

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.35.008

shRNA 抑制 survivin 基因表达对脐静脉血管内皮细胞增殖与凋亡的影响*

马莎,林俊[△],晋松,李芹,张虹,王静
(云南省第一人民医院风湿免疫科,昆明 650032)

[摘要] **目的** 研究靶向存活素(survivin)的短发夹 RNA 真核表达质粒(shRNA)对脐静脉血管内皮细胞增殖与凋亡的影响。**方法** 合成靶向 survivin 的 shRNA 真核表达质粒及阴性对照质粒,用脂质体法将质粒转染至经 VEGF(50 ng/mL)处理的 HUVEC 细胞;转染 48 h 后,采用实时定量聚合酶链反应(PCR)和蛋白印迹法检测 HUVEC 中 survivin 的 mRNA 表达及蛋白水平。四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞增殖;TUNEL 法检测细胞凋亡。**结果** (1) survivin-shRNA 质粒试验组与阴性对照 shRNA 质粒组及空白对照组比较,转染 48 h 后人脐静脉血管内皮细胞 survivin 的 mRNA 及蛋白表达水平明显下降($P < 0.05$)。(2)与阴性对照 shRNA 组及空白对照组比较,转染后的人脐静脉血管内皮细胞增殖能力明显下降。转染后 24、48、72 h 生长抑制率分别为(13.53±3.91)%、(38.97±1.82)%、(65.75±1.83)%,于转染后 72 h 最为显著。(3)试验组凋亡率为(28.07±1.71)%,较阴性对照组(11.45±1.52)%和空白对照组(10.04±1.46)%显著增高($P < 0.05$)。**结论** 靶向 survivin 的 shRNA 质粒能通过下调 survivin 表达,进而抑制人脐静脉血管内皮细胞增殖并促进其凋亡。

[关键词] 血管内皮生长因子;存活素;shRNA;增殖;细胞凋亡

[中图分类号] R593.22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)35-4922-03

Effects of shRNA-mediated survivin silencing on proliferation and apoptosis of human umbilical vein endothelial cells*

Ma Sha, Lin Jun[△], Jin Song, Li Qin, Zhang Hong, Wang Jing
(Department of Rheumatoid and Immunology, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of short hairpin RNA(shRNA) eukaryotic expression vector-mediated silencing of the survivin-gene on proliferation and apoptosis of human umbilical vein endothelial cells(HUVEC). **Methods** The shRNA vector targeting the survivin gene and negative control vector were transfected into human umbilical vein endothelial cells(HUVEC) incubated with 50 ng/mL of recombinant VEGF in vitro by lipofectamine 2000. Transfection after 48 h, the expression of survivin mRNA and protein was detected by quantitative real-time PCR and Western blot, respectively. HUVEC proliferation was assayed by four methylthiazolyl tetrazolium(MTT) and cell apoptosis was detected by TUNEL. **Results** (1) Transfection with survivin-shRNA vector significantly down-regulated the expression of survivin mRNA and protein as compared with the control group, after transfection of 48 h($P < 0.05$). (2) After survivin-shRNA vector transfected, the proliferation of HUVEC decreased significantly. After transfection 24, 48, 72 h, the growth inhibition rate were (13.53±3.91)%, (38.97±1.82)%, (65.75±1.83)% respectively, at 72 hours after transfection was the most significant. (3) The apoptosis rate of experimental group was (28.07±1.71)%, which was higher than the negative control group (11.45±1.52)% and blank control group (10.04±1.46)% ($P < 0.05$). **Conclusion** The shRNA-mediated mediated silencing of the survivin-gene could significantly inhibit proliferation and promote the apoptosis of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by regulating survivin expression.

[Key words] vascular endothelial growth factor; survivin; short hairpin RNA; proliferation; apoptosis

