

钙敏感性受体活化促进缺血/再灌注损伤心肌细胞的凋亡及炎症反应

周雪媛¹, 严 凌¹, 朱铁兵^{1*}, 潘世阳², 王连生¹, 陶正贤¹, 杨志健¹, 曹克将¹

(¹南京医科大学第一附属医院心脏科,²临床中心实验室,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨钙敏感性受体活化与心肌细胞缺血/再灌注损伤后凋亡及炎症反应的关系。方法:缺氧/复氧法处理新生大鼠心肌细胞,建立心肌缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)模型。新生大鼠心肌细胞随机分为对照组、缺血/再灌注组、GdCl₃(CaSR 激动剂)组、GdCl₃ + SB203058(p38MAPK 特异抑制剂)组。TUNEL 染色法检测心肌细胞凋亡;逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)测定钙敏感性受体(calcium-sensing receptor, CaSR)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及白细胞介素-6(IL-6)的 mRNA 表达;免疫蛋白印迹法(Western blot)测定 Caspase-3、Bcl-2 和丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)的蛋白表达。结果:模拟 I/R 增强了 CaSR、TNF- α 、IL-6、p38MAPK 的表达及心肌细胞凋亡;GdCl₃ 进一步增强了上述作用,而对 Caspase-3 和 Bcl-2 则分别起着正向及负向调节作用;与 GdCl₃ 组相比,GdCl₃ + SB203058 组 p38MAPK、TNF- α 、IL-6 的表达明显降低,而心肌细胞凋亡及 CaSR 的表达无明显改变。结论:CaSR 激活不仅促进新生鼠心肌细胞 I/R 损伤后心肌细胞凋亡,且通过 p38MAPK 信号转导促进 I/R 区域的炎症反应。

[关键词] 钙敏感性受体; 凋亡; 心肌细胞; 缺血/再灌注; 炎症反应

[中图分类号] R392

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)10-1366-06

Activation of calcium-sensing receptors promoting cardiomyocytes apoptosis and inflammation induced by ischemia/reperfusion

ZHOU Xue-yuan¹, YAN Ling¹, ZHU Tie-bing^{1*}, PAN Shi-yang², WANG Lian-sheng¹, TAO Zheng-xian¹, YANG Zhi-jian¹, CAO Ke-jiang¹

(¹Department of Cardiology,²Department of Clinical Key Laboratory, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To examine whether activation of calcium-sensing receptor (CaSR) is associated with apoptosis and inflammatory reaction of cardiomyocytes stimulated by ischemia/reperfusion (I/R). **Methods:** Primary neonatal rat ventricular cardiomyocytes were incubated in anoxia/reoxygenation method to establish a model of simulated I/R. And neonatal rat ventricular cardiomyocytes were randomly divided into control group, I/R group, GdCl₃ (CaSR agonist) group and GdCl₃+SB203058 (a specific inhibitor of p38MAPK) group. Cardiomyocyte apoptosis was detected by TUNEL assay. The expressions of CaSR, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) were detected by real reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). The expressions of Caspase-3, Bcl-2 and p38MAPK were detected by Western blot. **Results:** The simulated I/R enhances cardiomyocyte apoptosis and the expression of CaSR, TNF- α , IL-6 and p38MAPK. GdCl₃ can further increase cardiomyocyte apoptosis and expression of above proteins, along with up-regulation of Caspase-3 and down-regulation of Bcl-2. Compared with GdCl₃ group, the mRNA expression of TNF- α and IL-6 were markedly decreased with no significant changes of cardiomyocytes apoptosis and CaSR mRNA in GdCl₃+SB203058 group. **Conclusion:** Activation of CaSR is not only associated with increased cardiomyocytes apoptosis after I/R injury via suppressing Bcl-2 and promoting Caspase-3 expression, but also induces inflammatory reaction via p38MAPK signaling pathway at I/R area.

