

腺病毒介导的生长抑制基因 4 对 ECV304 细胞体外生长及分泌血管内皮生长因子的影响

张海峰^{1,2} 盛伟华² 缪竞诚² 陈卫东¹ 杨吉成²

[摘要]目的:检测腺病毒介导的生长抑制基因 4(adenovirus-mediated inhibitor of growth family member 4, Ad-ING4) 感染后 ECV304 细胞体外生长及分泌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 的影响,探讨 ING4 抑制肿瘤生长的可能机制。方法:构建 ING4 腺病毒载体,用 MTT 法检测 Ad-ING4 感染后 ECV304 细胞体外生长影响,ELISA 检测 VEGF 的分泌情况。结果:Ad-ING4 感染后第 3 天和第 4 天 ECV304 细胞体外生长均受到抑制($P < 0.01$),第 4 天时抑制率达 63.6%, VEGF 分泌受到抑制。结论:ING4 能抑制 ECV304 细胞生长及 VEGF 分泌。Ad-ING4 能抑制血管内皮细胞生长和血管的生成,从而可抑制体内肿瘤的生长。

[关键词] 腺病毒感染;生长抑制基因 4;血管内皮生长因子;血管生成

[中国图书资料分类法分类号] R 511.8 **[文献标识码]** A

The effect of adenovirus-mediated inhibitor of growth family member 4 on growth and vascular endothelial growth factor secretion of ECV304 cells

ZHANG Hai-feng^{1,2} SHENG Wei-hua² MIAO Jing-cheng² CHEN Wei-dong¹ YANG Ji-cheng²

(1. Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004;

2. Cell and Molecular Biology Institute, Suzhou University School of Medicine, Suzhou Jiangsu 215123, China)

[Abstract] Objective: To interpret the possible anti-tumor mechanism of adenovirus-mediated inhibitor of growth family member 4 (Ad-ING4) by testing the growth and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression of ECV304 cells infected by Ad-ING4.

Methods: Adenovirus vector of ING4 was constructed, then the growth of ECV304 cells was detected by MTT, and the VEGF expression of ECV304 cells infected by Ad-ING4 was detected by ELISA. **Results:** The VEGF expression of ECV304 cells infected by Ad-ING4 decreased, and the growth of ECV304 was inhibited, and the inhibition ratio was 63.6% on the fourth day. **Conclusions:** ING4 could down regulate the expression of VEGF and inhibit the growth of ECV304, and ING4 maybe through this way affect growth and tumor angiogenesis of lung cancer.

[Key words] adenovirus infections; inhibitor of growth family member 4; vascular endothelial growth factor; angiogenesis

腺病毒介导的生长抑制基因 4 (inhibitor of growth family member 4, ING4) 是新近发现的一种抑癌基因,具有抑制肿瘤细胞生长,诱导肿瘤细胞凋亡,抑制血管生成,抑制低氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor, HIF) 活性进而影响肿瘤对缺氧的耐受功能^[1-4]。通过氨基酸同源序列分析发现,人 ING4 (hING4) 和鼠 ING4 (mING4) 基因所编码的氨基酸组成有 99% 以上相同,仅有两个氨基酸不同,即 66 位与 156 位氨基酸在鼠为 R、A,而人为 K、T,因此我们在已成功克隆了 mING4 的基础上^[5],通

过定点突变技术,将 mING 基因序列进行了人源化改造,获得编码 hING4 氨基酸的基因序列。在此基础上构建了 Ad-ING4 重组腺病毒载体,并用 Ad-ING4 感染人脐静脉细胞系 ECV304,检测其对脐静脉细胞系生长及分泌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 pcDNA3.0-ING4 载体、*E. coli* 菌株 DH5 α 、细菌 BJ5183 及 ECV304 细胞为本室保存。PacI 和 PmeI 购自 New England Biolab 公司。pTrack-CMV 转移载体、pAdEasy-1 腺病毒载体和 QBI-293A 细胞为复旦大学钟江教授惠赠。Lipofectamine Reagent 为 Invitrogen 公司产品。VEGF ELISA 检测试剂盒购自晶美公司。

