

ERK1/2 蛋白在 17 β -雌二醇抑制睾酮诱导的 心肌细胞肥大反应中的作用

许研¹, 刘海梅², 徐进文², 蒋萍², 王庭槐²

(1. 广州市干部疗养院 广州市第十一人民医院, 广东省广州市 510530;

2. 中山大学中山医学院生理学教研室, 广东省广州市 510080)

[关键词] 睾酮; 17 β -雌二醇; 心肌细胞肥大; 细胞外信号调节激酶 1/2

[摘要] **目的** 观察 17 β -雌二醇对睾酮诱导的心肌肥大反应的影响, 探讨细胞外信号调节激酶(ERK1/2 蛋白)在性激素对心肌肥大影响中的作用。**方法** 采用差速贴壁法分离、纯化培养新生 SD 大鼠心肌细胞, 以 Bradford 法测定心肌细胞蛋白质含量, 同位素法分析³H-亮氨酸(³H-Leu)掺入, 以免疫印迹法检测心肌细胞 ERK1/2 蛋白表达水平的变化。**结果** 10⁻¹⁰ ~ 10⁻⁶ mol/L 17 β -雌二醇可明显对抗睾酮诱导的心肌细胞蛋白质含量和³H-Leu 掺入的增加, 其中以 10⁻⁸ mol/L 17 β -雌二醇作用最为明显; 预先给予 10⁻⁶ mol/L 雌激素受体拮抗剂他莫昔芬作用 2 h, 可部分取消 17 β -雌二醇对睾酮诱导的心肌细胞蛋白质含量增加的抑制效应。用 50 μ mol/L ERK1/2 上游激酶 MEK1/2 的特异性抑制剂 PD98059 预处理 2 h 不能增强 17 β -雌二醇对睾酮诱导的心肌细胞³H-Leu 掺入的抑制作用; 10⁻⁸ mol/L 17 β -雌二醇可以对抗睾酮诱导的心肌细胞 ERK1/2 蛋白表达增加; 10⁻⁶ mol/L 他莫昔芬预处理 2 h 可部分取消 17 β -雌二醇对睾酮诱导的心肌细胞 ERK1/2 蛋白表达增加的抑制作用。**结论** 17 β -雌二醇经雌激素受体介导下调睾酮诱导的心肌细胞 ERK1/2 蛋白表达, 从而抑制由睾酮诱导的心肌细胞肥大反应。

[中图分类号] R331

[文献标识码] A

Possible Involvement of ERK1/2 in the Inhibition of Testosterone Induced Myocardial Hypertrophy by 17 β -Estradiol

XU Yan¹, LIU Hai-Mei², XU Jin-Wen², JIANG Ping², and WANG Ting-Huai²

(1. *Cadre's Convalescent Hospital of Guangzhou & The Eleventh People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou, Guangdong 510530, China*; 2. *Department of Physiology, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China*)

[KEY WORDS] Testosterone; 17 β -Estradiol; Cardiomyocyte Hypertrophy; ERK1/2

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of 17 β -estradiol on myocardial hypertrophy induced by testosterone, and to explore the role of ERK1/2 protein in the signal transduction pathway of sexual hormone in development of myocardial hypertrophy. **Methods** Myocardial cells were isolated from ventricles of 1 ~ 3-day-old neonate rats purified by a culture method based on Simpson. Neonate rat cardiomyocyte hypertrophic responses were assayed by measuring protein content, protein synthesis rate. Expression of protein ERK1/2 was detected by Western blot. **Results** 17 β -estradiol (E₂) was able to inhibit the increase of cell protein and ³H-Leu incorporation induced by T in a range from 10⁻¹⁰ ~ 10⁻⁶ mol/L, with an optimal concentration of 10⁻⁸ mol/L. The effect of E₂ was partly intercepted by Tamoxifen. The inhibitory effect of E₂ on the increase of ³H-Leu incorporation in cardiomyocytes induced by testosterone was not enhanced by PD98059. The increased expression of ERK1/2 induced by testosterone was reversed by E₂ at concentration of 10⁻⁸ mol/L. The increased expression of ERK1/2 induced by testosterone which was inhibited by E₂ was reversed by pretreating with Tamoxifen (10⁻⁶ mol/L) for 2 h. **Conclusion** E₂ could reverse the myocardial hypertrophy induced by testosterone by inhibiting the expression of ERK1/2, which was mediated by estrogen receptor.

