

PMA 及乏氧诱导 VEGF 上调的细胞模型构建及用于 RNAi 研究 *

杨 艳^{1,2} 吕国军¹ 郭 昕¹ 张德蒙^{1,2} 于炜婷¹ 张 英¹ 刘袖洞^{3△} 马小军^{1△}

(1 中国科学院大连化学物理研究所 辽宁 大连 116023; 2 中国科学院研究生院 北京 100039;

3 大连大学环境与化学工程学院 辽宁 大连 116622)

摘要 目的 探讨佛波酯(PMA)与乏氧诱导对小鼠黑色素瘤细胞 B16-F10 中血管内皮细胞生长因子(VEGF)表达量的影响,构建适合 RNA 干扰(RNAi)的体外细胞模型。方法 通过酶联免疫吸附试验(ELISA 法)在蛋白质水平上检测细胞分泌的 VEGF 量,并用激光共聚焦显微镜观察小干扰 RNA(siRNA)转染的细胞胞吞及细胞形态。结果 1 M PMA 处理细胞 2 h 能明显上调 B16-F10 细胞中 VEGF 蛋白的合成及分泌,与常规培养相比,细胞可增加 50%的 VEGF 水平。再经乏氧诱导 48 h,稳定释放到培养液里的 VEGF 浓度大幅提高 200%,范围在 55-65 pg/mL/h。结论 经 PMA 和乏氧诱导后,B16-F10 细胞稳定的 VEGF 分泌量与一定时间内分泌的稳定性均表明其适合作为 RNAi 的体外细胞模型。初步的 RNAi 结果表明,TKO/siRNA 纳米粒与亮聚糖/siRNA 纳米粒对于 VEGF 的沉默效率达 40%。

关键词 小鼠黑色素瘤细胞 血管内皮细胞生长因子 PMA 诱导 乏氧诱导 RNAi 模型

中图分类号 Q782 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)02-265-05

Construction of VEGF Up-regulated Cells Induced by PMA and Hypoxia for RNAi *

YANG Yan^{1,2}, LV Guo-jun¹, GUO Xin¹, ZHANG De-meng^{1,2}, YU Wei-ting¹, ZHANG Ying¹, LIU Xiu-dong^{3△}, MA Xiao-jun^{1△}

(1 Laboratory of Biomedical Material Engineering, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China; 2 Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China;

3 College of Environment and Chemical Engineering, Dalian University, Dalian 116622, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in mouse melanoma cell B16-F10 induced by PMA and hypoxia so as to set up a stable in vitro model for RNA interference. **Methods:** Mouse VEGF immunoassay (ELISA kit) was utilized to determine the VEGF concentration secreted by B16-F10 cell. Confocal laser scanning microscopy was used for visualization of cellular uptake of siRNA loaded nanoparticles as well as cell morphology. **Results:** Stimulation of B16-F10 cells with 1 M PMA for 2 h, VEGF expression increased. Following hypoxia incubation for 48 h, the concentration of VEGF increased significantly 200%, ranging from 55 to 65 pg/mL/h in comparison with routine culture. **Conclusions:** Combining PMA stimulation and hypoxia culture, VEGF expression in B16-F10 cells was up-regulated and could keep a stable level in 48 h, which suggested that the induced B16-F10 cells were suitable for in vitro RNAi study. Furthermore, the silencing efficiency of VEGF by TKO/siRNA nanoparticles and chitosan/siRNA nanoparticles showed preliminary result of 40% with the established B16-F10 cell model.

Key words: Mouse melanoma cell; VEGF; PMA-stimulated; Hypoxia-induced; RNAi model

Chinese Library Classification(CLC): Q782 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)02-265-05

前言

肿瘤生长和转移是基于血管再生的,大量的新生血管形成是体积大于 2mm³ 的肿瘤继续生长不可缺少的因素,没有足够的新生血管提供充足的养分,肿瘤生长无以为继。在一系列的与血管再生相关的血管新生和血管生成抑制因子中,血管内皮细胞生长因子(VEGF),亦称血管通透因子(VPF),是内皮细胞特异性的丝裂原,能促进内皮细胞增殖、迁移,从而促进血管形

成,增强内皮细胞通透性,是最主要的调控实体瘤血管发生和新生血管形成的因子^[1,2]。因此,通过抑制 VEGF 以抗血管再生,成为抑制恶性肿瘤生长和转移的策略和有力工具。在抑制 VEGF 表达的诸多基因治疗途径中,使用反义寡核苷酸,核酸酶和 siRNA 被视为有力的抗癌策略^[3-6]。尤其是 siRNA 介导的 RNAi 技术基于“降低”(“knock down”)基因表达而给反向遗传学带来彻底变革^[7]。

