

三氧化二砷通过 FoxO3a 抑制乳腺癌血管生成的体外实验

白璐,卢今奇,孙卓,吴永平*

(徐州医科大学基础医学院病理学教研室,江苏 徐州 221004)

[摘要] 目的:研究三氧化二砷(As_2O_3)对乳腺癌肿瘤血管生成的影响,并初步探讨其可能的分子机制。方法:以人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)为实验对象,制备肿瘤条件培养基模拟肿瘤微环境培养细胞。使用不同浓度的 As_2O_3 (0、4、8 $\mu\text{mol/L}$)处理 HUVECs 细胞后,通过划痕试验检测内皮细胞迁移能力,Matrigel 试验检测内皮细胞体外小管形成情况,CCK-8 法检测细胞的增殖情况,Annexin V 染色检测细胞凋亡,Western blot 检测蛋白表达。结果:与对照组相比, As_2O_3 处理组细胞的迁移及小管形成能力明显下降;细胞增殖活性降低,凋亡增加;细胞中 FoxO3a 蛋白及其下游 Fas-L、p27^{Kip1} 蛋白的表达增多。结论: As_2O_3 可以通过上调 FoxO3a 的蛋白表达水平,激活其下游通路,抑制血管内皮细胞的增殖,促进其凋亡,并降低其体外血管形成能力,提示 As_2O_3 可能在抑制乳腺癌血管生成中起重要作用。

[关键词] 三氧化二砷;乳腺癌;血管生成;FoxO3a

[中图分类号] R737.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)07-842-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20170711

In vitro study on FoxO3a mediated anti-angiogenic effect of arsenic trioxide in breast cancer

Bai Lu, Lu Jinqi, Sun Zhuo, Wu Yongping*

(Department of Pathology, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-angiogenic effect of arsenic trioxide (As_2O_3) on breast cancer, and explore the possible molecular mechanisms. **Methods:** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured in tumor conditioned medium derived from MCF-7 and treated with 0, 4, 8 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 . Cell wound healing assay, Matrigel assay, CCK-8 assay, and Annexin V assay were carried out to detect cell migration rate, angiogenesis ability, cell proliferation and cell apoptosis, respectively. Western blotting assay was used for detecting protein level. **Results:** Compared to the control group, the As_2O_3 treated groups showed reduced ability of cell migration and tube formation. A decline in cell proliferation and a rise in apoptosis were also found in the As_2O_3 groups. The protein expression of FoxO3a and its downstream genes Fas-L and p27^{Kip1} were increased following As_2O_3 treatment. **Conclusion:** As_2O_3 could attenuate the angiogenic ability of HUVECs by inducing cell apoptosis and inhibiting cell proliferation through upregulation of FoxO3a and activating of its downstream pathways, which suggested that As_2O_3 may play an important role in anti-angiogenesis in breast cancer.

[Key words] arsenic trioxide; breast cancer; angiogenesis; FoxO3a

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(07):842-846]

三氧化二砷(arsenic trioxide, As_2O_3)是我国传统中药砒霜的主要成分,曾用来治疗银屑病、梅毒、风湿、疟疾等病证,但由于毒性较大,未能广泛应用。20世纪70年代后,我国学者张亭栋等将 As_2O_3 用于白血病的治疗,取得了令人瞩目的成就。随后有学

者将其用于与其他血液肿瘤、淋巴瘤以及实体瘤化学治疗的实验研究,治疗效果确切^[1-4]。乳腺癌是威胁女性健康的常见恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率在我国及全世界均呈逐渐上升趋势,研究乳腺癌的发病机制、发展过程以及治疗方法具有重要意义。恶性肿瘤新生血管的形成是肿瘤生长、侵袭、复发和转移的重要因素。临床实践已经证明,抑制肿瘤血管形成是抑制肿瘤生长、转移,同时也是增加其他疗法疗效的有益方法^[5]。目前关于 As_2O_3 的抑癌机制已经

