

编者按 人类和动物血管生成与肿瘤生长、侵袭、转移密切相关, 血管内皮生长因子能特异性与血管内皮生长因子受体结合, 促进内皮细胞的分裂、增殖及迁移, 在肿瘤新生血管生成过程中起着至关重要的作用。抗血管生成疗法已有效应用于肿瘤治疗。该文对 VEGFR1 基因特异性 siRNA 进行了筛选, 探讨了 RNA 干扰 VEGFR1 作为基因治疗的可行性, 可为农业生物医药研究者进行相关研究提供参考。

VEGFR1 基因特异性 siRNA 的筛选

李艳^{1,2,3}, 张必良¹ (1. 中国科学院华南植物园, 广东广州 510650; 2. 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广东广州 510663; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100080)

摘要 [目的] 筛选血管内皮生长因子受体(VEGFR)基因特异性小干扰RNA(Small Interference RNA, siRNA), 为肿瘤等疾病的基因治疗寻找一种新途径。[方法] 以高表达 VEGFR1 的人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)为模型, 采用 RNA 干扰技术, 化学合成了 3 条针对血管内皮生长因子受体 1(VEGFR1)的特异性 siRNA, 用 Lipofectamine2000TM 转染 HUVEC 细胞株, 通过 Real time RT-PCR 技术检测 HUVEC 细胞 VEGFR1 基因 mRNA 的表达。并对效果最好的 VEGFR1 siRNA_2 进行 siRNA 的浓度梯度效果检测。[结果] 结果表明, 与对照组相比, 所设计的 3 条 siRNA 均能不同程度地抑制 VEGFR1 mRNA 的表达, 其中 siRNA_2 号最有效, 浓度为 50 nmol/L 时抑制率达到 95% 左右。在浓度梯度试验中, VEGFR1 siRNA_2 转染浓度为 50 pmol/L 时, 对 VEGFR1 基因的沉默效果还能达到 50% 左右。[结论] 所设计的 siRNA 能有效抑制 VEGFR1 基因的表达, 为 RNAi 用于靶向 VEGFR1 的基因治疗提供了非常有效的 siRNA 序列。

关键词 RNA 干扰; siRNA; 人脐静脉血管内皮细胞; 血管内皮生长因子受体; 基因治疗

中图分类号 R734.2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)18-07862-03

Screening of VEGFR1 specific siRNA for therapeutic application

LI Yan et al (South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510650)

Abstract [Objective] The small interference RNAs (siRNAs) of vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1) was selected for a the new approach of tumor and other diseases-curing. [Method] In this study, we have applied RNA interference (RNAi) technology by utilized chemically synthesized small interference RNAs (siRNAs) to block the gene expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1) in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). The initial experiments were carried out with 50 nM various siRNAs to determine the expression of VEGFR1 mRNA by Real time RT-PCR. Result The results demonstrated that VEGFR1 siRNA_2 potently suppressed the expression of VEGFR1 mRNA in HUVEC. In attempt to identify the siRNA interfering efficiency, we have performed with a various concentrations of siRNA: 50 nmol/L, 20 nmol/L, 10 nmol/L, 1 nmol/L, 50 pmol/L, 250 pmol/L, 100 pmol/L, 50 pmol/L. We observed that even in the concentration of 50 pM, siRNA_2 can effectively inhibit the expression of VEGFR1 mRNA. [Conclusion] VEGFR1 siRNA_2 specifically suppresses the VEGFR1 expression, and may have the potential as an effective siRNA sequence in tumor gene therapy targeting VEGFR1.

Key words RNAi; siRNA; HUVEC; VEGFR1; Gene therapy

RNA 干扰(RNA Interference, RNAi)又叫基因沉默,是指在进化过程中高度保守的、由双链 RNA(Double-stranded RNA, dsRNA)诱发的、同源 mRNA 高效特异性降解的现象^[1-3]。RNAi 技术具有特异、高效、快捷、毒性小等特点,可高效、特异地抑制疾病相关基因的过度表达,从而达到治疗疾病的目的。目前, RNAi 技术已被广泛地应用于各种疾病的基因治疗研究中^[4]。肿瘤的血管形成(Angiogenesis)是一个相当复杂的过程,受多种因子的正负调控,其中血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)是作用最强的正性调控因子之一。它通过与其特异性受体血管内皮生长因子受体(Vascular Endothelial Growth Factor Receptor, VEGFR)结合刺激新生血管的形成^[5-9]。目前发现的 VEGFR 主要有 VEGFR1(Fms-like Tyrosine Kinase, Ht-1)、VEGFR2(Kinase Insert Domain Containing Receptor, KDR/Hk-1)、VEGFR3(Ht-4),均是酪氨酸蛋白激酶受体,属于 RTK(Receptor Tyrosine Kinase)型受体,受体的胞外区都含有 7 个免疫球蛋白(Ig)样结构域,胞内区都含有酪氨酸激酶结构域,其中 VEGFR1、VEGFR2 与血管生成的关系最为密切^[10]。目前,在肿瘤研究

