

川芎嗪对 PG 干细胞样细胞 VEGF、HIF-1 α 蛋白表达的影响

杨 栋¹, 张培彤¹, 王耀烺¹, 郭秀伟¹, 马雪曼²

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

摘要: [目的] 研究活血药川芎有效成分川芎嗪对高转移性人巨细胞肺癌细胞 PG-BE1 干细胞样细胞 VEGF、HIF-1 α 蛋白表达的影响。[方法] 利用无血清成球培养法分选 PG-BE1 中的干细胞亚群并验证其干性。用含不同浓度川芎嗪的培养液干预 PG-BE1 干细胞样细胞, 同时设立空白对照组及顺铂(DDP)组, 采用 ELISA 法检测 PG-BE1 亲代细胞、干细胞样细胞(常氧环境和低氧环境)以及不同浓度药物干预后的 PG-BE1 干细胞样细胞的 VEGF 表达, 采用 Western blot 法检测各组 HIF-1 α 蛋白表达。[结果] PG-BE1 干细胞样细胞 VEGF 表达强于其亲代细胞($P<0.001$), VEGF 在低氧环境中的表达高于常氧环境($P<0.001$), 不同浓度川芎嗪均可下调 VEGF 表达($P<0.001$), 且具有剂量依赖性; PG-BE1 干细胞样细胞 HIF-1 α 表达强于其亲代细胞($P<0.001$), HIF-1 α 在低氧环境中的表达高于常氧环境($P=0.001$), 不同浓度川芎嗪均可下调 HIF-1 α 表达($P<0.001$), 但不同剂量之间差异无统计学意义($P=0.477$)。[结论] PG-BE1 干细胞样细胞 VEGF、HIF-1 α 表达高于其亲代细胞, 低氧环境下 VEGF、HIF-1 α 表达上调, 川芎嗪对 VEGF、HIF-1 α 表达有一定的抑制作用。

关键词: 干细胞; 川芎嗪; 血管生成; VEGF; HIF-1 α

中图分类号: R73-34 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2015)03-0234-07

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2015.03.A014

Effect of TMP on the Expression of VEGF and HIF-1 α of PG CSC Like Cells

YANG Dong, ZHANG Pei-tong, WANG Yao-han, et al.

(Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100053, China)

Abstract: [Purpose] To explore the effect of TMP(the effective composition of Chuanxiong) on the expression of VEGF and HIF-1 α of high metastatic human lung cancer cells (PG-BE1). [Methods] Firstly, we sorted the CSC subgroups from the PG-BE1 CSC cells the serum free sphere culture method and then verified its stem cell proprieties. Based on the above experiment, we intervened the PG-BE1 CSC cells with different concentrations of TMP. Then we detected the effect of expression of VEGF of PG-BE1 CSC cells intervened by the different concentrations of TMP and the difference of the expression of VEGF between the PG-BE1 CSC like cells and parental cells by ELISA method. Finally, we detected the expression of HIF-1 α of PG-BE1 CSC cells intervened by the different concentrations of TMP and the difference of the expression of HIF-1 α between the PG-BE1 CSC like cells and parental cells by Western blot method. [Results] PG-BE1 CSC cells expressed higher VEGF compared with parental cells ($P<0.001$). PG-BE1 CSC like cells expressed higher VEGF in hypoxia environment($P<0.001$). Different concentrations of TMP can inhibit the expression of VEGF($P<0.001$) and there were dose dependence between different concentrations. PG-BE1 CSC cells expressed higher HIF-1 α compared with parental cells ($P<0.001$). PG-BE1 CSC like cells expressed higher VEGF in hypoxia environment ($P=0.002$). Different concentrations of TMP can inhibit the expression of HIF-1 α ($P<0.001$), but there were no dose dependence between different concentrations ($P=0.477$). [Conclusion] PG-BE1 CSC like cells expressed high VEGF and HIF-1 α . PG-BE1 CSC like cells expressed higher VEGF and HIF-1 α in hypoxia environment. TMP can inhibit the expression of VEGF and HIF-1 α to a certain extent.

