTCTCA-3',产物大小为 360 bp; Bax 上、下游引物分别为 5'-ATGGACGGGTCCGGGAGCA-3' 和 5'-TCAGCCCATCTTCTCCAGA-3',产物大小为 579 bp; Fas 上、下游引物分别为 5'-AAGTGGGCCCATTTTGCTGTCA-3' 和 5'-AATTGCCAAACCGGGGAGGATC-3',产物大小为 398 bp。以大鼠 GAPDH 为内参照,上、下游引物分别为 5'-AACGACCCCTTCATTGAC-3' 和 5'-TCCACGACATACTCAGCAC-3',产物大小为 191 bp。取扩增产物 5 μl 行 2% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色;Gel-Pro 图像分析系统对扩增产物条带进行吸光度扫描,mRNA 的相对表达量以目的基因与相应 GAPDH 的吸光度值比值进行半定量分析。

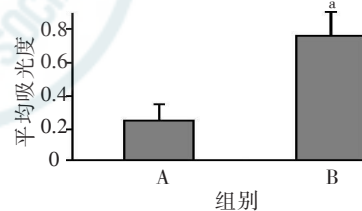
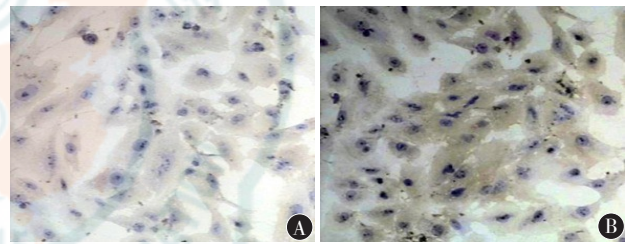
8. Western 印迹法检测活性 Caspase-3、8、9 蛋白质表达:提取各组细胞总蛋白质,BCA 法测定浓度,取 50 μg 蛋白质,100℃ 加热 5 min 变性,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,分别加入一抗(兔抗大鼠 Caspase-3、8、9 多克隆抗体,1:500)4℃ 过夜,洗膜,HRP 标记的对应二抗(1:1000)室温孵育 1 h, ECL 显影、扫描,利用 Gel-Pro 图像分析系统测定相对吸光度值,以目的

蛋白条带与 β-actin 蛋白条带吸光度的比值进行半定量分析。

9. 统计学处理:采用 SPSS 11.5 软件包进行统计学处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组资料比较用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. ADM 转染效率的检测:免疫细胞化学结果显示,空质粒 + HR 组 NRK-52E 细胞 ADM 呈阳性表达,位于肾小管上皮细胞胞质内;ADM 质粒 + HR 组 NRK-52E 细胞 ADM 呈强阳性,与空质粒 + HR 相比表达量显著上调 ($P < 0.05$),提示转染成功。见图 1。

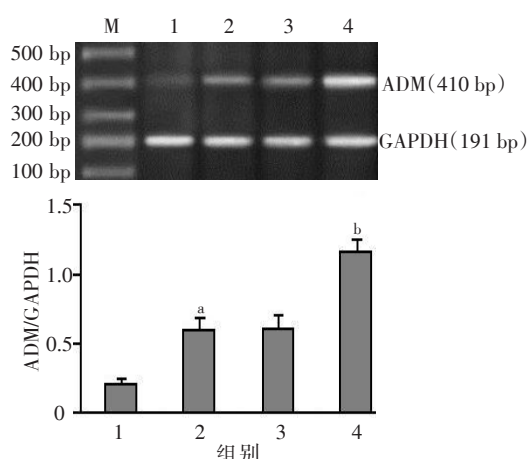


注: A: 空质粒 + HR 组; B: ADM 质粒 + HR 组; 与空质粒 + HR 组比较, * $P < 0.05$

图 1 ADM 转染效率鉴定(免疫细胞化学 ×250)

2. 各组 NRK-52E 细胞 ADM mRNA 表达: RT-PCR 结果显示,与正常对照组相比,HR 组 ADM 的 mRNA 表达显著上调 ($P < 0.05$);与 HR 组相比,ADM 质粒 + HR 组 ADM 的 mRNA 表达显著上调 ($P < 0.05$);空质粒 + HR 组与 HR 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 2。

