论著

文章编号:1000-5404(2013)10-0956-05

# 共培养体系中卵巢癌细胞对内皮祖细胞成管及MMP-2和MMP-9表达的影响

陈振波,赵俪梅,罗艳梅,阎 萍,梁志清 (400038 重庆,第三军医大学西南医院妇产科)

[摘要] **目的** 观察血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)对共培养体系中(EPCs + SKOV3)内皮祖细胞(endothelial progenitor cells,EPCs)的成管能力和MMP-2、MMP-9的表达影响。**方法** 采用密度梯度离心法分离EPCs,先在Matrigel基质胶中测定其成管能力,再与SKOV3共培养后测定成管能力,最后在共培养体系中加入不同浓度的血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)抗体再分别测定不同浓度抗体组的EPCs成管能力。采用RT-qPCR及Western blot测定不同浓度抗体组EPCs中MMP-9、MMP-2的表达量。**结果** EPCs单独成管时管腔个数为(18.00 ± 1.00),较共培养组(36.33 ± 1.52)明显降低($P < 0.05$)。加入25、50、100 μg VEGF抗体的共培养组EPCs成管个数分别为32.00 ± 1.00、26.33 ± 0.57、20.33 ± 1.15,均较共培养组降低($P < 0.05$)。RT-qPCR及Western blot结果显示:共培养组MMP-2和MMP-9 mRNA相对表达倍数较EPCs组分别上调了4.36、3.34倍($P < 0.05$),蛋白表达量上调了2.99、6.63倍($P < 0.05$);加入VEGF抗体100、50 μg的共培养组的MMP-2 mRNA相对表达倍数较共培养组分别下调了2.08、2.11倍($P < 0.05$),蛋白表达下调了2.12、1.71倍($P < 0.05$);加入VEGF抗体100 μg的共培养组的MMP-9 mRNA相对表达倍数较共培养组下调2.13倍($P < 0.05$),蛋白表达下调了2.94倍($P < 0.05$)。**结论** SKOV3可能通过分泌VEGF调节EPCs MMP-2、MMP-9蛋白的表达,从而促进EPCs的成管能力。

[关键词] 内皮祖细胞;共培养;新生血管化,病理性;细胞系,肿瘤
[中图法分类号] R394.2;R730.23;R737.31 [文献标志码] A

# Effect of ovarian cancer cells on MMP-2 and MMP-9 expression and tube formation of endothelial progenitor cells in co-culture system

Chen Zhenbo, Zhao Limei, Luo Yanmei, Yan Ping, Liang Zhiqing (Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, Chongqing)

[**Abstract**] **Objective** To observe the effect of vascular endothelial growth factor on the capacity of tube formation and expression of MMP-2 and MMP-9 in endothelial progenitor cells (EPCs) after co-cultured with ovarian cancer cell line SKOV3. **Methods** Density gradient centrifugation was used to isolate EPCs. The capacity of tube formation was determined in EPCs that was cultured in Martigel (EPCs group) and co-cultured with SKOV3 cells (co-culture group), respectively, and the tube formation capacity of EPCs was also determined after adding different concentrations of anti-VEGF antibody in the co-culture system. RT-qPCR and Western boltting were applied to determine the expression of MMP-2/MMP-9 in EPCs. **Results** The average number of tube formation in the EPCs group (18.00 ± 1.00) was significantly lower than that in the co-culture group (36.33 ± 1.52) ($P < 0.05$). The average numbers of tube formation in the co-culture group added with 25, 50 and 100 μg of anti-VEGF antibody were 32.00 ± 1.00, 26.33 ± 0.57 and 20.33 ± 1.15, respectively, which were all less than that in the co-culture group without anti-VEGF antibody ($P < 0.05$). The results of RT-qPCR and Western blotting showed that the co-culture group showed an increase in the mRNA and protein expression of MMP-2 and MMP-9 as compared with the EPCs group by 4.36 fold ($P < 0.05$), 3.34 fold ($P < 0.05$) and 2.99 fold ($P < 0.05$), and 6.63 fold ($P < 0.05$), respectively. Adding with 100 and 50 μg anti-VEGF antibody into the co-culture group resulted in an inhibition in the mRNA and protein expression of MMP-2 by 2.08 fold ($P < 0.05$) and 2.11 fold ($P < 0.05$), and 2.12 fold ($P < 0.05$) and 1.71 fold ($P < 0.05$), respectively. Adding 100 μg anti-VEGF antibody into the co-culture group resulted in an inhibition in the mRNA and proteins expression of MMP-9 by 2.13 fold ($P < 0.05$) and 2.94 fold ($P < 0.05$), respectively.

