

·实验研究 Experimental research·

微小核糖核酸-205 靶向调控血管内皮生长因子-A 对肝癌细胞的影响

曹磊, 谢坪, 顾露, 周石

【摘要】 目的 探讨微小核糖核酸(miR)-205 在肝细胞癌(HCC)中的作用及其与肝癌进展的关系,以及 miR-205 是否通过靶向血管内皮细胞生长因子(VEGF)-A 影响肝癌细胞增殖。方法 采用逆转录-定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测 miR-205 在 HCC、相邻正常肝组织和肝癌细胞株 HepG2、HuH-7、SMMC-7721、BEL-7402、人正常肝细胞株 L02 中的表达。RT-qPCR 检测转染 miR-205 激动剂和空白对照的 HepG2 和 HuH-7 细胞中 miR-205 表达。Transwell 和溴化噻唑蓝四氮唑(MTT)法检测转染后肝癌细胞增殖、迁移和侵袭。双荧光素酶报告基因检测 VEGF-A 是否为 miR-205 直接作用靶标。VEGF-A siRNA 敲低分析 VEGF-A 表达是否为 miR-205 调控 HCC 细胞增殖、迁移和侵袭的关键介质。结果 miR-205 在 HCC 组织和肝癌细胞株中表达下调。miR-205 过表达可抑制肝癌细胞增殖、迁移和侵袭。VEGF-A 是 HCC 中 miR-205 直接作用靶标,miR-205 通过靶向 VEGF-A 抑制肝癌细胞增殖、迁移和侵袭。结论 miR-205 可通过下调 VEGF-A 表达抑制 HCC 生长、迁移和侵袭,这可能是未来 HCC 治疗的潜在靶点。

【关键词】 肝细胞癌;微小核糖核酸-205;血管内皮细胞生长因子-A;转移

中图分类号:R735.7 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2020)-05-0483-06

The inhibition effect of microRNA-205 on hepatocellular carcinoma cells through targeting regulation of the vascular endothelial growth factor-A CAO Lei, XIE Ping, GU Lu, ZHOU Shi. Department of Radiology, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan Province 610072, China

Corresponding author: XIE Ping, E-mail: haoyanx@163.com

【Abstract】 Objective To explore of the inhibition effect of mirRNA-205(miR-205) on hepatocellular carcinoma(HCC), to analyze the relationship between miR-205 and HCC progression, and to clarify whether the inhibition effect of miR-205 on HCC is achieved by targeting regulation of vascular endothelial growth factor-A(VEGF-A). **Methods** Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction(RT-qPCR) was used to detect the expressions of miR-205 in HCC, adjacent normal liver tissues, hepatocellular carcinoma cell lines of HepG2, HuH-7, SMMC-7721, BEL-7402, and human normal liver cell line L02. RT-qPCR was adopted to test the expressions of miR-205 in HepG2 and HuH-7 cells transfected with miR-205 agonist and blank control. Transwell and MTT methods were employed to test the proliferation, migration and invasion of HCC cells after transfection. Luciferase assay system was adopted to determine whether VEGF-A was a direct target of miR-205. VEGF-A siRNA knock down analysis was conducted to clarify whether the expression of VEGF-A was a key mediator in regulating the proliferation, migration and invasion of HCC cells. **Results** The expression of miR-205 was down-regulated in both HCC tissues and HCC cell lines. The over-expression of miR-205 could inhibit the proliferation, migration and invasion of HCC cells. VEGF-A was a direct target of miR-205 in HCC. By down-regulating the expression of VEGF-A, miR-205 exerted its inhibition effect on the proliferation, migration and invasion of HCC cells. **Conclusion** Through down-regulating the expression of VEGF-A, miR-205 achieves its inhibition effect on the proliferation, migration

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2020.05.014

基金项目:贵州省普通高等学校医学影像工程研究中心项目(黔教合 KY2016012)、贵州医科大学医学影像工程研究中心项目(2016001)