[基金项目] 国家自然科学基金(81372479, 81502387);江苏省普通高校研究生科研创新课题(KYLX15_1476)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wyp@xzhmu.edu.cn

有了许多研究,但是多数集中在 As_2O_3 诱导肿瘤细胞凋亡及降解肿瘤特异性蛋白上。对于 As_2O_3 与肿瘤血管形成的关系,尤其是 As_2O_3 与乳腺癌血管生成关系的研究还较少。因此,本研究以人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 为对象,研究 As_2O_3 对乳腺癌中肿瘤血管生成的影响,并探索其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

HUVECs 细胞购自南京凯基生物公司, MCF-7 购自中国科学院上海细胞生物学研究所。 As_2O_3 (亚砷酸氯化钠注射液,国药准字 H19990191, 哈尔滨医大药业有限公司); Annexin V-FITC、PI(南京凯基生物公司); Matrigel (BD 公司, 美国); 主要抗体: FoxO3a Rabbit mAb 购自美国 CST 公司, β -actin Rabbit mAb、p27^{Kip1} Mouse mAb 购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司, Fas-L Rabbit mAb 购自英国 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及肿瘤条件培养基的制备

HUVECs 和 MCF-7 细胞使用含 10% 胎牛血清的高糖 RPMI1640 培养基培养于 37 °C 5% CO_2 的培养箱中。MCF-7 细胞进入对数生长期时分别给予 0、4、8 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 处理 24 h。收集处理后的培养基, 1 000 r/min 离心 5 min, 收集上清并过滤, 得到肿瘤细胞培养上清液, -20 °C 保存。使用时将肿瘤细胞培养上清液与 RPMI1640 培养基、胎牛血清按 4:5:1 混合, 制成相应组别的肿瘤条件培养基^[6]。

1.2.2 细胞划痕实验

将 HUVECs 细胞悬液铺于 6 孔板, 37 °C 培养箱过夜。次日观察细胞贴壁后, 用移液器吸头沿 6 孔板中间直线划痕。PBS 冲洗掉划下的细胞, 分别加入 0、4、8 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 , 作用 24 h 后观察并拍照。

1.2.3 Matrigel 小管形成实验

将 Matrigel 胶置于 4 °C 过夜使其处于熔融状态; 次日于水平冰面上将 100 μL /孔 Matrigel 胶加入 96 孔板中, 置于 37 °C、5% CO_2 培养箱中包被 30 min 使其凝固; 0.25% 胰酶消化 HUVECs 细胞, 分别以普通 RPMI1640 培养基或不同浓度 As_2O_3 处理 MCF-7 细胞获得的肿瘤条件培养基调整细胞浓度为 1×10^4 个/孔加入 96 孔板内胶面上, 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养 8 h; 通过相差显微镜(100 倍)观察脉管形成并照相; 计数小管的数量, 每孔 4 个随机视野计数进

行量化分析。

1.2.4 CCK-8 检测

将对数生长期的 HUVECs 细胞均匀种植于 96 孔板, 每个样本设置 4 个复孔, 每孔 100 μL , 待细胞贴壁且汇合度达到 80% 左右时, 分别给予 As_2O_3 0、4、8 $\mu\text{mol/L}$ 处理 0、24、48、72、96 h, 然后每孔加入 100 μL 的 CCK-8 试剂, 2 h 后使用酶标仪检测 450 nm 处各孔吸光度值。

1.2.5 凋亡细胞的检测

采用 Annexin V-FITC/PI 双染色法。收集经不同浓度 As_2O_3 处理 24 h 后的 HUVECs 细胞, 用冷 PBS 洗涤(4 °C, 1 000 r/min 离心 5 min), 弃上清液后用冷结合缓冲液调整细胞密度为 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 个/L, 加入 5 μL Annexin V-FITC 溶液混匀后再加入 10 μL PI 染色液, 缓缓混合。于冰上避光孵育 15 min, 随即进行流式细胞仪检测暴露在细胞表面的磷脂酰丝氨酸(PS), 所有数据经 Win MDI 软件收集分析。

