文章编号:1000-5404(2008)02-0093-05

论著

$VEGF_{165}$基因转染EPCs移植对大鼠阿霉素肾病组织学的影响

赵洪雯[1],余荣杰[1],彭侃夫[1],刘 宏[1],吴雄飞[1],贺伟峰[2],张晓蓉[2] (第三军医大学西南医院:[1]肾科,[2]全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,疾病蛋白质组学重庆市市级重点实验室,重庆 400038)

摘 要:**目的** 构建含血管内皮生长因子165基因的重组腺病毒(Ad-$VEGF_{165}$),转染血管内皮祖细胞(EPCs)后,观察其对阿霉素肾病大鼠肾脏组织学的影响。**方法** 用细菌内同源重组法构建含$VEGF_{165}$基因的重组腺病毒Ad-$VEGF_{165}$,通过PCR和Western blot鉴定所构建的腺病毒。贴壁法体外培养获得大鼠骨髓来源的EPCs,Ad-$VEGF_{165}$体外转染EPCs,检测转染后目的基因的蛋白表达。大鼠阿霉素肾病模型形成过程中,尾静脉注射转染Ad-$VEGF_{165}$的EPCs,在第16周时观察肾脏组织学变化。**结果** PCR和Western blot证实构建的重组腺病毒含有目的基因,滴度为1.4×10^{10} PFU/ml;培养第6天的EPCs用于Ad-$VEGF_{165}$转染,转染后24 h,培养上清中VEGF蛋白表达较对照组和转染前增加。转染了$VEGF_{165}$基因的EPCs移植后第12周(切肾术后16周),转染组的肾小球硬化和肾小管间质纤维化的程度明显较肾病组轻。**结论** 转染了$VEGF_{165}$基因的EPCs可以减轻阿霉素肾病的肾小球和肾小管的损伤程度,为VEGF在慢性肾脏病治疗提供了实验基础。

关键词:血管内皮生长因子;腺病毒;内皮祖细胞;阿霉素;肾病
中图法分类号:R329;R394.2;R692.02 **文献标识码**:A

Amelioration of Adriamycin nephropathy by transplanting endothelial progenitor cells transfected with Ad-VEGF165 gene

ZHAO Hong-wen[1], YU Rong-jie[1], PENG Kan-fu[1], LIU Hong[1], WU Xiong-fei[1], HE Wei-feng[2], ZHANG Xiao-rong[2] ([1]Department of Kidney, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Chongqing Key Laboratory for Proteomics of Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct the recombinant adenovirus of vascular endothelial growth factor 165 (Ad-$VEGF_{165}$) and observe the effects of endothelial progenitor cells (EPCs) transfected with Ad-$VEGF_{165}$ gene on ameliorating renal damages induced with Adriamycin. Methods Ad-$VEGF_{165}$ was identified with polymerase chain reaction (PCR) and Western blot. EPCs derived from rat bone marrow were obtained by adherent culture for 6 days and transfected with Ad-$VEGF_{165}$, then injected into tail vein at the early stage of Adriamycin induced renal disease. Results PCR and Western blot indicated that the recombinant adenovirus contained the inserted $VEGF_{165}$. The titer of the purified Ad-$VEGF_{165}$ was 1.4×10^{10} pfu/ml. After transfection, the expression of VEGF protein was significantly higher than that of control and untransfected EPCs. The pathological changes were less in $VEGF_{165}$ transfecting group than that in untransfecting group at the 12^{th} week, including glomerular sclerosis and tubulointerstitial fibrosis induced by Adriamycin after transplantation. Conclusion The Ad-$VEGF_{165}$ effectively mediates the target gene expression in cultured EPCs and ameliorates renal damages. But the adverse effect of VEGF to renal function needs further study.

