

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000604

Survivin 基因过表达对血管内皮细胞增殖及抗凋亡能力的影响

张灏龙, 张成瑶, 朱方玉, 王学虎, 赵 渝

(重庆医科大学附属第一医院血管外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究经转染生存素(survivin, SVV)基因后的血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VECs)的增殖、抗凋亡能力及血管生成能力的变化。**方法:**携带 SVV 基因腺病毒感染大鼠动脉内皮细胞(rat artery endothelial cell, RAEC)并通过 Western blot、real-time RCR 的方法检测 SVV 蛋白及其编码基因 birc-5。CCK8 检测经 SVV 干预的 RAEC 其增殖能力的变化;通过过氧化氢(H₂O₂)诱导正常 RAEC 凋亡, SVV 干预 RAEC 凋亡并通过流式细胞仪检测其凋亡率;采用 Western blot 法对比分析凋亡相关因子 caspase 3、bcl-2 及细胞周期蛋白 cyclinD 含量变化;CD31 标记 RAEC, 通过免疫组化检测裸鼠肌肉注射 RAEC 处新生血管情况。**结果:**SVV 基因过表达后, RAEC 的 birc5 mRNA, SVV 蛋白的表达均上调(birc5: $P=0.006$, SVV 蛋白: $P=0.000$), SVV 干预的凋亡 RAEC 其凋亡通路中 caspase 3 较对照组明显降低($P=0.000$), 细胞周期蛋白 cyclinD 明显增加($P=0.000$);其增殖及血管生成能力较对照明显增高($P=0.000$)。**结论:**SVV 干预的 RAEC 在抗凋亡, 促增殖及血管生成方面得到了明显的提升, 为血管内皮细胞(VECs)的临床应用提供一定的理论基础。

【关键词】生存素; 内皮细胞; 外周动脉疾病**【中图分类号】**R322.121; R654.4**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-09-16

Effects of survivin gene over-expression on vascular endothelial cells

Zhang Haolong, Zhang Chengyao, Zhu Fangyu, Wang Xuehu, Zhao Yu

(Department of Vascular Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To observe the ability of cell proliferation, anti-apoptosis, and angiogenesis of rat artery endothelial cells (RAECs) after survivin (SVV) gene transfection. **Methods:** The SVV was transfected into rat artery endothelial cells (RAECs) by adenovirus. The proliferation rates of RAECs with or without SVV transfection were determined by CCK8 assay. The levels of birc5, caspase-3, bcl-2 and cyclin D before or after transfection were detected by real-time PCR and Western blot. The apoptosis of RAECs was induced by H₂O₂ and the apoptosis rate in each group was detected by flow cytometry. The angiogenesis was detected by immunohistochemistry with the RAECs specific marker CD31. **Results:** The birc5 gene and survivin protein levels were both elevated in SVV over-expressed RAECs determined by RT-qPCR and Western-blot assay (birc5: $P=0.006$, SVV protein: $P=0.000$). Meanwhile, the Caspase-3 protein levels were decreased and the bcl-2, cyclinD levels were increased (Caspase-3: $P=0.000$; bcl-2: $P=0.000$; cyclinD: $P=0.000$). RAECs transfected with SVV exhibited a significant higher proliferation rate. The microvessel density (MVD) was much higher in RAECs transfected with SVV than in control group. **Conclusion:** The ability of proliferation, anti-apoptosis and angiogenesis is significantly elevated in RAECs after SVV transfection.

【Key words】survivin; rat artery endothelial cells; periphery artery disease

外周动脉疾病(periphery artery disease, PAD)是表现为外周动脉狭窄、闭塞或栓塞的疾病,以下肢动脉硬化闭塞最为常见。目前手术和药物均无法

逆转动脉壁本身的病变。血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VECs)的激活、增殖、迁移、管腔结构的形成以及塑形,可以重建形成新生血管网,可改善下肢缺血,但成熟的 VECs 活性低,生长速度及自我更新速度慢。生存素(survivin, SVV)是 IAP (inhibitor of apoptosis protein)家族中分子量最小的成员,具有强大的调节细胞增殖和抗凋亡的能力。近年来已有很多研究证实 SVV 也表达于非肿瘤细