1.2.6 Western blot 检测

采用 RIPA 裂解液裂解细胞, 提取细胞总蛋白。10% 的 SDS-PAGE 胶进行蛋白质分离, 每加样孔加样品 10~25 μL 。恒压电泳, 湿转电转法将蛋白质转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 PVDF 膜 2 h。分别加入一抗 4 °C 孵育过夜, 二抗选用 HRP 偶联羊抗兔 IgG (Santa Cruz 公司, 美国, 1:5 000 稀释), 室温孵育 2 h。以上操作均在摇床上进行, 且各步骤间均用 TBS-T 洗膜 5 min \times 3 次; 膜上加 ECL 超敏发光液, 保鲜膜包好后, 暗室内曝光 30 s, X 线片显影 2 min, 定影 5 min, 拍照灰度分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 统计软件进行统计分析。计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组数据间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK 法, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 As_2O_3 可以抑制乳腺癌中的血管生成

为了研究 As_2O_3 对内皮细胞体外血管生成的影响, 我们使用了细胞划痕试验检测 As_2O_3 对 HUVECs 细胞迁移能力的影响。与 Control 组相比, 8 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 处理 12 h 就可以降低 HUVECs 细胞的迁移率; 而处理 24 h 后, 4 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 处理组和 8 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 处理组均可以使 HUVECs 细胞的迁移能力显著下降(图 1), 表明 As_2O_3 可以在体外抑制血管内皮细胞的迁移能力。

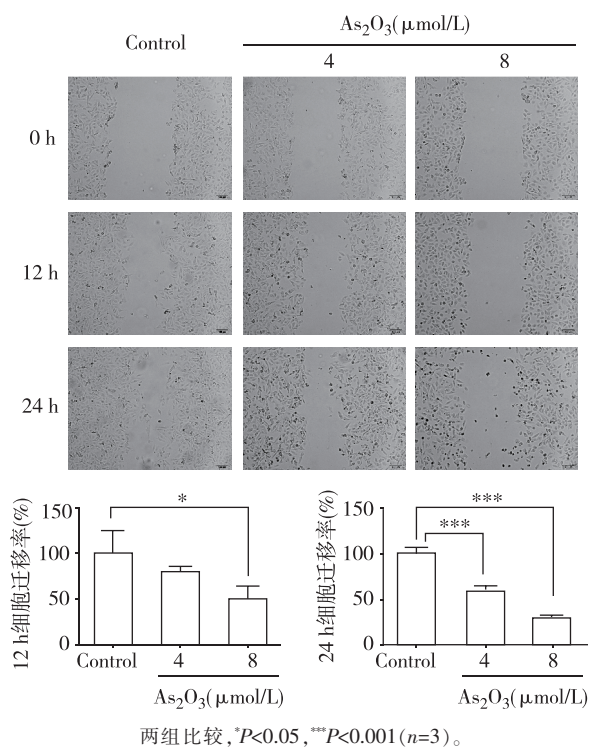


图1 不同浓度 As₂O₃ 处理对 HUVECs 细胞迁移能力的影响 (×100)

Figure 1 Effects of different doses of As₂O₃ on the migration rate of HUVECs (×100)

进一步利用小管形成试验检测 As₂O₃ 对肿瘤条件培养基培养的 HUVECs 细胞体外小管形成能力的影响。实验结果显示,普通培养基培养的 Untreated 组以及加了肿瘤条件培养基但未加 As₂O₃ 处理的 Control 组中 HUVECs 细胞都可以形成明显的小管;而 4 或 8 μmol/L As₂O₃ 处理组中的 HUVECs 细胞均无法有效形成小管,说明 As₂O₃ 可以显著干扰 HUVECs 细胞的体外小管形成(图 2)。提示 As₂O₃ 可以起到抑制肿瘤血管新生能力的作用。