Key words: vascular endothelial growth factor; adenovirus; endothelial progenitor cells; Adriamycin; nephropathy

1997年Asahara等[1]首次分离并证实人类出生后的外周循环血液中存在能分化成为血管内皮细胞(endothelial cell, EC)的血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs),能在缺血组织或器官中发挥其促进血管新生作用。其主要调节因子为血管内皮生长因

作者简介:赵洪雯,女,北京市昌平区人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事慢性肾脏病和肾移植方面的研究。电话:(023)68765335,E-mail:zhaohongwen0212@yahoo.com.cn
通信作者:吴雄飞,电话:(023)68754188,E-mail:wuxfei@126.com
收稿日期:2007-09-20;修回日期:2007-12-14

子(vascular endothelial growth factors, VEGF)。在VEGF家族中,含量最多、作用最强的是$VEGF_{165}$。新近的研究显示,肾动脉内给予体外扩增的EPCs能够减轻急性期抗体诱导的肾小球肾炎模型肾小球EC和足细胞损伤程度[2],而且慢性肾脏病时存在EPCs功能的不全[3],VEGF合成和分泌不足[4],导致肾脏病的进展。本实验通过观察腺病毒介导$VEGF_{165}$基因体外转染EPCs,进而将EPCs移植到阿霉素肾病大鼠体内,观察其对肾脏组织学的影响,为探索VEGF基因治疗慢性肾脏病、延缓慢性化进展提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

穿梭质粒pAdtrack-CMV[整合有绿色荧光蛋白(EGFP)基因]、腺病毒骨架质粒pAdEasy-1、HEK293细胞、DH5α及大肠杆菌BJ5183均由西南医院全军烧伤研究所贺伟峰博士提供。携带目的片段pcDNA3.1/$VEGF_{165}$质粒由第四军医大学西京医院舒茂国博士惠赠。T_4 DNA连接酶、限制性内切酶及DNA回收试剂盒(TaKaRa公司),质粒小量DNA提取盒(Omega公司)、Lipofectamine 2000(Invitrogen公司)、PCR试剂盒(Promega公司)、生物素标记的鼠抗人VEGF单抗(Santa Cruz公司)。VEGF引物序列:P1:5′-ATGACGAGGGCCTGGAGTGT-3′,P2:5′-ACATTTACACGTCTGCGGATCT-3′(上海生工合成)。兔抗Von Willebrand Factor(vWF)多克隆抗体和羊抗血管内皮生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor-2,VEGFR-2)多克隆抗体(Abcam公司,英国)、DiI标记的乙酰低密度脂蛋白(DiI-acLDL)(Molecular probe公司,美国)、荧光素标记的荆豆凝集素-1(FITC-UEA-1)(Vector公司,美国)、阿霉素(注射用盐酸多柔比星、10 mg粉剂(浙江海正药业股份有限公司,批号:041001)。HX-52荧光显微镜(Olympus公司)、紫外/可见光成像系统(上海复旦大学),LSM 510 META型激光共聚焦显微镜(ZEISS公司,德国)。SD雌雄性大鼠18只,体质量(150±10)g(第三军医大学实验动物中心)。

1.2 方法

1.2.1 $VEGF_{165}$重组腺病毒载体的构建及鉴定 *Xba* Ⅰ和*Hind* Ⅲ双酶切pcDNA3.1/$VEGF_{165}$质粒,获得$VEGF_{165}$基因片段,与pAdTrack-巨细胞病毒(CMV)的*Kpn* Ⅰ+*Hind* Ⅲ双酶切产物用T_4 DNA连接酶连接,形成穿梭质粒pAdTrack-CMV-$VEGF_{165}$,*Bgl* Ⅱ+*Xba* Ⅰ双酶切鉴定、测序正确后,*Pme* Ⅰ酶切线性化后与pAdEasy-1混匀,转化感受态细菌BJ5183,挑选阳性克隆,进一步*Pac* Ⅰ酶切鉴定正确后命名为pAd-$VEGF_{165}$,在293细胞大量扩增。病毒载体滴度根据文献[5],按pAdEasy-1系统说明书进行,腺病毒滴度=稀释倍数×稀释度$^{(阳性细胞孔数-4)/8}$。重组腺病毒Ad-$VEGF_{165}$转染293细胞后PCR和Western blot鉴定:PCR反应条件为95 ℃ 2 min,94 ℃ 30 s,64 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,28个循环,最后72 ℃ 3 min;提取Ad-$VEGF_{165}$感染293细胞和感染含EGFP的重组腺病毒(Ad-EGFP)的293细胞的总蛋白,Bradford法定量,变性后行SDS-PAGE电泳,半干法转膜,条件为0.25 mA/cm^2恒流,30 min。大鼠抗人VEGF单抗、HRP标记的抗大鼠IgG先后杂交反应后DAB显色。