作者介绍:张灏龙, Email: 451819971@qq.com,

研究方向:外周血管疾病的研究和治疗。

通信作者:王学虎, Email: 184037696@qq.com。

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(编号:81200230)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150405.2040.003.html>

(2015-04-05)

胞,如胃黏膜^[1]、巨噬细胞^[2]以及肾小管上皮细胞等^[3]。因此培养大鼠动脉内皮细胞(rat aortic endothelial cells, RAEC),上调其 SVV 基因的表达,以获得抗凋亡,促增殖的理想血管内皮细胞,为 PAD 的治疗提供一定的理论及实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

4~6 周龄健康雌性裸鼠购自于重庆医科大学实验动物研究中心;兔抗大鼠 survivin、caspase-3、cyclinD、Bcl-2 抗体(Cell Signaling Technology 公司),ReverTra Ace qPCR RT Kit 试剂盒、RTQ-PCR 试剂盒(TOYOBO 公司);携带 SVV 基因的腺病毒 AdCMV-SVV(上海诺赛基因),兔抗大鼠 CD31 单抗(abcam 公司)。

1.2 方法

1.2.1 腺病毒感染 RAEC 及 SVV 感染效果测定 向对数期生长的 RAEC 加入 50、100、150、200、300 感染复数(multiplicity of infection, MOI)(MOI=病毒颗粒数/细胞数)比例配置的无血清含病毒培养基,24、48 h 后荧光倒置显微镜下观察感染率,测定最佳 MOI 值。此最佳 MOI 值下感染 RAEC,实验分 3 组:空白对照、阴性对照及实验组。阴性对照采用空病毒感染 RAEC,实验组采用 SVV 感染 RAEC。各组提取细胞蛋白,采用 Western blot 法检测 SVV 蛋白变化。提取各组 mRNA,采用 real-time PCR 检测 SVV 核酸变化。引物正义链:5'-TTTTGTGGCTTTGCTCTATTGT-3';反义链:5'-GGTAGG-AGGACTCATCAGAAGGA-3'。

1.2.2 SVV 对细胞增殖率的影响 细胞培养:内皮细胞培养条件为小鼠动脉内皮细胞专用培养基 5 ml、于 37℃、5%CO₂ 条件下培养。实验分 3 组:空白对照、阴性对照及实验组。阴性对照采用空病毒感染 RAEC,实验组采用 SVV 感染 RAEC。按照说明书每空培养板加入 10 μl CCK-8 溶液,在 1、2、3、4 h 后分别在 450 nm 测点吸光度(absorbance, A),评估细胞增殖变化。

1.2.3 细胞诱导凋亡及检测 正常培养细胞同前分为 3 组,向无血清培养基中加入 H₂O₂,使其最终浓度为 0.1、0.5 与 1.0 μmol/L,对照组加入等量生理盐水并共同替换内皮细胞专用培养基培养 6~8 h。采用 AnnexinV-FITC /PI 法,行流式细胞术检测,用 PBS 重悬 1×10⁶ 个细胞,严格按照试剂盒操作说

明进行,计算细胞凋亡率。得出诱导 RAEC 凋亡的最佳双氧水浓度。进一步采用此浓度诱导正常 RAEC,3 组不同干预后采用上述同样的方式检测各组凋亡率。

1.2.4 SVV 对凋亡及增殖相关蛋白的影响 经 15%分离胶电泳,将目的蛋白转移至 PVDF 膜,封闭之后使用兔抗大鼠 caspase-3、Bcl-2、SVV 一抗(均为 1:1 000)。将孵育盒置于摇床 4℃过夜孵育,次日 37℃孵育山羊抗兔二抗(1:3 000)1 h, ECL 发光液显影,观察结果。采用 image J 软件进行目的条带灰度值分析

1.2.5 SVV 对组织新生血管的影响 取 9 只 4~6 周雌性裸鼠肌肉接种内皮细胞,分别分为实验组(接种过 SVV 干预的 RAEC)、空白对照组(正常 RAEC)、阴性对照组(接种空病毒感染 RAEC)。1 周后于注入处取标本,均经 10%中性甲醛、石蜡包埋、4 μm 切片,常规脱蜡,水化后,CD31 孵育过夜,次日采用 SP 免疫组化试剂盒(中杉金桥)测定, DAB 显色,观察新生血管情况。

