

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.06.005

· 基础研究 ·

胶质瘤 U87 细胞培养上清诱导 CD133⁺ 内皮细胞血管生成及其可能的机制

王颖毅, 骆 慧, 张军霞, 刘 宁, 尤永平, 傅 震(南京医科大学第一附属医院 神经外科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨胶质瘤 U87 细胞培养上清诱导 CD133⁺ 内皮细胞血管生成及其可能的机制。方法:磁珠法分选脐血 CD133⁺ 细胞,体外诱导为 CD133⁺ 内皮细胞并以共聚焦显微镜加以鉴定。U87 细胞培养上清作用于 CD133⁺ 内皮细胞(以 DMEM 作用为对照),体外血管生成实验检测其体外血管生成,Transwell 法检测其迁移能力,Western blotting 检测 CD133⁺ 内皮细胞中 VEGFR-1、VEGFR-2 与基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase, MMP-9)的表达,明胶酶谱检测 MMP-9 的活性。结果:脐血 CD133⁺ 细胞体外诱导培养 14 d 后,约 90% 的细胞呈 Dil-ac-LDL 和 FITC-UEA-1 双阳性,具有内皮细胞特性,鉴定为 CD133⁺ 内皮细胞。与 DMEM 对照组相比,U87 细胞培养上清可诱导 CD133⁺ 内皮细胞血管生成[(40.7 ± 3.3) vs (21.0 ± 2.3) , $P < 0.05$],促进 CD133⁺ 内皮细胞迁移[(0.60 ± 0.04) vs (0.27 ± 0.02) , $P < 0.05$]。U87 细胞培养上清上调 CD133⁺ 内皮细胞中 VEGFR-2 与 MMP-9 的表达($P < 0.05$),而 VEGFR-1 的表达基本不变;U87 细胞培养上清还可增强 CD133⁺ 内皮细胞中 MMP-9 的酶活性。结论:胶质瘤 U87 细胞培养上清通过上调 CD133⁺ 内皮细胞中 VEGFR-2 与 MMP-9 的表达促进内皮细胞血管生成。

[关键词] 胶质瘤;内皮祖细胞;血管新生;CD133;VEGFR;MMP-9

[中图分类号] R739.41; R730.2 [文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2010)06-0615-05

U87 glioma cell supernatant induces angiogenesis of CD133⁺ endothelial cells and possible mechanism

WANG Ying-yi, LUO Hui, ZHANG Jun-xia, LIU Ning, YOU Yong-ping, FU Zhen (Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the angiogenesis of CD133⁺ endothelial cells induced by glioma U87 cell supernatant and the possible mechanisms. **Methods:** CD133⁺ cells were sorted from the cord blood by magnetic activated cell sorting system, and were further induced to CD133⁺ endothelial cells. CD133⁺ endothelial cells were identified by confocal microscopy and treated with U87 cell supernatant (DMEM used as control), and their angiogenesis and migration were examined by *in vitro* angiogenesis assay and Transwell assay, respectively. VEGFR-1, VEGFR-2 and MMP-9 (matrix metalloproteinase 9) expressions were determined by Western blotting analysis, and MMP-9 activity was examined by gelatin zymography assay. **Results:** After *in vitro* cultured for 14 d, the cord blood CD133⁺ cells showed positive expression of Dil-ac-LDL and FITC-UEA-1 and had the features of endothelial cells, so they were named CD133⁺ endothelial cells. The supernatant of U87 glioma cells induced tube formation of CD133⁺ endothelial cells and increased migration of CD133⁺ endothelial cells. U87 cell supernatant induced angiogenesis [40.7 ± 3.3] vs [21 ± 2.3], $P < 0.05$, increased migration [0.60 ± 0.04] vs [0.27 ± 0.02], $P < 0.05$, up-regulated VEGFR-2 and MMP-9 expressions ($P < 0.05$) in CD133⁺ endothelial cells, while had minimal effect on VEGFR-1 expression. Moreover, U87 cell supernatant enhanced MMP-9 activity of CD133⁺ endothelial cells. **Conclusion:** Glioma U87 cell supernatant can induce angiogenesis of CD133⁺ endothelial cell *via* up-regulating VEGFR-2 and MMP-9 expressions.

