

p42/p44MAPK 通路在高糖诱导的 hRPE 细胞 VEGF 表达中的作用

张春侠¹, 胡建民², 庄铭忠²

作者单位:¹(250200)中国山东省章丘市,济南市明水眼科医院;²(362000)中国福建省泉州市,福建医科大学附属第二医院眼科

作者简介:张春侠,女,毕业于福建医科大学,硕士,主治医师,研究方向:眼底病。

通讯作者:胡建民,男,副主任医师,副教授,硕士研究生导师,中山眼科中心眼科学(眼视光)博士,目前主持及参与国家科技支撑项目、国家自然科学基金项目等多项研究,已发表国外杂志 SCI 文章 9 篇,研究方向:眼视光、眼底病及葡萄膜炎的诊治。

fjqzhjm@126.com

收稿日期:2014-03-09 修回日期:2014-07-14

Role of p42/p44MAPK signal transduction pathway in expression of VEGF induced by elevated glucose concentration in cultured hRPE cells

Chun - Xia Zhang¹, Jian - Min Hu², Ming - Zhong Zhuang²

¹Jinan Mingshui Eye Hospital, Zhangqiu 250200, Shandong Province, China; ² Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000, Fujian Province, China

Correspondence to: Jian-Min Hu. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000, Fujian Province, China. fjqzhjm@126.com

Received: 2014-03-09 Accepted: 2014-07-14

Abstract

• **AIM:** To study p42/p44 mitogen - activated protein kinases (MAPK) signal transduction pathway effect on vascular endothelial growth factor (VEGF) expression induced by elevated glucose concentration in cultured human retinal pigment epithelium (hRPE).

• **METHODS:** hRPE cells were cultured and divided into four groups: normal glucose group (NG) (5.6mmol/L), high glucose group (HG1: 15mmol/L D - glucose, HG2: 20mmol/L D - glucose, HG3: 30mmol/L D - glucose), PD98059 group. hRPE cells were treated by an efficient and selective inhibitor PD98059 (20μmol/L) of p42/p44MAPK signal transduction pathway and solvent dimethyl sulfoxide group (DMSO group). The expression of VEGF and pigment epithelium derived factor (PEDF) mRNA was detected by RT - PCR. VEGF protein expression in cultured hRPE supernatants was detected by enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA).

• **RUSULTS:** VEGF mRNA and protein expression induced by elevated glucose concentration increased significantly. VEGF mRNA and protein expression were restrained in PD98059 group. Ratio of (VEGF/β - actine)/(PEDF/β - actine) in PD98059 group decreased significantly compare with that in high glucose group.

• **CONCLUSION:** p42/p44MAPK signal transduction pathway might play a part in VEGF expression induced by elevated glucose concentration in cultured hRPE cells.

• **KEYWORDS:** retinal pigment epithelial cells; high glucose; vascular endothelial growth factors; pigment epithelium derived factor; mitogen - activated protein kinases

Citation: Zhang CX, Hu JM, Zhuang MZ. Role of p42/p44MAPK signal transduction pathway in expression of VEGF induced by elevated glucose concentration in cultured hRPE cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(8):1382-1385

摘要

目的:探讨 p42/p44 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen - activated protein kinases, MAPK) 信号转导通路在高糖诱导的人视网膜色素上皮 (human retinal pigment epithelium, hRPE) 细胞血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达中的作用。

方法:采用 hRPE 细胞株,将细胞分为正常对照组 (5.6mmol/L 葡萄糖)、高糖对照组 (15, 20, 30mmol/L 葡萄糖)、PD98059 处理组 (20μmol/L p42/p44MAPK 高效选择性抑制剂 PD98059 处理 hRPE 细胞) 和溶剂二甲基亚砜对照组 (dimethyl sulfoxide, DMSO 组)。应用逆转录 PCR (RT-PCR) 技术检测 VEGF 及色素上皮细胞衍生因子 (pigment epithelium derived factor, PEDF) mRNA 的表达。

