维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)02-0191-05

亚硒酸钠对大鼠肾小球系膜细胞 p38MAPK 和 VEGF 表达的调控

魏倩萍[1], 邓华聪[1], 赵 劼[2]

(1. 重庆医科大学临床学院内分泌科;2. 重庆医科大学超声工程研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨丝裂素活化蛋白激酶 p38(p38MAPK)和血管内皮生长因子(VEGF)的关系,从而研究 p38MAPK 和 VEGF 在糖尿病肾病中的作用及硒在抗糖尿病肾病中的作用机制。方法:分别以高葡萄糖、糖基化终产物,高胰岛素和过氧化氢孵育大鼠肾小球系膜细胞(RMCs);以 p38MAPK 特异抑制剂 SB203580 和亚硒酸钠分别预处理 RMCs,再给予上述四种刺激因素孵育 RMCs,观察 RMCs p38MAPK 和 VEGF 蛋白表达。结果:高葡萄糖、糖基化终产物、高胰岛素和过氧化氢均可独立激活 p38MAPK,使其磷酸化表达量增加,VEGF 表达也明显增加;SB203580 预处理后,VEGF 表达被显著抑制;亚硒酸钠预处理后,p38MAPK 磷酸化被明显抑制,同时 VEGF 表达显著降低。结论:p38MAPK 调控 VEGF 的表达,表明 p38MAPK 和 VEGF 参与了糖尿病肾病的发生发展;亚硒酸钠可通过抑制 p38 信号通路而抑制 VEGF 的表达,从而有效地防治糖尿病肾病。

【关键词】亚硒酸钠;p38MAPK;VEGF;糖尿病肾病;大鼠肾小球系膜细胞

【中国图书分类法分类号】R587.24 【文献标识码】A 【收稿日期】2004-10-08

A role of sodium selenite in regulating expression of p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in rat mesangial cells

WEI Qianping, et al

(*Department of Endocrinology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the relationship between p38 mitogen-activated protein kinase(p38MAPK) and vascular endothelial growth factor (VEGF), and to study the role of p38 mitogen-activated protein kinase and vascular endothelial growth factor for diabetic nephropathy, and therefore to study the mechanism of sodium selenite in anti-diabetic nephropathy. *Methods*: We initially investigated protein expression of p38MAPK and VEGF in rat mesangial cells(RMCs) which were incubated respectively with 25 mmol/L glucose, 100mg/L BSA-AGEs, 100nmol/L insulin and 100 μmol/L H_2O_2. We also studied the relationship between p38MAPK and VEGF protein expression by using SB203580, a specific inhibitor of p38MAPK. We then evaluated the direct effects of sodium selenite on the regulation of p38MAPK and VEGF protein expression. *Results*: p38MAPK and VEGF had significantly higher expression in RMCs incubated with 25mmol/L glucose, 100mg/L BSA-AGEs, 100nmol/L insulin and 100μmol/L H_2O_2 respectively. VEGF activity was significantly reduced when p38MAPK was inhibited by SB203580. Furthermore, both p38MAPK and VEGF protein expression were significantly decreased in RMCs with sodium selenite treatment. *Conclusion*: p38MAPK and VEGF are involved in development of diabetic nephropathy and p38MAPK stimulation is essential for VEGF expression, and also suggests that sodium selenite may play a role in the prevention of diabetic nephropathy by down-regulation of both p38MAPK and VEGF expression.