[收稿日期] 2011-10-15

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30250010)

[作者简介] 许研, 硕士, 研究方向为心血管保护机制, E-mail 为 sarah0703 @ 163. com。刘海梅, 博士。通讯作者王庭槐, 教授, 博士研究生导师, E-mail 为 wangth @ mail. sysu. edu. cn。

心肌肥大是多种心血管疾病的并发症,是导致心血管疾病发病率和死亡率增高的独立危险因素,严重危害着人类的身心健康和生活质量^[1]。心肌肥大的发生具有明显的性别差异^[2],但从性激素角度入手,探讨雌、雄激素对心肌肥大影响的研究较少,其影响机制及信号转导途径至今尚未完全阐明。目前研究认为,细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated protein kinase, ERK1/2)与细胞生长、分化和增殖调控密切相关^[3],我们既往的研究已证实生理剂量的睾酮可通过上调 ERK1/2 的蛋白表达诱导心肌细胞肥大反应^[4],本研究观察了 17 β -雌二醇(17 β -estradiol, E₂)对睾酮诱导的心肌肥大的影响,并观察 ERK1/2 蛋白在性激素对心肌肥大影响中的作用,为进一步研究性激素对心肌肥大的作用机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验细胞种类及来源

采用体外培养的新生大鼠心肌细胞,来源于出生 1~3 天的 Sprague-Dawley 种系大鼠,雌雄不限,由中山大学动物实验中心提供,动物合格证号:粤监证字 20064064。

1.2 主要实验药品、试剂

E₂、他莫昔芬(tamoxifen, Ta)、睾酮、5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromodeoxyuridine, 5-Brdu)、胰蛋白酶(trypsin)、ERK1/2 上游激酶 MEK1/2 的特异性抑制剂 PD98059、兔抗大鼠 ERK1/2 单克隆抗体、小鼠抗大鼠 GAPDH 单克隆抗体(Sigma 公司);琼脂糖(New England BioLabs 公司);DMEM 培养基(Gibco 公司);新生小牛血清(Hyclone 公司);³H-Leu(中国原子能科学研究所);HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体(博士德生物工程有限公司);其余均为国产分析纯。

1.3 心肌细胞培养

按 Simpson 等^[5]方法培养新生大鼠心肌细胞。以 0.08% 的无菌胰蛋白酶分离 1~3 天龄的 SD 大鼠心室肌细胞,采用 60~90 min 差速贴壁法纯化心肌细胞。并于培养前在心肌细胞培养液中加入 0.1 mmol/L 5-Brdu,以抑制非心肌细胞生长。48 h 时换无血清、无酚红培养液,72 h 时开始用于药物实验。

1.4 实验分组

不同浓度的 E₂ 对睾酮诱导的心肌细胞蛋白质含量和³H-Leu 掺入量增加的影响为 8 组:对照组、

睾酮(10⁻⁸ mol/L)组、E₂(10⁻¹⁰、10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷ 及 10⁻⁶ mol/L) + 睾酮组、E₂(10⁻⁸ mol/L)组。E₂ 与睾酮分别或同时在细胞培养 72 h 后进行干预 24 h,对照组则继续无血清培养 24 h。他莫昔芬对 E₂ 抑制睾酮诱导的心肌细胞蛋白质含量和 ERK1/2 蛋白表达增加的影响分为 6 组:对照组、睾酮组、E₂ + 睾酮组、他莫昔芬 + E₂ + 睾酮组、E₂ 组及他莫昔芬组。E₂ 与睾酮分别或同时在细胞培养 72 h 后进行干预,他莫昔芬则在 E₂ 与睾酮之前预处理 2 h,对照组则无任何干预因子加入。PD98059 对 E₂ 抑制睾酮诱导的心肌细胞³H-Leu 掺入的影响分为 6 组:对照组、睾酮组、E₂ + 睾酮组、PD98059 + E₂ + 睾酮组、E₂ 组及 PD98059 组。E₂ 与睾酮分别或同时在细胞培养 72 h 后进行干预,PD98059 则在 E₂ 与睾酮之前预处理 2 h,对照组则无任何干预因子加入。