应用酶联免疫吸附测定 (enzyme - linked immunosorbent assay, ELISA) 技术检测细胞上清液中 VEGF 蛋白的表达

结果:高糖作用下 VEGF mRNA 和蛋白表达显著增高, PD98059 处理组 VEGF mRNA 和蛋白表达受到抑制,且 VEGF mRNA/PEDF mRNA 比值较高糖组显著降低。

结论:p42/p44MAPK 信号转导通路可能参与了高糖引起的 hRPE 细胞 VEGF 的表达。

关键词:视网膜色素上皮细胞;高浓度葡萄糖;血管内皮生长因子;色素上皮源性衍生因子;丝裂原活化蛋白激酶
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.08.04

引用:张春侠,胡建民,庄铭忠. p42/p44MAPK 通路在高糖诱导的 hRPE 细胞 VEGF 表达中的作用. 国际眼科杂志 2014; 14 (8):1382-1385

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)晚期,视网膜新生血管形成,通常会造成严重的视力损伤,最终导致失明。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)受多种因素的调节使它成为重要的促新生血管生成因子,参与糖尿病视网膜病变新生血管的形成^[1,2]。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)途径是普遍存在于各种细胞中的信号转导途径,在许多细胞的增生和程序化死亡等的调节中具有重要意义。MAPK作为高糖所致不同信号通路的交汇点,其活性的变化直接参与DR的发生发展^[3]。前期研究显示,高糖可上调人视网膜色素上皮(human retinal pigment epithelial, hRPE)细胞VEGF的表达,但其信号转导机制尚不完全清楚^[4]。细胞外信号调节激酶(extra-cellular signal-regulated kinases, ERKs)是最重要的激酶途径,即p42/p44MAPK(ERK1/2),在受到如细胞因子、生长因子、激素、丝裂原受体、缺氧和高糖等刺激时,参与细胞的增生和分化。本研究拟讨论p42/p44MAPK信号转导通路在高糖诱导hRPE细胞VEGF表达中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 hRPE细胞株为购自中山大学动物实验中心人视网膜色素上皮细胞D407。含5.6mmol/L葡萄糖DMEM培养基购自Invitrogen公司。胎牛血清为杭州四季青产品。Trizol试剂,甘露醇,D-葡萄糖购自上海Sigma公司。逆转录试剂盒为Ferments#1621、Taq酶购自Takara公司。PD98059由福建医科大学生化教研室何艳博士赠送。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 按常规方法培养细胞,细胞接种于6孔板,密度为 4×10^5 个/孔,培养液为含10%胎牛血清及含5.6mmol/L葡萄糖的DMEM培养基。待细胞生长至70%~80%汇合时,更换为无血清5.6mmol/L DMEM培养基同步化24h。PD98059处理组为提前30min加入进行预处理(因PD98059需一定时间进入细胞内发挥阻断作用),再分成正常糖、高糖组,并设立DMSO组作为溶剂对照组,因PD98059需用DMSO溶解,所以加设该组,以排除DMSO的影响。分组如下:(1)对照组:分正常对照组(NG:10%胎牛血清+5.6mmol/L葡萄糖)和高糖对照组(HG1:10%胎牛血清+15mmol/L葡萄糖;HG2:10%胎牛血清+20mmol/L葡萄糖;HG3,10%胎牛血清+30mmol/L葡萄糖);(2)PD98059处理组:20 μ mol/L PD98059+NG(NG+P)、20 μ mol/L PD98059+HG1(HG1+P)、20 μ mol/L PD98059+HG2(HG2+P)、20 μ mol/L PD98059+HG3(HG3+P)。(3)DMSO组:20 μ mol/L PD98059+HG1(HG1+D)。

1.2.2 半定量RT-PCR检测 每组再培养24h后,收获细胞,按Trizol说明书提取细胞总RNA的方法提取所收获细胞的总RNA,紫外分光光度计测定RNA浓度,按Revert Aid First Strand Cdna Synthesis Kit的说明合成第一链cDNA,逆转录反应体系为20 μ L,其中总RNA量为2 μ g,70 $^{\circ}$ C 5min变性,37 $^{\circ}$ C温育5min,42 $^{\circ}$ C反转录1h,70 $^{\circ}$ C温育10min,-20 $^{\circ}$ C保存备用。引物设计合成,VEGF:5'-TAGACACACCCACCCACATA-3'(正义),5'-AACATTAGCACTGTTAATT-3'(反义),扩增片段长度为125bp,

