

曲古抑菌素 A 对大鼠脂肪干细胞在二维及三维培养下早期骨向分化的影响

李娜¹, 陈刚¹, 刘珏¹, 章非敏^{1*}, 夏阳^{1*}, 顾宁²

(¹南京医科大学口腔医学研究所, 江苏 南京 210029; ²东南大学苏州研究院, 江苏 苏州 215000)

[摘要] 目的:研究曲古抑菌素 A(trichostatin A, TSA)对大鼠脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)在二维培养板(TCP)和三维复合纳米羟基磷灰石/胶原(nano-hydroxyapatite/collagen, nHAC)支架上早期骨向分化的影响。方法:处理组分别在含 75 nmol/L TSA 的二维培养板和三维 nHAC 上培养 ADSCs(TCPT 组和 nHACT 组),未添加 TSA 的两组(TCP 组和 nHAC 组)为对照组。使用扫描电子显微镜(field emission scanning electron microscope, FESEM)对接种 ADSCs 1、3 d 后 nHAC 和 nHACT 组细胞的生长情况进行表征,以碱性磷酸酶(ALP)活性为早期骨向分化指标,分别检测 3、5、7 d 时的 ALP 活性,用 Western blot 检测成骨指标 Runx2、骨桥蛋白(OPN)、骨形态发生蛋白 2(BMP2)的表达。结果:ADSCs 在三维培养中均表现出良好的粘附、铺展,其中经 TSA 诱导的细胞对支架的黏附、铺展更好;ALP 值在 3、5、7 d 持续增高,其中以 nHACT 组最高,组间差异显著($P < 0.05$);Western blot 结果显示 Runx2、OPN、BMP2 在 nHACT 组表达最高,与 ALP 结果一致。结论:TSA 对 ADSCs 早期骨向分化有促进作用,复合三维支架共培养后促进作用显著。

[关键词] 曲古抑菌素 A;纳米羟基磷灰石/胶原;脂肪干细胞;分化

[中图分类号] Q254

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)04-472-06

doi:10.7655/NYDXBNS20140414

Effects of trichostatin A on the early osteogenic differentiation of RAT adipose-derived stem cells cultured in two-dimensional and three-dimensional systems

Li Na¹, Chen Gang¹, Zhang Feimin^{1*}, Xia Yang^{1*}, Gu Ning²

(¹Institute of Stomatology, NJMU, Nanjing 210029; ²Suzhou Institute, Southeast University, Suzhou 215000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of trichostatin A (TSA) on the osteogenic differentiation of rat adipose-derived stem cells (ADSCs) in two-dimensional tissue culture plastic and three-dimensional nano-hydroxyapatite/collagen (nHAC) scaffold. **Methods:** ADSCs were cultured in two-dimensional tissue culture plastic (TCPT) and three-dimensional nHAC (nHACT) which contained 75 nmol/L TSA, and two groups without TSA (the TCP group and the nHAC group) were set as control. One and three days after ADSCs seeded onto the nHAC scaffold, the cells were characterized by field emission scanning electron microscope (FESEM). The alkaline phosphate (ALP) activity was detected to evaluate the early osteogenic differentiation at 3, 5, 7 d. Western blot was performed to detect the expression of Runx2, OPN and BMP2 proteins. **Results:** On nHAC, ADSCs were well adhered to and fully extended on the scaffold with TSA. ADSCs on TSA treated scaffold presented better. The data of ALP was continuously increased at 3, 5, 7 d. The highest expression of ALP occurred in nHACT had significant difference between groups ($P < 0.05$). Western blot demonstrated that Runx2, OPN and BMP2 protein in the nHACT groups increased more evidently than the other groups, with the same trends as ALP results. **Conclusion:** TSA could improve the early osteogenic differentiation of ADSCs, especially in the three-dimensional nHAC scaffold.