[Key words] glioma; endothelial progenitor cell; angiogenesis; CD133; VEGFR; MMP-9

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(6): 615-619]

[基金项目] 江苏省医学重点人才基金资助项目(No. RC2007061)。Project supported by the Medical Major Talent Program of Jiangsu Province (No. RC2007061)

[作者简介] 王颖毅(1984-),女,江苏省徐州市人,住院医师,主要从事胶质瘤基因治疗研究。E-mail: secredidibes@yahoo.com.cn

[通信作者] 尤永平(YOU Yong-ping, corresponding author), E-mail: YYPL9@njmu.edu.cn

[网络出版] 2010-12-01; http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20101201.1552.007.html

新生血管生成在肿瘤的生长、浸润和转移过程中均发挥重要作用,是肿瘤发生、发展的关键因素之一。内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)参与胶质瘤血管生成,受到研究人员的广泛关注。深入了解胶质瘤中诱导 EPC 参与血管生成的机制,有助于阐明胶质瘤血管生成机制,进而探索通过阻断肿瘤血管生成来治疗胶质瘤的新策略。VEGFR 通路可调控血管内皮细胞的增殖,促进血管生成;基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)可有效降解血管基底膜及细胞外基质,与肿瘤细胞浸润中突破基底膜屏障能力的增强有关。上述两者均被认为可能在诱导 EPC 参与肿瘤血管生成过程中起重要作用^[1-2]。CD133 是 EPC 表面的重要标记分子。本课题分离脐带血 CD133⁺ 细胞,通过胶质瘤细胞系 U87 细胞培养上清作用于 CD133⁺ 内皮细胞,观察 CD133⁺ 内皮细胞的血管生成,初步探讨胶质瘤细胞诱导 EPC 参与血管生成的机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株和试剂

U87 胶质瘤细胞系由上海华山医院神经外科朱剑虹教授惠赠。EGM-2 MV 培养液(含 FBS、hEGF、VEGF、hFGF- β 、R3-IGF-1)购自 Cambrex 公司,人淋巴细胞分离液购自天津灏洋公司,纤维连接蛋白购自 Chemicon 公司,明胶购自 Sigma 公司,Transwell 购自 Costar 公司,Matrigel 购自 BD Pharmingen 公司,RIPA 裂解液、化学发光底物购自 Pierce 公司,VEGFR-1、VEGFR-2、MMP-9 抗体购自 Santa Cruz 公司。CD133 免疫磁珠分离试剂盒、MACS 磁性分选系统购自 Miltenyi Biotec 公司。

1.2 磁珠法分选脐血 CD133⁺ 细胞

内皮祖细胞分离与培养方法已由本室建立^[3]。采集新鲜脐血(2 h 以内),与 3% 明胶 1:1 混匀静置 30 min,取其上层悬液。经人淋巴细胞分离液(1.077 g/ml)密度梯度离心,收集白膜层获得脐血单个核细胞。单个核细胞悬液($1 \times 10^8/300 \mu\text{l}$)中加入 FcR 阻断反应剂 $100 \mu\text{l}$ 和 CD133 免疫磁珠 $100 \mu\text{l}$ 混匀,4 °C 孵育 30 min。通过 MACS 磁性分离柱,获取 CD133⁺ 细胞。将获得的 CD133⁺ 细胞悬浮于 EGM-2 MV 培养液,调整细胞密度为 $5 \times 10^5/\text{ml}$,种植于纤维连接蛋白包埋的培养瓶。细胞置于 5% CO₂、95% 湿度、37 °C 恒温培养箱中培养。3 d 后首次换液,弃去含有非贴壁细胞的上清液,更换新鲜培养液。之后每 2 d 更换 1 次培养液。细胞融合约 80% 时进行传代。

1.3 共聚焦显微镜鉴定培养后的 CD133⁺ 细胞

CD133⁺ 细胞培养至 14 d 后,进行 DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白(diI-labeled acetylated low density lipoprotein, DiI-ac-LDL)和 FITC 标记的荆豆凝集素 1(FITC-labeled ulex europaeus agglutinin 1, FITC-UEA-1)双荧光染色鉴定。细胞在含 DiI-ac-LDL($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)的培养液中避光孵育 4 min,然后以 4% 的中性甲醛固定 10 min, PBS 液漂洗后加 FITC-UEA-1($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)避光孵育 1 min。PBS 液漂洗后在共聚焦显微镜下观察。

1.4 U87 细胞培养上清的制备

收集生长状态良好的 U87 细胞,调整细胞数为 $1 \times 10^6/\text{ml}$,加 10 ml 于 75 cm^2 细胞培养瓶中。至细胞贴壁生长状况良好时,使用无血清 DMEM 继续培养,48 h 后收集细胞培养上清液, $400 \times g$ 离心 10 min,取上清备用。