[Key words] calcium sensing receptor; atoptosis; cardiomyocyte; ishemia/reperfusion; inflammatory reaction

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(10): 1366-1371]

[基金项目] 江苏省高校自然科学基金资助(06kjb320006)

*通讯作者, E-mail: JYF215117@sina.com

钙敏感性受体(calcium-sensing receptor, CaSR)为 G 蛋白偶联受体 C 家族成员, 包含细胞外氨基末

端、7 次跨膜域、细胞内羧基末端 3 个结构域^[1],以同源二聚体结构表达于细胞表面。1993 年首次于牛甲状旁腺中被发现。随后研究发现 CaSR 还表达在肾脏^[2]、骨^[3]、胃肠道^[4]、神经系统、心血管系统中。CaSR 除参与钙稳态的调节外,还参与细胞增殖、分化、凋亡、趋化的调节;膜电位的调节;激素的分泌;离子通道的调控^[5]。CaSR 在成年及新生鼠心肌细胞中均有表达^[6-7]。Sun 等^[8]研究表明 CaSR 活化可诱导新生鼠心肌细胞凋亡。本课题组已报道 CaSR 活化可促进新生鼠缺血/再灌注模型中心肌细胞的凋亡^[9]。

心肌组织缺血/再灌注损伤后常伴随心肌细胞凋亡、心肌重构及炎症反应。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及白细胞介素-6(IL-6)是两个重要的炎症反应因子。它们不仅在不稳定斑块的发生、演变及斑块破裂过程中起着重要的作用,而且加重心肌细胞凋亡、恶化左室重构^[10-11]。活化的 CaSR 与缺血/再灌注区域炎症反应及信号通道的关系尚无文献明确报道。

p38MAPK 和 JNK 是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)的主要家族成员。MAPK 信号转导通路存在于心肌细胞内,在调节心肌细胞的凋亡、炎症和损伤中发挥重要的作用^[12-13]。

本研究拟建立一个模拟缺血/再灌注模型,探讨 CaSR 活化在缺血/再灌注诱导的心肌细胞凋亡中作用、参与的炎症反应及可能的相关信号通道机制。

1 材料和方法

1.1 材料

出生 1~2 天的 Wistar 大鼠,雌雄不限,由南京医科大学实验动物中心提供。胰蛋白酶(Gibco 公司,美国),DNA 末端标记凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司),GdCl₃ (Sigma 公司,美国),抗 Bcl-2、抗 Caspase-3 和抗 p38MAPK 抗体(Santa Cruz 公司,美国),ABI prism 7000 sequece 检测系统(Applied Bio-systems,美国)。

1.2 方法

1.2.1 原代心肌细胞培养

无菌条件下分离乳鼠心脏,剪碎成 1~2 mm³ 组织块,加 0.06%胰蛋白酶消化分离得到单个心肌细胞,再加入含血清培养液终止消化,离心后弃上清获取底层心肌细胞,加入含 10%小牛血清和 2 μ mol/L 氟脱氧鸟苷(抑制非心肌细胞增殖)的 DMEM 培养液重悬细胞,滤除其中组织块,调整单层细胞密度为

5×10^4 个/cm² 时,即可放于含 5%CO₂、37℃的加湿培养箱中培养。心肌细胞培养 3 d 后,达同步搏动,即可用于下一步实验。

1.2.2 模拟缺血/再灌注模型

参考改进了 Han 等^[14]提出的实验方法,建立缺血/再灌注模型。取培养 3 d 的心肌细胞,弃原培养液,加入含游离血清的 DMEM 培养液,再加入预先用 95% N₂ 和 5% CO₂ 处理 5 min 后的缺血缓冲液(118 mmol/L NaCl, 24 mmol/L NaHCO₃, 20 mmol/L 乳酸钠, 16 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L NaH₂PO₄, 0.5 mmol/L EDTA 钠, pH6.8, 37℃), 然后放入含脱氧剂的 37℃密室中 2 h。此 Anaero-Packd 脱氧系统可提供 O₂ 浓度<1%, CO₂ 浓度大约 5% 的近似缺氧条件。然后培养液置换为 DMEM 正常培养液, 37℃, 95% O₂ 和 5% CO₂ 条件下培养 24 h。

1.2.3 实验分组

培养 3 d 的心肌细胞随机分成 4 组:①对照组:在 DMEM 培养液中连续培养 26 h;②模拟缺血/再灌注组(ischemia/reperfusion, I/R 组):即用上述 I/R 模型建立方法处理心肌细胞;③GdCl₃ 组:再灌注的培养液中含 300 μ mol/L GdCl₃;④GdCl₃ + SB203058 组:再灌注的培养液中含 300 μ mol/L GdCl₃+20 μ mol/L SB203058。下部分析在活性细胞>95%时可进行。