为了验证 RNAi 技术的可行性,可以采用转增强型绿色荧

* 基金项目 国家自然科学基金(20876018,20736006),教育部留学回国人员科研启动基金,

中国科学院知识创新工程重要方向项目(KJCX2.YW.M02,KJCX2-YW-210-02)

作者简介 杨艳(1981-),女,博士,主要研究方向 基因递送,E-mail yangy@dicp.ac.cn

△通讯作者 马小军,研究员,E-mail maxj@dicp.ac.cn;刘袖洞教授,E-mail liuxd@dicp.ac.cn

电话 0086-411-84379139 传真 0086-411-84379096

(收稿日期 2011-07-15 接受日期 2011-08-20)

光蛋白(EGFP)基因细胞^[8]和转 EGFP 基因动物^[9]来评价干扰效率,但由于靶向非疾病基因,难以直接与疾病的治疗效果相关联。在通过 RNAi 技术抑制 VEGF 表达上,其体外模型也曾使用转基因细胞如转 VEGF 基因的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞^[10],但这种做法不仅需要验证所转基因表达的稳定性,在体内实验方面还要使用裸鼠^[12]构建肿瘤模型以避免免疫排斥反应,增加了成本。实际上,生理状态下小鼠 B16 黑色素瘤可以表达 VEGF^[13],如果用取自小鼠自身建系的癌细胞,模拟体内肿瘤病理状态,则有望作为体外模型检验干扰效果。此外,还可通过注射法接种 B16 细胞到 C57BL/6 小鼠上,以同源细胞构建荷瘤鼠模型,实现体外模型与体内模型的一致性^[14]。本研究选择 C57BL/6 小鼠黑色素瘤高转移细胞株 B16-F10 细胞,旨在探索、构建一种能持续、稳定分泌 VEGF 的细胞模型,满足体外考察 RNAi 法抑制 VEGF 效果的需要,进而制备了 TKO/siRNA 纳米粒和壳聚糖/siRNA 纳米粒,初步考察了 VEGF 的抑制效果,也为后续构建动物模型奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

C57BL/6 小鼠黑色素瘤高转移细胞株 B16-F10 细胞,购自南京凯基公司。RPMI 1640 培养液,购自 Gibco 公司。新生牛血清 (FCS) 购自杭州四季青生物工程公司。佛波脂(PMA)、青霉素、链霉素、胰酶购自 Sigma 公司。转染试剂 TransIT-TKO,购自美国 Mirus 公司。壳聚糖 (分子量为 233 kDa、脱乙酰度为 94%)购自浙江金壳生物化学公司。VEGF-siRNA(21 bp),正义链 5'-CGA UGA AGC CCU GGA GUG CdTdT-3', 反义链: 5'-GCA CUC CAG GGC UUC AUC GdTdT-3' 对照 siRNA(N.C. siRNA),正义连 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3',反义链 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3' FAM 荧光标记的对照 siRNA (FAM-siRNA), 正义连 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3',反义链 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3' 均购自上海吉玛制药技术公司。小鼠 VEGF 酶联免疫试剂盒, 购自美国 R&D systems 公司。Labsystems Wellscan MK3 酶标仪购自美国。Leica SP2 激光共聚焦显微镜购自德国。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 B16-F10 细胞,复苏后于 RPMI 1640 培养液中培养,内含 10% FCS、青霉素 100 U/mL 和链霉素 0.1 g/mL。采用 0.02% EDTA-0.25%胰酶消化,所有实验细胞在保持湿度条件下 37 °C 体外培养、扩增均不超过 15 代。常规培养为培养箱通入 5% CO₂, 乏氧培养是通入 1% O₂, 5% CO₂ 和 94% N₂^[15]。

1.2.2 PMA 化学诱导及乏氧物理诱导 细胞接种到 24 孔板 24 h 后,采用 1 μM PMA 诱导不同时间(2 h, 4 h, 6 h),不同浓度 PMA(100 μM, 10 μM, 1 μM, 0.16 μM)诱导 30 min,以未经处理的细胞为对照,分别进行常规培养和乏氧培养。应用小鼠 VEGF 酶联免疫试剂盒检测上清液里 VEGF 的浓度,按产品说明书操作,在结合有 VEGF 抗体的微量滴定板中加入倍比稀释的 VEGF 标准品和样品,孵育 2 h,以洗涤缓冲液洗涤 5 次,加入酶标 VEGF 抗体孵育 2 h,洗涤 5 次,加入底物液避光反应 30 min,加终止液终止反应。在 Labsystems Wellscan MK3 酶标

