

医工结合研究专题

重组人骨形态发生蛋白10的表达纯化
及其心脏保护功能

王若璋, 金 坚

(江南大学 药学院, 江苏 无锡, 214122)

摘要:目的 验证重组人骨形态发生蛋白10(rhBMP10)的心脏保护作用。方法 使用CHO细胞表达并纯化rhBMP10;利用多柔比星多次给药构建小鼠心力衰竭模型;使用超声心动图、TUNEL染色等方法评价小鼠心功能变化和心肌细胞凋亡情况。结果 本研究成功表达了具有生物活性的rhBMP10;多柔比星造模小鼠的心功能受到严重损伤;心肌细胞凋亡比例显著升高,而rhBMP10处理的小鼠心脏功能和心肌细胞未受到显著影响。结论 rhBMP10在减轻多柔比星引起的心脏损伤方面具有积极作用。

关键词:心力衰竭;心脏毒性;重组人骨形态发生蛋白10;多柔比星;药理学

中图分类号: R 541.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2353(2019)21-001-06 **DOI:** 10.7619/jcmp.201921001

Expression and purification of recombinant
human bone morphogenetic protein 10 and
it cardiac protection effect

WANG Ruozhang, JIN Jian

(School of Pharmacy, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu, 214122)

ABSTRACT: Objective To verify the cardiac protection effect of recombinant human bone morphogenetic protein 10 (rhBMP10). **Methods** The rhBMP10 was expressed and purified by CHO cells, heart failure model was established by repeated administration of doxorubicin, and cardiac function and apoptosis were evaluated by echocardiography and TUNEL staining. **Results** In this study, rhBMP10 with biological activity was successfully expressed. Cardiac function of doxorubicin-induced mice was severely damaged. Apoptotic rate of cardiomyocytes significantly increased, and cardiac function and cardiomyocytes of rhBMP10-treated mice were not affected significantly. **Conclusion** The rhBMP10 has a positive effect on reducing heart damage caused by doxorubicin.

KEY WORDS: heart failure; cardiotoxicity; recombinant human bone morphogenetic protein 10; doxorubicin; pharmacology

2003年的流行病学统计结果^[1-3]显示,中国成人(35~74岁)的心力衰竭(心衰)患病率约为0.9%,已成为65岁以上患病人住院的首要原因。病毒性心肌炎、高血压、缺血性心脏病、使用具有心脏毒性的药物等因素均可导致心衰的发生。心衰的病理进展包括心肌细胞的死亡、成纤维细胞的募集和细胞外基质的沉积,最终可导致心脏功能的严重损伤^[4-7]。目前研究^[4-5,8]认

为,心肌细胞的死亡对心力衰竭的发展具有关键的影响。采取措施预防或拮抗心肌细胞死亡是阻止或减慢心力衰竭进展的关键。

多柔比星(DOX)是一种经典的蒽环类抗肿瘤化疗药物,可用于治疗实体瘤和血液系统肿瘤^[6]。20世纪60年代,随着蒽环类抗生素在肿瘤临床治疗中的使用,人们第一次意识到化疗过程可能对心脏功能产生影响^[9-11]。DOX介导的

心脏毒性的机制被认为主要与自由基产生、线粒体功能障碍、DNA 损伤和肌原纤维变性等因素有关^[12]。DOX 的使用可引起充血性心力衰竭、左室射血分数的下降、高血压、心律失常、QTC 期延长以及心肌缺血等现象,造成可逆或不可逆的心脏损伤^[13]。

骨形态发生蛋白 10 (BMP10) 是一种肿瘤坏死因子- β (TGF- β) 超家族的分泌型细胞外信号多肽,在哺乳动物胚胎心脏发育过程中起到关键作用^[14-16]。BMP10 的表达可以在特定的心脏病理情况下被重新激活^[16]。为了研究 BMP10 在成年动物心脏中的作用,作者前期研究构建了条件型转基因小鼠模型,发现 BMP10 在成年动物心脏中的过表达可以有效降低 β -肾上腺素类似物长期过度刺激引起的心肌细胞死亡,并保护受损心脏。此外,BMP10 通过旁分泌的方式来发挥其作用,这一特性赋予了其全身给药的能力。

在这项研究中,作者制备了一种关键的心源性生长因子 BMP10,并测试其是否可以减轻由 DOX 诱导的心脏损伤。作者研究证明,在注射 DOX 后,与使用生理盐水处理的野生型小鼠相比,BMP10 处理小鼠具有更好的心脏功能,证明 BMP10 可以有效地保护心脏免受 DOX 介导的心脏毒性影响,现将结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 材料与设备