1.3 统计学处理

用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。实验计量资料均以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两分析比较采用 LSD-*t* 检验;细胞增殖 CCK-8 吸光度采用重复测量设计方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

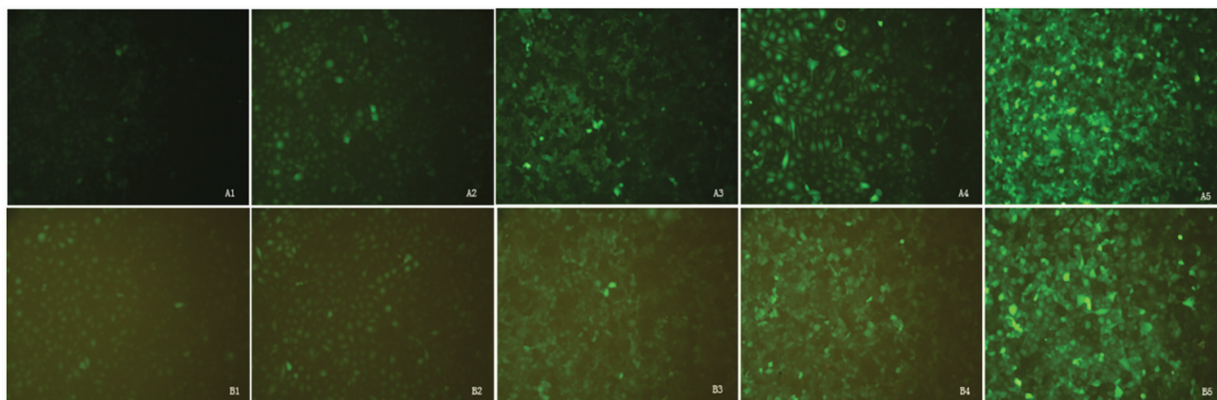
2.1 不同 MOI 病毒转染效率及其测定

经过不同 MOI 值病毒感染,5 组细胞在 24、48 h 荧光强度呈递增趋势,如表 2 所示,可见在 300 MOI 时,细胞感染效率最高,可达 95%且不随感染时间增加而递增(见表 1、图 1), Western blot 结果显示 300 MOI 感染组 SVV 蛋白表达有相应升高,见图 2,用 image J 软件分析条带灰度值,计算出正常组 SVV 蛋白为 13.600±1.560,阴性对照组为 15.620±2.289 实验组为 186.500±13.590,单因素方差分析结果显示差异有统计学意义($F=460.260, P=0.000$)(图 3,表 2)。组间两两比较,SVV 干预组 SVV 蛋白较正常组增高($P=0.000$),同时也较空病毒对照组升高($P=0.000$),正常组与空病毒对照组差异无统计学意义($P=0.770$)。通过 real-time PCR 检测得到各组基因的 Ct 值。目的基因 birc-5 与内参基因 GAPDH 的扩增效率一致,可运用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算各组细胞中 birc-5 mRNA 的相对表达水平。以 control RAEC 为标准化样品,其余组 2^{- $\Delta\Delta C_t$}

表 1 不同 MOI 值 RAEC 转染效率

Tab.1 The RAEC transfection efficiency in different MOI values

时间	50	100	150	200	300
24 h	15%	40%	60%	90%	95%
48 h	40%	45%	63%	95%	95%



1. 50 MOI; 2. 100 MOI; 3. 150 MOI; 4. 200 MOI; 5. 300 MOI (图中 A 为 24 h, 100 $\times$; B 为 48 h, 100 $\times$)

图 1 各组 MOI 值腺病毒感染 24、48 h 后荧光显微镜下 RAEC 发出的绿色荧光 (100 $\times$)

Fig.1 Green fluorescence of RAEC in each MOI under fluorescence microscope after transfected for 24 h and 48 h (100 $\times$)

值为该组 birc-5 基因的表达量相对于标准组基因表达量的倍数。空白对照 birc-5 基因的表达量为 0.936 ± 0.317 , 阴性对照组为 1.030 ± 0.298 , 实验组为 2.003 ± 0.217 , 见表 2。实验结果证明, 差别有统计学意义 ($F=13.397, P=0.006$)。见图 4, 表 2。SVV shRNA 组较空白对照组中 birc-5 基因表达升高 ($P=0.005$), 同时较阴性对照组其表达也提示 ($P=0.003$), 空白对照组与阴性对照组相比差异无统计学意义 ($P=0.687$)。

