论著

文章编号:1000-5404(2014)14-1448-06

KLF15基因对心肌纤维化的抑制作用

余 杨,邹书帆,马 杰,蹇 朝,唐富琴,陈 林 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军心血管外科研究所)

[摘要] **目的** 探讨心肌成纤维细胞 Krüppel 样因子 15(krüppel-like factor 15, KLF15)在心肌间质纤维化及转归中的作用和分子机制。**方法** 体外培养大鼠心肌成纤维细胞,建立促心肌成纤维细胞肥大模型,构建干涉和过表达 KLF15 腺病毒载体并转染,分别进行腺病毒组、空病毒组、对照组、阴性干涉组及干涉组细胞玻片染色观察,Ⅰ、Ⅲ型胶原纤维含量及 KLF15、TGF-β(transforming growth factor-β)、CTGF(connective tissue growth factor)、MRTF-A(myocardin-related transcription factor A)细胞因子蛋白表达水平检测。**结果** 在该细胞模型实验中,腺病毒组 KLF15 表达水平明显高于其余各组($P<0.05$),相应的 TGF-β、CTGF、MRTF-A 表达水平及Ⅰ、Ⅲ型胶原纤维含量却最低($P<0.05$),心肌细胞肥大、纤维化表现显著减轻,而干涉组上述各检测值变化恰与之相反($P<0.05$),有更重的心肌细胞肥大、纤维化表现。**结论** KLF15 可通过反馈调节 TGF-β,抑制 CTGF 及 MRTF-A 的作用,减轻心肌间质纤维化及心肌成纤维细胞表型转变,从而改善心功能。

[关键词] KLF15;心肌纤维化;心肌成纤维细胞;细胞培养;腺病毒载体;转染

[中图法分类号] R363.21;R394.3;R541.02 [文献标志码] A

Krüppel-like factor 15 inhibits myocardial fibrosis in rat cardiac fibroblast hypertrophy *in vitro*

Yu Yang, Zou Shufan, Ma Jie, Jian Zhao, Tang Fuqin, Chen Lin (Institute of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] Objective Krüppel-like factor 15 (KLF15) is a transcription factor and its expression is lost in the cardiac remodeling process associated with pathological cardiac hypertrophy prior to heart failure progression. We explored the role of KLF15 in the myocardial fibrosis process. Methods Cardiac fibroblasts of rats were cultured *in vitro* and then we developed a cell hypertrophy model. The cardiac fibroblasts were treated with KLF15 siRNA or KLF15 expression adenoviruses. The morphology of cell climbing slice was observed. Collagens type Ⅰ and type Ⅲ were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). protein expression levels of KLF15, transforming growth factor-β (TGF-β), connective tissue growth factor (CTGF) and myocardin-related transcription factor A (MRTF-A) were determined by Western blotting. Results The cardiac fibroblasts treated with KLF15 expression adenoviruses showed significant overexpression of KLF15 ($P<0.05$) and reduced expression of collagen type Ⅰ, collagen type Ⅲ, TGF-β, CTGF and MRTF-A ($P<0.05$), and displayed relieved hypertrophy and fibrosis. However, the cardiac fibroblasts treated with KLF15 siRNA had contrary results ($P<0.05$). Conclusion KLF15 inhibits cardiac interstitial fibrosis and cardiac fibroblast phenotypic transformation by feedback controlling of TGF-β and expression inhibition of CTGF and MRTF-A. The cardiac function is markedly ameliorated.

[**Key words**] Krüppel-like factor 15, myocardial fibrosis, cardiac fibroblast, cell culture, adenovirus vector, transfection

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81170216). Corresponding author: Chen Lin, Tel:86-23-68774107, E-mail:chenlin_xwk@yahoo.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81170216)

[通信作者] 陈 林,电话:(023)68774107,E-mail:chenlin_xwk@yahoo.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140710.0841.004.html(2014-07-10)

心脏瓣膜疾病在成人心脏疾病中占很大比重,是造成心力衰竭的主要病因之一[1]。慢性主动脉瓣狭窄是临床常见的导致左心室超负荷的疾病,通过主动脉瓣膜置换解除流出道梗阻是典型的卸负荷过程[2]。但是,通过手术减轻心室负荷并不能使所有患者同等受益。对于病程较长、瓣膜狭窄程度较重的患者行瓣膜置换术后,心功能并不能有效恢复[3]。心肌重塑导致的超微结构改变被认为是影响心脏功能恢复的主要分子生物学事件,KLF15 又是其中最为关键的因子[4]。因此,本研究拟建立有效的细胞模型,研究 KLF15 基因在心肌纤维化中的具体分子机制及转归。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

