

天然属性抗 LDL 及 oxLDL IgM 亚类抗体的制备与鉴定*

袁媛¹ 徐瑞芬² 何争³ 李成祥³ 李静霞³ 王海昌³ 冯旭阳^{3△}

(1 第四军医大学病理与病理生理学 陕西 西安 710032 2 口腔医院麻醉科 陕西 西安 710032 ;

3 西京医院心脏内科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:制备天然属性抗低密度脂蛋白(LDL)及抗氧化低密度脂蛋白(oxLDL)IgM 亚类抗体。方法:给予 Balb/c 小鼠高胆固醇饮食,4 周后取脾细胞直接与 SP2/0 细胞融合,以纯化的 LDL 及 oxLDL 为抗原,对阳性杂交瘤细胞生长孔进行间接 ELISA 筛选。鉴定杂交瘤上清的免疫球蛋白亚类,进而采用免疫沉淀和免疫印迹法对获得的抗体进行免疫学反应性鉴定。结果:杂交瘤细胞分泌的抗 LDL 及抗 oxLDL 的天然抗体通过 ELISA 法被筛选出来,可以与 LDL 或 oxLDL 发生高亲和力结合,经过 4 次克隆化,最终获得 2 株稳定分泌天然抗 LDL 的抗体,命名为 5G8 和 2H7,及 1 株稳定抗 oxLDL 的抗体,命名为 3A6,3 株抗体均属于 IgM 亚类,无交叉反应,可以满足免疫印迹、免疫沉淀等实验要求。结论:成功制备了抗 LDL 及抗 oxLDL IgM 亚类抗体,为研究天然抗体在体内脂质代谢和相关心脑血管疾病如动脉粥样硬化等发生发展中的作用提供了重要的研究工具。

关键词 天然抗体;单克隆抗体;杂交瘤技术;低密度脂蛋白;氧化低密度脂蛋白

中图分类号 Q95-3 R543.5 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)06-1043-05

Generation and Identification of Natural Monoclonal Antibodies against LDL and oxLDL*

YUAN Yuan¹, XU Rui-fen², HE Zheng³, LI Cheng-xiang³, LI Jing-xia³, WANG Hai-chang³, FENG Xu-yang^{3△}

(1 Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;

2 Department of Anesthesiology, School of Stomatology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;

3 Department of Cardiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: To produce natural mouse IgM monoclonal antibodies (MAbs) against low-density lipoprotein and oxidized low-density lipoprotein with high specificity and activity. **Methods:** BALB/c mice were fed with high cholesterol diet; The splenocytes cells were directly fused with Sp2/0 myeloma cells by standard hybridoma production techniques. Hybridomas were selected on the basis of the ability of supernatant to bind natural LDL and oxLDL in indirect ELISA. Hybridomas were identified by western blotting and immunoprecipitation. **Results:** The hybridomas producing anti-LDL and anti-oxLDL antibodies were screened by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and isotype was identified. Two hybridoma cell lines, named 5G8, and 2H7, were developed which could secrete anti-LDL MAbs stably. One hybridoma cell lines, named 3A6 was developed which could secrete anti-oxLDL MAbs stably. The three hybridoma cell lines were all belonged to IgM subclass, and no cross reactions were found between these MAbs. The specificity of MAb was determined based on activity of western blotting and immunoprecipitation. **Conclusion:** The natural mouse IgM monoclonal antibodies (MAbs) against LDL and against oxLDL with high specificity and activity were produced successfully by using standard hybridoma production techniques, which could provide potential tool for the research on lipid metabolism and atherosclerosis progression.

Key words: Natural antibodies; Monoclonal antibodies; Hybridoma; LDL; oxLDL

Chinese Library Classification: Q95-3, R543.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)06-1043-05

前言

天然抗体通常定义为在完全缺乏任何外源性的抗原刺激下,正常个体内存在的抗体。天然抗体是体液免疫系统一大类丰富的成分,在防御抵抗入侵病原体的一线发挥着重要的作用^[1]。研究发现,天然抗体主要以 IgM 型为主,可识别多个不同的抗原表位,在维持机体自身正常内环境的稳定、防止自身免疫病发生等方面可能具有重要的作用。