Key words: CSC cell; TMP; angiogenesis; VEGF; HIF-1 α

血管生成对肿瘤的生长和转移至关重要, 抗肿瘤

瘤血管生成一直是近年来肿瘤防治研究的热点。随着对肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)研究的不断深入, 人们发现在异质性的肿瘤组织中, 作为细胞

收稿日期: 2014-09-16; 修回日期: 2014-11-04
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173450)
通讯作者: 张培彤, E-mail: zhangpeitong@sohu.com

亚群之一的 CSCs 可通过不同途径在肿瘤血管生成或血管新生过程中发挥更为重要的作用,是保证肿瘤血供的关键因素,而血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)在 CSCs 中的高表达又提示 HIF-1 α -VEGF 信号通路的过表达有可能是 CSCs 促血管生成的关键途径。

1 材料与方法

1.1 实验材料

细胞株:高转移性人巨细胞肺癌细胞 PG-BE1,由中国中医科学院广安门医院肿瘤研究室提供。

主要试剂:Human FGF-basic (美国 Pepro Tech 公司,货号:AF-100-18B);Human EGF(美国 Pepro Tech 公司,货号:AF-100-15);B27 Supplement(50 $\times$)(美国 Gibco 公司,货号:7504-044);OCT-4 抗体(美国 CST 公司,货号:2750);SOX-2 抗体(美国 CST 公司,货号:3579);Nanog 抗体(美国 CST 公司,货号:4903); β -Actin (13E5) Rabbit mAb (美国 CST 公司,货号:4970);Anti-HIF-1 α [H1 α 67] 抗体(美国 Abcam 公司,货号:ab1);Goat Anti-Rabbit IgG H&L(HRP)(美国 Abcam 公司,货号:ab97051);Goat F(ab')₂ polyclonal Secondary Antibody to mouse IgG+IgM+IgA-H&L (HRP)(美国 Abcam 公司,货号:ab6006);VEGF ELISA(美国 R&D 公司,货号:DVE00);盐酸川芎嗪(中国药品生物制品鉴定所,批号:110817-200305);丹参酮 II A(中国药品生物制品鉴定所,批号:110766-200619);顺铂(DDP)注射液(云南个旧生物药业有限公司,批号:H53021740)。

主要仪器:CO₂ 细胞培养箱(日本 Sanyo 公司,型号:MCO-18AIC);光学倒置显微镜(日本 Nikon 公司,型号:TS100);凝胶成像分析系统(美国 BIO-RAD 公司);低氧工作站 INVIVO₂200(英国 RUSKINN 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 无血清成球培养法分选 PG-BE1 干细胞样细胞

常规复苏 PG-BE1 细胞,用含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基进行培养,细胞传代后进入指数生长期时,消化并收集细胞,重悬于含 1%双抗、20 μ g/L FGF、20 μ g/L EGF、2% B27 及 5 μ g/ml 胰岛素 DMEM/F12 培养基中,调整其浓度至 2 $\times 10^4$ 细胞/ml,后接种

于超低吸附六孔板中,每孔接种 2ml,待细胞成球且细胞球表面颜色变暗,折光度变低时收集细胞。

1.2.2 平板克隆形成实验检测 PG-BE1 成球细胞与亲代细胞克隆形成能力

收集 PG-BE1 亲代细胞及成球细胞,消化后重悬于含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中,调整其浓度为 200 细胞/ml,分别接种于六孔板中,每孔接种 2ml,置于细胞培养箱中培养 6d,后弃去培养液,95%乙醇固定后行结晶紫染色,倒置显微镜下(40 $\times$),观察每孔随机 5 个视野下超过 10 个细胞的克隆灶的数目。

1.2.3 Western blot 法检测 PG-BE1 干细胞样细胞与亲代细胞 OCT-4、SOX-2、Nanog 蛋白表达

提取各组细胞总蛋白,用 BCA 法测定各组总蛋白浓度,分别制备浓缩胶与分离胶,加样后行蛋白电泳、电转移,5%脱脂奶粉封闭后,一抗(稀释倍数为 1:1000)、二抗(稀释倍数为 1:2000)孵育各 1h,后于暗室中滴加超敏发光液孵育 5min,于凝胶成像系统拍照,并用软件 Quantity One 分析各组蛋白表达量。

1.2.4 Western blot 法检测 PG-BE1 干细胞样细胞及 HIF-1 α 表达

PG-BE1 干细胞样细胞分别于常氧(5%CO₂、95%空气)和低氧(5%O₂、5%CO₂、90%N₂)环境下培养,各组细胞培养 48h。药物干预细胞分别经含低(100 μ g/ml)、中(300 μ g/ml)、高(500 μ g/ml)浓度川芎嗪(TMP)(根据文献及预实验结果确定高、中、低浓度)的无血清培养基中培养 24h。收集各组细胞后按 1.2.3 步骤检测 HIF-1 α 表达。

1.2.5 ELISA 法检测 PG-BE1 干细胞样细胞及 VEGF 表达

按 1.2.4 步骤处理各组细胞后,收集各组细胞的上清液,按照 ELISA 试剂盒步骤行 VEGF 检测。

1.3 统计学处理

采用 SPSS17.0 进行统计分析,两组间比较采用独立样本 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析,多组内两组间比较采用 LSD 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PG-BE1 干细胞样细胞分选

