

反义促血管生成素 2 基因稳定转染对人胃癌细胞 SGC-7901 体外生长的抑制作用

陈 雷, 朱 鹏

(重庆医科大学附属第二医院普外科, 重庆 400010)

【摘要】目的:观察以 pEGFP-N1 为载体的促血管生成素 2(angiotensinogen, Ang2)反义基因转染的人胃癌细胞 SGC-7901 中 Ang2 蛋白的表达,研究其对胃癌细胞体外生长的抑制作用。**方法:**应用重组质粒转染反义 Ang2 的 pEGFP-N1 载体(pEGFP-N1-anti Ang2)、pEGFP-N1 空载体质粒以脂质体转染法转染体外培养的人胃癌细胞株,以未转染组为对照,经 G418 筛选抗性克隆,扩大培养后,应用 RT-PCR 技术与免疫组化法检测 Ang2 基因及其蛋白的表达,MTT 法分析细胞生长抑制作用,Annexin V-FITC 和 PI 双染流式细胞仪检测细胞凋亡。**结果:**RT-PCR 与免疫组化均示 pEGFP-N1-anti Ang2 转染组无 Ang2 mRNA 及其 Ang2 蛋白的表达,MTT 检测表明 pEGFP-N1-anti Ang2 转染组活细胞数较其它两组均低,差异有统计学意义($F=10.39, P=0.0024$),流式细胞仪检测则显示其凋亡率较其它两组明显增高,差异有统计学意义($\chi^2=3188.98, P<0.0001$)。**结论:**pEGFP-N1-anti Ang2 成功转染人胃癌细胞 SGC-7901 且可封闭 Ang2 mRNA 表达,使已转染 pEGFP-N1-anti Ang2 的人胃癌细胞 Ang2 蛋白的表达减少,并抑制人胃癌细胞的恶性表型。

【关键词】人类;反义真核表达载体;促血管生成素 2;基因转染;凋亡

【中国图书分类法分类号】R735.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-06-11

Growth suppression of human gastric carcinoma cell line SGC-7901 by stable transfection of antisense angiotensinogen 2 gene

CHEN Lei, ZHU Peng

(Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective:To evaluate expressions of angiotensinogen 2(Ang2) protein in human gastric cancer cells SGC-7901 transfected by pEGFP-N1-antisense Ang2 and to investigate whether antisense Ang2 gene could inhibit the vitro growth of human gastric carcinoma cell line. **Methods:**Two different plasmids including pEGFP-N1 and pEGFP-N1 SGC-7901 antisense Ang2 were separately transferred into an in vitro cultured human gastric cancer cell line SGC-7901 using Lipofectamine2000 transfection technique. After transfection, the cells were selected by G418. Then resistant clones were chosen and expanded in DMEM culture medium, with parental SGC-7901 cells as control. RT-PCR and immunohistochemical method were done to determine whether target genes and its proteins had expressed. Cell viability was determined by MTT assay. Apoptosis was determined by flow cytometry with a double dyeing method using FITC-conjugated annexin V and PI. **Results:**According to results of RT-PCR and immunohistochemical methods, angiotensinogen mRNA and its proteins were not expressed in transfected antisense Ang2 gene SGC-7901 cells. MTT assay showed that pEGFP-N1-anti Ang2 transfection group had much lower cell viability than other groups($F=10.39, P=0.0024$). Meanwhile, pEGFP-N1-anti Ang2 transfection group had an increase in apoptosis rates compared with those of the other groups based on results of flow cytometry($\chi^2=3188.98, P<0.0001$). **Conclusions:**pEGFP-N1-anti Ang2 successfully transfects human gastric cancer cells SGC-7901, which inhibits Ang2 mRNA and protein expressions as well as suppresses the malignant phenotype of human gastric cells.