[基金项目] 国家自然科学基金(30801235)
[通信作者] 梁志清,E-mail:zhi.lzliang@gmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130228.1713.005.html(2013-02-28)

**Conclusion** SKOV3 cells may regulate the expression of MMP-2 and MMP-9 in EPCs by secreting VEGF, thereby promoting the tube formation capacity of EPCs.

[**Key words**] endothelial progenitor cells; co-culture; neovascularization; pathology; cell line; tumor

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30801235). Corresponding author: Liang Zhiqing, E-mail: zhi.lzliang@gmail.com

卵巢癌的高致死率主要原因是转移和复发,新生血管生成是肿瘤的浸润和转移的关键因素。肿瘤血管生成受多种因素调控,目前多数学者均认为VEGF是新生血管的必要因素,一方面通过作用于内皮细胞,促进细胞增殖,诱导肿瘤新生血管生成,另一方面通过增加肿瘤血管通透性,增强肿瘤细胞侵袭性进而促进肿瘤转移[1]。其中内皮祖细胞(endothelial progenitor cells,EPCs)是成熟内皮细胞的前体细胞,同时也是VEGF作用的对象,在参与肿瘤新生血管的生成中也有重要作用;基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs) MMP-2、MMP-9参与了许多重要的病理和生理过程,对促进恶性肿瘤细胞的侵袭和转移有重要作用,可以降解新生血管基底膜,促进肿瘤血管形成,而且还能直接破坏细胞外基质(extracellular matrix, ECM)促进肿瘤的侵袭和转移[2]。目前对于VEGF和MMPs对肿瘤新生血管生成的作用大多数是分开讨论研究,因为二者在肿瘤血管生成有着相似的促进作用,可能二者之间会有相关性存在。因此,本实验采用体外共培养、RT-qPCR及Western blot技术探讨VEGF对EPCs成管特性及MMP-2、MMP-9表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

脐带血均来自重庆西南医院妇产科病房,经产妇或家属知情同意。在产妇足月顺产胎盘取出后,用无菌血袋(200 mL)采集脐带血,一般采血量为60~100 mL,每次细胞分离均在4 h内完成。EBM-2培养液、EGM-2 SingleQuots(Lonza公司),DMEM-F12培养基(HyClone公司),人淋巴细胞分离液(天津灏洋生物公司),0.25%胰酶、胎牛血清(SIGMA公司),Metrigel基质胶、Transwell非接触共培养小室、VEGF抗体、FITC-UEA-1、DiI-acLDL、FITC- CD34小鼠抗人单克隆IG1抗体、PE标记的VEGFR2小鼠抗人单克隆IG1抗体、FITC-AC133小鼠抗人单克隆IG1抗体、PE标记的小鼠IG1抗体、PE标记的小鼠IG1抗体(BD公司),RT-qPCR及Western blot试剂盒(海韵生物公司)。

### 1.2 脐血内皮祖细胞分离及培养

取脐带血100 mL与6%羟乙基淀粉20 mL混匀,在4 ℃静置2 h。小心吸取上清并与淋巴细胞分离液1∶1混合,常温下以400 g/min×20 min、加5减3加速度的条件离心,之后小心吸取白膜层。用PBS离心洗涤3遍,每次1 200 r/min×8 min,最后一次离心完毕后用EGM-2MV悬浮细胞并计数,调整细胞密度为$1\times10^6$/mL接种于6孔板中。将接种好的细胞放在37 ℃、5% $CO_2$培养箱中培养。培养至第3天时进行半量换液,取未贴壁细胞重新离心并接种于新的6孔板中继续培养,之后每3天进行1次半量换液。

