

技术与方法

用亚硫酸钠制造新的肺动脉平滑肌细胞化学缺氧模型

包财盈¹ 叶玉柱¹ 朱成武¹ 薛彬彬¹ 袁培根¹ 金立达¹ 王万铁² 林丽娜^{1*}¹温州医科大学附属第一医院麻醉科, 温州 325000; ²温州医科大学病理生理学教研室, 温州 325000

摘要 该文应用1.5, 2.0, 3.0 g/L亚硫酸钠制造新的肺动脉平滑肌细胞化学缺氧模型, 并与三气培养箱制造的物理缺氧模型进行对比, 采用hematoxylin-eosin staining(HE染色)、Cell Counting Kit-8 (CCK-8)来观察亚硫酸钠对细胞的影响, 检测细胞体内的活性氧和缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)的基因及蛋白表达量来判断模型的缺氧程度。细胞体内活性氧和HIF-1 α 的检测结果显示, 亚硫酸钠所制造的缺氧模型的缺氧程度随其浓度的升高而升高, 虽然2.0 g/L和3.0 g/L亚硫酸钠组对细胞有一定程度的毒性作用, 但是1.5 g/L亚硫酸钠组对细胞的损害程度与物理缺氧组相比无明显差异。该研究表明, 1.5 g/L亚硫酸钠所制造的肺动脉平滑肌细胞化学缺氧模型较符合肺动脉平滑肌细胞缺氧模型的要求。

关键词 缺氧模型; 亚硫酸钠; 肺动脉平滑肌细胞

A New Chemical Hypoxia Model of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells Induced by Sodium Sulfite

Bao Caiying¹, Ye Yuzhu¹, Zhu Chengwu¹, Xue Binbin¹, Yuan Peigen¹, Jin Lida¹, Wang Wantie², Lin Lina^{1*}¹The Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China;²The Department of Physiology of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China)

Abstract Different concentrations of sodium sulfite of 1.5, 2.0, 3.0 g/L were used to make a new chemical hypoxia model of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCS). Hematoxylin-eosin (HE) staining and Cell Counting Kit-8 (CCK-8) were performed to observe the effect of sodium sulfite on the PASMCS. To define the anoxic extent of new hypoxia model, the changes of reactive oxygen species and the expression of HIF-1 α were detected. The content of ROS tested by fluorescence microscope and the expressions of HIF-1 α tested by RT-PCR and Western blot indicated that the levels of hypoxia were dependent on the concentration of the sodium sulfite. Although there were some damages to the PASMCS in the hypoxia model induced by 2.0 g/L and 3.0 g/L, but the model induced by 1.5 g/L of sodium sulfite was similar to the model induced by three gas incubator. So the concentration of sodium sulfite with 1.5 g/L was the best to induce a hypoxia model.

Keywords hypoxia model; sodium sulfite; pulmonary artery smooth muscle cells

细胞缺氧是多种缺血缺氧性疾病发病的关键环节, 建立细胞缺氧模型来模拟疾病关键环节是从细胞和分子水平研究该类疾病的重要方法。肺动

脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PASMCS)是肺脏急、慢性缺氧时的一种重要的效应细胞^[1]。PASMCS的增殖和凋亡失衡引起肺血管阻

收稿日期: 2014-11-27

接受日期: 2015-01-17

浙江省科技平台项目(批准号: 2012C37092)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-88069458, E-mail: wzlinlina@163.com

Received: November 27, 2014

Accepted: January 17, 2015

This work was supported by the Science and Technology Experimental Platform Project of Zhejiang Province (Grant No.2012C37092)

*Corresponding author. Tel: +86-577-88069458, E-mail: wzlinlina@163.com

网络出版时间: 2015-04-07 11:12

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150407.1112.002.html>

力增加是肺血管重塑最基本的病理基础, 其与缺氧性肺血管收缩的共同作用是导致肺动脉高压的主要病理生理变化。

到目前为止, 主要建立了物理性和化学性缺氧模型。物理性缺氧模型是向细胞培养液中持续通入氮气或无氧气体从而降低氧分压, 早期有液面封闭模型^[2-3], 后来有自制简易密封舱^[4-5], 到现在主要是国际上公认的三气培养箱。三气培养箱控制精确, 可以设定不同的缺氧程度, 但其价格昂贵, 气体平衡时间长, 无法在缺氧期间进行实验操作。而化学性缺氧模型是在细胞培养基中加入化学物质, 造成细胞用氧障碍或使培养液内的氧气耗尽。普遍使用的化学物质有氯化钴和硫代硫酸钠。这种方法简单易行、经济便捷、重复性高。然而, 硫代硫酸钠的自燃及放热和钴离子的重金属毒性, 限制了它们的使用。