【Key words】human; antisense oligonucleotide; angiotensinogen 2; gene transfection; apoptosis

胃癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤,其治疗原则是以手术为主,放疗、化疗、免疫治疗、基因治

作者介绍:陈 雷, Email: 552056506@qq.com,

研究方向: 甲肠道肿瘤。

通信作者:朱 鹏, Email: 526679209@qq.com。

基金项目:重庆市科委自然科学基金资助项目(编号:CSTC2011JJA0623);重庆医科大学科研创新基金资助项目(编号: CX200503)。

疗等结合的综合治疗。胃癌的基因治疗,要想取得突破性进展,有赖于发现更多、更有效的靶点,采用多基因联合治疗。而肿瘤性血管的稳定形成是肿瘤细胞生长、浸润及转移的重要因素。目前已有不少报道证实促血管生成素 2(angiotensinogen 2, Ang2)在胃癌组织血管生成和促进中发挥了重要作用^[1-2],并且有人通过选择性阻断 Ang2 与其受体酪氨酸激酶受

体 2 (tyrosine kinase with immuno-globulin-like and epidermal growth factor homology domains, Tie2) 的结合后抑制荷瘤小鼠的新生血管形成和肿瘤生长^[3], 而反义基因技术是针对某一靶点设计反义寡核苷酸而阻止该靶点表达, 故笔者认为在理论上也许可以通过构建反义基因封闭 Ang2 基因的表达来抑制肿瘤血管形成而进一步抑制肿瘤细胞的生长、促进和加速肿瘤细胞凋亡。笔者以此为思路针对 Ang2 靶点设计了一系列实验, 前期已成功构建了以 pEGFP-N1 为载体的反义 Ang2 基因 (pEGFP-N1-anti Ang2)^[4]。本实验选择高表达 Ang2 并且有较强血管形成能力的人胃癌细胞系 SGC-7901, 予转染 pEGFP-N1-anti Ang2 重组质粒, 观察转染前后人胃癌细胞 Ang2 的表达, 采用 MTT 法、流式细胞仪 (flow cytometry, FCM) 观察其对人胃癌细胞体外生长的影响, 为进一步研究反义 Ang2 基因对胃癌细胞成瘤性和血管生成的影响奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

pEGFP-N1-anti Ang2 重组质粒在前期实验已成功构建^[3]、高表达 Ang2 人胃癌细胞系 SGC-7901 (中科院上海细胞所)、胎牛血清 (Gibco)、pEGFP-N1 (CLONTECH 公司)、DMEM 高糖型培养基 (Gibco)、G418 (Promega)、DMSO (sigma)、MTT (Amresco)、Lipofectamine2000、无血清培养基 OP-TI-MEM (Gibco)、质粒少量提取所需的溶液 [25 mmol/L Tris-Cl (pH8.0)、10 mmol/L EDTA (pH8.0)、1% SDS (w/r)、RnaseA (10 mg/ml)、Annexin-FITC (深圳晶美) 等]。

1.2 细胞的培养、传代

将冻存的人胃癌细胞株 SGC-7901 以震荡、离心、培养等方法复苏后, 以 0.25% 胰蛋白酶液处理后, 待细胞开始变圆, 以 1.5 ml 不含血清的 DMEM 培养液替换培养液, 离心, 去除上清后, 加入 10 ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 置入 CO₂ 孵箱中培养、传代。选用对数生长期的细胞分装于无菌冻存管中, 置入 4 °C 30 min 和 -20 °C 1 h 后, 放于 -80 °C 冰箱过夜再转于液氮罐中长期保存。

1.3 基因转染和转染克隆的筛选

将脂质体分为 3 组: 未转染组、pEGFP-N1 空载体转染组、pEGFP-N1-anti Ang2 转染组。为提高转染质粒整合进宿主基因组的机率, 采用线性质粒 DNA 转化。采用 Lipofectamine 介导的转染技术 (参阅其产品说明书), 分别用 pEGFP-N1-anti Ang2 及 pEGFP-N1 空载体质粒进行细胞转染。取对数生长期的人胃癌细胞株 SGC-7901 细胞, 按 7×10^5 个/孔接种于 2 个 6 孔板中, 待细胞生长近 90% 融合时, 分别加入 G418 浓度为 350、500、650、800、1 000 $\mu\text{g/ml}$ 的含 10% 胎牛

血清的 DMEM 培养基, 每种浓度设 2 个复孔, 另 2 孔以不加 G418 的细胞维持液为对照, 每天观察细胞, 每 3 d 换液 1 次, 以 7 d 内 2 孔细胞全部死亡的最低浓度为确定的筛选浓度, 最后确定筛选浓度为 1 000 $\mu\text{g/ml}$ 。若细胞被质粒转染, 则可在含 G418 的筛选培养基中生存。以此原理采用抗性加压方法筛选出成功转染 pEGFP-N1-anti Ang2 质粒的胃癌 SGC-7901 细胞, 最后在培养瓶中扩增、培养、传代、建系命名为 SGC-7901/anti Ang2。转染组的细胞均稳定传代 2 个月。