CHO-S 细胞株为本实验室留存细胞株,C2C12 细胞株购自 ATCC。高保真酶, Takara; DMEM/F12 培养基,胎牛血清, G418, DMEM 等, Gibco; M2/M4 CHO 无血清培养基, Feed4 补料培养基,苏州康聚生物有限公司; anti-BMP10 antibody, R&D; Dual luciferase reporter assay system, Promega。

1.2 实验方法

1.2.1 表达质粒构建:通过融合 PCR 的方法除去重组人 BMP10 (rhBMP10) cDNA 序列中的 EcoRI 识别位点 (GAATTC),突变后的序列为 GAGTTC,不影响其编码的氨基酸序列和翻译效率。修改后的 cDNA 被 EcoRI 和 Not I 酶切,并使用 T4 连接酶插入到 pMH3 质粒中。融合 PCR 所使用的引物和 PCR 程序见表 1。

1.2.2 CHO-BMP10 细胞株构建:取悬浮培养的状态良好的 CHO-S 细胞,计数,取约 3.0×10^6 cells/mL

表 1 融合 PCR 引物

引物名称	序列
FL-5'	CGAAGAATTCACCATGGGCTCTCTGGT CCTGACAC
FL-3'	ATTGCGGCCGCCTATCTACAGCCACA TTCGGAGACG
MID-5'	ATCCAGGCCTTGGTCCACCTCAAGAG TTCCAGAAAGCTTCCAAAGCCT
MID-3'	AGGCTTTGGAAGCTTTCTGGGAAGTCTT GAGGTGACCAAGGCCTGGAT

细胞,离心,用 200 μ L PBS 重悬,加入 40 μ g 质粒和 10 μ g Salmon sperm 混匀,将电转体系加入预冷的 2 mm 电击杯中,置冰上 5 min, 160 V, 15 ms 电击共 3 次。取 2 个 100 mm dish, 分别加入 10 mL D/F 完全培养基,将电击后的体系均匀分至 2 个 dish 中,置于湿式二氧化碳培养箱静置培养 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)。

CHO-S 转染第 2 天,换液,加入终浓度为 4.5 mg/mL 的 G418 进行压力筛选,静置培养约 10 d。取 96 孔板,每孔加入 200 μ L D/F 完全培养基。取压力筛选后,生长出克隆的 dish,用 10 μ L tip 挑取克隆,并转移至 96 孔板中。约 1 周后,镜检可观察到明显克隆,弃上清,加入 100 μ L D/F 基础培养基,2 d 后取上清,Dot blot 检测 BMP10 表达水平,选取高表达的 3 个克隆,使用 dish 扩大培养后,再挑去克隆至 96 孔板中,重复上述步骤,共 3 次。最后,取表达量最高的 1 株细胞,稀释至约 3.5 cells/mL,每孔 200 μ L 铺 96 孔板,选择单克隆,扩大培养并冻存,命名为 CHO-BMP10 细胞系。

1.2.3 CHO-BMP10 流加培养:将 CHO-BMP10 细胞株悬浮驯化,将生长状态良好的种子接种于 250 mL 摇瓶中,密度为 1.0×10^6 cells/mL,体积 150 mL, 100 转/min, 37 $^{\circ}$ C 培养。至密度为 $(5.0 \sim 6.0) \times 10^6$ cells/mL 时,将二级种子接入 3 L 摇瓶中, 100 转/min, 37 $^{\circ}$ C 培养。根据生长情况将培养体积逐渐补充至 1.5 L, 停止补加培养基后,待细胞密度上升至 $(9.0 \sim 10.0) \times 10^6$ cells/mL 时,降温至 34 $^{\circ}$ C 培养。根据葡萄糖浓度添加 Feed 4 补料培养基,维持体系中葡萄糖的浓度在 3 g/L 左右。至细胞直径 ≥ 16 μ m 时,密切关注细胞活率,当活率突然下降时 (90% 左右),结束培养。

1.2.4 纯化:将 5 L 培养上清 8 000 转/min 离心 30 min。用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤上清,然后使用 Millipore Pellicon 超滤系统和 10 kDa 膜包进行

缓冲液置换。将体积超滤浓缩至 500 mL, 然后加入 50 mmol/L 苯丁酸钠 (NaPB) 4.5 L, 超滤浓缩至 500 mL, 然后再加入 50 mmol/L NaPB 4.5 L, 超滤浓缩至 500 mL。

将 3 个 5 mL HiTrap Q HP 柱串联, 接入 AKTA avant 25。所使用的流动相中, A 液为 50 mmol/L NaPB, B 液为 1 mol/L 氯化钠 (NaCl), 系统流速为 1 mL/min。用 A 液冲平 UV280, 调零后上样, 然后用 A 液淋洗, 直至冲平 UV280, 用 25% B 液洗脱并收集洗脱峰。