接种后第 3d 开始形成细胞球,随着培养时间延

长,细胞球体逐渐增大,至第 6d 时细胞球表面颜色变暗、球体折光度降低(Figure 1)。

2.2 PG-BE1 成球细胞克隆形成能力

PB-BE1 成球细胞的平板克隆灶形成数目为 8.06 ± 1.31 个,PB-BE1 原代细胞平板克隆灶形成数目为 3.94 ± 1.06 个,两组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。镜下克隆灶呈散在分布,每个克隆灶由多个细胞形成,克隆灶呈规则的圆形(Figure 2)。

2.3 PG-BE1 成球细胞与亲代细胞 OCT-4、SOX-2、Nanog 蛋白表达

PG-BE1 成球细胞的干细胞相关表面标志蛋白 SOX-2、OCT-4、Nanog 表达均强于其亲代细胞 (P 值分别为 0.017、0.010、0.004)(Table 1,Figure 3)。

2.4 PG-BE1 原代细胞与不同氧浓度下 PG-BE1 成球细胞 VEGF 表达

常氧和低氧环境下培养的 PG-BE1 干细胞样细

胞的 VEGF 表达量均明显高于亲代细胞($P<0.001$),低氧环境下培养的 PG-BE1 干细胞样细胞的 VEGF 表达量高于常氧环境($P<0.001$)(Table 2)。

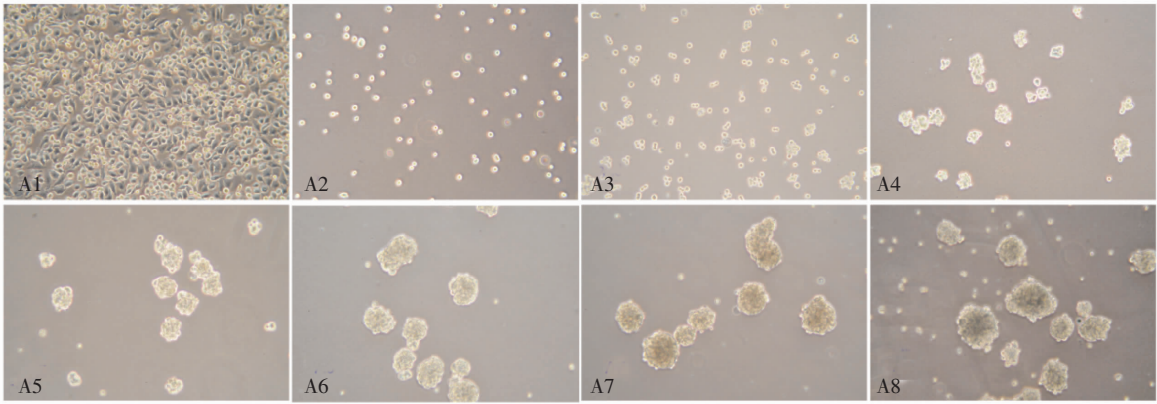
Table 1 Stem cell related markers expression of PG-BE1 parental cells and PG-BE1 sphere cells($\bar{x}\pm s$)

Marker	PG-BE1 parental cells	PG-BE1 sphere cells	P
SOX-2	1.00±0.00	1.99±0.59	0.017
OCT-4	1.00±0.00	1.52±0.21	0.010
Nanog	1.00±0.00	1.44±0.36	0.029

Table 2 VEGF expression of PG-BE1 parental cells and PG-BE1 sphere cells in different oxygen concentration environment($\bar{x}\pm s$)

Group	VEGF(ng/ml)
PG-BE1 parental cells	252.57±12.03
PG-BE1 sphere cells(NO)	1242.79±6.79 [△]
PG-BE1 sphere cells(HO)	1564.57±56.61 [*]

Note :F=1239.30, $P<0.001$;^{*} $P<0.001$,compare to PG-BE1 parental cells;
[△] $P<0.001$,compare to PG-BE1 sphere cells.



FigureA1 is the adherent cells;FigureA 2~8 are the inoculation cells and the formation of stem cell sphere in 1~6 days.

Figure 1 Formation of PG-BE1 stem like cells by inverted microscope(×200)

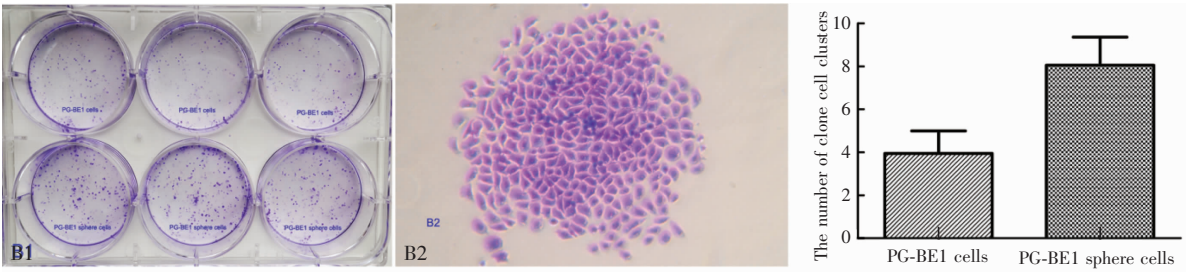


Figure B1 is the 6 holes plate and the above three holes are PG-BE1 cells while the following three holes are PG-BE1 sphere cells. The cluster number of the above three holes is significantly more than the following three holes. Figure B2 is the clone cluster form by inveted microscope(crystal violet staining,×200).