1.4 细胞爬片免疫组化检测 Ang2 蛋白表达

将 3 组 (未转染组、pEGFP-N1-anti Ang2 转染组、pEGFP-N1 空载体转染组) 细胞用免疫组织化学方法染色 (SP 法)。分别取各组细胞爬片, 消除内源性过氧化物酶的活性。加入 1:100 鼠抗人的 Angiopoietin 单克隆抗体 4 °C 过夜。PBS (磷酸盐缓冲液) 洗 3 次后加生物素标记的二抗, 37 °C 湿盒内 30 min, PBS 再洗 3 次后 DAB 显色, 显微镜下观察并摄片。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.5 RT-PCR 检测反义 Ang2 基因表达

收集成功转染 pEGFP-N1-anti Ang2 后 48 h 的转染细胞 2×10^6 个, 用 Gibco 公司的 Trizol Reagent 提取细胞总 RNA, 参照说明书逆转录后作 PCR 扩增。根据反义 Ang2 基因序列用 Primer 5.0 软件设计引物 A。PCR 反应条件下 30 个循环后, PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 长波紫外灯下观察结果。

1.6 RT-PCR 检测 Ang2 mRNA 表达

收集稳定转染组阳性细胞及未转染的人胃癌细胞 SGC-7901 各约 2×10^6 个, 用 Gibco 公司的 Trizol Reagent 提取总 RNA, 然后进行逆转录 PCR 扩增测 Ang2 mRNA 表达。具体步骤同 1.5。

1.7 MTT 实验

将扩大培养后的各组细胞分别以每孔 5×10^4 个/ml 接种于 96 孔板, 每组 3 个复孔, 每孔体积 100 μl 。在 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养, 每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/ml) 20 μl , 37 °C 继续孵育 4 h, 弃培养液, 每孔加入 100 μl DMSO、震荡 15 min, 以酶标仪检测 550 nm 波长下其吸光度 (absorbance, A) 值, 其增殖能力大小以平均 A 值分析。

1.8 FCM 检测细胞凋亡

0.25% 胰酶 0.02% EDTA 消化收获培养的 2 个转染组细胞 (含悬浮及贴壁细胞)。FCM 对 3 组 (2 个转染组、1 个未转染组) 凋亡细胞进行定量检测。将细胞用两种染色同时染色后, 可以检测出非凋亡的活细胞 (Annexin V 阴性/PI 阴性), 凋亡细胞 (Annexin V 阳性/PI 阴性) 及坏死细胞 (Annexin V 阳性/PI 阳性), 计算凋亡细胞比率。

1.9 统计学方法及分析软件

运用 SAS 9.2 版统计软件分析数据, A 值为计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 3 组之间比较采用方差分析, 两两之间比较采用 LSD-t 法; 凋亡细胞比率为计数资料, 采用 χ^2 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 转染细胞株的筛选及反义 Ang2 基因在细胞内的整合和表达

2.1.1 采用脂质体转染 转染人反义 Ang2 基因的细胞在含有 1 mg/ml 的 G418 的作用下,5 d 后大部分细胞死亡,紧接着筛选 2 d,可见对照孔未转染细胞几乎全部死亡,而转染细胞孔中有抗性的细胞逐渐扩增;降低 G418 浓度至 400 μ g/ml,持续筛选 2 周后,得到 8 个抗 G418 阳性克隆,取出单个克隆细胞,转入 96 孔板中培养,待生长融合后转至 24 孔板,继续用 G418 400 μ g/ml,压力筛选扩大培养,稳定传代 2 个月 after 对各组进行 RT-PCR 及免疫组化检测。pEGFP-N-anti Ang2 转染组经 *Xho* II, *Bam* H I 双酶切后,重组质粒为 0.72 kb 和 5.4 kb 2 个片段,与理论计算长度相等(图 1)。