2.2 As₂O₃ 抑制 HUVECs 细胞增殖并促进其凋亡

为了进一步研究 As₂O₃ 抑制肿瘤血管生成的机制,我们使用 CCK-8 试剂盒检测了 As₂O₃ 对 HUVECs 细胞增殖能力的影响。实验结果显示,与 Control 组相比,8 μmol/L As₂O₃ 处理可以显著抑制 HUVECs 细胞的增殖;4 μmol/L As₂O₃ 处理效果稍弱,但在 48 h 后也可明显抑制 HUVECs 细胞的增殖(图 3A)。As₂O₃ 对 HUVECs 细胞凋亡水平的影响实验结果显示,8 μmol/L As₂O₃ 处理 24 h 可以显著增加 HUVECs 细胞的凋亡(4.61% vs.13.04%, P<0.05,图 3B)。这些结果提示 As₂O₃ 可能是通过抑制血管内皮细胞的增殖,促进其凋亡而达到抑制肿瘤血管生成的效果。

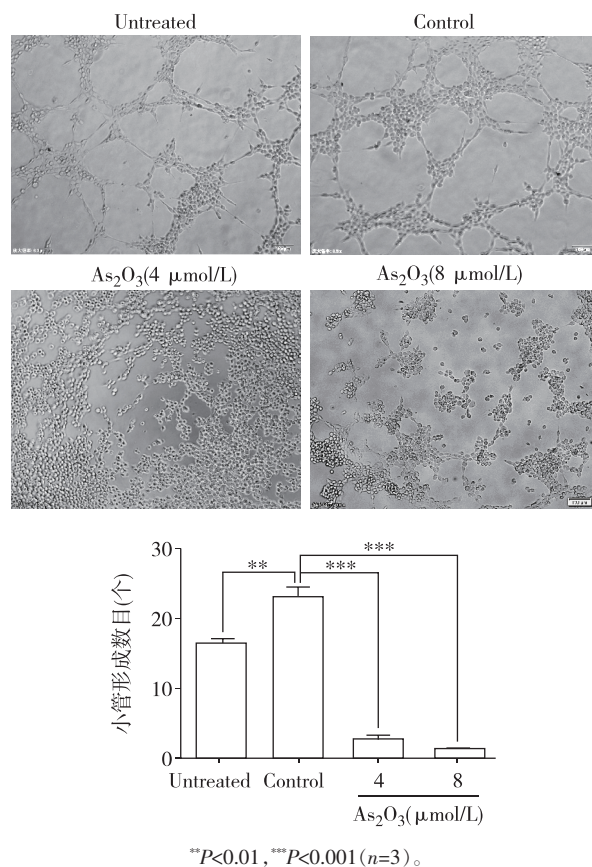


图2 不同浓度 As₂O₃ 处理对 HUVECs 细胞体外小管形成能力的影响 (×100)

Figure 2 Effects of different doses of As₂O₃ on the tube formation potential of HUVECs (×100)

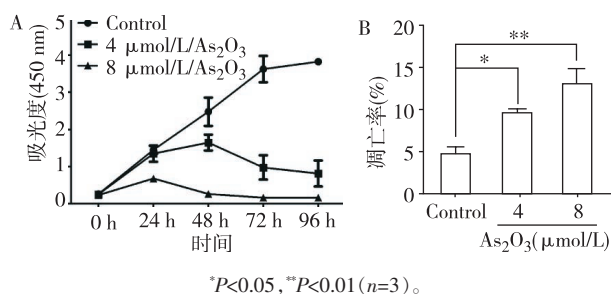


图3 不同浓度 As₂O₃ 处理对 HUVECs 细胞增殖(A)和凋亡(B)的影响

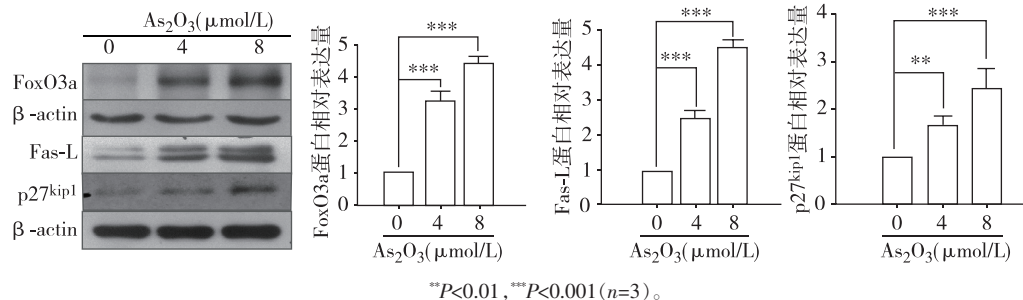
Figure 3 Effects of different doses of As₂O₃ on the proliferation(A) and apoptosis(B) of HUVECs

