文章编号:1000-5404(2014)05-0487-05

论著

色素上皮衍生因子在不同时期婴幼儿血管瘤组织中的表达

李 铭[1],郭志辉[1],陈昭宏[2],谢义德[1],周亚宽[1],江成鸿[1],陈小松[1],詹明坤[1],王立敏[1] (350001 福州,福建医科大学附属协和医院:整形外科[1],烧伤科[2])

[摘要] **目的** 研究不同时期婴幼儿血管瘤病灶内色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor,PEDF)表达水平的差异以及与婴幼儿血管瘤增殖、消退的关系。**方法** 选择2010年5月至2012年6月来我科就诊,选择手术切除的血管瘤新鲜标本63例作为研究对象,根据Mulliken标准将其分为增生期(32例)及消退期(31例)。采用免疫组化、实时荧光定量RT-PCR,检测病灶组织内PEDF、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)表达水平的变化,并通过CD34、Ki-67免疫组化染色,计算病灶内微血管密度(microvessel density, MVD)和Ki-67阳性率,分析与PEDF、VEGF表达水平的相关性。**结果** 免疫组化与实时荧光定量RT-PCR结果均提示,增生期血管瘤病灶内PEDF表达水平明显低于消退期($P<0.05$),而VEGF表达水平则明显高于消退期($P<0.05$),且增生期、消退期血管瘤病灶PEDF/VEGF比值也存在统计学差异($P<0.05$)。PEDF表达水平与MVD、Ki-67呈负相关,而VEGF表达水平则与MVD、Ki-67呈正相关。**结论** PEDF与VEGF在婴幼儿血管瘤增殖、消退过程中起调节作用,PEDF可能与婴幼儿血管瘤自发消退密切相关。

[关键词] 血管瘤;增生;消退;PEDF;VEGF
[中图法分类号] R730.23; R732.2 [文献标志码] A

Expression of pigment epithelium-derived factor in different phases of infantile hemangiomas

Li Ming[1], Guo Zhihui[1], Chen Zhaohong[2], Xie Yide[1], Zhou Yakuan[1], Jiang Chenghong[1], Chen Xiaosong[1], Zhan Mingkun[1], Wang Limin[1] ([1]Department of Plastic Surgery, [2]Department of Burns, Affiliated Fujian Union Hospital, Fujian Medical Universtiy, Fuzhou, Fujian Province, 350001, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression differences of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in the proliferating and regressing phases of infantile hemangiomas and their correlation with the proliferation and regression. **Methods** A total of 63 children with infantile hemangiomas admitted in our department from May 2010 to June 2012 were enrolled in this study. They all received selective surgery, and the obtained fresh specimens were divided into proliferating phage group ($n=32$) and regressing phage group ($n=32$) according to Mulliken. The expression of PEDF, vascular endothelial growth factor (VEGF), Ki-67 and CD34 in the specimens at mRNA and protein levels was examined with quantitative real-time RT-PCR and immunohistochemical assay. Microvessel density (MVD) and rate of Ki-67 positive cells were analyzed with the expression of PEDF and VEGF. **Results** The protein and mRNA expression of PEDF were significantly lower in proliferative phase than in regressing phase ($P<0.05$), while the protein and mRNA expressions of VEGF were much higher ($P<0.05$). The expression ratio of PEDF/VEGF had significant difference between the 2 phases ($P<0.05$). Significant positive correlation was found between the changes of MVD and Ki-67 and the expression of VEGF, while, negative correlation was seen between the changes and the expression of PEDF. **Conclusion** PEDF and VEGF play regulating roles in the proliferation and regression of infantile hemangiomas. PEDF might be correlated with the spontaneous regression of infantile hemangiomas.