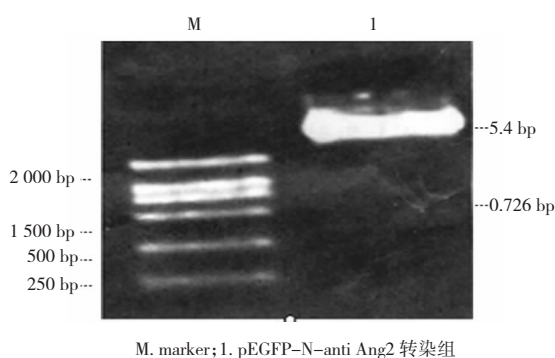


图 1 重组反义质粒 *Xho* II 和 *Bam* H I 双酶切图谱

Fig.1 Double enzyme digestion of restructured antisense plasmid *Xho* II and *Bam* H I

2.1.2 RT-PCR 方法检测各组 Ang2 mRNA 表达 通过 RT-PCR 法检测,在未转染的人胃癌细胞株及转染了空质粒的胃癌细胞株均可扩增出 1 319 bp 的 Ang2 DNA 片段,与预期相符。而在转染 pEGFP-N1-anti Ang2 的阳性克隆细胞中不能扩增出上述 DNA 片段,见图 2,与预期结果相符。此结果说明人胃癌细胞株 SGC-7901 高表达 Ang2 mRNA,而转染了反义 Ang2 基因的人胃癌细胞株不表达 Ang2 mRNA。

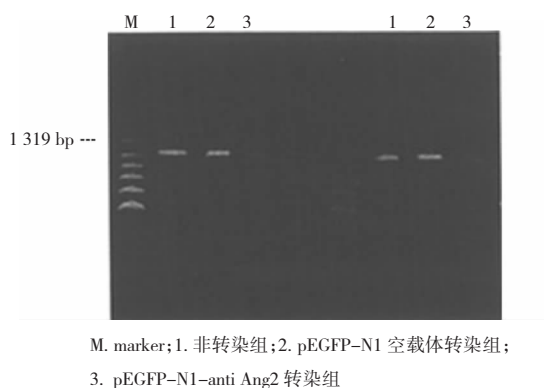


图 2 RT-PCR 显示 Ang2 DNA 片段在各组的表达结果

Fig.2 Expressions of Ang2 DNA fragments in each group displayed by RT-PCR

2.1.3 RT-PCR 检测转染组反义 Ang 基因的表达 通过 RT-PCR 方法检测,结果在转染了反义 Ang2 基因的人胃癌细胞株中可扩增出 726 bp 的 DNA 片段,与所导入的 DNA 片段相等,此结果说明反义 Ang2 基因成功转染人胃癌细胞株。如图 3。

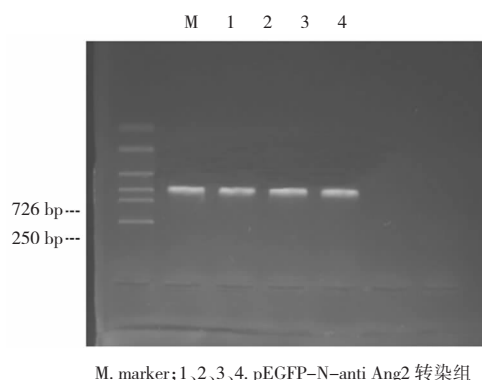


图 3 RT-PCR 显示反义 Ang2 的表达

Fig.3 Antisense Ang2 expression displayed by RT-PCR

2.1.4 免疫组化检测 Ang2 蛋白表达、DAB 染色结果 未转染组及 pEGFP-N1 空载体转染组人胃癌细胞株阳性信号位于胞质中,DAB 染色后呈清晰棕黄色颗粒弥漫分布,说明 Ang2 蛋白表达。而 pEGFP-N1-anti Ang2 转染组细胞以 DAB 染色后细胞质核呈蓝色,无 Ang2 蛋白表达。见图 4。

2.2 MTT 法检测人胃癌细胞体外增殖能力

用 MTT 法检测 3 组细胞体外增殖的能力,3 组之间比较采用方差分析,差异有统计学意义 ($F=10.39, P=0.024$)。再进行两两比较:pEGFP-N1-anti Ang2 转染组与 pEGFP-N1 空载体转染组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$),pEGFP-N1-anti Ang2 转染组与未转染组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$),而 pEGFP-N1 空载体转染组细胞与未转染组细胞之间差异无统计学意义,见表 1。结果显示反义 Ang2 基因转染能够抑制人胃癌细胞 SGC-7901 的生长。