2.3 As₂O₃ 可能通过 FoxO3a 参与调控 HUVECs 细胞的增殖与凋亡

已有研究表明 As₂O₃ 可以通过多种分子机制促进细胞凋亡,抑制其增殖。本实验室早期研究提示 FoxO3a 可能在 As₂O₃ 诱导肿瘤细胞凋亡中起着重要作用。因此 As₂O₃ 可能也是通过 FoxO3a 影响 HUVECs 细胞的增殖与凋亡,从而起到抑制血管新生的作用。Western blot 检测 As₂O₃ 处理后 HUVECs

细胞中 FoxO3a 蛋白的表达水平, 与 Control 组相比, As₂O₃ 处理可以明显上调 HUVECs 细胞中

FoxO3a 的蛋白水平, 且具有统计学差异($P < 0.001$), 上调程度与 As₂O₃ 剂量相关(图 4A)。



** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n = 3$)。

图 4 不同浓度 As₂O₃ 作用后 HUVEC 细胞中 FoxO3a 蛋白(A)及其下游 Fas-L、p27^{kip1} 蛋白(B)的表达情况

Figure 4 Protein levels of FoxO3a, Fas-L and p27^{kip1} in HUVECs after As₂O₃ treatment

Fas-L 和 p27^{kip1} 均是已知的 FoxO3a 靶基因, 它们分别在诱导细胞凋亡和调控细胞周期中起着重要作用。我们猜测 As₂O₃ 通过上调 FoxO3a 的表达也激活了其下游 Fas-L 和 p27^{kip1} 的转录表达。因此我们检测了 As₂O₃ 处理后 HUVECs 细胞中 Fas-L 和 p27^{kip1} 的表达。结果显示, 与 Control 组相比, As₂O₃ 处理使 HUVECs 细胞中 Fas-L 和 p27^{kip1} 蛋白的表达水平均显著升高, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 4B)。这些结果都提示 As₂O₃ 可能通过上调 FoxO3a 的表达激活其下游信号通路(如 Fas-L 和 p27^{kip1}), 从而促进血管内皮细胞的凋亡, 并限制性调节其细胞周期, 进而抑制血管内皮细胞 HUVECs 的血管新生能力。

3 讨论

As₂O₃ 可以通过多种分子机制抑制肿瘤的发生发展。目前普遍认为诱导肿瘤细胞凋亡是其主要抑癌机制^[6-8]。有研究表明 As₂O₃ 可以上调细胞内多种促凋亡因子, 如 Bax、Noxa、Bim 等的表达, 从而促进细胞凋亡; 另一方面 As₂O₃ 也能下调 Bcl-2 家族抗凋亡蛋白表达, 如 Bcl-2、Bcl-xL 和 Mcl-1^[9]。JNK/NP-1 信号通路、Notch-1 以及活性氧也都被证明在 As₂O₃ 诱导肿瘤细胞凋亡中起到重要作用^[10-12]。诱导肿瘤特异蛋白的降解是 As₂O₃ 另一重要的抑癌机制, 急性早幼粒细胞白血病 (APL) 中的 PML-RAR α 融合蛋白和慢性髓细胞白血病 (CML) 中的 BCR-ABL 融合蛋白都可被 As₂O₃ 靶向诱导降解^[13-14], 从而起到抑制肿瘤的作用。