1.5 心肌细胞蛋白质含量的测定及免疫印迹法检测 ERK1/2 蛋白表达

心肌细胞以 3 × 10⁸ cells/L 密度接种于 6 孔板,每孔 1000 μ L。48 h 后换为无血清无酚红的 DMEM 培养液,无血清培养 24 h 后加入药物或其他干预因子,持续刺激一定时间后,弃培养液,用预冷的 D-Hank's 液清洗 3 次,每孔加入 100 μ L 蛋白裂解液,其组成为: β -磷酸甘油 20 mmol/L, Benzamidine 10 mmol/L, 焦磷酸钠 50 mmol/L, NaF 50 mmol/L, NaCl 50 mmol/L, EDTA 5 mmol/L, EGTA 5 mmol/L, Na₃VO₄ 0.2 mmol/L, HEPES 10 mmol/L (pH 7.4), Triton X-100 0.1% (v/v), PMSF 0.5 mmol/L, Aprotinin 0.1 mmol/L, Leupeptin 0.02 mmol/L, β -巯基乙醇 0.03% (v/v),置于 4 $^{\circ}$ C 下 30 min,收集细胞裂解液于 EP 管中,13000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,取上清,按 Bradford 法^[6]测定心肌细胞蛋白质含量。

调每孔上样蛋白量为 30 μ g,进行 SDS-PAGE 电泳,电印迹转移法将凝胶内的蛋白质转移至硝酸纤维素膜上,用含 2.5% 小牛血清白蛋白的 TBST 溶液室温封闭 1 h,分别为一抗兔抗大鼠 ERK1/2 单克隆抗体(稀释度为 1:2000)、小鼠抗大鼠 GAPDH 单克隆抗体(稀释度为 1:2000,已标记,不用二抗),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 溶液洗脱 3 次,再与二抗 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体(稀释度为 1:2000)室温孵育 1 h, TBST 溶液洗脱 2 次后用 TBS 溶液再洗一次,与 ECL 试剂反应 1 min, X 光胶片压片曝光 10 s ~ 1 min,以 IBAS 图像处理系统对胶片进行扫描测定感光区带的感光密度,并进行积分处理,以对照组为 100% 进行统计分析。

1.6 心肌细胞³H-Leu 掺入测定

将心肌细胞以 3×10^8 cells/L 密度接种于 24 孔培养板, 每孔 500 μ L。48 h 后换为无血清无酚红的 DMEM 培养液培养 24 h, 再加入各种干预因子后, 每孔加入 37 kBq 的³H-Leu 继续孵育 16 h, 移去培养液, 以三氯乙酸固定, 洗去游离的同位素标记物, 最后用含 1% SDS 的 0.2 mol/L NaOH 溶液 0.5 mL 裂解细胞, 37°C 孵育 12 h 后收集裂解液于含有 8 mL 闪烁液的测量杯中, 摇匀放置在 LS3801 液体闪烁仪 (Beckman) 上测定放射性强度。

1.7 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 *t* 检验和单因素方差分析作统计学处理。

2 结果

2.1 不同浓度 E₂ 对睾酮诱导的心肌肥大反应的影响

与对照组相比, 10^{-8} mol/L 睾酮可使心肌细胞蛋白质含量、³H-Leu 掺入增加, 该作用可被 $10^{-10} \sim 10^{-6}$ mol/L 的 E₂ 明显抑制, 其中以 10^{-8} mol/L E₂ 作用最为明显, 单独给予 E₂ 对心肌细胞蛋白质含量、³H-Leu 掺入无明显影响 (表 1)。

表 1. 不同浓度 E₂ 对睾酮诱导的心肌细胞蛋白质含量和³H-Leu 掺入的影响 ($n = 3$)

Table 1. Effects of E₂ at different concentrations on protein content and ³H-Leu incorporation in cultured neonatal rat cardiomyocytes induced by testosterone

分 组	蛋白质含量 (mg/L)	³ H-Leu 掺入 (cpm)
对照组	1033 ± 193	131 ± 4
睾酮组	2264 ± 164 ^a	348 ± 31 ^a
10 ⁻¹⁰ mol/L E ₂ + 睾酮组	1379 ± 78 ^c	255 ± 17 ^b
10 ⁻⁹ mol/L E ₂ + 睾酮组	1120 ± 160 ^c	213 ± 46 ^c
10 ⁻⁸ mol/L E ₂ + 睾酮组	1055 ± 53 ^c	152 ± 43 ^c
10 ⁻⁷ mol/L E ₂ + 睾酮组	1076 ± 237 ^c	156 ± 18 ^c
10 ⁻⁶ mol/L E ₂ + 睾酮组	1871 ± 230 ^b	234 ± 29 ^c
E ₂ 组	939 ± 198	147 ± 12