[**Key words**] hemangiomas; proliferation; regression; pigment epithelium-derived factor; vascular endothelial growth factor

Supported by the Foundation for Young Scholars of Fujian Provincial Department of Health(2013-1-28). Corresponding author: Guo Zhihui, E-mail: guokex@tom.com

[基金项目] 福建省卫生厅青年基金(2013-1-28)
[通信作者] 郭志辉,E-Mail:guokex@tom.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131219.2029.015.html(2013-12-19)

婴幼儿血管瘤是婴幼儿最常见的良性肿瘤。发病率约10%,尤以早产儿、低体质量儿好发(30%)[1]。自然病程多分为3个阶段:增生期、稳定期和消退期[2]。目前认为,血管瘤基本发生机制是血管生长及修复的紊乱,其主要的特征是毛细血管的内皮细胞过度增生。但其确切的发病机制尚未完全清楚,目前普遍认可的观点是血管瘤发生、发展与血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等促血管生成因子高表达有关。而血管生成和维持稳定受血管增生刺激因子和抑制因子网络的精密调控。色素上皮细胞衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)是目前发现的最有效的内源性新生血管抑制因子。PEDF与VEGF的比值(PEDF/VEGF)可以反映血管增生促进因子与抑制因子平衡关系[3]。本研究通过研究增生期及消退期婴幼儿血管瘤病灶组织内PEDF、VEGF以及CD34(并计算微血管密度MVD)、Ki-67表达水平的变化,初步探讨PEDF在婴幼儿血管瘤发生、发展以及消退病程中的作用。

1 资料与方法

1.1 标本来源

本研究经医院伦理委员会审核批准,并经患儿监护人书面同意。选择于2010年5月至2012年6月在福建医科大学附属协和医院整形外科接受手术治疗的63例血管瘤患儿作为研究对象,年龄2个月至5岁7个月,肿瘤发生部位包括头顶、额部、四肢、腹壁、背部等。根据Mulliken标准将其分为增生期(32例)及消退期(31例)。排除有先天性疾病、基础性疾病、产伤史、窒息史、新生儿黄疸史以及家族性遗传疾病史的患儿。

1.2 试剂与设备

1.2.1 免疫组化试剂 浓缩型鼠抗人PEDF单克隆抗体(Millipore公司),即用型鼠抗人CD34单克隆抗体(福州迈新公司),即用型鼠抗人VEGF单克隆抗体(福州迈新公司),即用型鼠抗人Ki-67单克隆抗体(福州迈新公司),辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠IgG抗体试剂盒(中杉金桥公司,PV9002),抗原修复液(中杉金桥公司),DAB显色试剂盒(中杉金桥公司)等。

1.2.2 实时荧光定量RT-PCR试剂 Trizol(TaKaRa RNAiso plus),异丙醇(上海生工),逆转录试剂盒(TaKaRa PrimeScript® RT reagent Kit,DRR037A),荧光定量试剂盒(TaKaRa SYBR® Premix *Ex Taq*™Ⅱ,DRR820A),内参引物(TaKaRa Human-GAPDH-Primer)(B702A),基因编号:NM_002046.3,引物序列为:上游:5′-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3′,下游:5′-TGGTGAAGACG-CCAGTGGA-3′。其余引物由TaKaRa公司设计合成。其中PEDF引物基因编号:NM_002615.5,序列为:上游:5′-GAAGCTGAGTTATGAAGGCGAAGTC-3′,下游:5′-CCTGT-GATCTTGCTAAAGTCTGGTG-3′。VEGF引物基因编号:NM_001025366.2,序列为:上游:5′-GAGCCTTGCCTTGCTGCTCTA-3′,下游:5′-CACCAGGGTCTCGATTGGATG-3′。

1.2.3 主要设备 Eppendorf Centrifuge 5430R高速低温离心机,Applied BioSystems 2720 Thermal Cycler PCR仪,Applied BioSystems 7500荧光定量PCR仪,Thermo NANO DROP 1000分光光度计+ND1000 V3.6.0分析软件等。

1.3 方法

1.3.1 组织材料处理 将收集的手术切除标本用无菌PBS溶液洗净,切取1~2 mm^3小块,置入液氮罐内冻存。其余标本浸入10%中性甲醛溶液内固定,并将组织块经脱水透明、浸蜡包埋等处理后,制成4 μm厚组织薄切片。