### 1.3 EPCs的鉴定

1.3.1 细胞形态学变化 光学显微镜下直接观察细胞在1、7、14 d的形态变化。

1.3.2 免疫荧光检测细胞表面标志物 用4%多聚甲醛固定爬片第7天的细胞,PBS漂洗2次,每次5 min。向各爬片依次加入FITC-CD34、FITC-CD133、PE-VEGFR2抗体,在4 ℃下避光孵育30 min,PBS漂洗3次,最后在荧光显微镜下观察结果。

1.3.3 双吞试验 细胞培养第7天向爬片上滴加DiI-ac-LDL(10 μg/mL),放入37℃避光孵育1 h,用4%多聚甲醛固定;继续在爬片上滴加FITC-UEA-1(10 μg/mL),在37℃避光孵育1 h。PBS漂洗3次,50%缓冲甘油封片后激光共聚焦显微镜下观察结果[3]。

### 1.4 卵巢癌细胞SKOV3的复苏和培养

从液氮罐中取出SKOV3冻存管,37 ℃水浴解冻,溶解后吸出液体至离心管并加入血清充分混匀细胞,离心后用DMEM培养基悬浮细胞,接种在50 mL培养瓶中,放入5% $CO_2$、37 ℃孵箱中培养。每隔2 d换液1次,细胞镜下融合80%~90%时进行传代。

### 1.5 体外SKOV3与EPCs共培养

EPCs培养至第8天时将Transwell小室放入6孔板中,并在Transwell上室接种SKOV3细胞,Transwell的孔径为0.4 μm,可以使得两种细胞分隔开,不会影响细胞介质在两种细胞间的交换;VEGF抗体以25、50、100 μg在共培养第1天就加入各共培养孔板中。2 d后解除共培养系统,消化EPCs进行成管试验、Western blot及RT-qPCR检测。

### 1.6 EPCs体外成管试验

在冰上将无血清培养基100 μL与Metrigel基质胶1∶1混合,混合后铺被在24孔板中,避免气泡的产生,然后放入37 ℃孵箱30 min使其凝固;将单独培养第10天和共培养2 d后的EPCs消化,每孔加入$2\times10^4$细胞,放入孵箱培养24 h后显微镜下观察EPCs成血管数目。随机选取3个视野计管腔数目总和。

### 1.7 RT-qPCR检测EPCs中MMP-2、MMP-9的mRNA表达

收集6孔板中单独培养第10天和共培养第2天的EPCs,Trizol提取细胞总RNA,利用紫外分光光度计测定紫外260 nm/280 nm处光密度值比值计算mRNA表达量。引物序列由上海生工生物工程合成如下:MMP-2上游5′-CCCAGACAGTGGATGATGC-3′,下游5′-TTGTCCTTCCTCCCAGGTC-3′,产物大小为219 bp;MMP-9上游5′-CAGCTGTATTTGTTC-3′,下游5′-CTTGTCACGCCTCGG-3′,产物大小为213 bp;β-actin上游5′-ACCCCGTGCTGCTGACCGAG-3′,下游5′-TCCCGGCCAGCCAGGTCCA-3′,产物大小为249 bp。RT-qPCR总反应体系为20 μL。

94 ℃预变性5 min,94 ℃变性30 s,57 ℃退火30 s,72 ℃延伸30 s,共40个循环,最后72 ℃延伸10 min。分析其他各组EPCs相对于EPCs组MMP-2、MMP-9mRNA的表达倍数。

### 1.8 免疫印迹法检测EPCs中MMP-2、MMP-9蛋白水平表达

收集6孔板中单独培养第10天和共培养第2天的EPCs。裂解细胞提取总蛋白,以4 ℃、20 000×*g*离心30 min,去除细胞碎片后收集上清,用二辛可酸(BCA)法测定蛋白浓度。调节蛋白样品浓度为3 μg/μL,以聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳结束后将蛋白转移至硝酸纤维膜。将膜至于封闭液中(5%脱脂奶粉、1×PBST)37 ℃封闭2 h。加入Ⅰ抗兔抗人MMP-2和MMP-9(1∶200),37 ℃摇床4 h,1×PBST洗膜15 min×3次。加入Ⅱ抗鼠抗人GAPDH抗体(1∶2 000),4 ℃摇床过夜,1×PBST洗膜15 min×3次。将膜放入显影液中,显影5 min,取出后用水冲洗终止显色。