Figure 2 Clone forming experiments of PG-BE1 sphere cells and PG-BE1 parental cells

2.5 不同浓度川芎嗪对 PG-BE1 成球细胞 VEGF 表达的影响

不同浓度的川芎嗪及 DDP 对 PG-BE1 成球细胞的 VEGF 表达均有抑制作用($P<0.01$),其抑制能力与浓度呈正相关;高、中、低浓度川芎嗪对 PG-BE1 干细胞样细胞 VEGF 表达的抑制能力均弱于 DDP($P<0.001$)(Table 3, Figure 4)。

2.6 PG-BE1 原代细胞与不同氧浓度下 PG-BE1 成球细胞 HIF-1 α 表达

低氧环境下培养的 PG-BE1 干细胞样细胞的 HIF-1 α 表达高于常氧环境($P=0.002$)及亲代细胞($P<0.001$)(Table 4, Figure 5)。

2.7 不同浓度川芎嗪对 PG-BE1 干细胞样细胞 HIF-1 α 表达的影响

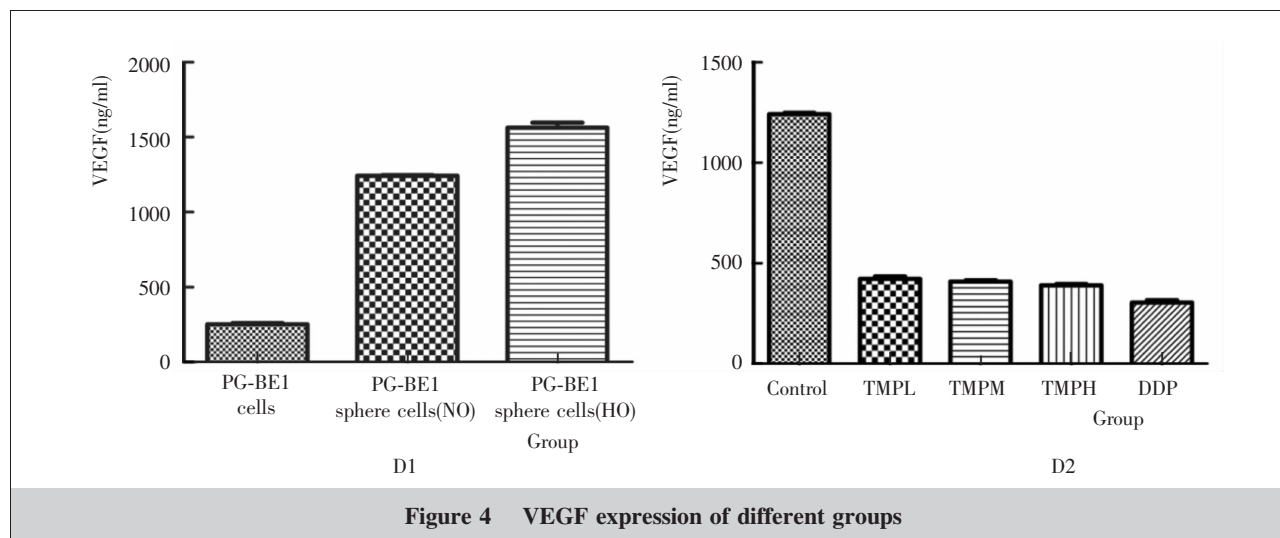
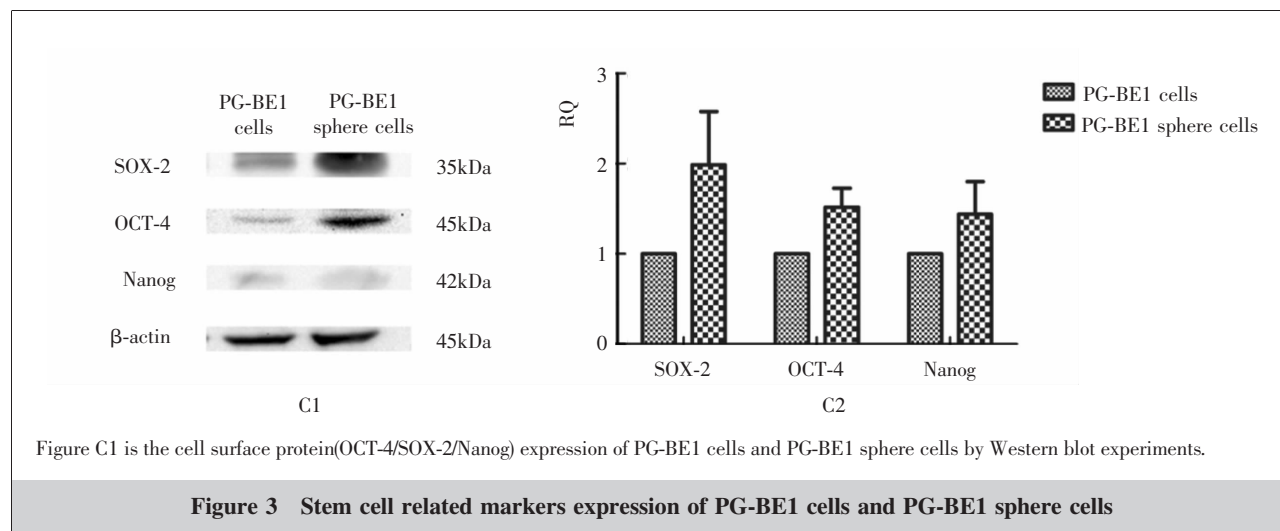
不同浓度的川芎嗪及 DDP 均对 PG-BE1 干