1.2.2 Ad-$VEGF_{165}$转染EPCs 按文献[6]的方法获得大鼠骨髓来源EPCs。第6天贴壁细胞,vWF和VEGFR-2免疫细胞化学染色均阳性,同时DiI-acLDL及FITC-UEA-1免疫双荧光阳性,证实细胞为正在分化的EPCs。在24孔板中进行转染,24 h后荧光显微镜观察细胞生长情况,在转染后1、4、7 d,Western blot检测培养上清中VEGF的蛋白表达情况。对照组为转染Ad-EGFP和转染前的培养上清蛋白。

1.2.3 Ad-$VEGF_{165}$转染EPCs移植对阿霉素肾病组织学的影响 雌性SD大鼠分为正常对照组(对照组)、阿霉素肾病组(肾病组)和转染了Ad-$VEGF_{165}$的EPCs移植组(转染组)。阿霉素肾病模型按文献[7]方法制作:切除右肾,术后1、2周后分别尾静脉注射阿霉素5 mg/kg和3 mg/kg。对照组假手术并在2个时间点注射等量生理盐水。于切肾后第3周3组行5 Gy的全身X线照射,转染组尾静脉注射移植Ad-$VEGF_{165}$转染24 h的EPCs 1×10^6(重悬于1 ml生理盐水),对照组和肾病组注射1 ml生理盐水。在第16周即移植后12周,取血测血肌酐(Scr)和血清白蛋白(ALB),取肾脏固定后石蜡切片HE、PAS和Masson染色,光镜下观察肾小球和肾小管间质组织学改变。

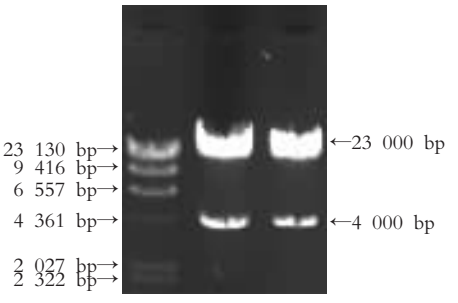
1.3 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,应用SPSS 11.0软件进行t检验。

2 结果

2.1 Ad-$VEGF_{165}$的构建

pcDNA3.1/$VEGF_{165}$质粒和pAdTrack质粒双酶切后,分别得到576 bp的特征性$VEGF_{165}$基因条带和9.2 kb的pAdTrack片段,DNA测序证实成功获得$VEGF_{165}$ cDNA。双酶切所得的$VEGF_{165}$基因片段定向插入pAdTrack-CMV,形成pAdTrack-CMV-$VEGF_{165}$穿梭质粒,经*Xba* Ⅰ和*Hind* Ⅲ酶切鉴定,得到9.2 kb和576 bp两个片段,证明插入片段正确。将pAdTrack-CMV-$VEGF_{165}$质粒经*Pme* Ⅰ酶切线性化后,电转入BJ5138细菌中,与其内的腺病毒骨架质粒pAdEasy-1在细菌内同源重组。经*Pac* Ⅰ酶切后,可见4 000 bp和23 000 bp的电泳条带各1条(图1),证明同源重组成功,得到最终所需要的腺病毒重组质粒即AdEasy-$VEGF_{165}$。