表 2 3 组细胞中 SVV 蛋白及 birc5 的表达情况
Tab.2 Expression of birc-5 mRNA and SVV protein in each group

组别	SW 蛋白	birc 5
空白对照组	15.620 ± 2.289	0.936 ± 0.317
阴性对照组	13.600 ± 1.560	1.030 ± 0.298
实验组	186.500 ± 13.590	2.003 ± 0.217
<i>F</i> 值	460.260	13.397
<i>P</i> 值	0.000	0.006

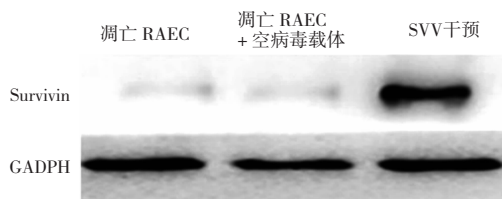


图 2 300 MOI 转染组与对照组 SVV 蛋白表达

Fig.2 Expression of survivin protein in RAEC with or without 300 MOI

2.2 上调 SVV 对 RAEC 增殖能力的影响

RAEC 在上调 SVV 基因 48 h 后, 运用 CCK-8 检测各组细胞增殖情况 (表 3), 根据所得数据绘制的生长曲线如图 3 所示, 结果显示 SVV 干预组细胞在 3 h 后增殖较正常 RAEC、vector+RAEC 明显增强 ($P=0.000$)。而正常 RAEC 与 vector+RAEC 之间差异无统计学意义 ($P=0.911$)。

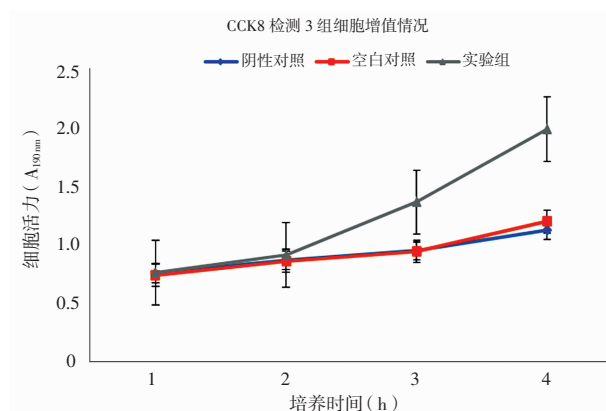


图 3 CCK8 检测过表达 SVV 后对 RAEC 增殖能力的影响

Fig.3 Influence of SVV on proliferation of RAEC detected by CCK8

2.3 不同浓度 H_2O_2 诱导 RAEC 凋亡变化及 SVV 干预后凋亡情况

分别经过 H_2O_2 0.1、0.5、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 及对照培养基处理 8 h 后的 4 组细胞, 4 组凋亡率分别为 26.32%、27.33%、97.68%、2.95%, 见图 4。可见 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度最为合适, 用此浓度诱导按以上分组的 RAEC, 流式细胞仪检测 AnnexinV-FITC/Propidium Iodide 染色后细胞凋亡率见图 5。3 组细胞平均凋亡率分别是 $(79.850 \pm 18.070)\%$ 和 $(90.550 \pm 6.280)\%$ 、 $(28.760 \pm 6.108)\%$, 结果分析显示, 差异有统计学意义 ($F=24.331, P=0.001$), SVV 基因上调后, 较其他 2 组细胞凋亡率明显减低 ($P_{H_2O_2}=0.02, P_{Vector}=0.01$), H_2O_2 对照较 Vector 组间无统计学差异 ($P=0.302$)。

2.4 caspase-3、Bcl-2、cyclin D 在 3 组细胞中的表达变化

Western blot 结果显示, 过表达 SVV 基因细胞中 caspase-3 的蛋白表达明显减低, 且转染组 Bcl-2、cyclin D 蛋白表达有相应升高, 见图 6。用 inmage J 软件分析条带灰度值 (表 4),