近年来研究表明 As₂O₃ 能够诱导多种实体瘤细胞的凋亡, 在乳腺肿瘤细胞研究中也取得了类似结果。本课题组前期研究发现 As₂O₃ 作用于乳腺癌 MCF-7 细胞后细胞生长明显受抑制, 出现显著的细胞凋亡特征, 提示 As₂O₃ 可诱导乳腺癌细胞凋亡^[15]。

Gao 等^[10]也证实 As₂O₃ 可以通过 JNK/AP-1 途径诱导乳腺癌细胞凋亡。但是目前包括乳腺癌在内的 As₂O₃ 抗实体瘤作用机制尚未完全明了。鉴于肿瘤血管在实体瘤发生发展中的重要地位, As₂O₃ 抑制肿瘤血管生成在抗乳腺癌中的作用及相关机制需要重点关注。因此本课题组将研究重点放在 As₂O₃ 对乳腺癌肿瘤血管形成的影响上, 并通过实验证实 As₂O₃ 可以抑制乳腺癌细胞系 MCF-7 诱导的 HUVECs 细胞体外血管形成, 提示抑制血管形成也是 As₂O₃ 抑制乳腺癌的重要分子机制。

尽管之前也有研究表明 As₂O₃ 对肿瘤血管形成具有明显抑制作用, 但是目前对 As₂O₃ 抑制肿瘤血管生成机制的探讨仍基本集中在与血管生成相关的生长因子上, 而对于抑制肿瘤血管生成的分子信号调节途径仍缺乏深入研究。As₂O₃ 如何抑制实体肿瘤血管生成的具体机制尚未得到确切解释。本研究从 As₂O₃ 对血管内皮细胞的直接影响切入, 通过多个实验证明 As₂O₃ 可以抑制 HUVECs 增殖, 诱导其凋亡, 从而抑制肿瘤血管生成。

FoxO 蛋白家族是 2000 年才被正式统一命名的新的转录因子家族, FoxO 家族通过多重信号通路调节机体诸如代谢、细胞周期、细胞凋亡、氧化应激反应和自噬等各种生物学过程^[16-19]。人 FoxO 转录因子包括 FoxO1、FoxO3a、FoxO4 以及 FoxO6, FoxO3a 是其中一个最重要的成员, 有研究表明沉默 FoxO3a 基因的表达可以显著增加内皮细胞迁移、出芽和管道形成能力, FoxO3a 的过表达则可明显抑制血管内皮生长因子 (VEGF) 诱导的内皮细胞迁移^[20]。因此 FoxO3a 转录因子可能是一个潜在的抑制肿瘤血管生成的新作用位点。本实验室在前期研究中也发现 As₂O₃ 可以调节乳腺癌细胞中 FoxO3a 的蛋白水平。基于此, 本实验研究了在血管内皮细胞中, As₂O₃ 对

FoxO3a的调节作用。实验结果表明 As₂O₃ 可以上调 FoxO3a 的蛋白表达,激活其下游信号通路,从而抑制 HUVECs 的增殖,促进其凋亡,并最终抑制肿瘤血管生成。本研究证实了 FoxO3a 是 As₂O₃ 抑制血管生成作用中的重要信号分子,提出了 As₂O₃ 抑制血管生成作用新的分子机制。

综上所述,本实验通过研究 As₂O₃ 对乳腺癌肿瘤血管形成能力的影响提出 As₂O₃ 可以通过抑制肿瘤血管形成起到抑制肿瘤发展的作用,并提出了 As₂O₃ 抑制肿瘤血管生成的新的分子机制,证实 FoxO3a 在其中扮演了重要角色。本研究结果提示 FoxO3a 可能成为 As₂O₃ 抗肿瘤血管生成作用的一个新靶点。但是 As₂O₃ 如何调控 FoxO3a 以及 FoxO3a 蛋白活性增强在 As₂O₃ 抑制肿瘤血管生成中的确切作用尚需深入研究。

[参考文献]