仪的 450 nm 波长(校正波长 570 nm)下测定 OD 值。分别计算各种培养方式每小时 VEGF 的分泌量进行比较。

1.2.3 化学物理联合诱导及其条件优化 细胞接种到 24 孔板 24 h 后,用不同浓度 PMA(100 μM, 10 μM, 1 μM, 0.16 μM, 0.1 μM)以 200 L/孔加入 24 孔板中,处理细胞不同时间(30 min, 2 h, 4 h, 6 h)后,乏氧培养 24 h。检测上清液里 VEGF 的浓度,分别计算各种培养方式每小时 VEGF 的分泌量进行比较。

1.2.4 联合诱导及其分泌稳定性检测 细胞接种到 24 孔板 24 h 后,用 1 μM PMA 处理细胞 2 h 后,乏氧培养,24 h 换液后常规培养。分不同时间点进行取样,检测上清液里 VEGF 的浓度并计算每小时 VEGF 的分泌量。

1.2.5 TKO/siRNA 纳米粒及壳聚糖/siRNA 纳米粒的制备与细胞转染 按照商品化转染试剂 TransIT-TKO 产品说明书操作,先将 TransIT-TKO 溶解在无血清培养液中,再加入 FAM-siRNA 或者 VEGF-siRNA 或者 N.C.siRNA 制备 TKO/siRNA 纳米粒。以 50 nM/孔的浓度加入含 10% FCS 的 1640 培养液与无血清培养液各 250 L/孔的 24 孔板中进行转染,常规培养 5 h。将壳聚糖溶解在 1% HAc 溶液中,用 NaOH 调节至 pH 5.5,制得终浓度为 10 mg/mL 的储存液。取溶解在去 RNA 酶水中的 20 μM 的 FAM-siRNA 或者 VEGF-siRNA 或者 N.C.siRNA 20 μL 在注射泵驱动的注射器中被匀速、缓慢地加入到下搅拌的壳聚糖溶液中(N/P=150),制备壳聚糖/siRNA 纳米粒。在无血清培养液中按 50 nM/孔的浓度进行转染,常规培养 5 h。

1.2.6 转染效果与细胞形态观察 细胞在铺有盖玻片的 24 孔板中生长爬片,再进行 TKO/FAM-siRNA 纳米粒和壳聚糖/FAM-siRNA 纳米粒转染,将盖玻片取出用 PBS(pH 7.4)冲洗 3 次后,倒置并用甘油固定在载玻片上,在 Leica SP2 激光共聚焦显微镜的油镜下观察。

1.2.7 细胞计数 细胞经 0.25% 胰蛋白酶 +0.02% EDTA(1:1)消化,吹打成单个细胞,细胞计数板计数。

1.2.8 细胞干扰 B16-F10 细胞以 4 × 10⁴ 个/mL 的浓度接种到 24 孔板 24 h 后,用 1 μM PMA 处理细胞 2 h 后常规培养 24 h,用 TKO/VEGF-siRNA 纳米粒和壳聚糖/VEGF-siRNA 纳米粒进行转染,以 TKO/N.C.siRNA 纳米粒和壳聚糖/N.C.siRNA 纳米粒同时进行转染作为对照。转染 5 h 后,用含 10% FCS 的 1640 培养液清洗 3 次,以 500 L/孔加入 10% FCS 的 1640 培养液,乏氧培养 48 h 进行 RNAi。以未经转染仅换液的细胞作为空白对照检测 VEGF 的原始分泌量。干扰过程收集不同实验条件下的培养上清液,应用小鼠 VEGF 酶联免疫试剂盒分别检测上清液里 VEGF 的浓度并计算每小时 VEGF 的分泌量,以百分率作图表示出 VEGF 在蛋白水平上被干扰的效果。

1.2.9 统计学分析 所有计量数据均以平均数 ± 标准差表示,组间比较采用方差分析。p-值 < 0.05 被认为有统计学差异。

2 结果

2.1 不同诱导方法的比较

B16-F10 细胞在含 10% FCS 的 1640 培养液中生长至 70% 融合,分别予以常规培养,PMA 处理,乏氧培养,PMA 处理后乏氧培养,收集细胞培养上清液,采用 ELISA 法对 VEGF 蛋白进行定量分析,比较的结果显示 PMA 刺激和乏氧诱导两种手

段均可以诱导细胞分泌 VEGF。与常规培养相比,细胞可增加 50%的 VEGF 水平。PMA 刺激再经乏氧诱导,稳定释放到培养液里的 VEGF 浓度大幅提高 200%,范围在 55-65 pg/mL/h (图 1)。

