

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.01.010

· 临床研究 ·

Artemin 在软骨肉瘤中的表达及其对内皮细胞增殖和迁移的影响

胡军^{1a}, 丰育来^{1b}, 周中²(1. 南京中医药大学连云港附属医院 a. 骨科; b. 肿瘤科, 江苏 连云港 222004; 2. 南京中医药大学附属中西医结合医院 骨伤科, 江苏 南京 210028)

[摘要] **目的:** 探讨 Artemin 在软骨肉瘤中的表达水平及其对内皮细胞增殖与迁移的作用及其机制。 **方法:** 收集 2015 年 5 月至 2019 年 4 月南京中医药大学连云港附属医院手术切除的 40 例软骨肉瘤患者的肿瘤组织标本, 分为低 (I 级)、高级别 (II、III 级) 软骨肉瘤各 20 例; 对照组为 20 例因车祸等意外伤截肢患者的正常软骨组织标本。用免疫组化法检测肿瘤组织中 Artemin、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、Ki-67 表达水平和 CD31⁺ 血管密度。用 10 ng/ml 的 Artemin 处理 SW1353 细胞后, 用 ELISA 实验检测细胞培养上清中 VEGF、基质细胞衍生因子-1 (stromal cell derived factor-1, SDF-1)、基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP2) 和 MMP9 的含量变化, 用 Transwell 迁移实验和 MTT 细胞增殖实验分别检测 Artemin 处理的软骨肉瘤细胞对 ECV304 细胞增殖和迁移的影响。 **结果:** 低级别组软骨肉瘤组织中 Artemin 和 Ki-67 表达水平均显著高于对照组 (均 $P < 0.01$), 高级别组软骨肉瘤组织中 Artemin 表达水平和 Ki-67 表达率显著高于低级别组 (均 $P < 0.01$)。Artemin 表达与软骨肉瘤组织中 VEGF 水平和血管密度呈正相关 (均 $P < 0.01$); Artemin 促进软骨肉瘤细胞分泌 VEGF, 而对 SDF-1、MMP2 和 MMP9 分泌无显著的影响; Artemin 通过促进软骨肉瘤细胞分泌 VEGF, 诱导 ECV304 细胞增殖和迁移 (均 $P < 0.01$)。 **结论:** Artemin 在软骨肉瘤组织中高表达且与 VEGF 水平和血管密度呈正相关, Artemin 能够增强软骨肉瘤细胞诱导血管生成功能。

[关键词] 软骨肉瘤; SW1353 细胞; ECV304 细胞; Artemin; 血管内皮生长因子; 血管生成; 增殖; 迁移

[中图分类号] R738.3; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)01-0062-06

Artemin expression in chondrosarcoma and its effect on proliferation and migration of endothelial cells

HU Jun^{1a}, FENG Yulai^{1b}, ZHOU Zhong² (1a. Department of Orthopedics; 1b. Department of Oncology, Lianyungang Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Lianyungang 222004, Jiangsu, China; 2. Traumatology and Orthopedics, Nanjing Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, Jiangsu, China)

[Abstract] Objective: To investigate the expression of Artemin in chondrosarcoma and its effect on proliferation and migration of endothelial cells, and to explore the mechanism. **Methods:** A total of 40 chondrosarcoma tissue samples (low degree (I), 20 cases; high degree (II, III), 20 cases) surgically resected from patients, who were treated in Lianyungang Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine from May, 2015 to April, 2019, were collected for this study. Another 20 cases of normal cartilage tissue specimen from patients with amputations due to car accidents were served as control. The expressions of Artemin, vascular endothelial growth factor (VEGF), Ki-67 and CD31⁺ vascular density in tumor tissues were detected by immunohistochemistry. After being treated with 10 ng/ml Artemin, the changes of VEGF, stromal cell derived factor-1 (SDF-1), matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 in the supernatant of SW1353 cell culture were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the effects of Artemin-treated chondrosarcoma cells on the migration and proliferation of ECV304 cells were detected by Transwell migration assay and MTT cell proliferation assay, respectively. **Results:** The expressions of Artemin and Ki-67 in the tissues of low-level group were significantly higher than those in the control group (all $P < 0.01$); the expressions of Artemin and Ki-67 in the tissues of high-level group were significantly higher than those in the low-level group (all $P < 0.01$). The expression of Artemin was positively correlated with VEGF level and vascular density in chondrosarcoma tissues (all $P < 0.01$); Artemin promoted the secretion of VEGF by chondrosarcoma cells, but had no significant effect on the secretion of SDF-1, MMP2 and MMP9. Artemin induced the proliferation and migration of ECV304 cells by promoting the secretion of VEGF by chondrosarcoma cells (all $P < 0.01$). **Conclusion:** Artemin is highly expressed in chondrosarcoma tissues and has a positive correlation with the expression of VEGF and vascular density. Artemin can enhance the angiogenesis induced

