

人血管内皮生长因子 165 慢病毒载体的构建及其抗放射所致细胞凋亡的作用

赵仲艳, 韦映梅, 黎祥喷, 吕瑞妍, 肖颂华, 刘中霖, 邢诒刚, 刘 军*
(中山大学孙逸仙纪念医院神经科老年神经变性专科, 广东 广州 510120)

摘 要:【目的】构建人血管内皮生长因子 165(hVEGF₁₆₅)慢病毒表达载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-hVEGF₁₆₅, 并转染至 HT22 细胞, 并进一步观察其对放射线损伤所致的细胞凋亡的保护作用。【方法】PCR 扩增 hVEGF₁₆₅ 基因, 克隆到 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 载体; 通过酶切电泳, 菌落 PCR 初步筛选和测序鉴定构建的 pCDH-CMV-MCS-EF1-GFP1-hVEGF₁₆₅ 重组载体; 采用磷酸钙共转染法转染 293T 细胞包装制备慢病毒液, 并感染 HT22 细胞, 采用实时 RT-PCR 及 Western Blot 检测 hVEGF₁₆₅ 基因在 HT22 细胞中的表达情况。进一步对单纯 HT22 细胞、空质粒转染组以及 hVEGF₁₆₅ 转染组 HT22 细胞进行 0、5、10 Gy 的 X 线照射, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况。【结果】hVEGF₁₆₅ 基因片段重组到 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 载体, 酶切后电泳结果显示均能得到与理论大小相符的片段, 测序结果与 GenBank 序列完全一致, 转染 HT22 后 hVEGF mRNA 及蛋白表达水平明显增高。而且同各对照组相比, hVEGF₁₆₅ 可以降低细胞放疗后的凋亡率。【结论】pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-hVEGF₁₆₅ 慢病毒表达载体构建成功, 其转染 HT22 细胞后可获得高水平 hVEGF₁₆₅ mRNA 和蛋白的表达, hVEGF₁₆₅ 具有抗放射所致细胞凋亡的作用。

关键词: 人血管内皮细胞生长因子; 慢病毒; 载体构建; HT22 细胞; 放射治疗

中图分类号: R747.9 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2011)05-0576-06

Construction of Lentivirus Vector of hVEGF₁₆₅ Gene and Its Protective Function of Irradiation-induced Apoptosis

ZHAO Zhong-yan, WEI Ying-mei, LI Xiang-pen, LÜ Rui-yan, XIAO Song-hua, LIU Zhong-lin,
XING Yi-gang, LIU Jun*

(Department of Neurology, Sun Yat-sen Memorial Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To construct human vascular endothelial growth factor-165 (hVEGF₁₆₅) gene lentivirus expression vector pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-hVEGF₁₆₅, and detect its expression after transfected into HT22 cells and further observe its effect of anti-apoptosis induced by irradiation. 【Methods】hVEGF₁₆₅ gene cDNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into the pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP vector. Reconstructed pCDH-CMV-MCS-EF1-hVEGF₁₆₅ plasmid was identified by electromigratory analysis, colony PCR, and sequencing analysis. 293T cells were transfected with recombinant vector using the way of calcium phosphate cotransfection to get lentiviral particles. Lentiviral particles were then transfected into HT22 cells. Real-time RT-PCR and Western blot were used to detect the expression of VEGF₁₆₅ gene in HT22 cells. Furthermore, 0 Gy, 5 Gy, and 10 Gy X-ray irradiation were given to HT22 cells, empty vector transfected HT22 cells and hVEGF₁₆₅ gene transfected HT22 cells, respectively. Flow cytometry was then used to compare different rates of apoptosis. 【Results】hVEGF₁₆₅ gene fragment was constructed into the pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP vector successfully. Enzyme digestion got correct length of hVEGF₁₆₅ gene, DNA sequencing analysis

收稿日期: 2011-03-30

基金项目: 国家自然科学基金(30870750)