1.2.4 TUNEL 染色检测细胞凋亡

使用 TUNEL (末端脱氧核苷酰基转移酶标记)法检测心肌细胞凋亡。计算凋亡心肌细胞占总心肌细胞比例。

1.2.5 RNA 分离及 RT-PCR 检测 CaSR、TNF- α 和 IL-6 的表达

TRIzol 法提取细胞中总 RNA, 紫外光吸收法 260 nm 处测定 RNA 的浓度和纯度后,每 1 μ g RNA 加 0.2 U/ml 反转录酶, 42℃下逆转录 50 min。CaSR 引物序列参考已报道文献^[9], 上游引物和下游引物分别是 5'-TTCGGCATCAGCTTTGTG-3'和 5'-TGAA-GATGATTTCTGCTTCC-3', 反应条件是:94℃预变性 2 min, 94℃变性 20 s, 55℃退火 40 s, 72℃延伸 40 s, 35 个循环后,最后 72℃延伸 2 min, 产物大小为 230 bp。TNF- α 上游引物:5'-TACTGAACCT-CGGGGT-GAT-3', 下游引物:5'-TTGTCCCTTGAAGAGAACC-3', 扩增后片段长度 290 bp。IL-6 上游引物:5'-AAT-GCCTCGTGCTGTCTGACCC-3', 下游引物:5'-TGTC-CCGACCATTGCTGTTTCC-3', 扩增后片段长度 378 bp。其反应条件为:94℃预变性 5 min, 94℃变性 1

min, 55°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1.5 min, 30 个循环后, 72°C 延伸 5 min。选择 β -actin 基因为内参, 其上游引物: 5'-CGTTGACATCCGTAAGAC-3', 下游引物: 5'-TGGAAGGTGGACAGTGAG-3', 产物 201 bp。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 观察结果。

1.2.6 免疫印迹法测定 Caspase-3、Bcl-2 和 p38MAPK 表达

提取总蛋白: 弃去培养基, 用冰 PBS 冲洗细胞 2 次, 加入含 PMSF 的细胞裂解液, 细胞刮刀刮下细胞, 静置裂解 15 min。4°C, 1 400 r/min 离心 15 min 后取上清, 即为总蛋白。Bradford 法测定蛋白含量。取 20 μ g 蛋白上样, 10% SDS-PAGE 电泳, 后 100 V 电压下 1 h, 将蛋白转至硝酸纤维素薄膜上。膜置入含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T 缓冲液中 37°C 封闭 1 h, 后孵育 Bcl-2、Caspase-3 及 p38MAPK 一抗, 4°C 均匀摇

动过夜。TBS-T 洗膜 3 次后, 室温下均匀摇动孵育碱性磷酸酶标记二抗 2 h, 后 TBS-T 洗膜 3 次。抗原抗体复合物用 NCIP/NBT 测定。

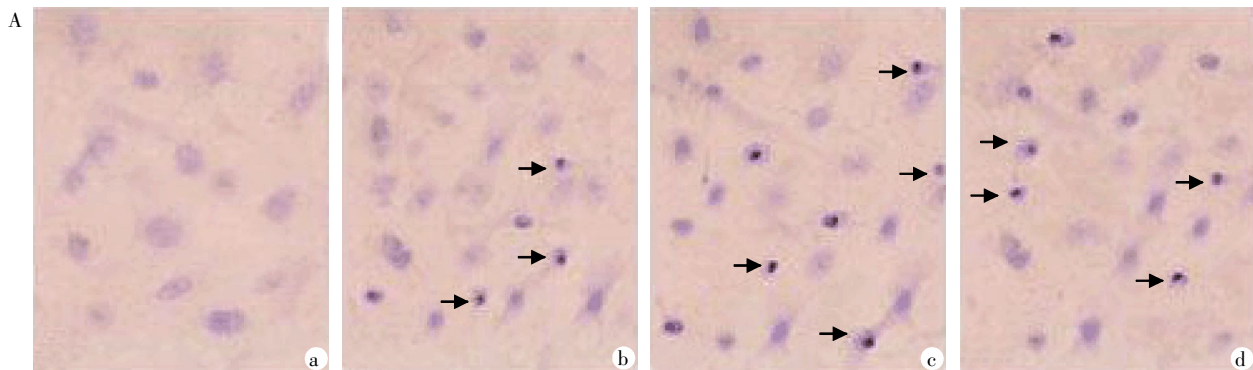
1.3 统计学方法

应用 SPSS13.0 软件进行统计处理。数据用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据对比用 *t* 检验或方差分析。P < 0.05 差异有统计学意义。