1.2 方法

1.2.1 mING4 基因人源化改造的点突变法 根据

[收稿日期] 2010-05-26

[基金项目] 安徽省高校省级自然科学基金资助项目(KJ2008B082)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院第一附属医院 肾内科,安徽 蚌埠 233004; 2. 苏州大学医学院 细胞与分子生物学教研室,江苏 苏州 215123

[作者简介] 张海峰(1974-)男,博士,讲师。

[通讯作者] 杨吉成,博士研究生导师,教授。

hING4 氨基酸序列 将 mING4 基因用点突变技术进行人源化改造。设计将 mING4 66 位氨基酸编码序列 AGA 变 AAA, 156 位氨基酸编码序列 GCT 变 ACT 的两对突变引物 P1、P2 和 P3、P4 及全长 ING4 上下游引物 P5、P6 (见表 1); 以 pcDNA3.0-mING4 质粒为模板 将 P1 与 P6、P2 与 P5 分别进行第一轮 PCR 胶回收后混合, 随后以该混合 PCR 产物为模板, 以引物 P5 与 P6 进行第二轮 PCR, 胶回收后再以此 PCR 产物为模板, 以引物 P3 与 P6、P4 与 P5 分别进行第三轮 PCR, 胶回收后混合, 再以此混合 PCR 产物为模板, 以引物 P5 与 P6 进行第四轮 PCR, 以获人源化改造的 ING4 基因。

表 1 PCR 扩增所用引物及其序列

引物序列	
P1	5'-GCC CTT CTC AAA CAG ATC CAG GAG GCC TAT3'
P2	5'-CTG GAT CTG TTT GAG AAG GGC CAG CTT CTC3'
P3	5'-GCC CCC AAG ACT GCC CAG AAG AAG TTA AAA3'
P4	5'-CTT CTG GGC AGT CTT GGG GGC TTC TTC ATC3'
P5	5'-GCG TCG ACA TGG ATG ATG GGA TAT ATT TGG AAC3'
P6	5'-GCA AGC TTC TAG TGG TGG TGG TGG TGG TGT TTC TTC TTC CGT TCT TGG GAG3'

1.2.2 重组腺病毒质粒构建 将纯化的第四轮 PCR 终产物和带有 GFP 标记基因的 pAdTrack-CMV 质粒经 *Sal* I、*Hind* III 双酶切后, 胶回收试剂盒回收目的片段, 再由 T4DNA 连接酶连接过夜, 氯化钙法转化 DH5 α 感受态细胞, 筛选 pAdTrack-CMV-ING4 转移质粒的阳性克隆, 测序鉴定。将测序正确的 pAdTrack-CMV-ING4 质粒和 pAdTrack-CMV 空质粒分别用 *Pme* I 单酶切线性化后, 胶回收与 pAdEasy-1 腺病毒载体氯化钙法分别共转化 BJ5183 感受态, 挑选阳性克隆抽提质粒, 酶切鉴定后, 大量扩增转化子。

1.2.3 重组病毒子 Ad-ING4 的获得 碱裂解法大抽 ING4 基因重组腺病毒质粒和空载体腺病毒质粒, 经 *Pac* I 线性化后, 按 Lipofectamine Reagent 操作转染 70% 贴壁的 QBI-293A 细胞。在荧光显微镜下 3~5 d 观察荧光, 7~10 d 收集细胞悬液, 2 000 r/min 离心 5 min, 细胞沉淀用无菌 PBS 洗涤 2~3 次后, 将细胞悬液反复冻融 3 次。2 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 经多轮感染后获得高滴度 Ad-ING4 重组病毒子和空载体 Adv 腺病毒子于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 重组病毒子效价检测 将培养生长状况良

好的 QBI-293A 细胞, 胰酶消化后, 细胞计数器计数, 稀释细胞浓度为每毫升 10^5 个后, 在 96 孔板上按每孔 100 μ l 接种细胞, 培养 24 h, 将收获的 Ad-ING4 重组病毒子和空载体 Adv 腺病毒子按 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 稀释后, 每个稀释度按每孔 100 μ l 接种 3 孔, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱培养 18 h, 荧光显微镜下进行荧光计数, 按病毒效价 (pfu/ml) = (每孔荧光平均数 \times 10) / 稀释度公式计算病毒效价。