表 1 3 组肿瘤细胞体外增殖能力的比较

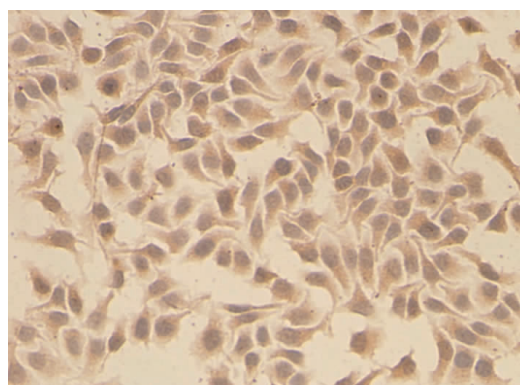
Tab.1 Comparison on tumor cell proliferation in vitro among three groups

细胞分组	例数 (n)	A 值 ($\bar{x} \pm s$)	P 值
未转染组	5	0.517 6 $\pm$ 0.112 8	< 0.05
pEGFP-N1 空载体转染组	5	0.426 5 $\pm$ 0.094 5	< 0.05
pEGFP-N1-anti Ang2 转染组	5	0.256 4 $\pm$ 0.063 2	/

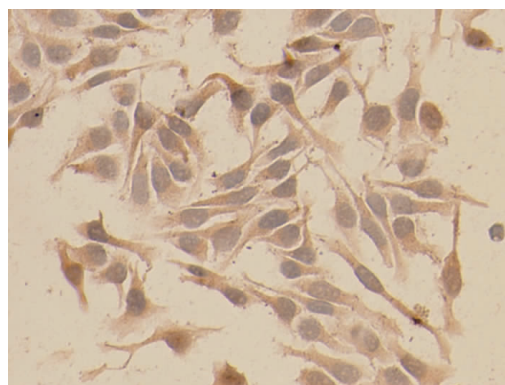
注:/,以该组数据作为比较

2.3 FCM 检测细胞凋亡(表 2)

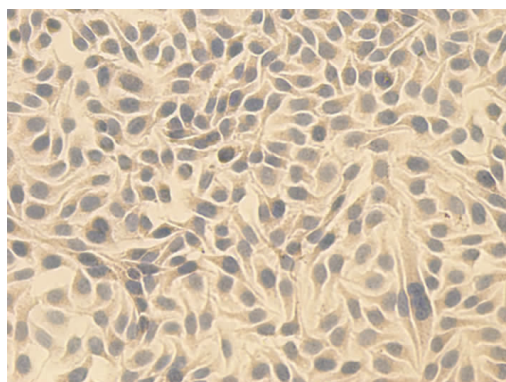
pEGFP-N1-anti Ang2 转染组其早期凋亡细胞百分数、晚期凋亡细胞百分数、继发坏死细胞百分数均明显高于未转染组及 pEGFP-N1 空载体转染组,而活细胞百分数明显低于未转染组及 pEGFP-N1 空载体转染组,经用 χ^2 检验,统计



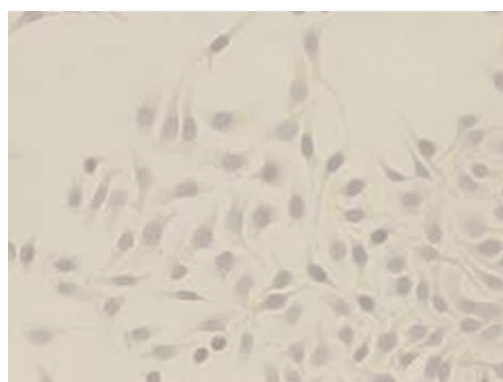
A. 未转染组 SGC-7901 细胞表达
Ang2 蛋白阳性



B. pEGFP-N1 空载体转染组 SGC-7901 细胞表达
Ang2 蛋白阳性



C. pEGFP-N1-anti Ang-2 转染组细胞表达 Ang2 阴性



D. 阴性对照组

图 4 未转染组 SGC7901 细胞表达 Ang2 蛋白阳性 (200 ×)