- [1] Cheng J, Wei HL, Chen J, et al. Antitumor effect of Arsenic trioxide in human K562 and K562/ADM cells by autophagy [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2012, 22(7): 512-519
- [2] Chen J, Wei HL, Xie B, et al. Endoplasmic reticulum stress contributes to Arsenic trioxide-induced apoptosis in drug-sensitive and -resistant leukemia cells [J]. *Leuk Res*, 2012, 36(12): 1526-1535
- [3] Zhang XY, Su Y, Zhang M. Opposite effects of Arsenic trioxide on the Nrf2 pathway in oral squamous cell carcinoma *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(8): 93-98
- [4] Zhao HB, Sun QX, Chen XF, et al. Efficacy of intratumoral chemotherapy using arsenic trioxide (As₂O₃) sustained release tablets for the treatment of neurogliocytoma in nude mice [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18(17): 2453-2459
- [5] Beck B, Driessens G, Goossens S, et al. A vascular niche and a VEGF-Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours [J]. *Nature*, 2011, 478(7369): 399-403
- [6] Walker AM, Stevens JJ, Ndebele K, et al. Evaluation of Arsenic trioxide potential for lung cancer treatment: assessment of apoptotic mechanisms and oxidative damage [J]. *J Cancer Sci Ther*, 2016, 8(1): 1-9
- [7] Ma ZB, Xu HY, Jiang M, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis of human gastrointestinal cancer cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(18): 5505-5510
- [8] Dong XY, Ma N, Liu MM, et al. Effects of as₂O₃ nanoparticles on cell growth and apoptosis of NB4 cells [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(4): 1271-1276
- [9] Chen GQ, Zhu J, Shi XG, et al. *In vitro* studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide(As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As₂O₃ induces NB4 cell apoptosis with downregulation of bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins [J]. *Blood*, 1996, 88(3): 1052-1061
- [10] Gao M, Dong W, Hu MR, et al. GADD45 alpha mediates arsenite-induced cell apoptotic effect in human hepatoma cells via JNKs/AP-1-dependent pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 109(6): 1264-1273
- [11] Selvaraj V, Armistead MY, Cohenford M, et al. Arsenic trioxide(As₂O₃) induces apoptosis and necrosis mediated cell death through mitochondrial membrane potential damage and elevated production of reactive oxygen species in PLHC-1 fish cell line [J]. *Chemosphere*, 2013, 90(3): 1201-1209
- [12] Xia J, Li Y, Yang Q, et al. Arsenic trioxide inhibits cell growth and induces apoptosis through inactivation of notch signaling pathway in breast cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(8): 9627-9641
- [13] Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, Chen Z, et al. Curing APL through PML/RARA degradation by As₂O₃ [J]. *Trends Mol Med*, 2012, 18(1): 36-42
- [14] Zhang QY, Mao JH, Liu P, et al. A systems biology understanding of the synergistic effects of Arsenic sulfide and Imatinib in BCR/ABL-associated leukemia [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(9): 3378-3383
- [15] Liu WL, Gong YS, Li HL, et al. Arsenic Trioxide-Induced growth arrest of breast cancer MCF-7 cells involving FOXO3a and I kappa B kinase beta expression and localization [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2012, 27(8): 504-512
- [16] Descalzo DL, Satoorian TS, Walker LM, et al. Glucose-Induced oxidative stress reduces proliferation in embryonic stem cells via FOXO3A/beta-Catenin-Dependent transcription of p21(cip1) [J]. *Stem Cell Reports*, 2016, 7(1): 55-68
- [17] Warr MR, Binnewies M, Flach J, et al. FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells [J]. *Nature*, 2013, 494(7437): 323-327
- [18] Das TP, Suman S, Alatassi H, et al. Inhibition of AKT promotes FOXO3a-dependent apoptosis in prostate cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7: e2111
- [19] Joseph J, Ametepe ES, Haribabu NA, et al. Inhibition of ROS and upregulation of inflammatory cytokines by FoxO3a promotes survival against Salmonella typhimurium [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12748
- [20] Potente M, Urbich C, Sasaki K, et al. Involvement of Foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(9): 2382-2392

[收稿日期] 2016-11-07