PCR反应条件为:94 $^{\circ}$ C预变性5min,94 $^{\circ}$ C变性45s,53.5 $^{\circ}$ C退火45s,72 $^{\circ}$ C延伸1min,40个循环,72 $^{\circ}$ C再延伸7min。色素上皮源性生长因子(pigment epithelium derived factor, PEDF):5'AAATCCAGCTTTGTGGCACCTC3'(正义),5'ACGGTCTTCAGTTCTCGGTCTA3'(反义),扩增片段长度为473bp,PCR反应条件为:94 $^{\circ}$ C预变性5min,94 $^{\circ}$ C变性30s,55 $^{\circ}$ C退火45s,72 $^{\circ}$ C延伸1min,35个循环,72 $^{\circ}$ C再延伸7min。同时设计内参照 β -actin:5'CGAGAAGATGACCCAGATCA3'(正义),5'GATCTTCATGAGGTAGTCAG3'(反义)扩增片段长度为224bp(PCR反应条件同VEGF及PEDF PCR反应条件)。PCR反应体系(20 μ L)均为:cDNA模板0.5 μ L+10pmol/ μ L上下游引物各0.5 μ L+10mmol/LdNTPs 0.4+5 U/L Taq酶0.25+10 \times buffer 2 μ L(含20mmol/L MgCl₂)+ddH₂O 15.85 μ L。扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳。用HPIAS1000型图像分析系统照相,使用Quantity One 6.0分析软件测量目的基因VEGF、PEDF及内参 β -actin的积分吸光度(A)值,并分别计算各条带 $A_{VEGF}/A_{\beta-actin}$ 及 $A_{PEDF}/A_{\beta-actin}$ 的比值,即相对积分吸光度值(relative integral absorbance, RIA),以此作为各组VEGF mRNA及PEDF mRNA的相对表达量。

1.2.3 VEGF蛋白的酶联免疫吸附测定 每组再培养48h后,收获上清液中的蛋白,采用双抗体夹心ELISA法,VEGF试剂盒为美国B-G公司产品。操作步骤按照ELISA试剂盒说明书进行,用酶标仪测量OD₄₅₀值。以VEGF标准品浓度为横坐标,OD值为纵坐标,做直线相关回归,据待测样本的OD值在标准曲线上查出该样本的VEGF水平对应值。主要仪器为美国Bio-Rad450型酶标仪。

统计学分析:应用SPSS 12.0统计软件,所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)形式表示,多组间比较应用方差分析,组间比较应用方差分析中的两两比较LSD-t检验。PD98059处理组和DMSO组与对照组的比较应用配对t检验,以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖条件下hRPE细胞VEGF的表达随时间的变化

15.0mmol/L高糖培养hRPE细胞,0,12,24,36,48和60h培养的hRPE细胞VEGF mRNA含量($A_{VEGF}/A_{\beta-actin}$)随时间延长而显著增加,各时间点VEGF含量均较0h明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$),36h表达量达高峰,并持续高表达一段时间,48,60hVEGF mRNA含量与36h相比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1,图1。

15.0mmol/L高糖培养hRPE细胞,0,12,24,36,48,60,72h培养的hRPE细胞上清中VEGF蛋白含量(A_{450nm})随时间延长而显著增加,各时间点VEGF含量均较0h明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$),48h表达量达高峰,并持续高表达一段时间,60,72hVEGF mRNA含量与48h相比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),结果与其mRNA表达一致,见表1。

2.2 PD98059对高糖培养条件下hRPE细胞VEGF含量的影响 与NG组比较,HG1、HG2及HG3组VEGF mRNA及蛋白的表达均增高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与对照组比较,PD98059处理组VEGF mRNA及蛋白的表达均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);DMSO处理组VEGF mRNA及蛋白的表达与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。VEGF蛋白和mRNA的表达一致。见表2,图2。