根据所得数据绘制的柱状图如图 7 所示。结果显示实验组 caspase 3 较空白对照组、阴性对照组明显降低,且 Bcl-2、cyclinD 较空白对照组、阴性对照组明显升高,差异有统计学意义($F_{\text{caspase-3}}=336.148, P_{\text{caspase-3}}=0.000, F_{\text{Bcl-2}}=449.907, P_{\text{Bcl-2}}=0.000, F_{\text{cyclinD}}=71.200, P_{\text{cyclinD}}=0.000$),组间两两比较实验组 cyclinD、Bcl-2 较其他 2 组均有升高($P_{\text{cyclinD(svv+cn)}}=0.000, P_{\text{Bcl-2(svv+cn)}}=$

$0.000, P_{\text{cyclinD(svv+cn)}}=0.000, P_{\text{Bcl-2(svv+cn)}}=0.000$),而 caspase 3 较其他 2 组均较低($P_{\text{caspase-3(svv+cn)}}=0.000, P_{\text{caspase-3(svv+cn)}}=0.000$),cyclinD、Bcl-2、caspase 3 在空白对照组与阴性对照组中差异无统计学意义($P_{\text{caspase-3}}=0.210, P_{\text{cyclinD}}=0.501, P_{\text{Bcl-2}}=0.965$)。

2.5 CD31 在大鼠注射处肌肉组织中的表达及血管新生情况
CD31 蛋白阳性型号均定位于 VEC 胞质中,呈棕黄色颗

表 3 各组 1~4 h 细胞 A 值

Tab.3 Absorbance value of each group from 1 h to 4 h

组别	1 h	2 h	3 h	4 h	F_g 值	P_g 值
实验组	0.761 ± 0.049	0.912 ± 0.041	1.360 ± 0.032	1.980 ± 0.052	200.060	0.000
空白对照组	0.751 ± 0.034	0.867 ± 0.025	0.945 ± 0.022	1.121 ± 0.047		
阴性对照组	0.741 ± 0.051	0.861 ± 0.032	0.942 ± 0.053	1.195 ± 0.074		
F_1 值	387.616				$F_{g \times 1}$ 值	71.200
P_1 值	0.000				$P_{g \times 1}$ 值	0.000

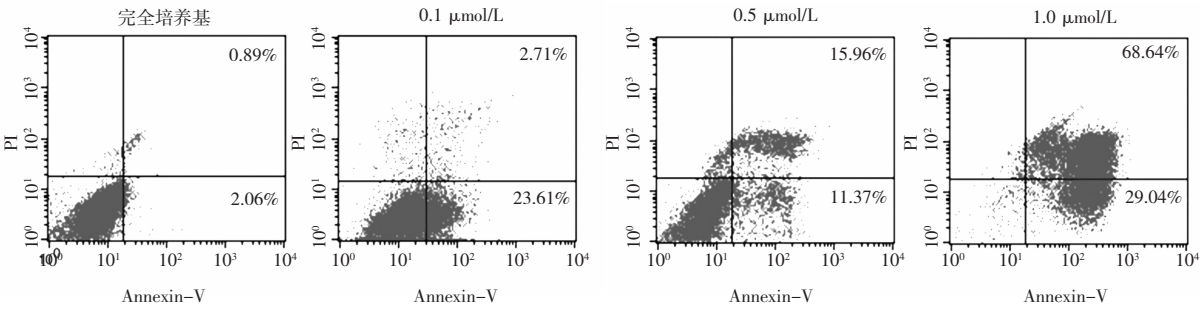


图 4 分别为加入生理盐水的完全培养基,0.1、0.5、1.0 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 8 h 后 RAEC 凋亡情况

Fig.4 Apoptosis rate of each group cultured with 0.1, 0.5, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ and serum-free culture medium for 8 h