1.5 体外血管生成实验检测 CD133⁺ 细胞的血管生成

应用预铺 Matrigel 的 96 孔板行体外血管生成实验。 5×10^3 个 CD133⁺ 细胞接种于预铺 Matrigel 的 96 孔,U87 细胞培养上清或 DMEM 作用 20 h,显微镜观察血管生成。随机选取 3 个视野($\times 200$)计算血管数目。实验重复 3 次。

1.6 Transwell 法检测细胞的迁移

应用 24 孔规格的预铺 Matrigel 的 Transwell(孔径 $8 \mu\text{m}$)行体外迁移实验。上室为 $200 \mu\text{l}$ CD133⁺ 细胞($1 \times 10^6/\text{ml}$),下室分别为 $400 \mu\text{l}$ U87 细胞培养上清或等量 DMEM。37 °C 下培养 20 h,弃去培养基,用棉签轻轻擦去 Matrigel 和上室内未迁移细胞,用 90% 酒精常温固定膜 30 min,0.1% 结晶紫常温染色 10 min,FBS 清洗 3 遍,显微镜下观察细胞并拍照($\times 200$),33% 冰醋酸脱色,酶标仪检测光密度值(D_{560})。实验重复 3 次。

1.7 Western blotting 检测 VEGFR-1、VEGFR-2 和 MMP-9 蛋白的表达

将 U87 细胞培养上清或 DMEM 作用 1×10^6 个 CD133⁺ 细胞 3 h,用 RIPA 裂解液裂解收获蛋白,并定量, $50 \mu\text{g}$ ($20 \mu\text{l}$)蛋白上样于 8% 的 SDS-PAGE,分离蛋白,电转移至 PVDF 膜后 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,一抗(VEGFR-1 为 1:500 稀释,VEGFR-2 为 1:1 000 稀释,MMP-9 为 1:1 000 稀释)孵育 2 h,洗涤后辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h。以 GAPDH 作为对照。洗涤后将化学发光底物加于 PVDF 膜上,X 线胶片适度曝光。Bio-Rad 成像系统采集图像,Quantity One 软件分析各蛋白的表达量。

1.8 明胶酶谱检测细胞中 MMP-9 的活性

1×10^6 个 CD133⁺ 细胞经 U87 细胞培养上清或 DMEM 作用 3 h, 用裂解液(含 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1% NP-40)裂解收获细胞蛋白, 样品上样于 8% 的 SDS-PAGE(含 0.1% 明胶)。电泳结束后, 以蒸馏水漂洗凝胶后移入洗液(含 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 2.5% Triton X-100), 摇床摇动 30 min 以洗脱 SDS 凝胶。洗脱后凝胶移入反应液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 5 mmol/L CaCl₂, 150 mmol/L NaCl, 0.02% NaN₃)中, 37 °C 温育 48 h, 0.05% 考马斯亮蓝染色, 脱色液脱色至蓝色背景出现明显透亮负染带。Bio-Rad 成像系统采集图像, Quantity One 软件分析 MMP-9 活性。

1.9 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 经 Stata7.0 软件分析, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脐血 CD133⁺ 细胞的鉴定结果

刚分离的 CD133⁺ 细胞呈圆形, 均匀地悬浮分布。3 d 后弃去非贴壁细胞, 可见少量梭形细胞出现; 7 d 左右出现小集落; 14 d 左右小集落逐渐生成典型集落; 21 d 左右集落进一步扩大并相互融合, 梭形细胞逐渐缩短, 呈现出典型铺路石样改变。对 14 d 左右的细胞进行双荧光染色结果表明, 培养贴壁细胞中约 90% 的细胞呈 Dil-ac-LDL 和 FITC-UEA-1 双阳性, 显示出能内吞 ac-LDL 和结合 UEA-1 的内皮细胞特性, 鉴定为 CD133⁺ 内皮细胞(图 1)。

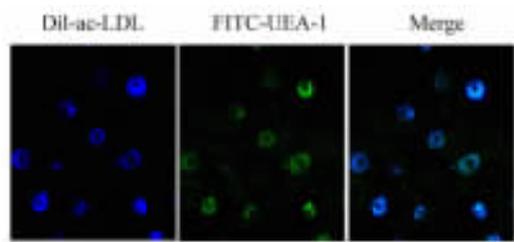


图 1 荧光染色检测 CD133⁺ 内皮细胞中 Dil-ac-LDL 和 FITC-UEA-1 的表达(×400)