表1 高糖培养条件下 hRPE 细胞 VEGF mRNA 及蛋白的表达随时间的变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

时间(h)	$A_{VEGF}/A_{\beta-actine}$	<i>P</i>	VEGF _{proline} (ng/L)	<i>P</i>
0	0.33±0.0764		412.55±16.1194	
12	0.57±0.0839 ^b	0.003	445.95±11.0126 ^b	0.003
24	0.77±0.0208 ^b	1.92×10 ⁻⁵	489.00±10.7984 ^b	8.48×10 ⁻⁷
36	1.91±0.0902 ^b	1.43×10 ⁻¹¹	510.05±4.1245 ^b	4.37×10 ⁻⁸
48	1.76±0.0777 ^{b,c}	4.39×10 ⁻¹¹	529.37±10.3920 ^b	4.35×10 ⁻⁹
60	1.82±0.1015 ^{b,c}	2.78×10 ⁻¹¹	532.54±11.5945 ^{b,c}	3.07×10 ⁻⁹
72			537.17±11.2487 ^{b,c}	1.88×10 ⁻⁹

^b*P*<0.01 vs 0h; ^c*P*>0.05 vs 36h; ^e*P*>0.05 vs 48h。

表2 对照组和 PD98059 处理组 hRPE 细胞 VEGF mRNA 及蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	$A_{VEGF}/A_{\beta-actine}$	<i>P</i>	VEGF _{proline} (ng/L)	<i>P</i>
NG 组	0.69±0.0351		455.55±10.2687	
NG+P 组	0.50±0.0451	0.001	404.26±14.3514	0.020
HG1 组	0.77±0.0208 ^a		529.39±10.392 ^a	
HG1+P 组	0.40±0.0433	0.021	364.32±15.62524	0.005
HG2 组	0.84±0.0153 ^a		549.17±14.2980 ^a	
HG2+P 组	0.67±0.0458	0.035	438.84±12.9264	0.000
HG3 组	1.06±0.0902 ^a		583.95±7.3856 ^a	
HG3+P 组	0.71±0.0503	0.016	475.42±12.4809	0.011
HG1 组	0.77±0.0208		529.37±10.392	
HG1+D 组	0.73±0.1060 ^c	0.513	532.00±16.9417 ^c	0.881

^a*P*<0.05 vs NG 组; ^c*P*>0.05 vs HG1 组。



图1 高糖培养条件下 RPE 细胞 VEGF mRNA 的表达随时间的变化。

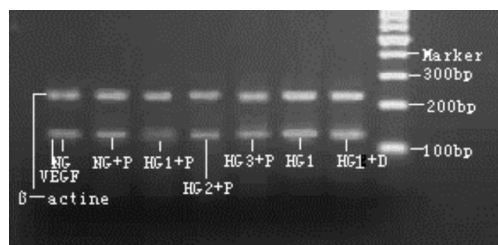


图2 对照组和 PD98059 处理组 RPE 细胞 VEGF mRNA 的表达。

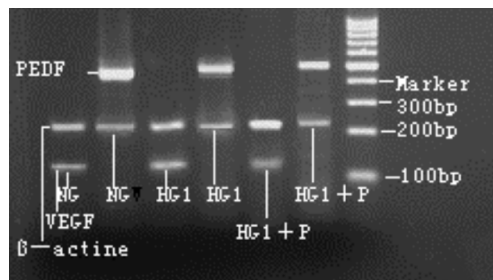


图3 对照组和 PD98059 处理组 RPE 细胞 VEGF mRNA/PEDF mRNA 比值的对比。

表3 对照组和 PD98059 处理组 hRPE 细胞 VEGF mRNA/PEDF mRNA 比值的比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	$(A_{VEGF}/A_{\beta-actine}) / (A_{PEDF}/A_{\beta-actine})$
NG 组	0.26±0.0033 ^b
HG1 组	0.40±0.0289
HG1+P 组	0.21±0.0219 ^b

