

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.01.012

· 基础研究 ·

FOXQ1介导TGF-β1信号通路调控胰腺癌PANC-1细胞体外血管生成

邓大炜^{a,b}, 吴斌^{a,b}, 严舒^{a,b}, 兰川^{a,b}, 张光年^{a,b}, 弋鹏圣^{a,b}, 曾丽娟^c, 李建水^{a,b} (川北医学院 a. 肝胆胰肠研究所; b. 附属医院肝胆外科; c. 信息科, 四川南充 637000)

摘要 **目的:** 探讨沉默叉头框蛋白Q1 (forkhead box Q1, FOXQ1) 基因对胰腺癌PANC-1细胞体外血管生成的影响及其在转化生长因子-β1 (transforming growth factor-β1, TGF-β1) 信号通路中的作用。 **方法:** 用FOXQ1-shRNA重组慢病毒和阴性对照慢病毒 (NC-shRNA) 感染PANC-1细胞, 流式细胞术检测感染率, 实时荧光定量PCR (qPCR) 和Western blotting法检测沉默效果。实验设FOXQ1-shRNA组、NC-shRNA组与空白对照组, 用人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 进行体外血管生成实验, 荧光显微镜下观察细胞血管生成能力。用qPCR、Western blotting法检测VEGF-A、MMP-2 mRNA和蛋白的表达水平; 用TGF-β1 (终质量浓度5 ng/ml) 诱导FOXQ1-shRNA组和NC-shRNA组细胞, 检测诱导前后细胞体外血管生成能力变化与FOXQ1、VEGF-A、MMP-2表达差异。 **结果:** shRNA慢病毒感染率为90%左右, FOXQ1-shRNA组PANC-1细胞的体外血管生成数目显著少于NC-shRNA组 [(9.33±2.08) vs (28.67±2.52) 条, $P<0.05$], 其VEGF-A、MMP-2表达下调 (均 $P<0.05$)。TGF-β1增强各组细胞体外血管生成能力, 促进FOXQ1、VEGF-A、MMP-2 mRNA和蛋白的表达水平 (均 $P<0.05$)。 **结论:** FOXQ1介导了胰腺癌PANC-1细胞体外血管生成, 其机制可能与VEGF-A和MMP-2的下调有关, 且可能受TGF-β1通路的调控。

关键词 胰腺癌; PANC-1细胞; 叉头框蛋白Q1基因; 转化生长因子-β1 (TGF-β1); 血管生成

[中图分类号] R735.9; R730.2 [文献标识码] A [文章编号] 1007-385X(2018)01-0001-05

FOXQ1 gene mediates TGF-β1 signaling pathway to regulate *in vitro* angiogenesis of pancreatic cancer PANC-1 cells

DENG Dawei^{a,b}, WU Bin^{a,b}, YAN Shu^{a,b}, LAN Chuan^{a,b}, ZHANG Guangnian^{a,b}, YI Pengsheng^{a,b}, ZENG Lijuan^c, LI Jianshui^{a,b} (a. Institute of Hepato-Biliary-Pancreas and Intestinal Disease; b. Department of Hepatobiliary Surgery of Affiliated Hospital; c. Information Centre of Affiliated Hospital, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

[Abstract] Objective: To explore the effect of forkhead box Q1 (FOXQ1) gene silencing on *in vitro* angiogenesis of pancreatic carcinoma cells, and to investigate its role in transforming growth factor-β1 (TGF-β1) signaling pathway. **Methods:** FOXQ1-shRNA recombinant lentiviral vector and negative control lentiviral vector (NC-shRNA) were transfected into PANC-1 cells. Flow cytometry was used to detect the transfection efficiency. The gene silencing efficiency was measured by qPCR and Western blotting. FOXQ1-shRNA group, NC-shRNA group and blank group were set up. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were used for the *in vitro* angiogenesis assay, which was observed under fluorescence microscopy. Meanwhile, qPCR and Western blotting were performed to examine mRNA and protein expressions of VEGF-A and MMP-2, respectively. After induction by TGF-β1 (final concentration of 5 ng/ml), the changes in angiogenesis ability as well as the expression changes in FOXQ1, VEGF-A, MMP-2 in each group were detected. **Results:** The transfection efficiency of lentivirus was about 90%. Compared with NC-shRNA group, the angiogenesis ability in FOXQ1-shRNA group was remarkably decreased (9.33±2.08 vs 28.67±2.52, $P<0.05$); Meanwhile, the expressions of VEGF-A and MMP-2 were all declined significantly ($P<0.05$). TGF-β1 improved the mRNA and protein expressions of FOXQ1, VEGF-A and MMP-2, and increased the *in vitro* angiogenesis ability ($P<0.05$). **Conclusion:** FOXQ1 gene could mediate the *in vitro* angiogenesis of PANC-1 cells; its mechanism may be related to the down-regulation of VEGF-A and MMP-2 and possibly be regulated by TGF-β1 pathway.