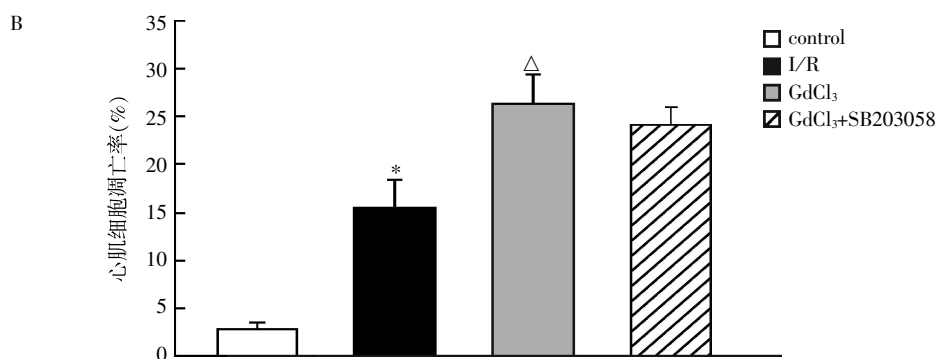
2 结果

2.1 心肌细胞凋亡

凋亡细胞的特征为染色质浓缩深染, 胞体皱缩 (图 1A)。I/R 组心肌细胞与对照组比较存在明显的凋亡 (P < 0.01)。而 GdCl₃ 比 I/R 组又进一步增加了凋亡比率 (P < 0.01)。GdCl₃+SB203058 组凋亡率与 GdCl₃ 组则没有显著差别 (图 1B)。



箭头表示凋亡细胞 (TUNEL, $\times 400$)。a: 正常乳鼠心肌细胞; b: I/R 处理组; c: GdCl₃ 处理组; d: GdCl₃+SB203058 处理组。



与正常对照组相比, *P < 0.01; I/R 组相比, ^P < 0.01。

图 1 心肌细胞凋亡情况的 TUNEL 染色结果及心肌细胞凋亡率的比较

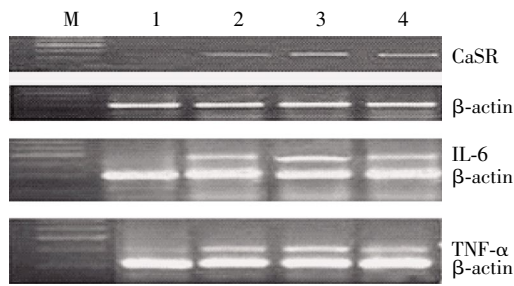
Figure 1 Observation of cardiomyocyte apoptosis by TUNEL staining and comparison of cardiomyocyte apoptotic rate

2.2 CaSR、TNF- α 和 IL-6 mRNA 表达

在 I/R 组 CaSR、TNF- α 和 IL-6 mRNA 的表达较对照组增加 (P < 0.01)。GdCl₃ 较 I/R 组进一步增加了三者的表达 (P < 0.01)。与 GdCl₃ 组相比, GdCl₃+SB203058 组 CaSR 表达无显著差异, 而 TNF- α 和 IL-6 表达则明显降低 (图 2)。

2.3 Bcl-2、Caspase-3 和 p38MAPK 的蛋白表达

I/R 组 Bcl-2、Caspase-3 和 p38MAPK 表达均较对照组增加 (P < 0.01), GdCl₃ 较 I/R 组进一步增加了 Caspase-3 和 p38MAPK 的表达, 而对 Bcl-2 的表达起抑制作用。GdCl₃+SB203058 组, p38MAPK 表达明显降低, 而 Bcl-2、Caspase-3 表达则无明显变化 (图 3)。

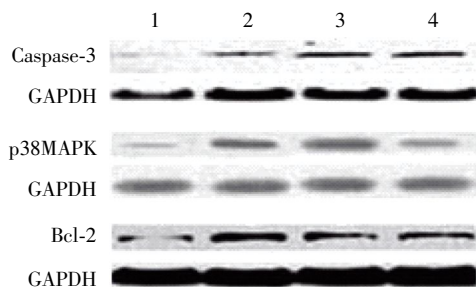
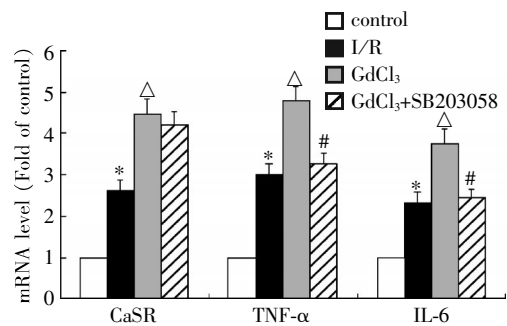


