

[文章编号] 1000-4718(2007)05-0833-06

· 论 著 ·

Akt、ERK1/2 活化在脑源性神经营养因子 促血管新生中的作用*

王雅丹, 胡 豫[△], 孙春艳

(华中科技大学同济医学院附属协和医院血液病研究所, 湖北 武汉 430022)

[摘要] 目的: 探讨脑源性神经营养因子(BDNF)促进血管新生的作用及其参与的信号通路,为抗肿瘤血管生成的研究提供新的实验依据。方法: 以人脐静脉内皮细胞为对象,采用 Western 印迹方法检测细胞内磷酸化 Akt、ERK1/2 蛋白质的表达;采用 Transwell 小室迁移实验、管腔形成实验评价体外内皮细胞血管新生的能力,MTT 法检测内皮细胞增殖活性,FITC-Annexin-V/PI 双染流式细胞术分析细胞凋亡。结果: BDNF 以时间依赖性方式激活 PI3K/Akt 和 MEK1/ERK 信号通路。分别应用 PI3K 激酶抑制剂 Ly294002、MEK1 激酶抑制剂 PD98059 可以明显阻断 BDNF 对 PI3K/Akt、MEK1/ERK 信号通路的激活。100 $\mu\text{g/L}$ 的 BDNF 体外促内皮细胞血管新生能力与 25 $\mu\text{g/L}$ 血管内皮生长因子(VEGF)相当,其中 BDNF 诱导的细胞迁移分别被 Ly294002 和 PD98059 阻断,其抑制率分别约为 74% 和 36%;同样,Ly294002、PD98059 可部分阻断 BDNF 诱导的小管形成效应,其阻断率分别约 57% 和 37%;而 BDNF 的促增殖效应仅被 PD98059 拮抗,抑制凋亡效应仅受 Ly294002 影响。结论: BDNF 在体外有促血管新生的作用。PI3K/Akt 和 MEK1/ERK 信号通路以不同机制共同调节这一过程,其中 PI3K/Akt 信号通路起着更为重要的调节作用。

[关键词] 脑源性神经营养因子; 新生血管化, 生理性; 信号转导

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Akt and ERK1/2 are involved in brain derived neurotrophic factor - induced angiogenesis of endothelial cells

WANG Ya - dan, HU Yu, SUN Chun - yan

(Institution of Hematology, Union Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China. E-mail: huyu1964@163.net)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the role of PI3K/Akt and MEK1/ERK pathway in the brain derived neurotrophic factor(BDNF) - induced angiogenesis *in vitro* and to explore the further molecular mechanisms. **METHODS:** The phosphorylations of Akt and ERK1/2 were detected in human umbilical vein endothelial cells(HUVECs) by Western blotting. The angiogenic activity *in vitro* was evaluated by transwell migration assay and tubule formation assay. Cell proliferation was determined by crystal violet staining. Cell apoptosis was analysed by FITC - Annexin - V/PI double staining and flow cytometry. **RESULTS:** BDNF activated the PI3K/Akt and MEK1/ERK pathway in a time - dependent manner. Ly294002 and PD98059 blocked the activation of Akt and ERK1/2 in response to BDNF. BDNF at concentration of 100 $\mu\text{g/L}$ significantly increased HUVECs tube formation, migration and proliferation *in vitro* to a degree similar to those induced by 25 $\mu\text{g/L}$ VEGF. Furthermore, tube formation and migration of HUVECs toward BDNF were significantly inhibited by treatment with 20 $\mu\text{mol/L}$ Ly294002 and 20 $\mu\text{mol/L}$ PD98059. BDNF - induced survival was only blocked by Ly294002 and BDNF - induced proliferation was only inhibited by PD98059. **CONCLUSION:** BDNF promotes angiogenesis of HUVECs *in vitro*. The ERK and Akt are two crucial events in BDNF - mediated signal transduction leading to HUVECs angiogenesis by different mechanisms. Moreover, the latter is more important.