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是严重危害人类健康的常见病,其发病机制尚未完全阐明,目前研究认为其本质是血管壁的一种慢性炎症性疾病,有多种免疫因素参与了 As 损害的形成^[2-4]。As 的发展是一个缓慢的进程,因而 As 损害的形成很可能是一个动态的过程,即机体内既存在促 As 的机制,同时也存在着抑制 As 形成的因素,而 As 的发展正是这一平衡失调的结果。显然,高脂血症^[4]、低密度脂蛋白(LDL)、氧化低密度脂蛋白(oxidized LDL, oxLDL)^[5]等是促 As 形成的重要因素。另一

* 基金项目:国家自然科学基金资助(81070248)

作者简介:袁媛(1985-),硕士,主要研究方向:肿瘤治疗。Tel:15129821206 Email:yy12103034@163.com

△通讯作者:冯旭阳,主治医师,医学博士。Email: fengxuyang@sohu.com

(收稿日期:2010-12-05 接受日期:2010-12-30)

方面,机体在长期的进化过程中形成了对抗 As 形成的机制,如天然抗体^[6]、脂联素^[7]的作用等。

本研究应用正常未免疫小鼠的脾细胞直接与骨髓瘤细胞进行融合,以 LDL 和 oxLDL 为抗原筛选、制备了针对 LDL 和 oxLDL 的单克隆天然抗体。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

Beckman optima L-100XP 超高速低温离心机(美国 Fullerton 公司);PEG 8,000、HAT、TMB 和小鼠免疫球蛋白亚类夹心 ELISA 试剂盒(美国 Sigma 公司);胎牛血清(美国 Invitrogen 公司);羊抗鼠抗体(HRP-G- α -M Ig,丹麦 Dako 公司);Western blot 化学发光检测试剂盒(美国罗氏公司);硝酸纤维素膜(美国 Millipore 公司);酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 LDL 的分离提取^[8]

取空腹 12 小时的正常人血浆,应用密度梯度超速离心法分离提取脂蛋白。

1.3 oxLDL 的制备^[9,10]

将制备好的 LDL 于 4℃ PBS 透析 24h,去除 EDTA,与硫酸铜(5 μ mol/L)在 37℃ 下共同孵育 18h,得到 oxLDL,EDTA 中止反应。对 PBS 进行透析,过滤除菌,分装,4℃ 保存备用。

1.4 杂交瘤细胞株的建立^[11,12]

取 2 只 5 周龄 Balb/c 小鼠,给予高胆固醇饮食饲喂 4 周。取其脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞常规进行 PEG 法细胞融合,融合细胞在 HAT 选择性培养基压力筛选下选择性培养 1 周后,包被 LDL 和 oxLDL,以间接 ELISA 法筛选阳性克隆,以底物 TMB 显色,酶标仪测定 450nm 处吸光度。以吸光度值大于空白对照 2.1 倍的上清液判定为阳性。阳性孔细胞采用有限稀释法进行克隆化。克隆化 4 次后获得 100%阳性的单克隆抗体细胞株。扩大培养杂交瘤细胞,常规给予 Balb/c 小鼠腹腔注射 10^6 细胞/只,诱生腹水,-20℃ 保存。

1.5 单克隆抗体特性的鉴定

1.5.1 亚型和效价 经过 4 次克隆化获得的 100%阳性单克隆杂交瘤细胞培养上清作为待检样品,按照说明书要求,使用 Sigma 公司小鼠免疫球蛋白亚类夹心 ELISA 试剂盒检测杂交瘤产生抗体的亚类和亚型。同上述方法以纯化提取的 LDL 包被微量酶标板,常规间接 ELISA 法测定单抗腹水效价,TMB 为底物显色。

1.5.2 免疫印迹 将 LDL 及 LDLSDS-PAGE 后按半干法转移至硝酸纤维素膜上,脱脂奶粉封闭后,分别加各株单抗杂交瘤培养上清液,置 4℃ 冰箱中与转印膜温育反应过夜,TBS/0.05% Tween-20 洗涤 3 次后加 HRP-G- α -M Ig 抗体,室温作用 1h,洗涤 3 次,增强型化学发光法检测抗体与 LDL 的反应性。