中,利用 RNAi 技术沉默 VEGFR 表达的文献还很少。笔者采用 RNA 干扰方法,以人脐静脉血管内皮细胞为研究对象,选用 Lipofectamine2000TM 作为转染试剂,寻找 VEGFR1 作为基因治疗靶点时最佳的 siRNA 靶向序列,并且进一步检测浓度梯度的 VEGFR1 siRNA 对 VEGFR1 mRNA 的沉默效果,进而探讨 RNA 干扰 VEGFR1 作为基因治疗的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株。人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)由广州生物医药与健康研究院周国春研究员惠赠,培养于含 2% 胎牛血清的 EGM2(美国 Clonetics 公司)培养液中,置于 5% CO₂、37 饱和湿度的孵箱中培养。

1.1.2 试剂。Lipofectamine2000TM及 Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司;AMV 逆转录试剂盒为美国 Promega 公司生产,SYBR Premix Ex TaqTM(Perfect Real Time)试剂盒购自 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 siRNA 设计合成。首先在美国国立生物技术信息中心 NCBI 数据库中获取人 VEGFR1 mRNA 的序列全长(序列号:NM_002019),使用中国科学院广州生物医药与健康研究院张必良实验室自主开发的设计软件,设计 3 条 VEGFR1 siRNA 和一条阴性对照 siRNA(Notarget siRNA)。VEGFR1 siRNA_1 靶序列:CTAGCTGTACCTACTTCAA (328~346 bp),正义

基金项目 国家高技术研究发展计划资助项目(863 计划)(2006AA02Z191)资助课题。

作者简介 李艳(1982-),女,安徽亳州人,硕士研究生,研究方向:RNA 干扰。

收稿日期 2008-04-17

链(Sense Strand) 序列为5'-CUAGCUGUACCUACUCAA dTdT-3', 反义链(Antisense Strand) 序列为5'-UUGAAGUAGGUACAGCUAG dTdT-3'。VEGFR1 siRNA 2 靶序列: CAATCTTGCTGAGCATAAA (1 211 ~1 229 bp), 正义链序列为5'-CAAUCUUGCUGAGCAUAAA dTdT-3', 反义链序列为5'-UUUAUGCUCAGCAAGAUUG dTdT-3'。VEGFR1 siRNA 3 靶序列: GCAGCACGCTGTTTATTGA (2 138 ~2 156 bp), 正义链序列为5'-GCAGCACGCGUUAUUGA dTdT-3', 反义链序列为5'-UCAUAAACAGCGUGCUGC dTdT-3'。此外, 设计了非靶向性的 Ntarget siRNA 作为对照, 正义链序列为5'-UUCUCGGAACGUGUCACGU dTdT-3', 反义链序列为5'-ACGUGACACGUUCGGAGAA dTdT-3'。额外设计了dTdT 悬挂末端, 以增加siRNA 的稳定性。设计的siRNA 由广州市锐博生物科技有限公司合成。

1.2.2 细胞转染。取对数生长期的 HUVEC 细胞, 转染前1 d 将细胞接种于6 孔培养板, 接种密度为 1×10^5 /孔, 使得次日转染时细胞融合度达30%~50%。根据 Lipfectamine™2000 试剂操作指南进行转染。50 nmol/L 浓度的siRNA 转染方案为: 在250 μ l OPTI-MEM 中加入5 μ l 20 μ mol/L 的siRNA, 室温孵育5 min。在250 μ l OPTI-MEM 中加入5 μ l Lipfectamine™2000, 室温孵育5 min。将上述2 种稀释液混匀, 室温孵育20 min 后加入细胞板孔中, 细胞置于培养箱进行常规培养。

1.2.3 总 RNA 的抽提和cDNA 的生成。收集转染后24 h 的细胞, 6 孔板每孔加入1 ml Trizol, 加入氯仿和异丙醇按常规方法抽提细胞总 RNA, 所提 RNA 溶于40 μ l 无 RNA 酶水中, Beckmen 紫外分光光度计检测各处理组 RNA 的含量和纯度, 并进行凝胶电泳, 观察 RNA 完整性。以 oligo(dT)¹⁵ 为引物, 1 μ g RNA 为模板, 按 Promega 逆转录试剂盒操作生成cDNA。