作者简介: 赵仲艳, 硕士研究生, E-mail: zzyzhongyanzhao@163.com; * 通信作者: 刘军, 副教授, E-mail: docliujun@hotmail.com

confirmed that hVEGF165 gene sequence was exactly the same with that reported by GenBank. There were significant increased expression of hVEGF165 mRNA and protein in the HT22 cells after transfected. Compared with the control group, hVEGF₁₆₅ could reduce apoptotic rate after cell radiation. 【Conclusions】 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-hVEGF₁₆₅ lentivirus vector has been successfully constructed. High level of hVEGF₁₆₅ mRNA and protein expression could be obtained in HT22 cells after transfected with pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-hVEGF₁₆₅. hVEGF₁₆₅ gene can protect the cells from irradiation induced apoptosis.

Key words: human vascular endothelial growth factor165; lentivirus vector; vector construction; HT22 cells; radiotherapy

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(5):576-581]

目前,放射性治疗已成为大多数颅脑肿瘤首选的治疗手段^[1-2]。广东省位居世界鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)高发地区之首,其总的发病率约为20/10万,放射治疗是鼻咽癌的最主要治疗手段。随着病人生存率的逐渐改善,越来越多的放疗后并发症的出现也已逐渐引起人们的注意,放射线会对正常脑组织产生一定的杀伤作用,造成不可逆的脑损伤,极大地降低患者的生活质量,因此研究放射性脑损伤越来越受到人们的重视。血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)家族成员, VEGF是辐射后血管增殖的重要调节因子,在体研究显示VEGF具有抗辐射的功能,还有研究表明VEGF可以直接作用于神经元,对包括干细胞在内的神经细胞具有保护作用。因此我们设想VEGF是否可减轻射线对神经元的损伤,降低辐射损伤效应。为此,本实验构建了hVEGF₁₆₅慢病毒表达载体,并在293T细胞中包装病毒颗粒,转染至HT22细胞^[3](一种永生化的海马神经元细胞系),建立一种新型的hVEGF₁₆₅体外模型,并初步研究hVEGF对放射线所致的细胞凋亡的抑制作用,为进一步研究hVEGF抗辐射机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

HT22细胞株由本实验室保存。限制性内切酶EcoR1、BamH1, T4 DNA连接酶购自NEB公司,高保真PCR酶(PfuUltra™ II Fusion HS DNA Polymerase)购自Stratagene公司, Moloney Murine Leukemia Virus(MMLV)逆转录酶购自Promega公司,琼脂糖凝胶回收试剂盒(TIANgel Mini

Purification Kit)购自TIANGEN公司,兔抗人hVEGF₁₆₅购自ABCAM公司,慢病毒载体pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP购自System Biosciences(SBI)公司,质粒提取盒购自Axygen公司,DMEM培养基、胎牛血清、2.5%胰酶购自GIBCO公司。仪器包括德国西门子Primus H直线加速器、美国BD公司FACSCalibur流式细胞仪,实时PCR仪采用Bio-Rad CFX96™ real-time系统。

1.2 PCR扩增hVEGF165基因

根据GenBank收录的hVEGF₁₆₅序列(序列号:486837),利用引物设计软件Primer Premier设计引物,并分别在每条引物的5'端添加相应的限制性酶切位点,上游引物序列为:5'-GCCGAAATTCATGAACCTTTCTGCTGTCTTG-3,(下划线处为EcoR1位点);下游引物序列为:5'-GCCGGATCCTCACCGCCTCGGCTTGTCAC-3'(下划线处为BamH1位点),提交序列到上海英骏生物技术有限公司合成。以hVEGF165基因为模板进行PCR,反应条件为:95℃预变性3min,95℃变性15s,55℃退火30s,72℃延伸1min,30个循环,72℃延伸7min后4℃1min终止反应。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3 重组慢病毒载体的构建及克隆鉴定