新生 1 周雄性 SD 大鼠 10 只,体质量 10~15 g(购于第三军医大学新桥医院实验动物中心),将其处死后,取心脏,充分剪碎,0.25% 胰蛋白酶彻底消化,采用差速离心法分离心肌成纤维细胞,加入 20% DMEM/H 完全培养基中,孵箱孵育,视细胞生长情况传代或冻存[5]。

1.2 体外培养心肌成纤维细胞肥大模型的构建

将 TGF-β 按 1、5、10 μg/μL 3 个不同浓度分为 3 组,分别加入同等容积体外培养的心肌成纤维细胞中,依次共同作用 6、12、24 h。收集细胞上清,采用反转录-聚合酶链式反应(Reverse Transcription-PCR)对大鼠心肌成纤维细胞Ⅰ型胶原 mRNA 水平进行检测(大鼠Ⅰ型胶原引物由上海生工合成,序列为 C_1:5′-GTTCGTGGTTCTCAGGGTAG-3′, C_2:5′-TTGTCGTAGCAGGGTTCTTT-3′),以 GAPDH 为内参调齐上样量,将扩增的目的脱氧核糖核酸(DNA)片段行琼脂糖凝胶电泳,再用凝胶成像分析仪进行分析,计算目的片段的平均积分光密度值[6]。确定 TGF-β 刺激浓度和时间,以成功构建 TGF-β 促体外培养心肌成纤维细胞肥大模型。

1.3 过表达和干涉 KLF15 腺病毒载体构建

KLF15 基因引物由上海生工合成,序列为 C_1:5′-CGTTGTGCTGCTTTCCTG-3′, C_2:5′-GGAGGTGGGGGAGGGGAG-3′。采用 PCR 扩增目的条带,将其连接 PTA_2,转化入 *E. coli* $DH10^B$ 细胞中,抽提质粒,再将目的基因亚克隆到腺病毒骨架载体 pAdtrack-CMV 后,与 BJ5183 重组,最后进行 KLF15 腺病毒包装,制成过表达 KLF-15 腺病毒载体[7]。KLF15 基因 siRNA 干扰片段购至 Sigma 公司。

1.4 过表达 KLF15 腺病毒、空病毒及其 siRNA 干扰片段与大鼠心肌成纤维细胞的转染

体外培养大鼠心肌成纤维细胞,用已构建好的过表达 KLF15 腺病毒真核载体按 50、100、150、200 μL/mL 浓度分别转染 24、48、72 h,倒置显微镜成像,随机选取 10 个连续低倍镜视野,检测各时间点相应腺病毒浓度组的绿色荧光蛋白(GFP)表达率(表达率 = 呈绿色荧光阳性表达细胞数/总细胞数 × 100%),以确定过表达 KLF15 腺病毒转染浓度和时间[8];根据已确定的过表达 KLF15 腺病毒转染浓度和时间进行空病毒的转染,得出其转染率;根据已确定的过表达 KLF15 腺病毒转染浓度和时间,将 3 个 KLF15 基因 siRNA 干扰片段分别与同等容积体外培养的心肌成纤维细胞共转染,收集细胞,采用反转录-聚合酶链式反应(Reverse Transcription-PCR)对大鼠心肌成纤维细胞 KLF15 基因 mRNA 水平进行检测[6-9],以 GAPDH 为内参调齐上样量,将扩增的目的脱氧核糖核酸(DNA)片段行琼脂糖凝胶电泳,再用凝胶成像分析仪进行分析,计算目的片段的平均积分光密度值,以筛选干扰片段,并确定干扰效果。

1.5 分组

构建体外培养心肌成纤维细胞肥大模型,分别与 KLF15 过表达腺病毒和 siRNA 干扰片段共转染,将其分为腺病毒组、空病毒组、对照组、阴性干涉组及干涉组等 5 组($n=10$)。