1.2.5 RT-PCR 鉴定 Ad-ING4 感染 ECV304 细胞后 ING4 表达 用 100 感染复数的 Ad-ING4 重组病毒子和空载体 Adv 腺病毒子分别感染 ECV304 细胞 48 h, 1 500 r/min 离心收集细胞, PBS 洗涤 2~3 次, 按 RNA 抽提试剂盒说明书操作提取 RNA, 用上述引物 P5 和 P6 进行 RT-PCR 鉴定, PCR 的条件为 94 $^{\circ}$ C 4 min, 94 $^{\circ}$ C 50 s, 55 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 35 循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min 延伸。

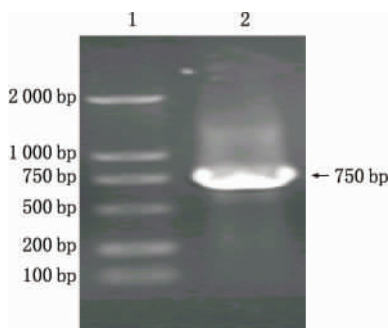
1.2.6 MTT 法检测 Ad-ING4 重组病毒对 ECV304 细胞生长的影响 收取 ECV304 细胞作为靶细胞, 用 RPMI 1640 配成浓度为 1×10^5 的细胞悬液, 于 96 孔培养板每孔加 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵育过夜后, 弃上清, 于 96 孔培养板中分别加无血清 RPMI 1640 10 μ l 为空白细胞对照组, 加 10 μ l (10^8 pfu/ml) 空载体 Adv 腺病毒为空白病毒对照组, 分别加 10 μ l (10^8 pfu/ml) Ad-ING4 重组病毒子为实验组, 每组设 3 个复孔, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵育 2 h 后, 每孔补加 90 μ l 含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 液。随后分别于 0、24、48、72、96 h 每孔加 MTT (5 mg/ml) 10 μ l, 继续孵育 4 h 后加入溶解剂, 每孔 [10% SDS + 1% HCl (1 mol/L)] 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C, 次日待甲瓚结晶完全溶解后, 在酶联免疫检测仪上测 OD₅₇₀ 值。并按抑制率 = (对照组 OD 值 - 实验组 OD 值) / 对照组 OD 值的公式计算细胞生长抑制率。

1.2.7 ELISA 检测 Ad-ING4 对 ECV304 细胞分泌 VEGF 的影响 收取 ECV304 细胞, 用 RPMI 1640 配成浓度为 1×10^5 的细胞悬液, 于 96 孔培养板每孔加 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵育过夜后, 弃上清, 于 96 孔培养板中分别加无血清 RPMI 1640 10 μ l 为空白细胞对照组, 加 10 μ l (10^8 pfu/ml) 空载体 Adv 腺病毒为空白病毒对照组, 加 10 μ l (10^8 pfu/ml) Ad-ING4 重组病毒子为实验组, 每组设 3 个复孔, 感染 2 h 后每孔补加含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 90 μ l, 随后分别于 24、48、72 h 收取上清。按 ELISA 试剂盒说明书检测 VEGF 的表达, 重复实验 3 次。

1.3 统计学方法 采用方差分析和 *q* 检验。

2 结果

2.1 pAdTrack-CMV-ING4 重组质粒的构建 将获得的阳性克隆抽提质粒 经 PCR 鉴定(用引物 P5 和 P6)在 750 bp 附近有一条带(见图 1)。目的条带的测序结果与基因库(GeneBank)中的鼠 ING4 序列有 4 个不一致,即 197 位碱基由 G(AGA)变成 A(AAA) 231 位由 A(GAA)变成 G(GAG) 476 位由 G(GCT)变成 A(ACT) 528 位由 C(ACC)变成 A(ACA) 因此鼠 66 位氨基酸由 Lys 变成 Arg ,156 位氨基酸由 Ala 变成 Thr ,其余 2 个为由 PCR 引起的同义突变,结果此基因翻译后的氨基酸序列与 hING4 氨基酸序列完全相同。表明人源化改造的 pAdTrack-CMV-ING4 重组质粒构建获得成功(见图 2)。