[作者简介] 胡军 (1979-), 男, 本科, 副主任中医师, 主要从事骨病、创伤的研究, E-mail: hujx22@126.com

[通信作者] 周中 (ZHOU Zhong, corresponding author), 博士, 主任中医师, 硕士生导师, 主要从事骨关节疾病的研究, E-mail: hujx22@126.com

by chondrosarcoma.

[Key words] chondrosarcoma; SW1353 cell; ECV304 cell; Artemin; vascular endothelial growth factor (VEGF); angiogenesis; proliferation; migration

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(1): 62-67. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.01.010]

软骨肉瘤(chondrosarcoma)是最常见的骨恶性肿瘤之一,常发生于骨盆和股骨等部位^[1]。手术治疗是软骨肉瘤最主要的治疗手段,然而部分患者发现时已经发生了转移,手术大范围切除会严重影响患者的肢体功能,术后辅助治疗对于清除残存的肿瘤至关重要^[2]。但软骨肉瘤对放疗和化疗均不敏感^[3],因此寻找新的治疗靶点具有十分重要的临床意义。软骨特殊的组织结构使得软骨肉瘤相对于其他部位恶性肿瘤血管密度较低,而血管密度是影响软骨肉瘤患者预后的独立风险因素^[4-6]。Artemin属于胶质细胞源性神经生长因子配基家族,在乳腺癌和食管癌等肿瘤中高表达,促进肿瘤生长和转移^[7-9],然而其在软骨肉瘤中的表达还尚未见报道。神经与血管生成密切相关,许多神经分子也可作为有效的血管生成分子,促进血管新生和内皮细胞增殖^[10-11]。本研究通过检测 Artemin 在软骨肉瘤中的表达水平,探讨其与软骨肉瘤促血管生成的相关性,以期对软骨肉瘤的靶向治疗探寻新的靶标。

1 资料与方法

1.1 临床样本的来源

收集2015年5月1日至2019年4月30日南京中医药大学连云港附属医院手术切除的40例软骨肉瘤患者的组织标本,其中男性24例、女性16例。病例纳入标准:影像学 and 病理学均诊断为软骨肉瘤。病例排除标准:年龄<18周岁或者>70周岁;合并脑出血或者脑梗死等神经系统病变;合并糖尿病等全身系统性代谢疾病;合并其他恶性肿瘤;合并乙肝病毒和HIV感染者。按照2013年世界卫生组织骨和软组织肿瘤分级标准,将软骨肉瘤分为低级别组(I级软骨肉瘤,共20例)和高级别组(II、III级软骨肉瘤,共20例)。选取20例因车祸等意外伤截肢患者的正常软骨组织标本作为对照组。所有标本获取前均告知患者并签署知情同意书,研究方案和程序征得医院伦理委员会批准。

1.2 细胞系及主要试剂

人软骨肉瘤细胞SW1353和内皮细胞ECV304均购于美国ATCC公司。胎牛血清和RMPI 1640均购于美国Hyclone公司,DMSO、MTT细胞增殖试剂盒购于美国Sigma公司,Artemin、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、Ki-67和

CD31一抗、VEGF中和性抗体购于美国Abcam公司,基质细胞衍生因子(stromal cell derived factor-1, SDF-1)、基质金属蛋白酶2(matric metalloproteinase 2, MMP2)和MMP9的ELISA试剂盒购于欣博盛生物科技有限公司,Transwell小室购于美国Corning公司。