[Key words] trichostatin A; nano-hydroxyapatite/collagen; adipose-derived stem cells; osteogenic differentiation

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(04):472-477]

[基金项目] 江苏高校优势学科建设工程资助项目(2011-137);江苏省医学领军人才与创新团队;苏州市国际科技合作项目(SH201114)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: fmzhang@njmu.edu.cn; xiayangxy@sina.com

脂肪干细胞(adipose derived stem cells, ADSCs) 是 2001 年由 Zuk 等^[1]首次在脂肪组织中发现并提取的一群与骨髓间充质干细胞类似的具有多向分化潜能和生物学特性的细胞。且脂肪组织的来源更加广泛,但其体外成骨性能较骨髓间充质干细胞弱^[2-3]。利用外源性因子、药物诱导、支架材料等方式能成功诱导脂肪干细胞成骨性分化^[4]。羟基磷灰石具有良好的生物相容性和生物活性,能与骨形成很强的化学结合,因此已作为优良的人工骨材料及组织材料得到了广泛的应用^[5-7]。近年来曲古抑菌素((trichostatin, TSA)主要作为抗肿瘤药物而应用于基础和临床试验中,近期有研究表明 TSA 可诱导干细胞的多向分化,同时有文献报道 TSA 可诱导 ADSCs 成骨分化^[8-9]。

本实验通过研究 TSA 对 ADSCs 在二维培养板以及三维纳米羟基磷灰石/胶原(nano-hydroxyapatite/collagen, nHAC)上培养细胞黏附和骨向分化能力的影响,探讨 TSA 和三维培养以及两者结合在促进 ADSCs 成骨分化上应用的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料

SD 大鼠 ADSCs (广州赛业生物科技有限公司),取第 2~5 代进行相关实验。nHAC(北京奥精医药科技有限公司)。SD 大鼠脂肪间充质干细胞完全培养基(广州赛业生物科技有限公司)。TSA、CCK-8 试剂盒(杭州碧云天)。Triton X-100(杭州国药集团化学试剂有限公司)。0.25%胰酶-EDTA(Gbico 公司,美国)。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)检测试剂盒(北京中生北控生物科技股份有限公司)。胎牛血清(Hyclone 公司,美国)。Runx2、骨桥蛋白(OPN)、骨形态发生蛋白 2(BMP2)抗体、内参 GAPDH 抗体(南京 Bioworld 公司),辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(杭州碧云天),发光液(Millipore 公司,美国)。S-4800 场发射扫描电镜(Hitachi 公司,日本),酶标仪(ELX800, BioTek 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

实验分组如下: ①二维培养+诱导组(TCPT): TSA 75 nmol/L; ②纯支架组(nHAC); ③支架+诱导组(nHACT): TSA 75 nmol/L+nHAC; ④二维未处理组(TCP)。

1.2.2 支架预培养以及 TSA 干预培养

将 Co⁶⁰ 照射消毒后的 nHAC 在无菌环境下切成直径 5 mm,厚 1 mm 的小圆片,置于 96 孔板内。

75%乙醇浸泡 4 h 后,弃酒精, PBS 清洗 3 遍后,加入 200 μ l 完全培养液浸没支架材料,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中预培养 24 h。另设两组不加支架材料,处理方式相同。预培养 24 h 后,彻底吸净培养液。按 5 \times 10³ 个/孔的密度接种 ADSCs,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 和 100%湿度中培养。8 h 后,待细胞完全贴壁, TCPT 和 nHACT 组换含有 TSA 75 nmol/L 的完全培养基,同时其余组换完全培养基继续培养。3 d 后所有组均换成完全培养基继续培养。

1.2.3 细胞铺展形态观察

分别在培养 1, 3 d 后, nHAC 和 nHACT 组吸弃原培养液,用 PBS 冲洗 3 遍后, 2.5%的戊二醛室温固定 1 h,酒精梯度脱水至无水酒精,冷冻 24 h 后真空干燥 2 d。然后将 nHAC 和 nHACT 喷金,分别在扫描电镜(FESEM)下观察细胞黏附、铺展形态。

1.2.4 细胞增殖检测

支架预处理以及细胞培养条件同 1.2.2。分别在培养 3, 5, 7 d 后,从孵箱中取出 96 孔板,各组吸弃原培养液,用 PBS 清洗 3 遍后加入 100 μ l 蒸馏水, 37 $^{\circ}$ C 和 -70 $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次,每孔再加入 100 μ l 20 μ g/ml Hoechst 33258 染液,室温避光反应 10 min 后,吸取上清液至另一 96 孔板,最后荧光酶标仪设置激发波长 360 nm,检测波长 460 nm 检测吸光度,并绘制标准曲线,按标准曲线计算细胞数。

