

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)04-0352-05

VEGF 特异 siRNA 对骨肉瘤细胞凋亡和仿血管发生的影响

张立智¹, 蔡宣松¹, 钱志康², 梅 炯^{1,3*}, 黄煌渊³, 黄伟达²(1. 同济大学附属同济医院 骨科, 上海 200065; 2. 复旦大学 分子生物化学教研室, 上海 200433; 3. 复旦大学 附属华山医院 骨科, 上海 200040)

[摘 要] 目的: 探讨 VEGF 特异 siRNA 在骨肉瘤细胞株(MG63)增殖、凋亡以及仿血管发生中的作用。方法: 以 pSilencer 载体构建 VEGF 特异 siRNA 质粒 pSilencer-VEGF siRNA, 并转染骨肉瘤细胞 MG63; 将细胞分为 pSilencer-VEGF siRNA 质粒组(试验组) 和空 siRNA 质粒组(对照组), Western blotting 在蛋白水平检测转染重组质粒后 MG63 细胞 VEGF 表达情况; MTT 比色法、光镜、流式细胞仪结合 Annexin V-FITC/PI 染色和 H-E 染色观察质粒转染后骨肉瘤细胞增殖、凋亡和仿血管发生情况。结果: 测序证实成功构建了针对 VEGF 的 siRNA 重组质粒。转染 pSilencer-VEGF siRNA 重组质粒后的试验组培养液中及骨肉瘤细胞内 VEGF 蛋白表达下降; 转染后 48、72、96 h 骨肉瘤细胞的增殖抑制率分别为 41.67%、43.92%、35.32%, 并发生了早期凋亡, 凋亡率为 28.27%。转染 pSilencer-VEGF siRNA 重组质粒的骨肉瘤细胞未见仿血管发生, 转染空质粒的对照组骨肉瘤细胞则有仿血管发生。结论: RNA 干扰 VEGF 基因能抑制骨肉瘤细胞增殖, 促进骨肉瘤细胞早期凋亡, 干扰骨肉瘤细胞仿血管发生, 为临床基因治疗骨肉瘤提供了新的思路。

[关键词] 血管内皮生长因子; 小干扰 RNA; 骨肉瘤细胞; 仿血管发生; 凋亡; 增殖

[中图分类号] R738 [文献标志码] A

Effects of vascular endothelial growth factor-siRNA on apoptosis and vasculogenic mimicry of osteosarcoma cells

ZHANG Li-zhi¹, CAI Xuan-song¹, QIAN Zhi-kang², MEI Jiong^{1,3*}, HUANG Huang-yuan³, HUANG Wei-da²(1. Department of Orthopaedics, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China; 2. Department of Molecular Biochemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China; 3. Department of Orthopaedics, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

[Abstract] **Objective:** To study the role of vascular endothelial growth factor (VEGF)-siRNA in the proliferation, apoptosis, and vasculogenic mimicry of osteosarcoma cell line MG63. **Methods:** pSilencer vector was used to construct pSilencer-VEGF siRNA and the latter was used to transfect MG63 cells (experimental group). MG63 cells were also transfected with blank siRNA to serve as control (control group). Western blotting was used to examine the expression of VEGF protein in MG63 cells in the 2 groups. The proliferation, apoptosis, and vasculogenic mimicry of MG63 cells were investigated using MTT assay, light microscope, and flow cytometry combined with Annexin V-FITC/PI and H-E staining. **Results:** The pSilencer-VEGF plasmid was confirmed by DNA sequencing. Sequence-specific siRNA targeting VEGF significantly decreased the expression of VEGF protein expression in MG63 cells. 48, 72 and 96 hours after pSilencer-VEGF-siRNA transfection, the inhibitory rate of MG63 cells proliferation were 41.67%, 43.92%, and 35.32%, respectively. Early apoptosis was also noticed in MG63 cells, with an apoptosis rate of 28.27%. Vasculogenic mimicry of MG63 cells was not found in experimental group, but was noticed in control group. **Conclusion:** Sequence-specific siRNA targeting VEGF can inhibit the proliferation, promote early apoptosis, and interfere with the vasculogenic mimicry of osteosarcoma cells, which casts new lights on clinical treatment of osteosarcoma.