### 1.9 统计学分析

数据以$\bar{x} \pm s$表示,用SPSS 13.0统计软件,不同抗体浓度组分别与共培养组之间进行$t$检验。

## 2 结果

### 2.1 EPCs的鉴定

光镜观察EPCs形态发现,接种第1天呈漂浮的圆形细胞。在第3天后可发现部分细胞已经贴壁变形,呈梭形。培养第7天后细胞,贴壁细胞数量增加,大部分都已经变为梭形,镜下还可见较多的细胞团生长,中间是较圆形的细胞,外周是梭形细胞呈"放射状"。14 d后细胞大部分变为较大的圆形,类似"铺路石"形态,只有少量的细胞呈现梭形(图1)。免疫荧光检测细胞表面标志物,荧光显微镜下观察CD34、CD133、VEGFR2均呈阳性反应(图2)。经激光共聚焦显微镜观察鉴定,能够同时摄取DiI-ac-LDL和FITC-UEA-1的细胞是正在分化的内皮祖细胞(图3)。

### 2.2 VEGF抗体处理对EPCs体外成管的影响

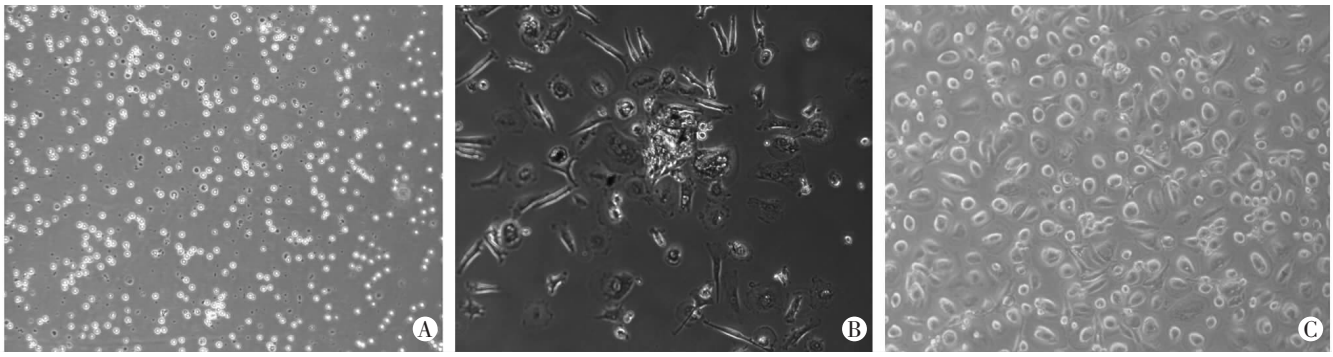
单独培养的EPCs组管腔数与共培养组(EPCs+SKOV3组)比较,差异有统计学意义(18.00±1.00 *vs* 36.33±1.52,$P<0.05$),加入VEGF抗体100、50、25 μg的共培养组管腔数分别与未加抗体的共培养组比较,差异有统计学意义(20.33±1.15、26.33±0.57、32.00±1.00 *vs* 36.33±1.52,$P<0.05$),见图4。

### 2.3 VEGF抗体处理对MMP-2和MMP-9 mRNA转录水平的影响

共培养组MMP-2和MMP-9 mRNA相对表达倍数较EPCs组分别上调了4.36、3.34倍($P<0.05$),加入VEGF抗体100、50 μg的共培养组的MMP-2 mRNA相对表达倍数较未加抗体的共培养组分别下调了2.08、2.11倍($P<0.05$);加入VEGF抗体100 μg的共培养组的MMP-9 mRNA相对表达倍数较未加抗体的共培养组下调2.13倍($P<0.05$)。见图5。