1.6 指标检测

通过免疫组化、MTT 增殖及 TUNEL 凋亡法进行离体培养的大鼠心肌成纤维细胞鉴定;行各组培养细胞玻片,作 HE 及天狼星红苦味酸染色(Sirius Red),在光镜下观察细胞病理形态变化[10];取各组培养细胞上清,用酶联免疫吸附法(ELISA)检测其Ⅰ、Ⅲ型胶原纤维含量[11];取各组培养细胞,用蛋白质印迹(Western Blot)检测 KLF15、TGF-β、CTGF、MRTF-A 的蛋白表达水平[12]。

1.7 统计学分析

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有数据均应用 SAS 8.0 或 SPSS 17.0 统计软件包进行统计学分析,计数资料采用 χ^2 检验,计量资料采用 t 检验,多组间计量资料采用单因素方差分析。

2 结果

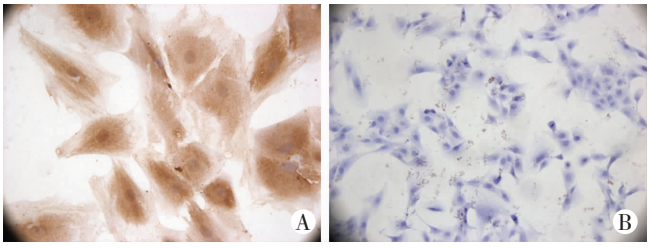
2.1 大鼠心肌成纤维细胞鉴定、凋亡及增殖检测

倒置显微镜观察,大鼠心肌成纤维细胞生长迅速,1~2 d 即呈汇合状态,细胞排列紧密,有的交叉重叠生长。与心肌细胞不同,心肌成纤维细胞显棱形,胞体较大,胞质透明,细胞核较大,呈椭圆形,通常含 2~3 个核,无自发性搏动。利用心肌成纤维细胞特异性标记物-胶原受体(discoidin domain receptor2, DDR_2)的抗体染色法进行培养的大鼠心肌成纤维细胞鉴定,在荧光微镜下成像,可见视野内细胞质呈棕黄色的阳性表达,再结合细胞形态学即可予以证实(图 1A)。TUNEL 法进行培养的大鼠心肌成纤维细胞凋亡检测,在倒置显微镜下成像,可见视野内有较多呈蓝色显像的梭状心肌成纤维细胞,其中有极少数细胞,细胞核呈棕黑色阳性表达,并有核固缩现象,此即为凋亡细胞(图 1B)。MTT 法进行培养的大鼠心肌成纤维细胞增殖检测,可见随细胞培养时间的延长,其检测所得 OD 值有逐渐增加的趋势,且培养时间越长,差异越显著(72 h 组与其余各培养时间点组比较,$P<0.05$)。

2.2 大鼠心肌成纤维细胞肥大模型构建——TGF-β 的刺激浓度和作用时间

Ⅰ型胶原纤维含量随 TGF-β 作用浓度和时间的增加而有相应增加,12 h 组 B(5 μg/μL)、C(10 μg/μL)浓度点间差异无

显著性($P>0.05$),且其Ⅰ型胶原纤维mRNA表达水平最高,故确定TGF-β 5 μg/μL、作用12 h是构建大鼠心肌成纤维细胞肥大模型的刺激浓度和作用时间。见表1,图2。



A:DDR_2抗体免疫组化染色(荧光显微镜 ×400);B:TUNEL法检测结果(倒置显微镜×100)

图1 体外培养大鼠心肌成纤维细胞的特异性抗体染色鉴定和凋亡检测

表1 不同TGF-β浓度及时间作用下Ⅰ型胶原mRNA表达水平

(平均积分光密度,$n=10$, $\bar{x}\pm s$)

TGF-β浓度	6 h	12 h	24 h
1 μg/μL	1 092.991±154.001	1 200.323±68.382	1 117.061±59.224
5 μg/μL	1 263.651±107.127[b]	1 806.167±72.528[a]	1 395.554±74.946[b]
10 μg/μL	1 256.325±139.189[b]	1 801.728±89.436[a]	1 397.792±124.911[b]

a:$P<0.05$,与1 μg/μL比较;b:$P<0.05$,与12 h比较

2.3 过表达KLF15腺病毒及空病毒与大鼠心肌成纤维细胞的转染

倒置显微镜成像检测转染后细胞内绿色荧光蛋白(GFP)的表达率显示:150 μL/mL和200 μL/mL重组腺病毒在第48、72小时对大鼠心肌成纤维细胞的转染率最高,可达80%以上,二者间无显著性差异($P>0.05$,表2,图3),故确定150 μL/mL、48 h为过表达KLF15腺病毒的转染浓度和作用时间。同时150 μL/mL浓度的空病毒与大鼠心肌成纤维细胞共同作用48 h,其转染率也高达80%以上,见图3。