[KEY WORDS] Brain - derived neurotrophic factor; Neovascularization, physiologic; Signal transduction

[收稿日期] 2005-08-31 [修回日期] 2005-11-28

* [基金项目] 湖北省青年杰出人才基金资助项目(No. 2003ABB017)

[△]通讯作者 E-mail: huyu1964@163.net

文献曾报道脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 参与多种内皮细胞生长、分化的调节^[1,2], 我们的新近研究发现 BDNF 可促进体内外人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 的血管新生, 可能是一种新的促血管新生因子^[3], 并参与骨髓瘤细胞诱导的血管新生^[4]。然而, BDNF 调节血管新生的分子机制和所涉及的信号分子目前并不十分清楚。PI3K/Akt、MEK1/ERK 信号通路已被证实是诸多血管新生因子如 VEGF、bFGF、Ang1 等调控血管新生的两条重要的信号转导通路^[5,6], 因此本研究拟观察 BDNF 体外诱导的血管新生与上述两条通路的关系, 探讨其内在的分子机制, 以期为抗肿瘤血管生成的研究提供新的实验依据。

材 料 和 方 法

1 试剂

二甲亚砜 (DMSO)、四甲偶氮唑盐 (MTT) 购于 Sigma 公司; BDNF 购于 R&D 公司, 用含 1% 牛血清白蛋白的 PBS 溶解至 50 mg/L, 储存于 -20 °C, 使用时终浓度为 100 μg/L。去生长因子 Matrigel 为 BD 公司生产, 8 μm 聚碳酸酯膜 Transwell 为 Corning 公司产品。Annexin - V - FLUOS staining kit 为 Roche 产品。Ly294002、PD98059 分别为 Cayman Chemical 和 Biosource 公司产品。兔抗 p - ERK1/2 (Thr202/Tyr204)、兔抗 ERK1/2、小鼠抗 p - Akt (Ser473) 和兔抗 Akt 抗体购于 Cell Signaling Technology 生物技术公司, HRP 标记的 II 抗购于北京中山生物技术公司。

2 HUVECs 培养

取 20 cm 长脐带, 温 PBS 冲洗干净, 一端结扎, 一端注入 37 °C 预热的 0.1% 的 I 型胶原酶 10 mL, 37 °C 消化 10 min, 收集消化液, 1 000 × g 离心 10 min, 以含 20% 胎牛血清、50 μg/L ECGS、1 × 10⁵ U/L 肝素的 M199 培养基重悬细胞, 接种于预先包被 1% 明胶的 25 cm² 塑料培养瓶中, 12 h 后换液, 以后每 2 d 换液 1 次, 1 周左右生长至完全融合状单层细胞。以 0.25% 胰蛋白酶消化传代, FSABC 法鉴定其为内皮细胞, 取 3 - 6 代细胞用于实验。

3 MTT 试验

96 孔培养板每孔接种 5 × 10³ 个 HUVECs, 培养 24 h 待其贴壁后, 以 PBS 洗涤 2 次, 再用含 1% 血清的 M199 继续培养 12 h 后开始实验。不同孔分别经 20 μmol/L LY294002、PD98059 预处理 1 h, 再加入 100 μg/L 的 BDNF, 以 PBS 为对照, 培养 24 h, 每孔

再加入 MTT 至终浓度为 500 mg/L, 继续培养 4 h, 弃培养液, 加入 DMSO 150 μL, 振荡使结晶溶解后酶标仪读取 A_{490nm} 值。增殖率 (%) = (实验组 A 值 / 对照组 A 值) × 100%。每组设 3 个复孔, 实验重复 3 次。

4 Annexin V 凋亡实验

6 孔培养板每孔接种 1 × 10⁵ 个 HUVECs, 培养 24 h 待其贴壁后, 每孔改用含 1% 血清的 M199 并按上述方法进行处理, 继续培养 24 h。按 Annexin - V - FLUOS staining kit 的操作说明进行 FITC - Annexin - V/PI 的荧光染色, 在荧光显微镜下 (×400) 观察并应用流式细胞仪计数凋亡细胞占有细胞的比例, 每组设 3 个复孔, 实验重复 3 次。FITC⁺PI⁻ 的细胞为早期凋亡细胞, FITC⁺PI⁺ 的细胞为晚期凋亡细胞。