3. ADM 对 HR 诱导的 NRK-52E 细胞活力的影响:与正常对照组相比,HR 组活细胞计数和细胞存活率显著降低 ($P < 0.05$),而 LDH 含量则显著升高 ($P < 0.05$);与 HR 组相比,ADM 质粒 + HR 组活细胞计数和细胞存活率显著升高 ($P < 0.05$),LDH 含量显著下降 ($P < 0.05$);空质粒 + HR 组与



注: M: 分子量标记; 1: 正常对照组; 2: HR 组; 3: 空质粒 + HR 组; 4: ADM 质粒 + HR 组; 与对照组比较, ^a*P* < 0.05; 与 HR 组比较, ^b*P* < 0.05

图 2 各组 NRK-52E 细胞 ADM mRNA 表达 (RT-PCR)

表 1 各组 NRK-52E 细胞计数、存活率及 LDH 含量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

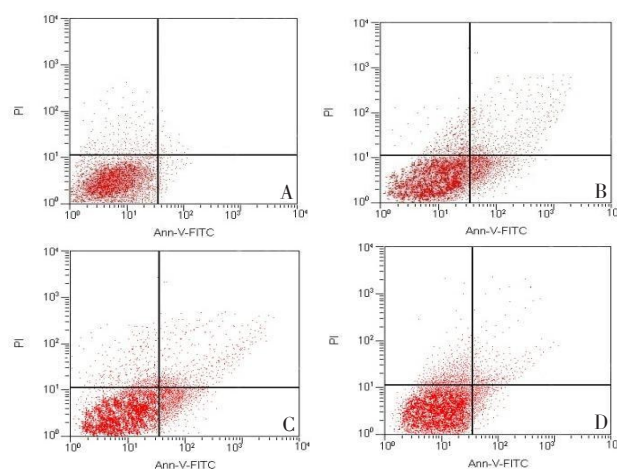
组别	细胞计数 ($\times 10^6/\text{ml}$)	细胞存活率 (%)	LDH 含量 (U/L)
正常对照组	4.83 \pm 0.19	98.45 \pm 0.38	693.77 \pm 73.45
HR 组	3.35 \pm 0.23 ^a	81.36 \pm 0.25 ^a	1513.29 \pm 331.56 ^a
空质粒 + HR 组	3.48 \pm 0.20	82.85 \pm 0.35	1485.31 \pm 339.47
ADM 质粒 + HR 组	4.48 \pm 0.35 ^b	95.58 \pm 0.46 ^b	967.28 \pm 139.58 ^b

注: 与正常对照组比较, ^a*P* < 0.05; 与 HR 组比较, ^b*P* < 0.05

HR 组之间差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。见表 1。

4. ADM 对 HR 诱导的 NRK-52E 细胞凋亡的影响: Annexin V-PI 染色结合流式细胞仪检测结果显示, 与正常对照组相比, HR 组细胞凋亡率显著增加 (12.71% \pm 1.38% 比 1.39% \pm 0.68%, *P* < 0.05); 与 HR 组相比, ADM 质粒 + HR 组细胞凋亡率显著降低 (3.84% \pm 0.97% 比 12.71% \pm 1.38%, *P* < 0.05); 空质粒 + HR 组和 HR 组之间差异无统计学意义 (11.96% \pm 1.04% 比 12.71% \pm 1.38%, *P* > 0.05)。见图 3。