用 10 kDa 超滤管将 Q 柱纯化产物浓缩。Loop 环上样至采用 50 mmol/L NaPB + 150 mmol/L NaCl 平衡过的 Superdex 200 10/300 色谱柱上, 并收集洗脱峰。所使用的流动相为 50 mmol/L NaPB + 150 mmol/L NaCl, 系统流速为 0.5 mL/min。

1.2.5 蛋白电泳: CHO 细胞的培养上清或纯化后的蛋白, 适当稀释后, 加入不含还原剂的 5 × Loading Buffer, 常规制样, 并使用 4% ~ 20% 梯度胶板进行电泳。根据需要进行考马斯亮蓝染色或 Western blot。

1.2.6 荧光素酶报告检测: 取 C2C12 细胞铺 24 孔板, 每孔 7×10^4 cells。培养过夜后, 转染 pGL6 质粒, 6 h 后换液, 每孔加入适当稀释的 BMP10 标准品或样品, 培养 12 h, 用 PBS 洗涤 1 次, 弃上清, 按照试剂盒说明书进行检测。

1.2.7 动物模型构建: 70 只雄性健康 C57BL/6J 小鼠被随机分为 4 组, 其中 2 组为每组 15 只 (Saline 组, rhBMP10 组), 其他 2 组为每组 20 只 (DOX 组, DOX + rhBMP10 组)。在实验开始前 3 d, Saline 组、DOX 组每天注射 PBS 200 μ L; rhBMP10 组、DOX + rhBMP10 组每天注射 200 μ L rhBMP10 (2 μ g), 直至第 5 周结束。Saline 组、rhBMP10 组每周注射 1 次 PBS, 共 5 次; DOX 组、DOX + rhBMP10 组每周注射 1 次 DOX (5 mg/kg), 共 5 次^[17]。第 5 周结束后, 每组随机选取 4 只动物检测超声心动图; 随后处死动物, 分离血清检测血清心肌肌钙蛋白和肌红蛋白水平; 取心脏组织切片并使用 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡水平。

1.2.8 超声心动图: 采用 Visual Sonics 公司的 Vevo 2100 小动物超声系统, 在第 5 周实验结束后进行超声心动图检测。使用 Vaporizer 雾化罐, 将小鼠置于密闭透明亚克力箱中, 使其吸入异氟烷麻醉, 在小鼠左胸涂抹适量脱毛膏, 稍等片刻后用湿棉球擦去毛发。采用仰卧位将小鼠固定至恒温

手术台, 套上异氟烷呼吸面罩。固定四肢以采集心电及呼吸信号, 待心率稳定后在左胸涂抹耦合剂, 接入探头采集数据。选取短轴切面进行采集。自 B mode 超声心动图中截取 M mode 超声, 并以此为基础计算短轴缩短率 (FS)。