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与睾酮组比较。

2.2 他莫昔芬对 E₂ 抑制睾酮诱导的心肌肥大反应的影响

与对照组相比, 10^{-8} mol/L 睾酮可使心肌细胞蛋白质含量增加, 该作用可被 10^{-8} mol/L E₂ 同时处

理 24 h 后明显抑制; 预先给予 10^{-6} mol/L 他莫昔芬作用 2 h, 可抑制 E₂ 降低睾酮诱导的心肌细胞蛋白含量增加; 他莫昔芬 + E₂ + 睾酮组与睾酮组之间差异无统计学意义; 单独给予他莫昔芬对心肌细胞蛋白质含量无明显影响 (表 2)。

2.3 他莫昔芬对 E₂ 抑制睾酮诱导的心肌细胞 ERK1/2 蛋白表达的影响

与对照组相比, 10^{-8} mol/L 睾酮作用 24 h 使心肌细胞 ERK1/2 蛋白表达增加, 给予 10^{-8} mol/L E₂ 同时处理 24 h 使睾酮诱导的心肌细胞 ERK1/2 蛋白表达降低, 单独给予 E₂ 对 ERK1/2 蛋白表达无明显影响; 他莫昔芬预处理 2 h 可逆转 E₂ 对睾酮诱导的心肌细胞 ERK1/2 蛋白表达增加的抑制作用, 使 ERK1/2 的蛋白表达增加, 单独给予他莫昔芬对 ERK1/2 蛋白表达无明显影响 (表 2 和图 1)。

表 2. 他莫昔芬对 E₂ 抑制睾酮诱导的心肌细胞蛋白质含量和 ERK1/2 蛋白表达的影响 ($n = 3$)

Table 2. Influence of Tamoxifen on the inhibition of E₂ on protein content and expression of ERK1/2 of cardiomyocytes induced by testosterone

分 组	蛋白质含量 (mg/L)	ERK 1/2 蛋白
对照组	1132 ± 68	100%
睾酮组	2578 ± 76 ^a	224% ± 12% ^a
E ₂ + 睾酮组	1395 ± 59 ^b	113% ± 6% ^b
他莫昔芬 + E ₂ + 睾酮组	2049 ± 148 ^c	149% ± 5% ^c
E ₂ 组	1190 ± 225	89% ± 11%
他莫昔芬组	1219 ± 148	91% ± 10%

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与睾酮组比较; c 为 $P < 0.01$, 与 E₂ + 睾酮组比较。

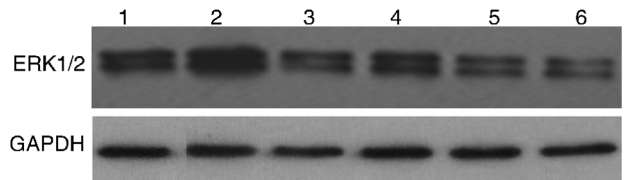


图 1. 他莫昔芬对 E₂ 抑制睾酮诱导的心肌细胞 ERK1/2 蛋白表达的影响 1 为对照组, 2 为睾酮组, 3 为 E₂ + 睾酮组, 4 为他莫昔芬 + E₂ + 睾酮组, 5 为 E₂ 组, 6 为他莫昔芬组。

Figure 1. Influence of Tamoxifen on the inhibition of E₂ on expression of ERK1/2 induced by Testosterone in cardiomyocytes

2.4 PD98059 对 E₂ 抑制睾酮诱导的心肌细胞肥大反应的影响

与对照组相比, 10^{-8} mol/L 睾酮可使心肌细

胞³H-Leu 掺入增加 (261.00 ± 33.36 cpm 比 527.75 ± 34.47 cpm; $P < 0.01$); 与睾酮组相比, 10^{-8} mol/L E_2 使睾酮诱导的心肌细胞³H-Leu 掺入减少至 317.25 ± 37.75 cpm ($P < 0.01$); 与 E_2 + 睾酮组相比, PD98059 预处理 2 h 不能增强 E_2 对睾酮诱导的心肌细胞肥大反应的抑制作用, 心肌细胞³H-Leu 掺入无明显变化 ($P > 0.05$, 图 2)。