细胞样细胞 HIF-1 α 表达产生一定的抑制作用($P<0.001$),高、中、低浓度川芎嗪组间比较差异无统计学意义($P>0.05$);高、中、低浓度川芎嗪对 PG-BE1 干细胞样细胞 HIF-1 α 表达的抑制强于 DDP($P<0.05$)(Table 5, Figure 6)。

Table 3 Effect of VEGF expression of PG-BE1 sphere cells by different concentrations of TMP

Group	VEGF(ng/ml)
Control	1242.79 $\pm$ 6.79
TMPL	422.73 $\pm$ 11.66 ^{*$\Delta$$\nabla$}
TMPM	409.40 $\pm$ 5.95 ^{*$\Delta$$\Delta$$\nabla$}
TMPH	390.87 $\pm$ 5.60 ^{*∇}
DDP	304.87 $\pm$ 10.60 [*]

F=6242.59, $P<0.001$; ^{*} $P<0.001$, vs. Control; ^{Δ} $P=0.029$, vs. TMPM; ^{Δ} $P<0.001$, vs. TMPH; ^{Δ} $P=0.004$, vs. TMPH; ^{∇} $P<0.001$, vs. DDP; TM-PL: 1000 concentration TMP; TMPM: moderate concentration TMP; TMPH: high concentration TMP.



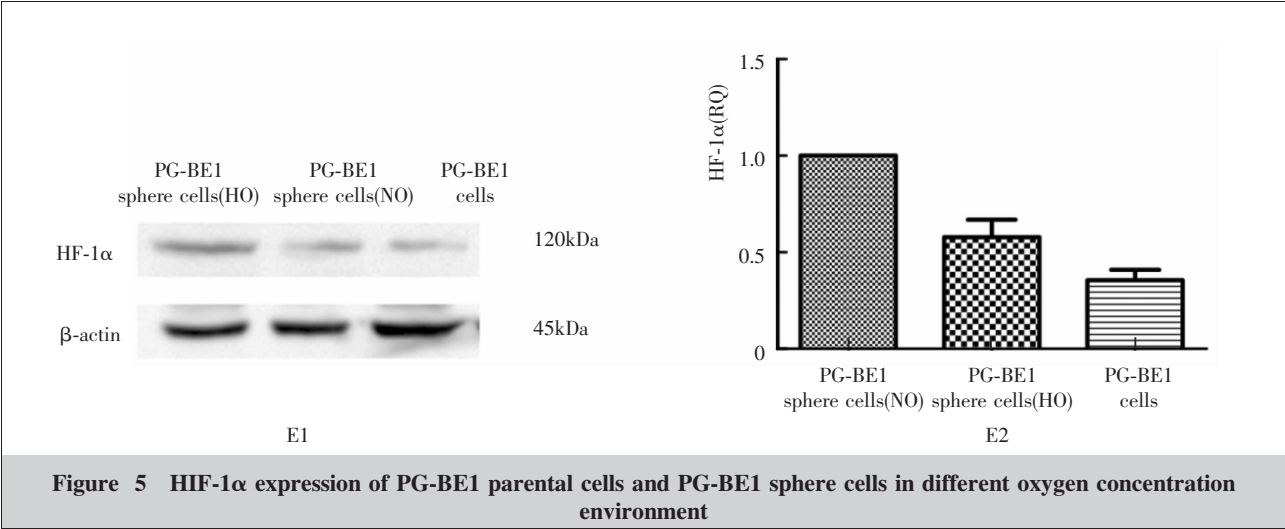


Table 4 HIF-1α expression of PG-BE1 parental cells and PG-BE1 sphere cells in different oxygen concentrations environment ($\bar{x} \pm s$)