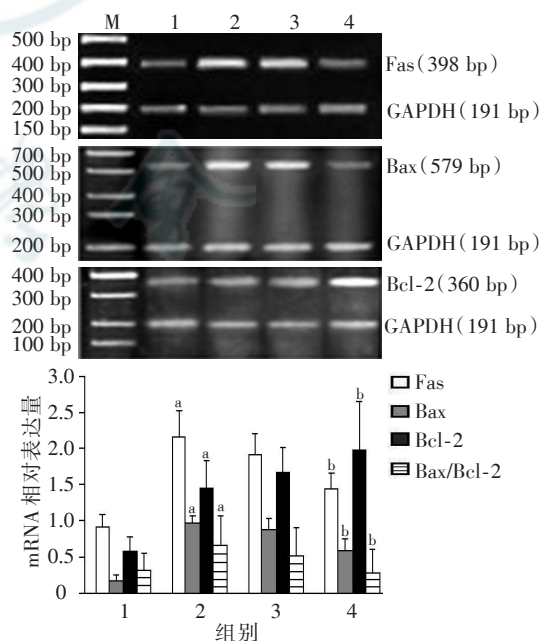
5. 各组 NRK-52E 细胞 Bcl-2、Bax 和 Fas mRNA 表达: 与正常对照组相比, HR 组 Bcl-2、Bax 和 Fas mRNA 表达均显著增加 (均 *P* < 0.05), Bax 的增加更明显, 故 Bax/Bcl-2 升高 (*P* < 0.05); 与 HR 组相比, ADM 质粒 + HR 组 Bax 和 Fas mRNA 表达显著减少 (均 *P* < 0.05), Bcl-2 的表达进一步上调, Bax/Bcl-2 下降 (*P* < 0.05); 空质粒 + HR 组和 HR 组之间差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。见图 4。



注: A: 正常对照组; B: HR 组; C: 空质粒 + HR 组; D: ADM 质粒 + HR 组

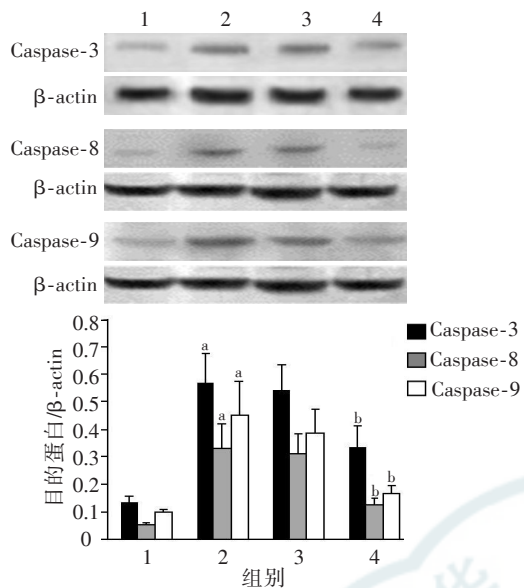
图 3 ADM 对 HR 诱导的 NRK-52E 细胞凋亡的影响 (流式细胞术)

6. 各组 NRK-52E 细胞 Caspase-3、8、9 活性蛋白表达: 与正常对照组相比, HR 组 Caspase-3、8、9 活性蛋白表达均显著上调 (均 *P* < 0.05); 与 HR 组相比, ADM 质粒 + HR 组 Caspase-3、8、9 活性蛋白表达均显著下调 (均 *P* < 0.05)。空质粒 + HR 组和 HR 组之间差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。见图 5。



注: 1: 正常对照组; 2: HR 组; 3: 空质粒 + HR 组; 4: ADM 质粒 + HR 组; 与正常对照组比较, ^a*P* < 0.05; 与 HR 组比较, ^b*P* < 0.05

图 4 各组 NRK-52E 细胞 Bcl-2、Bax 和 Fas mRNA 表达 (RT-PCR)



注: 1: 正常对照组; 2: HR组; 3: 空质粒 + HR组; 4: ADM质粒 + HR组; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与HR组比较, ^b $P < 0.05$

图5 各组NRK-52E细胞Caspase-3、8、9活性蛋白质表达(Western印迹)

讨论

众所周知,肾脏血流量占心输出量的1/4,是全身对IRI最敏感的器官之一,研究并寻求有效的防治IRI手段是目前肾脏病领域研究的热点和亟待解决的问题。导致肾脏IRI的主要机制包括肾小管上皮细胞凋亡、活性氧代谢产物的积聚、自由基钙超载^[9]、炎性介质^[10]、内皮细胞功能紊乱及能量代谢障碍等。大量研究均表明抑制细胞凋亡,可以减轻肾脏IRI,保护肾功能^[11-12]。ADM和垂体中叶素(intermedin, IMD)同为降钙素基因家族的小分子活性多肽。本实验室在前期研究发现IMD可通过抑制肾脏IRI中细胞凋亡从而减轻肾脏IRI^[13]。在肾脏IRI中,ADM的作用较明确,但机制尚不清楚,值得深入研究。