1.3 组织学染色法观察软骨肉瘤中Artemin、VEGF、Ki-67表达和CD31⁺血管密度

收集对照组、低级别组和高级别组软骨肉瘤患者的组织标本,4%多聚甲醛固定12 h。石蜡包埋后,进行组织切片,一部分组织进行H-E染色,另一部分组织进行免疫组织化学染色检测Artemin和VEGF、Ki-67表达和CD31⁺血管密度。结果判定:阳性表达为组织或细胞染色呈棕色或者黑色,阴性表达为组织或细胞呈苏木精染色的蓝色。检测结果由2名副主任医师进行判断,并在相同光背景下,使用显微镜进行拍照。Artemin和VEGF表达采用Image Pro Plus 6.0分析平均光密度,Ki-67表达率为阳性表达细胞/所有细胞,CD31⁺血管密度为每个视野CD31⁺内皮细胞形成的血管数目。

1.4 ELISA实验检测Artemin对SW1353细胞中VEGF、SDF-1、MMP2和MMP9水平的影响

将人软骨肉瘤SW1353细胞置于含有10%胎牛血清的RMPI 1640中进行培养,细胞汇合度达70%~80%时进行传代。实验分为2组:Artemin组(培养基中加入10 ng/ml的Artemin)和对照组(培养基中加入相同体积的PBS)。在常规条件下培养48 h后,以ELISA法检测上清中VEGF、SDF-1、MMP2和MMP9的水平。

1.5 Transwell实验检测Artemin处理的SW1353细胞对ECV304细胞迁移的影响

Transwell小室上层加入 2×10^4 个ECV304细胞,小室下层为 1×10^5 SW1353细胞(10 ng/ml的Artemin刺激48 h,PBS清洗3次后进行实验),实验分为4组:空白组(下室加入正常的培养基)、对照组(下室为对照组SW1353细胞)、Artemin组(下室内加入Artemin预处理的SW1353细胞)和VEGF阻断组(下室为Artemin预处理的SW1353细胞,同时加入VEGF的中和性抗体)。共培养48 h后,取出小室,用棉签抹去上层的细胞,4%多聚甲醛固定30 min后,加入1%结晶紫染液中染色30 min,PBS清洗3次后,置于显微镜下随机拍摄9个部位,然后观测迁移ECV304细胞的数目。

1.6 MTT 实验检测 Artemin 处理的 SW1353 细胞对 ECV304 细胞增殖的影响

实验分组同 1.5。共培养 24 h 后, 将各组 ECV304 细胞消化以 6×10^3 /孔的细胞密度种植到 96 孔板内, 每组设置 6 个复孔, 继续培养 24 h 后, 加入 MTT 溶液。4 h 后, PBS 清洗 3 次, 加入 DMSO 培养基, 室温避光震荡 15 min 后, 在酶标仪上检测各组细胞波长在 570 nm 的光密度(D)值, 并通过计算细胞相对增殖率。细胞增殖率=(处理后各组 D 值/处理前 D 值-1)×100%。

1.7 统计学处理

ELISA、Transwell、MTT 实验均重复 6 次。采用 SPSS18.0 软件对实验数据进行统计分析。正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 相关性分析采用 Pearson 法。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 软骨肉瘤患者的一般临床资料

对照组患者年龄为 (46.3±6.9) 岁, 体质量为 (62.3±10.3)kg, 男性 14 例、女性 6 例。低级别组软骨

肉瘤患者年龄为 (48.9±8.3) 岁, 体质量为 (66.2±9.2) kg, 男性 13 例、女性 7 例; 高级别组患者年龄为 (51.3±6.6) 岁, 体质量为 (59.5±8.6)kg, 男性 11 例、女性 9 例。两组患者的年龄、性别、体质量等比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$), 具有可比性。