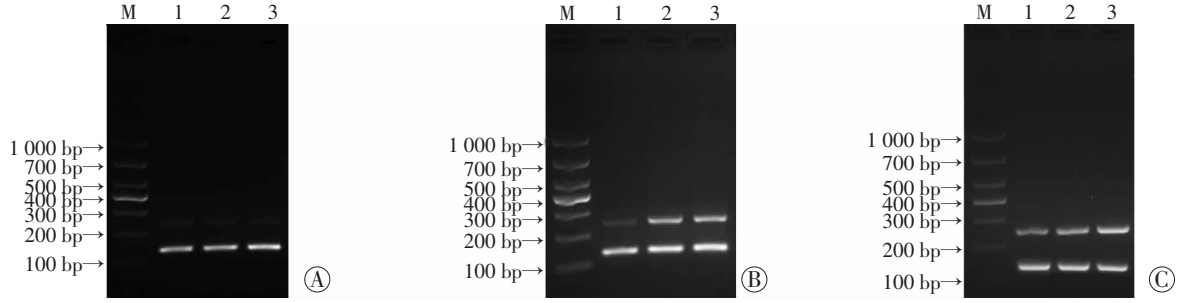
表2 不同浓度和作用时间下KLF15腺病毒对大鼠心肌成纤维细胞的转染率[$n=10$, ($\bar{x}\pm s$)%]

TGF-β浓度	24 h	48 h	72 h
50 μL/mL	11.1±2.9	18.9±2.5	19.5±2.0
100 μL/mL	13.8±2.0	26.2±5.5	26.7±4.2
150 μL/mL	59.7±3.8	89.3±3.0[abc]	88.1±3.6[abc]
200 μL/mL	60.7±4.4	87.3±3.6[abc]	86.7±2.0[abc]

a:$P<0.05$,与50 μL/mL比较;b:$P<0.05$,与100 μL/mL比较;c:$P<0.05$,与24 h比较

2.4 KLF15 siRNA干扰片段与大鼠心肌成纤维细胞的转染

3个KLF15 siRNA干扰片段(1、2、3)按150 μL/mL浓度与大鼠心肌成纤维细胞转染,作用48 h,干扰片段2中KLF15 mRNA表达水平最低,与其余各组间比较有显著性差异($P<0.05$),故证实其干扰效果最佳。见图4。



M:标准;1~3:分别为干扰片段1~3 A:1 μg/μL;B:5 μg/μL;C:10 μg/μL

图2 不同TGF-β浓度及时间作用下Ⅰ型胶原纤维mRNA表达变化的凝胶分析结果

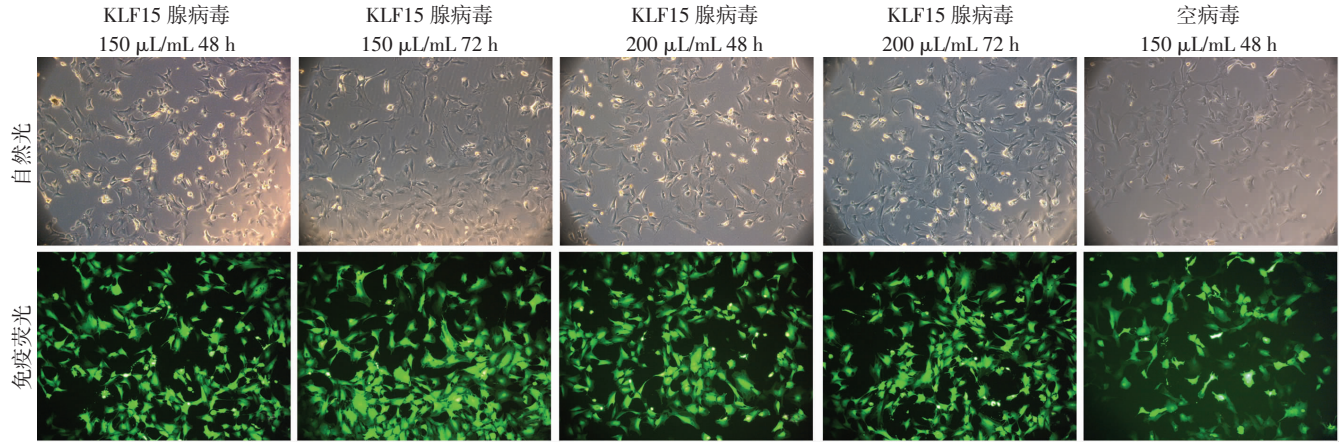
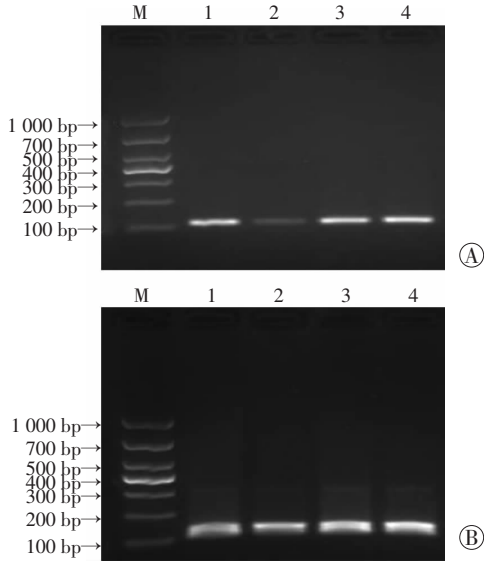