亚硫酸钠(sodium sulfite, SS)是一个新的化学除氧剂。颜月娥等^[6]报道, 亚硫酸钠具备清除氧的能力, 具有物美价廉、来源方便、无毒及与氧反应速度较快等优点而被广泛应用于工业实践中。在食品行业中, 亚硫酸钠是被广泛使用的防腐剂, 因为它具有引发厌氧条件的能力, 可以有效地抑制好氧微生物的生长^[7]。Jiang等^[8]报道, 亚硫酸钠可以成功地引发低氧, 缺氧的程度可以通过可溶性亚硫酸钠的浓度控制, 并且亚硫酸钠和水的反应不自燃, 也不产生二氧化硫。

本文采用亚硫酸钠去除细胞培养液中的氧来建立体外培养肺动脉平滑肌细胞缺氧模型, 观察其细胞形态及功能的改变, 初步探讨其可能的机制, 为肺动脉平滑肌细胞缺氧损伤的研究提供新方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康SPF级雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠(200~250 g)由温州医科大学实验动物房提供。

1.2 试剂

亚硫酸钠购自浙江中星化工试剂有限公司; Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)培养基、澳洲胎牛血清、青霉素-链霉素溶液和胰酶均购自美国Gibco公司; α -SM actin鼠单克隆抗体购自英国Abcam公司; 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)粉末购自Sigma公司; HIF-1 α 抗体购自Novous公司; PCR引物由上海生工生物工程技术服

务有限公司合成。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠PASCs的分离和培养 SPF级雄性SD大鼠经10%水合氯醛麻醉后剖胸, 取出心肺组织, 显微镜下分离肺动脉, 加入I型胶原酶消化, 再加入含20%胎牛血清的培养基后吹打混匀接种于培养瓶中, 将培养瓶放入普通培养箱中培养3~7 d, 于倒置显微镜下观察细胞生长情况。待原代细胞生长至汇合状态、铺满瓶壁的80%以上时, 进行传代。实验用第4~6代细胞。

1.3.2 肺动脉平滑肌细胞的鉴定 将细胞消化后, 接种于有盖玻片的6孔板中, 培养1~2 d后, 4%多聚甲醛固定10~15 min, 3% H₂O₂孵育10 min以阻断内源性过氧化物酶, 滴加一抗 α -SM actin(稀释度1:100), 4 °C过夜, 最终滴加二抗, 在室温条件下孵育时间约60 min, DAPI染细胞核, 在荧光显微镜下观察细胞并拍摄图片。

1.3.3 分组 取状态良好的对数生长期细胞消化、接种, 待细胞生长至70%~80%时, 用没有添加血清的DMEM同步24 h后, 用随机排列表法将细胞分为5组: (1)正常对照组(normal control group): 在常氧条件(37 °C、21% O₂、5% CO₂)下培养24 h; (2)物理缺氧组(three gas incubator group): 在三气培养箱(37 °C、3% O₂、5% CO₂、92% N₂)下培养24 h; (3)低浓度亚硫酸钠缺氧组(1.5 g/L SS组): 在常氧条件下培养24 h, 培养液中加入1.5 g/L亚硫酸钠; (4)中浓度亚硫酸钠缺氧组(2.0 g/L SS组): 在常氧条件下培养24 h, 培养液中加入2.0 g/L亚硫酸钠; (5)高浓度亚硫酸钠缺氧组(3.0 g/L SS组): 在常氧条件下培养24 h, 培养液中加入3.0 g/L亚硫酸钠。