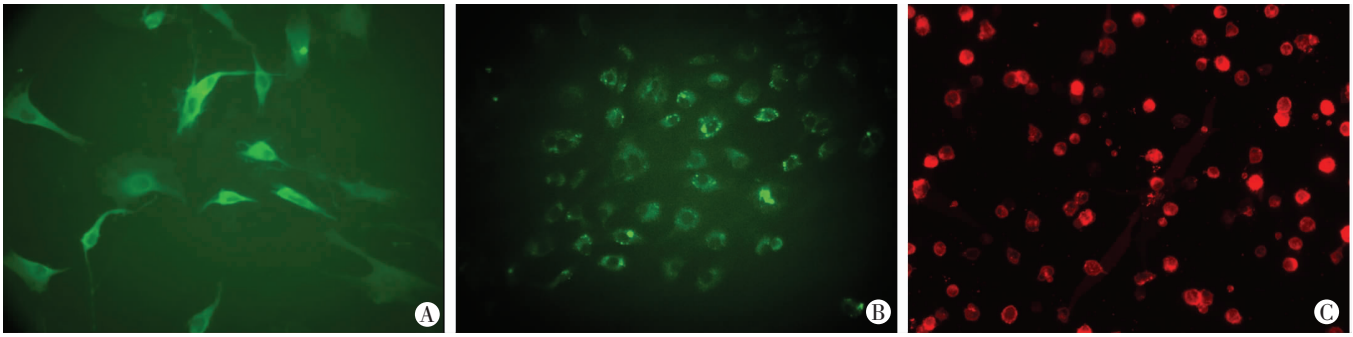
### 2.4 VEGF抗体处理后MMP-2和MMP-9的蛋白表达变化

共培养组的MMP-2和MMP-9的蛋白表达量较EPCs组上调了2.99、6.63倍($P<0.05$);加入VEGF抗体100 μg共培养组MMP-2和MMP-9的蛋白表达较未加抗体的共培养组分别下调了2.12、2.94倍($P<0.05$),在50 μg组中MMP-2和MMP-9分别下调了1.71、1.86倍($P<0.05$)。见图6、7。



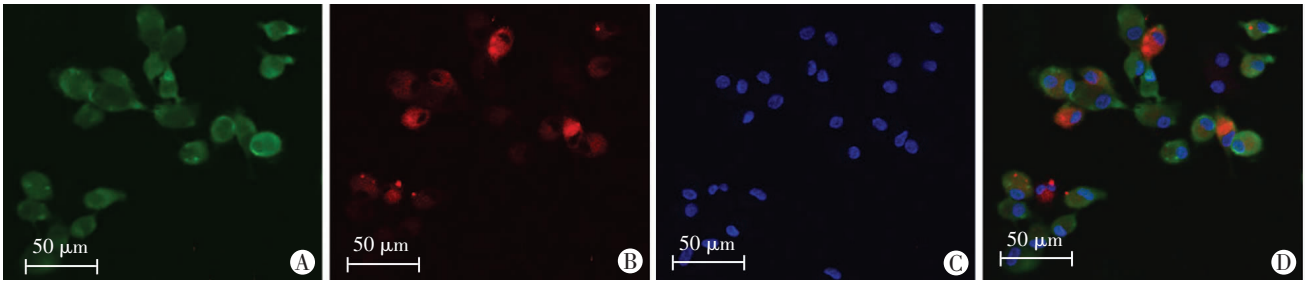

A:1 d(×100);B:7 d(×200);C:14 d(×200)

**图1 光镜下观察不同时间点EPCs的形态变化**



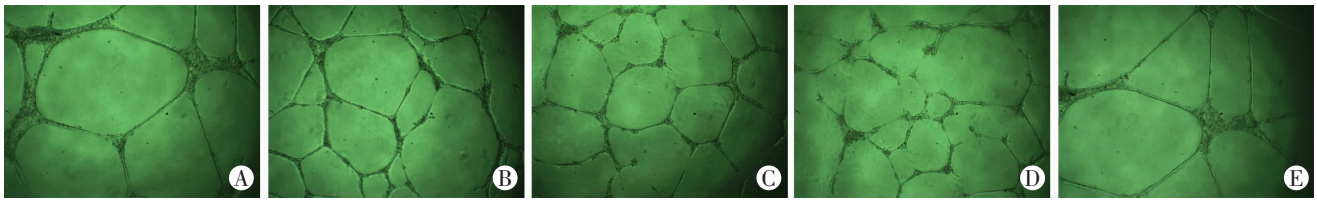

A:FITC-CD34(×400);B:FITC-CD133(×200);C:PE-VEGFR2(×100)