图3 不同浓度和作用时间下KLF15腺病毒对大鼠心肌成纤维细胞转染效果 (倒置显微镜 ×100)



M:标准; 1:干扰片段 1;2:干扰片段 2;3:干扰片段 3;4:对照组. A:KLF-15;B:GADPH

图 4 KLF15 mRNA 表达变化的凝胶分析结果

2.5 各组体外培养大鼠心肌成纤维细胞玻片观察

促肥大刺激各组细胞间细胞玻片显示:大鼠心肌成纤维细胞增生、肥大,排列紊乱,胶原纤维增多;干涉组细胞增生、肥大及胶原纤维增多更为显著,而腺病毒组细胞上述表现明显减弱。见图 5。

2.6 各组细胞分泌Ⅰ、Ⅲ型胶原纤维含量

促肥大刺激各组细胞间相比,腺病毒组细胞上清中Ⅰ、Ⅲ型胶原纤维含量明显少于空病毒组、对照组、阴性干涉组及干涉组 4 组,其差异有显著性($P<0.05$);而干涉组细胞上清中Ⅰ、Ⅲ型胶原纤维含量明显多于其余 4 组,其差异也有显著性($P<0.05$);空病毒组、对照组及阴性干涉组间无明显差异($P>0.05$)。见表 3。

表 3 促肥大刺激各细胞组Ⅰ、Ⅲ型胶原纤维含量

[$D(470)$, $n=10$, $\bar{x}\pm s$]

组别	Ⅰ型胶原纤维	Ⅲ型胶原纤维
腺病毒组	3.838 ± 0.134	1.579 ± 0.123
空病毒组	4.478 ± 0.175^{ab}	1.852 ± 0.084^{ab}
对照组	4.548 ± 0.090^{ab}	1.880 ± 0.064^{ab}
阴性干涉组	4.526 ± 0.269^{ab}	1.834 ± 0.077^{ab}
干涉组	5.105 ± 0.169^{a}	2.793 ± 0.112^{a}

a:$P<0.05$,与腺病毒组比较;b:$P<0.05$,与干涉组比较

2.7 各细胞因子蛋白水平的表达

促肥大刺激各组细胞间相比,腺病毒组中 KLF15 蛋白表达水平明显高于空病毒组、对照组、阴性干涉组及干涉组,而 TGF-β、CTGT、MRTF-A 蛋白表达水平明显低于此 4 组,而干涉组中上述 4 个细胞因子蛋白表达水平变化趋势恰好相反,差异均有显著性($P<0.05$);空病毒组、对照组及阴性干涉组间各细胞因子蛋白表达水平基本无差异($P>0.05$)。见表 4,图 6。