作者单位:610072 成都 四川省人民医院放射科(曹磊、谢坪、顾露);贵州医科大学附属医院介入科(周石)
通信作者:谢坪 E-mail: haoyanx@163.com

and invasion of HCC cells, which may be a potential target for the treatment of HCC in the future. (J Intervent Radiol, 2020, 29: 483-488)

【Key words】 hepatocellular carcinoma; microRNA-205; vascular endothelial growth factor-A; metastasis

近年肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)诊断和综合介入治疗取得了一定进展,但晚期患者预后仍欠佳^[1-2],伴发肝内或肝外转移患者5年生存率<5%^[3],因此迫切需要阐明其发生发展过程中的分子机制,提高诊断效率,更新治疗策略。微小核糖核酸(microRNA, miRNA, miR)是一类新的非编码内源性小RNA分子,长度为19~25个核苷酸,通过与3'非翻译区(UTR)相互作用在转录后水平负调节靶信使RNA(mRNA)蛋白产生^[4]。miRNA参与细胞分化、增殖、血管生成、代谢、凋亡和转移^[5]。累积证据表明miRNA和靶mRNA表达水平失调可能导致人类恶性肿瘤发生发展,HCC也在其中^[6-8]。以往研究表明miRNA异常表达与HCC发生发展、转移和复发有关^[9-10]。本研究旨在探讨miR-205在肝癌细胞株中表达水平及对肝癌细胞增殖和转移的影响,miR-205是否通过靶向血管内皮细胞生长因子(VEGF)-A对肝癌细胞增殖产生影响,从而为HCC预防和治疗提供一新的候选靶标。

1 材料与方法

1.1 实验标本

搜集2014年8月至2016年12月在四川省人民医院接受外科手术切除且术前未经任何抗肿瘤治疗的32例患者肝癌组织和相邻正常肝组织作为实验标本。其中男19例,女23例,平均年龄62(46~74)岁,病理结果均提示为HCC。本研究所有组织学样本均由医院病理科提供并储存于-80℃超低温冰箱。所有提供标本患者均签署书面知情同意书,实验获得医院伦理委员会批准。

1.2 细胞培养

人肝癌细胞株为HepG2、HuH-7、SMMC-7721、BEL-7402,人正常肝细胞株为L02[美国菌种保藏中心(ATCC)],均置于37℃、5%CO₂和95%空气加湿孵化器中,在含10%胎牛血清(FBS,美国Gibco公司)并加入100 U/mL青霉素(美国Sigma-Aldrich公司)和0.1 mg/mL链霉素(德国Merck KGaA公司)的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM,美国Gibco公司、美国Thermo Fisher科技公司)中培养。

1.3 逆转录-定量聚合酶链反应检测

miR-205模拟序列为5'-UCCUUCAUUCCAC-

CGGAGUCUG-3',阴性对照(NC)序列为5'-UUCU-CCGAACGUGUCACGUTT-3'。VEGF-A小干扰(si)序列:正向5'-GGCAGAAUCAUCACGAAGUTT-3',反向5'-ACUUCGUGAUGAUUCUGCCTT-3';NC siRNA序列:正向5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',反向5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。采用Invitrogen™ Lipofectamine 2000试剂(美国Thermo Fisher科技公司)转染miRNA和siRNA,Invitrogen™ TRIzol试剂(美国Thermo Fisher科技公司)提取HCC组织、相邻正常肝组织和HCC细胞株总RNA,RevertAid™ 逆转录试剂盒(First Strand cDNA Synthesis Kit)(美国Thermo Fisher科技公司)从提取的RNA合成cDNA,SYBR Green聚合酶链反应(PCR)Master Mix试剂盒(TaKaRa生物技术大连公司)检测mRNA表达水平。PCR反应步骤:95℃反应10 min,95℃40次循环15 s,60℃反应1 min。U6、β-肌动蛋白分别用作miR-205和VEGF-A表达水平内部对照,2^{-ΔΔCt}法计算基因相对表达量^[11]。引物序列:miR-205上游5'-GCTCCTTCATCCACGG-3',下游5'-CAGTGCGAGGTCCGAGT-3';U6上游5'-GCTTC-GGCAGCACATATACTAAAAT-3',下游5'-CGCTT-CACGAATTTGCGTGTTCAT-3';VEGF-A上游5'-AA-CTTTCTGCTGTCTTGGGT-3',下游5'-TCTCGATGG-ATGAGGAT-3';β-肌动蛋白上游5'-GGCACTGA-CTACGACTACTC-3',下游5'-TCATACTCTCTCTTG-CTGAT-3'。

