

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.03.002

低氧和缺氧诱导因子-1 α 对人白血病细胞株 K562 细胞血管相关生成因子的影响*

解友邦, 李建平, 沈括, 孟芳, 王莉, 韩国雄, 艾国, 蒋白丽, 赵强强, 候艳, 杨红艳, 李文倩 Δ

(青海省人民医院血液风湿科, 西宁 810007)

[摘要] 目的 观察低氧和缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)对 K562 细胞分泌血管相关生成因子的影响。方法 选用携带和干扰 HIF-1 α 基因的慢病毒转染 K562 细胞,以转染携带和干扰 HIF-1 α 基因的 K562 细胞分别作为过表达组、干扰组,同时以空载病毒转染 K562 细胞作为对照组,3 组在低氧状态下培养 72 h 后收集细胞。通过荧光显微镜观察转染效率,采用 RT-PCR 法检测 HIF-1 α 和血管相关生成因子 mRNA 表达水平;ELISA 法检测培养上清液中血管相关生成因子蛋白水平。结果 慢病毒转染 K562 细胞最佳感染复数(MOI)为 10,转染效率约 50%,经过嘌呤霉素筛选后转染阳性细胞达 90%以上。干扰组人血管生成素(ANG)-II 和血管内皮生长因子(VEGF) mRNA 表达均低于过表达组,而转化生长因子(TGF)- β mRNA 表达高于对照组和过表达组,过表达组 ANG-II mRNA 表达高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。培养上清液中 TGF- α 未检测到,过表达组 ANG-II 水平低于对照组($P < 0.05$);过表达组 VEGF 和 TNF- α 水平高于对照组,干扰组 TGF- β 和 VEGF 水平低于对照组($P < 0.05$)。干扰组 TGF- β 、VEGF 和 TNF- α 水平低于过表达组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 低氧和 HIF-1 α 可影响慢性白血病 K562 细胞血管生成相关因子的表达和自分泌,但在 mRNA 表达和蛋白分泌水平上存在差异。

[关键词] 白血病;K562 细胞;缺氧诱导因子-1 α ;低氧;血管相关生成因子

[中图分类号] R557. +3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)03-0364-06

Effect of hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 α on angiogenesis-related factors in human leukemia K562 cells*

XIE Youbang, LI Jianping, SHEN Kuo, MENG Fang, WANG Li, HAN Guoxiong, AI Guo, JIANG Baili, ZHAO Qiangqiang, HOU Yan, YANG Hongyan, LI Wenqian Δ

(Department of Hematology and Rheumatology, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining, Qinghai 810007, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of hypoxia and hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) on human leukemia cell line K562 secreting angiogenesis-related factors. **Methods** The lentivirus carrying and interfering HIF-1 α was transfected into K562 cells. The K562 cells transfection carrying and interfering HIF-1 α gene served as the overexpression group and interference group respectively. Meanwhile K562 cells with empty virus transfection served as the control group. The cells in 3 groups were harvested after 72 h of incubation under hypoxia. The transfection efficiency was observed by using the fluorescence microscope. The expression levels of HIF-1 α and angiogenesis-related factors mRNA were detected by RT-PCR. The level of angiogenesis-related factor protein in the culture supernatant was detected by ELISA. **Results** The optimal multiplicity of infection(MOI) of transfected K562 cells with lentivirus was 10 and the transfection efficiency was about 50%. The transfection positive cells after screening by puromycin reached more than 90%. The expressions of ANG-II and VEGF mRNA in the interference group were all lower than those in the overexpression group, while the TGF- β mRNA expression was higher than that in the control group and overexpression group ($P < 0.05$); the ANG-II mRNA expression level in the overexpression group was higher than that in the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). TGF- α in the culture supernatant fluid was not detected.