【Key words】Sodium selenite; P38 mitogen-activated protein kinase; Vascular endothelial growth factor; Diabetic nephropathy; Rat mesangial cells

糖尿病肾病(diabetic nephropathy,DN)是糖尿病(diabetes,DM)最常见、最严重的慢性并发症,随着 DM 发病率的逐年提高,DN 已成为导致慢性肾功能衰竭的主要病因之一。其主要病理变化表现为肾小球、肾小管肥大、基底膜增厚、肾小球系膜区细胞外基质(extracellular matrix,ECM)堆积以及肾小

作者介绍:魏倩萍(1966-),女,副教授,博士,主要研究方向:糖尿病肾病。

基金项目:国家自然科学基金(30370670)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

球硬化。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种血管渗透性因子,属于生长因子的一种,在正常人组织和血浆渗出液中呈低水平表达[1]。目前认为 VEGF 参与了微血管病变的病理过程。p38MAPK(p38mitogen - activated protein kinase, p38MAPK)信号通路是细胞信号传递的交汇点或共同通路[2],但它在 DN 形成中的作用及它与 VEGF 关系的研究报道甚少。硒作为一种抗氧化剂可减少蛋白尿的生成及减轻肾小球硬化的形成[3],但其是否通过信号通路发挥作用还不清楚。本研究在体外模拟 DM 状态,探讨 DM 时存在的各种应激如高葡萄糖、糖基化终末产物(Advanced glycation end product, AGEs)、高胰岛素、过氧化氢对 RMCs p38MAPK、VEGF 蛋白表达的影响及二者的关系,明确 p38MAPK 和 VEGF 在 DN 形成中的作用以及硒在抗 DN 中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

大鼠肾小球系膜细胞系(HBZY - 1,中国典型培养物保藏中心 CCTCC);新生牛血清及 RPMI - 1640 培养液(北京中山生物技术有限公司);Sodium Selenite(Karolinska Institute 赠送);磷酸化 P38MAPK 兔多抗(Promega 公司);p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580(Promega 公司);VEGF 兔多抗(Santa cruz 公司);第二抗体为生物素化羊抗兔 IgG(北京中山生物技术有限公司);S - P 试剂盒(北京中山生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞系 HBZY - 1 的培养 HBZY - 1 常规培养于 20%RPMI1640 培养液中,培养条件为 37℃,饱和湿度 5% CO_2,每 2~3 天用 0.02% 乙二胺四乙酸(EDTA)消化传代。

1.2.2 体外制备糖基化终末产物(AGEs) 参考文献,按牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)50g/L,与葡萄糖 90g/L,0.5mmol/L EDTA 及 0.2mmol/L PBS(pH7.4)混匀后过滤除菌,37℃ 恒温培养箱孵育 60 天。0.1mol/L PBS (pH7.4)中透析 48h,测定蛋白含量及荧光强度,分装后存于 -80℃ 冰箱保存备用。

1.2.3 实验分组 分别以一定浓度高葡萄糖、糖基化终末产物、高胰岛素和过氧化氢刺激细胞系 HBZY - 1 一定时间后,给予 p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 10μmol/L 和 sodium selenite100nmol/L 分别预处理 30min 和 48h,再分别以上述 4 种刺激因素(浓度、时间同前)孵育细胞系 HBZY - 1,同时设对照组。分组情况如下:(1)对照组(control 组):无任何刺激因素孵育细胞系 HBZY - 1。(2)高糖组(high glucose, HG 组):用 25mmol/L glucose 刺激 HBZY - 1 细胞 72h。(3)糖基化终末产物组(BSA - AGEs 组):用 100mg/L 的 BSA - AGEs 刺激 HBZY - 1 细胞 6h。(4)高胰岛素组(high insulin, HI 组):用 100nmol/L 的 insulin 刺激 HBZY - 1 细胞 24h。(5)过氧化氢组(H_2O_2 组):用 100μmol/L 的 H_2O_2 刺激 HBZY - 1 细胞 1h。(6)SB—高糖组(SB - HG 组):用 10μmol/L 的 SB203580 预处 HBZY - 1 细胞 30min,再以 25mmol/L 的 glucose 刺激 72h。(7)SB—糖基化终末产物组(SB - BSA - AGEs 组):先以 10μmol/L 的 SB203580 预处理 HBZY - 1 细胞 30min,再以 100mg/L 的 BSA - AGEs 刺激 6h。(8)SB—高胰岛素组(SB - HI 组):依次以 10μmol/L 的 SB203580 和 100nmol/L 的 insulin 分别刺激 HBZY - 1 细胞 30min 和 24h。(9)SB - 过氧化氢组(SB - H_2O_2 组):依次以 10μmol/L 的 SB203580 和 100μmol/L 的 H_2O_2 分别刺激 HBZY - 1 细胞 30min 和 1h。(10)sodium selenite - 高糖组(sodium selenite - HG 组):依次以 100nmol/L sodium selenite 和 25mmol/L 的 glucose 分别刺激 HBZY - 1 细胞 48h 和 72h。(11)sodium selenite - 糖基化终产物组(sodium selenite - BSA - AGEs 组):依次以 100nmol/L 的 sodium selenite 和 100mg/L 的 BSA - AGEs 分别刺激 HBZY - 1 细胞 48h 和 6h。(12)sodium selenite - 胰岛素组(sodium selenite - HI 组):依次以 100nmol/L 的 sodium selenite 和 100nmol/L 的 insulin 分别刺激 HBZY - 1 细胞 48h 和 24h。(13)sodium selenite - 过氧化氢组(sodium selenite - H_2O_2 组):依次以 100nmol/L 的 sodium selenite 和 100μmol/L 的 H_2O_2 分别刺激 HBZY - 1 细胞 48h 和 1h。