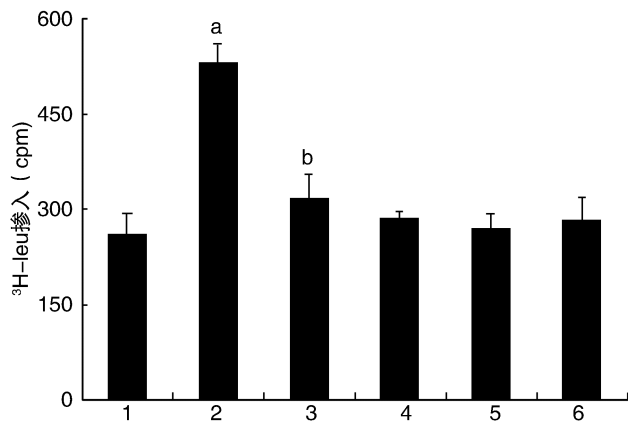


图 2. PD98059 对 E_2 抑制睾酮诱导的心肌细胞³H-Leu 掺入增加的影响 ($n = 4$) 1 为对照组, 2 为睾酮组, 3 为 E_2 + 睾酮组, 4 为 PD98059 + E_2 + 睾酮组, 5 为 E_2 组, 6 为 PD98059 组。 a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与睾酮组比较。

Figure 2. Influence of PD98059 on the inhibition of E_2 on ³H-leu incorporation of cardiomyocytes induced by Testosterone

3 讨论

心血管疾病的发病率具有明显的性别差异, 女性在绝经期前心血管疾病的发病率明显低于同龄男性, 绝经后心血管疾病的发病率显著上升, 提示雌激素具有心血管保护效应^[7]。我们在先前的实验研究中已经证实生理浓度的睾酮可以通过雄激素受体 (androgen receptor, AR) 的介导诱导心肌细胞肥大反应^[4], 那么, 在绝经期妇女体内雌激素水平显著降低, 雌、雄激素比例失调, 在心肌肥大的过程中, 雌、雄激素的相互作用如何尚不明了, 雌激素是否可以逆转由雄激素诱发的心肌肥大, 性激素在心肌细胞肥大反应中的作用机制方面的研究尚未见报道。在本研究中观察到, 在睾酮刺激状态下, $10^{-10} \sim 10^{-6}$ mol/L 的 E_2 对睾酮诱导的心肌细胞肥大反应均有明显的抑制作用, 表现为显著降低由睾酮诱导的心肌细胞蛋白质含量和³H-Leu 掺入的增加, 其中以 10^{-8} mol/L E_2 作用最为明显; 而在基础

状态下, E_2 本身对于正常心肌细胞蛋白质含量和³H-Leu 掺入则没有影响。以上结果表明, E_2 可以抑制由睾酮诱导的心肌细胞肥大反应, 由此可以推测, 绝经期妇女左心室肥厚的危险性增高可能是由于缺乏雌激素对雄激素引起心肌细胞肥大反应的抑制作用而引发的。

有研究显示, ER 广泛分布于心血管系统^[8-10], ER 在心血管系统的发现使雌激素对心血管作用的研究进入了分子水平。本研究发现, ER 拮抗剂他莫昔芬显著逆转 E_2 对睾酮诱导的心肌细胞蛋白质含量增加的抑制作用, 而基础状态下单独给予他莫昔芬对心肌细胞蛋白质含量没有影响。以上结果提示, E_2 对睾酮诱导的心肌细胞肥大反应的抑制作用至少部分通过 ER 介导。另外有研究表明, 在心血管系统还存在 ER 的非雌激素激活途径^[11], 这提示除了雌激素以外, 其他影响因素亦可能直接作用于 ER, 与雌激素共同影响心血管系统的功能, 其具体机制有待进一步探索。