1.3.2 普通HE染色 切片置70 ℃恒温1.5 h烤片;常规脱蜡及水化;PBS冲洗2 min×3次;苏木精染色2 min,1%盐酸酒精分化;流动双蒸水中冲洗30 min;伊红染色2 min;流动双蒸水冲洗30 min;常规梯度脱水、透明,中性树脂封片。将切片置于光镜下观察并拍照。观察组织及细胞形态是否符合增生期、消退期形态特点。

1.3.3 免疫组化染色 选择PBS代替Ⅰ抗作为阴性对照,选择已确定阳性表达的样本作阳性对照,参照PV9002试剂盒说明操作。将组织切片放入70 ℃恒温烤箱中1.5 h;常规脱蜡及水化;滴加3%过氧化氢去离子水溶液,室温孵育4 min;抗原修复液中热修复2 min;滴加Ⅰ抗,室温孵育2 h;滴加聚合物辅助剂,室温孵育15 min;滴加辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠IgG抗体(Ⅱ抗),室温孵育15 min;每步骤间用PBS溶液冲洗3 min×5次。滴加DAB显色5 min;双蒸水中洗涤5 min;苏木精复染2~3 min,1%盐酸酒精分化;双蒸水冲洗10~15 min;常规梯度脱水、透明,中性树脂封片,镜下观察并拍照。应用Image Pro Plus 6.0软件,计算每张切片的阳性反应平均积分光密度、阳性反应面积,计算阳性面积率。计算每张切片的微血管密度(MVD)值以及Ki-67阳性率。

1.3.4 RNA提取及实时荧光定量RT-PCR 提取各样本组织RNA,RNA纯度及浓度要求:$D(260)/D(280)$介于1.85~2.00,浓度≥100 ng/μL。不符合者重新提取RNA。按照DRR037A逆转录试剂盒说明,配置80 μL逆转录反应体系,按37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s,4 ℃进行反转录。将获得的cDNA样本按DRR820A荧光定量试剂盒说明,在96孔PCR反应板上配置标准20 μL反应体系,每个样品均设3个复孔。置于荧光定量PCR仪内,按两步法标准PCR扩增程序进行反应(95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s-60 ℃ 34 s,并循环40次,95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,95 ℃ 15 s)。保存并确认Real-time PCR的扩增曲线和融解曲线。将cDNA样本按10倍梯度稀释后,绘制标准曲线,计算扩增效率。用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各指标相对于内参GAPDH的相对表达量。

1.4 统计学方法

(1)正态分布的数值以$\bar{x} \pm s$表示,采用t检验。非正态分布的数值以中位数/4分位间距表示,采用秩和检验。(2)相关性分析:两个正态分布的数值计算Pearson积差相关系数,否则用Spearsman相关性分析。(3)除实时荧光定量RT-PCR检验结果用REST 2009软件外,其余利用SPSS 19.0统计软件分析。

2 结果

2.1 HE染色观察病灶组织及细胞形态

增生期血管瘤组病灶内新生血管排列致密,部分内皮细胞呈团块状增生,血管内皮细胞胞核肥大而淡染。消退期血管瘤组病灶内血管不同程度较治疗前排列稀疏,血管腔增大,周围结缔组织或脂肪组织浸润增多。血管内皮细胞胞核扁平,染色较深(图1)。

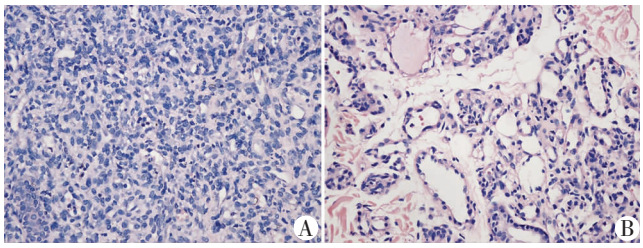


图 1 HE 染色观察增生期(A)与消退期(B)病灶组织及细胞形态 (×400)