存活素(survivin)是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis of protein, IAP)家族成员,是具有强大抗凋亡效应的蛋白^[1]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)可诱导 survivin 抗凋亡蛋白的表达,抑制内皮细胞凋亡,促进血管生成^[2]。深入认识和揭示 survivin 在介导 VEGF 促血管新生中的作用对寻找类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的基因靶向治疗的方法具有重要意义。本试验旨在通过转染 survivin-短发夹 RNA 真核表达质粒(shRNA)至人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC),观察抑制 survivin 对外源性 VEGF 处理后 HUVEC 增殖及凋亡的影响,为 RA 基因靶向治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料 人脐静脉血管内皮细胞(凯基生物公司), VEGF₁₆₅(美国 Peprotech 公司),澳洲胎牛血清 FBS、RPMI-1640 培养基(Gibco 公司),四甲基偶氮唑蓝(MTT)、DMSO(Sigma 公司),survivin 兔抗人单克隆抗体(Abcam 公司),GAPDH 鼠抗人单克隆抗体(上海 Abmart 公司),SYBR Green Master(Roch 公司)、Lipofectamine2000(Invitrogen 公司),shRNA-survivin 表达质粒载体及阴性对照质粒载体(吉凯基因技术公司),实时荧光定量 PCR 引物(Invitrogen 公司),蛋白浓度测定试剂盒、TUNEL 细胞凋亡检测显色法试剂盒(碧云天生物技术公司)。

1.2 方法

1.2.1 外源性 VEGF 处理 HUVEC HUVEC 细胞系采用含 10%FBS 的 RPMI-1640 完全培养基加双抗,置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中。细胞生长密度至 85%~90%,按 1:2 比例进行传代。转染前 24 h 选择对数生长期 HUVECs 细胞,按照 6×10⁵/孔接种至 6 孔板,每孔使用 2 mL 不含抗菌药物的完全培养基,加入 VEGF 使其终浓度为 50 ng/mL^[3],继续培养 24 h。

1.2.2 shRNA 载体转染 HUVEC 经 VEGF 处理细胞 24 h 后将 VEGF 培养基弃去,PBS 润洗 3 次,每孔加入 2 mL 不含抗菌药物完全培养基,设空白对照组(加入 RPMI-1640 培养基)、阴性对照组(加入 negative-shRNA)、试验组(加入 survivin-shRNA),靶序列为 5'-AGA ATT AAC CCT TGG TGA A-3',按照 Lipofectamine 2000 说明书进行,转染 48 h 后在荧光显微镜下观察细胞,呈 GFP 绿色荧光的细胞为转染阳性细胞,计数 4 个高倍视野,转染效率=阳性细胞数/总的细胞数×100%,根据转染效率优化转染条件。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测 HUVEC 中 survivin mRNA 表达 转染 48 h 后收集细胞,用 Trizol 法提取细胞总 RNA,按试剂盒说明书合成 cDNA。以 cDNA 作为模板,采用 SYBR 荧光染料法进行实时定量 PCR 检测各组 mRNA 表达,反应体系为 25 μL,每个样品分别设计 3 个重复。survivin 上游引物:5'-GAC CAC CGC ATC TCT ACA TTC-3',下游引物 5'-TGC TTT TTA TGT TCC TCT ATG GG-3';GAPDH 的上游引物:5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3',下游引物:5'-CCA CCA CCC TGT TGC TGT AG-3';实时定量 PCR 仪循环设置:95 °C 10 min 预变性,95 °C 15 s,58 °C 30 s,进行 40 个循环。用相对定量方法 2^{-ΔΔCt} 值表示目的基因的 mRNA 水平^[4]。

1.2.4 Western 印迹法检测 survivin 蛋白表达水平 转染 48 h 后收集细胞并提取蛋白,BCA 法测蛋白浓度。用 15%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离胶进行电

泳分离,并转移至 PVDF 膜,用 5%的脱脂奶粉封闭 1 h,孵育 survivin 一抗(1:2 000 稀释)和内参 GAPDH 一抗(1:10 000 稀释),4 °C 过夜。TBST 洗膜,用特异性辣根过氧化物酶标记的二抗(1:7 000 稀释)室温孵育 1 h,TBST 洗膜,显色并于暗室曝光。Bio-Rad 凝胶成像分析系统对电泳条带进行密度扫描,用 Scion-Image 软件对图像进行分析,测目的蛋白和内参 GAPDH 蛋白的电泳条灰度值,以二者比值代表目的蛋白相对表达量。