1.2.4 Real time PCR 检测3 条 VEGFR1 siRNA 的干扰效果。各取逆转录的cDNA 产物1.6 μ l 作模板, 利用 SYBR Green I 染料实时定量PCR 试剂盒检测不同转染组细胞中的 VEGFR1 mRNA 表达, 并以无 RNA 酶水作为阴性模板对照, 以 β -Actin 作为内参。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性10 s, 94 $^{\circ}$ C 变性5 s; VEGFR1 基因55.5 $^{\circ}$ C 退火30 s, β -Actin 基因60 $^{\circ}$ C 退火30 s, 45 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸1 s。引物序列根据 GenBank 公布的cDNA 序列设计, VEGFR1 的引物序列为5'-GGTATCCCTCAACGTACA-3' (上游引物) 和5'-CCACAGTCCCAACTTTATT-3' (下游引物), PCR 产物长262 bp。 β -Actin 的引物序列为5'-CGTAGCACTGGCATCGTGAT-3' (上游引物), 5'-GTGTTGGCGTACAGTCTTTG3' (下游引物), PCR 产物长452 bp。用 2^{-CT} 法计算和分析 VEGFR1 基因的相对表达量, 确定 VEGFR1 基因的 mRNA 被siRNA 沉默的程度。

1.2.5 Real time PCR 检测浓度梯度的 VEGFR1 siRNA 2 干扰效果检测。收集对数生长期细胞接种于6 孔板, 每孔 1×10^5 个细胞, 设立空白对照组(只加培养基), Ntarget siRNA 转染组和 VEGFR1 siRNA 2 转染组, 第1 批 VEGFR1 siRNA 2 转染浓度分别为50、20、10、1 nmol/L。第2 批 VEGFR1 siRNA 2 转染浓度分别为500、250、100、50 pmol/L。Ntarget siRNA 转染浓度为50 nmol/L。细胞继续培养, 24 h 后提取各处理组细胞的总 RNA 进行 Real time PCR 检测。

1.2.6 统计学处理。数据用 $x \pm s$ 表示, 经 SPSS14.0 统计软件分析, 多组间差异显著性检验用单因素方差分析, 两组间比较用 t 检验。

2 结果与分析

2.1 VEGFR1 mRNA 表达的变化 图1~5 表明, 5 个不同处理组中, 细胞内源 β -Actin 基因片段的扩增曲线基本一致, 说明 PCR 中加入的模板量基本一致, 而目的基因 VEGFR1 的扩增曲线存在差异, 利用 2^{-CT} 法计算和分析 VEGFR1 基因的相对表达量及3 条 VEGFR1 siRNA 的抑制效果显示, 与 Ntarget siRNA 转染组比较, VEGFR1 siRNA 1 对 VEGFR1 mRNA 的抑制率达到66%, VEGFR1 siRNA 2 对 VEGFR1 mRNA 的抑制率达到96%, 而 VEGFR1 siRNA 3 对 VEGFR1 mRNA 的抑制率只有25%左右。Ntarget siRNA 转染组与空白对照组之间比较无明显差异。表明在50 nmol/L 的转染浓度下, VEGFR1 siRNA 2 非常有效地抑制了 VEGFR1 mRNA 的表达。