1:对照组;2:I/R组;3:GdCl₃组;4:GdCl₃+SB203058组。

与正常对照组相比, **P* < 0.01; 与 I/R 组相比, [△]*P* < 0.01; 与 GdCl₃ 组相比, #*P* < 0.01。

图 2 半定量 RT-PCR 检测 CaSR、TNF-α 及 IL-6 的表达及表达量比较

Figure 2 Detection and comparison of CaSR, TNF-α and IL-6 expression in cardiomyocytes by Semi-Quantitative RT-PCR

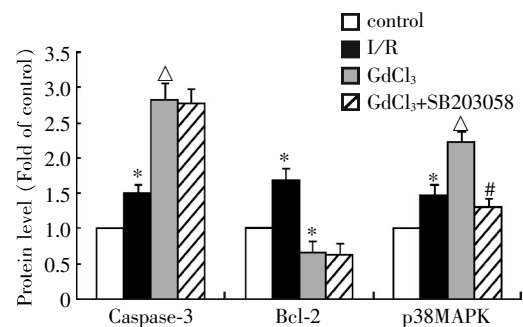


1:对照组;2:I/R组;3:GdCl₃组;4:GdCl₃+SB203058组。

与正常对照相比, **P* < 0.01; 与 I/R 组相比, [△]*P* < 0.01; 与 GdCl₃ 组相比, #*P* < 0.01。

图 3 免疫印迹法检测心肌细胞中 Caspase-3、Bcl-2 和 p38MAPK 表达及表达量的比较

Figure 3 Detection of Caspase-3, Bcl-2 and p38MAPK expression in cardiomyocytes by Western blot



3 讨论

心肌细胞凋亡是导致心肌缺血再灌注损伤的一种主要机制。本课题组已报道 I/R 可导致 CaSR 活化,且 CaSR 活化与 I/R 时心肌细胞凋亡密切相关。CaSR 促心肌细胞凋亡作用是通过上调 Caspase-3 及下调 Bcl-2 实现的^[15]。

炎症是心肌缺血再灌注损伤后一个重要的病理环节。它们不仅在不稳定斑块的发生、演变及斑块破裂过程中起着重要的作用,而且加重心肌凋亡、恶化左室重构^[10-11]。

TNF-α 是由多种细胞产生的一种具有多种效应的细胞因子,主要作用是参与了炎症反应的级联过程。心肌细胞在低氧应激情况下,不仅能转录 TNF-α mRNA,而且还合成其蛋白质。急性心肌梗死时, TNF-α 血浆水平与心肌梗死面积呈正相关。急性心肌梗死后血浆 TNF-α 持续升高伴随较高的心血管病事件发生率^[16-18]。这可能和冠状动脉内持续的炎症反应导致斑块不稳定有关。TNF-α 通过活化核因子 κB(NF-κB),能够激活心肌组织金属蛋白酶,引起心肌重构,导致心功能减退。

IL-6 是一种多功能细胞因子,介导免疫及炎症反应,诱导肝细胞合成 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)^[19-20]。心肌细胞与平滑肌细胞在不同条件下均能产生 IL-6。IL-6 通过以下作用参与急性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)的病理过程,刺激 CRP 和纤维蛋白原的产生^[21],刺激巨噬细胞产生组织因子和基质金属蛋白酶^[22];促进血小板聚集;促进黏附因子和肿瘤坏死的表达和平滑肌细胞的增殖^[23]。循环中 IL-6 水平增高与 ACS 事件的死亡率相关^[24]。

细胞信号转导系统在调节细胞增殖、迁移、分化和代谢等方面具有非常重要的作用^[12]。细胞信号通过受体或类似受体的物质激活细胞内的信号转导通路,触发离子通道的开放、蛋白质可逆性磷酸化反应以及基因表达等改变。

p38MAPK 通路的上游激活因子有小 G 蛋白 Ras 和 Raf 蛋白,启动的下游信号通路包括转录因子和其他激酶^[25]。研究表明心肌细胞中存在的 p38MAPK 信号通路参与炎症反应调节和多种细胞因子的表达^[26-27]。