**图2 免疫荧光观察细胞表面标志物表达**



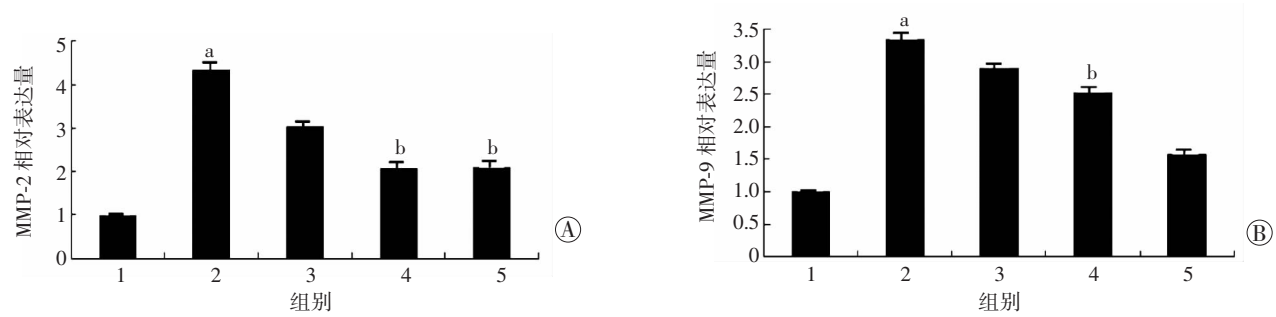

A:FITC-UEA-1;B:DiI-acLDL;C:DAPI;D:融合图

**图 3　激光共聚焦显微镜 EPCs 双染色鉴定**



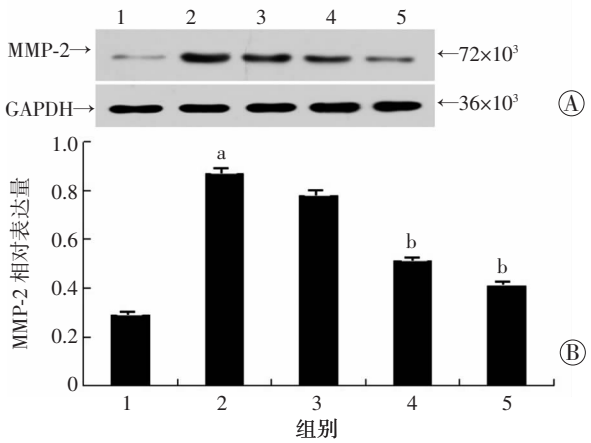

A:EPCs 组;B: EPCs + SKOV3 组;C:EPCs + SKOV3 + 25 μg 抗体组;D:EPCs + SKOV3 + 50 μg 抗体组 E: EPCs + SKOV3 + 100 μg 抗体组

**图 4　光镜下观察 VEGF 抗体处理对 EPCs 体外成管的影响　(×400)**



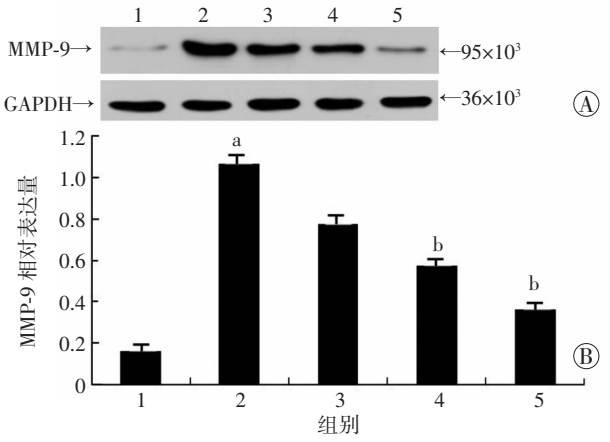

1:EPCs 组;2:EPCs + SKOV3 组;3:EPCs + SKOV3 + 25 μg 抗体组;4:EPCs + SKOV3 + 50 μg 抗体组;5:EPCs + SKOV3 + 100 μg 抗体组;a: $P < 0.05$,与 EPCs 组比较;b: $P < 0.05$,与 EPCs + SKOV3 组比较