* 基金项目:青海省卫生和计划生育委员会 2016 年科研指导项目(青卫科[2016]22 号 2016-wjzdx-17);青海省国家重点专科项目(卫办医政函[2011]873 号);2014 年度青海省人才小高地项目(青海人才字[2014]12 号);青海省高层次卫生人才(骨干人才和领军人才)计划。作者简介:解友邦(1980-),副主任医师,博士,主要从事血液及高原医学方面的研究。 Δ 通信作者, E-mail:lwq121616@163.com。

The ANG- II level in the overexpression group was lower than that in the control group; the VEGF and TNF- α levels in the overexpression group were higher than those in the control group, the TGF- β and VEGF levels in the interference group were lower than those in the control group ($P < 0.05$). The levels of TGF- β , VEGF and TNF- α in the interference group were lower than those in the overexpression group. The above differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Hypoxia and HIF-1 α could affect the expression and autocrine of angiogenesis-related factors in chronic leukemia K562 cells. However, there are differences in mRNA expression and secretion levels.

[Key words] leukemia; K562 cell; hypoxia inducible factor-1 α ; angiogenesis; related factors

骨髓中造血细胞不受控制地增殖是白血病的特征之一,慢性白血病细胞会导致更多造血功能正常的成熟细胞群的出现,临床进展比较慢,生存周期长^[1]。目前,医学界对慢性白血病的生物学和分子遗传学有了较深的理解,临床转化和诊治取得了重大进展^[2-3]。但造血细胞中许多信号传导途径与 BCR/ABL 交叉,包括抑制信号、细胞凋亡、细胞生存及增殖信号^[4]。近年研究表明,长非编码 RNA HULC 的抑制增强了伊马替尼诱导的慢性粒细胞性白血病(CML)细胞凋亡,HULC 沉默明显抑制了磷酸肌醇-3 激酶(PI3K)和蛋白激酶 B(Akt)的磷酸化,提示 HULC 抑制后导致伊马替尼诱导的凋亡增加与 c-Myc 表达的减少可能和 PI3K/Akt 途径活性的抑制有关^[5]。通过 RNA 干扰(RNAi)或小分子靶向抑制缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)后,在体外抑制原始细胞集落形成,抑制肿瘤的生长和白血病进展^[6-7]。然而由于新血管生成过程已被证明是持续肿瘤生长和癌症进展必需的阶段,因此血管生成相关治疗制剂是目前临床研究的重点^[8]。上述研究提示,HIF-1 α 及信号相关通路(如 PI3K/Akt 信号通路)和慢性白血病有密切的联系。已有文献报道 CML 患者骨髓 HIF-1 α 表达明显增高^[9]。缺氧、HIF-1 α 及 CML 细胞分泌血管相关因子之间的关系目前尚不清楚,本实验的目的在于观察 K562 细胞分泌血管生成因子与 HIF-1 α 和缺氧之间的关系,为高海拔缺氧环境中的白血病临床治疗提供一定的基础依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞培养 K562 细胞由青海省人民医院血液病研究室冻存,生长于含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基(含 100 U/mL 青霉素和 100 mg/L 链霉素,pH 值 7.2~7.4)中,37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱中常规孵育,每 2~3 天换液传代,分瓶传代继续培养。取对数生长期的细胞用于后续实验。

1.1.2 仪器及试剂 细胞培养箱购自美国 ThermoFisher 公司;全自动酶标仪购自美国 BioTek 有限公司(型号 ELx800);实时荧光定量 PCR 仪器购自美

国 AB 公司(型号 ABI7500);倒置荧光显微镜购自日本 Olympus 公司;Trizol RNA 提取试剂购自美国 Invitrogen 公司;ELISA 试剂盒购自欣博盛有限公司。引物的设计使用加拿大 Premier 公司的 Primer5.0 软件,PCR 试剂购自北京索莱宝有限公司,PCR 所用引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。细胞转染慢病毒载体购自广东赛尔飞世有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染及分组 将对数生长期的 1×10^5 细胞接种于 12 孔板,共接种 4 个孔,培养液体积 2 mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育箱中培养 12 h,待细胞铺满培养孔 60%时,加入含有 HIF-1 α 干扰或过表达 Lentivirus 病毒液,其中 3 个孔感染复数(MOI)分别为 100、10 和 1;第 4 孔为空载病毒液,同时加入 10 μL Polybrene 稀释液(终浓度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$),混匀,继续培养 48 h 后加 1 mL 新鲜培养基,稀释 Polybrene。每 4 小时观察细胞形态,更换新鲜培养液。感染 4 d 后观察荧光表达情况,并根据细胞生长情况换液,保持细胞活性;确定最佳感染 MOI 为 10,每 1 毫升培养基加 1 μL 嘌呤霉素(终浓度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)筛选转染的阳性细胞,根据实际情况可以重复筛选 1 次。收集转染阳性的细胞继续做后续实验。以转染携带和干扰 HIF-1 α 基因的 K562 细胞分别作为过表达组和干扰组,同时以空载病毒转染 K562 细胞为对照组,分别给予低氧(5% CO_2 ,3% O_2)处理 72 h 后收集细胞和培养上清液。上述实验重复 3 次。