PCR产物凝胶电泳,按照凝胶回收试剂盒说明回收hVEGF₁₆₅片段。用EcoR1和BamH1分别对空载体pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP和PCR的回收产物进行双酶切,反应条件:37℃,1h。回收酶切产物,将酶切载体和目的基因片段采用T4 DNA连接酶进行连接反应,20℃,3h。连接产物转化DH5a感受态大肠杆菌,取菌液100μL均匀涂布于含有氨苄青霉素的LB平板,37℃培养过夜。转化后挑取单菌落,使用上述针对目的基因hVEGF₁₆₅的引物进行PCR扩增,产物进行1.5%琼

脂糖凝胶电泳,判断阳性克隆菌落。阳性菌落 PCR 产物酶切鉴定之后送上海英骏生物技术有限公司测序,测序结果与 GenBank 中的 hVEGF₁₆₅ 序列进行比对。

1.4 转染 293T 细胞及病毒液收集

采用磷酸钙共沉淀法将 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 空质粒或重组 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-hVEGF 质粒各 20 μg , CaCl₂ 30 μL , 慢病毒包装质粒 pSPAX2 5 μg 和 pMD2.G 15 μg , 加水混合至总量 100 μL , 室温下静置 30 min。之后将混合液加入生长良好、细胞融合度达 80% 以上的单层 293T 细胞中。用无血清高糖 DMEM 培养基在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO₂ 条件下培养, 6 h 后, PBS 洗去磷酸钙颗粒, 加入含体积分数 10% 血清的 DMEM 培养基继续培养。分别于培养 12、24、36 及 48 h 后荧光显微镜下检测培养液的荧光强度, 待达到一定亮度时, 回收 293T 细胞的上清培养液, 用 0.45 μm 滤过滤器过滤后, 过滤后上清培养液含有大量的慢病毒颗粒, 即是病毒液。高速离心对病毒液做进一步的浓缩, 得到空白对照病毒液以及含 hVEGF 基因的病毒液。

1.5 转染 HT22 细胞

将 HT22 细胞分为 Vector 组 (pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 空质粒转染组) 和 hVEGF165 组 (pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-hVEGF 质粒转染组)。HT22 细胞以每孔 2×10^4 接种于 24 孔培养板中, HT22 细胞培养参照文献^[3-4]。每孔加入相应的病毒液 200 μL , 并加入 polybrene (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。感染 36 h 后换成不含有病毒的新鲜培养基, 继续培养 36 h 后在荧光显微镜下观察 GFP 细胞的阳性比例, 即病毒感染效率, 收集细胞待测。

1.6 稳定细胞系的鉴定

1.6.1 实时聚合酶链反应 (real time RT-PCR)

设计合成 hVEGF165 及 GAPDH RT-PCR 检测引物, hVEGF165 上游引物: 5'-CTACCTCCACCATGCCAAGT-3', 下游引物: 5'-AGCTGCGCTGATACACATCC-3'; GAPDH 上游引物: 5'-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA-3', 下游引物: 5'-AATGAAGGGTCATTGATGG-3'。收集各组待测样品, 提取细胞总 RNA, 用电泳及紫外分光光度计鉴定其纯度, 使

用 MMLV 反转录后进行实时 PCR 扩增, 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共反应 39 个循环, 双标准曲线法计算相对定量值。

1.6.2 Western blotting 鉴定 刮取细胞, PBS 洗 3 次后加入细胞裂解液进行裂解, 离心弃细胞碎片, 从上清液中提取并收集纯化蛋白质, 用 BCA 法测定蛋白浓度。每组各取 40 μg 蛋白液, 行 9% SDS-Page 凝胶电泳, 转膜, 加入兔抗人 hVEGF 多克隆抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 加入辣根过氧化物酶标记的兔抗 IgG, 室温孵育 1 h 后行化学发光显示结果, 观察目的蛋白的表达情况。

