

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.02.008

siRNA CD31 沉默 *PECAM-1* 对鼠源血管内皮瘤细胞 VEGF 表达的影响

欧阳金生, 陈成水, 李玉苹, 蔡畅, 叶民, 林全, 陈俊杰(温州医科大学附属第一医院 呼吸内科, 浙江 温州 325000)

[摘要] **目的:** 研究 siRNA CD31 靶向沉默血管内皮细胞中血小板内皮细胞黏附分子 1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1, *PECAM-1*) 基因对鼠源性血管内皮瘤 (murine hemangioendothelioma, EOMA) 细胞增殖及其 VEGF 表达的影响。**方法:** 实验分为裸 siRNA CD31 组、siRNA CD31-FAM 组、稳定阴性对照 (SNC) 组、空白对照 (Opti-Med) 组, 以阳离子脂质体 (RNAi-mate) 为载体将化学合成的 2'-O-甲基修饰的 siRNA CD31 转染体外培养的 EOMA 细胞, 以激光共聚焦显微镜观察 siRNA CD31 的转染效果, 以四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法检测 siRNA CD31 对 EOMA 细胞增殖的影响, 以 RT-PCR、Western blotting 分别检测 EOMA 细胞中 *PECAM-1*、*VEGF* 的表达水平。**结果:** 与 SNC 组和空白对照组比较, 裸 siRNA CD31 和 siRNA CD31-FAM 转染的 EOMA 细胞中的 *PECAM-1* mRNA 和蛋白、*VEGF* mRNA 和蛋白的表达量均显著降低 (均 $P < 0.01$)。与 SNC 组比较, 裸 siRNA CD31 组、siRNA CD31-FAM 组的 EOMA 细胞增殖抑制率明显上升 [(18.82 ± 1.46)%、(18.91 ± 2.21)% vs (0.61 ± 1.06)%], 均 $P < 0.01$ 。**结论:** 采用 siRNA CD31-脂质体复合物沉默 EOMA 细胞中的 *PECAM-1* 基因可抑制 *VEGF* mRNA 和蛋白的表达, 从而抑制 EOMA 细胞的增殖。

[关键词] 小分子干扰 RNA; 血小板内皮细胞黏附分子; 血管内皮细胞生长因子; 血管内皮瘤; 细胞增殖

[中图分类号] R732.2; R730.59

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)02-0160-05

Effects of siRNA CD31-mediated *PECAM-1* gene silencing on proliferation and VEGF expression in vascular endothelial cells

Ouyang Jinsheng, Chen Chengshui, Li Yuping, Cai Chang, Ye Min, Lin Quan, Chen Junjie (Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 32500, Zhejiang, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of siRNA CD31-targeted silencing of the platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (*PECAM-1*) or *CD31* gene on VEGF expression and proliferation in endothelial cells. **Methods:** Murine hemangioendothelioma cells (EOMAs) were used as a model. They were transfected with naked siRNA CD31, siRNA CD31-FAM, a stable negative control (SNC) siRNA and Opti-Med as a blank control, respectively, using lipofectamin (RNAi-mate). After transfection, cell proliferation was assessed by MTT assays. *PECAM-1* and *VEGF* mRNA and protein levels were determined by RT-PCR and Western blotting respectively. **Results:** *PECAM-1* mRNA and protein levels and proliferative activity were all significantly lower in EOMAs transfected with naked siRNA CD31 and siRNA CD31-FAM than in EOMAs transfected with the SNC and Opti-MEM ($P < 0.01$). As compared with the SNC, naked siRNA CD31 and siRNA CD31-FAM rested significantly higher rates of proliferation inhibition ($P < 0.01$). **Conclusion:** The chemically synthesized 2'-O-methyl-siRNA CD31 may effectively silence the target gene *PECAM-1* and inhibit proliferation in EOMAs, at least partially through a VEGF signaling-dependent mechanism.