1.5.3 免疫沉淀 将 LDL 及 oxLDL 按照 Roche 公司产品说明书操作步骤进行生物素标记^[13],加入 Protein A/G 葡聚糖微珠,进行预清除,离心弃沉淀,上清中分别加入各株单抗,混匀后加入 Protein A/G 葡聚糖微珠,混匀并洗涤,离心弃上清后进行 SDS-PAGE,如上行免疫印迹。以正常小鼠血清作为阴性对照抗体来源。

1.5.4 间接 ELISA 鉴定 将制备的抗原(5 μ g/ml)分别包被于 96

孔 ELISA 板 4℃ 过夜。以 PBS/0.2%Tween 洗涤孔 4 次,然后以含 1% BSA 的 PBS 封闭 30 min。将腹水按照 1:10 数量级稀释后加入 ELISA 板中,37℃ 水浴作用 1 小时,以 PBS/0.2%Tween 洗涤孔 4 次,加入 1:1000 稀释的辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgM,37℃ 水浴作用 1 小时,PBS/0.2%Tween 洗涤孔 4 次,加入 ABTS 显色 10-15min,最后于 ELISA 读数仪中在 410nm 测定吸光度。含 IgM 的腹水按照 McCarthy 等的方法以两步法纯化^[14](由免疫教研室协助完成),即快速的阳离子交换层析捕获和用阴离子交换色谱洗脱纯化。

2 结果

2.1 LDL 的分离提取和 oxLDL 的制备

按参考文献^[8]修改方案成功分离纯化出了 LDL 并制备了 oxLDL,经 SDS-PAGE 检测,如图 1 所示,oxLDL 的电泳迁移率较 LDL 升高,提示 LDL 已被有效氧化。

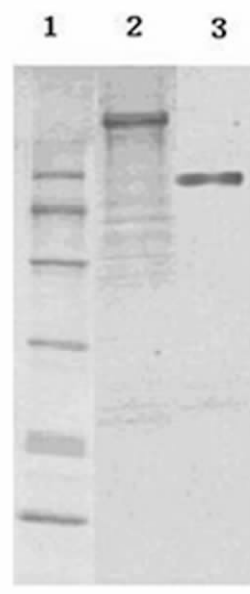


图 1 蛋白质电泳检测已纯化的人 LDL 与 oxLDL (1) 蛋白 marker (2) 纯化的人 LDL (3) oxLDL

Fig.1 Protein electrophoresis detected purified human LDL and oxLDL : (1)Protein marker (2)Purified human LDL (3) Purified oxLDL

2.2 分泌天然抗 LDL/oxLDL 单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立

Balb/c 小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞融合后共铺 4 块 96 孔细胞培养板,经 HAT 选择性培养筛选 1 周后,检测发现培养板 384 个孔中共计有 219 个孔有杂交瘤细胞生长,融合率为 57%,包被 LDL 或 oxLDL、间接 ELISA 方法检测出 16 个孔的杂交瘤上清液可与 LDL 或 oxLDL 抗原发生阳性反应,阳性率 7.3%,经过 4 次有限稀释法克隆化,获得了 2 株可稳定分泌抗 LDL 的杂交瘤细胞株,分别命名其克隆编号为 5G8 和 2H7 及 1 株稳定分泌 IgM 型天然抗 oxLDL 的单克隆抗体,命名为 3A6。

2.3 单克隆抗体免疫学特性的鉴定

经过检测发现,所获得的 3 株抗体 5G8、2H7 和 3A6 的轻重链均分别为 κ 链和 μ 链,即 κ 亚型、IgM 亚类。腹水效价 5G8 为 10-6,2H7 为 10-5,3A6 为 10-6。

将 LDL 或 oxLDL 经 SDS-PAGE 并转印至硝酸纤维素膜上,发现 5G8 和 2H7 均可以识别变性条件下的 LDL,而 3A6 不能识别变性的 LDL。其中 5G8 的亲和力比 2H7 明显较高,但 2H7 特异性更好,表现为一条特异性的条带(图 2A)。相类似地,5G8 和 2H7 不能识别变性条件下的 oxLDL,而 3A6 对 oxLDL 的识别表现为一条特异性的条带(图 2B)。