Fig. 1 Expressions of Dil-Ac-LDL and FITC-UEA-1 in CD133⁺ endothelial cells as detected by immunofluorescence staining (×400)

2.2 U87 细胞培养上清促进 CD133⁺ 内皮细胞的血管生成

如图 2 所示, CD133⁺ 内皮细胞在 U87 细胞培养上清或 DMEM 作用下生成的血管数目(3 个随机视野血管数之和)分别为(40.7 ± 3.3)个和(21.0 ± 2.3)个($P < 0.05$), 提示胶质瘤 U87 细胞培养上清可明显促进 CD133⁺ 内皮细胞的血管生成。

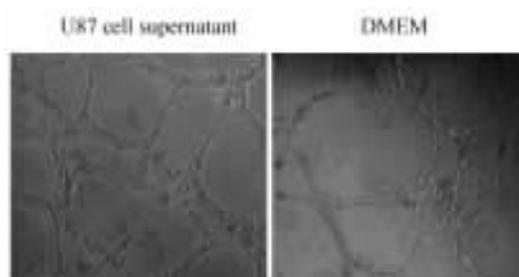


图 2 U87 细胞培养上清促进 CD133⁺ 内皮细胞的血管生成(×200)

Fig. 2 U87 cell supernatant increased angiogenesis of CD133⁺ endothelial cells (×200)

2.3 U87 细胞培养上清促进 CD133⁺ 内皮细胞的迁移

如图 3 所示, U87 细胞培养上清组穿越的 CD133⁺ 内皮细胞明显多于 DMEM 组[0.60 ± 0.04 vs 0.27 ± 0.02, $P < 0.05$]。由此可见, 胶质瘤 U87 细胞培养上清可明显促进 CD133⁺ 内皮细胞的迁移。

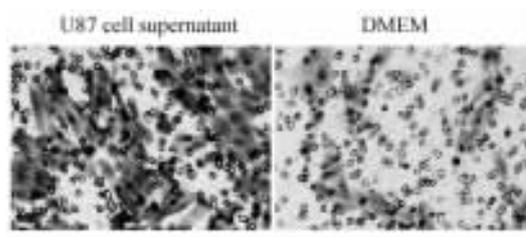


图 3 U87 细胞培养上清促进 CD133⁺ 内皮细胞迁移(×200)

Fig. 3 U87 cell supernatant increased migration of CD133⁺ endothelial cells (×200)

2.4 U87 细胞培养上清促进 CD133⁺ 内皮细胞中 VEGFR-2 和 MMP-9 蛋白的表达

如图 4 所示, CD133⁺ 内皮细胞经 U87 细胞培养上清处理后, 其 VEGFR-2 和 MMP-9 蛋白的表达分别为 DMEM 组的 2.6 和 2.5 倍, 而两组 CD133⁺ 内皮细胞中 VEGFR-1 蛋白表达基本保持不变, 提示 U87 细胞培养上清可促进 CD133⁺ 内皮细胞中 VEGFR-2 和 MMP-9 蛋白的表达。

2.5 U87 细胞培养上清上调 MMP-9 蛋白的酶活性

如图 5 所示,明胶酶谱检测显示,CD133⁺ 内皮细胞经 U87 细胞培养上清处理后,MMP-9 的酶活性明显上升。

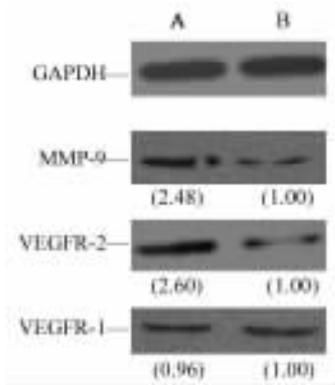


图 4 U87 细胞培养上清上调 CD133⁺ 内皮细胞中 VEGFR-2 和 MMP-9 蛋白的表达

Fig. 4 U87 cell supernatant increased VEGFR-2 and MMP-9 protein expressions in CD133⁺ endothelial cells

A: U87 cell supernatant treatment; B: DMEM treatment



图 5 U87 细胞培养上清增强 CD133⁺ 内皮细胞中 MMP-9 酶的活性

Fig. 5 U87 cell supernatant enhanced MMP-9 enzyme activity in CD133⁺ endothelial cells