1.3.4 HE染色法观察细胞形态 按上述步骤将细胞接种于有盖玻片的6孔板, 按照分组条件分别培养24 h, 用PBS漂洗3次后按照HE染色试剂盒步骤染色, 将盖玻片滴入中性树脂后盖在载玻片上, 在倒置显微镜下观察结果并拍摄照片。

1.3.5 CCK-8法检测细胞活性 将细胞接种于96孔培养板, 密度约为1×10³/孔, 培养1~2 d, 分组与干预方式同前, 24 h后每孔加入100 μ L DMEM+10 μ L CCK-8试剂, 避光继续培养1 h, 用酶标仪测定450 nm波长处各孔吸光度。

1.3.6 荧光显微镜检测细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS) 将细胞接种于铺有盖玻片的6孔板,

分组与干预方式同前, 后加入稀释好的DCFH-DA 1 mL, 终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育45 min后用PBS清洗3次, 用荧光显微镜观察并拍摄图片, 用Image-Pro Plus 6.0软件分析, 得出平均荧光强度。

1.3.7 RT-PCR检测HIF-1 α 基因的表达 按上述实验分组进行处理后提取RNA, 将RNA逆转录为cDNA后, 进行PCR处理。HIF-1 α (670 bp)的引物为: 上游引物: 5'-CAG CAG CAA CAG CAC TAC CCA TA-3', 下游引物: 5'-TTG TCC TTG ACG CAG ATA CCA TA-3', 内参为 β -actin(201 bp)。

1.3.8 Western blot检测HIF-1 α 蛋白表达水平 按上述实验分组条件处理后收集细胞, 用预冷的细胞裂解液裂解30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 离心20 min, 吸取上清液, 采用BCA法测蛋白浓度。取相当于50 μg 蛋白的样品, 采用5%的浓缩胶、8%的分离胶电泳, 300 mA 2 h转膜至PVDF膜上, 5%的脱脂牛奶封闭2 h, I抗(目的蛋白HIF-1 α 浓度1:300, 内参蛋白 β -actin浓度1:5 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST洗膜, II抗(目的蛋白和内参蛋白都为1:50 000)室温孵育1 h, 洗膜后曝光, 对条带灰度值进行定量分析。

1.4 统计学方法

采用SPSS 15.0统计软件分析。所有数据进行正态性检验, 计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组样本均数比较用方差检验, 两两比较用LSD检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺动脉平滑肌细胞的培养及鉴定

从倒置相差显微镜中我们可以看到, 消化下来的细胞经20%牛胎血清培养基培养2~3 d后, 单个的细胞贴壁并且逐渐有细胞从未消化完全的组织块中爬出, 细胞贴壁生长, 呈长梭形, 8~10 d后细胞逐渐融合, 呈现典型的“峰-谷”状生长特点(图1)。 α -SM actin免疫荧光染色显示, 细胞质中有较多与细胞纵轴相平行的丝状绿色荧光, 即为平滑肌细胞特有的肌动蛋白, 而且超过95%的细胞呈阳性, 说明本实验所用的细胞为肺动脉平滑肌细胞(图2)。

2.2 各组细胞活性的变化

各组细胞CCK-8实验的吸光度值大小可间接反映细胞活性, 正常对照组细胞的吸光度值为 0.69 ± 0.01 , 与物理缺氧组(0.78 ± 0.01)相比有显著差异(图3, $P<0.05$)。而用亚硫酸钠制造缺氧模型的3个组

分别与物理缺氧组对比后发现, 1.5 g/L SS组的吸光度值为 0.77 ± 0.01 , 与物理缺氧组无统计学意义(图3); 而2.0 g/L SS组的吸光度值为 0.65 ± 0.01 , 3.0 g/L SS组

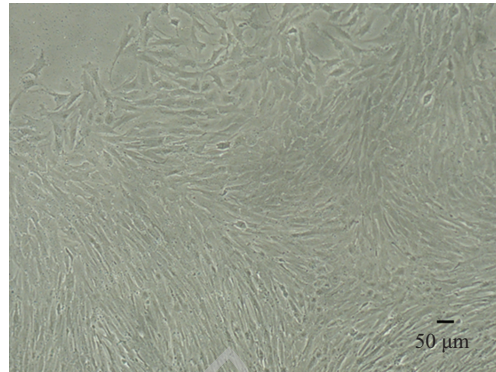


图1 相差倒置显微镜下的原代的肺动脉平滑肌细胞
Fig.1 Primary PASCs observed with inverted phase contrast microscope