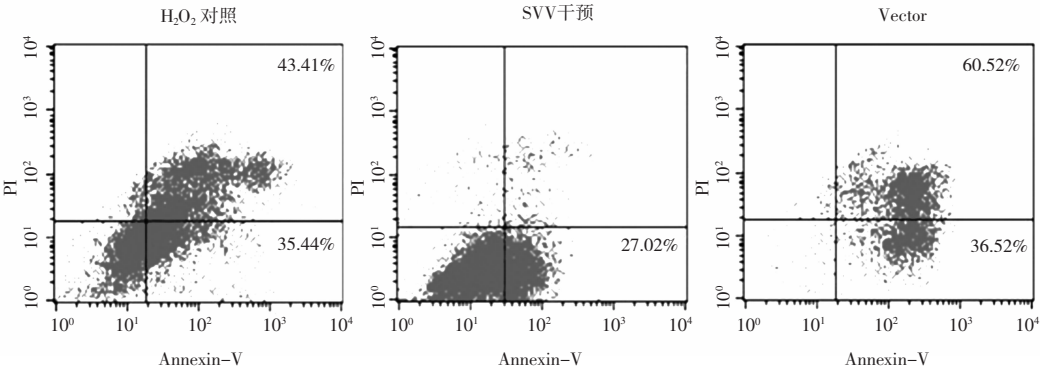


图 5 各组经 1.0 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 8 h 后凋亡情况

Fig.5 Apoptosis rate of each group cultured with 1.0 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 8 h

表 4 各组细胞吸 caspase-3、bcl-2 及 cyclinD 的表达情况

Tab.4 Expression of caspase-3, bcl-2 and cyclinD protein in each group

组别	Caspase-3	Bcl-2	Cyclin D	$P_{\text{caspase-3(svv+cn)}}$	$P_{\text{caspase-3(svv+cn)}}$	$P_{\text{caspase-3(cn+cn)}}$
空白对照组	244.900 ± 2.400	28.300 ± 0.980	108.300 ± 11.500	0.000	0.000	0.210
阴性对照组	237.000 ± 2.010	54.500 ± 1.210	140.500 ± 8.890	$P_{\text{Bcl-2(svv+cn)}}$	$P_{\text{Bcl-2(svv+cn)}}$	$P_{\text{Bcl-2(svv+cn)}}$
实验组	194.230 ± 2.640	140.530 ± 8.890	218.330 ± 27.537	0.000	0.000	0.965
F 值	336.148	449.907	41.097	$P_{\text{cyclinD(svv+cn)}}$	$P_{\text{cyclinD(svv+cn)}}$	$P_{\text{cyclinD(svv+cn)}}$
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.501

粒,CD31 在微血管及大血管,包括正常组织的血管内皮均表达,且 SVV 干预的 RAEC 注射后,组织中 CD31 的阳性表达均大于空白对照组及阴性对照组。见图 8。

3 讨论

SVV 是 IAP(家族中最小成员,在恶性肿瘤中具有较高的表达水平,是目前已知最强的凋亡抑制因子^[4],主要通过抑制线粒体依赖途径的 caspase-3、caspase-7、caspase-9 和 caspase-10^[5-6],同时 SVV 参与细胞周期蛋白的调控,如 CCND1、CDKN1B、CDC2、CDK9 等,CCND1、CDKN1B 和细胞有丝分裂相关,特异性参与 G1 期向 S 期的调控^[7],促进细胞的增殖。实验通过腺病毒感染的方法,上调 RAEC 中 SVV 的表达,并通过 Western blot,real-time PCR 加以验证。采用 CCK8 研究发现,上调 SVV 基因的 RAEC 较对照组细胞增殖能力明显上升,Western blot 结果显示其促增殖蛋白 cyclinD1 较对照组明显升高,说明 SVV 可能同样参与了 RAEC 细胞周期的调控。通过细胞周期蛋白 cyclinD1 等使细胞加速从 G1 到 S 期转换,细胞迅速的通过 G1/S 检测点,S 期缩短,从而大大缩短了细胞周期,使其在体内外的细胞增殖效率面得到了提升,消除了 VECs 增殖率低这一弊端,但仍需要进一步实验证实。

caspase 家族成员大多是凋亡通路中的启动因子及效应因子,在凋亡中发挥重要作用^[8],而其中 caspase-3 被认为是凋亡的关键蛋白,通常以无活性的酶原形成存在于细胞中,具有短前结构域(short-