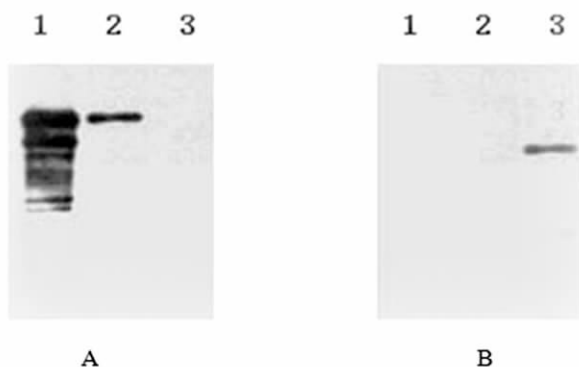


图 2 Western blot 鉴定抗体对变性 LDL 和 oxLDL 的识别:A LDL (1) 5G8 (2) 2H7 (3) 3A6; B oxLDL (1) 5G8 (2) 2H7 (3) 3A6

通过将 LDL 及制备的氧化型低密度脂蛋白生物素化,使用单抗结合 ProteinA/G 微珠进行结合,转印至硝酸纤维素膜上,以 HRP-Streptavidin 进行检测,发现单抗发现单抗 5G8 和 2H7 均可以有效捕获近生理条件溶液中的天然 LDL 分子,而 3A6 不能识别 LDL(图 3A),单抗 3A6 可以有效捕获近生理条件溶液中的 oxLDL 分子,而 5G8 和 2H7 均不能识别 oxLDL(图 3B)。说明此三种单抗均可以结合其对应的天然蛋白分子

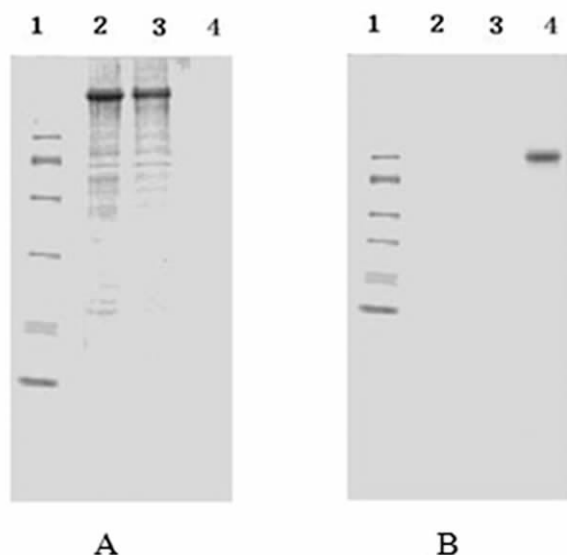


图 3 免疫沉淀鉴定抗体对天然 LDL 和 oxLDL 的识别:A LDL (1) 蛋白 marker (2) 5G8 (3) 2H7 (4) 3A6; B oxLDL (1) 蛋白 marker (2) 5G8 (3) 2H7 (4) 3A6

Fig.3 Immunoprecipitation analysed the identification of antibodies to the natural LDL:A: LDL (1) Protein marker (2) 5G8 (3) 2H7 (4) 3A6; B: oxLDL (1) Protein marker (2) 5G8 (3) 2H7 (4) 3A6

间接 ELISA 实验,将 LDL 分别氧化 4 h 或者 16 h,发现 3A6 和 4h、16h-oxLDL 及两者的混合物 Mix-oxLDL(1:1)都反应,但不识别对照组牛血清白蛋白(BSA)(图 4)。在各组之间没有明显差异($P>0.05$),说明 3A6 能特异性识别氧化低密度脂蛋白。为了模拟类似的病理条件,如图 5 所示,利用铜氧化的低密度脂蛋白(CuoxLDL)混合物进一步研究对象。CuoxLDL 特异性抗体 3A6 和先前建立的 LDL 特异性单抗抗低密度脂蛋白单抗 5G8 和 2H7 之间没有交叉识别现象,3A6、5G8 和 2H7 均不识别对照组 BSA(图 5)。