本研究显示, NRK-52E细胞给予缺氧1h复氧1.5h后,细胞受损明显,悬浮细胞增加。HR组活细胞数及细胞存活率较正常对照组显著下降,培养基中的LDH含量及细胞凋亡率均明显高于正常对照组,HR对细胞造成损伤,说明模型制作成功。我们采用Fugene HD转染试剂,将ADM真核质粒转染至NRK-52E细胞,经免疫细胞化学法检测转染后ADM的蛋白质表达及RT-PCR法检测各组ADM的mRNA表达,证实ADM的表达在

ADM质粒 + HR组较空质粒 + HR组显著上调,转染成功。

细胞凋亡是机体细胞在正常生理或病理状态下发生的一种自发的、程序化的死亡过程,它的发生受到机体的严密调控。细胞凋亡的分子生物学机制主要包括Caspase依赖和非Caspase依赖,目前认为肾脏IRI中细胞凋亡主要通过Caspase依赖的途径,它又可分为线粒体通路和死亡受体通路。在线粒体通路中,细胞在 Ca^{2+} 超载、NO、氧自由基大量形成等因素的刺激下,线粒体膜通透性转运孔开放,使细胞色素c自线粒体释放。细胞色素c与凋亡蛋白酶激活因子1结合,进而与pro-Caspase-9形成凋亡小体,导致Caspase-9活化,进一步激活效应物Caspase-3,引起凋亡。Bcl-2家族是线粒体通路的关键调节因子^[14],其抗凋亡和促凋亡成员协同作用,发挥着细胞凋亡开关的作用。Bcl-2具有抗凋亡作用。Bax是促凋亡基因,可与Bcl-2形成异二聚体使Bcl-2失活。Bax/Bcl-2比值对于细胞受刺激后是否进入凋亡状态有重要意义,其比值增高决定了细胞凋亡进入执行期,将通过细胞内信号转导途径导致细胞凋亡,相反比值降低将抑制凋亡的发生^[15]。在死亡受体通路中,需要死亡受体与其配体结合(如Fas与FasL),使死亡结构域和死亡效应结构域一起形成死亡诱导信号复合物,激活Caspase-8,进一步激活Caspase-3诱导凋亡。活性Caspase-3是线粒体通路和死亡受体通路共同的终末因子。

本研究结果显示, NRK-52E细胞经过HR后可导致细胞活力下降,细胞凋亡比例增加,促凋亡基因Bax,抑制凋亡基因Bcl-2及死亡受体Fas的表达上调, Bax/Bcl-2升高,同时活性Caspase-3、8、9的表达明显上调,证实在HR时有细胞凋亡现象存在,线粒体通路和死亡受体通路可能均参与发生。同时我们观察到在ADM质粒 + HR组NRK-52E活细胞数及细胞存活率均较HR组显著增加,细胞凋亡率下降,提示抑制凋亡的现象发生;线粒体通路中的Bax、活性Caspase-9的表达下调,而Bcl-2的表达呈现上调趋势, Bax/Bcl-2降低;死亡受体通路中的死亡受体Fas及活性Caspase-8的表达下调;而活性Caspase-3作为两条通路共同的终末因子在ADM质粒 + HR组的表达呈现显著下降。提示ADM的高表达可以抑制肾小管上皮细胞凋亡的线粒体通路和死亡受体通

路。

综上所述,HR 可导致 NRK-52E 细胞凋亡,线粒体通路和死亡受体通路可能均参与了其发生;ADM 高表达可以减轻 HR 诱导的 NRK-52E 细胞凋亡,其机制至少部分是通过抑制线粒体通路和死亡受体通路实现的。