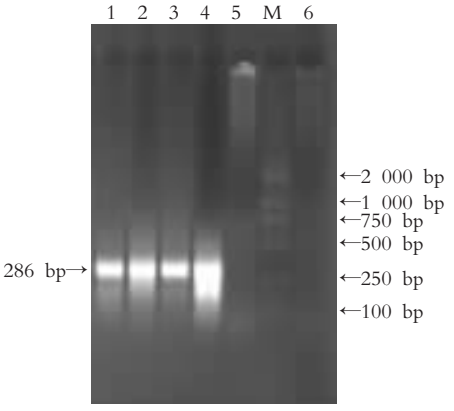


M1:λDNA/*Hind* Ⅲ标准;1和2:pAdEasy-$VEGF_{165}$经*Pac* Ⅰ酶切可见23 000 bp和4 000 bp片段

图1 pAdEasy-$VEGF_{165}$同源重组腺病毒基因组质粒鉴定

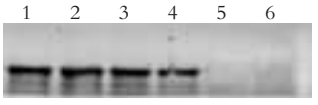
2.2　AdEasy-$VEGF_{165}$ 重组腺病毒感染 293 细胞的鉴定

脂质体包裹 AdEasy-$VEGF_{165}$ 同源重组腺病毒基因组质粒转染 293 细胞 1～2 d 后，光镜下观察到空斑形成，细胞变圆、肿胀、脱壁，细胞核变大等病变。荧光显微镜下有 EGFP 表达且逐渐增多。PCR 检测显示 pAdEasy-$VEGF_{165}$ 转染的 293 细胞组有 1 条 286 bp 的条带，而 pAd-EGFP 转染组相应位置无特异性条带（图 2），表明该条带系 pAdEasy-$VEGF_{165}$ 感染 293 细胞后产生的 $VEGF_{165}$。Western blot 检测显示，pAdEasy-$VEGF_{165}$ 感染 293 细胞组有 1 条能与大鼠抗人 VEGF 单抗特异性结合的蛋白免疫印记，而 pAd-GFP 组相应位置无特异性条带（图 3），表明该蛋白条带为 AdEasy-$VEGF_{165}$ 重组腺病毒感染 293 细胞后产生的 $VEGF_{165}$。病毒滴度为 1.4×10^{10} PFU/ml。



M：DNA 标准（DL 2000）；1～4：转染 Ad-$VEGF_{165}$ 组；5、6：转染 Ad-EGFP 组

图 2　Ad-$VEGF_{165}$ 转染 293 细胞的 PCR 鉴定

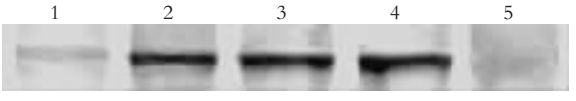


1～4：转染 Ad-VEGF165 组；5、6：转染 Ad-EGFP 组

图 3　Ad-$VEGF_{165}$ 转染 293 细胞的 Western blot 鉴定

2.3　Ad-$VEGF_{165}$ 转染 EPCs 的结果

贴壁培养第 6 天，细胞可以表达 vWF 和 VEGFR-2，且可以内吞 DiI-acLDL 显示红色荧光，并能够与 FITC-UEA-1 结合显示绿色荧光，重叠后为橙黄色即免疫双荧光阳性，证实为正在分化的 EPCs，与文献[6]一致。Ad-$VEGF_{165}$ 转染 EPCs 后 24 h，细胞中有 EGFP 表达，细胞未出现脱壁、变圆等病变。Western blot 测定转染后 1、4、7 d 培养上清中 VEGF 的蛋白表达情况显示，转染后 24 h VEGF 蛋白含量即开始明显升高，显著高于转染前和转染 Ad-GFP 组（图 5），证实转染后 VEGF 蛋白表达显著增加。