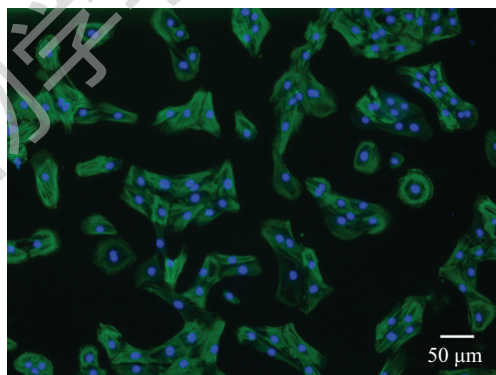
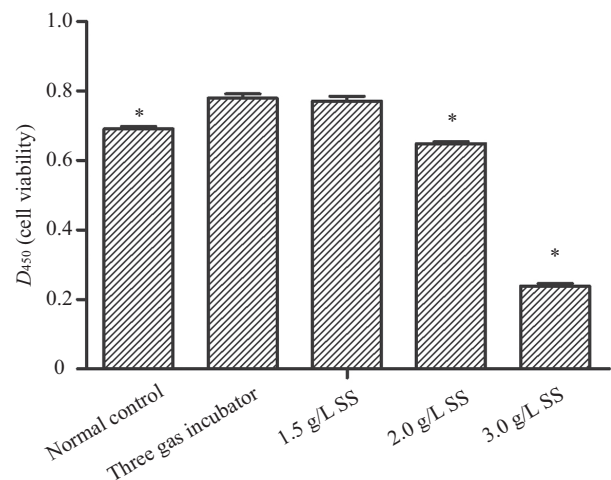


图2 免疫荧光染色法鉴定肺动脉平滑肌细胞
Fig.2 Identification of PASCs with immunofluorescence staining



* $P<0.05$, 与物理缺氧组相比。n=3。

* $P<0.05$ compared with three gas incubator group. n=3.

图3 CCK-8法检测肺动脉平滑肌细胞细胞活力
Fig.3 PASCs viability among different groups by CCK-8 assay