1.2.5 ALP 活性检测

支架预处理以及细胞培养条件同 1.2.2。此时培养基采用成骨诱导分化培养基。分别在培养 3, 5, 7 d 后,从孵箱中取出 96 孔板,各组吸弃原培养液,用 PBS 清洗 3 遍后,每孔加入 50 μ l 0.25% Triton X-100, -70 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 反复冻融 3 遍裂解细胞。加入 100 μ l 反应底物 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 后,取上清液置于另一 96 孔板中,用酶标仪于 405 nm 波长下测吸光度值。将 ALP 活性检测所得吸光度均值除以同组增殖均值后进行统计分析,以排除细胞总量的不同对 ALP 值的影响。

1.2.6 Western blot 检测 Runx2、OPN、BMP2 的表达

支架预处理和细胞培养条件同 1.2.2, 3 d 后, PBS 反复清洗 3 遍,胰酶消化并离心收集细胞,提取总蛋白,用 Bradford 法测定蛋白质浓度。各组等量蛋白质采用 10%聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳进行分离,然后转至 PVDF 膜上,室温下封闭摇动(TBS-T+5%脱脂奶粉) 2 h 后,加入 Runx2、OPN、BMP2 单克隆抗体 4 $^{\circ}$ C 过夜,第 2 天室温下洗膜后加入山羊抗小鼠 IgG 抗体 1 h,洗膜后用化学发光底物进

行发光显迹。

1.3 统计学方法

所有定量数据均由采用统计分析软件 SPSS17.0 进行单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义, 结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 细胞铺展情况

图1为 nHAC 和 nHACT 组的 FESEM 图片, 可见支架为一种多孔结构, 表面高低不平。可见 1、3 d 时, ADSCs 在 nHAC 和 nHACT 上黏附, 铺展良好,

nHACT 组的细胞较 nHAC 组扁平而呈多形性, nHACT 组细胞出现较多伪足伸展贴附于材料表面, 黏附铺展较好。而 nHAC 组未见明显细胞铺展, 细胞呈长梭形, 伪足较少。

2.2 细胞增殖检测

图2为 ADSCs 在二维以及三维环境下培养 3、5、7 d 后细胞增殖的检测结果。单因素方差分析结果表明, 在 3、5 和 7 d 时, TCPT 和 nHAC 组与 TCP 组均无统计学差异($P > 0.05$)。在 5 d 时, nHACT 与 TCP 组存在统计学差异($P < 0.05$), 在 7 d 时, nHACT 与 TCP 组存在显著差异($P < 0.01$)。