1.2.2 总 RNA 提取及 PCR 检测 收集处理后的 K562 细胞,每 1×10^6 细胞加入 1 mL Trizol 反复吹打至细胞完全裂解,提取细胞总 RNA。核酸蛋白测定仪测定光密度(OD)₂₆₀/ OD ₂₈₀ 的比值,并进行 RNA 样品的纯度与浓度测定。RNA 纯度和浓度合格者将 RNA 反转录制备 cDNA,逆转录体系为 40.0 μL 即 Total RNA sample 10.0 μL ,4 \times dNTP 2.5 μL ,Oligo dT primer 2.0 μL ,5 \times Buffer 8.0 μL ,焦碳酸二乙酯(DEPC) H_2O 14.5 μL ,RNase Inhibition 1.0 μL 和 M-MLV 2.0 μL 。ABI7500 PCR 检测仪检测 mRNA 表达,反应体系为 20.0 μL ,即 cDNA 2.0 μL ,10 \times

Buffer 2.5 μL , PCR Primer 2.0 μL , dNTP 2.0 μL , Premix Taq 0.5 μL 和 ddH₂O 11.0 μL 。扩增条件: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 退火 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 共进行 40 个循环。设置甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 基因作为内参。应用 Primer5.0 软件设计引物。引物序列见表 1。

1.2.3 ELISA 检测培养上清液血管相关因子水平
通过 ELISA 法测定培养上清液中的人血管生成素 (ANG)-I、ANG-II、转化生长因子- α (TGF- α)、血管内皮生长因子 (VEGF) 和转化生长因子- β (TGF- β) 的水平。其中 ANG-I、ANG-II、TGF- α 、VEGF 实验前不需要标本预处理, 而 TGF- β 实验前需要对本标进行 50 倍数稀释, 并给予氯化氢 (HCl) 10 μL 进行预处理 15 min, 加入氢氧化钠 (NaOH) 10 μL 后进行后续 ELISA 操作步骤。结果根据标准绘制标准函数和曲线, 将 OD 值换算为浓度, 并将稀释样品检测浓度乘以稀释倍数计算样品浓度。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行实验数据分析, 计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 3 组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 LSD 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态观察及转染效率 K562 细胞经吉姆萨染色处理后, 在显微镜下细胞胞体呈圆形或椭圆形, 边缘可见瘤状突起。细胞核呈圆形或椭圆形, 约占细胞直径的 4/5, 染色质呈颗粒状, 有聚集趋势, 为淡蓝色, 核膜较清楚, 胞质质量较少, 呈不透明的深蓝色, 核周有淡染区。K562 细胞形态与原始红细胞形

态相似。最适 MOI 值为 10, 转染效率约 50%, 经过嘌呤霉素筛选后阳性细胞大于 90%, 见图 1、2。

表 1 各基因引物序列

基因	引物序列(5'-3')	序列长度(bp)
ANG-I R	CCGACTTCATGTTTTCCACA	20
ANG-I S	ACCGGATTTCTCTTCCCAGA	20
ANG-II R	GGCGAGGTGTAGGAGAAGGA	20
ANG-II S	TTCCTCACGCAACCTCCAC	19
TGF- α R	GGGCAGTCATTAATAATGGGA	20
TGF- α S	GCTCTGGGTATTGTGTTGGC	20
VEGF R	TAACACCGCAAGTTCCTCA	19
VEGF S	AAGGTCAACACGCCAAGA	18
TGF- β R	GGCCAGATCTGTCCAAGC	19
TGF- β S	GTGGGTTTCCACCATTAGCAC	21
GAPDH R	ATCAAGAAGGTGGTGAAGCA	20
GAPDH S	CAAAGGTGGAGGAGTGGGT	19