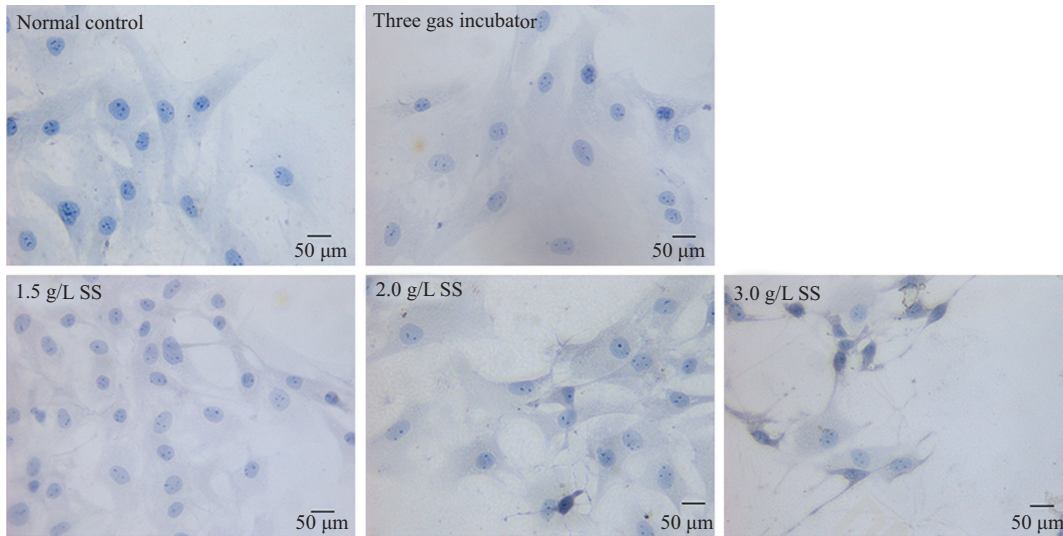


图4 HE染色法观察细胞的形态

Fig.4 The morphology of PAMSCs by HE staining

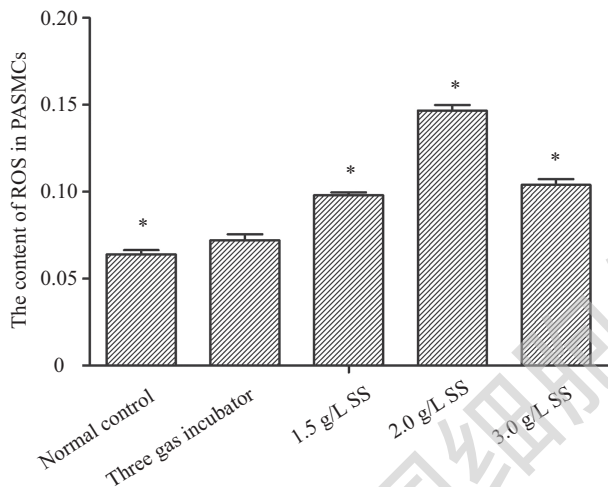
* $P < 0.05$, 与物理缺氧组相比。 $n = 3$ 。* $P < 0.05$ compared with three gas incubator group. $n = 3$ 。

图5 荧光显微镜检测细胞体内活性氧含量

Fig.5 The content of ROS in PAMSCs test by fluorescence microscope

为 0.24 ± 0.01 , 与物理缺氧组比较均有显著差异(图3, $P < 0.05$), 且随着亚硫酸钠浓度的提高, 数值逐渐变小。1.5 g/L SS组的细胞活力和细胞增殖情况均与物理缺氧组无明显差异, 但是随着亚硫酸钠浓度的增加, 细胞活力逐渐下降。

2.3 各组HE染色结果的比较

与正常对照组比, 物理缺氧组和1.5 g/L SS组的细胞形态无显著改变。2.0 g/L SS组的细胞开始出现凋亡的细胞, 3.0 g/L SS组的凋亡细胞明显比2.0 g/L SS组要多(图4)。

2.4 各组细胞活性氧的变化

正常对照组细胞体内的活性氧含量比物理缺氧组低(图5, $P < 0.05$), 符合大多数学者的研究。1.5 g/L SS组和2.0 g/L SS组的平均荧光强度与物理缺氧组

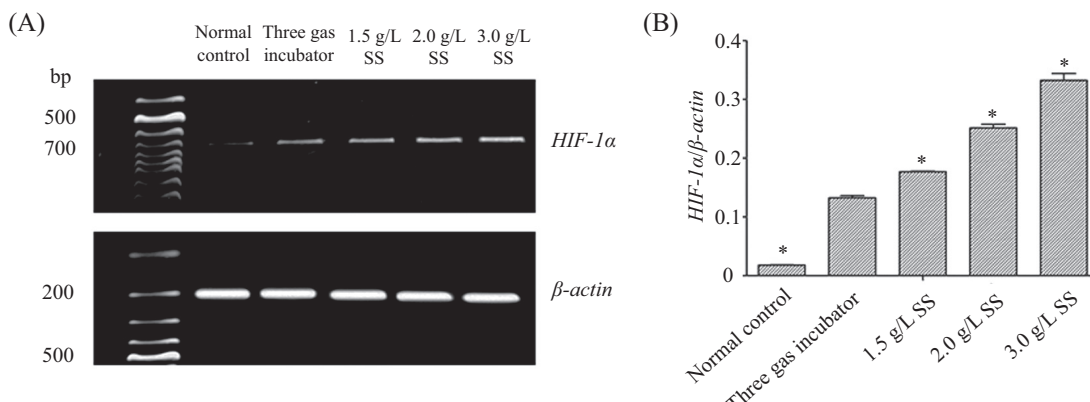
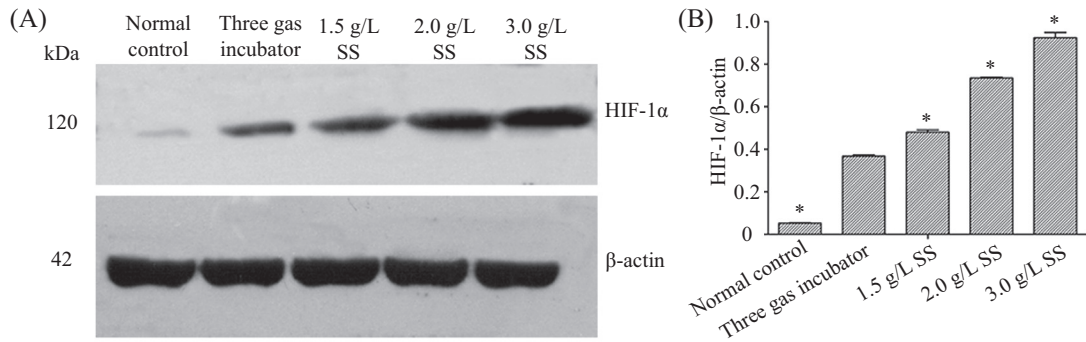
A: 不同处理条件下HIF-1α mRNA表达量; B: 不同处理条件下HIF-1α mRNA表达趋势。* $P < 0.05$, 与物理缺氧组相比。 $n = 3$ 。A: the content of HIF-1α mRNA under different conditions; B: the tendency of HIF-1α mRNA under different conditions. * $P < 0.05$ compared with three gas incubator group. $n = 3$ 。