2.2 免疫组化染色观察不同时期血管瘤组织 CD34、Ki-67、PEDF、VEGF 蛋白表达

2.2.1 CD34 染色结果与 MVD 计数情况 CD34 主要表达于血管内皮细胞胞浆中。增生期血管瘤组病灶内新生血管致密,部分内皮细胞呈团块状增生,内皮细胞胞浆内有大量浓密棕黄色颗粒。计算 MVD 值为(92.396 5±7.942 4)。消退期血管瘤组病灶内新生血管密度明显减低,血管腔增大,周围结缔组织增多,内皮细胞胞浆内棕黄色浓度较前减低。计算 MVD 值为(37.185 7±4.791 7)。二者差异存在统计学意义(t = 33.275, P < 0.05,图 2)。

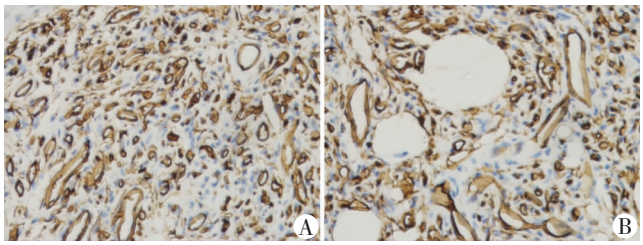


图 2 增生期(A)与消退期(B)血管瘤病灶内 CD34 的表达及新生血管密度 (polymer HRP ×400)

2.2.2 Ki-67 染色情况及 Ki-67 阳性率 Ki-67 主要表达于血管内皮细胞胞核内,阳性反应呈深棕色团块状。增生期血管瘤组病灶 Ki-67 阳性率为:41.54%/9.85%,消退期组血管瘤病灶 Ki-67 阳性率为:9.68%/2.75%。二者差异有统计学意义(Z = −6.819, P < 0.05,图 3)。

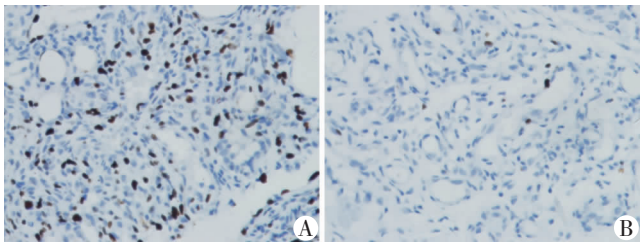


图 3 增生期(A)与消退期(B)血管瘤病灶内 Ki-67 的表达 (polymer HRP ×400)

2.2.3 PEDF、VEGF 染色情况 PEDF、VEGF 蛋白均主要定位于血管内皮细胞胞浆内。其中增生期血管瘤组病灶内 PEDF 表达水平明显低于消退期组(PEDF 染色示增生期组胞浆内棕黄色颗粒明显少于消退期组),而 VEGF 表达水平则明显高于消退期组(VEGF 染色示增生期组胞浆内棕黄色颗粒明显多于消退期组)。上述因子治疗前后表达水平差异均具有统计学意义(P < 0.05)。同时 PEDF 与 VEGF 平均积分光密度、平均阳性面积率比值在增生期与消退期血管瘤组亦存在统计学差异(P < 0.05,表 1,图 4、5)。

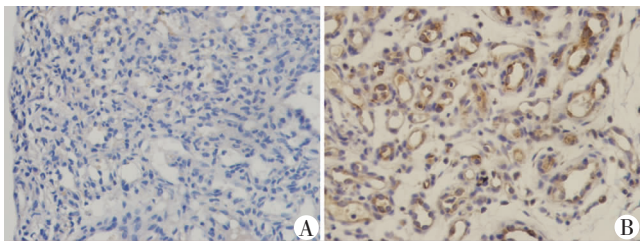


图 4 增生期(A)与消退期(B)血管瘤病灶内 PEDF 蛋白的表达 (polymer HRP ×400)