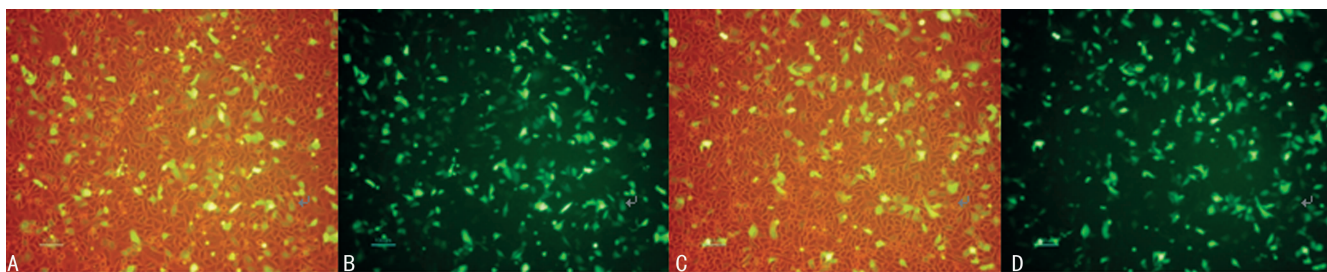
1.2.5 MTT 法检测抑制 survivin 表达对 HUVEC 细胞增殖的影响 取对数生长期的 HUVEC 细胞,转染前 24 h 按 5×10³ 个/孔细胞接种至 96 孔板,其后按上述分组及 96 孔板说明参数进行转染,转染 6 h 后更换完全培养基,培养 24、48、72 h 后每孔加入浓度为 5 mg/mL 的 MTT 30 μL,37 °C 作用 4 h,PBS 洗涤 2 次,每孔加入 150 μL DMSO,室温避光振荡 15 min 使结晶充分溶解。在酶标仪测定 490 nm 波长下的吸光度(A)值。细胞生长抑制率(%)=(1-试验组 A 值/空白对照组 A 值)×100%。

1.2.6 细胞凋亡分析 采用 TUNEL 法检测细胞凋亡。接种细胞至爬片后按上述方法转染及分组,培养 48 h 后收集细胞爬片,按说明书进行操作,细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞,即凋亡细胞。每张爬片计数 5 个高倍镜视野(×400)中的凋亡阳性细胞核数和总的细胞核数,凋亡率=阳性细胞核数/总的细胞核数计算细胞×100%,取其平均值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析处理。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 观察转染 48 h 后 GFP 绿色荧光标记细胞阳性率 观察转染 48 h 后 HUVECs 中 GFP 绿色荧光标记细胞阳性率,通过优化转染条件,发现当培养基中质粒浓度为 1.5 μg/mL 时可获得最佳的转染效率,转染效率达到 70%以上,见图 1。



A,B: 试验组;C,D: 阴性对照组。

图 1 转染 48 h 后试验组与阴性对照组细胞(倒置相差显微镜,×200)

表 1 转染 48 h 后各组检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	mRNA(%)	Western blot 蛋白表达量	凋亡率(%)
试验组	4	27.67±3.51*#	0.74±0.05*#	28.07±1.71*#
阴性对照组	4	96.67±1.53	1.64±0.05	11.45±1.52
空白对照组	4	100.00	1.71±0.04	10.04±1.46
F	—	1 023.16	513.35	164.32
P	—	0.001	0.001	0.001

*: P<0.05,与阴性对照组比较;#: P<0.05,与空白对照组比较。

2.2 实时荧光定量 PCR 检测 survivin mRNA 的表达 转染 48 h 后试验组、阴性对照组、空白对照组 survivin mRNA 相对表达量见表 1,试验组显著低于空白对照组和阴性对照组(P<0.01);阴性对照组与空白对照组间比较差异无统计学意义(P>0.05)。

2.3 Western blot 检测 survivin 蛋白的表达 转染 48 h 后空白对照组、阴性对照组、试验组 survivin 蛋白表达情况见图 2,相对表达量见表 1。试验组 survivin 蛋白表达量显著低于空白对照组和阴性对照组(P<0.01),表达抑制率为 56.7%;阴性对照组和空白对照组间比较,差异无统计学意义(P>0.05)。

2.4 MTT 法检测各组细胞增殖活性结果 转染 24、48、72 h

后各组 A 值见表 2, 实验组细胞生长速度较空白对照组和阴性对照组均有不同程度减慢 ($P < 0.01$), 生长抑制率分别为 $(13.53 \pm 3.91)\%$ 、 $(38.97 \pm 1.82)\%$ 、 $(65.75 \pm 1.83)\%$, 而阴性对照组与空白对照组细胞生长抑制率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