**图 5　RT-qPCR 检测各组中 MMP-2(A)、MMP-9(B) mRNA 的表达**




1:EPCs 组;2:EPCs + SKOV3 组;3:EPCs + SKOV3 + 25 μg 抗体组;4:EPCs + SKOV3 + 50 μg 抗体组;5:EPCs + SKOV3 + 100 μg 抗体组; a: $P < 0.05$,与 EPCs 组比较;b: $P < 0.05$,与 EPCs + SKOV3 组比较　A: Western blot;B:半定量分析

**图 6　Western blot 检测各组 MMP-2 蛋白的表达**




1:EPCs 组;2:EPCs + SKOV3 组;3:EPCs + SKOV3 + 25 μg 抗体组;4:EPCs + SKOV3 + 50 μg 抗体组;5:EPCs + SKOV3 + 100 μg 抗体组; a: $P < 0.05$,与 EPCs 组比较;b: $P < 0.05$,与 EPCs + SKOV3 组比较　A: Western blot;B:半定量分析

**图 7　Western blot 检测各组 MMP-9 蛋白的表达**

## 3　讨论

自从“血管形成决定肿瘤生长”在 1971 年被提出后[4],肿瘤血管就一直成为了研究热点。肿瘤通过自身分泌多种血管生成因子来维持自身生长、浸润和转移,其中 VEGF 最为关键,它是目前为止发现的对内皮细胞最具特异性的一种血管生长因子,通过作用于内

皮细胞上特异性受体 VEGFR2,刺激内皮细胞增殖,促进新生血管生长,增加血管通透性,为肿瘤的侵袭和转移创造条件[5]。于是抗 VEGF 治疗肿瘤血管生成进入了该研究领域,并取得了较大的成果,在卵巢癌研究方面严瑞兰等[6]通过转染抗 VEGF 发卡状核酶基因抑制卵巢癌细胞分泌 VEGF,发现肿瘤增殖及血管生成均下降。本实验中采取 EPCs 与 SKOV3 非接触共培养模式,建立造肿瘤细胞分泌 VEGF 作用于 EPCs 表面特异性 VEGFR2 受体的条件,再通过 VEGF 抗体阻断这一作用途径后达到了减少 EPCs 成管的形成,这说明抗 VEGF 可以减少 EPCs 成血管作用,但是具体是通过何种路径发挥作用并不清楚。MMPs 最初在血管损伤修复方面研究较多,在机体血管内皮损伤或者肢体缺血时,会动员骨髓细胞中 EPCs 向损伤缺血部位移动,MMP-2、MMP-9 在这一过程中起到重要作用,促进 EPCs 修复损伤血管和在缺血部位形成新生血管[7-8]。另外,在肿瘤血管生成研究方面,研究[9-10]通过上调 EPCs 表达的 MMPs,发现 EPCs 在肿瘤中生成血管能力明显增强,然而抑制了 EPCs 表达的 MMPs,EPCs 参与肿瘤新生血管生成明显减少[11]。这说明 EPCs 的 MMPs 表达增高促进了肿瘤血管生成。在肿瘤的生长过程中,随着肿瘤不断地增大,肿瘤内部会逐渐形成一个缺氧、缺血的微环境,不仅肿瘤细胞分泌 VEGF 增加,还会促进内皮细胞的增殖、迁移和新生血管生成,而且此时 MMP-2、MMP-9 表达均显著增高[12-13]。这可能是 VEGF 分泌增加后通过作用于内皮细胞促进了 MMP-2、MMP-9 的表达[14]。本实验在 EPCs 和 SKOV3 共培养条件下,EPCs 的成血管能力及 MMP-2、MMP-9 的蛋白表达较单独培养时明显上升,之后共培养组在不同量的 VEGF 抗体(25、50、100 μg)作用下,EPCs 的成血管能力及 MMP-2、MMP-9 的蛋白表达都随 VEGF 抗体量的增加而下降。这提示阻断 EPCs 表面 VEGF 受体后可能是通过降低 EPCs 的 MMP-2 和 MMP-9 表达,进而抑制 MMP-2 和 MMP-9 促进 EPCs 成血管的作用。这与 Zhang 等[15]在通过抑制 VEGFR2 后发现降低了 EPCs 的 MMP-9 表达,进而抑制了其生成血管能力的结果基本一致。