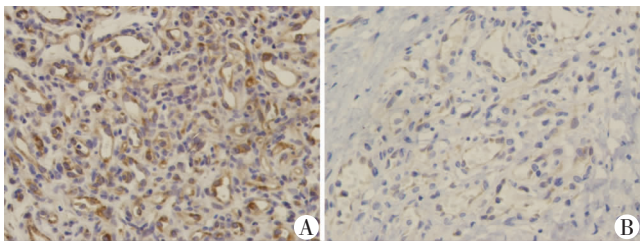


图 5 增生期(A)与消退期(B)血管瘤病灶内 VEGF 蛋白的表达 (polymer HRP ×400)

2.3 实时荧光定量 RT-PCR 检测不同时期血管瘤组织 PEDF、VEGF mRNA 相对表达量

各样本各指标扩增曲线均已到达平台期,3 个复孔重复性良好。融解曲线形成高窄单峰,未检测到引物二聚体形成。增生期血管瘤组病灶内 PEDF 转录水平较消退期组低,而 VEGF 转录水平较消退期组高,差异均有统计学意义(P < 0.05,表 2)。

表 2 增生期与消退期病灶实时荧光定量 RT-PCR

指标	$2^{-\Delta\Delta Ct}$(中位数/4 分位间距))		Z 值	P 值
	增生期病灶(n = 32)	消退期病灶(n = 31)		
PEDF	0.038 0/0.011 9	1.922 2/0.192 1	−6.819	<0.05
VEGF	2.309 1/0.381 9	0.036 0/0.004 5	−6.819	<0.05
PEDF/VEGF	0.164 1/0.008 1	53.418 1/12.244 3	−6.819	<0.05

GAPDH 的扩增效率为:1.993 721,PEDF 的扩增效率为:2.003 267,VEGF 的扩增效率为:1.992 673

2.4 MVD 值、Ki-67 阳性率与 PEDF、VEGF 蛋白及 mRNA 相对表达量相关性分析

MVD 值、Ki-67 阳性率与 PEDF 平均积分光密度、平均阳性面积率、mRNA 相对表达量呈负相关,而与 VEGF 平均积分光密度、平均阳性面积率、mRNA 相对表达量呈正相关,均具有统计学意义(均 P < 0.05),且相关水平较高。见表 3、4。

表 1 增生期、消退期病灶内 PEDF、VEGF 蛋白表达水平免疫组化检测结果

指标	平均积分光密度				平均阳性面积率			
	增生期病灶	消退期病灶	t 值(Z 值)	P 值	增生期病灶	消退期病灶	Z 值	P 值
PEDF	4.305 2±0.335 0	13.797 1±0.318 5	−115.187	<0.05	0.750 1/0.025 6	0.113 6/0.001 6	−6.819	<0.05
VEGF	18.392 5±0.259 2	4.557 4±0.300 2	195.985	<0.05	0.325 4/0.019 7	0.072 7/0.003 1	−6.819	<0.05
PEDF/VEGF	0.242 2/0.039 0	0.231 7/0.002 5	−6.819	<0.05	0.301 5/0.254 2	1.572 9/0.088 5	−6.819	<0.05

表3 MVD值、Ki-67阳性率与PEDF、VEGF蛋白表达水平的相关性

指标	MVD值				Ki-67阳性率			
	平均积分光密度		平均阳性面积率		平均积分光密度		平均阳性面积率	
	*r*值	*P*值	*r*值	*P*值	*r*值	*P*值	*r*值	*P*值
PEDF	−0.986	<0.05	−0.741	<0.05	−0.984	<0.05	−0.730	<0.05
VEGF	0.981	<0.05	0.999	<0.05	0.978	<0.05	0.997	<0.05
PEDF/VEGF	−0.999	<0.05	−0.998	<0.05	−0.969	<0.05	−0.996	<0.05

表4 MVD值、Ki-67阳性率与PEDF、VEGF mRNA相对表达量的相关性

指标	MVD值		Ki-67阳性率	
	*r*值	*P*值	*r*值	*P*值
PEDF	−0.994	<0.05	−0.992	<0.05
VEGF	0.998	<0.05	0.995	<0.05
PEDF/VEGF	−0.998	<0.05	−0.996	<0.05