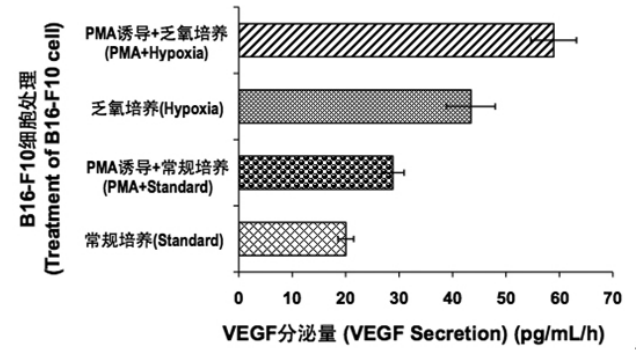


图 1 不同诱导方式与常规培养相比较对 B16-F10 细胞 VEGF 分泌量的影响

Fig. 1 The influence of different stimulation approaches on VEGF secretion in B16-F10 cells compared with conventional culture

2.2 PMA 诱导细胞表达 VEGF 蛋白的优化

B16-F10 细胞在含 10% FCS 的 1640 培养液中生长至 70% 融合, 分别给予 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 0.16 μ M, 0.1 μ M PMA 处理 30 min, 2 h, 4 h, 6 h, 收集细胞培养上清液, 采用 ELISA 法对 VEGF 蛋白进行定量分析, 结果显示: 1 μ M, 0.16 μ M, 0.1 μ M PMA 三种剂量的 PMA 均能明显诱导 VEGF 蛋白的表达, 以 1 μ M PMA 刺激 2 h 后 VEGF 蛋白表达增加最为显著, 并至少持续到 24 h (图 2)。

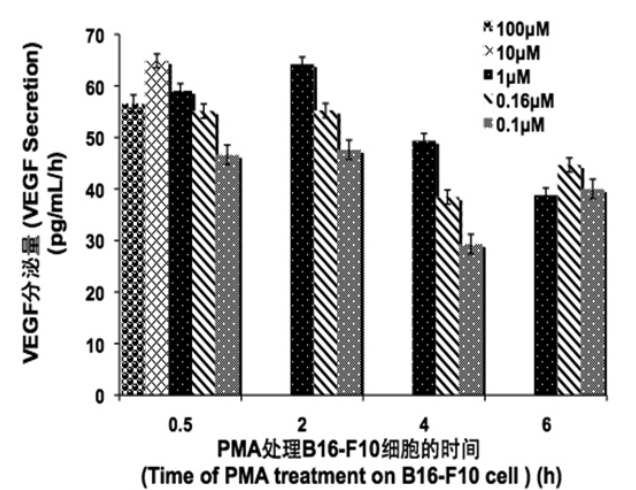


图 2 不同 PMA 浓度及处理时间对 B16-F10 细胞 VEGF 分泌量的影响

Fig. 2 The influence of PMA concentration and treatment time on VEGF secretion in B16-F10 cells

2.3 PMA 及乏氧诱导细胞 VEGF 分泌增加的时间效应

B16-F10 细胞在含 10% FCS 的 1640 培养液中生长至 70% 融合, 1 μ M PMA 处理 2 h 后, 乏氧培养 24 h 后换液, 进行常规培养收集细胞培养上清液, 采用 ELISA 法对 VEGF 蛋白进行定量分析, 结果显示: 经 PMA 刺激和乏氧诱导后, 细胞分泌

VEGF 的水平被上调到 55-65 pg/mL/h, 并可持续保持 48 h (图 3)。此 VEGF 稳定分泌的细胞平台将作为体外干扰模型使用。

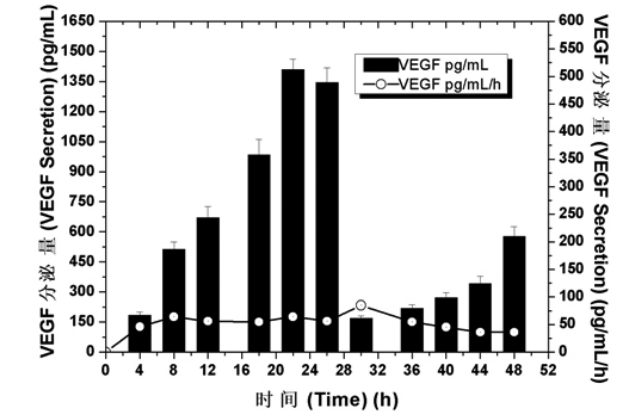


图 3 PMA 及乏氧诱导对细胞 VEGF 分泌量的影响

Fig. 3 The influence of PMA and hypoxia induction on VEGF secretion with time in B16-F10 cells