1.2.9 TUNEL: 取小鼠心脏组织, 常规脱水包埋, 并切片。常规脱蜡至水, 用索莱宝 TUNEL 试剂进行检测。

1.3 统计学分析

数据以均数 \pm 标准差表示, 行 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

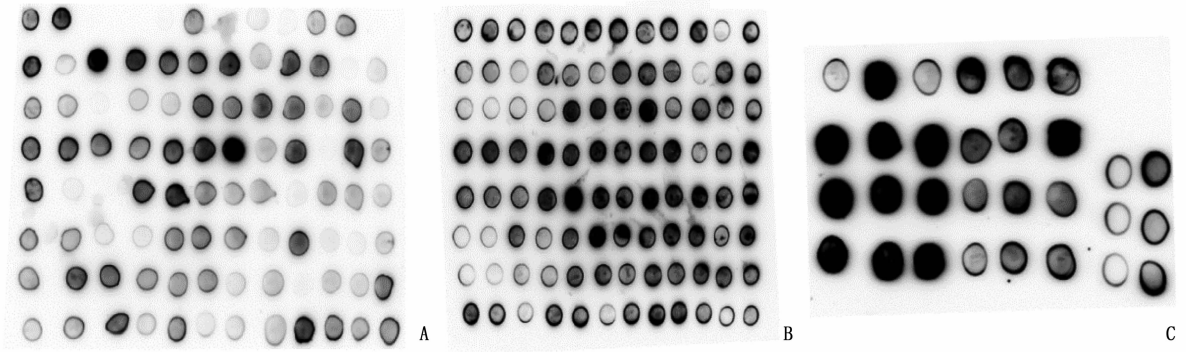
2.1 CHO-BMP10 细胞株的构建

将构建好的 pMH3 质粒电转染至 CHO-S 空细胞, 并加入终浓度为 4.5 mg/mL 的 G418 压力筛选。约 10 d 后, 可在 dish 底部观察到肉眼可见的白色半透明细胞克隆。将克隆挑至 96 孔板并培养至圆形克隆长出后, 换用 D/F 基础培养基培养 2 d, 并用 Dot blot 检测上清中 rhBMP10 的表达水平。第 1 次克隆检测中 (图 1A), 背景较深, 一方面说明 rhBMP10 的表达水平较低, 另一方面说明单孔中的细胞为非单一来源细胞, 有一定比例的细胞不能表达 rhBMP10。第 2 次克隆中 (图 1B), rhBMP10 的表达水平呈上升趋势。选取第 2 次克隆中表达最高的 3 个孔, 将细胞消化、扩大培养后, 用有限稀释法接种至 96 孔板, 待克隆长出后再次进行 Dot blot 检测 (图 1C)。选取表达量最高的孔, 扩大至 24 孔板培养并再次检测, 将表达量最高的细胞株扩大培养并冻存, 得到稳定表达 rhBMP10 的 CHO-S 工程细胞株 CHO-BMP10。

2.2 rhBMP10 的流加培养

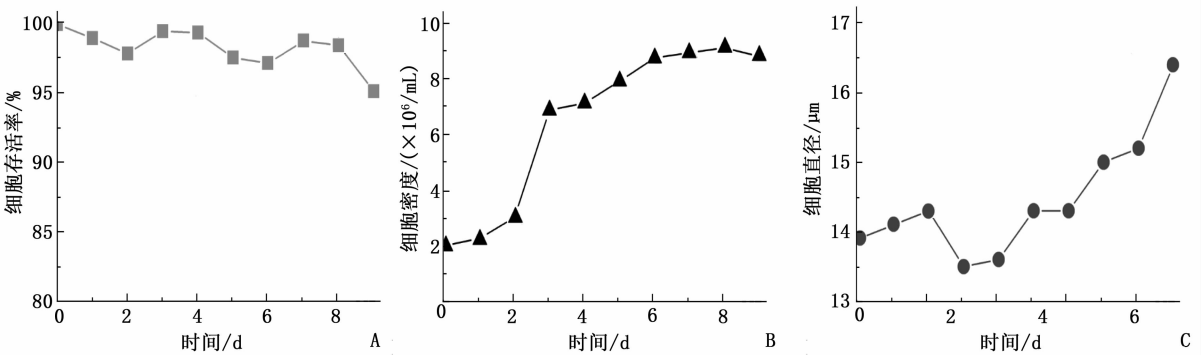
细胞在 0 ~ 3 d 呈现快速增长状态, 此时细胞处于对数增长期, 细胞增殖旺盛, 存活率高且细胞直径小。在 4 d 开始进行补料, 同时将培养温度下调至 34 $^{\circ}$ C, 以延长平台期, 维持细胞的高密度生长状态。由于养分的消耗和空间的挤占, 细胞生长速度下降, 活率也缓慢下降, 最终在 8 d 达到最大密度 (9.1×10^6 cells/mL)。从第 3 天开始, 细胞直径逐步增大, 到第 9 天达到 16.4 μ m, 提示细胞衰老, 同时存活率下降至 94.0%, 故选择在第 10 天结束培养。见图 2。

取样进行 Western blot, 由图 3 可以看出, rhBMP10 随着培养时间的增加逐步积累, 同时呈



A: 第 1 次克隆筛选结果; B: 第 2 次克隆筛选结果; C: 单克隆化后的表达情况

图 1 rhBMP10 表达细胞株构建免疫印迹图



A: 细胞存活率; B: 细胞密度; C: 细胞直径

图 2 CHO-BMP10 细胞株在 3 L 摇瓶流加培养过程中的生长情况

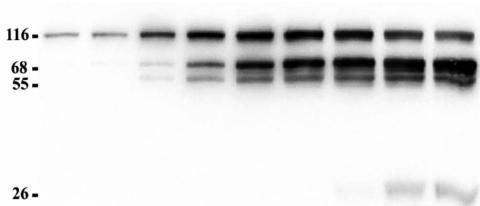


图 3 CHO-BMP10 细胞株在 3 L 摇瓶流加培养过程中的产物累积情况 (Western blot)

现多条带的特征。其中 116 kDa 的条带在 1~2 d 较少,随后逐渐增多; 68 kDa 和 55 kDa 的条带则在 3 d 开始积累,而位于 26 kDa 的成熟 rhBMP10 生长因子结构域二聚体则在 7 d 开始出现,表明 CHO 表达体系缺乏相关的酶切体系,不足以处理 rhBMP10 中存在的 RIRR^{L316} 酶切位点。