^b*P*<0.01 vs HG1 组。

2.3 PD98059 对高糖培养条件下 hRPE 细胞 VEGF mRNA/PEDF mRNA 比值的影响 与 NG 组比较, HG1 组 VEGF mRNA/PEDF mRNA 的比值明显增高, 差异有统计学意义 ($P=1.86 \times 10^{-4}$); 与 HG1 组比较, PD98059 处理组 VEGF mRNA/PEDF mRNA 的比值明显减少, 差异有统计学意义 ($P=3.26 \times 10^{-5}$), 见表3, 图3。

3 讨论

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病微血管病变的重要并发症之一。在糖尿病状态下, 近年来发现在高糖、血管活性物质和细胞因子作用下, 丝裂原活化的蛋白激酶激活引起的细胞生长、增殖、分化、凋亡等作为 DR 发生、发展的共同通路日益成为热点。其中已有

报道, 在糖尿病状态下, 高糖^[3, 5, 6]、低氧^[7]、胰岛素样生长因子-1^[8]、转化生长因子 β ^[9] 等多种因素可激活 MAPK 通路, 进而调节 VEGF 的表达, 促进 DR 的发生、发展。但 MAPK 通路在高糖促进 DR 发生、发展中的作用机制尚未完全明确^[10], 本文通过应用 MAPK 高效选择性抑制剂 PD98059 来研究高糖在 DR 发生、发展中可能参与的作用机制。

DR 是糖尿病最严重的慢性并发症之一, 其发生率与糖尿病的病程^[11]、发病年龄^[12]、遗传因素和控制情况有关, 血糖控制好的比控制不好的发生 DR 要晚。高糖通过糖基化等多种途径参与糖尿病视网膜病变的发生发展。

在糖尿病视网膜病变发展的过程中起着十分重要的作用。在本实验中我们发现 15mmol/L 高糖培养 hRPE 细胞,随着时间的延长,VEGF mRNA 及蛋白含量增加,并持续高表达一段时间,表明高糖可刺激 VEGF 表达,且具有时间依赖性,进一步证实了高糖在 DR 发生中的作用,且可通过促进 RPE 细胞 VEGF 的表达参与 DR 的发生,也验证了高血糖是糖尿病糖毒性学说最重要的危险因素之一,通过控制血糖可延缓 DR 的发展。

已有研究表明,在体外培养的牛视网膜血管内皮细胞 (bovine retinal endothelial cells, BREC),高糖可分别增加 p42/44MAPK 和 p38MAPK 的活性水平^[13];和原癌基因的表达调控一样,p42/44MAPK 信号转导通路可通过胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 等各种生长因子调控 VEGF 的表达,同时 p42/44MAPK 还可增强缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 的作用,促进 VEGF 的表达。p38MAPK 途径可使 VEGF 的 mRNA 稳定性增加从而增强 VEGF 的作用^[14]。视网膜微血管内皮细胞、周细胞和视网膜色素上皮细胞均可产生 VEGF,其中以 RPE 细胞表达 VEGF 的能力最为显著^[15]。Poulaki 等^[16]也发现在体外培养的人视网膜色素上皮细胞中,高糖激活了 p42/44MAPK、PKC 及 p38MAPK。

MAPK 和磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3-K) 是细胞内重要的信号转导通路,能接受细胞外多种刺激信号,参与细胞多种功能的调控,在细胞增殖、分裂及凋亡中起关键作用,且有交叉作用^[17]。但高糖经 MAPK 通路诱导的 VEGF 表达的增加,不能被 PI3-K 的抑制剂抑制。本研究发现高糖引起 hRPE 细胞 VEGF 表达增强,具有浓度依赖性,经 p42/44MAPK 高效选择性抑制剂 PD98059 处理后,VEGF 表达显著降低,因 PD98059 需用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解,所以加设 DMSO 组作为溶剂对照组,排除了 DMSO 的影响。MAPK 高效选择性抑制剂 PD98059 可抑制高糖诱导的 hRPE 细胞 VEGF 的表达,表明 p42/44MAPK 的激活与 VEGF 的表达相关,提示 p42/44MAPK 可能在高糖诱导的 hRPE 细胞 VEGF 表达中具有一定作用。