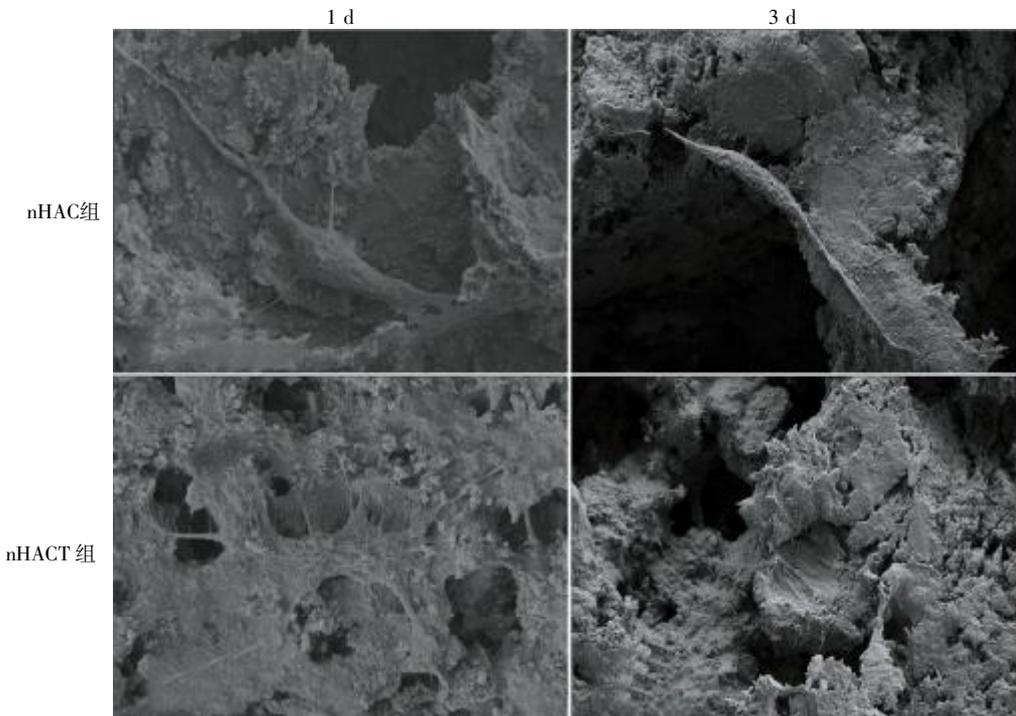


图1 nHAC 和 nHACT 组的扫描电镜图($\times 2000$)

Figure 1 The SEM images of nHAC and nHACT($\times 2000$)

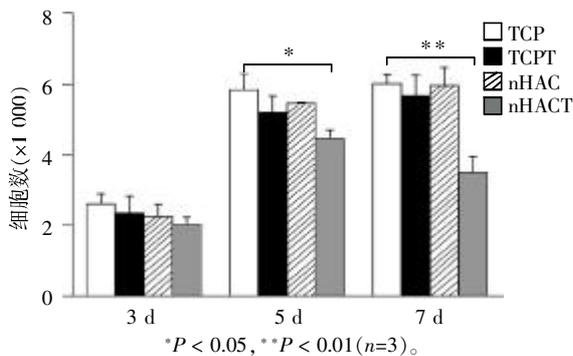


图2 TCP、TCPT、nHAC、nHACT 的增殖检测结果

Figure 2 The proliferation results of ADSCs on TCP, TCPT, nHAC and nHACT scaffolds

2.3 ALP 活性检测

图3为 ADSCs 在二维以及三维环境下成骨诱导培养 3、5、7 d 后的 ALP 活性。单因素方差分析结果表明, 在 3 d 时, TCPT 与 TCP 组存在显著差异($P < 0.01$), nHAC、nHACT 分别与 TCP 组存在统计学差异($P < 0.05$)。在 5 d 时, TCPT 与 TCP 组无明显差异($P > 0.05$), nHAC 与 TCP 组存在统计学差异($P < 0.05$); nHACT 组与 TCP 组存在显著差异($P < 0.01$)。在 7 d 时, TCPT 与 TCP 组存在统计学差异($P < 0.05$); nHAC、nHACT 组分别与 TCP 组存在显著差异($P < 0.01$)。

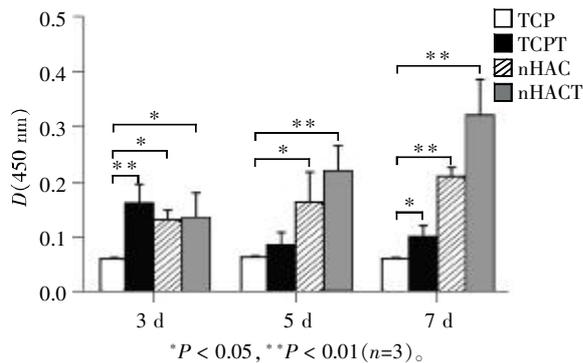
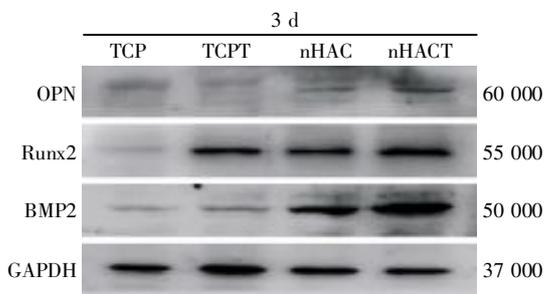
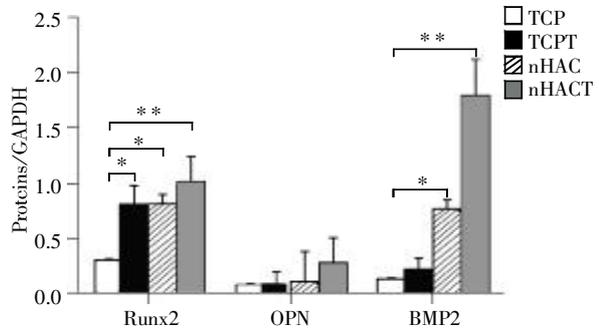