[基金项目] 四川省教育厅科研项目资助 (No.12ZB218)。Project supported by Scientific Research Foundation of the Education Department of Sichuan Province (No.12ZB218)

[作者简介] 邓大炜 (1988-), 男, 硕士, 主要从事肝胆胰肿瘤分子靶向研究, E-mail: 294164156@qq.com

[通信作者] 李建水 (LI Jianshui, corresponding author), 博士, 副教授, 主要从事肝胆胰肠疾病的研究, E-mail: ljs2005doctor@126.com

[Key words] pancreatic carcinoma; PANC-1 cell; forkhead box Q1 (*FOXQ1*) gene; TGF- β 1; angiogenesis

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(1): 68-72. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.01.012]

胰腺癌是最难治疗且预后最差的消化道恶性肿瘤之一,其中位生存期仅3~6个月,5年生存率不到5%,位居恶性肿瘤病死率第4位^[1]。据报道^[2-3],近年来中国胰腺癌的发病率呈逐年上升趋势,然而目前尚缺乏胰腺癌特异性的早期诊断标志物与有效的化疗药物,因此需要进一步研究胰腺癌的发生发展的相关分子机制。叉头框蛋白Q1(forkhead box Q1, *FOXQ1*)基因是FOX基因家族的新发现的重要成员之一,编码有403个氨基酸的蛋白称为FOXQ1蛋白^[4]。*FOXQ1*作为转录因子与多条信号通路间的相互作用,参与肿瘤恶性生物学行为的形成与维持^[5]。转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)是具有双向调控作用的细胞因子,早期抑制肿瘤细胞的增殖,而一旦肿瘤形成后又促进肿瘤细胞的血管形成、上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)和迁移等^[6]。有研究^[7]表明,*FOXQ1*可能与TGF- β 1通路调控的肿瘤恶性生物学行为的形成与维持发生交互作用。鉴于目前对*FOXQ1*在胰腺癌中的研究报道较少,该基因是否参与胰腺癌PANC-1细胞的血管生成及其与TGF- β 1通路的关系有待深入研究。本课题通过RNAi技术沉默胰腺癌PANC-1细胞*FOXQ1*基因,观察该基因对PANC-1细胞体外血管生成的影响,探讨其是否介导TGF- β 1通路调控胰腺癌PANC-1细胞的体外血管生成。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

胰腺癌PANC-1细胞株购自北京中科院细胞库,人脐静脉内皮细胞株(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)由川北医学院肝胆胰肠研究所提供。RPMI 1640、DMEM培养基和10%胎牛血清购于美国Hyclone公司, RNA提取试剂盒、PCR逆转录试剂盒、PCR扩增试剂盒、SYBYGreen染料、实时荧光定量PCR(qPCR)引物购于日本TaKaRa公司, Western blotting相关试剂盒均购于上海碧云天公司, FOXQ1一抗购于Santa Cruz生物技术有限公司, 兔抗人VEGF-A多克隆一抗、兔抗人MMP-2多克隆一抗、兔抗人GAPDH多克隆一抗购于武汉三鹰生物技术有限公司, 辣根过氧化物酶标记的鼠抗兔二抗购于上海生工, Matrigel基质胶购于美国BD公司, TGF- β 1粉剂购于美国sigma公司。携带FOXQ1-shRNA重组慢病毒和NC-shRNA慢病毒(pLKD.CMV.GFP.U6)均为上海纽恩生物科技有限公司产品。