2.2 高级别软骨肉瘤组织中 Artemin 表达水平显著升高

免疫组化染色结果(图 1)显示, 与对照组比较, 低级别组、高级别组软骨肉瘤组织中 Artemin 表达水平均显著升高(19.50±3.78、93.83±17.62 vs 3.33±0.88, $t=4.161$ 、 4.124 , 均 $P < 0.01$)、Ki-67 表达率显著升高 [(6.88±0.58)%、(13.70±1.57)% vs (1.53±0.45)% , $t=7.298$ 、 4.064 , 均 $P < 0.01$]。

2.3 高级别软骨肉瘤组织中血管密度显著增高

免疫组化染色结果(图 2)显示, 与对照组比较, 低级别组、高级别组软骨肉瘤组织中 VEGF 表达水平显著升高(9.80±1.32、45.62±4.21 vs 3.88±0.59, $t=4.092$ 、 8.120 , 均 $P < 0.01$)、血管密度显著增高 [(7.33±0.99)、(21.50±1.73) vs (0.83±0.31) 个, $t=6.277$ 、 7.118 , 均 $P < 0.01$]。相关性分析结果显示, 软骨肉瘤组织中 Artemin 表达与 VEGF 的表达和血管密度呈正相关($r=0.7935$ 、 0.8235 , 均 $P < 0.01$)。

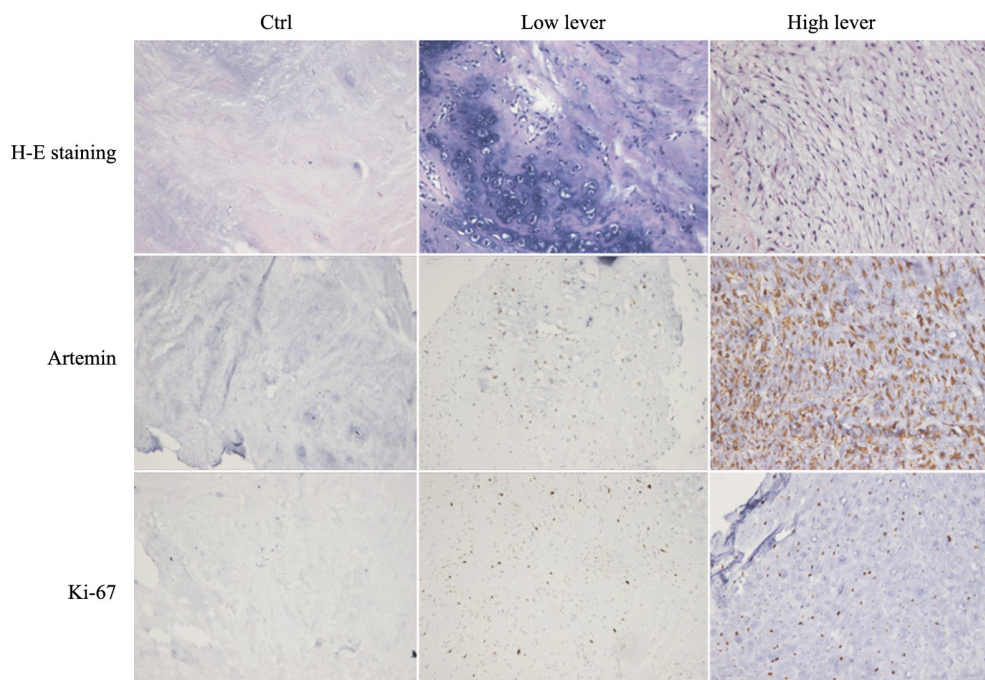


图 1 软骨肉瘤组织中 Artemin 表达水平(×100)

Fig.1 Artemin expression in chondrosarcoma tissues (×100)

2.4 Artemin 促进 SW1353 细胞分泌 VEGF

ELISA 实验结果(图 3)显示, Artemin 组 SW1353 细胞上清液中 VEGF 含量显著高于对照组 [(64.77±6.11) vs (18.50±2.93) ng/ml, $t=6.825$, $P < 0.01$]; 而 SDF-1、MMP2 和 MMP9 含量在两组之间的差异均无