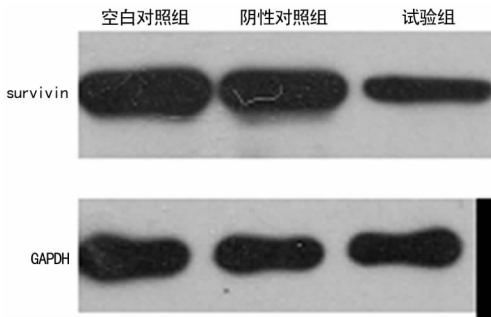


图 2 各组 HUVEC 细胞 survivin 的蛋白表达量

表 2 各组 HUVEC 细胞不同转染时间 MTT 实验检测的 A 值比较 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	24 h	48 h	72 h
试验组	$0.145 \pm 0.005^{* \#}$	$0.132 \pm 0.008^{* \#}$	$0.096 \pm 0.006^{* \#}$
阴性对照组	0.164 ± 0.004	0.212 ± 0.008	0.276 ± 0.004
空白对照组	0.168 ± 0.003	0.217 ± 0.012	0.282 ± 0.008
F	34.26	95.32	1 171.01
P	0.001	0.001	0.001

*: $P < 0.05$, 与同一转染时间点阴性对照组比较; #: $P < 0.05$, 与同一转染时间点空白对照组比较。

2.5 survivin-shRNA 干扰 HUVEC 细胞后对其凋亡的影响

转染 48 h 后, 试验组细胞凋亡率为 $(28.07 \pm 1.71)\%$, 与空白对照组 $(10.04 \pm 1.46)\%$ 和阴性对照组 $(11.45 \pm 1.52)\%$ 比较, 试验组细胞凋亡率明显增加 ($F = 164.32, P < 0.01$)。而阴性对照组与空白对照组间细胞凋亡率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨 论

血管翳是 RA 病变过程中一个特征性的病理表现, 新生血管形成在 RA 的侵蚀和破坏过程中发挥了重要的作用并贯穿整个病程^[5]。VEGF 被认为是血管新生过程中的核心因子, 其通过增加血管内皮细胞有丝分裂, 促进新生血管形成, 并增加血管通透性及炎性物质渗出, 促进炎症形成与发展^[6]。VEGF 及其受体在 RA 动物模型及 RA 患者的滑膜组织及血清中均高表达^[7]。体外试验也证明了关节炎的滑膜细胞能够分泌较高水平的 VEGF^[8]。RA 血清 VEGF 水平与疾病严重程度及并发症的出现存在相关性^[9], 同时抑制血管生成的药物可有效缓解 RA 的病情^[10], 腺病毒介导的反义 VEGF 基因转染可有效减轻胶原关节炎症状, 减轻滑膜血管翳对关节软骨的破坏和病理改变^[11]。然而, VEGF 作为具有重要生理功能的细胞因子, 抑制其表达也将带来新的健康问题^[12]。

survivin 是 IAP 家族具有强大凋亡抑制效应的蛋白, survivin 可以与 VEGF 相互作用, 在 VEGF 诱导下, 内皮细胞中 survivin 表达增强, 抑制内皮细胞凋亡, 促进血管生成^[13]。survivin 表达异常增高则促进 VEGF 诱导的内皮细胞增殖和三维毛细血管网的形成^[12]。采用反义技术使内皮细胞 survivin 表达缺失, 可抑制 VEGF 介导的内皮细胞保护作用, 促进

内皮细胞的凋亡和血管的退行性变, 进而阻抑血管新生^[3]。研究表明 survivin 在常见恶性肿瘤中表达, 而在正常成熟的细胞和组织中无表达, 这些研究使得通过抑制 survivin 表达来调控血管新生过程在治疗 RA 成为可能。

本试验通过 VEGF 处理 HUVEC 促进细胞增殖及上调 survivin 表达而模拟体外类风湿关节炎滑膜组织中血管新生状态, 构建靶向 survivin 的 shRNA 质粒载体转染经外源性重组 VEGF₁₆₅ 处理的脐静脉血管内皮细胞。转染 48 h 后 HUVEC 中 survivin 的 mRNA 及蛋白表达水平明显下降, 试验组 mRNA 相对表达量分别为 $(27.67 \pm 3.51)\%$, 蛋白的相对表达量为 0.74 ± 0.05 , 表达抑制率为 56.7%, 显著低于阴性对照组与空白对照组 ($P < 0.01$), 说明在一定程度上 survivin-shRNA 实现了对人脐静脉血管内皮细胞 survivin 基因的沉默, 而阴性对照组 shRNA 对 survivin 的表达无影响。MTT 法检测细胞的增殖效应发现转染后试验组细胞增殖的抑制于转染 48 h 后出现, 随着时间的增加抑制效应递增, 72 h 抑制达到高峰, 生长抑制率为 $(65.75 \pm 1.83)\%$, 实现了对 HUVEC 增殖的下调。转染 48 h 后试验组凋亡率为 $(28.07 \pm 1.71)\%$, 较阴性对照组和空白对照组显著增加 ($P < 0.05$), 证明下调 survivin 基因的表达可促进 HUVEC 细胞凋亡。