本研究发现 I/R 时, CaSR 的活化伴随心肌细

胞凋亡增加及 TNF- α 、IL-6、p38MAPK 的表达增加。GdCl₃ 处理 I/R 的心肌细胞使 CaSR 过度表达时,心肌细胞凋亡及 TNF- α 、IL-6、p38MAPK 的表达则进一步增加,但 GdCl₃+SB203058(p38MAPK 特异抑制剂)共同处理心肌细胞时,心肌细胞凋亡与 GdCl₃ 相比无明显改变,但 TNF- α 、IL-6、p38MAPK 的表达均明显下调。此研究结果表明 CaSR 的活化可明显促进 TNF- α 、IL-6 这些炎症介质表达,促进心肌的炎症反应,其机制可能是活化的 CaSR 激活 p38MAPK 信号途径。

TNF- α 作为多效应的细胞因子,不仅参与炎症反应的级联过程,也可诱导细胞的凋亡。本研究 CaSR 的活化可明显促进 TNF- α 的表达,但未发现 TNF- α 升高伴随的心肌细胞凋亡的增加,可能与观察的时间较短有关(24 h)。

本研究结果表明 CaSR 的活化不仅参与 I/R 诱导的新生鼠心肌细胞凋亡,亦可能通过激活 p38MAPK 信号途径促进炎症反应特别是 TNF- α 及 IL-6 的释放加重心肌的损伤,加重心肌缺血再灌注损伤的不良预后。

[参考文献]

- [1] Bai M. Structure and function of the extracellular calcium-sensing receptor[J]. *Int J Mol Med*, 1999, 4(2): 115-125
- [2] Kwak JO, Kwak J, Kim HW, et al. The extracellular calcium sensing receptor is expressed in mouse mesangial cells and modulates cell proliferation [J]. *Exp Mol Med*, 2005, 37(5): 457-465
- [3] Jung SY, Kwak JO, Kim HW, et al. Calcium sensing receptor forms complex with and is up-regulated by caveolin-1 in cultured human osteosarcoma (Saos-2) cells [J]. *Exp Mol Med*, 2005, 37(2): 91-100
- [4] Bevilacqua M, Dominguez LJ, Righini V, et al. Increased gastrin and calcitonin secretion after oral calcium or peptones administration in patients with hypercalciuria: a clue to an alteration in calcium-sensing receptor activity [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(3): 1489-1494
- [5] Zhang W, Xu C. Calcium sensing receptor and heart disease[J]. *Pathophysiology*, 2009, 16(4): 317-323
- [6] Wang R, Xu C, Zhao W, et al. Calcium and polyamine regulated calcium-sensing receptors in cardiac tissues[J]. *Eur J Biochem*, 2003, 270(12): 2680-2688
- [7] Tfelt-Hansen J, Hansen JL, Smajilovic S, et al. Calcium receptor is functionally expressed in rat neonatal ventricular cardiomyocytes [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290(3): H1165-1171
- [8] Sun YH, Liu MN, Li H, et al. Calcium-sensing receptor induces rat neonatal ventricular cardiomyocyte apoptosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 350(4): 942-948
- [9] Yan L, Zhu TB, Sun TT, et al. Activation of calcium-sensing receptor is associated with apoptosis in a model of simulated cardiomyocytes ischemia/reperfusion [J]. *J Biochem Res*, 2010, 24(4): 301-307
- [10] Mulvihill NT, Foley JB, Murphy RT, et al. Risk stratification in unstable angina and non-Q wave myocardial infarction using soluble cell adhesion molecules[J]. *Heart*, 2001, 85(6): 623-627
- [11] Lindmark E, Diderholm E, Wallenin L, et al. Relationship between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary heart disease: effects of an early invasive or noninvasive strategy[J]. *JAMA*, 2001, 286(17): 2107-2113
- [12] Kishimoto T, Taga T, Akira S. Cytokine signal transduction[J]. *Cell*, 1994, 76(2): 253-262
- [13] Kyriakis JM, Avruch J. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines [J]. *Bioessays*, 1996, 18(7): 567-577
- [14] Han LP, Xu CQ, Li HZ, et al. Effects polyamines on apoptosis induced by simulated ischemia/reperfusion injury in cultured neonatal rat cardiomyocytes [J]. *Cell Biol Int*, 2007, 31(11): 1345-1352
- [15] Hattori R, Hernandez TE, Zhu L, et al. An essential role of the antioxidant gene Bcl-2 in myocardial adaptation to ischemia: an insight into antisense Bcl-2 therapy[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2001, 3(3): 403-413
- [16] Lin XM, Zhang ZY, Wang LF, et al. Attenuation of tumor necrosis factor-alpha elevation and improved heart function by postconditioning for 60 seconds in patients with acute myocardial infarction [J]. *Chin Med J(Engl)*, 2010, 123(14): 1833-1839
- [17] Sugano M, Tsuchida K, Hata T, et al. In vivo transfer of soluble TNF-alpha receptor 1 gene improves cardiac function and reduces infarct size after myocardial infarction in rats[J]. *FASEB J*, 2004, 18(7): 911-913
- [18] Saito Y, Watanabe K, Fujioka D, et al. Disruption of group IVA cytosolic phospholipase A2 attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury partly through inhibition of TNF- α -mediated pathway [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 302(10): H2018-2030
- [19] Koenig W, Khuseynova N. Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(1): 15-26
- [20] Luigi MB, Giovanna L, Giamila F, et al. Increasing levels of interleukin (IL)-1Ra and IL-6 during the first 2 days of hospitalization in unstable angina are associated with