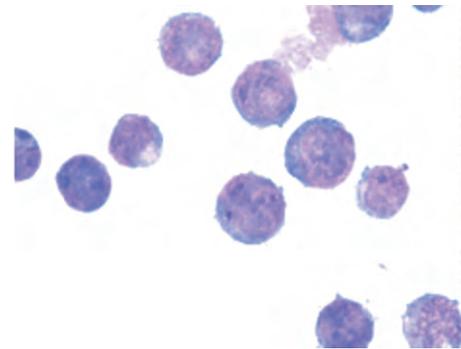


图 1 K562 细胞形态 (吉姆萨染色, $\times 100$)

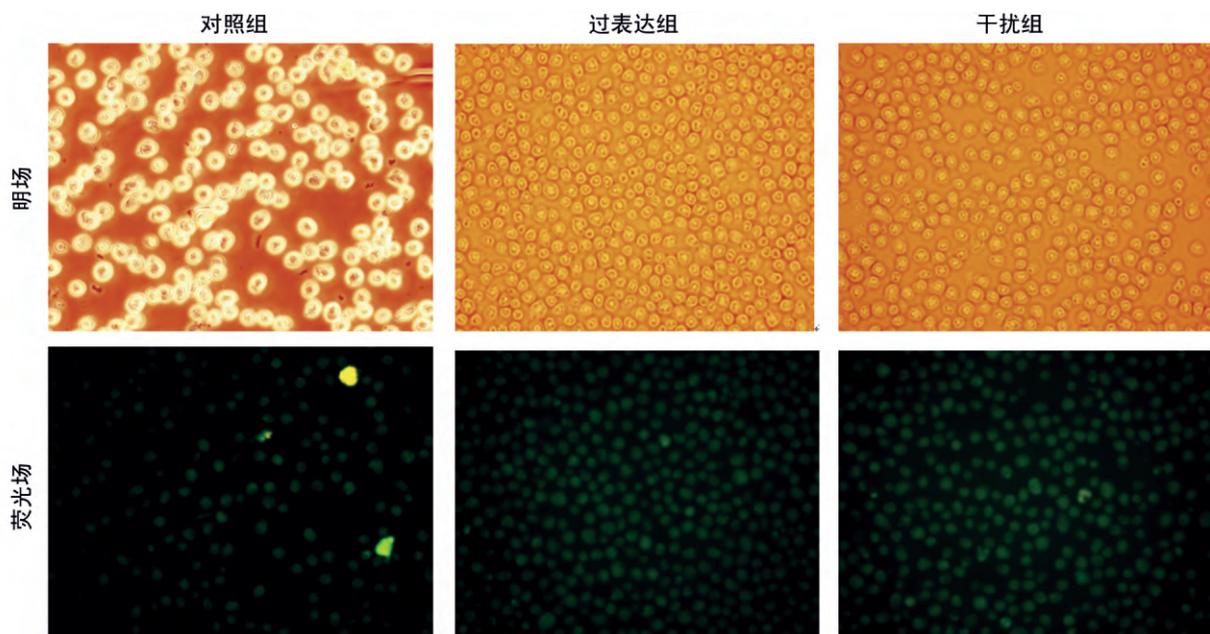


图 2 3 组转染阳性细胞 (吉姆萨染色, $\times 100$)

表 2 低氧状态下 3 组血管生成相关因子 mRNA 水平

项目	对照组	过表达组	干扰组	F	P
ANG-I	7.44±3.98	4.64±2.60	3.81±1.97	2.056	0.171
ANG-II	3.93±0.61	5.38±0.59 ^a	1.40±0.81 ^{ab}	44.301	<0.01
TGF-α	7.02±1.24	7.58±1.39	5.23±3.45	1.479	0.267
TGF-β	1.85±0.60	3.13±1.16	4.95±1.16 ^{ab}	11.951	0.001
VEGF	7.92±2.77	12.25±3.89	3.76±3.60 ^b	6.581	0.015