1: Marker; 2: ING4 PCR产物
图1 pAdTrack-CMV-ING4重组质粒PCR鉴定

2.2 重组腺病毒载体构建 测序正确的 pAdTrack-ING4 质粒和空载体质粒经 PmeI 线性化后,与 pAdeasy-1 质粒共转化 BJ5183 大肠埃希菌,将卡那霉素筛选的阳性克隆扩增后,抽提质粒进行 PCR(用引物 P1 和 P3)鉴定(见图 3),PCR 产物在 280 bp 有一目的条带,结果表明 pAdeasy-1-pAdTrack-CMV-ING4 重组腺病毒载体已成功构建。

2.3 重组病毒子的获得 鉴定正确的重组 pAdeasy-1-pAdTrack-CMV-ING4 质粒和空载体腺病毒质粒分别经 PacI 酶切后,用 Lipofectamine 转染 QBI-293A 细胞,5 d 在显微镜下可观察到荧光,7~10 d 后,收集细胞,反复冻融的重组病毒子经多轮感染后,检测效价达到 10⁹ pfu/ml 的重组病毒子于 -80 ℃ 冻存储备用(见图 4)。

2.4 RT-PCR 鉴定 Ad-ING4 感染 ECV304 细胞后 ING4 表达 Ad-ING4 感染 ECV30 细胞 48 h 后,收集细胞抽提总 RNA,进行 RT-PCR 鉴定;RT-PCR 产物的电泳结果显示,感染 Ad-ING4 病毒 ECV304 细胞出现 750 bp 的电泳条带;感染空载体 Adv 病毒于 750 bp 处未出现条带,与预期结果一致(见图 5)。

2.5 Ad-ING4 重组病毒对 ECV304 细胞生长的影响 用获得的重组 Ad-ING4 病毒感染 ECV304 细胞,结果表明第 3 天和第 4 天被感染的 ECV304 细胞生长均受到抑制($P < 0.01$),感染后第 4 天其抑制率达 63.6%。而空载体 Adv 感染细胞组与空白细胞组差异均无统计学意义($P > 0.05$)(见表 1)。