2.4 转染 FAM-siRNA 后 B16-F10 细胞的胞吞及细胞形态

在已建立的细胞平台上, 进行 TKO 和壳聚糖两种载体载 FAM-siRNA 的细胞转染, 通过激光共聚焦显微镜观察显示: 与对照相比, 转染的细胞形态良好, FAM-siRNA 被转染到细胞质中。细胞对照组由于没有载体保护, FAM-siRNA 被降解而荧光淬灭 (图 4)。

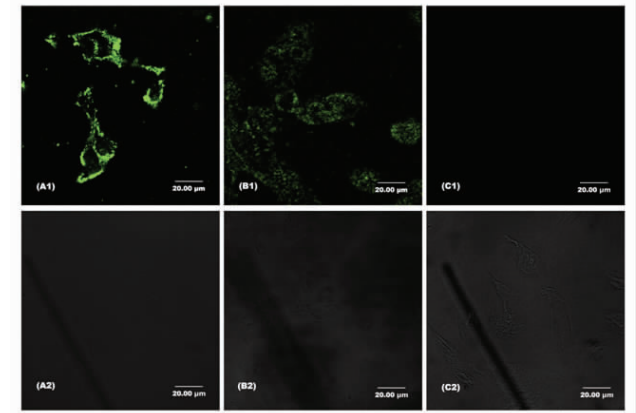


图 4 B16-F10 细胞经不同纳米粒转染后的激光共聚焦图谱: A1-C1: FAM 荧光标记的显微镜图像; A2-C2: 视差显微镜图像。 (A1) (A2) TKO/FAM-siRNA 纳米粒转染; (B1) (B2) 壳聚糖 /FAM-siRNA 纳米粒转染; (C1) (C2) 细胞对照

Fig. 4 Confocal microscopic images of B16-F10 cells transfected with different nanocarriers A1-C1: FAM labeled; A2-C2: Phase contrast. (A1) (A2) TKO/FAM-siRNA nanoparticles; (B1) (B2) CTS/FAM-siRNA nanoparticles; (C1) (C2) Cell control

2.5 转染 VEGF-siRNA 后 B16-F10 细胞 VEGF 表达的变化

在已建立的细胞平台上, 进行 TKO 和壳聚糖两种载体载 VEGF-siRNA 与 N.C.siRNA 的细胞转染, 转染后又持续培养至 48 h, 其结果显示: 与空白对照相比, 两种载体均能够实现对 VEGF 的干扰, 干扰效率分别是 46% 和 41% (图 5)。

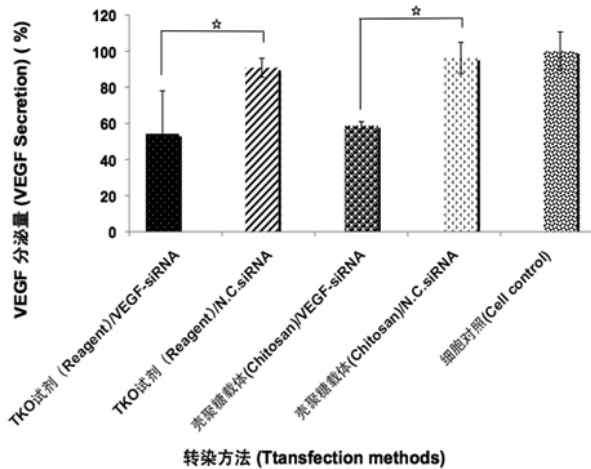


图5 RNA 干扰后 B16-F10 细胞中 VEGF 的沉默效果
(表示 p -值 < 0.05)

Fig. 5 The silencing efficiency of VEGF in B16-F10 cells after RNA interference with nanoparticles
(p -value < 0.05)

3 讨论

由于肿瘤血管形成是一个多因子多步骤的复杂生物学过程^[16]: (1) 肿瘤的各种成分释放多种血管生成因子; (2) 血管内皮细胞形态发生改变, 包括各种细胞器数目的增多, 体积增大及伪足的出现; (3) 内皮细胞和肿瘤细胞释放蛋白溶酶降解毛细血管基底膜和周围的细胞外基质, 细胞外基质重塑; (4) 内皮细胞从毛细血管后静脉迁徙出来形成血管胚芽; (5) 内皮细胞增殖; (6) 肿瘤微血管分化和成型。而 VEGF 作为一种内皮细胞的有丝分裂原和促血管形成因子, 直接特异地作用于血管内皮细胞, 引起内皮细胞的增殖, 在新生血管生成过程中起着“扳机”样作用。因此, VEGF 对于肿瘤引起的血管再生的调节最为重要, 它是快速增殖的癌症细胞生存所必需的, 也是肿瘤持续增长所必需的。