图 3 TCP、TCPT、nHAC、nHACT 的 ALP 活性检测结果
Figure 3 The ALP results of ADSCs on TCP, TCPT, nHAC and nHACT scaffolds



2.3 Western blot

图 4 为 ADSCs 接种在二维以及三维环境下成骨诱导培养 3 d 后, Western blot 检测 Runx2、OPN 和 BMP2 表达的情况。结果显示: Runx2 的表达中, TCPT 组和 nHAC 组比 TCP 组表达量均高, 存在统计学差异 ($P < 0.05$); nHACT 组比 TCP 组表达量高, 显著差异 ($P < 0.01$)。OPN 的表达在各组间差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$)。BMP2 表达中, TCPT 组与 TCP 组差异不明显; nHAC 组比 TCP 组表达量高, 存在统计学差异 ($P < 0.05$); nHACT 组比 TCP 组的 BMP2 的表达量高, 存在显著差异 ($P < 0.01$)。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图 4 2D 和 3D 培养下 Western blot 检测 Runx2、OPN、BMP2 表达的情况
Figure 4 Western blot analysis for the expression of Runx2, OPN and BMP2 in 2D and 3D cultures

3 讨论

骨组织工程的 3 大要素: 支架材料、种子细胞、细胞因子。自 Zuk 等^[1]首次提出脂肪干细胞至今, 因其取材方便, 生长、增殖能力强, 且具有多向分化潜能, 受到广泛关注, 但其体外成骨分化能力较经典的骨髓间充质干细胞弱, 这一缺点限制了脂肪干细胞在骨组织工程中的应用。如何提高其成骨分化, 以便将其作为骨组织工程的种子细胞, 一直都是研究的重点。羟基磷灰石支架材料可以促进表面骨样磷灰石表层的形成, 可选择性地吸收诸如纤维蛋白等血清蛋白, 能够诱导体外培养的骨髓间质细胞中碱性磷酸酶的表达, 在体内则能够定向诱导干细胞分化成成骨细胞^[10-13]。Li 等^[14]研究发现纳米羟基磷灰石的骨诱导性比羟基磷灰石更好, 但其成骨诱导能力较弱, 需进一步以复合生长因子来提高支架材料的骨诱导性。

乙酰化酶抑制剂 TSA 之前主要作为抗肿瘤药物而应用于基础和临床试验中。近期有研究表明 TSA 可诱导干细胞的多向分化。Hu 等^[15]采用 TSA

体外诱导培养大鼠的脂肪干细胞 3 d 后, 发现经 TSA 诱导的同时加入成骨诱导培养液较未经 TSA 诱导组, ADSCs 的成骨分化显著提高。杨舸等^[16]研究发现经 TSA 干预 48 h 后的骨髓间充质干细胞 (MSCs), 给与其一定的体外心肌微环境, 对 MSCs 向心肌样细胞的特化有促进作用。TSA 主要使干细胞的组蛋白 H3 和 H4 在核外乙酰化水平增强, 诱导一些基因的转录活性^[17]。此时给与细胞一定的微环境, 理论上可以促进干细胞向特定的方向分化。这些提示, 如果给与干细胞一个理想的成骨微环境, 加上 TSA 的诱导作用, 是否可以提高干细胞的成骨分化效率? 本研究使用的 nHAC 是一种纳米羟基磷灰石/胶原复合材料, 是根据仿生原理制备的重组胶原矿化的支架材料, 孔隙率一般在 60%~90%, 具有与天然骨相似的疏松结构, 多孔网状结构可为种子细胞的生长以及在材料上的增殖、分化和代谢提供支架环境。此外, nHAC 所含纳米级羟基磷灰石 (hydroxyapatite, HA) 可以增强材料的生物活性, 促使 ADSCs 向成骨分化。因此本研究考虑通过 TSA 的诱导作用, 促进 ADSCs 的部分基因进入转录状态, 复合