1.4 溴化噻唑蓝四氮唑检测

将HepG2和HuH-7细胞以每孔3 000个细胞密度接种至96孔板中,过夜孵育后如前所述转染miRNA或siRNA;室温下分别转染24、48、72、96 h后作溴化噻唑蓝四氮唑(MTT,美国Sigma-Aldrich公司)测定;每孔中加入MTT溶液20 μL,37℃下MTT溶液再孵育4 h后,加入二甲基亚砜(DMSO)200 μL溶解10 min;酶联免疫吸附试验(ELISA)读数器(美国BioTek公司)检测490 nm处吸光度。

1.5 细胞迁移和侵袭检测

采用8 μm孔径聚碳酸酯膜Transwell室(美国Corning公司)评估细胞迁移和侵袭,细胞侵袭检测时Transwell室预涂Matrigel基质胶(美国BD生物科学公司)。将悬浮在300 μL无血清DMEM中的

3×10^4 转染 HepG2 和 HuH-7 细胞加入上室,将补充有 20%FBS 的 DMEM (500 μ L) 作为化学引诱剂添加至底室,37℃ 下孵育 48 h 后用棉绒小心地除去未迁移或侵入 Transwell 室底部表面的细胞;室温下将迁移和侵入细胞用 100% 甲醇固定 10 min,0.5% 结晶紫染色 10 min 后用光学显微镜成像($\times 200$)。

1.6 蛋白印迹检测

采用放射免疫沉淀测定(RIPA)裂解缓冲液(北京百泰克生物技术公司)从 HepG2 和 HuH-7 细胞(2×10^6)分离总蛋白,补充 0.1 mg/mL 苯甲基磺酰氟、1 mM 原钒酸钠和 1 mg/mL 抑肽酶;二辛可宁酸测定试剂盒(北京百泰克生物技术公司)检测蛋白浓度;通过 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)(碧云天生物技术研究) 分级分离总蛋白(20 μ g),再转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)(美国 Millipore 公司);通过含 0.1% Tween20 溶液的 Tris 缓冲 0.9% NaCl 溶液(TBST)和 10% 脱脂奶粉室温下封闭 PVDF 膜 1 h 阻断非特异性位点;4℃ 下将 PVDF 膜与小鼠抗人 VEGF-A 单克隆一抗(1:1 000, ab155944)和小鼠抗人 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GADPH)单克隆一抗(1:1 000, ab9484, 英国 Abcam 公司)孵育过夜;TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次并与山羊抗小鼠 IgG 辣根过氧化物酶偶联二抗体(1:3 000, ab6789, 英国 Abcam 公司)室温下再孵育 2 h;TBST 洗涤 3 次后,用增强的 Pierce 化学发光溶液(美国 Thermo

Fisher 科技公司)使 PVDF 膜可视化。

1.7 双荧光素酶报告基因检测

将 HEK293 细胞接种至 12 孔板(3×10^5 细胞/孔)中,通过 Lipofectamine 2 000 试剂用 100 ng/mL UTR 或突变 UTR 荧光素酶基因构建体转染;VEGF-A-3'UTR 野生型(Wt) 或 VEGF-A-3'UTR 突变体(Mut),miR-205 模拟物或 NC 共转染后,收集细胞并检测荧光素酶活性,并与海肾荧光素酶活性作对照;miRNA 靶预测工具 TargetScan (6.0 版, http://www.targetscan.org/vert_60/)^[12] 评估 miR-205 靶基因。

1.8 数据分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析和图形显示,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较用 t 检验或单因素方差分析、Student-Newman-Keuls 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-205 在 HCC 组织和细胞株中表达