1.2.4 免疫细胞化学法检测 p38MAPK、VEGF 蛋白表达 预先在 24 孔板中加入无菌爬片,将调整好密度的 RMC(2×10^5)1ml/孔接种至 24 孔培养板中,用含 20% 新生牛血清的 RPMI1640 培养液使其贴壁培养 24h;换为无血清的培养液,饥饿培养 24h 后,按上述实验分组加入一定浓度的刺激及/或抑制剂再培养一定时间,每组设 4 个平行孔;吸去培养液,95% 乙醇固定 30min;吸去固定液。采用链霉卵白素 - 生物素 - 辣根过氧化物酶法(SP 法)进行免疫细胞化学染色。按试剂盒说明步骤进行染色。

1.2.5 结果判断 应用 SAS 统计分析软件包完成,所有数据用 $M\pm Q$ 表示,组间比较用秩和检验。$P<0.05$ 表示有统计学意义,$P<0.001$ 表示有极显著意义。

2 结 果

2.1 HG, HI, BSA - AGEs, H_2O_2 对细胞系 HBZY - 1 磷酸化 p38MAPK 表达量的影响

CON 组细胞系 HBZY - 1 胞核内仅有微弱磷酸化 p38MAPK 蛋白表达;分别以一定浓度 HG, HI, BSA - AGEs, H_2O_2 四种刺激因素孵育细胞系 HBZY - 1 一定

维普资讯 http://www.cqvip.com

时间后,各刺激组细胞系 HBZY－1 磷酸化 p38MAPK 蛋白表达量均明显增加。与对照组(CON 组)比较有非常显著差异($P<0.001$)。见表 1,图 2、图 3。

表 1 各组 HBZY－1 p38MAPK 蛋白表达比较(M±Q)

组 别	标本数	HBZY－1 p38MAPK 蛋白表达		
		染色强度	阳性率	免疫细胞化学得分
CON 组	10	0±1	0±1	0±1
HG 组	10	2±0##	4±1##	8±0##
HI 组	10	2±1##	4±1##	8±1##
H_2O_2 组	10	2±0##	4±0##	8±0##
BSA－AGEs 组	10	2±1##	4±1##	8±1##

注:与 CON 组比较 #$P<0.05$;##$P<0.001$

表 2 SB203580 预处理各组 HBZY－1 VEGF 蛋白表达比较(M±Q)