统计学意义(均 $P > 0.05$)。

2.5 Artemin 处理的 SW1353 细胞促进 ECV304 细胞迁移

Transwell 实验结果(图 4)显示, 对照组 ECV304 细胞的迁移率显著高于空白组 [(10.55±1.30)% vs

(4.35 ± 0.76)%, $t=4.132, P<0.01$]; Artemin 组 ECV304 细胞的迁移率显著高于对照组 [(20.82 ± 1.72)% vs (10.55 ± 1.30)%, $t=4.767, P<0.01$]; VEGF 的阻断能够

完全抑制 Artemin 的促迁移作用, 与 Artemin 组比较, 差异具有显著的统计学意义 [(7.75 ± 1.42)% vs (20.82 ± 1.72)%, $t=6.055, P<0.01$]。

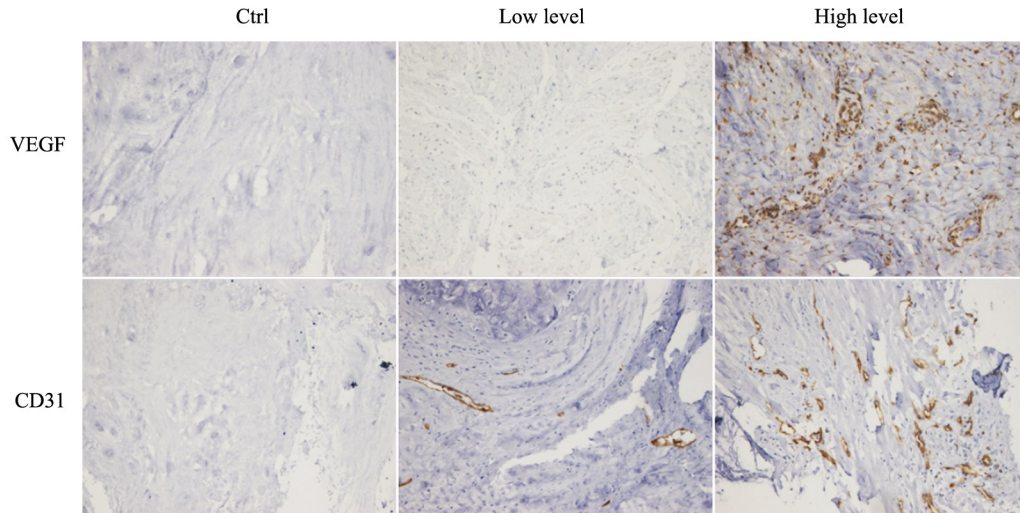
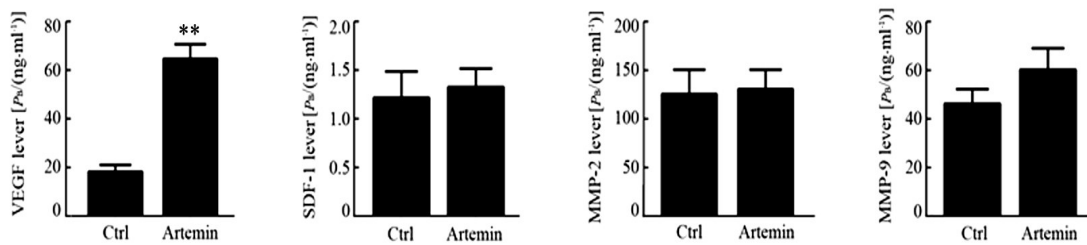


图2 软骨肉瘤与正常组织中 VEGF 表达和血管密度比较($\times 100$)

Fig.2 Comparisons of VEGF expression and vascular density between chondrosarcoma tissues and normal tissues ($\times 100$)



** $P<0.01$ vs Ctrl group

图3 Artemin 对 SW1353 细胞中 VEGF、SDF-1、MMP-2 和 MMP-9 表达的影响

Fig.3 Effects of Artemin on expressions of VEGF, SDF-1, MMP-2 and MMP-9 in SW1353 cells