Fig.4 Positive Ang2 protein expressed by SGC7901 cells in non transfection group (200 ×)

量为 χ^2 分布,结果提示 3 组之间比较差异有统计学意义($\chi^2=3\ 188.98, P<0.000\ 1$),再进行两两比较结果如下:pEGFP-N1-anti Ang2 转染组与 pEGFP-N1 空载体转染组比较差异有统计学意义($\chi^2=1969.98, P<0.000\ 1$),pEGFP-N1-anti Ang2 转染组与未转染组比较差异有统计学意义($\chi^2=2\ 005.1, P<0.000\ 1$),而 pEGFP-N1 空载体转染组与未转染组之间差异无统计学意义($\chi^2=0.2376, P=0.625\ 9$),表明反义促 Ang2 基因转染促进肿瘤细胞(人胃癌细胞株)凋亡。

表 2 FITC-PI 双染 FCM 检测

Tab.2 FITC-PI double staining FCM detection

细胞分组	构成比 (%)				χ^2 值	P 值
	UL	UR	LL	LR		
未转染组	1.24	3.85	92.73	2.18	2 005.1	<0.000 1
pEGFP-N1 空载体转染组	1.52	2.78	92.55	3.15	1 969.98	<0.000 1
pEGFP-N1-anti Ang-2 转染组	1.18	9.80	67.44	21.58	/	/

注:UL,损伤细胞;UR,晚期凋亡细胞和继发坏死细胞;LL,活细胞;LR,早期凋亡细胞;P 值为未转染组、pEGFP-N1 空载体转染组分别与 pEGFP-N1-anti Ang2 转染组比较结果;/,以该组数据作为比较

3 讨 论

基因治疗是目前国内外研究治疗胃癌的新兴手段,其通过在基因水平封闭影响肿瘤生长、分化、浸润的相应基因来控制肿瘤,甚至消灭肿瘤。其具有特异性高、易设计和合成、毒副作用小等优点,但目前胃癌的基因治疗限于有效靶点的发现、封闭技术的欠缺等原因,一直难以取得较大突破。故胃癌的基因治疗想取得突破性进展,有赖于发现更多、更有效的靶点、采用多基因联合治疗。国外许多研究证实,Ang 家族及其受体 Tie2 与血管生成密切相关,且在肿瘤形成过程中对血管形成、稳定、转移、退化起重要作用。Ang/Tie2 参与多种血管生成过程,在此过程中表达水平明显升高,且特异表达于肿瘤边缘的血管重建区^[6]。Ang2 可通过诱导内皮细胞蛋白酶的产生促进肿瘤血管生长、转移,靶向 Ang/Tie2 的治疗可抑制肿瘤血管生成。最近几年国内也有许多文章报道用免疫组化等方法证实了胃癌组

织中 Ang2 高阳性表达,且明显高于其在正常组织、细胞中的表达程度,二者差异性具有统计学意义^[1-2]。同时有不少文章报道了 Ang2 的表达程度随胃癌组织的病理分期(有无转移、浸润程度、分化程度)^[7]及新生血管和微血管密度增加而增加^[8],还与血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)有协同作用^[9]。总之,这些报道都在很大程度上证明了 Ang2 在胃癌发展中起到了参与、促进作用,提示其是胃癌的基因治疗中的有效靶点。在此之后不少作者成功构建了 pEGFP-N1-anti Ang2^[4],这就为针对 Ang2 这一靶点行反义基因治疗提供了早期的物质条件。本实验在前人的基础上进一步证明了该靶点基因治疗的可行性及有效性。通过 RT-PCR 方法检测各组 Ang2 mRNA 表达的结果可以证明:本研究成功转染人胃癌细胞株 SGC-7901,且成功封闭人胃癌细胞中 Ang2 基因及蛋白的表达。在此基础上,用 RT-PCR 方法检测到在转染组中扩增出 726 bp 大小的 DNA 片段,这个结果从另外一个角度说明了反义 Ang2 是成功转染了人胃癌细胞株 SGC-7901。此结果为通过 Ang2 这一靶点行基因治疗提供了前期技术上的可能性,而 MTT 实验证实:反义 Ang2 基因转染人胃癌细胞 SGC-7901 后,其生长受到抑制:稳定转染反义 Ang2 基因的细胞组 A 值显著低于其余 2 组。且本实验用了 pEGFP-N1 空载体转染组与未转染组进行比较 MTT 结果差异无统计学意义,从而排除了载体毒性的作用,从而使本实验的设计更加科学,其结果更有对照性。