1.2 细胞培养及分组

细胞在完全培养基(RPMI 1640或DMEM+10%胎牛血清)、37°C、5%CO₂、常规湿度的培养箱中培养。将实验用PANC-1细胞分为:FOXQ1-shRNA组(感染FOXQ1-shRNA重组慢病毒)、NC-shRNA组(感染Negative control慢病毒)和空白对照组(未经处理的细胞)。

1.3 流式细胞术检测慢病毒感染率

FOXQ1-shRNA干扰序列:5'-GATCTGGA-CAGGGATGACT-3'; NC-shRNA序列:5'-TTCTCC-GAACGTGTCACGT-3',感染复数(multiplicity of infection, MOI)为30,每孔加入终质量浓度5 μ g/ml聚凝胺,24 h后换液,72 h后在倒置荧光显微镜下观察荧光强度,用流式细胞仪测定细胞慢病毒感染率。

1.4 qPCR法检测PANC-1细胞FOXQ1、EGF-A和MMP2 mRNA的表达

使用qPCR法检测细胞中FOXQ1、VEGF-A和MMP2的表达水平,以GAPDH作为内参。引物序列:FOXQ1上游引物为5'-TGATTTCTTGCTATT-GACCGATGC-3',下游引物为5'-GCCCAAGGAGACCACAGTTAGAG-3'; VEGF-A上游引物为5'-TGCTGTGGACTTGAGTTGGGAG-3',下游引物为5'-CCTGGCCTTGCACATTCCTG-3'; MMP2上游引物为5'-ACATCAAGGGCATTTCAGGAGC-3',下游引物为5'-CACAGTCCGCCAAATGAACC-3'; GAPDH上游引物为5'-CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC-3',下游引物为5'-GTAGAGGCAGGGATGATGTTCT-3'。按照TRIzol法抽提试剂盒说明书提取3组细胞的总RNA,然后进行逆转录得到cDNA,用CFX96热循环扩增仪扩增各目的基因。扩增条件:95°C预变性30 s,95°C变性5 s,50~60°C不等退火30 s,共40个循环。根据各目的基因以2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算FOXQ1、VEGF-A和MMP2A mRNA的相对表达水平。每个样本设3个复孔,实验重复3次。

1.5 Western blotting检测PANC-1细胞FOXQ1蛋白的表达

按照碧云天蛋白抽提试剂盒说明书进行操作。行SDS-PAGE,孔道蛋白上样量50 μ g,恒流电泳2 h。参照Maker切胶,湿法转膜至PVDF膜,5%的脱脂奶粉封闭1 h,4°C孵育一抗FOXQ1(1:2 000)、MMP-2(1:500)、VEGF-A(1:500)过夜,次日上午复温,TBST漂洗后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(1:200),37°C孵育1 h,ECL显影、保存图像,用Quantity

One灰度分析软件测分析灰度值,结果以目的蛋白灰度值与内参灰度值的比值表示。实验重复3次。

1.6 TGF- β 1 诱导 PANC-1 细胞

将对数生长期的 FOXQ1-shRNA 组、NC-shRNA 组 PANC-1 细胞接种于 24 孔培养板中,分别加入终质量浓度 5 ng/ml 的 TGF- β 1 培养 48 h 后,收集上清液行体外血管生成实验。PBS 清洗 3 遍后,提取细胞总 RNA 与总蛋白,按照 qPCR 和 Western blotting 法分别检测 TGF- β 1 诱导前后 FOXQ1、VEGF-A、MMP-2 mRNA 和蛋白表达水平。

1.7 体外血管生成实验

Matrigel 基质胶与 4 $^{\circ}$ C 无血清培养基体积比 1:9 稀释,150 μ l/孔平铺于 24 孔板上,紫外灯下过夜,收集 FOXQ1-shRNA 组、NC-shRNA 组 PANC-1 细胞不换液连续培养 3 d 后的培养基,离心后取上清液与新鲜完全培养基以 1:1 的比例混匀,以 3 ml/孔加入铺好基质胶的 24 孔板中。取密度 5×10^5 个 HUVEC (被