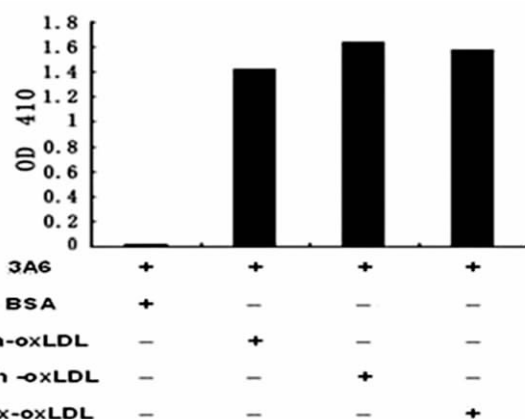


图 4 间接 ELISA 方法检测 3A6 与 BSA、4h、16h-oxLDL 及 Mix-oxLDL 的结合情况

Fig.4 Indirect ELISA detected the combination of 3A6 with BSA, 4h, 16h-oxLDL and Mix-oxLDL, respectively

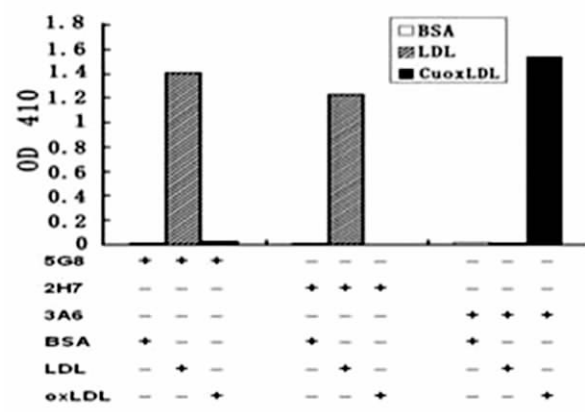


图 5 间接 ELISA 方法检测 5G8、2H7 和 3A6 与 BSA、LDL 和 oxLDL 结合情况

Fig.5 Indirect ELISA detected the combination of 5G8, 2H7 and 3A6 with BSA, LDL and oxLDL, respectively

3 讨论

天然抗体是天然体液免疫的重要组成部分,是指在没有任何抗原主动免疫的情况下,正常机体产生的针对一种或多种自身和(或)外来抗原的抗体。天然抗体主要是 IgM 亚型。大量研究已经证明天然抗体具有重要的生物学功能,初步的结论^[15, 16]包括:①通过抗原交叉反应的特性识别并清除病原微生物,构成抵御外来感染的第一道防线;②协助清除衰老或凋亡的细

胞,参与生理稳定状态的维持和调节;③参与向T细胞呈递抗原;④能够结合并封闭超抗原、中和炎症介质从而发挥抗炎活性;⑤对肿瘤的发生有监视作用,通过结合于恶变细胞膜表面抗原而阻抑肿瘤的发展,或协助免疫细胞进行识别和杀伤;⑥通过抗独特型作用中和自发少量产生的病理性自身抗体,防止自身免疫病的发生;⑦通过与T细胞、B细胞表面受体的结合影响这两种免疫细胞表位识别库的形成,参与免疫系统自身稳定的调节。

在无任何病原体刺激的条件,饲养在无菌条件(SPF)下的小鼠可以自发产生天然IgM,应用定量免疫印迹技术发现带菌和无菌小鼠血清中天然IgM的反应模式基本相同,表明天然IgM的产生与外来病原体刺激无关,是健康个体血清中客观存在的一种生理成分^[17]。天然IgM由胚系基因编码,主要由B-1B细胞产生,是构成天然体液免疫的重要组成成分。由于技术方法和理论研究的局限,以往人们对天然抗体存在的意义及生物学作用一直不甚了解。随着免疫学、分子生物学等学科理论的发展和相关研究手段的进步,天然抗体日益受到人们的关注。大量证据表明天然抗体可以识别多种AS相关的脂类或脂蛋白。Alving CR等检测了742份正常人血清,发现具有滴度不等的抗胆固醇天然抗体,并且发现来自100份正常人和120份Chagas病患者的血清中也都含有抗胆固醇抗体^[18]。Freigang S研究组发现在AS动物模型和人体内,针对oxLDL的IgG和IgM抗体滴度显著增高^[19],并从饲喂胆固醇而具有高抗oxLDL抗体滴度的apoE^{-/-}小鼠的脾细胞中获得了多株分泌IgM型抗oxLDL抗体的杂交瘤,这些抗体的可变区序列与已知的天然抗体T15一致,也属于天然抗体^[20]。本课题组前期的实验研究中发现,针对人角蛋白的天然抗体同样对LDL具有一定的结合能力^[21]。