逆转录-定量 PCR(RT-qPCR)检测结果显示,HCC 组织中 miR-205 表达较相邻正常肝组织显著下调(图 1①),肝癌细胞株 HepG2、HuH-7、SMMC-7721、BEL-7402 中 miR-205 表达与正常肝细胞株 L02 相比均降低(图 1②),表明 miR-205 下调可能在肝癌发生发展中发挥一定作用。

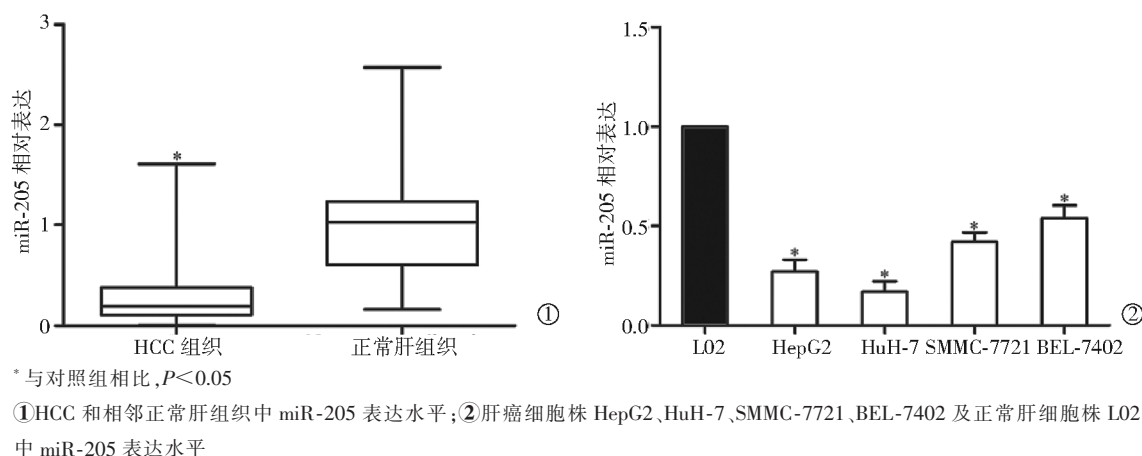


图 1 miR-205 在 HCC 组织和细胞株中表达

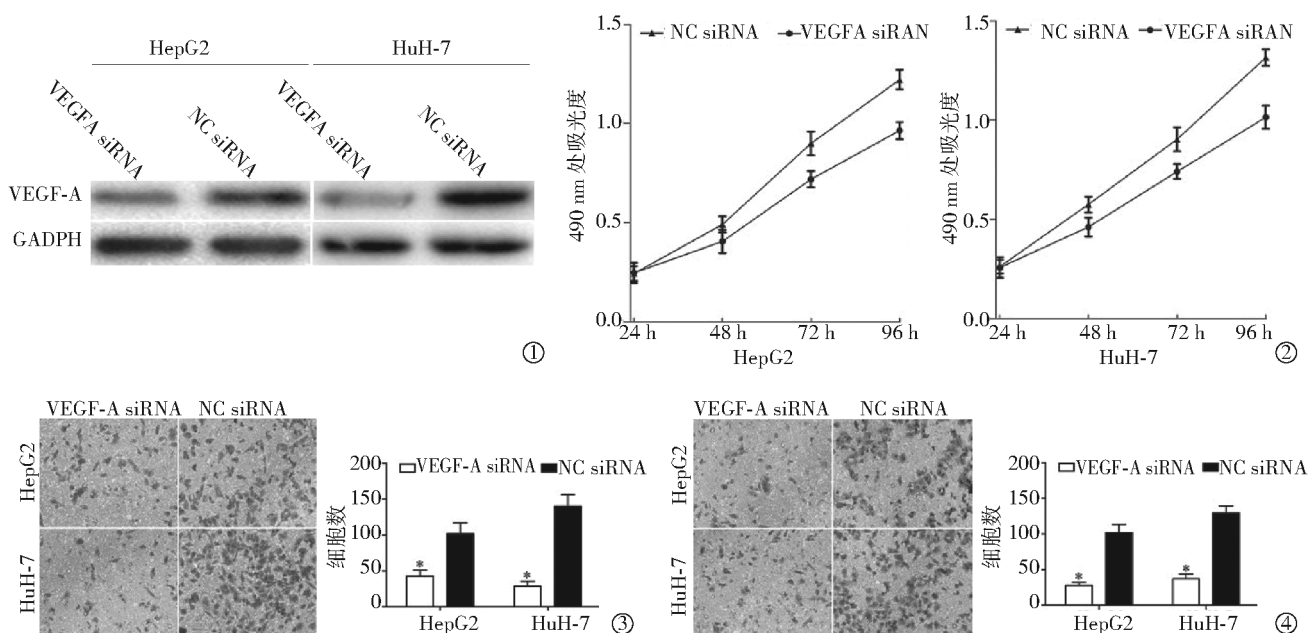
2.2 miR-205 对肝癌细胞增殖的影响

RT-qPCR 检测显示,miR-205 激动剂转染 HepG2 和 HuH-7 细胞后 miR-205 表达与 NC 组相比显著上调(图 2①),表明 HepG2 和 HuH-7 细胞是 miR-205 功能研究一有效的可调节模型;MTT 法检测发现,miR-205 显著抑制 HepG2 和 HuH-7 细

胞增殖(图 2②),提示 miR-205 过表达可抑制 HepG2 和 HuH-7 细胞增殖。

2.3 miR-205 对 HCC 细胞迁移和侵袭的影响

Transwell 迁移和侵袭检测显示,miR-205 表达上调与 NC 组相比抑制 HepG2 和 HuH-7 细胞迁移和侵袭(图 3),表明 miR-205 可在体外抑制 HCC 细



* 与对照组相比, $P < 0.05$

① VEGF-A siRNA 和 NC siRNA 转染后 HepG2 和 HuH-7 细胞中 VEGF-A 蛋白表达水平; ② MTT 法检测 VEGF-A siRNA 对 HepG2 和 HuH-7 细胞增殖的影响; ③④ 敲低 VEGF-A 表达抑制 HepG2 和 HuH-7 细胞迁移和侵袭($\times 200$)