[Key words] small interference RNA (siRNA); platelet endothelial cell adhesion molecule (*PECAM*); vascular endothelial cell growth factor (*VEGF*); hemangioendothelioma; cell proliferation

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(2): 160-164]

[基金项目] 浙江省温州市科技计划资助项目 (No. Y20100182)。Project supported by the Science and Technology Project of Wenzhou City (No. Y20100182)

[作者简介] 欧阳金生 (1971-), 男, 福建省尤溪县人, 硕士, 副主任医师, 主要从事胸部肿瘤研究。E-mail: ouyangjsh@gmail.com

[通信作者] 欧阳金生 (Ouyang Jinsheng, corresponding author), E-mail: ouyangjsh@gmail.com

[网络出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20140331.1727.007.html

小分子干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 正逐渐取代反义核苷酸技术,成为肿瘤基因疗法的理想工具。研究^[1-3]表明,阳离子脂质体可有效地实现 siRNA 的靶向输送,2'-O-甲基修饰的 siRNA 可提高 siRNA 的稳定性。

肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)与癌细胞的增殖和浸润密切相关,靶向 TME 的治疗药物已成为目前恶性肿瘤最有效的生物治疗手段之一^[4-5]。血管内皮细胞是 TME 的主要组分,前者受多种生物活性介质的调控^[6-9]。血小板内皮细胞黏附分子 1 (platelet endothelial cell adhesion molecular 1, PECAM-1, 即 CD31) 是血管内皮细胞特异性标志物^[10-11],其与内皮细胞的运动、血管的生成密切相关。此外,已有研究^[12-14]报道,PECAM-1 是恶性肿瘤 TME 的潜在治疗靶点。具有信号功能的 PECAM-1 可通过激活下游的信号分子调节细胞因子的合成和释放^[15-17]。受多种信号途径调控的血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)具有调节血管内皮细胞生物活性的作用^[6-9],但 PECAM-1 与 VEGF 之间的关系尚不明确。本研究采用 siRNA CD31-阳离子脂质体复合物沉默鼠源性血管内皮瘤(murine hemangioendothelioma, EOMA)细胞的靶基因 *PECAM-1*,探讨下调 *PECAM-1* 对 EOMA 细胞增殖及 *VEGF* 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

EOMA 细胞株购自 ATCC 公司。2'-O-甲基修饰的 siRNA CD31、荧光标记的 2'-O-甲基 siRNA CD31-FAM、稳定阴性对照 siRNA (stable negative control, SNC)、*PECAM-1* 和 *VEGF* PCR 引物(寡核苷酸序列分别见表 1、2)、阳离子脂质体(RNAi-mate)均购自上海吉玛生物技术有限公司,兔抗 PECAM-1 抗体,兔抗 VEGF 抗体、鼠抗 GAPDH 抗体、羊抗鼠/兔单克隆抗体均购自 Santa Cruz 公司。Opti-MEM 购自 Invitrogen 公司,激光共聚焦显微镜购自 LEICA 公司。

1.2 EOMA 细胞的培养和实验分组

常规培养 EOMA 细胞,取对数生长期细胞用于实验。实验分为四个组:裸 siRNA CD31 组、荧光标记的 siRNA CD31-FAM 组、SNC 组、空白对照组。

1.3 siRNA CD31 转染 EOMA 细胞

每实验组设 3 个复孔,转染前 24 h,将 5×10^4 / μ l EOMA 细胞接种在 24 孔板上,次日转染时细胞汇合度达 70%。50 μ l 的 Opti-MEM 加入 20 pmol

siRNA CD31 (或 siRNA CD31-FAM、SNC) 并混匀;50 μ l Opti-MEM 稀释 2 μ l RNAi-Mate 试剂,室温放置 5 min;将稀释好的 siRNA CD31 和 RNAi-Mate 试剂轻柔混合,室温放置 20 min,以便形成 siRNA CD31-阳离子脂质体(RNAi-Mate)复合物。按实验分组分别将 100 μ l 上述复合物加入细胞中进行转染;空白对照组加入 100 μ l 的 Opti-MEM 培养基。37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱培养,6 h 后检测转染率(细胞的转染效率达到 80% 以上),48 h 后进行后续实验。

1.4 MTT 比色法检测 EOMA 细胞的增殖活性

取每实验组的 EOMA 细胞,以每孔 5×10^4 / μ l 接种于 24 孔板中,每孔总体积 100 μ l,转染方法见 1.3;37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱培养 48 h 后陆续加入 MTT 和 DMSO 溶液,振荡溶解后,用酶标仪测定各孔 570 nm 处的光密度(D)值。每个标本设两个平行孔,实验重复 3 次。细胞增殖抑制率(%) = $(1 - \text{实验孔 } D \text{ 值} / \text{对照孔 } D \text{ 值}) \times 100\%$ 。