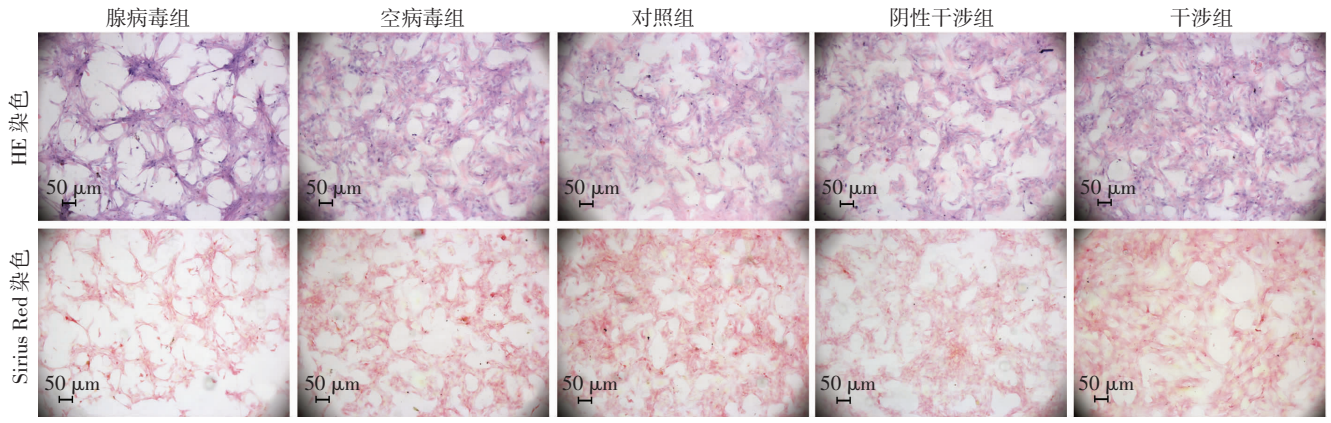
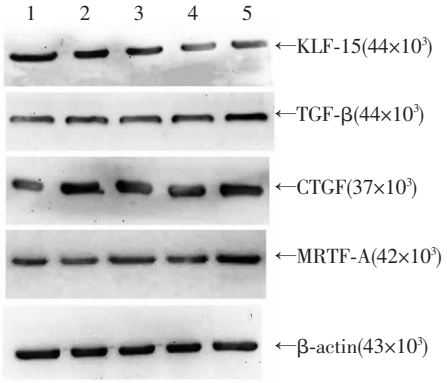


图 5 各组体外培养大鼠心肌成纤维细胞玻片观察

表 4 促肥大刺激各细胞组细胞因子蛋白表达水平(平均积分光密度,$n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	KLF15	TGF-β	CTGF	MRTF-A
腺病毒组	15 525.692 ± 356.356	2 915.961 ± 154.313	12 260.462 ± 694.308	6 007.330 ± 201.512
空病毒组	13 753.115 ± 800.176^{ab}	3 887.364 ± 111.186^{ab}	15 538.784 ± 651.046^{ab}	6 969.164 ± 198.856^{ab}
对照组	13 048.995 ± 475.790^{ab}	3 668.968 ± 234.576^{ab}	14 979.005 ± 496.131^{ab}	7 066.697 ± 298.255^{ab}
阴性干涉组	13 658.178 ± 501.577^{ab}	3 550.551 ± 204.713^{ab}	15 555.278 ± 610.845^{ab}	7 055.313 ± 260.107^{ab}
干涉组	9 895.195 ± 729.780^{a}	4 594.057 ± 411.684^{a}	18 125.813 ± 674.234^{a}	8 332.421 ± 315.919^{a}

a:$P<0.05$,与腺病毒组比较;b:$P<0.05$,与干涉组比较



1:腺病毒组;2:空病毒组;3:对照组;4:阳性干涉组;5:干涉组

图6 Western blot检测各组细胞因子蛋白表达情况

3 讨论

慢性主动脉瓣狭窄和瓣膜置换是典型的心室压力超负荷和卸负荷过程[13]。压力超负荷/卸负荷后心肌重塑决定心功能的恢复。心肌重塑是指在各种机械应力、代谢和遗传的因素作用下产生的以包括心肌细胞肥大、间质纤维化、细胞间基质成分增加和细胞超微结构改变等为特征的病理生理过程[14],既往针对心肌重塑时心肌细胞本身的变化已有较多深入的研究,其中,TGF-β致纤维化作用已经受到广泛的认可[15],但截至目前为止,对于调控压力超负荷/卸负荷所致心肌纤维化及其转归这两个过程的具体机制尚不清楚。