^a: P<0.05, 与对照组比较; ^b: P<0.05, 与过表达组比较

表 3 低氧状态下 3 组血管生成相关因子水平

项目	对照组	过表达组	干扰组	F	P
ANG-I (ng/mL)	0.76±0.22	0.81±0.33	0.64±0.25	0.627	0.548
ANG-II (ng/mL)	73.33±18.22	53.57±8.09 ^a	63.53±8.44	3.751	0.048
TGF-β (pg/mL)	491.48±102.40	551.25±112.02	157.69±173.20 ^{ab}	10.616	0.003
VEGF (pg/mL)	587.10±31.49	759.74±109.43 ^a	368.60±103.79 ^{ab}	29.136	<0.01
TNF-α (pg/mL)	12.04±1.31	14.93±1.83 ^a	11.34±1.61 ^b	7.694	0.006

^a: P<0.05, 与对照组比较; ^b: P<0.05, 与过表达组比较

2.2 低氧状态下 HIF-1α 和血管生成相关因子 mRNA 的表达比较 干扰组 ANG-II 和 VEGF mRNA 表达均低于过表达组 (P<0.05), 而 TGF-β mRNA 表达高于对照组和过表达组 (P<0.05); 过表达组 ANG-II mRNA 表达高于对照组, 差异有统计学意义 (P<0.05), 见表 2、图 3。

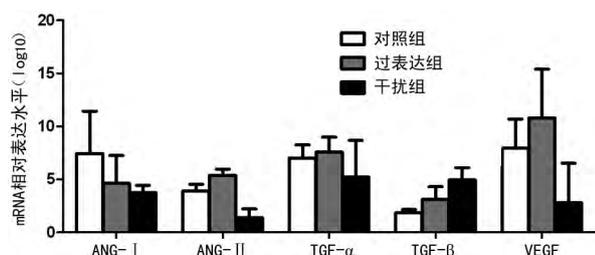


图 3 低氧状态下 3 组血管生成相关因子 mRNA 水平

2.3 低氧状态下 3 组培养上清液中血管生成相关因子水平的比较 培养上清液中 TGF-α 未检测到, 过表达组 ANG-II 水平低于对照组 (P<0.05); 过表达组 VEGF 和 TNF-α 水平高于对照组 (P<0.05), 干扰组 TGF-β 和 VEGF 水平低于对照组 (P<0.05)。干扰组 TGF-β、VEGF 和 TNF-α 水平低于过表达组, 差异有统计学意义 (P<0.05), 见表 3。

3 讨论

关于低氧和缺氧诱导因子(HIF)与造血的研究已经有相关报道,主要集中在缺氧通过 HIF 相关的能量代谢、细胞周期及免疫功能等方面影响疾病的维持和进展^[10-13]。关于 HIF 和 CML 细胞之间的关系有研究提示 HIF 表达增加可以促进 B 细胞淋巴瘤 2(Bcl-2)表达,抑制细胞凋亡,并促进 VEGF 的表达,诱导肿瘤新血管生成^[6]。本实验结果提示,低氧和 HIF-1α 可影响慢性白血病 K562 细胞血管生成相关因子的表

达和自分泌,但在 mRNA 表达和分泌水平上存在差异。血管生成是新血管通过已有血管萌芽形成和原有血管纵向分隔的过程,血管新生是一种正常的生物学过程^[14-15]。许多血管相关生成因子参与实体瘤血管生成,目前可应用靶向药物来预防实体瘤中的血管生成。

Ang II 来源于内皮细胞,是血管中 Tek 信号传导的拮抗剂^[16-17]。Ang I 和 Ang II 是内皮细胞特异性酪氨酸激酶受体(Tie2)的配体,Tie2 是血管生成的基本调节剂^[18]。Ang II 上调导致血管通透性增加和不稳定而引发内皮炎症和血管生成。Ang II 在许多肿瘤类型的脉管系统中高表达,和肿瘤血管生成密切相关,可作为 Tie2 激动剂^[19-21]。除肿瘤外,在炎症中 Ang II 表达增加,具有促炎作用,可通过抑制 Tie2 功能促进血管失稳和渗漏^[22-23]。本实验结果提示,在低氧下 HIF-1α 干扰或过表达对 K562 细胞分泌 Ang I 没有影响,而 HIF-1α 过表达使 K562 细胞分泌 Ang II 的能力下降,这表明在低氧下除 HIF-1α 之外可能还有其他低氧相关因素的影响,这有待进一步的验证。