鉴于天然抗体在动脉粥样硬化这一严重影响人类健康的疾病中扮演了相当重要的角色^[6],本实验研究中有目的的制备了两株抗人LDL的单克隆天然抗体5G8和2H7,一株抗人氧化型低密度脂蛋白的单克隆天然抗体3A6,试图为深入探讨天然抗体对于AS发生、发展的影响机制提供有力的研究工具。在初步预实验中直接使用未免疫的Bab/c小鼠脾细胞与SP2/0细胞融合,筛选抗LDL及oxLDL的单克隆抗体,结果发现获得的阳性克隆数目少、亲和力低,而且经过4次克隆化后几乎没有阳性克隆存活(结果未显示)。而在后续实验中给小鼠饲喂高胆固醇饮食,3周后取脾细胞进行融合,获得了较为满意的结果。考虑存在此种问题的主要原因是LDL本身是健康机体正常存在的蛋白成分,免疫原性低,仅能诱导很低水平的抗体存在,故不易获得单克隆抗体,而人为给与大剂量胆固醇后,使得体内这一部分阳性的B-1B细胞得以活化、增殖,获得阳性单克隆的几率大大提高。

综上所述,本研究利用常规单克隆抗体技术,成功制备了2株可以特异性结合LDL和一株特异性结合oxLDL的IgM单抗,可以满足免疫印迹、免疫沉淀等实验要求,具有结合变性和天然蛋白分子的能力。同时,我们也获得了2株与LDL及oxLDL都不反应的IgM亚类单克隆抗体,可以作为我们以后

实验的研究对照。已知IgM属性的天然抗体对AS形成有抑制作用,其机理在于天然IgM抗体与oxLDL结合封闭了单核-巨噬细胞与oxLDL的结合^[22-24]。天然属性的抗LDL单克隆抗体的成功制备为进一步深入研究LDL及其相应的天然抗体在动脉粥样硬化症发生、发展中的重要作用提供了有力的研究工具。

参考文献(References)

- [1] Baumgarth NJ, Tung W, Herzenberg LA, et al. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion[J]. Springer Semin Immunopathol, 2005, 26: 347-362
- [2] Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, et al. Innate and acquired immunity in atherogenesis[J]. Nat Med, 2002, 8(11): 1218-1226
- [3] Glass CK, Witztum JL. Atherogenesis. The road ahead [J]. Cell, 2001, 104: 503-516
- [4] Wick G, Knoflach M, Xu Q. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis[J]. Annu Rev Immunol, 2004, 22: 361-403
- [5] Steinberg D. Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis: an interpretive history of the cholesterol controversy, part III: mechanistically defining the role of hyperlipidemia [J]. J Lipid Res, 2005, 46(10): 2037-2051
- [6] Horkko S, Bird DA, Miller E, et al. Monoclonal autoantibodies specific for oxidized phospholipids or oxidized phospholipid-protein adducts inhibit macrophage uptake of oxidized low-density lipoproteins [J]. J Clin Invest, 1999, 103(1): 117-128
- [7] Han SH, Quon MJ, Kim JA, et al. Adiponectin and cardiovascular disease: response to therapeutic interventions [J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 49(5): 531-538
- [8] Belcher JD, Egan JO, Bridgman G, et al. A micro-enzymatic method to measure cholesterol and triglyceride in lipoprotein subfractions separated by density gradient ultracentrifugation from 200 microliters of plasma or serum[J]. Journal of Lipid Research, 1991, 32(2): 359-370
- [9] Havel RJ, Eder HA, Bragdon JM. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum [J]. Journal of Clinical Investigation, 1955, 34(9): 1345-1353
- [10] Cominacini L, Pasini AF, Garbin U, et al. Oxidized low density lipoproteins (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF- κ B through an increased production of intracellular reactive oxygen species [J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(17): 12633-12638
- [11] Cheung NK, Guo HF, Modak S, et al. Anti-idiotypic antibody as the surrogate antigen for cloning scFv and its fusion proteins [J]. Hybrid Hybridomics, 2002, 21(6): 433-43
- [12] Steed J, Gilliam LK, Harris RA, et al. Antigen presentation of detergent-free glutamate decarboxylase (GAD65) is affected by human serum albumin as carrier protein [J]. J Immunol Methods, 2008, 334 (1-2): 114-21
- [13] Ed Harlow DL. Using Antibodies: A Laboratory Manual [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999: 176-82
- [14] McCarthy E, Vella G, Mhatre R, et al. Rapid purification and monitoring of immunoglobulin M from ascites by perfusion ion-exchange