nHAC 支架材料培养后,让支架材料提供 ADSCs 良好的成骨微环境,探究其复合效应对 ADSCs 成骨分化的作用。

本研究主要对 ADSCs 的黏附和早期骨向分化进行了初步检测。扫描电镜观察,ADSCs 在支架的表面和内部稳定生长。经 TSA 诱导后,细胞伪足变多,呈多角形分化,支架材料表面有大面积细胞类基质生成,细胞铺展黏附良好。说明 TSA 不仅不影响 ADSCs 在支架上的黏附,同时能促进细胞的分化,使细胞呈扁平多角形,进而更有利于 ADSCs 的早期黏附、铺展。提示 ADSCs 在复合支架培养后,进一步经过 TSA 的诱导,促进了 ADSCs 在支架上的黏附。细胞增殖结果显示,TSA 对细胞的增殖有一定的抑制作用,这与之前的学者研究一致^[14]。可能正是因为 TSA 促使细胞进入转录状态,反而抑制了其增殖活性。

Runx2 是转录因子 Runx 家族成员之一,作为成骨细胞的特异转录因子,决定着多能干细胞向成骨细胞分化,主要参与成骨分化的早期调控^[18]。OPN 是成骨分化的一种晚期指标。BMP 是一类具有高效成骨诱导活性的蛋白质,BMP2 是其中最重要的一种成骨促进因子,能诱导间充质干细胞向成骨细胞方向分化,促进成骨^[19-20]。Western blot 检测结果显示,二维培养环境下经 TSA 诱导的 ADSCs,Runx2、OPN 和 BMP2 的表达升高,但效果不显著。单独使用 nHAC 培养,ADSCs 也表达 Runx2 和 BMP2,同时轻微表达 OPN,提示纳米羟基磷灰石/胶原复合材料对 ADSCs 也有一定的促进成骨分化的作用。在三维培养环境下,加入 TSA 干预诱导 3 d 后,Runx2、BMP2 的表达最高,与其他组都存在显著差异,同时 OPN 表达量也最高,但并不显著,这可能是由于 OPN 为成骨晚期分化的指标,在早期生成较少。提示 TSA 可能促进 ADSCs 的部分基因进入转录状态,nHAC 支架材料为 ADSCs 提供了一个成骨诱导的环境,从而更促进了 ADSCs 向成骨分化。

ALP 是成骨潜能细胞向成骨方向分化的早期标志^[21]。本实验对 4 个组 3、5、7 d 后的 ADSCs 进行了 ALP 活性的检测。结果表明,虽然增殖结果显示 TSA 对细胞增殖有抑制作用,与之前 Hu 等^[15]研究结果一致,然而除去细胞数目的影响后,TCPT 组的 ALP 值高于 TCP 组,nHACT 组的 ALP 值高于 nHAC 组,且组间差异显著。说明 TSA 与支架材料的协同作用促进了 ADSCs 的成骨分化,与 Western blot 检测结果一致。

从本研究结果可以看出,TSA 与 nHAC 分别对 ADSCs 有促骨向分化的作用,其复合效应对 ADSCs 的促分化作用更明显,TSA 与 nHAC 联合使用是改善 ADSCs 骨向分化的有效方法。但本研究仅检测了早期骨向分化的指标,体外晚期分化、体内的转化,以及 TSA 处理时间的长短对细胞成骨分化的影响还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Zuk PA,Zhu M,Mizuno H,et al. Multilineage cells from human adipose tissue:implications for cell-based therapies[J].*Tissue Eng*,2001,7(2):211-228
- [2] Peng L,Jia Z,Yin X,et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage and adipose tissue[J]. *Stem Cells Dev*,2008,17(4):761-773
- [3] Lee RH,Kim B,Choi I,et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue [J]. *Cell Physiol Biochem*,2004,14(4-6):311-324
- [4] 徐 炜,王明国,马 锋,等. 富血小板纤维蛋白对兔脂肪干细胞成骨分化的影响[J]. *口腔生物医学*,2013,4(1):19-22
- [5] Van der Wal BC,Vischjager M,Grimm B,et al.Periprosthetic fractures around cementless hydroxyapatite-coated femoral stems[J]. *Int Orthop*,2005,29(4):235-240
- [6] Lavos-Valereto IC,Konig B,Rossa C Jr,et al. A study of histological responses from Ti-6Al-7Nb alloy dental implants with and without plasma-sprayed hydroxyapatite-coating in dogs [J]. *J Mater Sci Mater Med*,2001,12(3):273-276
- [7] 彭莎莎,姚 菁,陈 刚,等. 多肽水凝胶复合支架对大鼠脂肪干细胞体外增殖和分化的影响[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*,2013,33(3):318-322
- [8] De Boer J,Licht R,Bongers M,et al. Inhibition of histone acetylation as a tool in bone tissue engineering[J]. *Tissue Eng*,2006,12(10):2927-2937
- [9] Snykers S,Vanhaecke T,De Becker A,et al. Chromatin remodeling agent trichostatin A:a key-factor in the hepatic differentiation of human mesenchymal stem cell derived of adult bone marrow[J]. *BMC Dev Biol*,2007,7(1):24
- [10] Bernhardt A,Despang F,Lode A,et al. Proliferation and osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on alginate-gelatine-hydroxyapatite scaffolds with anisotropic pore structure [J]. *J Tissue Eng Regen Med*,2009,3(1):54-62
- [11] Bernhardt A,Lode A,Mietrach C,et al. In vitro osteogenic potential of human bone marrow stromal cells cultivated in