1.5 RT-PCR 检测 EOMA 细胞中 *PECAM-1*、*VEGF* mRNA 的表达

提取各实验组 EOMA 细胞的总 RNA,RT-PCR 分别检测 *PECAM-1* mRNA 和 *VEGF* mRNA 的表达量。鼠 *PECAM-1* mRNA、*VEGF* mRNA 的上游引物及内参基因 *GAPDH* mRNA 核苷酸序列见表 2。RT 反应程序:25 $^{\circ}$ C 5 min,42 $^{\circ}$ C 60 min,70 $^{\circ}$ C 5 min,4 $^{\circ}$ C 5 min,瞬间提取。PCR 扩增程序:94 $^{\circ}$ C 30 s,59 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,共 35 个循环,然后 72 $^{\circ}$ C 5 min。以 Gel Pro 4.0 版凝胶光密度分析软件分析累积光密度(integrated optical density, IOD)值,以 *GAPDH* 为内参照,得到目的基因的相对定量值(relative quantification value, RQ)。*PECAM-1* (或 *VEGF*) mRNA 的 RQ 值按以下公式计算:*PECAM-1* 或 *VEGF* mRNA = *PECAM-1* IOD 值或 *VEGF* mRNA / *GAPDH* mRNA IOD 值。

1.6 Western blotting 检测 *PECAM-1*、*VEGF* 蛋白的表达

首先利用细胞膜蛋白提取试剂盒提取蛋白,进行 SDS-PAGE 后转膜,一抗[兔 PECAM-1 抗体(1:500)、兔 VEGF 抗体(1:1 000)、鼠 GAPDH 抗体(1:800)]、二抗[羊抗鼠/兔单克隆抗体(1:2 000)]孵育后显色、曝光。柯达紫外 400 W 成像系统下观察并记录结果,以 Gel pro 4.0 版凝胶光密度分析软件测定 IOD 值,以 *GAPDH* 为内参照,得到 RQ。*PECAM-1* (或 *VEGF*) 蛋白的 RQ 值按以下公式计算:RQ_{*PECAM-1* 或 *VEGF*} = *PECAM-1* 或 *VEGF*

IOD 值/*GAPDH* IOD 值。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 统计软件, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 经检测有统计学意义后用最小显著差异法 (*LSD*) 进行两两比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2'-O-甲基修饰 siRNA CD31 成功转染 EOMA 细胞

激光共聚焦荧光显微镜检测表明, FAM 荧光标记 2'-O-甲基修饰的 siRNA CD31 成功地转染 EOMA 细胞, 图 1A 显示成功转染 siRNA CD31 的 EOMA 细胞内呈现出绿色荧光, 图 1B 为对应的细胞光镜下所观察到的细胞形态。

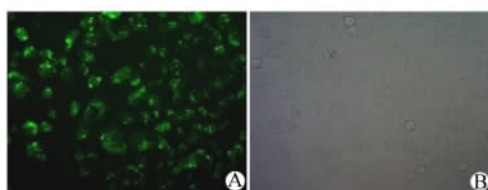


图 1 siRNA CD31-FAM 成功转染 EOMA 细胞

Fig. 1 siRNA CD31-FAM successive transfection of EOMA

A: Fluorescence image; B: Optical image

2.2 siRNA CD31 对 EOMA 细胞增殖的影响

siRNA CD31 转染 EOMA 细胞 48 h 后表现出对细胞增殖的抑制作用。裸 siRNA CD31 组、siRNA CD31-FAM 组 EOMA 细胞增殖抑制率分别为 $(18.82 \pm 1.46)\%$ 、 $(18.91 \pm 2.21)\%$, 显著高于 SNC 组的 $(0.61 \pm 1.06)\%$ (均 $P < 0.01$), 裸 siRNA CD31 组与 siRNA CD31-FAM 组的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 siRNA CD31 对 EOMA 细胞中 *PECAM-1*、*VEGF* 表达的影响

RT-PCR 及 Western blotting 检测结果 (图 2、3、4、5) 显示, siRNA CD31 降低了 EOMA 细胞中的 *PECAM-1* mRNA 与蛋白的表达水平, *VEGF* 的 mRNA 与蛋白的表达水平也随着 *PECAM-1* 表达的下调而下降。裸 siRNA CD31 组、siRNA CD31-FAM 组的 *PECAM-1*、*VEGF* mRNA 与蛋白表达的 RQ 值均低于 SNC 组和空白对照组 (均 $P < 0.01$), 但裸 siRNA CD31 组与 siRNA CD31-FAM 组之间、SNC 组与空白对照组的 *PECAM-1* 和 *VEGF* 的 mRNA 与蛋白表达