- chromatography[J]. J Chromatogr A, 1996(743): 163-70
- [15] Boes M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses[J]. Mol Immunol, 2000, 37(18): 1141-1149
- [16] Alving CR. Antibodies to lipids and liposomes: immunology and safety[J]. J Liposome Res, 2006, 16(3): 157-166
- [17] Haury M, Grandien A. The repertoire of serum IgM in normal mice is largely independent of external antigenic contact [J]. Eur J Immunol, 1997, 27(6): 1557-1563
- [18] Alving CR. Antibodies to lipids and liposomes: immunology and safety[J]. J Liposome Res, 2006, 16(3): 157-166.
- [19] Freigang S, Horkko S, Miller E, et al. Immunization of LDL receptor-deficient mice with homologous malondialdehyde-modified and native LDL reduces progression of atherosclerosis by mechanisms other than induction of high titers of antibodies to oxidative neoepitopes[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998, 18(12): 1972-1982
- [20] Shaw PX, Horkko S, Chang MK, et al. Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity[J]. J Clin Invest, 2000, 105(12): 1731-1740
- [21] 冯旭阳, 李巍, 王海昌, 等. 抗胆固醇天然抗体的检测与分析[J]. 心脏杂志, 2007, 19(2): 173-175.
Feng Xu-yang, Li Wei, Wang Hai-chang, et al. Detection and analyse of re-cholesterol natural antibody[J]. Chinese Heart Journal, 2007, 19(2): 173-175
- [22] Gounopoulos P, Merki E, Hansen LF, et al. Antibodies to oxidized low density lipoprotein: epidemiological studies and potential clinical applications in cardiovascular disease [J]. Minerva Cardioangiol, 2007,55(6): 821-837
- [23] Binder CJ, Hörkö S, Dewan A, et al. Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between Streptococcus pneumoniae and oxidized LDL [J]. Nat Med, 2003, 9(6):736-43
- [24] Hörkö S, Bird DA, Miller E, et al. Monoclonal autoantibodies specific for oxidized phospholipids or oxidized phospholipid-protein adducts inhibit macrophage uptake of oxidized low-density lipoproteins[J]. J Clin Invest, 1999, 103(1): 117-28

(上接第 1077 页)

- [9] Lucena JF, Herrero J I, Quir oga J, et al. A multidrug resistance 3 gene mutation causing cholelithiasis, cholestasis of pregnancy, and adulthood biliary cirrhosis[J]. Gastr oenterology, 2003,124(4):1037-1042
- [10] Jacquemin E, Cresteil D, Manouvrier S, et al. Heterozygous non-sense mutation of the MDR3 gene in familial intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. Lancet, 1999,353(9148):210-211
- [11] Marti HJ, Bernaudin M, Bellal A, et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia[J]. Am J Pathol, 2000,156(3):965-976
- [12] Pichiule P, Agani F, Chavez JC, et al. HIF-1 alpha and VEGF expression after transient global cerebral ischemia [J]. Adv Exp Med Biol, 2003, 530: 611-617
- [13] Karelis A D, Marcil M, Pé ronnet F, et al. Effect of lactate in fusion on Mwave characteristics and force in the rat plantaris muscle during repeated stimulation in situ[J]. J Appl Physiol, 2004,96(6):2133-2138
- [14] Johnson P, Lowry C, Truitt W, et al. Disruption of GABAergic tone in the dorsomedial hypothalamus attenuates responses in a subset of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus following lactate-induced panic[J]. J Psychopharmacol, 2008,22(6):642-652
- [15] Yates A, Edman J D, Crago M, et al. Eating disorder symptoms in runners, cyclists, and paddlers[J]. Addict Behav, 2003,28(8):1473-1480