图 5 VEGF-A 参与调控 miR-205 对 HCC 细胞增殖、迁移和侵袭的作用

2.5 VEGF-A 参与调控 miR-205 对 HCC 细胞的作用

VEGF-A siRNA 敲低并转染后, VEGF-A 在 HepG2 和 HuH-7 细胞中表达显著下调, VEGF-A 敲低抑制 HepG2 和 HuH-7 细胞增殖、迁移和侵袭(图 5), 提示 miR-205 通过靶向 VEGF-A 抑制肝癌细胞增殖、迁移和侵袭。

3 讨论

先前研究已证明 miR-205 在多种人类癌症中发挥一定程度的调控作用^[13-14]。卵巢癌中 miR-205 表达上调, 其表达水平与上皮性卵巢癌高病理分级和临床分期有关, 其通过直接靶向锌指 E-box 结合同源盒 1 (ZEB1) 蛋白增强卵巢癌细胞迁移和侵袭能力^[14]。miR-205 可促进子宫内膜癌细胞增殖、转移及抑制细胞凋亡^[15-17]。Lei 等^[18]、Bai 等^[19]研究发现 miR-205 在非小细胞肺癌组织和细胞株中呈高表达, 其通过对磷酸酶和张力蛋白同系物信号通路调节促进非小细胞肺癌细胞增殖、迁移、侵袭及对化疗药物耐药性。因此, 本研究针对 miRNA 在 HCC 中表达水平、功能和作用分子机制作进一步研究, 以增加对 HCC 发生和进展的了解。

文献报道 miR-205 是骨肉瘤^[20]、甲状腺癌^[21]、乳腺癌^[22-23]、肾细胞癌^[24]、口腔癌^[25]和前列腺癌^[26]等多种癌症的抑制因子。目前普遍认为 miRNA 参与调节包括癌症启动和进展的各种生物学过程。本研