的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 siRNA CD31 序列

Tab. 1 siRNA CD31 sequences

siRNA	Sequence(5' to 3')
CD31 s	<u>CAGAUACUCUAGAACGG</u>
CD31 as	<u>UUCGGUUCUAGAGUAUCUG</u>
CD31 s	<u>CAGAUACUCUAGAACGG</u>
CD31 as-FAM	<u>UUCGGUUCUAGAGUAUCUG</u> -FAM
SNC s	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
SNC as	ACGUGACACGUUCGGAGAATT

siRNA: Small interfering RNA; CD31: Namly *PECAM-1*, platelet endothelial cell adhesion molecule 1; FAM: 3'-fluorescence labeling; SNC: Stable negative control; underline: 2'-O-methyl modification; s: Sense; as: Anti-sense

表 2 RT-PCR 的引物序列

Tab. 2 Primer sequences for RT-PCR

Primer	Sequence(5' to 3')
<i>PECAM-1</i> s	TCCAGGCCAGCTGCTCCACTT
<i>PECAM-1</i> as	GCCTTCCGTTCTTTGGTGAGGC
<i>VEGF</i> s	CAATGACCCCTTCATTGACC
<i>VEGF</i> as	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG
<i>GAPDH</i> s	AACTTTGGCATTGTGGAAGG
<i>GAPDH</i> as	GGATGCAGGGATGATGTTCT

PECAM-1: Platelet endothelial cell adhesion molecule 1; *VEGF*: Vascular endothelial cell growth factor; s: Sense; as: Anti-sense

3 讨论

癌细胞的增殖及侵袭与 TME 密切相关, 以 TME 中的主要组分血管内皮细胞为靶向的药物可有效抑制恶性肿瘤的增殖和侵袭。siRNA 可有效地沉默靶基因而实现疾病的基因治疗, siRNA 的 2'-O-甲基修饰可提高 siRNA 的稳定性^[3], 阳离子脂质体作为 siRNA 的载体能有效地转染目标细胞而沉默靶基因^[18]。研究^[19]证实, 抗 *PECAM-1* 抗体可抑制鼠人肺腺癌 A549 细胞移植瘤的增殖。*PECAM-1* 还是个具有信号转导功能的膜蛋白^[17], 可通过激活下游信号分子而调节细胞因子的活性。*VEGF* 与 TME 中血管的发生及癌细胞的浸润密切相关^[4, 20]。

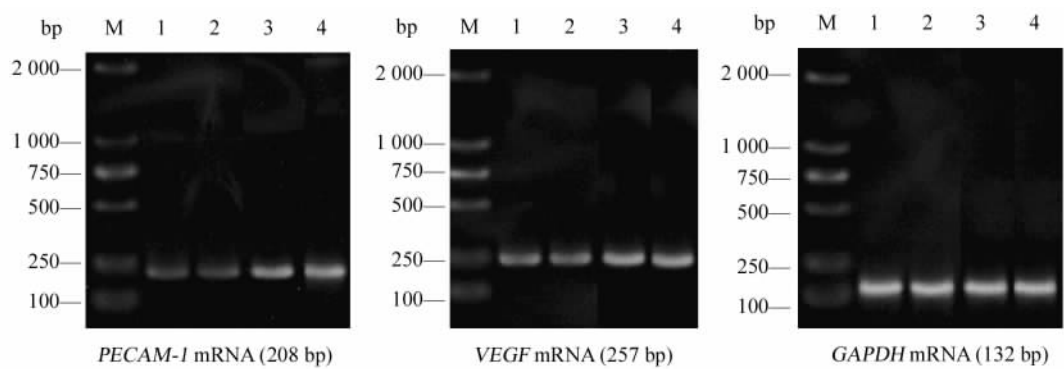


图2 siRNA CD31 下调 EOMA 细胞中的 *PECAM-1* 和 *VEGF* mRNA 的表达

Fig. 2 siRNA CD31 transfection downregulated the expressions of *PECAM-1* and *VEGF* mRNA in EOMA cells

M: Maker; 1: Naked siRNA CD31; 2: siRNA CD31-FAM; 3: SNC; 4: Control

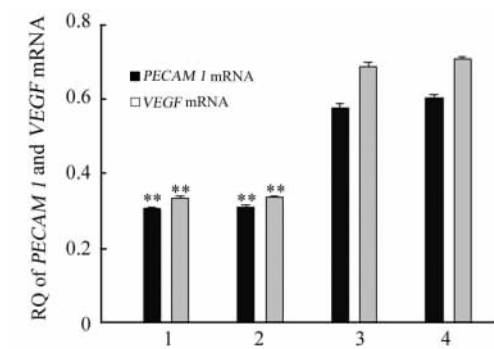


图3 siRNA CD31 下调 EOMA 细胞中 *PECAM-1* mRNA 的表达并伴有 *VEGF* mRNA 的同向变化

Fig.3 siRNA CD31 downregulated the expression of *PECAM-1* mRNA with simultaneous changes of *VEGF* mRNA in EOMA cells