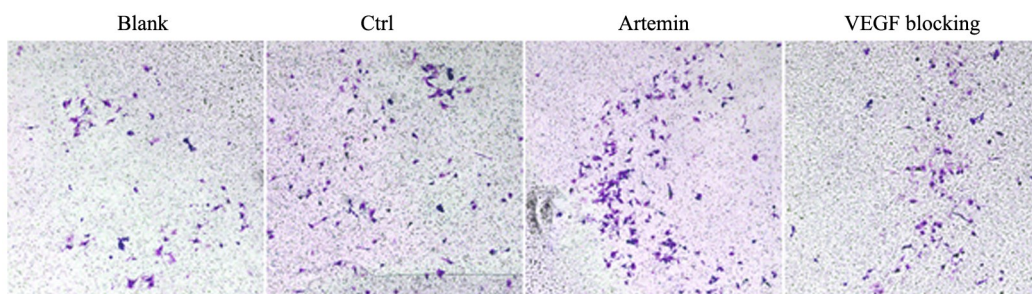


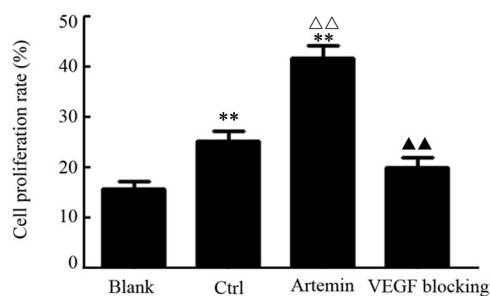
图4 Artemin 刺激的 SW1353 细胞促进 ECV304 细胞的迁移($\times 100$)

Fig.4 Artemin-stimulated SW1353 cells promoted migration of ECV304 cells ($\times 100$)

2.6 Artemin 处理的 SW1353 细胞促进 ECV304 细胞增殖

MTT 实验结果(图5)显示, 对照组 ECV304 细胞的增殖率显著高于空白组 [(25.33 ± 1.86)% vs (15.67 ± 1.65)%, $t=3.896, P<0.01$]; Artemin 组 ECV304 细胞的

增殖率显著高于对照组 [(41.67 ± 2.64)% vs (25.33 ± 1.86)%, $t=5.059, P<0.01$]; VEGF 的阻断能够完全抑制 Artemin 的促增殖作用, 与 Artemin 组比较差异具有显著的统计学意义 [(20.03 ± 2.16)% vs (41.67 ± 2.64)%, $t=6.349, P<0.01$]。



** $P < 0.05$ vs Blank group; ▲▲ $P < 0.01$ vs Ctrl group;
▲▲ $P < 0.01$ vs Artemin group

图5 Artemin刺激的SW1353细胞促进ECV304细胞增殖
Fig.5 Artemin-stimulated SW1353 cells promoted the proliferation of ECV304 cells

3 讨论

软骨肉瘤是一种发生于软骨组织或者成软骨结缔组织的恶性肿瘤,手术治疗为主的综合治疗是目前主要的治疗方法,治疗原则是减轻患者的临床症状、防止复发和转移,并尽可能保存关节等的功能^[12]。然而软骨肉瘤对放疗和化疗并不敏感,近几年发展起来的基因编辑技术能够增强放化疗的敏感性,但是离应用于临床还有很长的一段距离^[13]。因此,寻找新的治疗靶点具有十分重要的意义。Artemin是一种分泌型的磷酸化蛋白,具有促进细胞增殖和黏附等功能。近期大量研究^[14-16]发现,Artemin在胃癌、肺癌、胰腺癌和乳腺癌中高表达,且与肿瘤的浸润深度和淋巴结转移密切相关,但其具体的作用机制尚不明确。本研究结果发现,Artemin在软骨肉瘤组织中高表达,且与VEGF的表达和血管密度呈正相关,表明Artemin可作为一个潜在的靶标,应用于软骨肉瘤的靶向治疗。

神经与血管在解剖与功能上紧密相关,相互作用。血管新生后,可以为神经生长提供能量和物质,诱导神经末梢向组织内长入。许多神经分子是一种有效的血管生长因子,能够促进内皮细胞增殖和迁移,诱导移植生物材料的血管化^[17]。神经轴突导向因子Netrin-1是一种重要的神经轴突生长因子,科学家将其包裹到水凝胶,注射在梗死的心肌组织内,动物实验中发现Netrin-1可以诱导血管生成,维持心脏的各项功能^[18]。Artemin是一种胶质细胞分泌的神经分子,本研究发现在软骨肉瘤组织中Artemin与VEGF和血管密度呈正相关;进一步的体外研究发现,Artemin能够促进软骨肉瘤细胞分泌VEGF,诱导ECV304细胞增殖和迁移,结果表明Artemin具有诱导血管生成的重要作用。