对结束培养时的表达上清进行 ELISA 定量分析,结束培养时的 rhBMP10 产量为 35.3 mg/L。

2.3 rhBMP10 的纯化

本研究分别使用 Q 柱和分子筛对所表达的 rhBMP10 进行了纯化。Q 柱纯化中,洗脱峰的考马斯亮蓝染色结果呈现多条带的特征,主要包括 116 kDa、68 kDa、43 kDa、26 kDa 这 4 个条带。在分子筛纯化中,上述 4 个条带亦未被分离。对纯

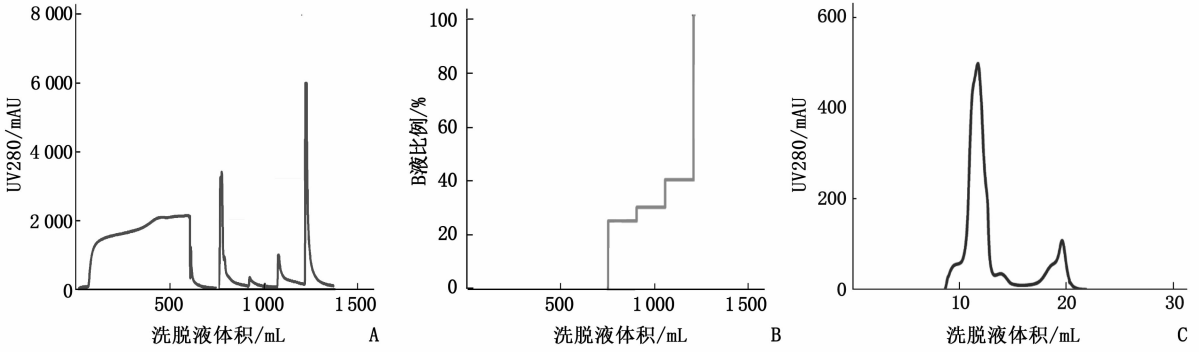
化后的表达上清进行 ELISA 定量分析,获得的纯化 rhBMP10 纯度 $\geq 95\%$,浓度为 4.5 mg/mL,体积为 15.3 mL, rhBMP10 总产量为 68.85 mg,收率为 49.8%。见图 4、5。

2.4 荧光素酶报告活性检测

能够被 BMP 家族成员特异性激活的核酸序列被称为 BMP 反应区段 (BRE)。将 BRE 序列整合到 Minimal TA promoter 前,在 BMP10 的存在下,便可以特异性地启动其下游编码蛋白的转录。作者构建了包含 BRE 元件的 pGL6 萤火虫荧光素酶报告质粒,将其稳定转染至 C2C12 细胞中,并利用这种方法对 BMP10 的生物活性进行体外检测。

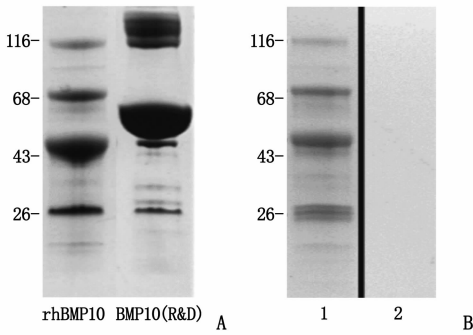
在作者构建的 C2C12 报告细胞株中,血清会对报告系统造成比较大的影响。培养基中 0%、0.1%、1%、2%、5%、10% 的胎牛血清 (FBS) 分别可以导致 (1 326 \pm 200)、(3 495 \pm 270)、(10 692 \pm 1 414)、(21 933 \pm 1 615)、(42 816 \pm 3 269)、(73 792 \pm 4 601) 相对荧光素酶单位 (RLU) 的非特异性信号。因此将检测过程的培养基血清含量降低至 0.1%,以保证较高的信噪比。

检测过程中使用浓度 10 ng/mL 的 rhBMP10 来测定 rhBMP10 的生物活性。未转染质粒的空白对



A: Q 柱纯化色谱图 (UV280); B: Q 柱纯化色谱图 (B 液比例); C: Gel filtration 柱纯化运行图谱

图 4 rhBMP10 的纯化结果图



A: Q 柱纯化收集洗脱峰的考马斯亮蓝染色图, rhBMP10 为含有 250 mmol/L NaCl 的 50 mmol/L NaPB 洗脱峰, BMP10(R&D) 为从 R&D 公司购买的对照品; B: Gel filtration 柱纯化收集洗脱峰的考马斯亮蓝染色图, 1 为 ~12 mL 洗脱峰, 2 为 ~19 mL 洗脱峰。