1: Naked siRNA^{CD31}; 2: FAM-siRNA^{CD31}; 3: SNC; 4: Ctrl

** $P < 0.01$ vs SNC or Ctrl

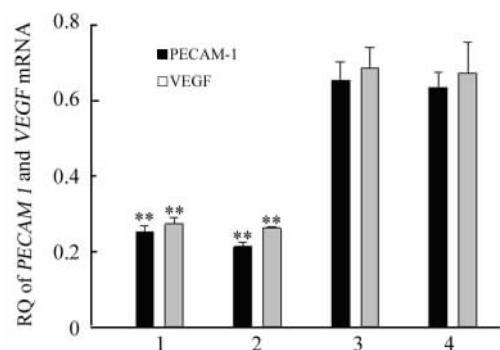


图5 siRNA CD31 下调 EOMA 细胞中 *PECAM-1* 蛋白的表达并伴有 *VEGF* 蛋白的同向变化

Fig.5 siRNA CD31 downregulated the expression of *PECAM-1* protein with simultaneous change of *VEGF* in EOMA cells

1: Naked siRNA^{CD31}; 2: FAM-siRNA^{CD31}; 3: SNC; 4: Ctrl

** $P < 0.01$ vs SNC or Ctrl

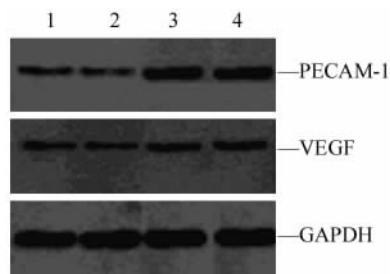


图4 siRNA CD31 下调 EOMA 细胞中的 *PECAM-1* 和 *VEGF* 蛋白的表达

Fig. 4 siRNA CD31 transfection downregulated the expression of *PECAM-1* and *VEGF* protein in EOMA cells

1: Naked siRNA CD31; 2: siRNA CD31-FAM; 3: SNC; 4: Ctrl

本课题采用 2'-O-甲基 siRNA-阳离子脂质体沉默 EOMA 细胞中的 *PECAM-1*, 探究血管内皮细胞 *PECAM-1* 对 *VEGF* 表达的影响。本研究中的裸 siRNA CD31-脂质体复合物和 FAM 荧光标记的 siRNA CD31-脂质体复合物均有效地转染了 EOMA 细胞, 下调了 *PECAM-1* mRNA 和蛋白的表达水平, 并抑制 EOMA 细胞的增殖。研究表明, 2'-O-甲基修饰的 siRNA CD31-阳离子脂质体可有效沉默 EOMA 细胞中 *PECAM-1* 的表达, FAM 荧光探针不影响 siRNA CD31 沉默 EOMA 细胞中 *PECAM-1* 的作用, siRNA CD31 可抑制 EOMA 的细胞增殖。实验中观察到, siRNA CD31 沉默 EOMA 中 *PECAM-1* 基因表达的同时, 下调了 *VEGF* mRNA 和蛋白表达。结

果表明, EOMA 中的 *PECAM-1* 具有调节 *VEGF* 合成的作用。*PECAM-1* 可通过激活 MAPK/ERKs^[15]、PI-3K^[16] 信号途径而发挥其信号转导功能, 而 MAPK/ERKs^[21]、PI-3K^[22-23] 细胞内信号途径可调控着 *VEGF* 的合成与释放。因此, *PECAM-1* 可能通过激活下游的信号分子而调节 *VEGF* 活性, 而 *VEGF* 的活性与 TME 中微血管的生成密切相关。依据以上讨论, 推断 *PECAM-1* 的抑瘤作用可能与 *PECAM-1* 信号调控 *VEGF* 的活性有关。

综上, 本研究证实了 siRNA CD31-阳离子脂质体复合物可有效沉默血管内皮细胞中的靶基因 *PECAM-1*, 沉默 *PECAM-1* 基因的表达可下调 *VEGF* 的表达水平并抑制 EOMA 的增殖; 对于 *PECAM-1* 调控 *VEGF* 表达的具体的信号途径, siRNA CD31-阳离子脂质体复合物的体内抑瘤效应及其分子机制有待于进一步探究。