故本课题利用体外培养大鼠心肌成纤维细胞促肥大模型,构建干涉和过表达KLF15腺病毒载体并转染,探讨了心肌纤维化及转归过程中的具体分子机制。

通过对大鼠心肌成纤维细胞培养、鉴定,TGF-β促细胞肥大模型构建,过表达KLF15腺病毒构建、转染及各组实验指标检测结果分析,我们得出:①TGF-β确有明显的促心肌成纤维细胞肥大、纤维化的作用,同时其效果与作用浓度和时间在一定范围内呈正相关;②构建的KLF15过表达腺病毒及其干扰片段在体外培养的大鼠心肌成纤维细胞中有较高的转染率,转染效率与作用浓度和时间在一定范围内也呈正相关;③过表达KLF15腺病毒与心肌成纤维细胞转染后,KLF15蛋白表达水平显著提高,TGF-β、CTGF、MRTF-A的蛋白表达水平明显降低,Ⅰ、Ⅲ型胶原纤维含量减少,其细胞玻片显示细胞肥大、纤维化减轻。而KLF15干扰片段与细胞转染后,上述各指标变化均与之相反。

KLFs家族是真核生物中最大、最重要的一类基础转录调控因子(BTEBP)[16]。其中KLF是锌指转录因子家族的一个亚组,目前共有17个KLF因子被确认。这些KLF因子广泛表达于各种细胞系中,在不同的细胞中发挥着重要的作用,包括心血管重建、造血、血管生成、肿瘤发生、内皮基因表达、糖异生、单核细胞活化和多元肝细胞分化方向的决定等[17]。而KLF15又是其中主要的转录调节因子,它广泛表达于心肌、血管平滑肌及骨骼肌细胞中,在促进心血管系统和运动系统发育中发挥着重要作用。新近研究表明,KLF15对心肌肥厚具有显著的抑制效应。在小鼠模型中,全身敲除KLF15表达后,小鼠心肌肥厚的程度明显加重[18]。Leenders等[20]研究证实,在心肌细胞中,TGF-β能够通过激活P^{38}促分裂原活化蛋白激酶(P^{38} mitogen activated protein kinase,P^{38}-MAPK),抑制心肌细胞KLF15的表达。有研究还证实了KLF15能竞争性与心肌素相结合,降低游离血清素的含量,进而抑制SRF的转录调控作用,抑制心肌细胞肥大[19];而又有一些研究证明在心肌成纤维细胞中,心肌素家族成员—心肌素相关蛋白A(myocardin-related transcription factor A,MRTF-A/MKLI)作为SRF的关键转录调控因子,是间质纤维化发生的重要调节因子[20]。通过生物信息学分析,发现在KLF15的结合区域,心肌素和MRTF-A具有相似的蛋白结构域。因此,在心肌成纤维细胞中KLF15可能是MRTF-A的竞争性结合因子,对间质纤维化有抑制作用[21]。另一方面,在研究心肌肥厚的模型中发现,KLF15能够显著抑制心肌成纤维细胞CTGF的表达[22],可能是KLF15抑制心肌肥厚的重要作用方面,其作用机制尚不清楚,推测可能与KLF15竞争性的抑制磷酸化Smad3对CTGF转录启动子的促进作用有关。

正是基于国内外的相关研究进展,结合本实验结果,我们得出结论:在促肥大刺激时,心肌成纤维细胞在其化学因素的作用下,TGF-β表达增加,通过自(旁)分泌的形式作用于成纤维细胞,活化P^{38}MAPK进而抑制KLF15的表达。一方面,低表达的KLF15失去对心肌成纤维细胞CTGF表达的抑制,促进心肌纤维化的发生;另一方面,低表达KLF15对心肌素相关转录因子A(MRTF-A)失去竞争性结合能力,MRTF-A通过SRF促进心肌成纤维细胞分化为肌成纤维细胞,促进间质纤维化。由此可知,心肌成纤维细胞KLF15的

持续低表达是影响心肌重塑转归的一个重要决定因素。

参考文献：

[1] Akinkuolie A O, Aleardi M, Ashaye A O, *et al*. Height and risk of heart failure in the Physicians´Health Study[J]. Am J Cardiol, 2012, 109(7): 994－997.

[2] Coeytaux R R, Williams J W Jr, Gray R N, *et al*. Percutaneous heart valve replacement for aortic stenosis: state of the evidence[J]. Ann Intern Med, 2010, 153(5): 314－324.