图 5 收集洗脱峰的考马斯亮蓝染色图

照、加入 CHO-S 空细胞培养上清、TGF- β 或是 PBS 的 C2C12 细胞几乎不表达萤火虫荧光素酶, 其信号值依次为 (22 \pm 9)、(2 652 \pm 405)、(3 585 \pm 297)、(3 315 \pm 366) RLU, 说明该检测系统的特异性较

好, 噪音值较低。从 R&D 购买的 BMP10 GFD 二聚体在 10 ng/mL 浓度时的信号值为 (67 640 \pm 8 535) RLU。同等浓度下, CHO-BMP10 表达并纯化的 rhBMP10 可以诱导表达 (86 367 \pm 2 685) RLU, 证实 CHO-BMP10 表达并纯化的 rhBMP10 具有很好的生物活性。

2.5 超声心动图

为了评价多柔比星对小鼠心脏收缩和舒张功能的损伤, 作者使用经胸廓超声心动图来检测小鼠的心功能 ($n=4$)。通过使用超高频的超声探头, 并配合 M mode 超声, 可以无损地对小鼠的左室功能进行定量分析。与 Saline 组相比, DOX 模型组的小鼠心脏功能出现了明显下降, 其短轴缩短率为 (40.4 \pm 2.8)%, 较 Saline 组 (58.0 \pm 2.8)% 出现了显著下降 ($P<0.01$), 提示多柔比星模型组小鼠心肌的收缩功能受损, 心功能下降。在 rhBMP10 组 (52.7 \pm 2.9)% 和 DOX + rhBMP10 联合给药组 (52.6 \pm 4.1)% 小鼠的超声结果中, 小鼠的心脏功能与 Saline 组相比差异无显著性。见图 6。

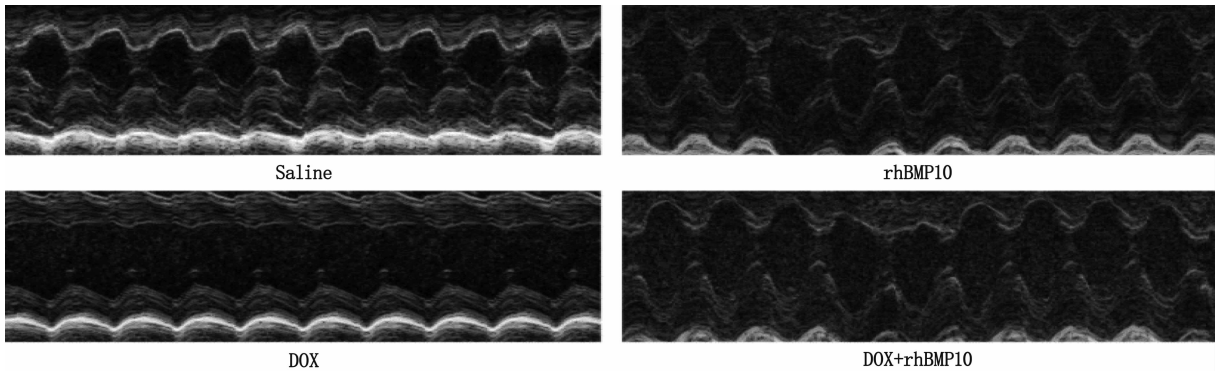


图 6 超声心动图检查结果

2.6 血清心肌损伤标志物检测

在 DOX 处理组中, 小鼠血清中的心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 和肌红蛋白 (Mb) 水平分别为 (138.5 \pm

23.8)、(292.2 \pm 20.4) ng/mL, 显著高于 Saline 组中的 (98.8 \pm 5.9)、(157.9 \pm 19.2) ng/mL 和 rhBMP10 组中的 (112.3 \pm 5.8)、(150.9 \pm 40.3) ng/mL, 提示心

肌细胞受损。而 DOX + rhBMP10 组小鼠中, cTnI 和 Mb 水平分别为(106.7 ± 8.0)、(175.4 ± 21.8) ng/mL。

表 2 各组血清心肌钙蛋白 I、肌红蛋白水平比较($\bar{x} \pm s$)

指标	Saline 组	BMP10 组	DOX 组	DOX + BMP10 组
cTnI/(ng/L)	98.8 ± 5.9 *	112.3 ± 5.8	138.5 ± 23.8	106.7 ± 8.0 *
Mb/(ng/mL)	157.9 ± 19.2 **	150.9 ± 40.3	292.2 ± 20.4	175.4 ± 21.8 **

cTnI: 心肌钙蛋白 I; Mb: 肌红蛋白。与 DOX 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.7 TUNEL

TUNEL 检测中, DOX 组小鼠的心脏凋亡比例显著上升($P < 0.01$), 达到(0.236 ± 0.082)%, 高于 DOX + rhBMP10 组(0.038 ± 0.028)% 和 Saline 组(0.011 ± 0.020)%。在 rhBMP10 对照组中, 心肌细胞的凋亡比例为(0.022 ± 0.022)%。见图 7。