图6 RT-PCR检测HIF-1α mRNA表达量

Fig.6 The content of HIF-1α mRNA tested by RT-PCR



A: 不同处理条件下HIF-1 α 蛋白表达量; B: 不同处理条件下HIF-1 α 蛋白表达趋势。* $P < 0.05$, 与物理缺氧组相比。 $n = 3$ 。

A: the content of HIF-1 α protein under different conditions; B: the tendency of HIF-1 α protein under different conditions. * $P < 0.05$ compared with three gas incubator group. $n = 3$.

图7 Western blot检测HIF-1 α 蛋白含量

Fig.7 The content of HIF-1 α protein tested by Western blot

相比也有显著差异(图5, $P < 0.05$), 且随着浓度的升高而递增, 提示1.5 g/L SS组和2.0 g/L SS组的缺氧程度比物理缺氧组要高, 而且随着亚硫酸钠浓度的增高而增高; 但是3.0 g/L SS组的平均荧光强度比2.0 g/L SS组的要低(图5, $P < 0.05$)。

2.5 各组HIF-1 α 基因表达量的变化

与物理缺氧组相比, 正常对照组的HIF-1 α mRNA含量明显降低(图6, $P < 0.05$)。物理缺氧组符合HIF-1 α 的低氧表现。1.5 g/L SS组与物理缺氧组相比, HIF-1 α 的mRNA含量略微有所上升(图6, $P < 0.05$), 2.0 g/L SS组和3.0 g/L SS组与物理缺氧组相比, 表达量显著上升(图6, $P < 0.05$), 而且可以看出呈剂量依赖性, 提示亚硫酸钠组的缺氧程度优于物理缺氧组, 而且随着亚硫酸钠浓度的增加, 缺氧程度升高。

2.6 各组HIF-1 α 蛋白含量的变化

与物理缺氧组相比, 正常对照组的HIF-1 α 蛋白表达量较少(图7, $P < 0.05$)。物理缺氧组符合低氧下HIF-1 α 蛋白的表达。1.5 g/L SS组与物理缺氧组相比, 蛋白表达量小幅度上升(图7, $P < 0.05$), 2.0 g/L SS组和3.0 g/L SS组与物理缺氧组相比, 蛋白表达量明显增加(图7, $P < 0.05$), 而且呈浓度依赖性, 提示亚硫酸钠组的缺氧程度优于物理缺氧组, 而且随着亚硫酸钠浓度的增加, 缺氧程度升高。

3 讨论

众所周知, 当氧分压(PO_2)低于60 mmHg时, 就可以引起组织缺氧。姚海霞等^[9]的研究显示, 1.5 g亚硫酸钠可以使0.5 L Krebs-Henseleit液(KH液)中的 PO_2 降到40 mmHg以下, 符合低氧培养肺动脉的要