[Key words] vascular endothelial growth factor; small interfering RNA; osteosarcoma cell; vasculogenic mimicry; apoptosis; proliferation

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(4): 352-356]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目。Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30271314; No. 30471760)

[作者简介] 张立智(1975-), 男, 汉族, 河北省唐山市人, 硕士, 主治医师, 主要从事骨肿瘤防治方面的研究

* Corresponding author. Tel: 021-6611092, E-mail: meijiong@163.com

恶性骨肉瘤的发生、发展是一个基因损伤和病变的过程。血管形成贯穿了骨肉瘤的生长、侵袭、转移的全过程^[1]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是重要的促血管生成因子之一,由于选择性剪切外显子 6 和 7 编码的序列,产生 6 种目前已知的 VEGF 的变异体,分别由 121、145、165、183、189、206 个氨基酸组成;肿瘤中 VEGF165 为可溶性分泌蛋白,表达最具特征性^[2]。决定变异体相对表达水平的机制目前仍不十分清楚,可能对调节 VEGF 的活性有关。单个骨肉瘤细胞是整个骨肉瘤肿瘤恶性转化及其特征性的血管系统形成的基础,研究已证实骨肉瘤细胞能自身合成分泌 VEGF^[3,4]。本实验构建针对 VEGF 基因 siRNA 表达质粒,转染骨肉瘤细胞 MG63,观察 VEGF 被抑制后骨肉瘤细胞增殖、凋亡和仿血管发生的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

骨肉瘤细胞 MG63 由武汉中国典型培养物保藏中心提供。DMEM 等培养液、胰酶、胎牛血清为 Gibco 公司产品。Matrigel 培养液、Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒、鼠尾 I 型胶原蛋白为美国 BD 公司产品。Effectene 转染试剂为德国 qiagen 公司产品。各种限制性内切酶、T4DNA 连接酶等基因工程用工具酶为日本 TaKaRa 公司产品。过氧化物酶标记的二抗为北京鼎国公司产品。VEGF 抗体为美国 R&D 公司产品。MTT、丙烯酰胺、TEMED、过硫酸铵为美国 Sigma 公司产品,pSilencer neo3.1 为美国 Ambion 公司产品。*E. coli* XLI-Blue 由复旦大学分子生物学教研室保存。

1.2 VEGF 特异 siRNA 的构建

根据 VEGF 基因在 Genbank 中的序列,按 siRNA 设计原则设计相应的 19 nt 靶序列 siRNA^[5],siRNA 由上海申友生物工程公司合成。VEGF 的正反义链序列为:5'-GATCCCGGCCAGCACATAGGAGAGATTCAAGAGATCTCTCCTATGTGCTGGCCTTTTTGGAAA-3';3'-GCCGGTCTGTATCCTCTCTAAGTTCTCTAGAGAGGATCACGACCGGAAAAAACC TTTTCGA-5'。根据说明书,5'端加磷,退火,T4DNA 连接酶连接,转化 *E. coli*,单个菌落进行扩增,抽提 pSilencer neo3.1 质粒 DNA,进行酶切,15% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳初步鉴定,将酶切正确的 pSilencer neo3.1 VEGF-siRNA (下称 pSilencer-VEGF siRNA)小量扩增后送公司进行测序。得到测序正确的质粒 pSilencer-VEGF siRNA 后抽提纯化,进行

下一步实验。

1.3 骨肉瘤细胞系的体外常规培养

骨肉瘤细胞 MG63 置于 37 °C、5% CO₂ 和饱和湿度的培养箱中,在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中贴壁培养。生长融合成单层时,用 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化,传代培养。将培养好的骨肉瘤细胞分别进行转染和三维培养等操作。