Group	HIF-1α (RQ)
PG-BE1 sphere cells(HO)	1.0000±0.0000*
PG-BE1 sphere cells(NO)	0.5783±0.0900* [△]
PG-BE1 parental cells	0.3550±0.0528

Note: F=177.38, $P<0.001$; [△] $P=0.002$, vs. PG-BE1 sphere cells(HO); * $P<0.001$, vs. PG-BE1 parental cells.

Table 5 Effect of HIF-1α expression of PG-BE1 sphere cells by different concentrations of TMP(RQ) ($\bar{x} \pm s$)

Group	HIF-1α (RQ)
Control	1.0000±0.0000
TMPL	0.3883±0.0791* ^{△▽}
TMPM	0.3883±0.0736* ^{△△▽}
TMPLH	0.4417±0.1013* ^{▽▽}
DDP	0.5700±0.1047*

Note: F=60.80, $P<0.001$; * $P<0.001$, vs. Control; [△] $P=1.00$, vs. TMPL; ^{△△} $P=0.384$, vs. TMPLH; [▽] $P=0.004$, vs. DDP; ^{▽▽} $P=0.04$, vs. DDP.

3 讨论

肿瘤生长过程中, 由于肿瘤细胞快速增殖会大量消耗营养物质和氧气。同时, 为保证肿瘤组织血供而新生的血管往往存在诸如形态扭曲、膨大、呈囊状、内皮细胞形态畸变、基底膜厚薄不一、管壁间隙大等形态异常^[1], 使其血供效率较低。因而, 肿瘤在生长过程中往往处于乏氧状态。HIF-1α 是一种氧依赖性转录因子, 低氧环境会促进肿瘤细胞 HIF-1α 基因高表达。VEGF 是 HIF-1α 的重要靶基因, HIF-1α 的高表达使得 VEGF 基因表达上调。VEGF 是目前已知的的作用最强、特异性最高的肿瘤血管生成促进因子。VEGF 与内皮细胞特异性结合后, 能促进其增殖、迁移及出芽生长^[2]。多项临床研究表明, 包括肺癌^[3]、胃癌^[4]、胰腺癌^[5]、胃癌^[6]、结肠癌^[7]、喉癌^[8]等在内的恶

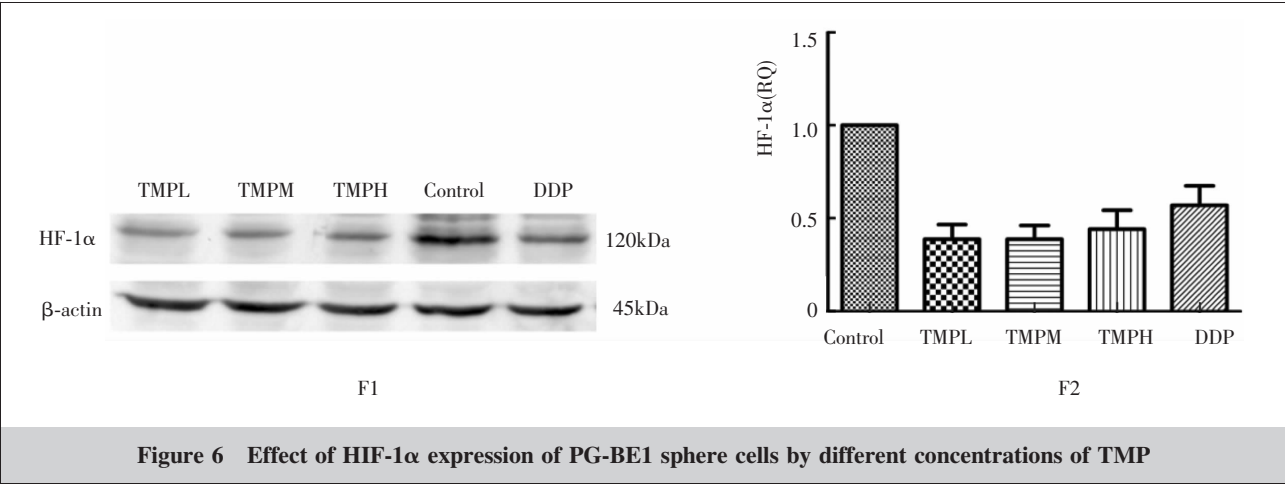


Figure 6 Effect of HIF-1α expression of PG-BE1 sphere cells by different concentrations of TMP