NC-shRNA 慢病毒感染)细胞接种于上述 24 孔板中培养 72 h,当 HUVEC 围成环形小管样结构时定义为新生血管,于倒置荧光显微镜下($\times 200$)摄片、计数。每个样本设 3 个复孔,实验重复 3 次。

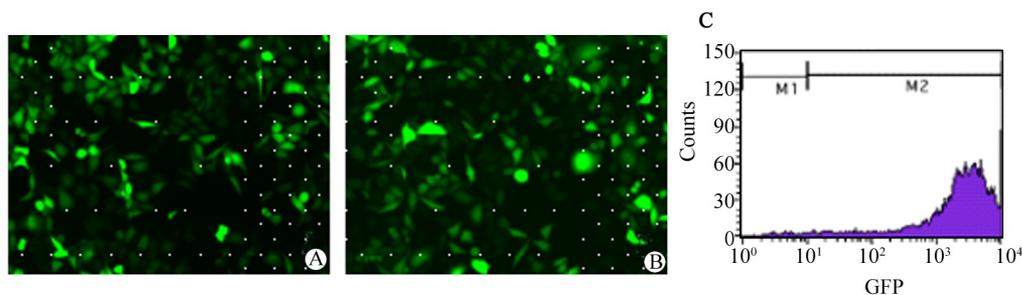
1.8 统计学处理

应用 SPSS19.0 进行统计学分析,计量数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间的均数比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 shRNA 重组慢病毒感染率达 90%

重组慢病毒感染 72 h 后,倒置荧光显微镜下观察结果(图 1A、B)显示,FOXQ1-shRNA 组与 NC-shRNA 组 PANC-1 细胞内可见绿色荧光蛋白表达。流式细胞术检测结果(图 1C)显示,两组 PANC-1 细胞 shRNA 重组慢病毒感染率均达 90% 左右。



A: FOXQ1-shRNA group; B: NC-shRNA group; C: Transfection rate detected by the flow cytometry

图 1 转染 72 h 后 PANC-1 细胞内见绿色荧光蛋白表达($\times 200$)

Fig. 1 Green fluorescent protein was observed under fluorescence microscope 72 h after transfection($\times 200$)

2.2 FOXQ1-shRNA 组 PANC-1 细胞中 FOXQ1 mRNA 和蛋白低表达

重组慢病毒感染 72 h 后,qPCR 检测结果(图 2A)显示,FOXQ1-shRNA 组的 PANC-1 细胞中 FOXQ1 mRNA 表达水平明显低于 NC-shRNA 组与空白组(均 $P < 0.05$)。Western blotting 检测结果(图 2B)显示,FOXQ1-shRNA 组的 PANC-1 细胞中 FOXQ1 蛋白表达水平也显著低于 NC-shRNA 组与空白组(均 $P < 0.05$)。

2.3 沉默 FOXQ1 基因抑制 HUVEC 体外血管生成

体外血管生成实验结果(图 3A)显示,沉默 FOXQ1 后,FOXQ1-shRNA 组的 HUVEC 体外血管生成数目明显少于 NC-shRNA 组 [(9.33 ± 2.08) vs (28.67 ± 2.52) 条, $t = 10.253$, $P < 0.05$]。同时,FOXQ1-shRNA 组体外生成的血管大多没有形成完整管腔,且管径明显小于对照组(图 3B)。

2.4 TGF- β 1 可诱导 PANC-1 细胞 FOXQ1 mRNA 和蛋白表达的变化

用含 TGF- β 1 (5 ng/ml) 培养基培养 PANC-1 细胞 48 h 后,qPCR(图 4A)和 Western blotting 检测结果(图 4B)显示,PANC-1 细胞内 FOXQ1 mRNA 和蛋白的表达水平均明显增加(均 $P < 0.05$)。

2.5 FOXQ1 介导了 TGF- β 1 诱导的血管生成

体外血管生成实验结果(图 5)显示,TGF- β 处理 48 h 后明显增强了 NC-shRNA 组 (40.67 ± 2.08 ; 图 5A) 和 FOXQ1-shRNA 组 (20.0 ± 2.64 ; 图 5B) 细胞的体外血管形成能力,FOXQ1-shRNA 组诱导程度较 NC-shRNA 组低 ($t = 10.633$, $P < 0.05$)。