另外,在 MTT 法检测的基础上,通过 FCM 检测结果表明:转染反义 Ang2 基因的人胃癌细胞系 SGC-7901 其早期凋亡细胞百分数、晚期凋亡细胞百分数及继发性坏死细胞百分数均明显高于未转染组和 pEGFP-N1 空载体转染组,而活细胞百分数明显低于其它两组。得出的结果与上述结果一致,表明转染过程是成功的,并且成功的证明了针对 Ang2 这一靶点设计的反义基因能在体外成功地封闭其表达,并且抑制了人胃癌细胞 SGC-7901 的生长、促进其发生凋亡。这与利用反义 VEGF-C 基因转染肿瘤细胞抑制其表型结果类似^[9]。本实验证实了反义 Ang2 在体外有抑制人胃癌细胞生长,促进其凋亡的作用,为以后研究反义 Ang2 转染对人胃癌细胞成瘤

性和血管生成的影响奠定了前期基础,但反义 Ang2 基因转染后在人体内是否能抑制肿瘤细胞的生长、促进肿瘤细胞的凋亡,并且是通过什么途径来发挥其生物学特性的等一系列问题还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 章 璠,周伟平,方国恩,等.胃癌组织中 Ang-2 和 VEGF 的表达与血管生成的关系[J].临床肿瘤学杂志,2009,11:994-998.
Zhang J,Zhou W P,Fang G E,et al.Expression of Ang-2 and VEGF and its relation with angiogenesis in gastric carcinoma[J].Chinese Clinical Oncology,2009,11:994-998.
- [2] 成旭惠,殷希龙,颜 芳,等. Ang-2、VEGF 及 MVD 在胃癌中的表达及其临床意义[J].现代医学,2008,36(2):86-91.
Cheng X H,Ou X L,Yan F,et al.Expression and significance of Ang-2,VEGF and MVD in gastric carcinoma[J].Modern Medical Journal,2008,36(2):86-91.
- [3] Qlier J,Min H,Leal J,et al.Suppression of angiogenesis and tumor growth by selective inhibition of angiopoietin-2[J].Cancer Cell,2004,6(5):507-516.
- [4] 朱 鹏,郑朝新,陈道达.人促血管生成素-2 反义真核表达载体的构建及鉴定[J].咸宁学院学报(医学版),2005,19(2):11-13.
Zhu P,Zheng C X,Chen D D,et al.Construction and identification of human angiopoietin-2 antisense eukaryotic expression vector[J].Journal of Xianning College(Medical Sciences),2005,19(2):11-13.
- [5] Zhu P,Zhang J,Chen Q,Wang J,et al.Expression of vascular endothelial growth factor-C in gastric carcinoma and the effect of its antisense gene transfection on the proliferation of human gastric cancer cell line SGC-7901[J].Am J Surg,2012,204(1):78-83.
- [6] Zergeroğlu S,Ozdemir H B,Ozel M,et al.The prognostic importance of proliferative activity and oestrogen receptor expression in stage I endometrial carcinomas[J].J Obstet Gynaecol,2006,26(8):798-801.
- [7] 刘少平,方春华,余立群,等.胃癌浸润转移与血清促血管生成素-2 的关系[J].中国医师进修杂志,2011,34(28):31-34.
Liu S P,Fang C H,Yu L Q,et al.Correlation between invasion and metastasis of gastric cancer and serum angiopoietin-2[J].Chinese Journal of Postgraduates of Medicine,2011,34(28):31-34.
- [8] 朱 鹏,郑朝新,陈道达,等.Ang-2 在胃癌组织中表达与胃癌新生血管形成的关系[J].咸宁学院学报(医学版),2005,19(6):461-464.
Zhu P,Zheng C X,Chen D D,et al.The expression of angiopoietin-2 in gastric carcinoma and its relation with tumor angiogenesis[J].Journal of Xianning College(Medical Sciences),2005,19(6):461-464.

(责任编辑:冉明会)