肿瘤细胞快速无限制性的增殖和血管生成及分布异常等因素带来肿瘤内部微循环异常, 导致很多实体瘤内部出现低氧及低 pH 值的新陈代谢微环境特点^[17]。因此, 缺氧不仅可使肿瘤细胞上调各种血管生长因子, 包括 VEGF^[18-20] 缺氧造成的进化选择也可使肿瘤细胞更具有侵袭性和转移性^[21]。尽管如此, 由于低氧抑制肿瘤细胞增殖^[17], 改变细胞原有的生长周期和生长状态, 把乏氧诱导的细胞作为 RNAi 的体外模型, 会影响后续的转染和干扰效果。因此, 在体外先采用促瘤剂促进肿瘤形成, 使肿瘤分泌 VEGF, 可以用于载体载 VEGF-siRNA 进行细胞转染, 再模拟肿瘤生长的低氧环境进一步上调 VEGF 表达量, 对于验证 RNAi 的效果非常有利。

采用佛波酯(PMA)处理细胞可上调 VEGF 的分泌^[22, 23], 它是一种丝裂原, 能促进细胞分裂, 具有强烈诱导细胞癌变的作用, 但其作用呈剂量和时间依赖性^[24, 25]。PMA 之所以能上调 VEGF, 需从信号通路入手分析原因 PKC 是一种磷脂依赖性丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 广泛参与细胞内生物信息传递, 离子通道调节, 细胞的增殖、分化和分泌等多种生物学过程, 是重要的细胞传导介质。短暂 PKC 活化与早期细胞反应如细胞因子分泌等有关, 而 PKC 持久的活化与调控细胞增殖、分化等有

关。PKC 激动剂 PMA 是一种促瘤剂, 能在体内至少激活 PKC 的 5 种同工型, 包括 cPKC(α , θ 和 γ)、PKC(δ 和 ϵ), 能明显上调 VEGF mRNA 的表达和 VEGF 蛋白的合成^[23, 26]。但过高剂量的 PMA(>10 M)导致大量 PKC 的活化, 使细胞内 PKC 的数量急剧下降, 影响细胞状态。因此, 在以后的研究中均采用 1 M 作为 PMA 诱导 VEGF 表达的工作浓度。经 PMA 刺激和乏氧诱导^[27]后, 细胞分泌 VEGF 的水平被上调到 55-65 pg/mL/h, 并可持续分泌 48 h。此 VEGF 稳定分泌的细胞平台可作为体外干扰模型使用。

RNA 干扰是胞中导入与内源性 mRNA 某段序列同源的 siRNA, 可致该 mRNA 发生特异性降解从而导致基因表达沉默的现象。目前, RNAi 已经成为研究基因功能的有力工具, 并有望在肿瘤基因治疗、遗传性疾病以及病毒性感染治疗等方面发挥重要作用。在选择合理的细胞模型的基础上, 应用 RNA 干扰技术的关键取决于靶序列的选择和载体系统的选择。本研究采用 Santa Cruz 设计的序列^[28, 29], 载体采用非病毒载体 TKO 和壳聚糖, 克服了 DNA 质粒法^[30, 31]和病毒载体装载量低, 存在免疫原性等缺点。但应该指出的是 我们所应用的载体存在着一定局限性, 如 TKO 载体虽已商品化, 但其稳定性差, 需要现用现制^[32], 还存在一定的细胞毒性^[33, 34]。壳聚糖载体虽然无细胞毒性, 但目前我们仅尝试了高脱乙酰度壳聚糖, 其降解后释放 siRNA 的能力有待改善^[8]。如果尝试低脱乙酰度的壳聚糖作为载体, 势必提高干扰的效果, 这也将是我们下一步工作的重点。