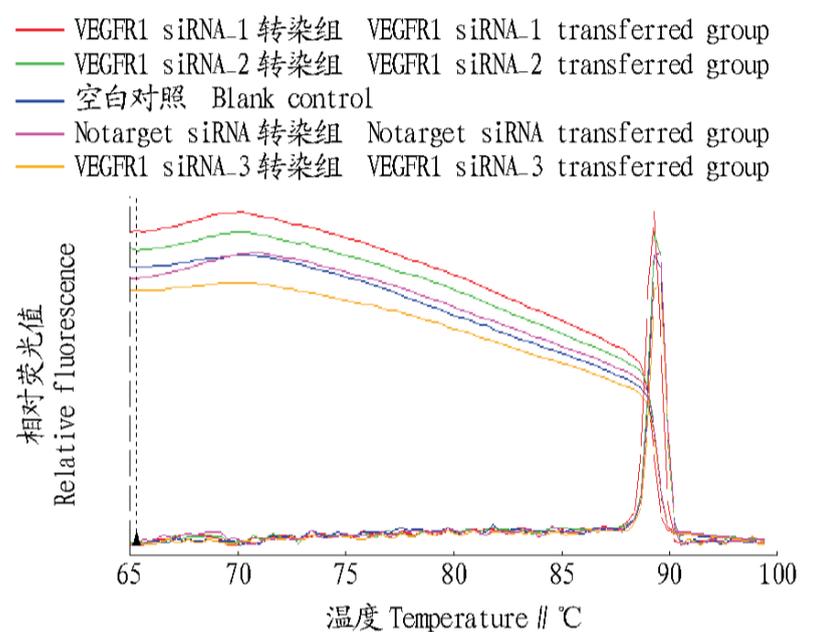


图1 β -Actin 溶解曲线

Fig.1 β -Actin dissolution curve

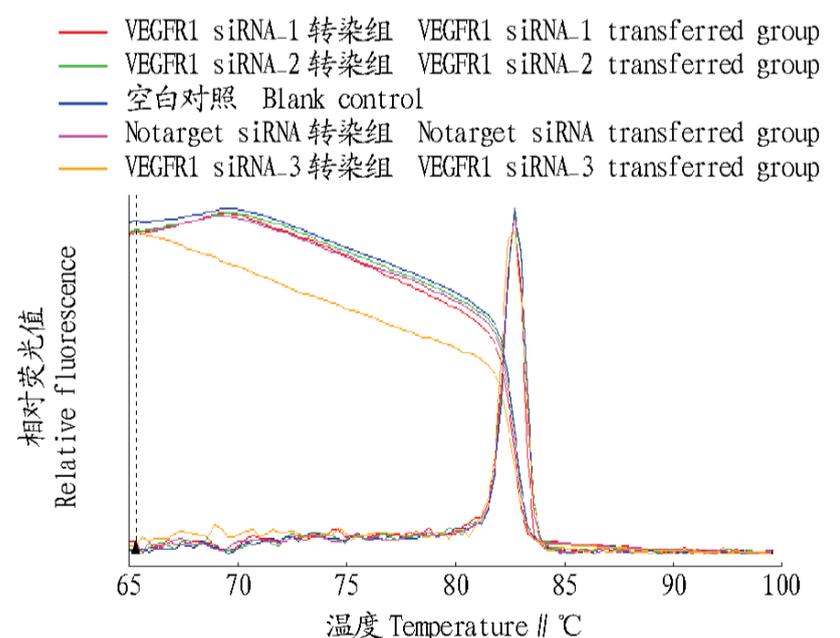


图2 VEGFR1 溶解曲线

Fig.2 VEGFR1 dissolution curve

2.2 不同浓度梯度的 VEGFR1 siRNA 2 干扰效果 由图6 可知, 与转染浓度为50 nmol/L 的 Ntarget siRNA 比较, VEGFR1 siRNA 2 转染浓度为1 nmol/L 时, 对 VEGFR1 mRNA 表达的抑制率仍能达到94%左右。更低浓度的 VEGFR1 siRNA 2 转染 Real time RT-PCR 结果见图7, 与转染浓度为50 nmol/L 的 Ntarget siRNA 比较, VEGFR1 siRNA 2 转染浓度为50 pmol/L 时, 对 VEGFR1 mRNA 表达的抑制率仍能达到50%