究通过检测 miR-205 在肝癌组织和肝癌细胞株中表达水平及其在肝癌发生发展中生物学功能和分子机制, 发现 miR-205 在肝癌组织中表达下调, 其过表达可抑制肝癌细胞增殖、迁移和侵袭。miR-205 在上述不同癌症中表达水平和功能差异表明, 其在某些类型癌症中作为促进因子, 在另一些癌症中则作为肿瘤抑制剂。这种差异可用 miRNA 与靶基因相互作用的“不完全互补”理论加以解释^[27]。

VEGF-A 是一种 35~45 kD 肝素结合糖蛋白, 是肿瘤局部生长和转移的重要血管生成调节因子^[20]。研究显示 VEGF-A 在包括 HCC^[28-29]在内各种类型癌症中高表达, 并在肿瘤增殖、迁移、侵袭和血管生成过程中发挥重要作用^[30-32]。因此, 贝伐单抗等针对 VEGF-A 的靶向治疗药物在临床上广泛应用^[33], 肝癌治疗中 VEGF-A 是值得研究的潜在靶点。为研究 miR-205 所诱导的抑制 HCC 细胞增殖、迁移和侵袭的分子机制, 本研究通过双荧光素酶报告基因检测证实 VEGF-A 是 HCC miR-205 直接作用靶点; RT-qPCR 和蛋白印迹检测结果显示 miR-205 通过直接结合 HCC 中 VEGF-A 3'UTR 负调节 VEGF-A 表达, 可显著降低 VEGF-A mRNA 和蛋白表达水平; miR-205 通过靶向 VEGF-A 抑制肝癌细胞增殖和转移表明, 基于 miR-205 和 VEGF-A 靶向治疗可能是一种针对肝癌治疗的新方法。

综上, 本研究发现 miR-205 在肝癌组织和肝癌

细胞株中表达下调,miR-205 过表达可抑制肝癌细胞增殖,并可通过直接靶向 VEGF-A 抑制肝癌细胞迁移和侵袭,这可能是未来 HCC 治疗的潜在靶点。

[参 考 文 献]