1：转染前；2～4：转染 Ad-VEGF 组；5：转染 Ad-GFP 组

图 4　Ad-$VEGF_{165}$ 转染 EPCs 后培养上清中 VEGF 蛋白表达情况

2.4　血清肌酐和白蛋白的变化

16 周时转染组 Scr 显著低于肾病组，但仍显著高于对照组（$P<0.01$）。见表 1。

表 1　第 16 周时各组大鼠 Scr 和 ALB 情况（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	Scr（μmol/L）	ALB（g/L）
对照组	44.8±4.5	41.4±2.5
肾病组	92.6±10.0[a]	27.3±3.3[a]
转染组	54.4±4.2[ab]	37.2±2.7[ab]

a：$P<0.01$，与对照组比较，b：$P<0.01$，与肾病组比较

2.5　肾脏组织学变化

16 周时对照组大鼠肾脏无明显变化。肾病组可见局灶节段性肾小球硬化（focal segmental glomerulosclerosis，FSGS），系膜区轻度增宽，基质中度至重度增生并呈弥漫性分布，部分肾小球球囊壁明显增厚，肾小球毛细血管丛与囊壁粘连，硬化区毛细血管腔狭小，肾小管基膜增厚，肾小管多灶状萎缩和片状扩张，管腔中可见蛋白管型，间质内有明显淋巴细胞浸润，并有轻到中度纤维化（图 5）。转染组大鼠肾脏病理改变较肾病组明显减轻，肾小球包曼氏囊增厚并部分球襻粘连，毛细血管襻开放好，无明显硬化，肾小管改变轻（图 6）。

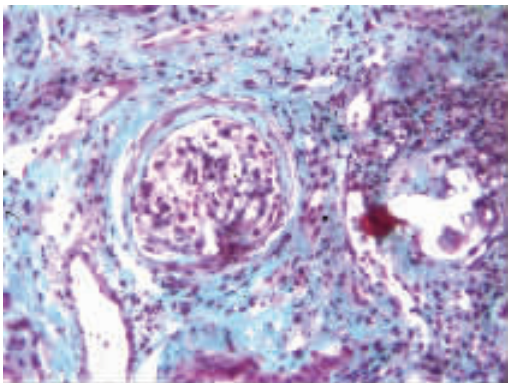


图 5　16 周时肾病组肾组织呈局灶节段性肾小球硬化改变（Masson×400）

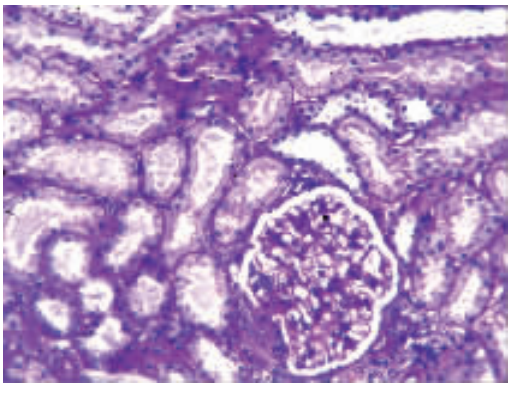


图 6　16 周时转染组肾组织病理改变较轻微　（PAS×400）

3　讨论

3.1　基因转染载体的选择

重组腺病毒载体既能感染处于分裂增殖期的细胞，又能感染静止期的细胞，如干、祖细胞，而且缺陷型重组腺病毒载体由于不整合入细胞染色体基因组，从而毒性低、安全性高，同时还具有病毒滴度高和装载容量大等特点，已被美国 FDA 批准作为基因治疗载体应

用于临床试验。所以本研究选择重组腺病毒载体来表达目的基因 $VEGF_{165}$，希望通过其高感染能力，直接将 $VEGF_{165}$ 表达单位转染 EPCs，并导入慢性肾脏病大鼠体内，使其在体内持续合成和分泌，以期达到缓解病情的作用。