左右。这些结果表明,筛选出的针对 VEGFR1 基因特异的 siRNA₂ 在极低的转染浓度下能够达到很好的干扰效果。

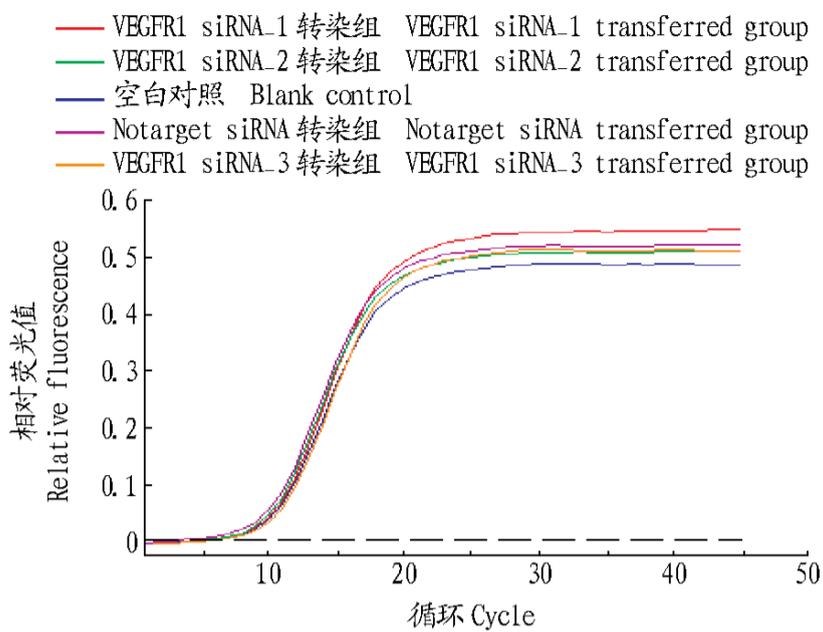


图3 -Actin 扩增曲线

Fig.3 -Actin amplification curve

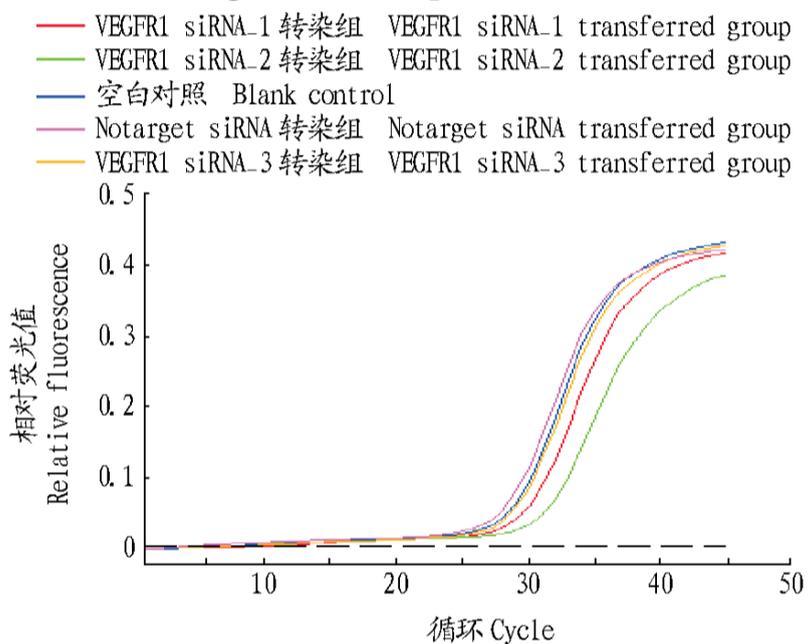
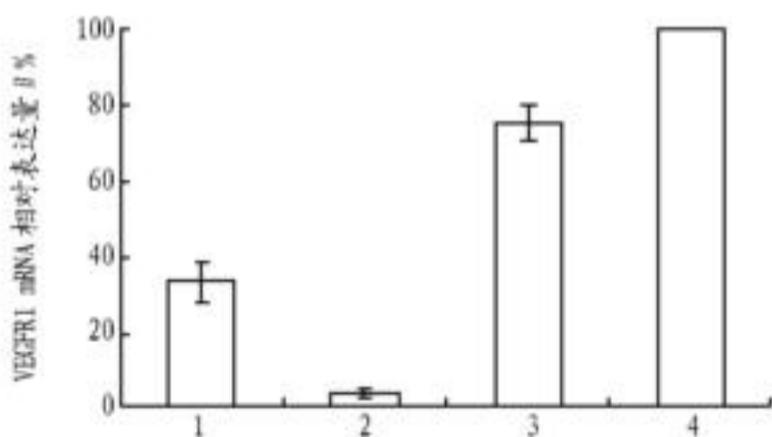


图4 VEGFR1 扩增曲线

Fig.4 VEGFR1 amplification curve



注:1 为 VEGFR1 siRNA₁ 转染组;2 为 VEGFR1 siRNA₂ 转染组;
3 为 VEGFR1 siRNA₃ 转染组;4 为 Notarget siRNA 转染组。

Nte :1 . VEGFR1 siRNA₁ group ;2 . VEGFR1 siRNA₂ group ;3 . VEGFR1 siRNA₃ group ;4 . Notarget siRNA group .