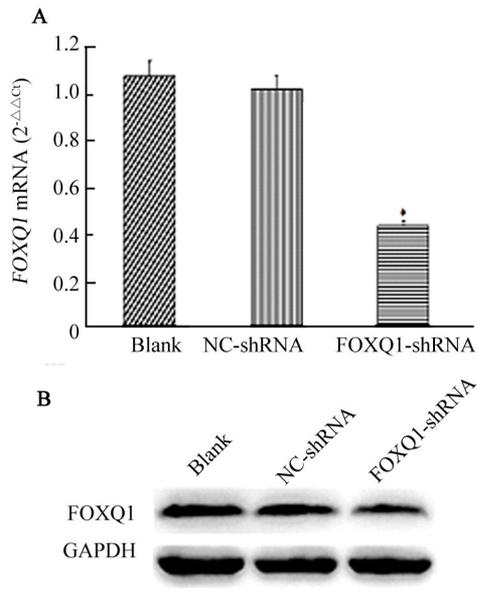


图2 3组PANC-1细胞 *FOXQ1* mRNA(A)和蛋白(B)的表达
Fig.2 Expression of *FOXQ1* mRNA (A) and protein (B) in PANC-1 cells of three groups

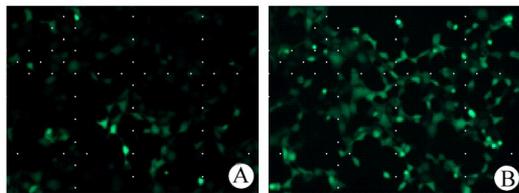


图3 两组PANC-1细胞体外血管生成能力变化(×200)
Fig.3 Changes in vitro angiopoiesis ability of PANC-1 cells in two groups(×200)

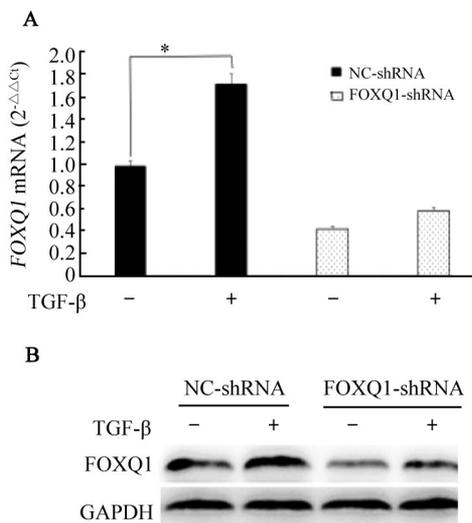


图4 TGF-β1 诱导后两组PANC-1细胞 *FOXQ1* mRNA(A)和蛋白(B)表达变化
Fig.4 Expression of *FOXQ1* mRNA(A) and protein (B) in PANC-1 cells of two groups after induction with TGF-β1

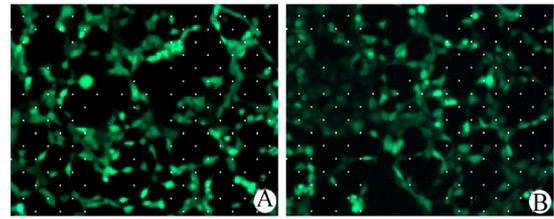


图5 TGF-β1 对NC-shRNA组(A)和FOXQ1-shRNA组(B)PANC-1细胞体外血管生成能力的影响(×200)
Fig.5 Angiopoiesis ability of PANC-1 cells in NC-shRNA group(A) and FOXQ1-shRNA group (B) after the treatment of TGF-β1(×200)

2.6 *FOXQ1* 介导 TGF-β1 调控的 *VEGF-A* 和 *MMP-2* mRNA 的表达

qPCR图6A)、Western blotting(图6B)检测结果显示,*FOXQ1* 基因沉默能下调FOXQ1-shRNA组与NC-shRNA组PANC-1细胞中*VEGF-A*和*MMP-2* mRNA的表达水平(均 $P < 0.05$);而TGF-β1能上调两组细胞中*VEGF-A*和*MMP-2* mRNA的表达,但FOXQ1-shRNA组诱导程度较NC-shRNA组低($P < 0.05$)。