4 结论

本研究比较了 PMA 诱导, 乏氧培养, PMA 诱导后乏氧培养三种方法刺激 VEGF 分泌的效果, 对 PMA 诱导的剂量进行了优化, 并检测了 VEGF 分泌的稳定性和持续的时间。其结果清晰地揭示了: 用 1 M PMA 处理 B16-F10 细胞 2 h 后, 再进行乏氧培养能够明显上调 VEGF 的分泌量达 50-65 pg/mL/h, 并持续分泌 48 h, 从而构建了一种能持续、稳定分泌 VEGF 的细胞模型。接着, 我们通过 RNAi 技术初步验证了 PMA 及乏氧诱导 VEGF 上调后作为体外 RNA 干扰模型的可行性, TKO 和壳聚糖两种纳米载体载 siRNA 对 VEGF 的沉默效率均大于 40%。另外, 由于 B16-F10 细胞的成瘤性高, 便于与体内模型相关联。因此, 此体外细胞模型的建立, 为应用 RNAi 技术开展对肿瘤的基因治疗提供了保障, 也为体内的研究奠定了基础。

参考文献 (References)

- [1] 贾仁兵, 范先群. 血管内皮生长因子与实体瘤关系研究进展 [J]. 临床眼科杂志, 2003, 11(3): 284-287
Jia Ren-bing, Fan Xian-qun. Research progress of the correlations between VEGF and solid tumor [J]. Journal of Clinical Ophthalmology, 2003, 11(3): 284-287
- [2] Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target [J]. Nature, 2005, 438(7070): 967-974
- [3] Bhagat L, Putta MR, Wang DQ, et al. Novel oligonucleotides containing two 30-ends complementary to target mRNA show optimal gene-silencing activity [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2011, 54(8): 3027-3036
- [4] Bhisitkul RB, Robinson GS, Moulton RS, et al. An antisense oligodeoxynucleotide against vascular endothelial growth factor in a nonhuman primate model of iris neovascularization [J]. Archives of Ophthalmology, 2005, 123(2): 214-219
- [5] Gao Y, Mei J, Tong T, et al. Inhibitory effects of VEGF-siRNA medi-