软骨质地较硬,且血管密度很低。相对于其他部位的恶性肿瘤,软骨肉瘤血管较少,能量供给相对较为困难,因此部分软骨肉瘤恶性程度相对较弱^[19]。然而仍有很多软骨肉瘤血管密度显著升高,且容易发生周围组织的浸润和淋巴结转移。因此血管密度被认为是软骨肉瘤的独立危险因素。血管密度低使得化疗药物很难到达肿瘤组织中,难以发挥有效的治疗作用。VEGF在软骨肉瘤中高表达,通过药物靶向抑制VEGF的表达,能够显著延缓肿瘤生长,增强治疗效果和延长患者的生存周期^[20-22]。本研究发现,Artemin是一种促血管生成分子,在软骨肉瘤中与VEGF和血管密度紧密相关,体外研究也发现Artemin能够促进软骨肉瘤分泌血管生成因子,进而诱导血管生成和肿瘤的进展。然而具体的疗效还需要进一步动物实验和临床试验进行验证。

综上,Artemin在软骨肉瘤组织中高表达,且与VEGF水平和血管密度呈正相关,Artemin能够增强软骨肉瘤诱导血管生成功能,本研究为软骨肉瘤的抗血管生成靶向治疗提供了潜在的靶标。

[参考文献]

- [1] KHALIL S, AL-RAHAWAN M G, AL-RAHAWAN M M. Periosteal mesenchymal chondrosarcoma of the tibia[J]. *Skeletal Radiol*, 2018, 47(5): 605. DOI:10.1007/s00256-018-2885-9.
- [2] GAO C P, LIU J H, HOU F, et al. Low-grade chondrosarcoma of the cricoid cartilage: a case report and review of the literature[J/OL]. *Skeletal Radiol*, 2017, 46(11): 1597-1601[201-07-29]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5599471/>. DOI:10.1007/s00256-017-2731-5.
- [3] TSUDA Y, OGURA K, HAKOZAKI M, et al. Mesenchymal chondrosarcoma: A Japanese musculoskeletal oncology group (JMOG) study on 57 patients[J]. *J Surg Oncol*, 2017, 115(6): 760-767. DOI: 10.1002/jso.24567.
- [4] ZHANG H T, GUI T, SANG Y, et al. The BET bromodomain inhibitor JQ1 suppresses chondrosarcoma cell growth via regulation of YAP/p21/c-myc signaling[J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(8): 2182-2192. DOI:10.1002/jcb.25863.
- [5] FUKUMOTO S, KANBARA K, NEO M. Synergistic anti-proliferative effects of mTOR and MEK inhibitors in high-grade chondrosarcoma cell line OUMS-27[J]. *Acta Histochem*, 2018, 120(2): 142-150. DOI:10.1016/j.acthis.2018.01.002.
- [6] SCHUETZE S M, BOLEJACK V, CHOY E, et al. Phase 2 study of dasatinib in patients with alveolar soft part sarcoma, chondrosarcoma, chordoma, epithelioid sarcoma, or solitary fibrous tumor[J]. *Cancer*, 2017, 123(1): 90-97. DOI:10.1002/cncr.30379.
- [7] KANG J, PERRY J K, PANDEY V, et al. Artemin is oncogenic for human mammary carcinoma cells[J]. *Oncogene*, 2009, 28(19): 2034-2045. DOI:10.1038/onc.2009.66.
- [8] LI S J, LI Z G, GUO F J, et al. MiR-223 regulates migration and invasion by targeting Artemin in human esophageal carcinoma[J/OL]. *J Biomed Sci*, 2011, 18: 24[201-07-29]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3111111/>.