3 讨论

*FOXQ1*在许多肿瘤中扮演原癌基因的角色,但本身又可作为转录因子可与异常激活的ZEB2/E-cadherin、WNT/β-catenin等信号轴交互作用^[4,7]。有研究^[8]证实,TGF-β1信号通路活性水平与肿瘤细胞的转移能力以及患者的病死率正相关。*FOXQ1*可能参与了TGF-β1信号通路的调控^[9-10]。肿瘤的快速生长需

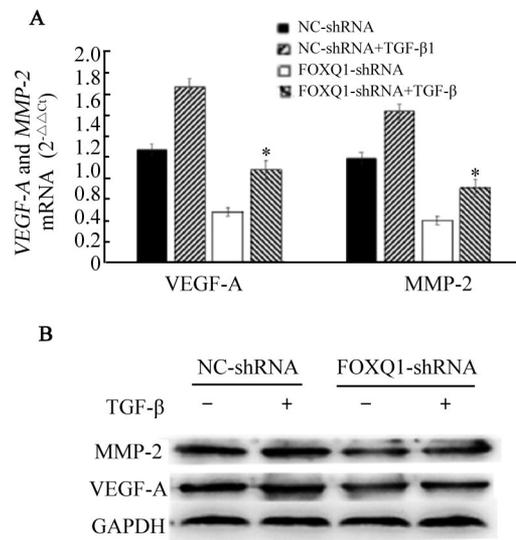


图6 沉默 *FOXQ1* 基因后两组PANC-1细胞 *VEGF-A*(A)和 *MMP-2* mRNA(B)表达变化
Fig.6 Expression of *VEGF-A*, *MMP-2* mRNA in two groups after *FOXQ1* gene silence

要新生血管为其输送血液,同时新生血管为肿瘤的远处转移提供脉管通道,在肿瘤的恶性生物学特性中发挥关键作用^[1]。因此,*FOXQ1*在胰腺癌血管生成中作用以及与TGF- β 1信号通路的关系有待深入研究。

本研究结果发现,*FOXQ1*基因沉默后显著减弱胰腺癌PANC-1细胞的体外血管生成能力。肿瘤的血管生成是由于其调控网络失调,血管生成促进因子取得优势^[2]。VEGF-A是目前已知最重要的肿瘤血管促进因子之一^[3]。MMP通过降解细胞外基质,促进内皮细胞迁移,提高促血管生成因子的活性^[4];还可促进结合的生长因子释放,调控肿瘤微环境,利于肿瘤的生长^[5]。为了探讨*FOXQ1*基因沉默后血管生成能力减弱的分子机制,笔者检测了细胞内*VEGF-A*、*MMP-2*的表达水平,研究结果显示*VEGF-A*、*MMP-2*的表达均下调,提示沉默*FOXQ1*后在转录水平抑制PANC-1细胞中*VEGF-A*、*MMP-2*的表达,导致细胞外基质的降解减少,使内皮细胞迁移、增殖能力减弱,最终致使血管生成能力减弱。课题组前期研究已经表明,TGF- β 1信号通路是一条调控肿瘤血管生成的关键通路。为了进一步探讨胰腺癌中*FOXQ1*在TGF- β 1信号通路中的作用,利用TGF- β 1诱导各组细胞。研究结果发现,TGF- β 1能够明显增加*FOXQ1*的表达、促进细胞的体外血管生成,上调*VEGF-A*、*MMP-2*的表达,但*FOXQ1*-shRNA组诱导程度较NC-shRNA组低,提示*FOXQ1*可能作为TGF- β 1信号通路的下游靶基因,直接或间接参与了该信号通路网络调控。沉默*FOXQ1*基因可在一定程度上减弱TGF- β 1的血管形成,但TGF- β 1调控*FOXQ1*的具体机制尚未明确,有待进一步研究。