组 别	标本数	HBZY－1 VEGF 蛋白表达		
		染色强度	阳性率	免疫细胞化学得分
CON 组	10	0±1	0±1	0±1
HG 组	10	3±0##	4±0##	12±0##
HI 组	10	3±0##	4±0##	12±0##
H_2O_2 组	10	3±0##	4±0##	12±3##
BSA－AGEs 组	10	3±0##	4±1##	12±3##
SB＋HG 组	10	1±0#**	3±1#****	3±1#****
SB＋HI 组	10	1±0#**	3±0#****	3±0#****
SB＋H_2O_2 组	10	1±0#**	3±1#****	3±1#****
SB＋BSA－AGEs 组	10	1±0#**	3±1#****	3±1#****

注:与对照组比较 #$P<0.05$;##$P<0.001$;

SB 预处理各组与相应刺激组比较 *$P<0.05$;**$P<0.001$。

表 3 Selenite 预处理各组 HBZY－1 p38MAPK 蛋白表达比较(M±Q)

组 别	标本数	HBZY－1 p38MAPK 蛋白表达		
		染色强度	阳性率	免疫细胞化学得分
CON 组	10	0.5±1	0.5±1	0.5±1
HG 组	10	2±0##	4±1##	8±0##
HI 组	10	2±1##	4±1##	8±1##
H_2O_2 组	10	2±0##	4±0##	8±0##
BSA－AGEs 组	10	2±1##	4±1##	8±1##
Se－HG 组	10	1±0#**	3±0#****	3±0#****
Se－HI 组	10	1±0#**	3±0#**	3±0#****
Se－H_2O_2 组	10	1±0#**	3±0#**	3±0#****
Se－BSA－AGEs 组	10	1±1#*	3±1#****	3±1#****

注:与 CON 组比较 #$P<0.05$;##$P<0.001$

Selenite 预处理各组与相应刺激组比较 *$P<0.05$;**$P<0.001$

表 4 Selenite 预处理各组 HBZY－1VEGF 蛋白表达比较(M±Q)

组 别	标本数	HBZY－1 VEGF 蛋白表达		
		染色强度	阳性率	免疫细胞化学得分
CON 组	10	0±1	0±1	0±1
HG 组	10	2±0##	4±1##	8±0##
HI 组	10	2±1##	4±1##	8±1##
H_2O_2 组	10	2±0##	4±0##	8±0##
BSA－AGEs 组	10	2±1##	4±1##	8±1##
Se－HG 组	10	1±0#**	3±0#****	3±0#****
Se－HI 组	10	1±0#**	3±0#****	3±0#****
Se－H_2O_2 组	10	1±0#**	3±0#**	3±0#****
Se－BSA－AGEs 组	10	1±0#**	3±1#**	3±0#****