性肿瘤组织中都存在 HIF-1 α 和 VEGF 的高表达,其表达水平与临床分期、病理类型以及预后密切相关。

CSCs 是近年来被发现的肿瘤组织中含量极少的细胞亚群,具有自我更新、多向分化及无限增殖等干细胞生物特性,在肿瘤发生、侵袭、转移及多药耐药等多个环节都发挥重要作用。研究发现,数量极少的 CSCs 即可在裸鼠体内形成移植瘤,而数量相等的 CSCs 和原代细胞同时接种到裸鼠皮下,CSCs 的成瘤速度及移植瘤生长速度快于原代细胞,这些都提示 CSCs 可能有潜在的促血管生成能力以保证移植瘤的血供。同时,在肿瘤组织中,CSCs 存在于由多种细胞成分、细胞外基质及多种细胞因子所构成的三维结构中,即所谓的干细胞壁龛(stem cell niche)。而低氧是干细胞壁龛微环境的重要特点,低氧环境促进 HIF-1 α 转录基因的表达,而 HIF-1 α 可通过 OCT-4 转录因子及 Notch 信号通路维持 CSCs 的干性^[9]。而 HIF-1 α 也可通过上调 VEGF 基因的表达参与促血管生成,CSCs 高表达 VEGF 也已经在乳腺癌^[10]、胶质瘤^[11]、肾癌^[12]、肺癌^[13]、肝癌^[14]、结肠癌^[15]等研究中得到证实。在本研究中,我们观察了巨细胞性人肺癌细胞 PG-BE1 干细胞样细胞与原代细胞,以及不同氧环境下 PG-BE1 干细胞样细胞 HIF-1 α 和 VEGF 表达。相对于原代细胞,PG-BE1 干细胞样细胞的 HIF-1 α 和 VEGF 表达均上调,表明 PG-BE1 干细胞样细胞有更强的促血管生成能力,与文献结论相一致。对于不同氧环境而言,PG-BE1 中 HIF-1 α 和 VEGF 在低氧环境中的表达显著性高于常氧环境,表明低氧环境可以通过上调 HIF-1 α 表达从而促进 VEGF 高表达。

肿瘤患者所普遍存在的血瘀证与其血液流变学异常相关,也是造成肿瘤组织低氧环境的重要因素,既往有学者试图通过应用活血药改善肿瘤组织的微环境以防止血管生成,同时又能保证化疗药被有效的血循环输送到肿瘤组织以达到杀伤肿瘤细胞的目的。如李小菊等^[16]研究发现水蛭可通过改善肿瘤缺氧微环境而抑制肿瘤血管生成,其作用机制可能是通过下调 HIF-1 α 表达水平以及由其介导的下游靶基因 VEGF mRNA 的表达而实现。奚胜艳等^[17]发现红花的有效成分羟基红花黄色素 A(HSYA)可降低人胃癌 BGC-823 移植瘤的 VEGF 及血清中 VEGF 的表达。张绪慧等^[18]应用鳖甲煎丸干预 H22 荷瘤小

鼠,也发现小鼠肿瘤组织内 VEGF 表达下调的结果。川芎嗪是伞形科植物川芎的有效成分,川芎是临床常用活血药,有活血行气、祛风止痛之效。在本研究中,我们发现不同浓度川芎嗪均可从一定程度上下调 PG-BE1 干细胞样细胞 HIF-1 α 和 VEGF 的表达,且不同浓度之间无差异,其作用机制可能是通过抑制 HIF-1 α 基因的表达,进而下调由其介导的 VEGF 表达。

参考文献:

- [1] McDonald DM,Choyke PL.Imaging of angiogenesis:from microscope to clinic[J].Nat Med,2003,9(6):713-725.
- [2] Yu DM,Yan XC,Guo DY,et al.Expressions of VEGF and nm23 protein in transitional cell carcinoma of the bladder and their clinical significance[J].Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae,2006,28(21):2180-2182.
- [3] Xu HY,Zhong H,Lu SW,et al.Correlation of expression of HIF-1 α to proliferation and neovascularization of tumor and prognosis of patients with non-small cell lung cancer [J].Journal of Clinical Pulmonary Medicine,2014,19(1):73-76.[徐怀阳,钟竑,陆善伟.HIF-1 α 与非小细胞肺癌增殖、血管生成及预后的关系 [J].临床肺科杂志,2014,19(1):73-76.]
- [4] Guo RH,Wang RR,Chen JO,et al.Expression of HIF-1 α , VEGF and Pvh1 in renal cell carcinoma and their significance[J].Journal of Chinese Oncology,2014,20(1):59-63.[郭瑞华,王蓉蓉,陈建欧,等.HIF-1 α 、VEGF 和 pVHL 在肾透明细胞癌中的表达及意义[J].肿瘤学杂志,2014,20(1):59-63.]
- [5] Zhang XB,Li YH,Li KL,et al.The expression and clinical value of VEGF,MMP-2,MMP-9 in pancreatic cancer[J].Chinese Journal of Gerontology,2014,34(2):327-329.[张小博,李艳会,李开良,等.VEGF、MMP-2、MMP-9 在胰腺癌中的表达及临床意义 [J].中国老年学杂志,2014,34(2):327-329.]
- [6] Li GY,Zhao JD,Wang C,et al. Expressions of HIF-1 α , VEGF in gastric carcinoma and their clinical significances [J].China Oncology,2010,20(8):602-606.[李国元,赵久达,王成,等.HIF-1 α 和 VEGF 在胃癌中的表达及临床意义[J].中国癌症杂志,2010,20(8):602-606.]
- [7] Li N.Expression and clinical significance of HIF-1 α VEGF and MMP-9 in colonic carcinoma [J]. Hebei Medicine, 2014,20(1):7-9.[李娜.结肠癌患者 HIF-1 α 、VEGF 和 MMP-9 表达及临床意义[J].河北医学,2014,20(1):7-9.]

- [8] Qiu YS,Zhou HF. Expression of HIF-1 α and VEGF in human laryngeal carcinoma and its relationship with angiogenes[J].Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery,2014,28(6):389-393.[邱亚双,周慧芳.HIF-1 α 和 VEGF 在喉癌中的表达及其与血管生成的关系[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2014,28(6):389-393.]
- [9] Covello KL,Kehler J,Yu H,et al.HIF-2 α regulates Oct-4:effects of hypoxia on stem cell function,embryonic development,and tumor growth[J].Genes Dev,2006,20(5):557-570.
- [10] Sun H,Jia J,Wang X,et al. CD44+/CD24- breast cancer cells isolated from MCF-7 cultures exhibit enhanced angiogenic properties[J].Clin Transl Oncol,2013,15(1):46-54.
- [11] Bao SD,Wu QL,Sathornsumetee S,et al. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor[J].Cancer Res,2006,66(16):7843-7848.
- [12] Grange C,Tapparo M,Collino F,et al. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche[J].Cancer Res,2011,71(15):5346-5356.
- [13] Cao B,Jia J,Ma L,et al. Recombinant human endostatin could eliminate the pro-angiogenesis priority of SP cells sorted from non-small cell lung cancer cells[J].Clin Transl Oncol,2012,14(8):575-585.
- [14] Yang XR,Xu Y,Yu B,et al. High expression levels of putative hepatic stem/progenitor cell biomarkers related to tumour angiogenesis and poor prognosis of hepatocellular carcinoma[J].Gut,2010,59(7):953-962.
- [15] Shang LN,Yang AJ,Wang CY,et al.The expression of CD133+ in colorectal cancer and its relationship with angiogenesis[J].Tumor,2010,30(6):524-528.[尚丽娜,杨爱军,王晨昱,等.结直肠癌中 CD133 的表达与血管生成相关性的研究[J].肿瘤,2010,30(6):524-528.]
- [16] Li XJ,Lu HD,Chen WQ,et al.Effects of Leech Hirudo on tumor angiogenesis and its mechanisms[J].Cancer Research on Prevention and Treatment,2013,40(1):46-50.[李小菊,卢宏达,陈卫群,等.水蛭抑制肿瘤血管生成的作用及其机制[J].肿瘤防治研究,2013,40(1):46-50.]
- [17] Xi SY,Zhang Q,Liu CY,et al. Effects of HSYA on protein and mRNA expression of KDR,HIF-1 α and protein expression of VEGF in nude mice with BGC-823 transplantation tumor[J].China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy,2012,27(1):82-86.[奚胜艳,张前,刘朝阳,等.红花组分 HSYA 对人胃腺癌 BGC-823 移植瘤裸鼠 VEGF 蛋 KDR 与缺氧诱导因子表达的影响[J].中华中医药杂志,2012,27(1):82-86.]
- [18] Zhang XH,Liang L,Cai CQ,et al.Rudimentary study on the anti-angiogenesis effects of Biejaijian pills on the mice bearing neoplasm of H22 cell[J].Shandong Journal of Traditional Chinese Medicine,2010,29(5):330-331.[张绪慧,梁磊,蔡长青,等.鳖甲煎丸对 H22 荷瘤小鼠肿瘤血管抑制作用的研究[J].山东中医杂志,2010,29(5):330-331.]