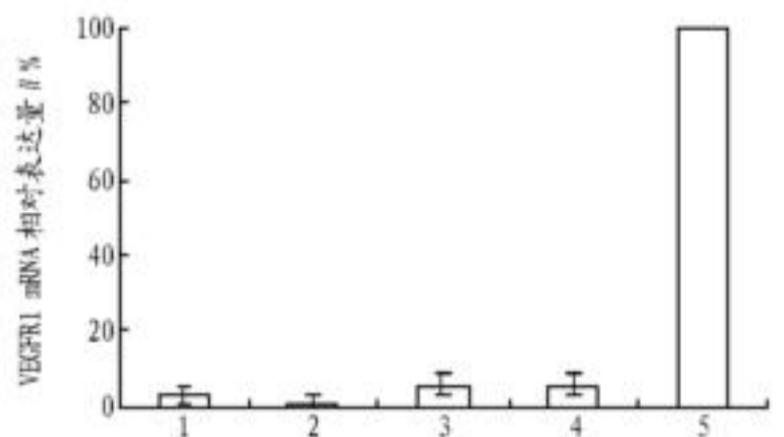
图5 Real time RT-PCR 检测不同转染组 VEGFR1 mRNA 的相对表达量

Fig.5 VEGFR1 mRNA relative expression in different transferred groups by Real Time RT-PCR

3 讨论

(1) RNAi 技术为快速、方便地确定基因功能提供了一种全新的方法,为后基因组时代功能基因组的研究提供了一个强有力的工具^[6]。由于其高效、特异的靶向作用与沉默机

制,有可能使其成为传统不治之症如肿瘤、爱滋病(AIDS)、病毒性肝炎、代谢性疾病等的克星^[11]。肿瘤的生长和转移离不开新生血管的形成,在血管形成前期肿瘤的生长和转移主要靠弥散功能,但是当肿瘤直径超过2 mm 时就必须依赖新生血管的形成^[12]。因此,血管生成是肿瘤生长和转移的必备条件,与肿瘤的发生、发展和转移有着密切关系^[13-14]。抑制肿瘤血管的形成,就有可能使肿瘤细胞营养供给匮乏而死

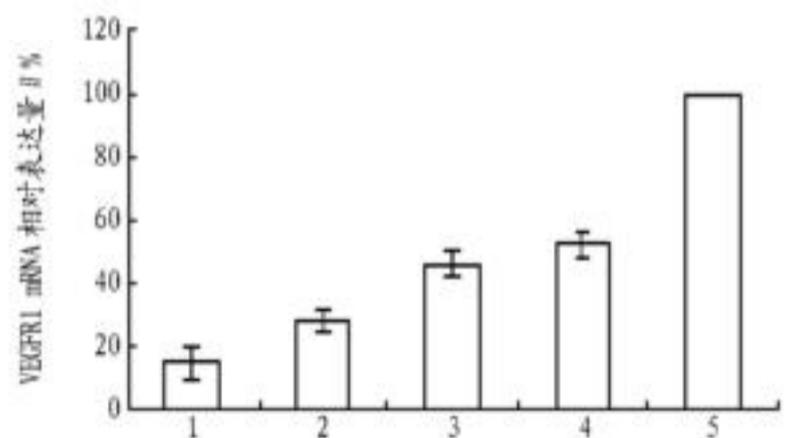


注:1 为 50 nmol/L VEGFR1 siRNA₂ 转染组;2 为 20 nmol/L VEGFR1 siRNA₂ 转染组;3 为 10 nmol/L VEGFR1 siRNA₂ 转染组;4 为 1 nmol/L VEGFR1 siRNA₂ 转染组;5 为 50 nmol/L Notarget siRNA 转染组。

Nte :1 .50 nmol/L VEGFR1 siRNA₂;2.20 nmol/L VEGFR1 siRNA₂;3.10 nmol/L VEGFR1 siRNA₂;4.1 nmol/L VEGFR1 siRNA₂;5.50 nmol/L Notarget siRNA.

图6 Real time RT-PCR 检测 50~1 nmol/L 浓度梯度 VEGFR1 siRNA₂ 转染后 VEGFR1 mRNA 表达量

Fig.6 Expression of VEGFR1 mRNA with 50~1 nmol/L concentration of VEGFR1 siRNA₂ by Real Time RT-PCR



注:1 为 500 pM VEGFR1 siRNA₂ 转染组;2 为 250 pM VEGFR1 siRNA₂ 转染组;3 为 100 pM VEGFR1 siRNA₂ 转染组;4 为 50 pM VEGFR1 siRNA₂ 转染组;5 为 50 nmol/L Notarget siRNA 转染组。

Nte :1 .500 pM VEGFR1 siRNA₂;2.250 pM VEGFR1 siRNA₂;3.100 pM VEGFR1 siRNA₂;4.50 pM VEGFR1 siRNA₂;5.50 nmol/L Notarget siRNA.