注:与 CON 组比较 #$P<0.05$;##$P<0.001$

Selenite 预处理各组与相应刺激组比较 *$P<0.05$;**$P<0.001$

维普资讯 http://www.cqvip.com

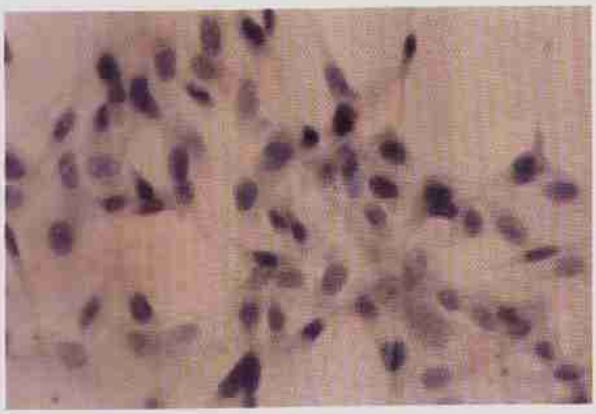


图 1 对照组大鼠肾小球系膜细胞:VEGF 表达呈阴性。SP×400



图 2 对照组大鼠肾小球系膜细胞:p38MAPK 表达呈阴性。SP×400



图 3 刺激组大鼠肾小球系膜细胞:p38MAPK 呈强阳性表达。SP×400



图 4 刺激组大鼠肾小球系膜细胞:VEGF 呈强阳性表达。SP×400

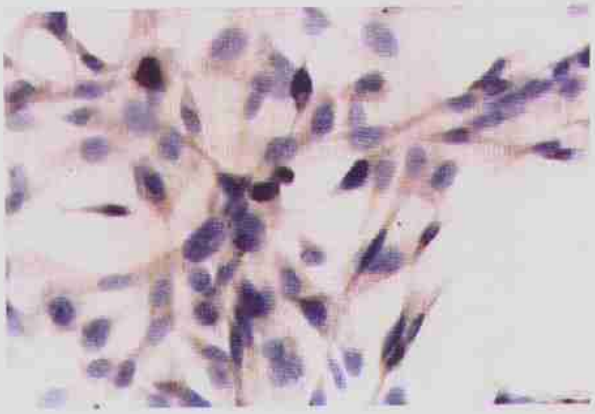


图 5 亚硒酸钠干预组大鼠肾小球系膜细胞:VEGF 表达呈低水平表达。SP×400



图 6 SB 干预组大鼠肾小球系膜细胞:VEGF 呈低水平表达。SP×400

2.2 HG,HI,BSA－AGEs,H_2O_2 对细胞系 HBZY－1VEGF 蛋白表达的影响

CON 组细胞系 HBZY－1 胞浆内仅有微弱 VEGF 蛋白表达;经 HG,HI,BSA－AGEs,H_2O_2 四种刺激因素作用后,各刺激组细胞系 HBZY－1 VEGF 蛋白表达量明显增加。与对照组比较有非常显著差异($P<0.001$)。见表 2,图 1、图 4。

2.3 SB203580 预处理后,四种刺激因素对细胞系 HBZY－1VEGF 蛋白表达量的影响

SB203580 预处理后,再分别给予 4 种刺激因素孵育细胞系 HBZY－1,可见各预处理组细胞系 HBZY－1 VEGF 蛋白表达被显著抑制,VEGF 蛋白表达量分别较相应未经 SB203580 预处理各组明显减少($P<0.001$,$P<0.05$),但与对照组比较仍有明显差异($P<0.05$,$P<0.001$)。见表 2,图 5。

2.4 亚硒酸钠对 HBZY－1 p38MAPK 及 VEGF 蛋

维普资讯 http://www.cqvip.com

白表达量的影响

亚硒酸钠预处理后,再分别给予 HG、HI,BSA－AGEs,H_2O_2 孵育细胞系 HBZY－1,可见各预处理组细胞系 HBZY－1 p38MAPK 磷酸化蛋白表达被显著抑制;VEGF 蛋白表达量分别较相应未经 Selenite 预处理各组明显减少($P<0.001$,$P<0.05$),但与对照组比较仍有明显差异($P<0.05$,$P<0.001$),见表 3,表 4,图 5。

3 讨 论

DN 是 DM 血管并发症中最常见的慢性并发症,也是 DM 患者死亡的主要原因,其危害性极大。目前认为,在 DM 状态下,高血糖、胰岛素抵抗、非酶糖基化、氧化应激、血液流变学及血液动力学异常是致 DN 的主要原因及结构基础,其中高血糖是首要致病因素。DN 早期的变化是以肾脏增大,肾小球高滤过率以及 ECM 合成增加为特点,有 25%～40%DM 患者可出现微量蛋白尿,最终发展为晚期 DN。VEGF 是一种血管渗透性因子,属于生长因子的一种,研究表明,一定数量的 VEGF 对维持正常肾小球的结构和功能是必需的,一旦这种细微的平衡被打破,VEGF 水平降低或过度表达都可能引起肾小球滤过屏障功能变化,从而导致高滤过率,白蛋白尿和肾小球肥大。近年来,国外研究已证明 VEGF 可能参与 DN 和糖尿病视网膜病变的发生发展[5,6],其主要是通过 PKC 依赖机制而发挥作用,但 VEGF 是否通过 p38MAPK 而参与 DN 的发生发展目前尚未见文献报道。本研究结果表明:HG、AGEs、HI 及 H_2O_2 可分别作为独立因素诱导细胞系 HBZY－1 VEGF 蛋白表达增加。总之,在促进 DM 内皮功能紊乱以及血管病理变化中,VEGF 可能起着主要作用。