- increased risk of in-hospital coronary events [J]. Circulation, 1999, 99(16): 2079-2084
- [21] Willibald M, Lukasa A, Altwegg RC, et al. Inflammatory markers at the site of ruptured plaque in acute myocardial infarction: locally increased interleukin-6 and serum amyloid a but decreased C-reactive protein [J]. Circulation, 2005, 111(11): 1355-1361
- [22] McEvoy MD, Taylor AG, Zavadzka JA, et al. Aprotinin exerts differential and dose-dependent effects on myocardial contractility, oxidative stress, and cytokine release after ischemia-reperfusion [J]. Ann Thorac Surg, 2008, 86(2): 568-575
- [23] AO L, Zou N, Cleveland JC Jr, et al. Myocardial TLR4 is a determinant of neutrophil infiltration after global myocardial ischemia: mediating KC and MCP-1 expression induced by extracellular HSC70 [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 297(1): H21-28
- [24] Kavsak PA, Ko DT, Newman AM, et al. Risk stratification for heart failure and death in an acute coronary syndrome population using inflammatory cytokines and N-terminal pro-brain natriuretic peptide [J]. Clin Chem, 2007, 53(12): 2112-2118
- [25] Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, et al. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Circulation, 2011, 123(6): 594-604
- [26] Fanger GR, Gerwing P, Widman C, et al. MEKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases [J]. Curr Opin Genet Dev, 1997, 7(1): 67-74
- [27] McDermott EP, O'Neill LA. Ras participates in the activation of p38 MAPK by interleukin-1 by associating with IRAK, TRAF6 and TAK-1 [J]. J Biol Chem, 2002, 277(10): 7808-7815

[收稿日期] 2012-03-13

本刊来稿题名和作者署名的注意事项

1. 题名

- (1) 题名应以简明、确切的词语反映文章中最重要特点内容,要符合编制题录、索引和检索的有关原则,并有助于选定关键词。
- (2) 中文题名一般不超过 20 个字,必要时可加副题名。
- (3) 英文题名应与中文题名含义一致。
- (4) 题名应避免使用非公用的缩写词、字符、代号,尽量不出现数学式或化学式。

2. 作者署名和工作单位

- (1) 文章都应有作者署名,这是文责自负和拥有著作权的标志;
- (2) 作者姓名署于题名下方;
- (3) 英文摘要中附与中文同样的作者姓名与排列顺序,写法为:姓前名后,姓全部大写,名的首字母大写,其余字母小写,名间加连字符,如 ZHOU Ping, SHI Hong-lei;
- (4) 作者单位需注明全称(标注到二级或三级单位,如“南京医科大学第一附属医院心内科”,“南京医科大学公共卫生学院流行病学与统计学系”)、所在城市及邮政编码;
- (5) 对于有基金课题资助的论文需在课题负责人的名字后加上标“*”,并在论文首页下补充基金的名称、编号,以及课题负责人的 E-mail。
- (6) 本刊对于没有课题资助的文章一律不标注通讯作者。

(本刊编辑:接雅俐)