图7 Real time RT-PCR 检测 500~50 pM/L 浓度梯度 VEGFR1 siRNA₂ 转染后 VEGFR1 mRNA 表达量

Fig.7 Expression of VEGFR1 mRNA with 500~50 pM/L concentrations of VEGFR1 siRNA₂ measured by Real Time RT-PCR

亡。VEGF 及其家族成员在肿瘤的血管生成中发挥着重要作用。VEGF 通过与相应受体 VEGFR 结合刺激血管内皮细胞增殖和迁移,促进新生血管的生成,与机体多种常见肿瘤的

湖泊、河流透明度的下降,使水质变坏^[8]。通过对扶河桥、新城桥、包兰桥3个控制断面在1998~2003年的监测数据表明磷的含量呈上升趋势(图6),特别是2002年以后,水体中磷的浓度从0.048 ng/L 上升至0.093 ng/L,增幅达93.7%。而青城桥监测显示,在其控制断面水体中总磷浓度年际间波动较大。

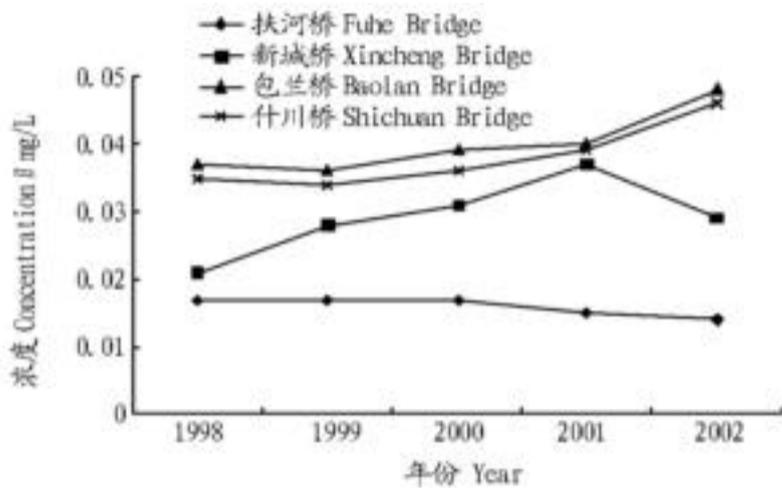


图6 1998~2002年黄河兰州段总磷变化趋势

Fig.6 Change trend of total P in Lanzhou section of Yellow River from 1998 to 2002

3 结论

通过对1998~2002年黄河兰州段监测断面pH值、COD、DO、挥发酚、六价铬、总磷6项指标的调查分析研究表明,扶河桥、新城桥、包兰桥和什川桥4个断面的各项指标监测值

(上接第7864页)

发生和转移有着密切的关系^[15-17]。近期研究表明,VEGFR1介导的信号转导在VEGF相关的病理性血管形成中发挥了重要作用^[18],用VEGFR1的单克隆抗体阻断VEGF和胎盘生长因子(PLGF)与VEGFR1的结合,可以明显抑制肿瘤的血管发生,对关节炎、动脉粥样硬化也有明显的治疗作用^[19]。

(2) 该研究化学合成了3条VEGFR1基因特异的siRNA,用Lipofectamine2000TM作转染试剂转染人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC),采用Real-time RT-PCR技术筛选出了一条最有效的siRNA,即VEGFR1 siRNA₂,而且浓度梯度转染试验发现,VEGFR1 siRNA₂在极低浓度的转染条件下还具有很好的沉默效果。所以,该研究通过化学合成方法获得了一条非常有效的VEGFR1基因特异的siRNA序列,为RNAi技术用于VEGFR1靶向的基因治疗提供了新途径。

(3) 虽然目前对RNAi技术的了解越来越深入,新的研究成果也不断涌现,但在其真正用于临床之前还有许多问题需要解决,如siRNA的稳定性问题,siRNA的给药问题等^[11]。中国科学院广州生物医药与健康研究院张必良实验室正在通过对siRNA分子在设计时进行一系列条件的优化,如不同基团及不同位点的化学修饰及不同长度的siRNA分子设计(主要是27mer长度)来增加siRNA作用的有效性、特异性、专一性,另外通过对转染试剂的分子量、基团修饰、辅料配比的改进等,增加siRNA的转染效率和体内给药的靶向性等。随着研究的不断细致深入,这些问题会逐渐被解决,在不久的将来,RNAi技术也会真正成为癌症治疗的新手段。

参考文献

[1] HANNON G L. RNA interference[J]. Nature, 2002, 418: 244 - 251.