3 讨论

目前普遍认为血管瘤的发生是由于血管发生及修复的紊乱所引起。血管发生异常是血管瘤形成的重要因素,其主要特征是毛细血管的内皮细胞增生。而血管内皮细胞增殖则是由于体细胞基因突变,导致控制内皮细胞生长的几种调节因子基因表达失调,使内皮细胞克隆性增生。已有研究发现婴幼儿血管瘤VEGF等因子的转录及表达在增生期都明显高于消退期,且增生期血管瘤内皮细胞及其邻近上皮细胞的VEGF等表达水平明显高于远处上皮细胞,说明在病变部位VEGF的高表达是增生期血管瘤内皮细胞异常增殖、瘤体快速增长的原因之一,表现为Ki-67高表达,大量微血管形成(新生血管密度MVD值增高)。但对于血管生成抑制因子在血管瘤病灶中的表达,特别是消退期血管瘤中是否高表达,并成为血管瘤能够自限的机制却鲜有研究。目前仅发现重组人血管内皮抑素可抑制鼠血管瘤内皮细胞株增殖,并促进其凋亡[4]。

PEDF属于丝氨酸蛋白酶抑制因子超家族成员,但本身不具备丝氨酸蛋白酶抑制功能。其基因全长约16 kb,定位于染色体17p13.1短臂末端,其所在区域包含一系列肿瘤相关的基因位点。进一步研究表明,PEDF是一种多功能蛋白,具有包括神经保护、神经营养、促进肿瘤细胞向神经元分化、促进神经干细胞自我更新、抑制新生血管形成、抗肿瘤等多种生物学功能。Dawson[3]和Matsui等[5]证明PEDF可特异性抑制体外培养的正常血管内皮细胞的增殖和迁移,诱导内皮细胞的凋亡,以及低氧诱导的视网膜血管增生,是最有效的内源性蛋白血管新生抑制因子,可能是维持角膜、玻璃体等眼内组织无血管的主要原因。另有研究显示PEDF可通过抑制VEGF表达,阻止肿瘤新生血管生成,抑制肺癌、肝癌、黑色素瘤、视网膜母细胞瘤、胰腺癌和前列腺癌的生长和浸润[6-11]。然而PEDF的抗肿瘤效果并不单单局限于抗血管生成,PEDF还能通过诱导肿瘤细胞分化(例如视网膜母细胞瘤、前列腺癌细胞)[12],通过Fas/FasL信号传导通路促进肿瘤细胞凋亡(如黑色素瘤、骨肉瘤、神经胶质瘤)[13-15],抑制肿瘤细胞迁移,发挥直接抗肿瘤的作用[13,16]。

本研究通过免疫组化及实时荧光定量RT-PCR实验方法,发现增生期组病灶内PEDF蛋白及mRNA表达水平均明显低于消退期组,而VEGF蛋白及mRNA表达水平则均明显高于消退期组。同时,所有样本中PEDF蛋白及mRNA表达水平与MVD值、Ki-67阳性率呈明显负相关,而VEGF蛋白及mRNA表达水平则与MVD值、Ki-67阳性率呈明显正相关。结果提示,PEDF与VEGF共同在婴幼儿血管瘤增殖、消退过程中起调节作用,PEDF与VEGF的比值(PEDF/VEGF)反映的血管增生促进因子与抑制因子平衡关系变化可影响Ki-67阳性率所反映的婴幼儿血管瘤体内血管内皮细胞增殖活跃度以及MVD值所反映的新生血管形成情况。PEDF可能与婴幼儿血管瘤自发消退密切相关。