[3] Kodali S K, Williams M R, Smith C R, *et al*. Two-year outcomes after transcatheter or surgical aortic-valve replacement[J]. N Engl J Med, 2012, 366(18): 1686－1695.

[4] Takeda N, Manabe I, Uchino Y, *et al*. Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the murine heart to pressure overload [J]. J Clin Invest, 2010, 120(1): 254－265.

[5] Salameh A, Djilali H, Blanke K, *et al*. Cardiac fibroblasts inhibit β-adrenoceptor-dependent connexin43 expression in neonatal rat cardiomyocytes[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2013, 386(5): 421－433.

[6] Wallander M L, Geiersbach K B, Tripp S R, *et al*. Comparison of reverse transcription-polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and fluorescence in situ hybridization methodologies for detection of echinoderm microtubule-associated proteinlike 4-anaplastic lymphoma kinase fusion-positive non-small cell lung carcinoma: implications for optimal clinical testing[J]. Arch Pathol Lab Med, 2012, 136(7): 796－803.

[7] Zhang X, Heckmann B L, Liu J. Studying lipolysis in adipocytes by combining siRNA knockdown and adenovirus-mediated overexpression approaches[J]. Methods Cell Biol, 2013, 116: 83－105.

[8] Li X, Liang L, Zhao P, *et al*. The effects of adenoviral transfection of the keratinocyte growth factor gene on epidermal stem cells: an *in vitro* study[J]. Mol Cells, 2013, 36(4): 316－321.

[9] 黄镇, 王子卫, 张能, 等. KLF4对胃癌SGC-7901细胞株体外生长增殖的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(8): 822－825.

[10] Stefanovic L, Stefanovic B. Role of cytokine receptor-like factor 1 in hepatic stellate cells and fibrosis[J]. World J Hepatol, 2012, 4(12): 356－364.

[11] Takahashi T, Naito S, Onoda J, *et al*. Development of a novel immunoassay for the measurement of type II collagen neoepitope generated by collagenase cleavage[J]. Clin Chim Acta, 2012, 413(19/20): 1591－1599.

[12] Kaur J, Kaur S. ELISA and western blotting for the detection of Hsp70 and Hsp83 antigens of Leishmania donovani[J]. J Parasit Dis, 2013, 37(1): 68－73.

[13] Bonow R O, Carabello B A, Chatterjee K, *et al*. 2008 focused update incorporated into the ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to revise the 1998 guidelines for the management of patients with valvular heart disease). Endorsed by the Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons[J]. J Am Coll Cardiol, 2008, 52(13): e1－e142.

[14] Bernardo B C, Weeks K L, Pretorius L, *et al*. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies[J]. Pharmacol Ther, 2010, 128(1): 191－227.

[15] Teekakirikul P, Eminaga S, Toka O, *et al*. Cardiac fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires TGF-beta[J]. J Clin Invest, 2010, 120(10): 3520－3529.

[16] 黄侃, 李为民. Kruppel样因子与心肌重构机制的研究进展[J]. 心血管病学进展, 2012, 33(2): 241－244.

[17] 许明, 沈宝茗. 锌指转录因子的研究进展[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2009, 15(3): 238－240, 封3.

[18] Liao X, Haldar S M, Lu Y, *et al*. Kruppel-like factor 4 regulates pressure-induced cardiac hypertrophy[J]. J Mol Cell Cardiol, 2010, 49(2): 334－338.

[19] Xu R, Lin F, Zhang S, *et al*. Signal pathways involved in reverse remodeling of the hypertrophic rat heart after pressure unloading[J]. Int J Cardiol, 2010, 143(3): 414－423.

[20] Leenders J J, Wijnen W J, Hiller M, *et al*. Regulation of cardiac gene expression by KLF15, a repressor of myocardin activity[J]. J Biol Chem, 2010, 285(35): 27449－27456.

[21] Small E M, Thatcher J E, Sutherland L B, *et al*. Myocardin-related transcription factor-a controls myofibroblast activation and fibrosis in response to myocardial infarction[J]. Circ Res, 2010, 107(2): 294－304.

[22] Wang B, Haldar S M, Lu Y, *et al*. The Kruppel-like factor KLF15 inhibits connective tissue growth factor (CTGF) expression in cardiac fibroblasts[J]. J Mol Cell Cardiol, 2008, 45(2): 193－197.

（收稿:2014-01-15;修回:2014-04-17）

（编辑 栾 嘉）