5 内皮细胞体外迁移实验

按文献^[7]报道进行 Transwell 小室迁移实验: Transwell 小室的聚碳酸酯膜下表面使用 0.1% 的明胶室温包被过夜。将 HUVECs 在含 1% 血清的 M199 培养液中培养 12 h 并分别经 20 μmol/L LY294002、PD98059 预处理 1 h 后收获, 制成 1 × 10⁹ cells/L 细胞悬液。24 孔板每孔加入 600 μL 含 1% 血清的 M199 培养液, 并添加试验所需的空白对照 (PBS) 和实验组 (BDNF); 放置 Transwell 小室, 向小室中加入事先制备的细胞悬液 100 μL, 实验组加入 20 μmol/L 的 LY294002 或 PD98059。37 °C、体积分数 5% CO₂ 条件下培养 4 h。去除滤膜上层细胞, 4% 多聚甲醛固定后行瑞氏吉姆萨染色。镜下 (×200) 计数滤膜下表面的细胞数, 随机选取 5 个视野, 实验重复 3 次。结果以与空白对照相比的百分数表示。

6 内皮细胞体外管腔形成实验

按文献^[8]报道, 将 HUVECs 在含 1% 血清的 M199 培养液中培养 12 h 并分别经 20 μmol/L LY294002、PD98059 预处理 1 h 后收获, 制成 5 × 10⁷ cells/L 细胞悬液。24 孔细胞培养板每孔加入 300 μL Matrigel, 37 °C、5% CO₂ 下温育 60 min。每孔加入以上已制成的细胞悬液 250 μL, 并分别添加实验所需的空白对照 (PBS)、BDNF。37 °C、5% CO₂ 下培养, 在 20 h 后观察细胞管状排列及管状结构数量、完整程度, 并随机选取 5 个视野, 应用 Image - pro plus 5.1 软件分析镜下每视野 (×40) 总的管状结构数量, 结果以与空白对照相比的百分数表示。实验重复 3 次。

7 免疫印迹法

不同处理的 HUVECs 分别经冷 PBS 冲洗 3 次, 加入预冷的细胞裂解液 (1% NP - 40, 20 mmol/L Tris

(pH7.4), 150 mmol/L NaCl, 10% 甘油, 1 mmol/L PMSF, 10 mg/L 抑菌肽, 1 mg/L 亮肽素, 1 mmol/L Na₃VO₄, 1 mmol/L NaF) 混匀, 冰浴 30 min, 12 000 ×g 离心 30 min 取上清。蛋白质经 Bradford (Bio-Rad) 分析定量调整蛋白浓度一致。加等量的 2 × SDS 上样缓冲液, 95 °C 变性 5 min。每孔 100 μg 的细胞总蛋白质经 12.5% SDS - PAGE 电泳分离、转移至硝酸纤维素膜; 室温下 5% BSA 封闭 1 h; 抗 p - Akt(1:1 000) 或抗 p - ERK1/2(1:1 000) 以及相应 HRP 标记的 II 抗结合; ECL 发光; 常规显影。抗体经缓冲液洗脱后, 再以相应的抗总激酶抗体二次检测总的 Akt、ERK1/2 作为激酶总量的评估。

8 统计学处理

应用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间分析采用 Student - Newman - keuls 检验。

结 果

1 BDNF 诱导内皮细胞血管新生

为评估 BDNF 体外促血管新生的能力, 我们分别进行了 Transwell 小室迁移实验、管腔形成实验和 MTT 增殖实验, 并以 VEGF 作为阳性对照。结果显示, 100 μg/L 的 BDNF 能在体外诱导 HUVECs 的迁移、管腔形成和增殖, 其效应与空白对照组(100%) 相比分别为 153%、241% 和 201% ($P < 0.05$), 而较之 25 μg/L 的 VEGF(162%、258% 和 231%), 两者间的差异无显著($P > 0.05$), 见图 1。

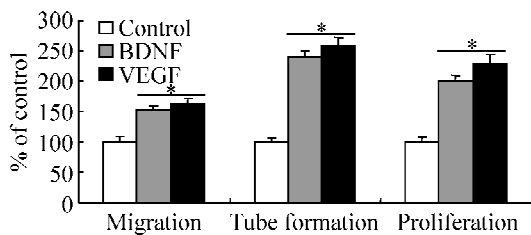


Fig 1 Migration, tube formation and proliferation in HUVECs induced by BDNF. $\bar{x} \pm s$. $n = 9$. * $P < 0.05$ vs control group.