A: U87 cell supernatant treatment; B: DMEM treatment

3 讨论

EPC 作为内皮细胞的前体细胞,不仅参与胚胎时期的血管生成,而且参与出生后的生理性血管生成和病理性血管生成^[4-5]。胶质瘤是人体血管化程度极高的肿瘤,血管生成在胶质瘤生长和侵袭过程中起重要作用,并与其恶性进展相关^[6]。本课题组、Anderson 研究小组以及 Ferrari 研究小组分别采用免疫组化技术、MRI 示踪技术与流式细胞仪检测到 EPC 参与胶质瘤血管生成^[7-9]。EPC 参与血管生成是一个受各种酶、生长因子和表面受体多因素调节的复杂过程,其具体机制尚不清楚^[4-5]。

体外血管生成与迁移的检测是目前血管生成研究的主要手段。本实验首先分离脐血中 CD133⁺ 细胞,经诱导培养后,荧光检测发现,培养后 CD133⁺

细胞表达 Dil-ac-LDL、FITC-UEA-1,显示出能内吞 ac-LDL、结合 UEA-1 的内皮细胞特性,鉴定为 CD133⁺ 内皮细胞。以 CD133⁺ 内皮细胞为模型研究胶质瘤 U87 细胞诱导 EPC 血管生成的作用。实验结果显示,胶质瘤 U87 细胞培养上清可明显促进 CD133⁺ 内皮细胞体外血管生成与迁移。由此提示胶质瘤细胞本身分泌的某些因子可诱导 EPC 参与血管生成。

胶质瘤细胞可以分泌多种细胞因子如 EGF、VEGF、FGF 等,其中 VEGF 作为血管生成的重要调控因子,促进血管内皮细胞迁移和血管生成。为了深入阐述胶质瘤细胞诱导 EPC 血管生成的作用机制,本实验研究了 VEGF 下游的信号通路分子 VEGFR-1、VEGFR-2 和 MMP-9 有无变化。目前认为,VEGF 可选择性直接作用于血管内皮细胞膜上的两种 II 型酪氨酸激酶受体(VEGFR-1、VEGFR-2)发挥作用。VEGFR-1 与 VEGFR-2 在血管生成中具有不同的功能^[10-12]。VEGFR-2 的酪氨酸激酶活性很强,与血管生成密切相关,是血管内皮细胞增殖、迁移和分化的信号转导的关键受体。VEGFR-1 酪氨酸激酶活性较弱,是双重血管生成调控因子,在胚胎期起负性调控作用,在成年期对 VEGFR-2 所引起的生物学效应起调节作用。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)是一类能降解细胞外基质的高度保守蛋白水解酶。MMP-9 的释放和激活为血管生成过程中细胞外基质重建所必需^[13]。动物实验^[14]发现,MMP-9 基因缺陷小鼠 EPC 参与血管生成能力与对照组相比显著降低。MMP-9 还可通过调节内皮细胞的增殖、黏附、迁移等过程来促进血管生成^[15]。本实验结果显示,U87 细胞培养上清作用于 CD133⁺ 内皮细胞后,CD133⁺ 内皮细胞中 VEGFR-1 蛋白表达基本保持不变,而 VEGFR-2 蛋白和 MMP-9 蛋白表达明显上调。同时,MMP-9 的酶活性也显著上升,并与 MMP-9 蛋白表达上调有密切关系。这提示在诱导 EPC 血管生成的过程中,胶质瘤细胞更有可能通过 VEGFR-2 与 MMP-9 而非 VEGFR-1 发挥作用。在血管生成中,VEGFR-2 与 MMP-9 两者之间是直接还是间接的关系有待探讨。目前研究已经证明,Akt 与 ERK 这两条信号转导通路分别参与了 VEGFR-2 与 MMP-9 的表达调控^[16-18],提示 VEGFR-2 和 MMP-9 可能通过 Akt 与 ERK 两条或其中一条信号转导通路调控它们表达,其具体机制需进一步研究。