蛋白质磷酸化是快速传递细胞内信号的重要途径,也是快速调节细胞对外界反应的基础。p38MAPK 是通过非磷酸化转化为磷酸化状态而促进下游底物的磷酸化来快速实现信号传递的。最近的研究提示,p38MAPK 是细胞信号传递的交汇点,在高糖、氧化应激、非酶糖基化和高胰岛素血症等因素作用下所致的 p38MAPK 激活而引起的细胞生长、增殖和分化,可能是 DM 血管并发症发生发展的共同通路。本实验中,HG、AGEs、HI 和 H_2O_2 均可独立激活 p38MAPK,使其磷酸化表达增加;以其特异性抑制剂 SB203580 预处理细胞系 HBZY－1,再分别以上述四种因素刺激细胞系 HBZY－1,可见其表达 VEGF 被显著抑制,表明 p38MAPK 是 VEGF 的上游激酶,p38MAPK 调控 VEGF 的表达,p38MAPK 和 VEGF 可能参与了 DN 的发生发展[7,8]。

硒是机体必需微量元素之一,它与人类健康密切相关。近年来硒与心血管疾病,肾脏疾病以及癌症的关系已引起人们普遍关注[9]。自 Rotruck 等发现硒是谷胱甘肽过氧化物酶必需的结构成分以来,人们日益重视硒在细胞抗氧化系统中的重要作用;研究表明,硒是谷胱甘肽过氧化物酶的重要组成部分,该酶的主要功能是清除体内脂质过氧化物,维持细胞膜的完整性,缺硒可出现拟高血糖症病理状态,引起白蛋白尿和肾小球硬化,从而加剧 DN 的发生发展;补充硒不仅可预防氧化应激,而且可防止肾脏损伤[10～12]。然而许多研究均集中在硒作为一种抗氧化剂而抗 DN,但硒是否作用于信号传导通路目前尚未见文献报道。本研究以亚硒酸钠预处理细胞系 HBZY－1,再分别给予四种刺激因素孵育该细胞系,可见其 p38MAPK 磷酸化被抑制,同时 VEGF 蛋白表达也减少。表明硒可通过抑制 p38MAPK 而调控下游因子,从而证明在未来防治 DN 形成中,硒可能是极有前途的药物之一。

参 考 文 献

[1] Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial grow factor[J]. J Mol Med, 1999; 77: 527－543.

[2] Igarashi M, Wakasaki H, Takahara N, et al. Glucose or diabetes activates p38 mitogen－activated protein kinase via different pathways[J]. J. Clin. Invest, 1999; 103: 185－195.

[3] Reddi Alluru S., Bollineni, Jaya S. Selenium－deficient induces renal oxidative stress and injury via TGF－(beta) 1 in normal and diabetic rats[J]. J. Kidney Int, 2001; 59(4): 1342－1353.

[4] 许 进,周序珑,夏明汗,等.乳腺癌 VEGF、p53 表达与肿瘤血管新生和转移的关系[J].临床与实验病理学杂志,2002; 18(2): 185－188.

[5] Khamaisi Mogher, Schrijvers, Bieke F. The emerging role of VEGF in diabetic kidney disease[J]. J. Nephrol Dial Transplant, 2003; 18(8): 1427－1430.