参 考 文 献

- [1] Jassem W, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury in organ transplantation. *Kindney Int*, 2004, 66: 514-517.
- [2] Wang SM, Yang WL. Circulating hormone adrenomedullin and its binding protein protect neural cells from hypoxia-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1790: 361-367.
- [3] Yang J, Wu R, Qiang X, et al. Human adrenomedullin and its binding protein attenuate organ injury and reduce mortality after hepatic ischemia-reperfusion. *Ann Surg*, 2009, 249: 310-317.
- [4] Kataoka Y, Miyazaki S, Yasuda S, et al. The first clinical pilot study of intravenous adrenomedullin administration in patients with acute myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2010, 56: 413-419.
- [5] Takei Y, Inoue K, Ogoshi M, et al. Identification of novel adrenomedullin in mammals: a potent cardiovascular and renal regulator. *FEBS Lett*, 2004, 556: 53-58.
- [6] Shah KG, Rajan D, Jacob A, et al. Attenuation of renal ischemia and reperfusion injury by human adrenomedullin and its binding protein. *J Surg Res*, 2010, 163: 110-117.
- [7] 乔晔, 王利华, 李荣山, 等. 肾上腺髓质素真核表达质粒的构建及其在大鼠近端肾小管上皮细胞中的表达. *山西医科大学学报*, 2007, 38: 899-902.
- [8] Basnakian AG, Ueda N, Hong X, et al. Ceramide synthase is essential for endonuclease-mediated death of renal tubular epithelial cells induced by hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 288: F308-F314.
- [9] Rubinstein I, Abassi Z, Milman F, et al. Hyperbaric oxygen treatment improves GFR in rats with ischemia/reperfusion renal injury: a possible role for the antioxidant/oxidant balance in the ischemic kidney. *Nephrol Dial Transplant*, 2009, 24: 428-436.
- [10] Domanski L, Pawlik A, Safranow K, et al. Circulating adhesion molecules and purine nucleotides during kidney allograft reperfusion. *Transplant Proc*, 2009, 41: 40-43.
- [11] Yang B, Jain S, Ashra SY, et al. Apoptosis and caspase-2 in longterm renal ischemia/reperfusion injury in rats and divergent effects of immunosuppressants. *Transplantation*, 2006, 81: 1442-1450.
- [12] Juan SH, Chen CH, Hsu YH, et al. Tetramethylpyrazine protects rat renal tubular cell apoptosis induced by gentamicin. *Nephrol Dial Transplant*, 2007, 22: 732-739.
- [13] 刘新艳, 刘兴花, 李荣山, 等. 垂体中叶素对肾脏缺血再灌注大鼠肾小管上皮细胞凋亡的影响及其机制. *中华肾脏病杂志*, 2011, 27: 29-33.
- [14] Jamil S, Wang SW, Bondy L, et al. Prevention of cytokine withdrawal-induced apoptosis by Mcl-1 requires interaction between Mcl-1 and Bim. *Biochem Cell Biol*, 2010, 88: 809-818.
- [15] Yang B, Johnson GL, Thomas GL, et al. A shift in the Bax/Bcl-2 balance may activate caspase-3 and modulate apoptosis in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int*, 2002, 62: 1301-1313.

(收稿日期:2013-02-17)

(本文编辑:王欣)

· 消息 ·

中华医学会系列杂志网上在线订阅通知

为加强中华医学会系列杂志整体品牌宣传,扩大中华医学会系列杂志的影响力,做好期刊征订工作,开辟新的发行征订渠道,方便广大读者订阅,中华医学会杂志社在中华医学网上搭建了“中华医学会系列杂志网上在线征订在线支付平台”,现已正式开通。在线订阅不仅改变了原有单一的邮局征订渠道,而且较传统邮局征订具有更大的优势:使期刊征订工作不再是阶段性的,可以实现全年征订;同时网上订阅减少了订阅环节,节约了时间和成本,使杂志订阅更加便捷。欢迎广大读者网上在线订阅中华医学会系列杂志。订阅办法:请登陆中华医学网 <http://www.medline.org.cn/>, 点击“在线订阅”或登陆 <http://ebook.medline.org.cn/> 进行在线订阅和在线支付。

联系电话:010-85158339、85158299 传真:010-85158391

电子邮件地址:info@cma.org.cn

中华医学会杂志社