VEGF 是由间充质细胞和基质细胞以旁分泌方式产生和分泌的,它是内皮细胞的有效促分裂原和化学引诱物^[24]。VEGF 诱导恶性细胞的新血管形成并在肿瘤细胞中高表达,是内皮增殖、迁移和存活的刺激剂^[25]。CML 致癌基因 BCR/ABL 通过 PI3K 和 mTOR 途径诱导 VEGF 和 HIF-1α 基因表达,有助于促进血管生成^[26]。本实验结果提示低氧下 HIF-1α 干扰降低 VEGF mRNA 的表达,过表达上调 VEGF mRNA 表达的同时促进 VEGF 蛋白分泌。既往研究提示 Siah2-PHD3-HIF-1α-VEGF 轴在白血病微环境

中是重要的缺氧信号传导,且与 CML 对伊马替尼耐药有关^[27]。HIF-1 α 抑制通过降低 VEGF、葡萄糖转运蛋白(Glut)-1、磷酸甘油酸激酶(PGK)和多药耐药蛋白 P 糖蛋白(P-gp)增加 K562 细胞对高三尖酯碱的敏感性^[28]。由此可见,低氧诱导的 HIF-1 α 表达相关的血管生成在 CML 发病及治疗效果中的重要意义。

TGF- α 是一种表皮生长因子受体(EGFR)配体,选择性结合 EGFR 并激活 EGFR 介导的信号通路,调节细胞增殖、分化、运动和存活^[29],HIF 激活后,TGF- α 的上调引起自分泌激活 EGFR 信号传导^[30]。有文献报道,组织因子通过蛋白酶激活受体-2(PAR-2)处理的胰腺癌细胞的培养基增强了人脐静脉内皮细胞增殖和血管形成,其被 MEK 抑制剂 PD98059 阻断,活化的 PAR-2 通过诱导 TGF- α 和 VEGF- α 基因表达促进癌细胞释放 VEGF- α 来增强肿瘤血管生成,独立于 ILK/HIFs- α 途径^[31]。本研究也提示 HIF-1 α 过表达和干扰后对 TGF- α mRNA 的表达无明显意义。但是,有文献报道,慢性缺氧状态下结肠腺癌 HCT-116 细胞中通过 GEO 数据库的微阵列生物信息学分析鉴定了 17 个参与血管生成的相关基因如 VEGF-A,Smad7,Jun,白细胞介素(IL)-8,趋化因子受体(CXCR4),血小板衍生生长因子 A(PDGF-A),TGF- α ,血管生成素样蛋白 4(ANGPTL-4)的表达明显上调^[32]。考虑体内和体外实验,以及不同细胞之间存在差异。

TGF- β 在转录水平调节 VEGF 的基因表达间接作用血管生成,可诱导成纤维细胞分化和活化^[33]。TGF- β 和细胞外基质对人心脏成纤维细胞向肌成纤维细胞的分化具有协同作用^[34]。本研究结果提示,在 K562 细胞中,HIF-1 α 的过表达可抑制 TGF- β mRNA 的表达,促进 TGF- β 的分泌。因此这也可能是临床上 CML 既有血管生成,也有骨髓纤维化的原因,关于 TGF- β 在血管生成和纤维化及 CML 中的作用的深入研究是很有意义的。