1.7 细胞照射后流式细胞仪测定细胞凋亡

单纯 HT22 细胞, Vector 组和 hVEGF₁₆₅ 组 HT22 细胞分别用胰酶消化后按照 5×10^4 密度种植在 6 孔板内。各孔加入 2 mL 的细胞分化培养基^[3-4]。分化 24 h 后将孔内的分化液吸出, PBS 洗 1 次, 加入高度为 1 cm 的完全培养基放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 条件下培养。1 h 后用使用直线加速器进行 X-ray 射线照射, 照射剂量依次为 0、5、10 Gy。照射后将培养基部分吸出, 每孔大约留 2 ~ 3 mL。放入培养箱内继续培养, 24 h 后送流式检测各组细胞凋亡情况。

2 结 果

2.1 hVEGF₁₆₅ 基因的扩增

以 hVEGF₁₆₅ 基因为模版, 用特异性引物 PCR 扩增 hVEGF₁₆₅ 基因, 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后可见 580 bp 左右的特异条带, 与 GenBank 上收录的 hVEGF₁₆₅ 大小一致 (图 1)。

2.2 hVEGF₁₆₅ 重组慢病毒表达载体的构建及鉴定

连接产物转化 DH5a 感受态细菌, 涂布氨苄青霉素抗性 LB 平板培养后, 可见单克隆菌落生成。挑取 9 个单克隆菌落, 用 hVEGF₁₆₅ 特异引物进行菌落 PCR 并进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示挑取的 9 个克隆菌落中有 7 个克隆有 580 bp 的特异条带。挑取阳性克隆送测序, 测序结果显示: hVEGF₁₆₅ 基因序列与 GenBank 中序列一致, 无缺

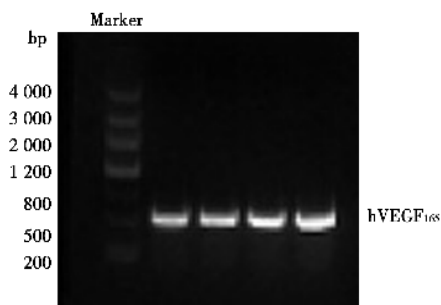


图 1 hVEGF₁₆₅ 基因的 PCR 产物电泳结果

Fig.1 PCR products of hVEGF₁₆₅ gene

失或突变。表明:pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-hVEGF₁₆₅慢病毒表达载体构建成功。

2.3 重组慢病毒 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-hVEGF₁₆₅ 的包装

转染 293T 细胞 36 h 后,倒置荧光显微镜观察培养细胞可见大量的绿色荧光蛋白的表达(图 2),由图可见转染效率将近 100%。收集并浓缩病毒液,得到含有 VEGF₁₆₅ 基因的病毒液及空白对照病毒液。

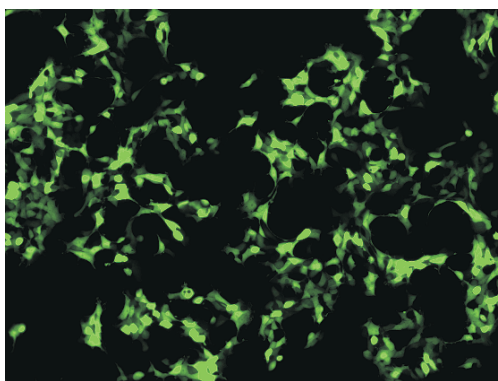


图 2 慢病毒转染后 293T 细胞中 GFP 表达($\times 100$)

Fig.2 GFP expression in 293T cells after transfected by lentivirus vector($\times 100$)

2.4 hVEGF₁₆₅ 在 HT22 细胞中的表达

分别用空质粒或含有 hVEGF₁₆₅ 基因的病毒液感染 HT22 细胞,72 h 后在荧光显微镜下观察 GFP 细胞的阳性比例,即感染效率,可见无论是 hVEGF₁₆₅ 病毒液还是空白对照病毒液的细胞感染率都在 90% 以上(图 3)。RT-PCR 检测 hVEGF₁₆₅ 的表达较 Vector 组及单纯 HT22 细胞组显著增加($P < 0.05$)。Western blotting 蛋白质分析示:hVEGF₁₆₅ 转染组较 Vector 组及单纯 HT22 细胞组,蛋白表