求, 所以本研究选取1.5、2.0、3.0 g/L三个浓度的亚硫酸钠制造肺动脉平滑肌细胞缺氧模型。

为了明确亚硫酸钠所制造缺氧模型的效果, 我们针对细胞毒性作用和缺氧效果方面与物理性缺氧模型进行了对比。首先, 我们用HE染色法和CCK-8法来观察亚硫酸钠对细胞的毒性作用。从HE染色的结果可见, 随着亚硫酸钠浓度的增加, 其对细胞逐渐出现毒性作用, 并随浓度增高毒性作用增强。我们用CCK-8法验证了以上结果。物理缺氧组的细胞活力比正常组要高(图3), 与缺氧可直接刺激PASCs引起增殖^[10]这一总所周知的结论符合。1.5 g/L SS组的细胞活力和物理缺氧组无明显差异, 但浓度继续增高后, 细胞的活力开始下降, 并随着亚硫酸钠浓度的增高, 细胞活力逐渐下降。对于这个现象, 我们考虑主要可能是由于我们所用的细胞培养液是厂家批量生产的, 里面所含物质及浓度按照最适宜细胞生长的范围配制的, 随着亚硫酸钠浓度的增加, 培养液中的钠离子浓度升高, 当其超过了细胞能承受的范围后, 会使得细胞脱水萎缩, 对细胞产生一定的伤害, 甚至使细胞产生凋亡, 大部分细胞出现一定程度的萎缩, 但是不是很明显, 细胞凋亡较少, 而3.0 g/L SS组图中的细胞萎缩程度严重, 细胞凋亡比例增加(图4)。

其次, 我们通过检测细胞内的活性氧和HIF-1 α 的基因及蛋白水平对亚硫酸钠制造缺氧模型的低氧程度进行了评估。活性氧主要来自线粒体系统和NADPH氧化酶系统, 它主要包括超氧阴离子、氢氧根、过氧化氢、烷氧基等。活性氧在缺氧导致的PASCs内质网应激中也扮演着重要的角色, 内质

网应激导致一系列的下游反应参与了肺动脉高压的发生、发展^[1]。Tuttle等^[12]的研究显示,细胞内活性氧的含量与氧浓度有关,氧浓度越低,活性氧的含量越高。我们的研究发现,物理缺氧组细胞内活性氧的含量高于正常组,而1.5 g/L SS组细胞内活性氧的含量高于物理缺氧组,并随着亚硫酸钠浓度的增高而增加,结合Tuttle等^[12]的研究结果,提示亚硫酸钠所制造的缺氧模型在缺氧程度上优于物理低氧组,而其缺氧程度可以随着亚硫酸钠浓度的增加而增加。对于物理缺氧组细胞内活性氧下降的现象,我们考虑可能是由于在3.0 g/L SS组中,细胞凋亡数量较多,而活性氧只在活细胞中表达,凋亡细胞中不显示,所以其比2.0 g/L SS组的活性氧含量要低。

缺氧诱导因子-1(HIF-1)是一个普遍存在于人和哺乳动物细胞内的缺氧应答因子,是诱导与缺氧应激有关的基因表达最有效的转录因子。HIF-1最初是在20世纪90年代被发现的, Semenza等^[13]在研究缺氧诱导的促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)基因表达时,在肝细胞核中提取出了这种蛋白质。HIF-1是DNA结合蛋白,它主要是由对氧敏感的 α 亚基(HIF-1 α)和在核内稳定表达的 β 亚基(HIF-1 β)组成的异二聚体转录因子。HIF-1 α 可以调控100多种涉及低氧应激下细胞适应与存活的靶基因的表达,从而在低氧应答反应中起核心作用,因而它被认为是一种氧感受器。本实验检测了HIF-1 α 的基因和蛋白表达量,从结果中可以看出,物理缺氧组比正常组表达量要高,符合了HIF-1 α 对缺氧的应答;三个浓度的亚硫酸钠组的表达量比物理缺氧组要高,并随着亚硫酸钠浓度的升高而升高,提示亚硫酸钠组的缺氧程度要优于物理缺氧组,并随着浓度的增加而增加,和我们前面检测的活性氧得出的结论基本一致。

综上所述,本研究发现,1.5 g/L SS组无论是在对肺动脉平滑肌细胞的毒性程度上还是缺氧程度上都比较符合肺动脉平滑肌细胞缺氧模型的要求,而2.0 g/L和3.0 g/L SS组虽然在缺氧程度上优于物理缺氧模型和1.5 g/L亚硫酸钠缺氧模型,但是由于其对细胞有毒性作用,可能不适用于肺动脉平滑肌细胞缺氧模型的制造。

参考文献 (References)

1 Killilea DW, Hester R, Balczon R, Babal P, Gillespie MN. Free radical production in hypoxic pulmonary artery smooth muscle

cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279(2): L408-12.