综上所述, 通过抑制人脐静脉血管内皮细胞中 survivin 的表达可减少外源性 VEGF 促血管内皮细胞增殖作用并促进细胞凋亡, 推测 survivin 参与介导 VEGF 促血管生成过程, 与 Mesri 等^[3]的研究结果一致。提示在 RA 中抑制 survivin 基因的表达将在抑制类风湿关节炎滑膜血管翳形成方面发挥作用, 对 RA 有潜在的治疗价值。下一步将借助 survivin-shRNA 载体上携带的抗性标记筛选出稳定转染的阳性 HUVEC 细胞, 研究其在更长时间范围的细胞生长特性及炎性因子分泌情况, 为 RA 基因靶向治疗奠定基础。

参考文献

- [1] 王春毅, 傅仲学. 高选择性 RNA 干扰抑制 survivin 基因对在体结肠癌的治疗作用[J]. 重庆医学, 2013, 42(28): 3339-3341.
- [2] 隋雪梅, 徐玲, 梁超. Survivin 与 VEGF 基因反义寡核苷酸联合应用人肺腺癌 A549 细胞作用研究[J]. 重庆医科大学学报, 2013, 38(9): 1006-1011.
- [3] Mesri M, Morales-Ruiz M, Ackermann EJ, et al. Suppression of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell protection by survivin targeting [J]. Am J Pathol, 2001, 158(5): 1757-1765.
- [4] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method [J]. Nat Protoc, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [5] Szekanecz Z, Besenyei T, Paragh G, et al. Angiogenesis in rheumatoid arthritis [J]. Autoimmunity, 2009, 42(7): 563-573.
- [6] 孙艳, 安永潼, 尹蓓珮, 等. 类风湿关节炎中血管新生调节网络及其药物研究启发 [J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(8): 1148-1151.
- [7] Pickens SR, Volin MV, Mandelin AM, et al. IL-17 contributes to angiogenesis in rheumatoid arthritis [J]. J Immunol, 2010, 184(6): 3233-3241.
- [8] 王聪华, 陈丽娜, 朱平, 等. CD147 分子 (下转第 4928 页)

胞,且其本身的转染对细胞生物学行为影响较小,这种方法已被广泛用于科研中^[12]。本研究结果显示,慢病毒为载体的转染效率(74.25±10.10)%,功能学检测显示,miRNA-29a 的 mRNA 及其靶基因蛋白 COL1A1 表达均在转染组显著升高,证实慢病毒对 VSMCs 有着较高的转染效率。

细胞的正常增殖、凋亡平衡对维持器官内环境的稳定有着至关重要的作用,其细胞的恶性增殖或凋亡受到抑制被认为是肿瘤发生的重要机制,因此,调控细胞增殖及凋亡成为研究肿瘤发病机制及治疗的有效方法。在骨肉瘤和肾纤维化的研究中,miRNA-29a 对平滑肌细胞的增殖、凋亡有着明显的调控作用^[13-14],但其对 HVSMCs 增殖、凋亡影响还未见报道。通过 MTS 结果显示 miRNA-29a 过表达的 HVSMCs 在不同时间点的 OD 值均明显高于其他两组($P<0.05$),而空病毒转染组与空白对照组间的 OD 值比较差异无统计学意义。这一结果说明病毒本身的转染并不影响细胞的增殖,而 miRNA-29a 能够有效促进 HVSMCs 细胞的增殖。另一方面,流式细胞检测结果发现 miRNA-29a 过表达能够有效地保护无血清培养所诱导的细胞凋亡,与其他两组比较,miRNA-29a 转染组细胞的凋亡率显著下降($P<0.05$)。

综上所述,本研究显示在 AAA 患者血清中 miRNA-29a 的表达较正常人显著降低,miRNA-29a 低表达与 AAA 的发生有着密切关系。所构建的 miRNA-29a 过表达慢病毒载体能有效提高 HVSMCs 中 miRNA-29a 的表达水平,通过对非编码 RNA 及其靶基因的增加血管平滑肌细胞的增殖,同时抑制其凋亡,为研究 AAA 的发病机制及治疗方法开拓了新思路及新方法。

参考文献

[1] Coughlin PA, Jackson D, White AD, et al. Meta-analysis of prospective trials determining the short-and mid-term effect of elective open and endovascular repair of abdominal aortic aneurysms on quality of Life[J]. Br J Surg, 2013,100(4):448-455.