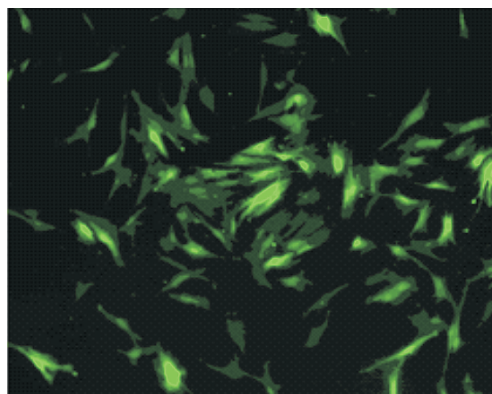


图 3 hVEGF₁₆₅ 重组慢病毒载体转染 HT22 细胞($\times 100$)

Fig.3 hVEGF₁₆₅ recombinant lentivirus transfected into HT22 cells($\times 100$)

达显著增加(图 4)。

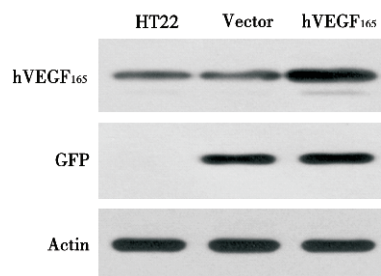


图 4 Western Blot 检测 HT22 细胞转染重组慢病毒载体后 hVEGF₁₆₅ 蛋白表达

Fig.4 Western blot of hVEGF₁₆₅ protein in HT22 cells after recombinant lentivirus transfected

2.5 hVEGF₁₆₅ 抗放射线所致的细胞凋亡作用

不同组 HT22 细胞经 X-ray 照射后结果显示,各组细胞在 0、5、10 Gy 放射剂量的照射下,随着放射剂量的增大,细胞凋亡率逐渐增高,但是单纯 HT22 细胞组和 Vector 组 HT22 细胞之间比较差异无显著性。而 hVEGF₁₆₅ 组 HT22 细胞尽管其凋亡率亦随着照射剂量的增大而增高,但是同其它两组相比较,其凋亡率则明显减低,差异具有统计学意义(图 5)。

3 讨论

放射治疗是多种颅脑肿瘤首选的治疗方式,病人接受放疗后其颅内肿瘤虽得以控制但却会出现严重的神经认知功能缺损,破坏了学习及记忆能力,这主要是由于对各种损伤较为敏感的颞叶

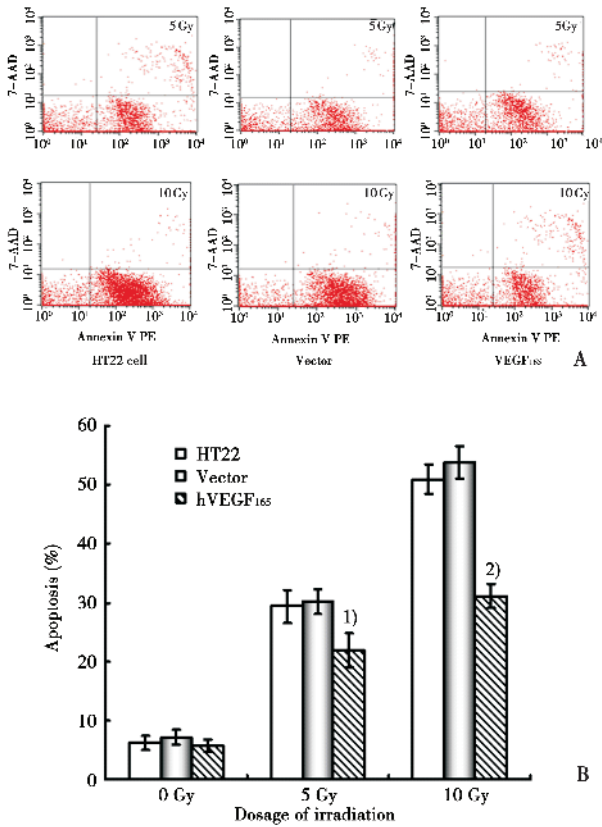


图 5 流式细胞仪检测 HT22 细胞在不同剂量照射下凋亡率的变化

Fig.5 Apoptosis of HT22 cell after different dose irradiation

A: Apoptosis after different dose irradiation by flow cytometry; B: Apoptosis after different dose irradiation in histogram, 1) P < 0.05, 2) P < 0.01