[参 考 文 献]

- [1] Aleku M, Schulz P, Keil O, et al. Atu 027, a liposomal small interfering RNA formulation targeting protein kinase N3, inhibits cancer progression [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(23): 9788-9798.
- [2] Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs [J]. *Nature*, 2004, 432(7014): 173-178.
- [3] Czauderna F, Fechtner M, Dames S, et al. Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(11): 2705-2716.
- [4] Holash J, Davis S, Papadopoulos N, et al. VEGF-Trap: A VEGF blocker with potent antitumor effects [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(17): 11393-11398.
- [5] Lagnien-Gaume V, Jehl J, Manzoni P, et al. Bevacizumab and lung cancer: Eligible patients in daily practice [J]. *Rev Mal Respir*, 2011, 28(1): 25-31.
- [6] Park S, DiMaio TA, Scheef EA, et al. *PECAM-1* regulates proangiogenic properties of endothelial cells through modulation of cell-cell and cell-matrix interactions [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 299(6): C1468-1484.
- [7] Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. *PECAM-1*: A multi-functional molecule in inflammation and vascular biology [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(12): 2514-2523.
- [8] Bautsch VL. VEGF-directed blood vessel patterning: From cells to organism [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(9): a006452.
- [9] Yang L, Guan H, He J, et al. VEGF increases the proliferative capacity and eNOS/NO levels of endothelial progenitor cells through the calcineurin/NFAT signalling pathway [J]. *Cell Biol Int*, 2012, 36(1): 21-27.
- [10] Ilan N, Madri JA. *PECAM-1*: Old friend, new partners [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15(5): 515-524.
- [11] Watt SM, Gschmeissner SE, Bates PA. *PECAM-1*: Its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells [J]. *Leuk Lymphoma*, 1995, 17(3/4): 229-244.
- [12] Bergom C, Gao C, Newman PJ. Mechanisms of *PECAM-1*-mediated cytoprotection and implications for cancer cell survival [J]. *Leuk Lymphoma*, 2005, 46(10): 1409-1421.
- [13] Chacko AM, Nayak M, Greineder CF, et al. Collaborative enhancement of antibody binding to distinct *PECAM-1* epitopes modulates endothelial targeting [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34958.
- [14] Bergom C, Goel R, Paddock C, et al. The cell-adhesion and signaling molecule *PECAM-1* is a molecular mediator of resistance to genotoxic chemotherapy [J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5(12): 1699-1707.
- [15] Wang Y, Sheibani N. *PECAM-1* isoform-specific activation of MAPK/ERKs and small GTPases: Implications in inflammation and angiogenesis [J]. *J Cell Biochem*, 2006, 98(2): 451-468.
- [16] Limaye V, Li X, Hahn C, et al. Sphingosine kinase-1 enhances endothelial cell survival through a *PECAM-1*-dependent activation of PI-3K/Akt and regulation of Bcl-2 family members [J]. *Blood*, 2005, 105(8): 3169-3177.
- [17] Newman PJ, Newman DK. Signal transduction pathways mediated by *PECAM-1*: New roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(6): 953-964.
- [18] Chien PY, Wang J, Carbonaro D, et al. Novel cationic cardiolipin analogue-based liposome for efficient DNA and small interfering RNA delivery *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12(3): 321-328.
- [19] Zhou Z, Christofidou-Solomidou M, Garlanda C, et al. Antibody against murine *PECAM-1* inhibits tumor angiogenesis in mice [J]. *Angiogenesis*, 1999, 3(2): 181-188.
- [20] Inai T, Mancuso M, Hashizume H, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts [J]. *Am J Pathol*, 2004, 165(1): 35-52.
- [21] Xu J, Liu X, Jiang Y, et al. MAPK/ERK signalling mediates VEGF-induced bone marrow stem cell differentiation into endothelial cell [J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(6A): 2395-2406.
- [22] Tong Q, Zheng L, Lin L, et al. VEGF is upregulated by hypoxia-induced mitogenic factor via the PI-3K/Akt-NF-kappaB signaling pathway [J]. *Respir Res*, 2006, 18(7): 37.
- [23] Zeng H, Dvorak HF, Mukhopadhyay D. Vascular permeability factor (VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(29): 26969-26979.

[收稿日期] 2013 - 12 - 05

[修回日期] 2014 - 02 - 20

[本文编辑] 阮芳铭, 黄静怡