2 薄涛,姜玉武,曹海燕,王静敏,吴希如. 无糖对体外培养的神经前体细胞损伤的影响. *北京大学学报(Bo Tao, Jiang Yuwu, Cao Haiyan, Wang Jingmin, Wu Xiru. Effect of glucose-free treatment on the neural precursor cells in vitro. Journal of Peking University)* 2003; 35(6): 600-4.

3 杜逸亭,董文斌,王明勇,航永伦. 人近曲肾小管上皮细胞缺氧/复氧损伤模型的建立. *中国危重病急救医学(Du Yiting, Dong Wenbin, Wang Mingyong, Hang Yonglun. Replication of a model of injury to human renal proximal tubular cells induced by hypoxia/reoxy genation. Chinese Critical Care Medicine)* 2005; 17(10): 619-22.

4 徐建文,张更,王玮. 围生期缺氧缺血后脑组织型纤溶酶原激活物的活性变化. *实用儿科临床杂志(Xu Jianwen, Zhang Geng, Wang Wei. The change of the brain's tissue plas minogen activator activity after hypoxia and ischemia in the perinatal. Journal of Applied Clinical Pediatrics)* 2002; 17(5): 444-6.

5 朱浩,丁文龙,王文进,李峰. 体外培养Schwann细胞缺氧模型的建立. *解剖学杂志(Zhu Hao, Ding Wenlong, Wang Wenjin, Li Feng. Establishment of hypoxic model of culturing Schwann cells in vitro. Chinese Journal of Anatomy)* 2008; 31(2): 210-2.

6 颜月娥. 亚硫酸钠化学除氧的应用. *工业水处理(Yan Yuee. Application of Na₂SO₃ to chemical deoxidization. Industrial Water Treatment)* 2007; 27(11): 88-90.

7 Schlatter J, Wuergler FE, Kraenzlin R, Maier P, Holliger E, Graf U. The potential genotoxicity of sorbates effects on cell cycle *in vitro* in V79 cells and somatic mutations in *Drosophila*. *Food Chem Toxicol* 1992; 30(10): 843-51.

8 Jiang B, Ren CH, Li Y, Lu YM, Li WG, Wu YH, *et al.* Sodium sulfite is a potential hypoxia inducer that mimics hypoxic stress in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Inorg Chem* 2011; 16(2): 267-74.

9 姚海霞,祝卿,吉伟,王淑君,林丽娜,王万铁. 应用亚硫酸钠快速制备低氧性肺血管收缩离体模型所需低氧性Krebs-Henseleit液的方法及评价. *中国病理生理杂志(Yao Haixia, Zhu Qin, Ji Wei, Wang Shujun, Lin Lina, Wang Wangtie. Rapid preparation of hypoxic Krebs-Henseleit solution with sodium sulfite for in vitro model of hypoxic pulmonary vasoconstriction. Chinese Journal of Pathophysiology)* 2012; 28(12): 2301-4.

10 Humbert M, Montani D, Perros F, Dorfmueller P, Adnot S, Eddahibi S. Endothelial cell dysfunction and cross talk between endothelium and smooth muscle cells in pulmonary arterial hypertension. *Vascul Pharmacol* 2008; 49(4/5): 113-8.

11 Ogura S, Shimosawa T, Mu S, Sonobe T, Kawakami-Mori F, Wang H, *et al.* Oxidative stress augments pulmonary hypertension in chronically hypoxic mice overexpressing oxidized LDL receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013; 305(2): H155-62.

12 Tuttle SW, Maity A, Oprysko PR, Kachur AV, Ayene IS, Biaglow JE, *et al.* Detection of reactive oxygen species via endogenous oxidative pentose phosphate cycle activity in response to oxygen concentration: Implications for the mechanism of HIF-1 α stabilization under moderate hypoxia. *J Biol Chem* 2007; 282(51): 36790-6.

13 Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via *de novo* protein, synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Bio* 1992; 12(12): 5447-54.