图 1 BDNF 诱导的内皮细胞迁移、小管形成和增殖效应

2 BDNF 诱导内皮细胞中 Akt 和 ERK1/2 的磷酸化

将 HUVECs 在含 1% 血清的 M199 培养液中培养 12 h, 而后采用 100 μg/L 的 BDNF 处理不同时间。从图 2 可知, 经过饥饿培养的 HUVECs 中存在微弱的组成性 Akt 和 ERK1/2 激活; BDNF 诱导 Akt 和 ERK1/2 的磷酸化, 并呈时间依赖性, Akt 的激活于 30 min 时作用最强, 60 min 恢复至基础水平。ERK1/2 的活化效应在 BDNF 刺激 5 min 时即可出

现, 20 min 达到高峰, 而后逐渐降低。

3 Ly294002 和 PD98059 分别阻断 BDNF 介导的 Akt、ERK1/2 的磷酸化

为了评价 PI3K/Akt 和 MEK1/ERK 信号途径特异性抑制剂 Ly294002、PD98059 对 BDNF 介导的 Akt、ERK1/2 活化的影响, 我们将 HUVECs 按上述方法饥饿培养 12 h, 应用 Ly294002、PD98059 各 20 μmol/L 分别预处理细胞 1 h, 再暴露于 100 μg/L 的 BDNF 20 min, 检测磷酸化 Akt、ERK1/2 的表达情况。由图 3 可知, Ly294002 几乎完全阻断基础 p - Akt 和 BDNF 诱导的 p - Akt 的表达(抑制率约为 96%); 同样, PD98059 可部分阻断 BDNF 诱导的 ERK1/2 的活化(抑制率约为 78%), 而对 Akt 的活化无影响。

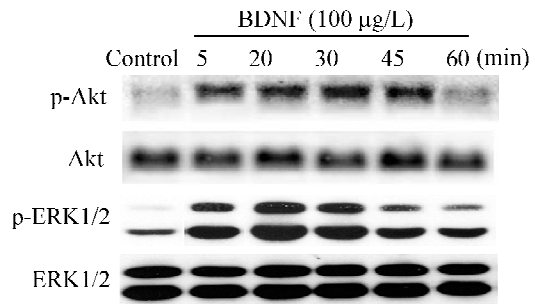


Fig 2 BDNF phosphorylate Akt and ERK1/2 of HUVECs in time - depended manner.

图 2 BDNF 诱导内皮细胞 Akt 和 ERK1/2 活化的时间效应

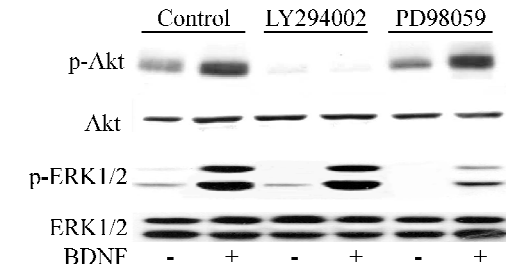


Fig 3 Ly294002 and PD98059 blocked the phosphorylation of Akt and ERK1/2, respectively.

图 3 Ly294002 和 PD98059 分别阻断 BDNF 介导的 Akt、ERK1/2 的活化

4 PI3K/Akt 和 MEK1/ERK 信号途径调节 BDNF 诱导的内皮细胞管腔形成和迁移效应

管腔形成和迁移实验是体外用来评价血管新生的模型。过去的研究已证实, BDNF 在体内外均具有促血管新生效应^[3]。我们将与上述实验相同浓度的 Ly294002、PD98059 预处理 HUVECs 细胞 1 h 后, 再检测 BDNF 促内皮细胞迁移和管腔形成效应, 用以探索不同信号途径在 BDNF 促血管新生中发挥的作用。由图 4、5 可知, BDNF 促进内皮细胞在 Matrigel 上形成完整的毛细管状结构, Ly294002、PD98059 可

部分阻断此效应(分别减少约 57% 和 37%)。同样, BDNF 介导的内皮细胞迁移效应也能被 Ly294002、PD98059 抑制, 其抑制率分别约为 74% 和 36%。Ly294002、PD98059 对未经 BDNF 刺激的细胞无明显

影响。此结果说明, BDNF 介导的血管新生是通过 PI3K/ Akt 和 MEK1/ ERK 途径的共同活化实现的, 而阻断 PI3K/Akt 途径对其影响较 MEK1/ERK 途径更为明显。