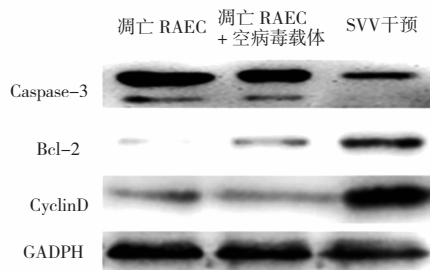


图 6 Western blot 检测各组 caspase-3、Bcl-2、CyclinD 的变化

Fig.6 Expression of caspase-3, Bcl-2, CyclinD protein in each group

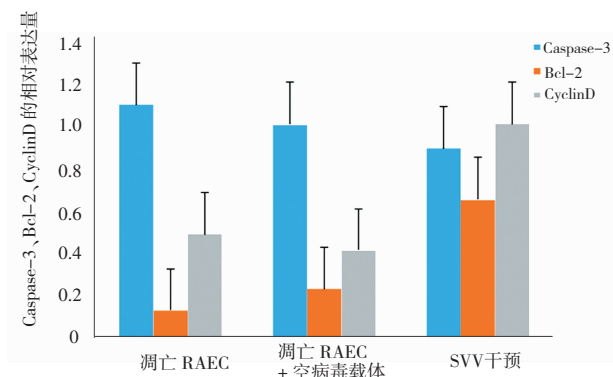
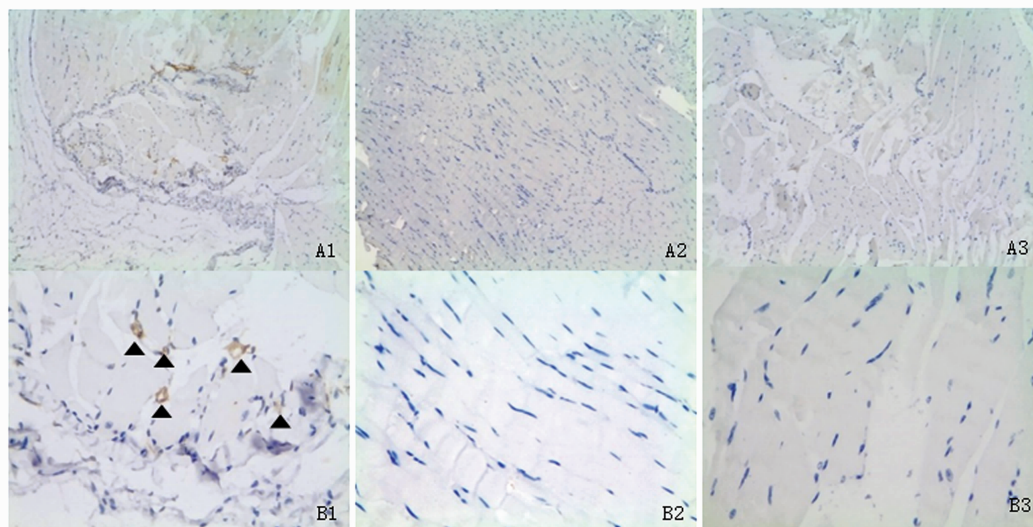


图 7 Western blot 检测 Caspase-3、Bcl-2 及 cyclinD 蛋白的表达

Fig.7 Expressions of caspase-3, Bcl-2, cyclinD protein relative GAPDH



1. SVV 干预 RAEC; 2. vector+RAEC; 3. RAEC control

(图中 A 为 100 × ; B 为 400 × ; ▲ 标示新生血管)

图 8 3 组细胞注射处肌肉组织中血管生成情况

Fig.8 The angiogenesis in the muscular tissue in each group

prodomain)的效应分子,经活化后,作用于胞内多种蛋白和酶类,产生多种凋亡信号,通过裂解灭活凋亡抑制物、细胞外基质蛋白及骨架蛋白、DNA 修复相关分子,促使细胞凋亡,同时 Caspase-3 的活化可激活下游级联反应,使凋亡不可避免。Bcl-2 家族在凋亡通路中有正、负调控作用,其中 Bcl-2 具有抑制凋亡及延长细胞生命的作用^[9],Bax 则通过自身二聚体及与 bcl-2 形成二聚体促进凋亡,因此,Bcl-2 与 Bax 表达的比例决定细胞受到凋亡刺激是否发生凋亡^[10],如干预 caspase-3 表达或下调其活性同时上调 Bcl-2 可抑制细胞的凋亡^[11]。本研究通过上调 RAEC 中的 SVV 基因,干预 caspase-3、Bcl-2 的表达,使其较对照组分别下调和上调并通过 Western blot 证实,同时经双氧水诱导 RAEC 凋亡,并证实 SVV 干预的 RAEC 凋亡率较对照显著下降。由此推测,RAEC 中的 SVV 基因功能与其在肿瘤中类似,通过抑制 Caspase-3 的表达,上调 Bcl-2 与 Bax 的比值,很大程度上抑制了线粒体依赖途径的凋亡,促进了 RAEC 的增生并抑制其凋亡。