本研究证实,胶质瘤细胞通过调控 VEGFR-2 与 MMP-9 表达参与诱导 CD133⁺ 内皮细胞血管生成。

本研究为阐明胶质瘤血管生成机制打下了基础,也为以 EPC 为靶向血管生成细胞载体的胶质瘤治疗策略提供了实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] Li B, Sharpe EE, Maupin AB, Teleron AA, Pyle AL, Carmeliet P, et al. VEGF and PIGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization [J]. *FASEB J*, 2006, 20(9): 1495-1497.
- [2] Su Y, Zheng L, Wang Q, Li W, Cai Z, Xiong S, et al. Quantity and clinical relevance of circulating endothelial progenitor cells in human ovarian cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29: 27.
- [3] 张军霞,李 瑞,赵 鹏,石 磊,程子昊,尤永平,等. CD133 免疫磁珠分选脐血内皮祖细胞的培养及鉴定 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15(2): 159-162.
- [4] Krenning G, van Luyn MJ, Harmsen MC. Endothelial progenitor cell-based neovascularization: Implications for therapy [J]. *Trends Mol Med*, 2009, 15(4): 180-189.
- [5] Tilki D, Hohn HP, Ergün B, Rafii S, Ergün S. Emerging biology of vascular wall progenitor cells in health and disease [J]. *Trends Mol Med*, 2009, 15(11): 501-509.
- [6] Chi AS, Sorensen AG, Jain RK, Batchelor TT. Angiogenesis as a therapeutic target in malignant gliomas [J]. *Oncologist*, 2009, 14(6): 621-636.
- [7] Zhang JX, Kang CS, Shi L, Zhao P, Liu N, You YP. Use of thymidine kinase gene-modified endothelial progenitor cells as a vector targeting angiogenesis in glioma gene therapy [J]. *Oncology*, 2010, 78(2): 94-102.
- [8] Anderson SA, Glod J, Arbab AS, Noel M, Ashari P, Fine HA, et al. Noninvasive MR imaging of magnetically labeled stem cells to directly identify neovasculature in a glioma model [J]. *Blood*, 2005, 105(1): 420-425.
- [9] Ferrari N, Glod J, Lee J, Kobiler D, Fine HA. Bone marrow-derived endothelial progenitor-like cells as angiogenesis-selective gene targeting vectors [J]. *Gene Ther*, 2003, 10(8): 647-656.
- [10] Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2006, 39(5): 469-478.
- [11] Ivy SP, Wick JY, Kaufman BM. An overview of small-molecule inhibitors of VEGFR signaling [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2009, 6(10): 569-579.
- [12] Stüttfeld E, Ballmer-Hofer K. Structure and function of VEGF receptors [J]. *IUBMB Life*, 2009, 61(9): 915-922.
- [13] Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment [J]. *Cell*, 2010, 141(1): 52-67.
- [14] Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice [J]. *Nature*, 1995, 376(6535): 62-66.
- [15] Ezhilarasan R, Jadhav U, Mohanam I, Rao JS, Gujrati M, Mohanam S. The hemopexin domain of MMP-9 inhibits angiogenesis and retards the growth of intracranial glioblastoma xenograft in nude mice [J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(2): 306-315.
- [16] Byun HJ, Hong IK, Kim E, Jin YJ, Jeoung DI, Hahn JH, et al. A splice variant of CD99 increases motility and MMP-9 expression of human breast cancer cells through the AKT-, ERK-, and JNK-dependent AP-1 activation signaling pathways [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(46): 34833-34847.
- [17] Xiao D, Li M, Herman-Antosiewicz A, Xiao H, Lew KL, Zeng Y, et al. Diallyl trisulfide inhibits angiogenic features of human umbilical vein endothelial cells by causing Akt inactivation and down-regulation of VEGF and VEGFR-2 [J]. *Nutr Cancer*, 2006, 55(1): 94-107.
- [18] Zimman A, Mouillesseaux KP, Le T, Gharavi NM, Ryvkin A, Graeber TG, et al. Vascular endothelial growth factor receptor 2 plays a role in the activation of aortic endothelial cells by oxidized phospholipids [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(2): 332-338.

[收稿日期] 2010 - 08 - 11

[修回日期] 2010 - 09 - 05

[本文编辑] 王 莹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中统计学符号规范化书写的要求

本刊严格遵守国家标准 GB 3358 - 93《统计学术语》的有关规定。为此,请作者书写统计学符号时注意以下要求:(1)样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} ,不用大写 X ,也不用 Mean 或 M ;(2)标准差用英文小写 s ,不用 SD;(3)标准误用英文小写 s_x ,不用 SE;(4) t 检验用英文小写 t ;(5) F 检验用英文大写 F ;(6)卡方检验用希腊文小写 χ^2 ;(7)相关系数用英文小写 r ;(8)自由度用希腊文小写 ν ;(9)样本数用英文小写 n ;(10)概率用英文大写 P ;(11)以上符号 \bar{x} 、 s 、 s_x 、 t 、 F 、 χ^2 、 r 、 ν 、 n 、 P 均为斜体。请作者注意遵照执行。

(本刊编辑部)