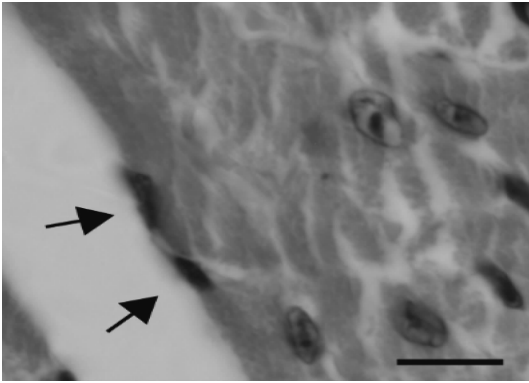


图 7 TUNEL 检测结果图(标尺 20 μm)

3 讨论

骨形态发生蛋白(BMP)属于 TGF-β 超家族。BMP 的所有成员在蛋白质序列中具有独特的同一性, 并且具有相似的蛋白质结构, 但具有不同的组织分布和生物学功能。在心脏中发现了 6 个 BMP 成员的表达, 其中包括 BMP2、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7 和 BMP10, 且已被证明参与了心脏发育的多个步骤。BMP10 的表达主要存在于心脏^[15]。BMP2 和 BMP4 的表达较为广泛, 并参与心源性诱导和心内膜垫形成^[15, 18]。

研究^[19]显示, BMP5、BMP6 和 BMP7 在早期心脏发育中调节心室壁和腔室形成。已知 BMP10 可在某些心脏病发病条件下重新激活^[16], 但 BMP10 在出生后心脏中的生物学功能尚不清楚。通常情况下, BMP 通过与 I 型和 II 型丝氨酸/苏氨酸激酶受体结合, 磷酸化 Smad1/5/8 蛋白并发挥其生物学活性^[20-21]。作者的前期研究表明, 出生后心脏中 BMP10 的转基因过表达显著降低了心肌细胞肥大性生长, 同时不影响运动诱

导的心脏肥大和对 β-肾上腺素能激动剂异丙肾上腺素的肥大反应(即模拟病理性肥大)。这些研究表明 BMP10 可能是一种心脏保护试剂。

本研究中, 作者制备了具有高生物活性的 rhBMP10 蛋白, 通过高剂量、多次的多柔比星注射构建了多柔比星诱导的小鼠心脏病模型, 并证明了 rhBMP10 的使用可以减轻多柔比星引起的心功能下降、心肌细胞损伤和凋亡。通过分析 rhBMP10 对多柔比星介导的心脏毒性的影响, 进一步证实了 BMP10 在心脏保护方面的积极意义。

参考文献

- [1] 陈伟伟, 高润霖, 顾东风, 等. 中国心血管病报告[J]. 中国循环杂志, 2017, 32(6): 521-530.
- [2] 周京敏, 崔晓通, 葛均波. 中国心力衰竭的流行病学概况[J]. 中华心血管病杂志, 2015, 43(12): 1018-1021.
- [3] 顾东风, 黄广勇, 何江, 等. 中国心力衰竭流行病学调查及其患病率[J]. 中华心血管病杂志, 2003, 31(1): 3-6.
- [4] Whelan R S, Kaplinskiy V, Kitsis R N. Cell Death in the Pathogenesis of Heart Disease: Mechanisms and Significance[J]. Annual Review of Physiology, 2010, 72(1): 19-44.
- [5] Kung G, Konstantinidis K, Kitsis R N. Programmed necrosis, not apoptosis, in the heart[J]. Circulation Research, 2011, 108(8): 1017-1036.
- [6] Raschi E, Vasina V, Grazia M, et al. Pharmacology & Therapeutics Anticancer drugs and cardiotoxicity: Insights and perspectives in the era of targeted therapy[J]. Pharmacology and Therapeutics, 2010, 125(2): 196-218.
- [7] Minotti G. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity[J]. Pharmacological Reviews, 2004, 56(2): 185-229.
- [8] Foo R S, Mani K, Kitsis R N, et al. Death begets failure in the heart[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2005, 115(3): 565-571.
- [9] Rosa G M, Gigli L, Tagliasacchi M I, et al. Update on cardiotoxicity of anti-cancer treatments[J]. European Journal of Clinical Investigation, 2016, 46(3): 264-284.
- [10] Myers C E, Mcguire W P, Liss R H, et al. Adriamycin: The role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response[J]. Science, 1977, 197(4299): 165-167.