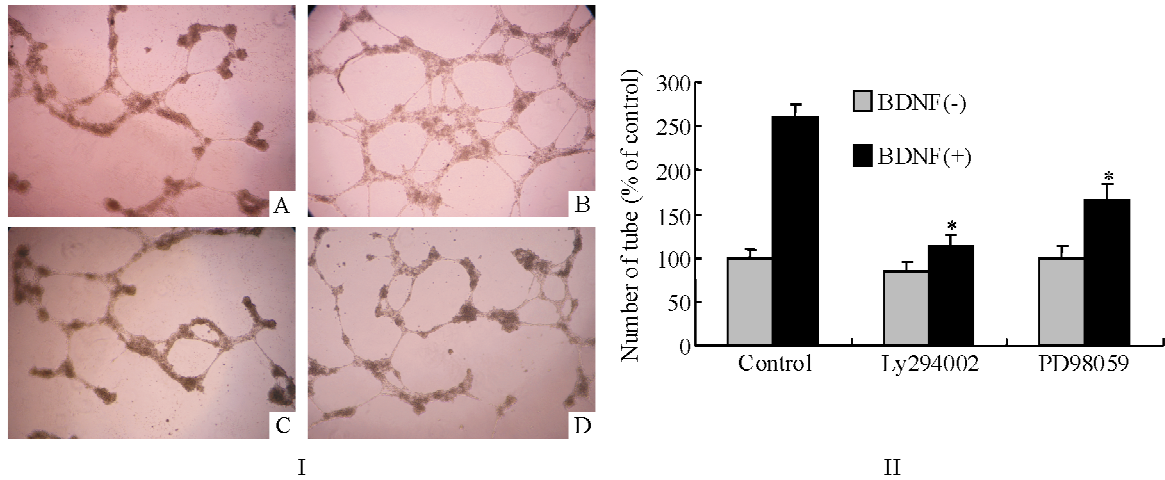


Fig 4 Ly294002, PD98059 significantly reduced BDNF - dependent tube formation (×40). I :A: control; B: BDNF (100 μg/L); C: BDNF + 20 μmol/L Ly294002; D: BDNF + 20 μmol/L PD98059; II :percentage of tube number per field. $\bar{x} \pm s$. n = 15. * P < 0.05 vs the BDNF - treated group.

图 4 Ly294002、PD98059 对 BDNF 诱导的内皮细胞管腔形成效应的影响

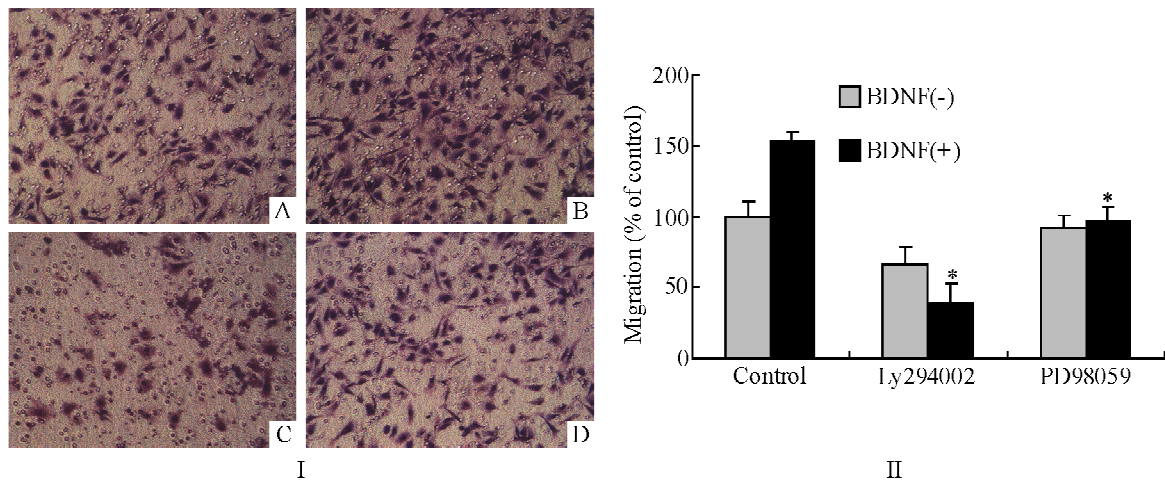


Fig 5 Ly294002, PD98059 significantly reduced BDNF - dependent migration (Wright's & Giemsa, ×200). I :A: control; B: BDNF (100 μg/L); C: BDNF + 20 μmol/L Ly294002; D: BDNF + 20 μmol/L PD98059; II :percentage of migration cell per field. $\bar{x} \pm s$. n = 15. * P < 0.05 vs the BDNF - treated group.