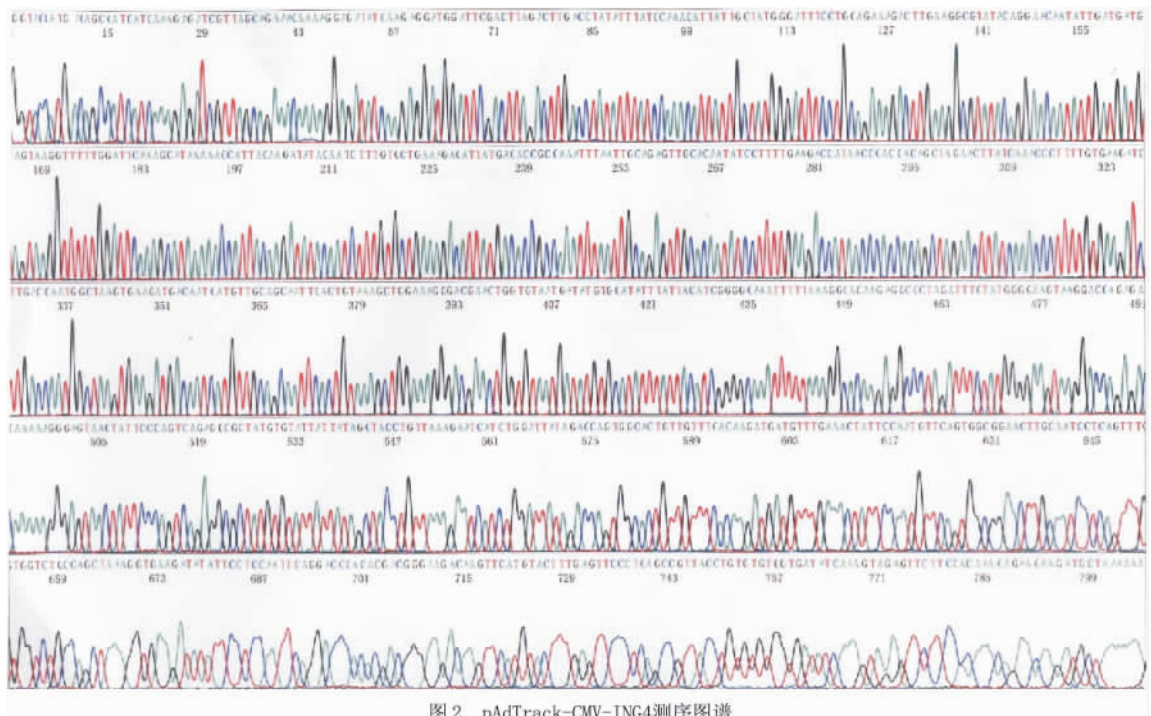


图2 pAdTrack-CMV-ING4测序图谱

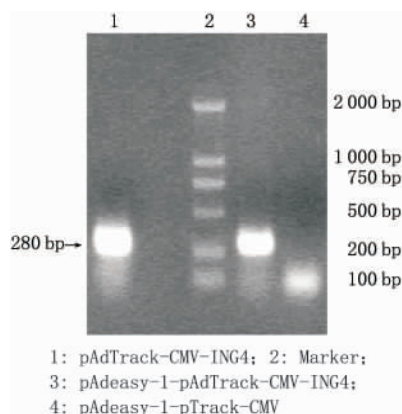


图3 pAdeasy-1-pAdTrack-CMV-ING4 PCR鉴定

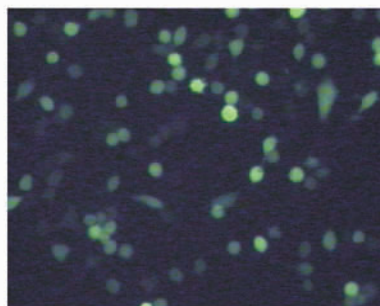


图4 重组pAdeasy-1-pAdTrack-CMV-ING4质粒线性化后转染QBI 293细胞后荧光照片

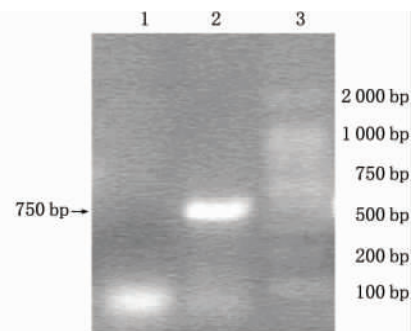


图5 重组病毒子再感染ECV304细胞后RT-PCR的鉴定

表1 Ad-ING4 重组病毒对 ECV304 细胞生长的影响($\bar{x} \pm s$; OD 值)

分组	n	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d
空白对照组	3	0.18 ± 0.01	0.29 ± 0.02	0.42 ± 0.01	0.61 ± 0.04	0.77 ± 0.02
Adv 对照组	3	0.19 ± 0.01	0.33 ± 0.03	0.48 ± 0.02*	0.60 ± 0.02	0.75 ± 0.02
Ad-ING4 组	3	0.20 ± 0.02	0.35 ± 0.02	0.45 ± 0.03	0.39 ± 0.01 ^{△△} *	0.28 ± 0.03 ^{△△} *
F	—	1.50	4.94	5.79	66.14	407.12
P	—	>0.05	>0.05	<0.05	<0.01	<0.01
MS _{组内}	—	0.000 2	0.000 6	0.000 5	0.000 7	0.000 6

q 检验:与空白对照组比较* P<0.05,**P<0.01;与 Adv 对照组比较 ΔP <0.01

2.6 Ad-ING4 感染后 ECV304 分泌 VEGF 的情况

Ad-ING4 感染 ECV304 细胞后,ELISA 法检测 24、48、72 h 上清 VEGF 分泌情况,发现 Ad-ING4 感染后,ECV304 细胞分泌 VEGF 24、48、72 h 分别为 365.8、481.5、702.3 pg/ml,实验组 48、72 h VEGF 的表达水平均较对照组下降(P<0.05)(见表2)。

表2 ELISA 检测 Ad-ING4 感染后 ECV304 细胞 VEGF 的表达($\bar{x} \pm s$)