[2] Wang XL, Thompson MM, Dole WP, et al. Standardization of outcome measures in clinical trials of pharmacological treatment for abdominal aortic aneurysm[J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2012,10(10):1251-1260.

[3] Charchian ER, Stepanenko AB, Gens AP, et al. Clinical management of patients with abdominal aortic aneurysms combined with coronary artery disease and multifocal ath-

erosclerosis[J]. Kardiologiia, 2014,54(3):37-41.

- [4] Rico-Rosillo MG, Vega-Robledo GB, Oliva-Rico D. The role and importance of the microRNAs in the diagnosis and development of diseases[J]. Revista Medica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social, 2014,52(3):302-307.
- [5] Fic P, Kowalczyk K, Grabarska A, et al. MicroRNA--a new diagnostic tool in coronary artery disease and myocardial infarction[J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2014,68:410-418.
- [6] Jiang H, Zhang G, Wu JH, et al. Diverse roles of miR-29 in cancer (review) [J]. Oncol Rep, 2014, 31(4): 1509-1516.
- [7] Kent KC. Clinical practice. Abdominal aortic aneurysms [J]. N Engl J Med, 2014,371(22):2101-2108.
- [8] Liu H, Wang B, Lin J, et al. microRNA-29b: an emerging player in human cancer [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014,15(21):9059-9064.
- [9] Redova M, Sana J, Slaby O. Circulating miRNAs as new blood-based biomarkers for solid cancers [J]. Future Oncol, 2013,9(3):387-402.
- [10] Jones JA, Stroud RE, O'quinn EC, et al. Selective microRNA suppression in human thoracic aneurysms: relationship of miR-29a to aortic size and proteolytic induction [J]. Circ Cardiovasc Genet, 2011,4(6):605-613.
- [11] Rowe VL, Stevens SL, Reddick TT, et al. Vascular smooth muscle cell apoptosis in aneurysmal, occlusive, and normal human aortas [J]. J Vasc Surg, 2000,31(3):567-576.
- [12] Lei CJ, Yao C, Pan QY, et al. Lentivirus vectors construction of siRNA targeting interference GPC3 gene and its biological effects on liver cancer cell lines Huh-7 [J]. Asian Pac J Trop Med, 2014,7(10):780-786.
- [13] Muniyappa MK, Dowling P, Henry M, et al. MiRNA-29a regulates the expression of numerous proteins and reduces the invasiveness and proliferation of human carcinoma cell lines [J]. Eur J Cancer, 2009,45(17):3104-3118.
- [14] Zhang W, Qian JX, Yi HL, et al. The microRNA-29 plays a central role in osteosarcoma pathogenesis and progression [J]. Mol Biol (Mosk), 2012,46(4):622-627.

(收稿日期:2015-05-26 修回日期:2015-07-16)

(上接第 4924 页)

通过 VEGF 促进类风湿关节炎滑膜组织中的血管新生 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007,23(5):426-428.

[9] Jiang M, Xiao C, Chen G, et al. Correlation between cold and hot pattern in traditional Chinese medicine and gene expression profiles in rheumatoid arthritis [J]. Front Med, 2011,5(2):219-228.

[10] 王建华, 黄华杨, 尹庆水, 等. 反义 VEGF165 基因关节腔注射抑制大鼠胶原性关节炎形成的病理观察 [J]. 第二军医大学学报, 2005,26(1):99-100.

[11] 王险峰, 陈森洲, 侯巧燕. 缺氧诱导因子-1 α 和血管内皮细

胞生长因子在胶原性关节炎动物模型中的表达与意义 [J]. 现代免疫学, 2010,30(3):212-216.

- [12] Song J, Cao L, Li Y. RNA interference mediated inhibition of survivin and VEGF in pancreatic cancer cells in vitro [J]. Mol Med Rep, 2013,7(5):1651-1655.
- [13] 况南珍, 傅颖媛, 黄红卫, 等. VEGF、PCNA 及 Survivin 与膀胱癌病理分级、临床分期的关系 [J]. 重庆医学, 2012,41(7):651-653.

(收稿日期:2015-05-15 修回日期:2015-07-22)