1.4 VEGF 特异 siRNA 质粒对骨肉瘤细胞的转染

接种 7.5×10^5 细胞于 35 mm 的培养皿,每孔加入 1 000 μ l 含血清和抗生素的生长培养液;接种 1×10^4 细胞于 96 孔板,每孔加入 100 μ l 含血清和抗生素的生长培养液,孵育至 40% ~ 80% 融合时分别转染针对 VEGF 的 siRNA 质粒(试验组)和空 siRNA 质粒(对照组)。具体转染质粒数量比例根据说明书进行操作。

1.5 Western blotting 检测转染细胞 VEGF 的表达

裂解液裂解转染骨肉瘤细胞(100 μ l/60 mm 培养皿),冰浴。超声剪切,提取细胞总蛋白。蛋白定量,样品与等体积的 $2 \times$ 上样 buffer 混匀,煮沸 5 min,用 15% SDS-PAGE 分离,分离的蛋白质转移到 PVDF 膜。(3% BSA + 2% 脱脂奶粉)/PBST 稀释一抗,与鼠抗人单克隆抗体孵育 4 °C 冰箱过夜,加入辣根过氧化物酶标记的抗鼠 IgG 第二抗体反应 2 h, ECL 显色,曝光照片用 Scion Image 软件进行扫描分析处理。

1.6 MTT 检测 VEGF 特异 siRNA 对骨肉瘤细胞增殖的抑制

收集细胞接种于 96 孔培养板中, 1×10^4 /孔,孵育至 40% ~ 80% 融合时转染。转染后,分别继续培养 48、72、96 h,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml),37 °C 孵育 4 h,小心吸弃孔内培养上清液。每孔加入 150 μ l 二甲亚砜(DMSO),振荡 10 min。在酶联免疫检测仪(490 nm 波长)上测定各孔光密度。每种细胞做 3 个平行孔。细胞增殖抑制率(%) = (对照组 *D* - 实验组 *D*)/对照组 *D* $\times 100$ %。

1.7 Annexin V-FITC/PI 双染色检测 VEGF 特异 siRNA 对骨肉瘤细胞凋亡的影响

分别取转染试验组和对照组 MG63 细胞,以 0.25% 的胰酶消化,保留培养液上清中的细胞,收获各组细胞(约 2×10^6 细胞),用冷却 PBS 洗涤细胞 2 次,按 Annexin V-FITC/PI 的试剂盒说明进行标记,以不加 Annexin V-FITC 及 PI 的一管作为阴性对照,立即上机行流式细胞术检测。

1.8 骨肉瘤细胞转染后的三维培养

按改良的 Montesano^[6]的方法制备 I 型胶原蛋

白凝胶。于 35 mm 培养皿中 22 mm 盖玻片上加入 500 μ l Matrigel 凝胶,轻轻吹散表面,37 $^{\circ}$ C 放置 1 h,制成 Matrigel 凝胶。然后,将试验组和对照组 MG63 细胞制成悬液(细胞密度为 7.5×10^5 /ml)注入凝胶上,常规标准条件下培养,并更换培养液,每天观测骨肉瘤细胞在 I 型胶原蛋白凝胶中的生长状况,培养 1 周。

1.9 三维培养转染骨肉瘤细胞切片的 H-E 染色

培养 1 周后,取出盖玻片及三维培养标本,中性甲醛固定,石蜡包埋,切片,常规脱蜡、水化,1% 的硫酸钠水溶液室温下浸泡 3 ~ 5 min,流水冲洗 5 min,蒸馏水漂洗 1 min、苏木精染液 7 ~ 15 min,常规分色,流水蓝化,于 0.5% 复制伊红液中 1 min,脱水、透明封固。显微镜下观察骨肉瘤细胞切片的类血管样结构。