- porous scaffolds from mineralized collagen [J]. *J Biomed Mater Res*, 2009, 90(3): 852–862
- [12] Okumura M, Ohgushi H, Dohi Y, et al. Osteoblastic phenotype expression on the surface of hydroxyapatite ceramics [J]. *J Biomed Mater Res*, 1997, 37(1): 122–129
- [13] 袁 华, 陈 宁, 吕晓迎, 等. 天然羟基磷灰石-壳聚糖复合材料修复骨缺损的实验研究 [J]. *口腔医学*, 2005, 25(2): 65–67
- [14] Li T, Takikawa K, Yoshizawa K, et al. Reaction of hydroxyapatite-sol in bone marrow [J]. *Biomed Mater Eng*, 1995, 5(2): 83–92
- [15] Hu X, Zhang X, Dai L, et al. Histone deacetylase inhibitor trichostatin a promotes osteogenic differentiation of rat adipose-derived stem cells by altering the epigenetic modifications on Runx2 promoter in a BMP signaling-dependent manner [J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(2): 248–255
- [16] 杨 舸, 朱 静. 曲古抑菌素干预骨髓间充质干细胞向心肌细胞特化体外实验 [J]. *重庆医科大学学报*, 2009, 34(4): 389–392
- [17] Richon VM, O'Brien JP. Histone deacetylase inhibitors: a new class of potential therapeutic agents for cancer treatment [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(3): 662–664
- [18] Lee MH, Kim YJ, Yoon WJ, et al. Dlx5 specifically regulates Runx2 type II expression by binding to homeodomain-response elements in the Runx2 distal promoter [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(42): 35579–35587
- [19] Govender S, Csimma C, Genant HK, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2002, 84-A(12): 2123–2134
- [20] Sasano Y, Ohtani E, Narita K, et al. (1993). BMPs induce direct bone formation in ectopic sites independent of the endochondral ossification *in vivo* [J]. *Anat Rec*, 236(2): 373–380
- [21] Dalby MJ, Gadegaard N, Tare R, et al. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder [J]. *Nat Mater*, 2007, 6(12): 997–1003
- [收稿日期] 2013–10–27

.....

(上接第 456 页)

- factor mRNAs by human Tenon's capsule fibroblasts [J]. *Exp Eye Res*, 1996, 63(3): 339–346
- [16] Cordeiro MF, Gay JA, Khaw PT. Human anti-transforming growth factor- β 2 antibody: a new glaucoma anti-scarring agent [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40(10): 2225–2234
- [17] Foster R, Hu KQ, Lu Y, et al. Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and *in vivo* farnesylation [J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(6): 2689–2699
- [18] Riento K, Totty N, Villalonga P, et al. RhoE function is regulated by ROCK I-mediated phosphorylation [J]. *EMBO J*, 2005, 24(6): 1170–1180
- [19] Villalonga P, Guasch RM, Riento K, et al. RhoE inhibits cell cycle progression and Ras-induced transformation [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(18): 7829–7840
- [收稿日期] 2013–12–23