分组	n	24 h	48 h	72 h
对照组	3	282.3 ± 94.4	708.2 ± 95.6	1 209.6 ± 226.8
Adv 对照组	3	362.5 ± 115.6	811.0 ± 141.8	1 215.0 ± 188.9
Ad-ING4 组	3	365.8 ± 125.6	481.5 ± 92.1 [△] *	702.3 ± 88.5 [△] *
F	—	0.53	6.78	8.22
P	—	>0.05	<0.05	<0.05
MS _{组内}	—	12 683.360	12 576.337	31 651.233

q 检验:与空白对照组比较* P<0.05;与 Adv 对照组比较 ΔP <0.05

3 讨论

恶性肿瘤的生长和转移必须依赖丰富的营养供给,组织中血管的生成成为营养物质和氧气进入肿瘤组织,把代谢产物运出组织细胞外和为肿瘤细胞迁移至靶器官奠定了重要的基础条件。若无血管生成,体外培养的肿瘤组织生长体积不超过 4 mm³,体

内肿瘤不超过 1~2 mm³[6]。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。新生血管生成的整个过程都受血管生成因子和血管生成抑制物的严密调控,VEGF 及其受体被认为是作用最强、特异性最高的关键调控因子。VEGF 除了能促进血管内皮细胞增殖外,还能增加血管通透性,促进血管支持物的生成。

ING4 作为肿瘤生长抑制因子家族的新成员,不但能抑制神经胶质瘤细胞生长,还能抑制肿瘤组织中新生血管的生成。Garkavtsev 等[7]将 ING4 及反义 ING4 基因利用真核表达质粒分别转入 U87MG 胶质瘤细胞,建立了 ING4 表达高低不同的 U87MG 细胞系,结果发现 ING4 过表达的肿瘤细胞生长明显减慢,其血管密度减少,而转入反义 ING4 的肿瘤血管密度增高,并容易出血,但他们在用基因芯片检测肿瘤组织中 VEGF、IL-6、IL-8 等的表达时,发现 IL-6、IL-8 等表达减少,而 VEGF 表达无明显改变。在以前的实验中,我们也证实 Ad-ING4 能在体内外抑制肿瘤的生长,并抑制肿瘤的血管生成,而不影响肿瘤细胞 VEGF 的表达[8]。本实验结果表明,人源化改造的 pAdTrack-1-CMV-ING4 重组质粒构建获得成功;pAdeasy-1-pAdTrack-CMV-ING4 重组腺病毒载体亦构建成功。用 Ad-ING4 感染 ECV304 脐静脉内皮细胞后,对 ECV304 细胞的生长及 VEGF 的分泌均有较强的抑制作用,因此提示,Ad-ING4 可能通过直接抑制血管内皮细胞生长及 VEGF 的分泌参与抑制血管的生成,从而可抑制体内肿瘤的生长。

[参 考 文 献]

[1] Hu RM, Han ZG, Song HD *et al*. Gene expression profiling in the human hypothalamus-pituitary-adrenal axis and full-length cDNA cloning [J]. Natl Acad Sci 2000 97(11): 9543-9548.
 [2] Zhang X, Xu LS, Wang ZQ *et al*. ING4 induces G2/M cell cycle arrest and enhances the chemosensitivity to DNA-damage agents in HepG2 cells [J]. FEBS Letters 2004 570(8): 7-12.

间日疟原虫 MSP1-19 基因的克隆与表达

李光友¹ 陈 勇¹ 夏 惠² 方 强² 刘 丹² 买月琴¹ 贺文欣¹

[摘要]目的:构建间日疟原虫 MSP1-19(*Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1-19, *Pv* MSP1-19) 基因克隆及表达的载体。方法:将 MSP1-19 基因克隆入原核表达载体 pET28a 中,构建重组表达载体。以重组载体转化大肠埃希菌 BL21,在 IPTG 诱导下表达重组 *Pv* MSP1-19 蛋白。采用亲和层析纯化重组蛋白,应用 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 对表达产物进行鉴定和分析。结果:成功构建了质粒 pET28a/*Pv* MSP1-19,并在大肠埃希菌中诱导可溶性表达的目的蛋白。表达的蛋白能与间日疟患者血清发生特异性结合反应。结论:成功地原核表达出 *Pv* MSP1-19 目的蛋白,为间日疟的疫苗研制提供了实验基础。