综上所述,*FOXQ1*基因介导了TGF- β 1调控的胰腺癌PANC-1细胞体外血管生成,其具体机制有待更深入研究,为临床胰腺癌的基因联合靶向治疗提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] VINCENT A, HERMAN J, SCHULICK R, et al. Pancreatic cancer[J/OL]. *Lancet*, 2011, 378(9791): 607-620[2017-08-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC21620466/>. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)62307-0.
- [2] OKADA K I, HIRONO S, KAWAI M, et al. Value of apparent diffusion coefficient prior to neoadjuvant therapy is a predictor of histologic response in patients with borderline resectable pancreatic carcinoma[J]. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2017, 24(3): 161-168. DOI: 10.1002/jhbp.430.
- [3] ZHANG B, DONG Y, LIU J, et al. Immunotherapy for patients with advanced pancreatic carcinoma: a promising treatment[J/OL]. *Oncotarget*, 2017, 8(4): 5703-5716[2017-08-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5351583/>. DOI: 10.18632/oncotarget.13968.
- [4] YANG L, ZHANG Y, YAO Z, et al. Forkhead box Q1: a key player in the pathogenesis of tumors (review)[J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(1): 51-58. DOI: 10.3892/ijo.2016.3517.
- [5] PENG X, ZAN L, KANG Q, et al. FOXQ1 mediates the crosstalk between TGF- β and Wnt signaling pathways in the progression of colorectal cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(7): 1099-1107. DOI: 10.1080/15384047.2015.1047568.
- [6] YUAN J H, YANG F, WANG F, et al. A long noncoding RNA activated by TGF- β promotes the invasion-metastasis cascade in pancreatic carcinoma[J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(5): 666-681. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.03.010.
- [7] CHRISTENSEN J, BENTZ S, SENGSTAG T, et al. FOXQ1, a novel target of the Wnt pathway and a new marker for activation of Wnt signaling in solid tumors[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e60051 [2017-08-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3608605/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0060051.
- [8] ZHU H, HUI L, SHEN Z, et al. Transforming growth factor- β 1 in carcinogenesis, progression, and therapy in cervical cancer[J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(6): 7075-7083. DOI: 10.1007/s13277-016-5028-8.
- [9] 朱智能, 朱朝辉, 庞自力, 等. 人膀胱移行细胞癌上皮间质转化与核转录因子叉头框蛋白Q1的关系[J]. *中华实验外科杂志*, 2013, 30(3): 567-570. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2013.03.050.
- [10] ZHANG H, MENG F, LIU G, et al. Forkhead transcription factor FOXQ1 promotes epithelial-mesenchymal transition and breast cancer metastasis[J/OL]. *Cancer Res*, 2011, 71(4): 1292-1301[2017-08-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3906209/>. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2825.
- [11] WIKSTROM P, STATTIN P, FRANCK-LISSBRANT I, et al. Transforming growth factor beta1 is associated with angiogenesis, metastasis, and poor clinical outcome in prostate cancer[J]. *Prostate*, 2015, 37(1): 19-29.
- [12] REARDON D A, TURNER S, PETERS K B, et al. A review of VEGF/VEGFR-targeted therapeutics for recurrent glioblastoma[J/OL]. *J Nat Compr Canc Netw*, 2011, 9(9): 414-427[2017-08-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3399727/>.
- [13] MATSUMOTO K, EMA M. Roles of VEGF-A signalling in development, regeneration, and tumors[J]. *J Biochem*, 2014, 156(1): 1-10. DOI: 10.1093/jb/mvu031.
- [14] MOESGAARD S G, AUPPERLE H, RAJAMÄKI M M, et al. Matrix metalloproteinases (MMPs), tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) and transforming growth factor- β (TGF- β) in advanced canine myxomatous mitral valve disease[J]. *Res Vet Sci*, 2014, 97(3): 560-567. DOI: 10.1016/j.rvsc.2014.10.003.
- [15] KAHLERT C, PECQUEUX M, HALAMA N, et al. Tumour-site-dependent expression profile of angiogenic factors in tumour-associated stroma of primary colorectal cancer and metastases[J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(2): 441-449. DOI: 10.1038/bjc.2013.745.

[收稿日期] 2017-08-22

[修回日期] 2017-10-24

[本文编辑] 党瑞山