目前婴幼儿血管瘤治疗方案大多并非针对血管瘤基本的发生机制——血管生长及修复的紊乱。因此,未来血管瘤治疗方案的发展方向应该是针对血管瘤发病机制,抑制新生血管形成,促进异常增殖的血管消退,诱导病灶提前进入消退期[17-18]。目前临床已有抑制血管增殖的药物——人源化VEGF单克隆抗体贝伐单抗(Bevacizumab, Avastin),其作用对象为VEGF,目前主要应用于抗肿瘤治疗,抑制肿瘤滋养血管形成。文献[19]报道将其用于中和黄斑区不正常的高浓度VEGF,从而抑制年龄相关性黄斑变性恶化,来治疗老年人常见的、可导致严重视力损伤的眼病。但尚无对婴幼儿患者的安全性和疗效的研究。且已有研究发现在幼年猕猴中,使用低于推荐剂量(以mg/kg为单位)的Avastin 4周后,观察到了发育不良,发生率和严重性呈剂量相关[20]。而内皮抑素和血管抑素应用于抑制肿瘤血管生长的研究提示,这些早先发现的血管抑制因子基因治疗肿瘤具有不稳定性,而直接应用蛋白质因子每天需要克级水平的高量蛋白,费用高且毒副作用大,因此更不适宜用于婴幼儿血管瘤的治疗。因此,人们开始把目光集中到研究和开发活性更强、性质更稳定的新型血管生成抑制因子。

PEDF作为目前发现的性质稳定、活性最强的血管生成抑制因子,在细胞实验[5,20-22]和体内实验[23-25]中均显示出极强的血管生成抑制效应,Dawson等[3]还发现PEDF在半数有效量基础上以剂量依赖方式特异性抑制内皮细胞迁移,其活性明显高于血管抑素、内

皮素。另外 PEDF 在人体多种组织中均有表达[5,26]，直接注射蛋白无明显毒副作用。Stellmach 等[25]通过腹腔内注射 PEDF 显著抑制了早产性视网膜病(ROP)小鼠模型的视网膜血管增生，无明显毒副作用，且最低有效剂量远低于上述其他血管抑制剂。Mori 等[26]通过眼内基因输送插入 PEDF 基因编码的腺病毒或腺相关病毒载体，在 3 种不同的眼血管增生模型中取得显著疗效。由于 PEDF 治疗的显著效果，美国 FDA 于 2003 年初批准 GenVec 生物制药公司应用 PEDF 进行年龄相关视网膜黄斑水肿和糖尿病性视网膜病的Ⅰ期临床试验(http://www.genvec.com)。

综上，PEDF 蛋白可能在婴幼儿血管瘤增殖及消退过程中发挥重要调节作用，并且现有关于 PEDF 在其他疾病的基础及临床应用研究亦提示 PEDF 蛋白有条件成为针对发病机制治疗婴幼儿血管瘤的新希望。

参考文献：

[1] Drolet B A, Swanson E A, Frieden I J, *et al*. Infantile hemangiomas: an emerging health issue linked to an increased rate of low birth weight infants[J]. J Pediatr, 2008, 153(5): 712 - 715.

[2] Eivazi B, Ardelean M, Baumler W, *et al*. Update on haemangiomas and vascular malformations of the head and neck[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2009, 266(2): 187 - 197.

[3] Dawson D W, Volpert O V, Gillis P, *et al*. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis[J]. Science, 1999, 285(5425): 245 - 248.

[4] 张翅，金先庆. 重组人血管内皮抑素对鼠血管瘤内皮细胞株 EOMA 增殖的影响[J]. 中华小儿外科杂志，2008，29(8)：475 - 478.

[5] Matsui T, Nishino Y, Maeda S, *et al*. PEDF-derived peptide inhibits corneal angiogenesis by suppressing VEGF expression[J]. Microvasc Res, 2012, 84(1): 105 - 108.

[6] Guo T, Gu C, Li B. PEDF inhibits growth and invasiveness of endometrial cancer cells *in vitro*[J]. Panminerva Med, 2012, 54(4): 299 - 304.

[7] Halin S, Wikström P, Rudolfsson S H, *et al*. Decreased pigment epithelium-derived factor is associated with metastatic phenotype in human and rat prostate tumors[J]. Cancer Res, 2004, 64(16): 5664 - 5671.