综上所述,卵巢癌细胞系 SKOV3 可能通过分泌 VEGF 作用于 EPCs 表面特异性受体 VEGFR2,促进 EPCs 表达 MMP-2 和 MMP-9 并作用于 EPCs 本身,进而使得成血管能力明显上升。再阻断 VEGF 后发现可以下调 EPCs 的 MMP-2、MMP-9 表达及其成血管能力,VEGF 与 MMP-2、MMP-9 在促进 EPCs 成血管能力中起到协同作用。这提示 MMP-2、MMP-9 是抗 VEGF 治疗肿瘤血管生成途径中不可忽视的重要因素。本实验结果可能为抗 VEGF 治疗肿瘤血管生成提供新的思路,在抗 VEGF 促进生成肿瘤血管中 MMP-2、MMP-9 也可能成为重要靶点,同时还需要进一步的体内及药物试验研究证实。

## 参考文献:


[1] 丁永清, 万桂华. 生长因子与卵巢癌的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2006, 6(3): 45-47.

[2] Huang G J, Yang C M, Chang Y S, *et al*. Hispolon suppresses SK-Hep1 human hepatoma cell metastasis by inhibiting matrix metalloproteinase-2/9 and urokinase-plasminogen activator through the PI3K/Akt and ERK signaling pathways[J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(17): 9468-9475.

[3] Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, *et al*. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease [J]. Circ Res, 2001, 89(1): E1-E7.

[4] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications[J]. N Engl J Med, 1971, 285(21): 1182-1186.

[5] Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer[J]. J Clin Oncol, 2003, 21(14): 2787-2799.

[6] 严瑞兰, 钱新华, 辛晓燕, 等. 抗 VEGF 发夹状核酶基因抑制 VEGF 表达及卵巢癌细胞增殖的实验研究[J]. 癌症, 2002, 21(1): 39-44.

[7] Heissig B, Rafii S, Akiyama H, *et al*. Low-dose irradiation promotes tissue revascularization through VEGF release from mast cells and MMP-9-mediated progenitor cell mobilization[J]. J Exp Med, 2005, 202(6): 739-750.

[8] Hawinkels L J, Zuidwijk K, Verspaget H W, *et al*. VEGF release by MMP-9 mediated heparan sulphate cleavage induces colorectal cancer angiogenesis[J]. Eur J Cancer, 2008, 44(13): 1904-1913.

[9] Yip H K, Sun C K, Tsai T H, *et al*. Tissue plasminogen activator enhances mobilization of endothelial progenitor cells and angiogenesis in murine limb ischemia[J]. Int J Cardiol, 2012, pii: S0167-5273(12)01196-5. [Epub ahead of print]

[10] Chakroborty D, Chowdhury U R, Sarkar C, *et al*. Dopamine regulates endothelial progenitor cell mobilization from mouse bone marrow in tumor vascularization[J]. J Clin Invest, 2008, 118(4): 1380-1389.

[11] Ohga N, Hida K, Hida Y, *et al*. Inhibitory effects of epigallocatechin-3 gallate, a polyphenol in green tea, on tumor-associated endothelial cells and endothelial progenitor cells[J]. Cancer Sci, 2009, 100(10): 1963-1970.

[12] Erdozain O J, Pegrum S, Winrow V R, *et al*. Hypoxia in abdominal aortic aneurysm supports a role for HIF-1α and Ets-1 as drivers of matrix metalloproteinase upregulation in human aortic smooth muscle cells[J]. J Vasc Res, 2011, 48(2): 163-170.

[13] Pratheeshkumar P, Kuttan G. Nomilin inhibits tumor-specific angiogenesis by downregulating VEGF, NO and proinflammatory cytokine profile and also by inhibiting the activation of MMP-2 and MMP-9 [J]. Eur J Pharmacol, 2011, 668(3): 450-458.

[14] Wang F Q, So J, Reierstad S, *et al*. Vascular endothelial growth factor-regulated ovarian cancer invasion and migration involves expression and activation of matrix metalloproteinases[J]. Int J Cancer, 2006, 118(4): 879-888.

[15] Zhang J, Zhao P, Fu Z, *et al*. Glioma cells enhance endothelial progenitor cell angiogenesis *via* VEGFR-2, not VEGFR-1[J]. Oncol Rep, 2008, 20(6): 1457-1463.


(**收稿**:2012-12-24;**修回**:2013-01-23)

(编辑 吴培红)