血管生成是指从已有的毛细血管或毛细血管后静脉发展而形成新的血管,主要过程包括:细胞外基质的降解;血管内皮细胞的激活、增殖、迁移;管腔结构的形成以及塑形,重新形成新的血管和血管网。是一个涉及多种细胞和细胞因子的复杂过程^[12-13]。研究表明在这一过程中,血管生成素-I(angiotensin,Ang-1)能促进血管内皮细胞表达SVV,且 Ang-1 的作用依赖 SVV 的上调^[14],协同促进新生血管的生成。同时有研究表明,用血管生长因子和碱性成纤维细胞生长因子诱导静止期的内皮细胞有丝分裂,并检测 SVV 的表达,结果提示其表达上升,提示 SVV 可能是血管形成中生长因子诱导的保护基因,保证了新生血管的形成^[15]。本研究通过于裸鼠肌肉内注射 SVV 干预的 RAEC,免疫组化检测标记 CD31+的 VECs,对比发现组织内新生血管的数量较对照组明显增多,说明 SVV 基因的表达与 VECs 以出芽的方式形成新生血管密切相关。

综上所述,本研究采取了体外基因过表达、体内细胞移植的方法对 SVV 干预的 RAEC 抗凋亡,促增殖及血管生成进行了探索与研究,但本研究仅限于细胞层面,后续将于缺血模型上移植衬有 SVV 干预的 RAEC 血管,研究并探讨其功能。本次研究为其提供了理论基础及依据,针对 SVV 转染的内皮细胞

可能成为未来治疗 PAD 的一种新方法。

参 考 文 献

- [1] Chiou SK, Moon WS, Jones MK, et al. Survivin expression in the stomach: implications for mucosal integrity and protection [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 305(2): 374-379.
- [2] Gurbuxani S, Xu Y, Keerthivasan G, et al. Differential requirements for survivin in hematopoietic cell development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(32): 11480-11485.
- [3] Lechler P, Wu X, Bernhardt W, et al. The tumor gene survivin is highly expressed in adult renal tubular cells: implications for a pathophysiological role in the kidney [J]. *Am J Pathol*, 2007, 171(5): 1483-1498.
- [4] Wang X, Fu Z, Zhao Y, et al. Profile of protein expression of the colon cancer cell line SW480 with survivin/shRNA [J]. *Eur J Cancer Prev*, 2011, 20(3): 190-198.
- [5] Gritsko T, Williams A, Turkson J, et al. Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(1): 11-19.
- [6] Colnaghi R, Connell CM, Barrett RM, et al. Separating the anti-apoptotic and mitotic roles of survivin [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(44): 33450-33456.
- [7] Payne SR, Kemp CJ. p27 (Kip1) (Cdkn1b)-deficient mice are susceptible to chemical carcinogenesis and may be a useful model for carcinogen screening [J]. *Toxicol Pathol*, 2003, 31(4): 355-363.
- [8] Stepien A, Izdebska M, Grzanka A. [The types of cell death] [J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2007(61): 420-428.
- [9] Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death [J]. *J Cell Biol*, 1994, 124(1-2): 1-6.
- [10] Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax [J]. *Nature*, 1994, 369(6478): 321-323.
- [11] Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta [J]. *Nature*, 2000, 403(6765): 98-103.
- [12] Cao PF, Xu YB, Tang JM, et al. HOXA9 regulates angiogenesis in human hypertrophic scars: induction of VEGF secretion by epidermal stem cells [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(6): 2998-3007.
- [13] Wan L, Zhang F, He Q, et al. EPO promotes bone repair through enhanced cartilaginous callus formation and angiogenesis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e102010.
- [14] Papapetropoulos A, Fulton D, Mahboubi K, et al. Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(13): 9102-9105.
- [15] Tran J, Master Z, Yu JL, et al. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(7): 4349-4354.

(责任编辑:冉明会)