- gov/pmc/articles/PMC3080798/. DOI:10.1186/1423-0127-18-24.
- [9] HIDAKA T, OGAWA E, KOBAYASHI E H, et al. The aryl hydrocarbon receptor AhR links atopic dermatitis and air pollution via induction of the neurotrophic factor artemin[J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(1): 64-73. DOI:10.1038/ni.3614.
- [10] HOLLÓ G. Comparison of peripapillary OCT angiography vessel density and retinal nerve fiber layer thickness measurements for their ability to detect progression in glaucoma[J]. *J Glaucoma*, 2018, 27(3): 302-305. DOI:10.1097/IJG.0000000000000868.
- [11] YOUNG K Z, DEDANIA V S, RAO R C. Acute-on-chronic: retinal artery occlusion following retinal vein occlusion[J]. *Ophthalmology*, 2017, 124(8): 1142. DOI:10.1016/j.ophtha.2017.01.025.
- [12] TAYLOR K, KRANSDORF M J, SCHWARTZ A J, et al. Mosaic-pattern dedifferentiation in liposarcoma and chondrosarcoma: imaging features of an uncommon form of dedifferentiation[J]. *Skeletal Radiol*, 2018, 47(6): 877-882. DOI:10.1007/s00256-017-2866-4.
- [13] STROTMAN P K, REIF T J, KLIETHERMES S A, et al. Dedifferentiated chondrosarcoma: A survival analysis of 159 cases from the SEER database (2001-2011) [J]. *J Surg Oncol*, 2017, 116(2): 252-257. DOI:10.1002/jso.24650.
- [14] HIDAKA T, OGAWA E, KOBAYASHI E H, et al. The aryl hydrocarbon receptor AhR links atopic dermatitis and air pollution via induction of the neurotrophic factor artemin[J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(1): 64-73. DOI:10.1038/ni.3614.
- [15] GÓMEZ E, MARTIN D, CARROCERA S, et al. Expression and localization of ARTEMIN in the bovine uterus and embryos[J]. *Theriogenology*, 2017, 90: 153-162. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.12.007.
- [16] WANG J, WANG H, CAI J, et al. Artemin regulates CXCR4 expression to induce migration and invasion in pancreatic cancer cells through activation of NF- κ B signaling[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 365(1): 12-23. DOI:10.1016/j.yexcr.2018.02.008.
- [17] AHMED R P, HAIDER K H, SHUJIA J, et al. Sonic Hedgehog gene delivery to the rodent heart promotes angiogenesis via iNOS/netrin-1/PCSK pathway[J/OL]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8576[201-07-29]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2797399/>. DOI:10.1371/journal.pone.0008576.
- [18] XIE Z Y, ENKHJARGAL B, REIS C, et al. Netrin-1 preserves blood-brain barrier integrity through deleted in colorectal cancer/focal adhesion kinase/RhoA signaling pathway following subarachnoid hemorrhage in rats[J/OL]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(5): e005198[201-07-29]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5524080/>. DOI:10.1161/JAHA.116.005198.
- [19] ZHONG Z Y, HUANG M G, LV M, et al. Circular RNA MYLK as a competing endogenous RNA promotes bladder cancer progression through modulating VEGFA/VEGFR2 signaling pathway[J]. *Cancer Lett*, 2017, 403: 305-317. DOI:10.1016/j.canlet.2017.06.027.
- [20] FENG Q Y, ZHANG C L, LUM D, et al. A class of extracellular vesicles from breast cancer cells activates VEGF receptors and tumour angiogenesis[J/OL]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14450[201-07-29]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5316898/>. DOI:10.1038/ncomms14450.
- [21] 邓大炜, 吴斌, 严舒, 等. FOXQ1 介导 TGF- β 1 信号通路调控胰腺癌 PANC-1 细胞体外血管生成[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018(1): 68-72. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.01.012.
- [22] CANAVESE M, NGO D T, MADDERN G J, et al. Biology and therapeutic implications of VEGF-A splice isoforms and single-nucleotide polymorphisms in colorectal cancer[J]. *Int J Cancer*, 2017, 140(10): 2183-2191. DOI:10.1002/ijc.30567.
- [收稿日期] 2019-07-29 [修回日期] 2019-11-24
[本文编辑] 党瑞山