- [1] 周旭林, 满沐苒, 王璐璐, 等. 肝动脉化疗栓塞联合放疗治疗中晚期肝癌疗效与安全性的荟萃分析[J]. 介入放射学杂志, 2019, 28: 428-435.
- [2] 龙 江, 赵 鹏, 杨晓珍, 等. 射频消融治疗中等肝细胞癌 5 年预后及影响因素分析[J]. 介入放射学杂志, 2019, 28: 343-346.
- [3] Zhou YM, Zhang XF, Yu F, et al. Efficacy of surgical resection for pulmonary metastases from hepatocellular carcinoma[J]. Med Sci Monit, 2014, 20: 1544-1549.
- [4] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116: 281-297.
- [5] Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJ. The long and short of microRNA[J]. Cell, 2013, 153: 516-519.
- [6] Li B, Liu L, Li X, et al. MiR-503 suppresses metastasis of hepatocellular carcinoma cell by targeting PRMT1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 464: 982-987.
- [7] Li J, Fang L, Yu W, et al. MicroRNA-125b suppresses the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells by targeting transcriptional coactivator with PDZ-binding motif[J]. Oncol Lett, 2015, 9: 1971-1975.
- [8] Zheng C, Li J, Wang Q, et al. MicroRNA-195 functions as a tumor suppressor by inhibiting CBX4 in hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Rep, 2015, 33: 1115-1122.
- [9] Chen X, Bo L, Zhao X, et al. MicroRNA-133a inhibits cell proliferation, colony formation ability, migration and invasion by targeting matrix metalloproteinase 9 in hepatocellular carcinoma[J]. Mol Med Rep, 2015, 11: 3900-3907.
- [10] Zhang ZQ, Meng H, Wang N, et al. Serum microRNA 143 and microRNA 215 as potential biomarkers for the diagnosis of chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma[J]. Diagn Pathol, 2014, 9: 135.
- [11] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method[J]. Methods, 2001, 25: 402-408.
- [12] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. Cell, 2005, 120: 15-20.
- [13] Zhong G, Xiong X. MiR-205 promotes proliferation and invasion of laryngeal squamous cell carcinoma by suppressing CDK2AP1 expression[J]. Biol Res, 2015, 48: 60.
- [14] Niu K, Shen W, Zhang Y, et al. MiR-205 promotes motility of ovarian cancer cells via targeting ZEB1[J]. Gene, 2015, 574: 330-336.
- [15] Jin C, Liang R. MiR-205 promotes epithelial-mesenchymal transition by targeting AKT signaling in endometrial cancer cells[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2015, 41: 1653-1660.
- [16] Su N, Qiu H, Chen Y, et al. miR-205 promotes tumor proliferation and invasion through targeting ESRG in endometrial carcinoma[J]. Oncol Rep, 2013, 29: 2297-2302.
- [17] Zhang G, Hou X, Li Y, et al. MiR-205 inhibits cell apoptosis by targeting phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten in endometrial cancer ishikawa cells[J]. BMC Cancer, 2014, 14: 440.
- [18] Lei L, Huang YP, Gong WR. MiR-205 promotes the growth, metastasis and chemoresistance of NSCLC cells by targeting PTEN[J]. Oncol Rep, 2013, 30: 2897-2902.
- [19] Bai JH, Zhu XY, Ma JQ, et al. MiR-205 regulates a549 cells proliferation by targeting PTEN[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8: 1175-1183.
- [20] Wang L, Shan M, Liu Y, et al. MiR-205 suppresses the proliferative and migratory capacity of human osteosarcoma Mg-63 cells by targeting VEGFA[J]. Onco Targets Ther, 2015, 8: 2635-2642.
- [21] Salajegheh A, Vosgha H, Md Rahman A, et al. Modulatory role of miR-205 in angiogenesis and progression of thyroid cancer[J]. J Mol Endocrinol, 2015, 55: 183-196.
- [22] Zhang H, Fan Q. MicroRNA-205 inhibits the proliferation and invasion of breast cancer by regulating AMOT expression[J]. Oncol Rep, 2015, 34: 2163-2170.
- [23] Zhang H, Li B, Zhao H, et al. The expression and clinical significance of serum miR-205 for breast cancer and its role in detection of human cancers[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8: 3034-3043.
- [24] Chen Z, Tang ZY, He Y, et al. MiRNA-205 is a candidate tumor suppressor that targets ZEB2 in renal cell carcinoma[J]. Oncol Res Treat, 2014, 37: 658-664.
- [25] Kim JS, Park SY, Lee SA, et al. MicroRNA-205 suppresses the oral carcinoma oncogenic activity via down-regulation of Axin-2 in KB human oral cancer cell[J]. Mol Cell Biochem, 2014, 387: 71-79.
- [26] Wang N, Li Q, Feng NH, et al. miR205 is frequently downregulated in prostate cancer and acts as a tumor suppressor by inhibiting tumor growth[J]. Asian J Androl, 2013, 15: 735-741.
- [27] Yu Z, Ni L, Chen D, et al. Identification of miR-7 as an oncogene in renal cell carcinoma[J]. J Mol Histol, 2013, 44: 669-677.
- [28] Yamaguchi R, Yano H, Nakashima O, et al. Expression of vascular endothelial growth factor-C in human hepatocellular carcinoma[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2006, 21: 152-160.
- [29] Miura H, Miyazaki T, Kuroda M, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 1997, 27: 854-861.
- [30] Zhuang Y, Wei M. Impact of vascular endothelial growth factor expression on overall survival in patients with osteosarcoma: a meta-analysis[J]. Tumour Biol, 2014, 35: 1745-1749.
- [31] Liu Y, Zheng Q, Wu H, et al. Rapamycin increases pCREB, Bcl-2, and VEGF-A through ERK under normoxia[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2013, 45: 259-267.
- [32] Wiszniak S, Mackenzie FE, Anderson P, et al. Neural crest cell-derived VEGF promotes embryonic jaw extension[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112: 6086-6091.
- [33] Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis[J]. J Clin Oncol, 2005, 23: 1011-1027.

(收稿日期:2019-07-01)

(本文编辑:边 佑)