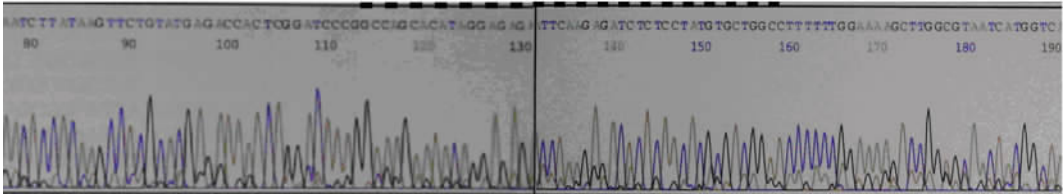


图 1 重组表达质粒 pSilencer-VEGF siRNA 的测序图
Fig.1 Sequencing of recombinant pSilencer-VEGF siRNA

2.2 转染后骨肉瘤细胞 MG63 的 VEGF 蛋白表达

Western blotting 检测显示,骨肉瘤细胞能表达 4 种 VEGF 变体,但细胞液中可溶性变体主要有一种(VEGF165),试验组培养液及细胞内 VEGF 蛋白表达下降,而正常细胞和对照组的细胞内和培养液中 VEGF 蛋白表达未见明显变化(图 2)。

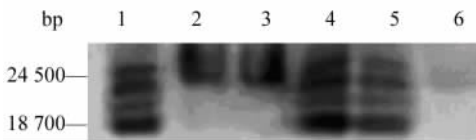


图 2 Western blotting 检测各组细胞中 VEGF 蛋白表达
Fig.2 Expression of VEGF protein detected by Western blotting in all groups

1:MG63 cells of untransfected group;2:Culture medium of untransfected group;3:Culture medium of pSilencer group;4:Cells of pSilencer group;5:Cells of pSilencer-VEGF siRNA group;6:Culture medium of pSilencer-VEGF siRNA group

2.3 VEGF 特异 siRNA 对骨肉瘤细胞增殖的抑制

MG63 细胞转染 pSilencer-VEGF siRNA 后于 48、72、96 h 的酶联免疫 D 值与转染 pSilencer 空质

1.10 统计学处理

所有的结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据的统计用方差分析,应用医用 SAS6.12 版软件进行处理。

2 结果

2.1 pSilencer-VEGF siRNA 表达载体的鉴定

电泳初步鉴定(图略)酶切正确的重组质粒由上海博亚生物技术有限公司测序分析(图 1),证实已将针对 VEGF mRNA 序列的寡核苷酸(GGCCAGCACATAGGAGAGATTCAAGAGATCTCTCC TATGTGCTGGCC)双链克隆入 pSilencer 表达载体,重组质粒构建成功。VEGF 测序图上可见成功构建的 pSilencer-VEGF siRNA 质粒的 H1-RNA 启动子,两端含有 BamH I 和 Hind III 酶切位点。

粒的酶联免疫 D 值比较有显著差异($P < 0.05$)。转染 pSilencer-VEGF siRNA 后于 48、72、96 h 后对骨肉瘤细胞的增殖抑制率分别为 41.67%、43.92%、35.32%。

2.4 VEGF 特异 siRNA 对 MG63 细胞凋亡的促进作用

转染 pSilencer 空质粒后可见瘤细胞伸展,贴壁良好,成星状、多边形等多种形状,呈紧密排列,并有重叠生长的能力;转染 pSilencer-VEGF siRNA 后 48 h,细胞呈长梭形,细胞排列稀疏,胞质增多平铺,部分细胞变圆,或脱壁,细胞生长缓慢(图 3)。

MG63 转染 pSilencer-VEGF siRNA 重组质粒后,培养 72 h 细胞早期凋亡的百分率为 28.27%;转染空质粒的 MG63 细胞没有表现出凋亡(图 4)。

2.5 转染 pSilencer-VEGF siRNA 对骨肉瘤细胞仿血管发生的影响

2.5.1 Matrigel 凝胶上转染后 GM63 细胞形成的类血管样结构 Matrigel 凝胶上 24 h 观察,转染空质粒的 MG63 细胞形成类血管样结构,转染 pSilencer-VEGF siRNA 的 MG63 细胞未能形成类血管样结构(图 5)。