均符合国家地面水水质标准。即黄河兰州段水质的各项检测指标都合格。从检测数据中可以明显看出,从1998~2002年黄河兰州段各项污染指标检测数据均呈上升趋势,其水质正受到越来越严重的污染。而个别监测断面检测到的数据存在较大的年际波动,因为该研究仅利用5年监测数据,但对于发现黄河兰州段水质稳定可靠的演变规律,还需要取得更长时间序列的数据资料。

参考文献

- [1] 姜光辉. 甘肃省黄河流域水污染状况及对策研究[J]. 甘肃水利水电技术, 2000, 136(14): 222 - 224.
- [2] 朱延盛. 黄河兰州段水环境质量的模糊评判[J]. 甘肃环境研究与监测, 1994, 7(2): 13 - 16.
- [3] 刘玉林, 关键, 达玉英. 黄河兰州段悬浮物油吸附规律研究[J]. 黄河水利职业技术学院学报, 2001, 13(4): 13 - 15.
- [4] 王有乐. 黄河上游甘肃段地区经济可持续发展与水资源保护[J]. 甘肃环境研究与监测, 2002, 15(2): 81 - 84.
- [5] 李清浮. 黄河水资源保护存在的问题及对策[J]. 人民黄河, 1999, 21(11): 5 - 7.
- [6] 王金玲, 柴成果, 卿本虞. 黄河上游兰州段水质污染趋势分析[J]. 水资源保护, 1994(1): 45 - 49.
- [7] 崔树彬. 黄河流域的水污染问题及对策措施[J]. 水资源保护, 1993(1): 26.
- [8] 徐祖信. 河流污染治理规划理论与实践[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2003.
- [9] 周艳丽, 李淑贞. 黄河流域河南段水污染危害与对策探讨[J]. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2001, 29(4): 63 - 66.
- [10] 牛永生, 崔树彬. 黄河水质现状评价及污染趋势和对策[J]. 环境保护, 1995(3): 37 - 39.
- [2] HUIVAGNER G, ZAMDRE P D. RNAi: Nature abhors a double strand[J]. Cur Opin Genet Dev, 2002, 12: 225 - 232.
- [3] SHARPP A. RNAi and double-strand RNA[J]. Ceres Dev, 1999, 13: 139 - 141.
- [4] HANNON G J, ROSSI J J. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference[J]. Nature, 2004, 431: 371 - 378.
- [5] CARMELET P. Angiogenesis in health and disease[J]. Nat Med, 2003, 9: 653 - 660.
- [6] BERGERS G, BENJAMIN L E. Tumorigenesis and the angiogenic switch[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3: 401 - 410.
- [7] JAIN R K. Molecular regulation of vessel maturation[J]. Nat Med, 2003, 9: 685 - 693.
- [8] DVORAK HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy[J]. J Clin Oncol, 2002, 20: 4368 - 4380.
- [9] FERRARA N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress[J]. Endocr Rev, 2004, 25: 581 - 611.
- [10] FERRARA N, GERBER HP, LECOUIER J. The biology of VEGF and its receptors[J]. Nat Med, 2003, 9: 669 - 676.
- [11] DANIEL H KIM, JOHN J ROSSI. Strategies for silencing human disease using RNA interference[J]. Nat Rev GENETICS, 2007, 8: 173 - 184.
- [12] FOLKMAN J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? [J]. J Natl Cancer Inst, 1990, 82: 4 - 6.
- [13] FOLKMAN J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis[J]. Semin Oncol, 2002, 29: 15 - 18.
- [14] FOLKMAN J. Fundamental concepts of the angiogenic process[J]. Cur Mol Med, 2003, 3: 643 - 651.
- [15] HERBST R S, CNN A, SANDLER A. Angiogenesis and lung cancer: Prognostic and therapeutic implications[J]. J Clin Oncol, 2005, 23: 3243 - 3256.
- [16] HERBST R S, HDLERI J. Angiogenesis and lung cancer: Potential for therapy [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6: 4604 - 4606.
- [17] CARMELET P, JAIN R K. Angiogenesis in cancer and other diseases[J]. Nature, 2000, 407: 249 - 257.
- [18] ZICHE M, MORDELLI L, CHOUDHURI R, et al. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis[J]. J Clin Invest, 1997, 99: 2625 - 2634.
- [19] LUTTUNA, TJWA M, MOONS L, et al. Revascularization of ischemic tissues by HGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Hit1[J]. Nat Med, 2002, 8: 831 - 840.