(下转第 17 面)

- Obstet Gynecol, 2010, 22(3): 202–207.
- [9] Schoolcraft W B, Surrey E S, Gardner D K. Embryo transfer: techniques and variables affecting success[J]. Fertil Steril, 2001, 76(5): 863–870.
- [10] Ishihara O, Kuwahara A, Saitoh H. Frozen-thawed blastocyst transfer reduces ectopic pregnancy risk: an analysis of single embryo transfer cycles in Japan[J]. Fertil Steril, 2011, 95(6): 1966–1969.
- [11] Smith L P, Oskowitz S P, Dodge L E, et al. Risk of ectopic pregnancy following day-5 embryo transfer compared with day-3 transfer[J]. Reprod Biomed Online, 2013, 27(4): 407–413.
- [12] Milki A A, Jun S H. Ectopic pregnancy rates with day 3 versus day 5 embryo transfer: a retrospective analysis[J]. BMC Pregnancy Childbirth, 2003, 3(1): 7–13.
- [13] Keegan D A, Morelli S S, Noyes N, et al. Lowectopic pregnancy rates after in vitro fertilization: do practice habits matter[J]. Fertil Steril, 2007, 88: 734–736.
- [14] Rosman E R, Keegan D A, Krey L, et al. Ectopic pregnancy rates after in vitro fertilization: a look at the donor egg population[J]. Fertil Steril, 2009, 92: 1791–1793.
- [15] Glujovsky D, Farquhar C, Quinteiro Retamar A M, et al. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2016(6): CD002118.
- [16] Fanchin R, Ayoubi J M, Righini C, et al. Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfers[J]. Hum Reprod, 2001, 16(6): 1115–1119.
- [17] 王菁, 刘嘉茵, 崔毓桂. 异位妊娠发生机制研究进展及辅助生殖技术相关高危因素分析[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2013, 32(3): 203–206.
- [18] Ellaihy M, Abdelaziz A, Hassan M F. Outcome prediction in pregnancies of unknown location using endometrial thickness measurement: is this of real clinical value[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2013, 168(1): 68–74.
- [19] Moschos E, Twickler D M. Endometrial thickness predicts intrauterine pregnancy in patients with pregnancy of unknown location[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2008, 32: 929–934.
- [20] Rombauts L, Motteram C, Berkowitz E, et al. Risk of placenta praevia linked to endometrial thickness in a retrospective cohort study of 4537 singleton assisted reproduction technology births[J]. Hum Reprod, 2014, 29: 2787–2793.
- [21] Rombauts L, McMaster R, Motteram C, et al. Risk of ectopic pregnancy is linked to endometrial thickness in a retrospective cohort study of 8120 assisted reproduction technology cycles[J]. Hum Reprod, 2015, 30(12): 2846–2852.

(上接第 6 面)

- [11] Mettler F P, Young D M, Ward J M. Adriamycin induced cardiotoxicity (cardiomyopathy and congestive heart failure) in rats[J]. Cancer Research, 1977, 37(8): 2705–2713.
- [12] Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. From the Cardiotoxic Mechanisms to Management[J]. Progress in Cardiovascular Diseases, 2007, 49(5): 330–352.
- [13] Ewer M S, Ewer S M. Cardiotoxicity of anticancer treatments[J]. Nature Reviews Cardiology, 2015, 12(9): 547–558.
- [14] Pashmfroush M, Lu Jonathan T, Chen H Y, et al. Nkx2-5 pathways and congenital heart disease: Loss of ventricular myocyte lineage specification leads to progressive cardiomyopathy and complete heart block[J]. Cell, 2004, 117(3): 373–386.
- [15] Chen H Y, Shi S, Acostaqa L, et al. BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis[J]. Development, 2004, 131(9): 2219–2231.
- [16] Hori Hisae, Abe Minako, Nakano Noritsugu, et al. Interaction of BMP10 with Teap may modulate the course of hypertensive cardiac hypertrophy[J]. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2007, 293(6): H3396–H3403.
- [17] Zhu W Q, Soonpaa M H, Chen H Y, et al. Acute doxorubicin cardiotoxicity is associated with p53-induced inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway[J]. Circulation, 2009, 119(1): 99–106.
- [18] Ducy P, Karsenty G. The family of bone morphogenetic proteins[J]. Kidney International, 2000, 57(6): 2207–2214.
- [19] Solloway M J, Robertson E J. Early embryonic lethality in Bmp5; Bmp7 double mutant mice suggests functional redundancy within the 60A subgroup [J]. Development (Cambridge, England), 1999, 126(8): 1753–1768.
- [20] Macias M J, Martin-Malpartida P, Massagué J, et al. Smad transcription factors [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2015, 40(6): 2783–2810.
- [21] Derynck R, Zhang Y E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling[J]. Nature, 2003, 425(6958): 577–584.