海马区的功能降低所致。尤其是鼻咽癌患者在接受放疗时, 双侧颞叶亦不可避免地受到照射, 其放疗后认知功能障碍的损害亦更为突出[5-6]。寻找行之有效的预防和治疗放射性神经损伤的手段已越来越受到学者们的重视。放射导致神经认知功能的损害的发病机制是复杂的, 包括影响神经前体细胞, 抑制海马区神经元的再生[7], 以及相关细胞炎性因子, 如肿瘤坏死因子的变化等[8]。其中血管壁细胞的破坏, 进一步导致局部糖代谢的降低在放疗后神经损伤中的地位越来越受到人们的重视 [9]。

血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 又称血管通透性因子 (vascular permeability factor) 或促血管因子 (vasculotropin), 是血小板源性生长因子 (platelet

derived growth factor, PDGF) 家族成员。于 1989 年被正式克隆确认, 是体内一种强效促血管生成因子, 能直接作用于血管内皮细胞促进血管内皮细胞的增殖, 直接或间接参与血管生成, 增强血管通透性[10]。目前已发现的 VEGF 家族包括 7 个成员, 即 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、VEGF-F 和胎盘生长因子 (placenta growth factor, PlGF)[11]。其中 VEGF-A 发现最早, 在组织和细胞中含量最丰富, 功能也最强, 其前体 mRNA 经过不同的剪切可以产生 7 个不同的亚型, 分别是 VEGF₁₂₁、VEGF₁₄₅、VEGF₁₄₈、VEGF₁₆₅、VEGF₁₈₃、VEGF₁₈₉ 和 VEGF₂₀₆, 其中 VEGF₁₆₅ 在组织分布最为广泛, 功能最强, 是其发挥生物学效应的主要形式[11]。VEGF 在神经系统疾病中的作用, 以往认为对胚胎神经系统的发育、恶性肿瘤浸润性生长起到重要作用[12]。

VEGF 是放射后血管增殖的重要调节因子, 它在促进血管内皮细胞增殖及促使受辐射的组织形成新生血管中起到重要作用。但近年来的研究表明, VEGF 除了能够促进新生血管的形成外, 对神经元亦具有直接的神经营养和保护作用, 并可促进神经突触延伸, 具有神经新生作用, 例如 VEGF 可以保护大脑神经元和 HN33 细胞 (小鼠海马神经元) 免于缺氧诱导的死亡[13]。更重要的是 VEGF 具有抗神经细胞和神经前体细胞的凋亡作用[14]。体内研究表明, VEGF 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 具有协同作用, 使得内皮细胞免于凋亡, 抑制 VEGF 受体可增加辐射对微血管的破坏, 表明 VEGF 对内皮细胞具有辐射防护作用, 增加机体对辐射的抗性[15]。Kato 等[16]对受 γ 射线照射的 CMK86 细胞系和多能造血干细胞通过克隆形成分析发现, VEGF 能抑制辐射所导致的细胞凋亡, 其抑制凋亡的能力与细胞周期的分布无关, 也没有发现 VEGF 的丝裂原活性, 表明 VEGF 可能是使细胞在辐射下免于凋亡而存活的重要因素, 同时也可能使一些肿瘤细胞以自分泌和旁分泌 VEGF 增加其辐射抗性。但 VEGF 究竟是通过何种机制发挥其抗辐射作用至今仍不清楚。