[关键词] 间日疟; MSP1-19 基因; 原核表达; 基因表达

[中国图书资料分类法分类号] R 531.31 **[文献标识码]** A

Cloning and expression of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1-19 geneLI Guang-you¹, CHEN Yong¹, XIA Hui², FANG Qiang², LIU Dan², MAI Yue-qin¹, HE Wen-xin¹

(1. Department of Immunology 2. Department of Microbiology and Parasitology Bengbu Medical College Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] Objective: To construct a vector which clone and express *Plasmodium vivax* MSP1-19 Gene(*Pv* MSP1-19). **Methods:** The *Pv* MSP1-19 was cloned into the expression vector pET28a. The recombinant expression vector was transformed into *E. coli* μ and the *Pv* MSP1-19 protein was expressed under IPTG induction. The recombinant protein was purified by affinity chromatography and the fusion protein was characterized by SDS-PAGE and Western blot. **Results:** The *Pv* MSP1-19 gene in plasmid pET28a was expressed in *E. coli* as a fusion protein. The fusion protein could be reacted specifically with *Plasmodium vivax* patient serum. **Conclusions:** The *Pv* MSP1-19 gene was expressed successfully in *E. coli*, which provides the necessary basis for preparing vaccine in human.

[Key words] *Plasmodium vivax*; merozoite surface protein-1-19; gene prokaryotic expression; gene expression

疟疾是严重危害人类健康的寄生虫病,其中心日疟是流行最广泛的疟疾之一,危害性仅次于恶性疟^[1]。我国中部沿黄淮流域地区疫情回升势头虽得以遏制,但疟疾发病仍处较高水平^[2],因此研制

有效防治疟疾疫苗受到越来越多研究者的重视。由于在间日疟生活史中,唯有红内期原虫能使人体致病甚至危及生命,所以研制针对红内期的疫苗对降低间日疟的发病率和病死率具有重要意义。疟原虫裂殖子主要蛋白 1 (merozoite surface protein-1, MSP1) 是一种表达于裂殖子表面的蛋白,由于其位于裂殖子表面,所以认为它可能参与裂殖子的入侵,是重要疫苗候选分子之一^[3-4]。它含有保护性免疫功能域,可以产生特异性保护性抗体,这些抗体可以阻止疟原虫入侵红细胞。本研究以间日疟原虫 MSP1 羧基端 19 kDa 片段(*Pv* MSP1-19) 进行克隆与表达,以期获得 MSP1-19 重组蛋白,制备抗原和为

[收稿日期] 2010-12-01

[基金项目] 卫生部寄生虫病预防与控制技术重点实验室开放课题资助项目(WK008-04)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 免疫学教研室 2. 病原生物学教研室 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 李光友(1982-) 男 硕士研究生。

[通讯作者] 夏 惠, 硕士研究生导师, 教授. E-mail: xiahui912@hotmail.com.

[3] Li X, Li C. Inhibitor of growth 4 induces growth suppression and apoptosis in glioma U87MG [J]. Pathobiology, 2009, 76(4): 181-192.

[4] Colla S, Tagliaferri S, Morandi F, et al. The new tumor-suppressor gene inhibitor of growth family member 4 regulates the production of proangiogenic molecules by myeloma cells and suppresses hypoxia-inducible factor-1 alpha activity: involvement in myeloma-induced angiogenesis [J]. Blood, 2007, 110(13): 4464-4475.

[5] 王金志, 缪竞诚, 盛伟华, 等. ING4 基因真核表达载体的构建及其功能 [J]. 解剖学杂志, 2005, 28(4): 383-386.

[6] 吴胤瑛, 李恩孝. VEGF 在恶性肿瘤中的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2005, 13(5): 18-20.

[7] Garkavtsev I, Kozin SV, Chernova L, et al. The candidate tumour suppressor protein ING4 regulates brain tumour growth and angiogenesis [J]. Nature, 2004, 428(5): 328-332.

[8] Xie YF, Zhang HF, Sheng WH, et al. Adenovirus-mediated ING4 expression suppresses lung carcinoma cell growth via induction of cell cycle alteration and apoptosis and inhibition of tumor invasion and angiogenesis [J]. Cancer Letters, 2008, 271(1): 105-116.

(本文编辑 马启)