2.5.2 MG63 细胞转染后在 I 型胶原蛋白培养基上形成的类血管样结构 MG63 细胞转染 pSilencer-VEGF siRNA 后在 I 型胶原蛋白培养基上培养 1 周未见形成类血管样结构; 而转染 pSilencer 空质粒培养 2 d 后局部细胞汇聚, 培养 1 周后形成类血管样结构。横断面 H-E 染色, 可见有 MG63 细胞围成的管腔结构(图 6)。

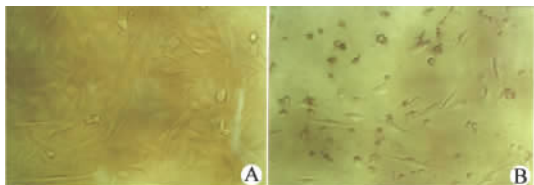


图 3 转染后骨肉瘤细胞 MG63 的形态变化(×400)

Fig. 3 The shape of osteosarcoma cells MG63 after transfection(×400)

A: MG63 cells transfected by pSilencer; B: MG63 cells transfected by pSilencer-VEGF siRNA

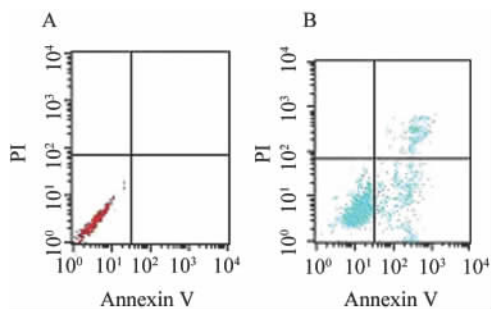


图 4 MG63 转染 pSilencer-VEGF siRNA 后凋亡的检测

Fig. 4 Effect of pSilencer-VEGF siRNA on apoptosis of osteosarcoma MG63 cells

A: Transfected by pSilencer; B: Transfected by pSilencer-VEGF siRNA

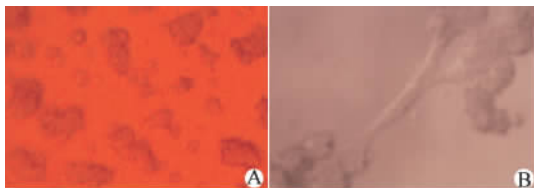


图 5 MG63 细胞转染后在 Matrigel 凝胶上形成类血管样结构(×400)

Fig. 5 Vasculogenic mimicry of MG63 cells in Matrigel culture 24 h after transfection(×400)

A: Transfected by pSilencer-VEGF siRNA; B: Transfected by pSilencer

3 讨论

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指双链

RNA 特异性地诱发与其同源序列的 mRNA 分子降解, 从而阻断体内特定基因表达的现象, 是一种特殊的转录后基因表达沉默(post transcriptional gene silencing, PTGS)现象。21-23 nt 的 siRNA 能在哺乳动物细胞中引导特异性干扰反应, 并降解相应基因 mRNA^[5]。Zhang 等^[7]认为 RNAi 不仅是研究 VEGF 各亚型功能的新型工具, 还可能在肿瘤的 VEGF 特异性抑制疗法中发挥作用。RNAi 技术应用于哺乳动物体系的关键是制备 siRNA, 通过质粒转染产生 siRNA 是一种相对性价比高的筛选 siRNAs 的好方法^[8-9]。

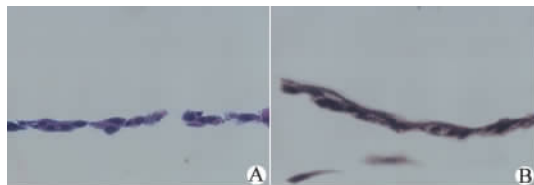


图 6 I 型胶原蛋白培养基上 MG63 细胞转染后形成的类血管样结构(H-E, ×400)