本实验成功构建了 hVEGF₁₆₅ 的慢病毒表达载体, 用其转染海马神经元 HT22 细胞后, 并证实

VEGF mRNA 和蛋白可以在 HT22 细胞中大量表达,从而为下一步研究 VEGF 的抗辐射机制提供了一种新型的体外工具模型。更进一步的是我们通过对单纯 HT22 细胞,空质粒转染后 HT22 细胞以及含 hVEGF₁₆₅ 基因质粒转染后 HT22 细胞进行不同剂量的照射,通过流式细胞检测其细胞凋亡情况,研究结果表明在使用不同的照射剂量的情况下,hVEGF₁₆₅ 可以较为有效的阻止细胞放疗后的凋亡,初步证实了我们的设想。

综上所述,本研究的意义在于在国内第一次构建了 hVEGF₁₆₅ 的慢病毒表达载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-hVEGF₁₆₅,并将其转染至特殊的海马神经元细胞 HT22 细胞中,从而在体外建立了一种合适的探讨放疗后认知功能障碍的细胞模型。通过进一步的研究,初步证实了 hVEGF₁₆₅ 抗辐射后细胞凋亡的作用。但是 hVEGF₁₆₅ 究竟是通过何种机制发挥其神经保护作用,仍有待于我们进一步的探讨。

参考文献:

- [1] Tsao MN, Lloyd NS, Wong RK, et al. Radiotherapeutic management of brain metastases: a systematic review and meta-analysis[J]. *Cancer Treat Rev*, 2005, 31(4): 256-273.
- [2] Kantor G, Laprie A, Huchet A, et al. Radiation therapy for glial tumors: technical aspects and clinical indications [J]. *Cancer Radiother*, 2008, 12(6-7): 687-694.
- [3] Liu J, Li L, Suo WZ. HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties [J]. *Life Sci*, 2009, 84(9-10): 267-271.
- [4] Liu J, Rasul I, Sun Y, et al. GRK5 deficiency leads to reduced hippocampal acetylcholine level via impaired presynaptic M2/M4 autoreceptor desensitization [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(29): 19564-19571.
- [5] Welzel G, Fleckenstein K, Mai SK, et al. Acute neurocognitive impairment during cranial radiation therapy in patients with intracranial tumors [J]. *Strahlenther Onkol*, 2008, 184(12): 647-654.
- [6] Liu Y, Xiao S, Liu J, et al. An experimental study of acute radiation-induced cognitive dysfunction in a young rat model [J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2010, 31(2): 383-387.
- [7] Madsen TM, Kristjansen PE, Bolwig TG, et al. Arrested neuronal proliferation and impaired hippocampal function following fractionated irradiation in the adult rat [J]. *Neuroscience*, 2003, 119(3): 635-642.
- [8] Chiang CS, McBride WH. Radiation enhances tumor necrosis factor alpha production by murine brain cell [J]. *Brain Res*, 1991(1-2): 265-269.
- [9] Stone HB, Coleman CN, Anscher MS, et al. Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms [J]. *Lancet Oncol*, 2003, 4(9): 529-536.
- [10] Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen [J]. *Science*, 1989, 246(4935): 1306-1309.
- [11] Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease [J]. *Nat Med*, 2003, 9(6): 653-660.
- [12] 刘宜敏,薛卫平,白守民,等.鼻咽癌组织中 VEGF 表达及 MVD 的临床意义 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2004, 25(3S): 69-70.
- [13] Jin KL, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor rescues HN33 neural cells from death induced by serum withdrawal [J]. *Mol neurosci*, 2000, 14(3): 197-203.
- [14] Yasuhara T, Shingo T, Kobayashi K, et al. Neuroprotective effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) upon dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease [J]. *Eur J Neurosci*, 2004, 19(6): 1494-1504.
- [15] 华平,陈炬,张惠忠,等.腺病毒介导血管内皮细胞生长因子基因体外转染骨髓间充质干细胞 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2007, 28(1): 69-70.
- [16] Katoh O, Tauchi H, Kawaiishi K, et al. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(23): 5687-5692.

(编辑 刘清海)