参考文献

- [1] GIBSON J,ILAND H J,LARSEN S R,et al. Leukaemias into the 21st century. Part 2: the chronic leukaemias[J]. Intern Med J,2013,43(5):484-494.
- [2] HOCHHAUS A,LARSON R A,GUILHOT F,et al. Long-term outcomes of imatinib treatment for chronic myeloid leukemia[J]. N Engl J Med,2017,376(10):917-927.
- [3] OKADA M,IMAGAWA J,TANAKA H,et al. Final 3-year results of the dasatinib discontinuation trial in patients with chronic myeloid leukemia who received dasatinib as a second-line treatment[J]. Clin Lymphoma Myeloma Leuk,2018,18(5):353-360.
- [4] MELO J V,BARNES D J. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer[J]. Nat Rev Cancer,2007,7(6):441-453.
- [5] LU Y H,LI Y,CHAI X,et al. Long noncoding RNA HULC promotes cell proliferation by regulating PI3K/AKT signaling pathway in chronic myeloid leukemia[J]. Gene,2017(607):41-46.
- [6] KAWADA H,KANEKO M,SAWANOBORI M,et al. High concentrations of ascorbic acid specifically inhibit the growth of human leukemic cells via downregulation of HIF-1 α transcription[J]. PLoS One,2013,8(4):e62717.
- [7] ZHANG H J,LI H W,XI H S,et al. HIF1 α is required for survival maintenance of chronic myeloid leukemia stem cells[J]. Blood,2012,119(11):2595-2607.
- [8] GACCHE R N,MESHAM R J. Targeting tumor micro-environment for design and development of novel anti-angiogenic agents arresting tumor growth[J]. Prog Biophys Mol Biol,2013,113(2):333-354.
- [9] CHEN H,SHEN Y F,GONG F,et al. HIF- α promotes chronic myelogenous leukemia cell proliferation by upregulating p21 expression[J]. Cell Biochem Biophys,2015,72(1):179-183.
- [10] SIMSEK T,KOCABAS F,ZHENG J,et al. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche[J]. Cell Stem Cell,2010,7(3):380-390.
- [11] SUNITHA M M,SRIKANTH L,KUMAR P S,et al. Role of STPK in maintaining the quiescent Nature of human CD34⁺ stem cells[J]. J Stem Cells,2016,11(3):125-133.
- [12] SUDA T,TAKUBO K,SEMENZA G L. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche[J]. Cell Stem Cell,2011,9(4):298-310.
- [13] KOCABAS F,XIE L,XIE J J,et al. Hypoxic metabolism in human hematopoietic stem cells[J]. Cell Biosci,2015(5):39.
- [14] GOODWIN A M,D'AMORE P A. Wnt signaling in the vasculature[J]. Angiogenesis,2002,5(1/2):1-9.
- [15] STETLER-STEVENSON W G. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention[J]. J Clin Invest,1999,103(9):1237-1241.
- [16] FIEDLER U,SCHARPFENECKER M,KOIDL S,et al. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies[J]. Blood,2004,103(11):4150-4156.
- [17] THOMSON B R,HEINEN S,JEANSSON M,et al. A lymphatic defect causes ocular hypertension and glaucoma in mice[J]. J Clin Invest,2014,124(10):4320-4324.
- [18] DALY C,QIAN X Z,CASTANARO C,et al. Angiopoietins bind thrombomodulin and inhibit its function as a thrombin cofactor[J]. Sci Rep,2018,8(1):505.
- [19] AUGUSTIN H G,KOH G Y,THURSTON G,et al. Control