Fig. 6 Vasculogenic mimicry of MG63 cells on type I collagen culture after transfection(H-E, ×400)

A: Transfected by pSilencer-VEGF siRNA; B: Transfected by pSilencer

骨肉瘤是一种富含血管的高恶性肿瘤, 肿瘤血管形成与骨肉瘤生长、侵袭与转移密切相关。而 VEGF 作为肿瘤血管形成中重要的始动、调节因子, 促进血管形成、重塑, 还可提高血管通透性, 形成肿瘤基质, 并和金属蛋白酶等相互作用, 促使肿瘤生长和转移。本实验室在 mRNA 和蛋白水平均检测到骨肉瘤细胞能表达 VEGF 多种变体及其受体^[4,10]。VEGF 及其受体共同定位于肿瘤血管内皮细胞和肿瘤细胞, 提示了 VEGF 在肿瘤演化中的重要作用。VEGF 有 6 种变体, 结合不同的跨膜受体, 启动信号传递系统, 从而发挥其生物学功能。本实验选取 siRNA 作用的靶序列位于多种变体共有的外显子 4, 就能对 VEGF 所有的变体进行识别并降解, 从而达到彻底阻断 VEGF 的生物学作用。骨肉瘤细胞对产生和维持骨肉瘤特征性血供起重要作用。细胞培养中, VEGF 主要来自于骨肉瘤细胞的分泌。本实验显示骨肉瘤细胞能分泌 VEGF 多种变体, 但细胞培养液中可溶性 VEGF 主要是 VEGF165。本实验采用了 RNAi 技术能从源头上切断 VEGF 的来源, 对骨肉瘤细胞新生血管形成的抑制更有针对性。

早期一直认为肿瘤细胞、肿瘤浸润的巨噬细胞

和肥大细胞等能分泌高水平 VEGF,以旁分泌机制调控内皮细胞的分化和血管形成。在一些 VEGF 为靶点的抑制骨肉瘤血管的实验中,人们也一直将肿瘤细胞的凋亡归因于肿瘤血管受到抑制。VEGF 参与的信号转导参与了骨肉瘤细胞的体外增殖,抑制骨肉瘤肿瘤细胞的凋亡。这可能是 VEGF 及其受体的连接活化了 PI3K 存活途径,导致了丝/苏氨酸激酶蛋白激酶的活化及磷酸化;同时 VEGF 能诱导肿瘤细胞中抗凋亡效应分子的表达,这包括 bcl-2, A1, HIF-1 和凋亡抑制剂家族的两个成员, XIAP 和 survivin^[11]。VEGF 起着内皮细胞特异性存活因子的作用,与抗肿瘤血管治疗和化疗的耐药性的产生密切相关。VEGF 可能也参与肿瘤相关的免疫缺陷及肿瘤细胞的免疫逃避^[12]。

肿瘤组织血液供应丰富,肿瘤细胞直接构成管壁,无内皮细胞衬附,肿瘤细胞释放蛋白水解酶降解管道内的基膜,就和血循环直接接触,国外学者称之为“vasculogenic mimicry”,本文中称之为“仿血管发生”;也就是说仿血管发生可能更有利于肿瘤的生长、侵袭和转移;如能阻断仿血管发生,可能更有效地治疗肿瘤^[13-16]。本研究中证实沉默 VEGF 在骨肉瘤细胞中的表达,阻断了骨肉瘤细胞仿血管发生的途径,这可能与阻断了受体酪氨酸激酶的信号传导途径,及与金属蛋白酶的相互作用有关。Oda 等^[17]研究证实 VEGF 在骨肉瘤肺转移过程中有一定的预见价值。