[8] Matsumoto K, Ishikawa H, Nishimura D, *et al*. Antiangiogenic property of pigment epithelium-derived factor in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2004, 40(1): 252 - 259.

[9] Cai J, Parr C, Watkins G, *et al*. Decreased pigment epithelium-derived factor expression in human breast cancer progression[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(11 Pt 1): 3510 - 3517.

[10] Demestre M, Terzi M Y, Mautner V, *et al*. Effects of pigment epithelium derived factor (PEDF) on malignant peripheral nerve sheath tumours (MPNSTs)[J]. J Neurooncol, 2013, 115(3): 391 - 399.

[11] Yang H, Cheng R, Liu G, *et al*. PEDF inhibits growth of retinoblastoma by anti-angiogenic activity[J]. Cancer Sci, 2009, 100(12): 2419 - 2425.

[12] Smith N D, Schulze-Hoepfner F T, Veliceasa D, *et al*. Pigment epithelium-derived factor and interleukin-6 control prostate neuroendocrine differentiation *via* feed-forward mechanism[J]. J Urol, 2008, 179(6): 2427 - 2434.

[13] Tan M L, Choong P F, Dass C R. Anti-chondrosarcoma effects of PEDF mediated via molecules important to apoptosis, cell cycling, adhesion and invasion[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 398(4): 613 - 618.

[14] Chen Q, Cheng P, Song N, *et al*. Antitumor activity of placenta-derived mesenchymal stem cells producing pigment epithelium-derived factor in a mouse melanoma model[J]. Oncol Lett, 2012, 4(3): 413 - 418.

[15] Takenaka K, Yamagishi S, Jinnouchi Y, *et al*. Pigment epithelium-derived factor (PEDF)-induced apoptosis and inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in MG63 human osteosarcoma cells[J]. Life Sci, 2005, 77(25): 3231 - 3241.

[16] Zhang T, Guan M, Xu C, *et al*. Pigment epithelium-derived factor inhibits glioma cell growth *in vitro* and *in vivo*[J]. Life Sci, 2007, 81(16): 1256 - 1263.

[17] Neri I, Balestri R, Patrizi A. Hemangiomas: new insight and medical treatment[J]. Dermatol Ther, 2012, 25(4): 322 - 334.

[18] Boscolo E, Bischoff J. Vasculogenesis in infantile hemangioma[J]. Angiogenesis, 2009, 12(2): 197 - 207.

[19] Kubicka-Trzaska A, Wilanska J, Romanowska-Dixon B, *et al*. Circulating antiretinal antibodies predict the outcome of anti-VEGF therapy in patients with exudative age-related macular degeneration[J]. Acta Ophthalmol, 2012, 90(1): e21 - e24.

[20] Gaudreault J, Shiu V, Bricarello A, *et al*. Concomitant administration of bevacizumab, irinotecan, 5-fluorouracil, and leucovorin: nonclinical safety and pharmacokinetics[J]. Int J Toxicol, 2005, 24(5): 357 - 363.

[21] Alcantara M B, Dass C R. Regulation of MT1-MMP and MMP-2 by the serpin PEDF: a promising new target for metastatic cancer[J]. Cell Physiol Biochem, 2013, 31(4/5): 487 - 494.

[22] Haurigot V, Villacampa P, Ribera A, *et al*. Long-term retinal PEDF overexpression prevents neovascularization in a murine adult model of retinopathy[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41511.

[23] Wang Q, Zhang Z, Ding T, *et al*. Mesenchymal stem cells over-expressing PEDF decreased the angiogenesis of gliomas[J]. Biosci Rep, 2012, [Epub ahead of print].

[24] Zheng D, Chen H, Davids J, *et al*. Serpins for diagnosis and therapy in cancer[J]. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2013, 13(2): 123 - 132.

[25] Stellmach V, Crawford S E, Zhou W, *et al*. Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(5): 2593 - 2597.

[26] Mori K, Gehlbach P, Yamamoto S, *et al*. AAV-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(6): 1994 - 2000.

(**收稿**：2013-09-23；**修回**：2013-11-27)

(编辑 黄 超)