3.2 EPCs 与 VEGF 及其基因治疗

近年来，随着 EPCs 的发现使人们对于血管新生的机制有了更深入的了解，而治疗性血管形成和治疗性血管生成两个概念的提出则为心血管、缺血肢体、缺血大脑等器官及组织缺血性疾病的治疗、提高组织移植存活率和存活质量提供了新的思路。VEGF 能诱导血管生成、增加血管通透性及维持血管功能，其家族的 5 种亚型中 $VEGF_{165}$ 是最有代表性、作用最强的亚型[8]。但是，由于 $VEGF_{165}$ 的生物半衰期很短，仅 30 ~ 40 min，费用高，局部给药困难等缺点导致其难以推广应用。目前分子生物学、基因转染等技术的进展，VEGF 基因治疗促进缺血组织血管新生的研究已取得了较大的进展[9]，这些都为本实验的深入进行提供了理论依据。本实验通过腺病毒介导，将 $VEGF_{165}$ 基因转染到体外培养第 6 天的早期 EPCs[10] 后观察到，培养上清中 VEGF 蛋白表达显著高于空载体组（Ad-EGFP）和转染前 EPCs 上清，提示转染后的 EPCs 可以合成和分泌大量的 VEGF 蛋白，与实验的预期结果相符，也为进一步将其应用于延缓慢性肾脏病进展的研究奠定了实验基础。

3.3 Ad-$VEGF_{165}$ 移植对阿霉素诱导的 FSGS 肾组织学的影响

FSGS 发病率高且有逐渐增加的趋势，治疗以免疫抑制和肾素血管紧张素系统（renin angiotensin system，RAS）阻断为主，缺乏对受损肾小球修复再生性治疗，常不能有效控制病情进展，肾功能进行性恶化，最终导致慢性肾衰竭（chronic renal failure，CRF）[11]。因此如何从根本上延缓甚至逆转 FSGS 进展成为肾脏病治疗的热点与难点，探索新的治疗手段解决这一难题是当前国内外肾病界努力的方向。最近的研究认为，FSGS 发病的始动因素足细胞损伤，其本质是一种由不同病因引起的肾小球足细胞病：①肾小球足细胞的损伤和剥脱，使肾小球基底膜裸露，是 FSGS 的常见和早期病变，进而导致球囊粘连和硬化；②损伤和剥脱的肾小球足细胞可以转分化为巨噬细胞，并产生转化生长因子 β（transforming growth factor β，TGFβ）等多种促纤维化和硬化的细胞因子，促进并加速肾小球硬化、肾小管萎缩和间质纤维化；③足细胞损伤使其丧失其生理功能，如合成和分泌血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）明显减少。正常情况下 VEGF 在足细胞合成，以旁分泌的形式作用于临近 EC 表面的 VEGF 受体，是维持毛细血管袢完整和 EC 增殖的必要条件。足细胞损伤导致 VEGF 合成和分泌不足，肾小球毛细血管袢的正常结构和功能无法维持；同时由于 VEGF 在调整肾脏微血管变化中也起重要作用，VEGF 不足也可导致肾间质和肾小管周微血管减少，形成肾脏局部缺血缺氧状态，引起并加速肾小管萎缩和肾间质的纤维化。局部的缺血缺氧状态以及肾小管萎缩和间质纤维化反之又引起和加重肾小球硬化，并形成恶性循环，最终导致 CRF[12]。由于肾小球足细胞损伤 VEGF 合成和分泌不足，可以导致肾小球其他固有细胞损伤如 EC 损伤的修复障碍，VEGF 受体表达下调，使肾小球毛细血管袢结构维持更加困难，这种足细胞和 EC 损伤的相互作用形成瀑布效应，一旦启动，很难自行终止。所以，我们推测更新与修复足细胞、恢复 VEGF 合成与分泌、重建 EC 细胞的正常功能，可能是延缓或阻断 FSGS 进展的关键。