- of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(3):165-177.
- [20] SAHARINEN P, EKLUND L, ALITALO K. Therapeutic targeting of the angiopoietin-TIE pathway[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(9):635-661.
- [21] DALY C, EICHTEN A, CASTANARO C, et al. Angiopoietin-2 functions as a Tie2 agonist in tumor models, where it limits the effects of VEGF inhibition[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(1):108-118.
- [22] BENEST A V, KRUSE K, SAVANT S, et al. Angiopoietin-2 is critical for Cytokine-Induced vascular leakage[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8):e23940579.
- [23] SENER J M, BHANDARI V, ENGLE K M, et al. Elevated serum angiopoietin 2 levels are associated with increased mortality in sepsis[J]. *Shock*, 2009, 31(4):348-353.
- [24] RISAU W. Mechanisms of angiogenesis[J]. *Nature*, 1997, 386(6626):671-674.
- [25] FERRARA N H K, DEVELOPMENT O B. An anti-VEGF antibody for treating cancer[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3(5):391-400.
- [26] MAYERHOFER M, VALENT P, SPERR W R, et al. BCR/ABL induces expression of vascular endothelial growth factor and its transcriptional activator, hypoxia inducible factor-1alpha, through a pathway involving phosphoinositide 3-kinase and the mammalian target of rapamycin[J]. *Blood*, 2002, 100(10):3767-3775.
- [27] HUANG J X, LU Z Y, XIAO Y J, et al. Inhibition of Sirah2 ubiquitin ligase by vitamin K3 attenuates chronic myeloid leukemia chemo-resistance in hypoxic microenvironment[J]. *Med Sci Monit*, 2018(24):727-735.
- [28] LI B Z, ZHUANG W Z, CHEN P, et al. Effects of RNA interference targeting hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) on chemosensitivity of leukemia K562 cells towards homoharringtonine[J]. *Ai Zheng*, 2008, 27(7):723-728.
- [29] CIARDIELLO F, TORTORA G. EGFR antagonists in cancer treatment[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(11):1160-1174.
- [30] GUNARATNAM L, MORLEY M, FRANOVIC A, et al. Hypoxia inducible factor activates the transforming growth factor-alpha/epidermal growth factor receptor growth stimulatory pathway in VHL(-/-) renal cell carcinoma cells[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(45):44966-44974.
- [31] CHANG L H, PAN S L, LAI C Y, et al. Activated PAR-2 regulates pancreatic cancer progression through ILK/HIF- α -induced TGF- α expression and MEK/VEGF-A-mediated angiogenesis[J]. *Am J Pathol*, 2013, 183(2):566-575.
- [32] ZONG S Q, LI W, LI H J, et al. Identification of hypoxia-regulated angiogenic genes in colorectal cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 493(1):461-467.
- [33] BERNARD K, LOGSDON N J, BENAVIDES G A, et al. Glutaminolysis is required for transforming growth factor- β 1-induced myofibroblast differentiation and activation[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(4):1218-1228.
- [34] CHO N, RAZIPOUR S E, MCCAIN M L. Featured article: TGF- β 1 dominates extracellular matrix rigidity for inducing differentiation of human cardiac fibroblasts to myofibroblasts[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2018, 243(7):601-612.

(收稿日期:2018-07-18 修回日期:2018-10-01)

(上接第 363 页)

- [13] 库恩托马斯. 科学革命的结构[M]. 4 版. 北京:北京大学出版社, 2003:206.
- [14] 苏博, 刘鉴汶. 高等医学教育学[M]. 北京:人民军医出版社, 2004:19.
- [15] 王红漫. 医学社会学撰格[J]. *中国医学人文评论*, 2015, 14-20.
- [16] 王红漫. “医”步亦曲[M]. 北京:北京大学医学出版社, 2015:7, 103.
- [17] 王红漫. 高等教育撰格[EB/OL]. [2018-9-20]. <http://www.rmlt.com.cn/2018/0920/528758.shtml>.
- [18] HUMA K. Taking the first step: developing a department for medical education[J]. *Is Med J*, 2016, 8(2):121-122.
- [19] ROSE S. Teaching old dogma with new tricks and technology: educational paradigm shifts in graduate medical education[J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2015(6):e78.
- [20] KATHERINE C, CHRETIEN M L M Y. Technology in graduate medical education: shifting the paradigm and advancing the field[J]. *J Grad Med Educ*, 2014, 6(2):195-196.
- [21] KOST A, CHEN F M. Socrates was not a pimp: changing the paradigm of questioning in medical education[J]. *Acad Med*, 2015, 90(1):20-24.
- [22] BENOR D E. A New paradigm is needed for medical education in the mid-twenty-first century and beyond: are we ready? [J]. *Rambam Maimonides Med J*, 2014, 5(3):e18.
- [23] MEHTA N B, HULL A L, YOUNG J B, et al. Just imagine: new paradigms for medical education[J]. *Acad Med*, 2013, 88(10):1418-1423.
- [24] 杨彩玲. 论我国医学高等教育范式的生态学转向[J]. *求索*, 2014(8):188-191.
- [25] 时统君. 意义体认视域下高等医学人文教育范式创新论略[J]. *卫生软科学*, 2015, 29(3):159-161.
- [26] 周立华, 张怡琳, 肖慧. 医学院校生命科学类课程教学范式改革的探讨[J]. *时代教育*, 2015(4):200-201.

(收稿日期:2018-07-18 修回日期:2018-10-01)