- ated by adenovirus on osteosarcoma-bearing nude mice [J]. Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals, 2009, 24(2): 243-247
- [6] Häbel S, Koburger I, John M, et al. Polyethylenimine/small interfering RNA-mediated knockdown of vascular endothelial growth factor in vivo exerts anti-tumor effects synergistically with bevacizumab [J]. The Journal of Gene Medicine, 2010, 12(3): 287-300
- [7] McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs [J]. Nature Reviews Genetics, 2002, 3(10): 737-747
- [8] Liu XD, Howard KA, Dong MD, et al. The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing [J]. Biomaterials, 2007, 28(6): 1280-1288
- [9] Howard KA, Rahbek UL, Liu XD, et al. RNA interference in vitro and in vivo using a chitosan/siRNA nanoparticle system [J]. Molecular Therapy, 2006, 14(4): 476-484
- [10] Zhang H, Zhu SJ, Wang W, et al. Transplantation of microencapsulated genetically modified xenogeneic cells augments angiogenesis and improves heart function [J]. Gene Therapy, 2008, 15(1): 40-48
- [11] 唐浩, 陈勇, 夏昆, 等. VEGF165 在哺乳动物细胞中的稳定表达 [J]. 中国医师杂志, 2004, 6(7): 868-871
Tang Hao, Chen Yong, Xia Kun, et al. The stable expression of VEGF165 in mammalian cells [J]. Journal of Chinese Physician, 2004, 6(7): 868-871
- [12] 康楷, 李铁军, 胡丽娜, 等. RNA 干扰抑制结肠癌血管内皮生长因子的体内实验研究 [J]. 生物技术通报, 2007, 5: 136-140
Kang Kai, Li Tie-jun, Hu Li-na, et al. Inhibit VEGF expression of colon cancer by RNA interference in vivo [J]. Biotechnology Bulletin, 2007, 5: 136-140
- [13] 杨雪琴, 白晋, 于廷和, 等. B16 黑色素瘤血管生长因子的表达及其相关性研究 [J]. 中国现代医学, 2003, 13(23): 38-47
Yang Xue-qin, Bai Jin, Yu Ting-he, et al. Study of expression of vascular growth factors and their correlations in B16 melanoma [J]. China Journal of Modern Medicine, 2003, 13(23): 38-47
- [14] Teng HN, Zhang Y, Wang W, et al. Inhibition of tumor growth in mice by endostatin derived from abdominal transplanted encapsulated cells [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2007, 39 (4): 278-284
- [15] Was H, Cichon T, Smolarczyk R, et al. Overexpression of heme oxygenase-1 in murine melanoma increased proliferation and viability of tumor cells decreased survival of mice [J]. American Journal of Pathology, 2006, 169(6): 2181-2198
- [16] Stephen BF, Kevin CG, Adrian LH. Tumor angiogenesis [J]. Journal of Pathology, 1996, 179(3): 232-237
- [17] 陆萌, 吴苏稼, 施鑫. 实体瘤微环境的特点及治疗策略 [J]. 医学研究生学报, 2009, 22(1): 104-107
Lu Meng, Wu Su-jia, Shi Xin. The characteristics and treating strategy on the micro-environment of solid tumor [J]. Journal of Medical Postgraduate, 2009, 22(1): 104-107
- [18] Harris A. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth [J]. Nature Reviews Cancer, 2002, 2(1): 38-47
- [19] Enholm B, Paavonen K, Ristimäki A, et al. Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia [J]. Oncogene, 1997, 14 (20): 2475-2483
- [20] Wang B, Li WJ, Meng XJ, et al. Hypoxia up-regulates vascular endothelial growth factor in U-87 MG cells: involvement of TRPC1 [J]. Neuroscience Letters, 2009, 459(3): 132-136
- [21] Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression [J]. Nature, 2006, 441 (7092): 437-443
- [22] 胡可斌, 戴艳, 刘志红, 等. 内皮细胞表达血管内皮细胞生长因子的研究 [J]. 上海医学, 2004, 27(4): 253-256
Hu Ke-bing, Dai Yan, Liu Zhi-hong, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells: an in vitro study [J]. Shanghai Medical Journal, 2004, 27(4): 253-256
- [23] Young TA, Wang H, Munk S, et al. Vascular endothelial growth factor expression and secretion by retinal pigment epithelial cells in high glucose and hypoxia is protein kinase C-dependent [J]. Experimental Eye Research, 2005, 80(5): 651-662
- [24] Löffek S, Zigrino P, Steiger J, et al. Melanoma cell-derived vascular endothelial growth factor induces endothelial tubulogenesis within fibrin gels by a metalloproteinase-mediated mechanism [J]. European Journal of Cell Biology, 2006, 85(11): 1167-1177
- [25] Grau R, Iniguez MA, Fresno M. Inhibition of activator protein 1 activation, vascular endothelial growth factor, and cyclooxygenase-2 expression by 15-deoxy- δ 12, 14-prostaglandin J2 in colon carcinoma cells: evidence for a redox-sensitive peroxisome proliferator-activated receptor- γ -independent mechanism [J]. Cancer Research, 2004, 64 (15): 5162-5171
- [26] Hossain MA, Bouton CML, Pevsner J, et al. Induction of vascular endothelial growth factor in human astrocytes by lead [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(36): 27874-27882
- [27] 唐鹏, 郭桥楠, 姜军. 肿瘤组织缺氧诱导 VEGF 表达的分子机制 [J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(1): 157-158
Tang Peng, Guo Qiao-nan, Jiang Jun. Mechanism of tumor hypoxia inducing VEGF expression [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2007, 7(1): 157-158
- [28] Chen YC, Zhu XD, Zhang XJ, et al. Nanoparticles modified with tumor-targeting scFv deliver siRNA and miRNA for cancer therapy [J]. Molecular Therapy, 2010, 18(9): 1650-1656
- [29] Reich SJ, Fosnot J, Kuroki A, et al. Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model [J]. Molecular Vision, 2003, 9(31-32): 210-216
- [30] 马岚青, 郭永章, 张洪斌, 等. RNA 干扰对小鼠结肠癌细胞 VEGF 表达及细胞增殖的影响 [J]. 山东大学学报(医学版), 2010, 48(11): 63-69
Ma Lan-qing, Guo Yong-zhang, Zhang Hong-bin, et al. Inhibitory effect of short interfering RNA-mediated gene silencing on expression of VEGF and cell proliferation in murine colon carcinoma cells [J]. Journal of Shandong University (Health sciences), 2010, 48 (11): 63-69
- [31] 王继, 李星蓉, 左丹, 等. RNA 干扰对 HeLa 细胞 VEGF 表达和细胞增殖的影响 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2009, 35(6): 996-1001
Wang Ji, Li Xing-rong, Zuo Dan, et al. Effects of siRNA on VEGF expression and cell proliferation of HeLa cells [J]. Journal of Jilin University (Medicine Edition), 2009, 35(6): 996-1001
- [32] Fougerolles ARD. Delivery vehicles for small interfering RNA in vivo [J]. Human Gene Therapy, 2008, 19(2): 125-132
- [33] Morrey ME, Anderson PA, Chambers G, et al. Optimizing nonviral-mediated transfection of human intervertebral disc chondrocytes [J]. The Spine Journal, 2008, 8(5): 796-803
- [34] Nakamura Y, Kogure K, Futaki S, et al. Octaarginine-modified multifunctional envelope-type nano device for siRNA [J]. Journal of Controlled Release, 2007, 119(3): 360-367