同时本实验还检测了处理组 PEDFmRNA 的表达,实验发现高糖浓度下 VEGF mRNA/PEDF mRNA 的比值较正常对照组比较明显升高,而 PD98059 处理组 VEGF mRNA/PEDF mRNA 的比值较高糖对照组明显减低,促进了已打破的血管生成和抑制因子之间平衡的恢复。这一结果对于理解和未来防治 DR 具有一定的价值,有可能通过阻断 p42/44MAPK 通路,延缓糖尿病视网膜病变的发生、发展。

参考文献

1 Ozturk BT, Bozkurt B, Kerimoglu H, et al. Effect of serum cytokines and VEGF levels on diabetic retinopathy and macular thickness. *Mol Vis* 2009;15:1906-1914

2 Wang X, Wang G, Wang Y. Intravitreal vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1 α in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2009;148(6):883-889

3 Hu J, Wu Q, Li T, et al. Inhibition of high glucose-induced VEGF release in retinal ganglion cells by RNA interference targeting G protein-coupled receptor 91. *Exp Eye Res* 2013;109:31-39

4 张春侠,胡建民,庄铭忠.高糖对人视网膜色素上皮细胞 VEGF 及 PEDF 表达的影响. *中国实用眼科杂志* 2012;30(11):1373-1376

5 Zong H, Ward M, Madden A, et al. Hyperglycaemia-induced pro-inflammatory responses by retinal Muller glia are regulated by the receptor for advanced glycation end-products (RAGE). *Diabetologia* 2010;53(12):2656-2666

6 Villeneuve LM, Reddy MA, Lanting LL, et al. Epigenetic histone H3 lysine 9 methylation in metabolic memory and inflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells in diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(26):9047-9052

7 Jiang D, Gu H, Wu Q, et al. Impact of the transfer of sFlt-1 gene fragments on the ERK1/2 pathway of VEGF *in vitro*. *Curr Eye Res* 2009;34(9):800-808

8 Poulaki V, Joussen AM, Mitsiades N, et al. Insulin-like growth factor-1 plays a pathogenetic role in diabetic retinopathy. *Am J Pathol* 2004;165(2):457-469

9 Nagineni CN, Samuel W, Nagineni S, et al. Transforming growth factor-beta induces expression of vascular endothelial growth factor in human retinal pigment epithelial cells; involvement of mitogen-activated protein kinases. *J Cell Physiol* 2003;197(3):453-462

10 Miranda S, Gonzalez-Rodriguez A, Garcia-Ramirez M, et al. Beneficial effects of fenofibrate in retinal pigment epithelium by the modulation of stress and survival signaling under diabetic conditions. *J Cell Physiol* 2012;227(6):2352-2362

11 Xie XW, Xu L, Jonas JB, et al. Prevalence of diabetic retinopathy among subjects with known diabetes in China: the Beijing Eye Study. *Eur J Ophthalmol* 2009;19(1):91-99

12 Wong J, Molyneaux L, Constantino M, et al. Timing is everything: age of onset influences long-term retinopathy risk in type 2 diabetes, independent of traditional risk factors. *Diabetes Care* 2008;31(10):1985-1990

13 McBain VA, Robertson M, Muckersie E, et al. High glucose concentration decreases insulin-like growth factor type 1-mediated mitogen-activated protein kinase activation in bovine retinal endothelial cells. *Metabolism* 2003;52(5):547-551

14 Maxwell PH, Ratcliffe PJ. Oxygen sensors and angiogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13(1):29-37

15 Treins C, Giorgetti-Peraldi S, Murdaca J, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by advanced glycation end products. *J Biol Chem* 2001;276(47):43836-43841

16 Poulaki V, Qin W, Joussen AM, et al. Acute intensive insulin therapy exacerbates diabetic blood-retinal barrier breakdown via hypoxia-inducible factor-1 α and VEGF. *J Clin Invest* 2002;109(6):805-815

17 Allen RT, Krueger KD, Dhume A, et al. Sustained Akt/PKB activation and transient attenuation of c-jun N-terminal kinase in the inhibition of apoptosis by IGF-1 in vascular smooth muscle cells. *Apoptosis* 2005;10(3):525-535