MAPK 是重要的生长信号调节蛋白激酶, 在细胞内信号传递的过程中起到重要作用, 其成员 ERK1/2 信号途径是许多生长因子促细胞增殖的共同通路, 在细胞生长和增殖的调控中起关键作用^[12], 其与雌、雄激素在心血管系统作用的关系越来越引起学者们的兴趣。本研究在培养的新生大鼠心肌细胞上观察了 E_2 对睾酮诱导的心肌细胞 ERK1/2 蛋白表达的影响。研究结果显示, 10^{-8} mol/L E_2 可以显著抑制睾酮诱导的心肌细胞 ERK1/2 蛋白表达的增高; 而 ER 拮抗剂他莫昔芬可以逆转 E_2 对睾酮诱导的心肌细胞 ERK1/2 蛋白表达增高的抑制作用。在基础状态下, E_2 、他莫昔芬本身对心肌细胞 ERK1/2 蛋白表达没有影响。以上结果表明, 在基础状态下, E_2 对心肌细胞 ERK1/2 信号通路无明显影响; 但是在睾酮对心肌细胞刺激条件下, E_2 可以通过 ER 介导抑制睾酮诱导的心肌细胞 ERK1/2 蛋白表达的增加。

为了探讨 ERK1/2 信号途径在 E_2 抑制睾酮诱导的心肌肥大反应中的作用, 本研究观察了 ERK1/2 上游激酶 MEK1/2 的特异性抑制剂 PD98059 对 E_2 抑制睾酮诱导的心肌细胞肥大反应的作用。我们先前研究结果显示 PD98059 可明显抑制睾酮诱导的心肌细胞³H-Leu 掺入的增加, 而本研究结果显示 PD98059 预处理 2 h 并不能增强 E_2 对睾酮诱导的心肌细胞³H-Leu 掺入增加的抑制作用。本研究证实 E_2 可以抑制睾酮诱导的心肌肥大反应, 并且可明

显抑制睾酮诱导的心肌细胞 ERK1/2 蛋白表达的增加,因而推测 E₂ 可能通过下调 ERK1/2 蛋白表达从而抑制睾酮诱导的心肌细胞肥大反应。

综上所述,本研究证明 E₂ 至少部分通过 ER 介导抑制睾酮诱导的心肌细胞肥大反应,这一作用与 ERK1/2 信号途径密切相关。本研究将有助于阐明 ERK1/2 信号途径在性激素影响心肌肥大反应中的作用及其调控机制,从而进一步加深了解性激素在心血管系统的作用,为绝经后妇女心肌肥厚的临床治疗以及激素替代疗法的合理应用提供一定的理论基础,对于心肌肥大等心血管疾病的防治具有积极的意义。

[参考文献]

- [1] Mehta SK, Rame JE, Khera A, et al. Left ventricular hypertrophy, subclinical atherosclerosis, and inflammation [J]. *Hypertension*, 2007, 49 (6): 1 385-391.
- [2] Movahed MR, Martinez A, Greaves J, et al. Left ventricular hypertrophy is associated with obesity, male gender, and symptoms in healthy adolescents [J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2009, 17 (3): 606-610.
- [3] Faustino RS, Maddaford TG, Pierce GN. Mitogen activated protein kinase at the nuclear pore complex [J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15 (4): 928-937.
- [4] 王庭槐, 许研, 刘海梅, 等. 睾酮诱导大鼠心肌细胞肥大反应并上调 ERK1/2 蛋白表达 [J]. *基础医学与临床*, 2010, 30 (5): 449-453.
- [5] Simpson P, McGrath A, Savion S. Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines [J]. *Circ Res*, 1982, 51 (6): 787-801.
- [6] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [7] 邹燕, 李向平, 赵水平. 内源性雌激素对血管内皮功能的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11 (3): 238-241.
- [8] Fliegner D, Schubert C, Penkalla A, et al. Female sex and estrogen receptor-beta attenuate cardiac remodeling and apoptosis in pressure overload [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2010, 298 (6): 1 597-606.
- [9] Arnal JF, Laurell H, fontaine C, et al. Estrogen receptor actions on vascular biology and inflammation: implications in vascular pathophysiology [J]. *Climacteric*, 2009, 12 (Suppl 1): 12-17.
- [10] 金莉子, 肖宏凯, 陈剑. 雌激素受体 α 基因多态性与冠心病病变程度的关系 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16 (8): 647-650.
- [11] El-Tanani MK, Green CD. Two separate mechanisms for ligand-independent activation of the estrogen receptor [J]. *Mol Endocrinol*, 1997, 11 (7): 928-937.
- [12] Zebisch A, Czernilofsky AP, Keri G, et al. Signaling through RAS-RAF-MEK-ERK: from basics to bedside [J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14 (5): 601-623.

(此文编辑 文玉珊)