国外研究显示，慢性肾功能不全时存在内皮祖细胞（endothelial progenitor cells，EPCs）功能不全，无法正常修复受损的肾小球 EC 和小管间质血管的 EC[3]，而肾动脉内给予体外培养的骨髓单个核细胞获得的 EPCs，可以降低抗体诱导的 EC、足细胞损伤并减轻系膜细胞活化[2]。这些研究结果提示 FSGS 与 EPCs、VEGF 关系密切。VEGF 是肾小球和肾小管以及 EC 增殖的必要条件，肾小球毛细血管修复过程中，下调 VEGF 会导致肾小球硬化和肾小管间质纤维化的发生[4]，由此我们设想，EPCs 和 VEGF 可能对 FSGS 时足细胞和 EC 及其他肾小球固有细胞损伤有修复和更新作用，进而可能成为延缓 FSGS 进展的有效手段。随着日益成熟的分离培养、诱导和扩增技术，EPCs 可以相对容易地从外周血或骨髓中获得，结合近年基因工程技术的迅速发展及在临床不同领域的应用，为证实我们这一设想提供了可实施的技术手段。

本研究采用的阿霉素肾病诱导的 FSGS 模型[7,13]，即单侧肾切除后分次注射阿霉素，如果不给予任何干预措施，动物将在肾切除和注射阿霉素后 12 ~ 16 周发展为 FSGS，是目前研究人类 FSGS 的常用模型。在本实验中，切肾后 16 周肾病组表现为局灶节段性肾小球硬化，系膜区轻度增宽，基质中度至重度增生并呈弥漫性分布，部分肾小球球囊壁明显增厚，肾小球毛细血管丛与囊壁粘连，硬化区毛细血管腔狭小，肾小管基膜增厚，肾小管多灶状萎缩和片状扩张，管腔中可见蛋白管型，间质内有明显淋巴细胞浸润，并有轻到中

度纤维化，证实造模成功，与文献[7，13]报道一致；而转染组在 EPCs 移植后 12 周，肾脏组织病理学改变明显较肾病组轻，仅表现为肾小球包曼氏囊增厚和部分球襻粘连，毛细血管襻开放较好，肾小球无明显硬化，肾小管改变轻微；同时在转染组血清肌酐显著低于肾病组，提示在阿霉素诱导的 FSGS 进展过程中尽早移植 $VEGF_{165}$基因转染的 EPCs 可以改善肾功能，显著减轻阿霉素诱导的 FSGS 的病理改变，延缓其慢性化进展。分析 VEGF 转染 EPCs 后的有益作用可能是两方面的，即 EPCs 的修复足细胞和 EC，甚至是系膜细胞损伤，另一方面是转染了 $VEGF_{165}$的 EPCs 可以持续合成分泌 $VEGF_{165}$，减轻足细胞损伤后 VEGF 的不足。这与其他慢性进展性肾病模型（如 5/6 肾切除大鼠）补充外源性 VECF 可以促进毛细血管修复，减轻肾脏纤维化，改善肾功能相符。但是在早期糖尿病肾病时升高的 VEGF 促进了肾小球和小管的肥大，此时中和 VEGF 的作用反而改善高滤过、蛋白尿和小球的肥大[14]，因此 VEGF 在慢性进展性肾脏疾病中的作用可能存在两面性。

总之，细菌内同源重组可以构建 $VEGF_{165}$的重组腺病毒载体，所制备 Ad-$VEGF_{165}$可以在体外转染培养的 EPCs 并有效表达相应的基因产物。转染了 $VEGF_{165}$基因的 EPCs 可以减轻阿霉素肾病的肾小球和肾小管的损伤程度，为 VEGF 治疗 FSGS 提供了实验基础。但是目前仍存在一些问题，如转染后体内 EPCs 合成的 VEGF 的量的调节，异体治疗的生物安全性的确定等，均需要深入研究。

参考文献：

[1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, *et al*. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. Science, 1997, 275(5302): 964－967.