(下转第 199 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

CON43mRNA 的表达降低，进而蛋白表达的降低而降低或缺失，上皮细胞间的物质和信号传递因此而减弱或消失，细胞失去彼此间调控和粘附、从而侵袭于它处。

此外，本研究发现 CON43 蛋白主要表达于子宫内膜腺上皮细胞浆中，在基质细胞几乎无表达。Risek，Grummer[7,8]等发现 CON43 仅在小鼠内膜的基质细胞中表达，而另外两种间隙连接蛋白 CON32 和 CON26 在小鼠内膜腺上皮表达。

Jahn[9]等研究发现在增生早期 CON43 蛋白有弱的表达，在增生晚期 CON43 表达增加，排卵后在分泌早期表达受抑，而在分泌晚期则完全消失，指出间隙连接蛋白的表达受激素调控。本研究发现在月经周期中，对照组 CON43 在增生期中强表达较多，分泌期强表达减少，其趋势和上述研究结果一致；而在内异症组中增生期、分泌期强表达均少，我们推测雌、孕激素对内异症在位内膜间隙连接的调节作用和正常内膜有差异。

参 考 文 献

[1] Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel[J]. Cell, 1996; 84: 381 - 388.

[2] Yamasaki H, Naus CC. Role of connexin genes in growth control[J]. Carcinogenesis, 1996; 17: 1199 - 1213.

[3] Lee SW, Tomasetto C, Paul D, et al. Transcriptional down - regulation of gap - junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines[J]. J Cell Biol, 1992; 118: 1213 - 1221.

[4] Hanna EA, Umhauer S, Roshong SL, et al. Gap junctional intercellular communication and connexin43 in human ovarian surface epithelial cells and ovarian carcinomas in vivo and in vitro[J]. Carcinogenesis, 1999; 20: 1369 - 1373.

[5] Umhauer S, Ruch RJ, Fanning J. Gap junctional intercellular communication and connexin43 expression in ovarian carcinoma[J]. Am J Obstet Gynecol, 2000; 182: 999 - 1000.

[6] Stern RC, Dash R, Bentley RC, et al. Malignancy in endometriosis: frequency and comparison of ovarian and extraovarian types[J]. Int J Gynecol Pathol, 2001; 20(2): 133 - 139.

[7] Risek B, Klier EG., Phillips A., et al. Gap junction regulation in the uterus and ovaries of immature rats by estrogen and progesterone[J]. J Cell Sci, 1995; 108: 1017 - 1032.

[8] Grummer R, Chwalisz K, Mulholland J, et al. Regulation of connexin26 and connexin43 expression in rat endometrium by ovarian steroid hormones[J]. Biol Reprod, 1994; 51: 1109 - 1116.

[9] Jahn E, Classen - linke I, Kusche M, et al. Expression of gap junction connexins in the human endometrium throughout the menstrual cycle[J]. Hum Reprod, 1995; 10: 2666 - 2670.

(上接第 195 页)

[6] Kim NH, Kim KB, Kim SG, et al. Plasma and urinary vascular endothelial growth factor and diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus[J]. J. Diabet Med, 2004; 21(6): 545 - 551.

[7] Linderholm B K, Andersson J S, on Schoultz E, et al. Prognostic and predictive value of receptor tyrosine kinase(c - erbB - 2, VEGFR2), VEGF and phosphorylated p38 MAP kinase(MAPK) follwing adjuant endocrine therapy[J]. J. Breast Cancer Res Treat, 2003; 82(S1): p S121.

[8] Oak M, Chataigneau M. Red wine polyphenolic compounds inhibit vascular endothelial growth factor expression in vascular smooth muscle cells by preventing the activation of the p38 mitogen - activated protein kinase pathway[J]. J. Arterioscerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2003; 23(6): 1001 - 1007.

[9] Neve, Jean. Selenium as a 'nutraceutical': how to conciliate physiological and supra - nutritional effects for an essential trace element[J]. J. Clin Nutr and Meta Care, 2002; 5(6): pp659 - 663.

[10] Sheng XQ, Huang KX, Xu HB. New experimental observation on the relationship of selenium and diabetes mellitus [J]. J. Biol Trace Elem Res, 2004; 99(1 - 3): 241 - 254.

[11] 张玉洪，肖 谦. 单核苷酸多态性在研究糖尿病微血管病变易感基因中的应用[J]. 重庆医科大学学报，2004; 29(1): 18 - 20.

[12] 倪银星. 硒与糖尿病[J]. 重庆医科大学学报，2002; 27(3): 366 - 368.