骨肉瘤细胞自身在肿瘤的血供以致整体发展中有核心作用,VEGF 可能在骨肉瘤肿瘤的发生发展中有着重作用,不仅能作用于内皮细胞、内皮前体细胞,而且能作用于骨肉瘤细胞自身,形成类血管管道,并参与了骨肉瘤细胞的增殖、凋亡过程。因此,骨肉瘤细胞分泌的 VEGF 可能是原始瘤和转移瘤早期重要的始动因子。但在靶向 VEGF 基因治疗中,肿瘤仍可能会突变表达其他的血管生成因子而逃避抑制;而且肿瘤外的其他细胞也能产生 VEGF 进入血循环,这些都有待进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] DuBois S, Demetri G. Markers of angiogenesis and clinical features in patients with sarcoma[J]. *Cancer*, 2007, 109(5): 813-819.

[2] Tesone M, Stouffer RL, Borman SM, *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) production by the monkey corpus luteum during the menstrual cycle: isoform-selective messenger RNA expression *in vivo* and hypoxia-regulated protein secretion *in vitro* [J]. *Biol Reprod*, 2005, 73(5): 927-934.

[3] Charity RM, Foukas AF, Deshmukh NS, *et al.* Vascular endothelial growth factor expression in osteosarcoma[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2006, 448: 193-198.

[4] 张立智,梅炯,蔡宣松. 骨肉瘤细胞血管自成分相关基因表达 [J]. *同济大学学报: 医学版*, 2006, 27(3): 6-9.

[5] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. *Nature*, 2001, 411(6836): 494-498.

[6] Montesano R, Orci L, Vassalli *et al.* *In vitro* rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices[J]. *Cell Biol*, 1983, 48(2): 133-141.

[7] Zhang L, Yang N, Mohamed-Hadley A, *et al.* Vector-based RNAi, a novel tool for isoform-specific knock-down of VEGF and anti-angiogenesis gene therapy of cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 303(4): 1169-1178.

[8] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. *Science*, 2002, 296(5567): 550-553.

[9] Tiscornia G, Singer O, Ikawa M, *et al.* A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vector-expressing small interfering RNA[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(4): 1844-1848.

[10] 张立智,蔡宣松,钱志康,等. RNAi 抑制骨肉瘤细胞 KDR 蛋白表达的研究[J]. *同济大学学报医学版*, 2006, 27(1): 13-16.

[11] Carroll VA, Ashcroft M. Role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha versus HIF-2alpha in the regulation of HIF target genes in response to hypoxia, insulin-like growth factor-I, or loss of von Hippel-Lindau function: implications for targeting the HIF pathway [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(12): 6264-6270.

[12] Ohm JE, Gabrilovich DI, Sempowski GD, *et al.* VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression[J]. *Blood*, 2003, 101(12): 4878-4886.

[13] Dome B, Hendrix MJ, Paku S, *et al.* Alternative vascularization mechanisms in cancer: pathology and therapeutic implications[J]. *Am J Pathol*, 2007, 170(1): 1-15.

[14] Folberg R, Arbieva Z, Moses J, *et al.* Tumor cell plasticity in uveal melanoma: microenvironment directed dampening of the invasive and metastatic genotype and phenotype accompanies the generation of vasculogenic mimicry patterns[J]. *Am J Pathol*, 2006, 169(4): 1376-1389.

[15] Chung LW, Huang WC, Sung SY, *et al.* Stromal-epithelial interaction in prostate cancer progression[J]. *Clin Genitourin Cancer*, 2006, 5(2): 162-170.

[16] Vartanian AA, Burova OS, Stepanova EV, *et al.* The involvement of apoptosis in melanoma vasculogenic mimicry[J]. *Melanoma Res*, 2007, 17(1): 1-8.

[17] Oda Y, Yamamoto H, Tamiya S, *et al.* CXCR4 and VEGF expression in the primary site and the metastatic site of human osteosarcoma: analysis within a group of patients, all of whom developed lung metastasis[J]. *Mod Pathol*, 2006, 19(5): 738-745.

[收稿日期] 2007-03-13

[修回日期] 2007-06-04

[本文编辑] 韩丹