[2] Uchimura H, Marumo T, Takase O, *et al*. Intrarenal injection of bone marrow-derived angiogenic cells reduces endothelial injury and mesangial cell activation in experimental glomerulonephritis[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(4): 997－1004.

[3] Rodriguez-Ayala E, Yao Q, Holmen C, *et al*. Imbalance between detached circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells in chronic kidney disease[J]. Blood Purif, 2005, 24(2): 196－202.

[4] Kelly D J, Hepper C, Wu L L, *et al*. Vascular endothelial growth factor expression and glomerular endothelial cell loss in the remnant kidney model[J]. Nephrol Dial Tranpslant, 2003, 18(7): 1286－1292.

[5] Zan H, Cerutti A, Dramitinos P, *et al*. CD40 engagement triggers switching to IgA1 and IgA2 in human B cells through induction of endogenous TGF-beta: evidence for TGF-beta but not IL-10-dependent direct S mu→S alpha and sequential S mu→S gamma, S gamma→S alpha DNA recombination[J]. J Immunol, 1998, 161(10): 5217－5225.

[6] 赵洪雯，余荣杰，李　敛，等. 大鼠内皮祖细胞的分离培养与鉴定[J]. 重庆医学，2007，36(18)：1836－1839.

[7] 王泰华，钱家麒，张介玉，等. 阿霉素肾病肾硬化动物模型的实验改进[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志，1997，6(2)：191－193.

[8] 易成刚，郭树忠. 基因治疗在整形外科中的应用[J]. 中国美容医学，2003，12(3)：328－332.

[9] Waller W, Lee J, Zhang F, *et al*. Gene therapy in flap survival[J]. Microsurgery, 2004, 24(3): 168－173.

[10] Hristov M, Erl W, Weber P C. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23(7): 1185－1189.

[11] Brenner B M. Brenner & Rector's The Kidney[M]. 6th Ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2001: 1277－1284.

[12] Ferrarini M, Arsic N, Recchia F A, *et al*. Adeno-associated virus-mediated transduction of VEGF165 improves cardiac tissue viability and functional recovery after permanent coronary occlusion in conscious dogs[J]. Circ Res, 2006, 98(7): 954－961.

[13] 张丽芬，黄文政，朱小棣，等. 阿霉素肾病肾小球硬化动物模型的研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志，2005，6(4)：195－199.

[14] 黄颂敏，陈泽君，杨亦彬，等. 血管生成素及其受体、血管内皮生长因子与糖尿病肾脏微血管病变的关系[J]. 中华肾脏病杂志，2006，22(9)：521－527.

（编辑　王　红）

《军医大学学报》（英文版）欢迎投稿

Journal of Medical Colleges of PLA 是由 3 所军医大学和南方医科大学共同主办的、国内外公开发行的综合性医学学术类英文期刊，是中国英文版科技论文统计源期刊，并被纳入中文科技期刊数据库、中国期刊网、万方数据库、重庆维普数据库。从 2007 年开始，本刊电子版由全球著名的科技出版集团爱思唯尔（Elsevier）负责海外发行，全文已进入 ScienceDirect 全文数据库，期刊网址 http：//www.elsevier.com/locate/jmcpla。国内统一刊号：CN 31－1002/R，国际标准刊号：ISSN 1000－1948。双月刊。设有论著、技术与方法、个案报道、交流等栏目。若无彩图，无需缴纳版面费；亦不收取审稿费；无稿酬。投稿要求：中（或大摘要）、英文稿各 1 份，照片提供 3 份。电子投稿 E-mail：gangela@mail.tmmu.com.cn。照片需以附件形式单独提供 JPG 或 TIF 格式。电子投稿请注明英文版。

联系地址：重庆市沙坪坝区高滩岩第三军医大学学报编辑部（400038）　　电话：（023）68752782