图 5 Ly294002、PD98059 对 BDNF 诱导的内皮细胞迁移效应的影响

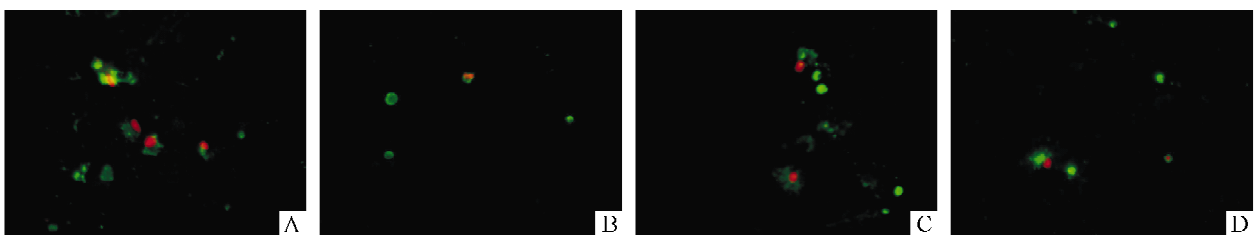


Fig 6 Apoptosis detected by FITC - Annexin - V/PI (×400). A: control; B: BDNF (100 μg/L); C: BDNF + 20 μmol/L Ly294002; D: BDNF + 20 μmol/L PD98059. Cells in early apoptosis bound Annexin V but did not incorporate propidium iodide, while cells in late apoptosis bound Annexin V and incorporated propidium iodide, due to a loss of membrane integrity.

图 6 FITC - Annexin - V/PI 双染法分析 Ly294002、PD98059 对 BDNF 抑制内皮细胞凋亡的影响

5 PI3K/ Akt 信号途径调控 BDNF 介导的内皮细胞存活, MEK1/ERK 信号途径不具有此效应

HUVECs 在含 1% 血清的 M199 中培养并按上述方法处理 24 h 后,采用 FITC - Annexin - V/PI 双染检测细胞的凋亡情况。FITC⁺PI⁻ 的细胞为早期凋亡细胞, FITC⁺PI⁺ 的细胞为晚期凋亡细胞。空白对照组凋亡细胞比例(早期凋亡 + 晚期凋亡)约为 61.7%, 且出现较多 FITC⁺PI⁺ 细胞,部分胞膜失去完整性; BDNF 组凋亡细胞比例约为 22.6%, FITC⁺PI⁻ 细胞较 FITC⁺PI⁺ 细胞多,胞膜多为完整;经 Ly294002 处理后,凋亡细胞比例上升为 61.5%;而 PD98059 处理的约为 28.0%(表 1、图 6)。

6 MEK1/ ERK 信号途径调控 BDNF 介导的内皮细胞增殖, PI3K/ Akt 信号途径不具有此效应

由图 7 可知, 100 μg/L 的 BDNF 可明显促进 HUVECs 的增殖, 其 A 值约为 BDNF 阴性对照组的 2 倍; 20 μmol/L PD98059 阻断此效应, A 值约降低 46% (P < 0.05), 而 20 μmol/L Ly294002 虽可略减少 BDNF 诱导的增殖效应, 但两者间的差异不显著 (P > 0.05)。Ly294002、PD98059 对未经 BDNF 刺激的细胞增殖无明显影响。此结果说明, MEK1/ERK 途径参与调节 BDNF 介导的 HUVECs 体外增殖, 而 PI3K/Akt 途径对其无影响。

表 1 流式细胞术分析 FITC - Annexin - V/PI 双染细胞
Tab 1 Flow cytometry analysis of Annexin - V/PI double staining ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Group	Live (%)	EA (%)	LA (%)
Control	37.3 ± 5.9	24.2 ± 3.7	37.5 ± 7.0
BDNF	76.5 ± 11.0*	18.4 ± 2.1	4.2 ± 1.2
BDNF + Ly294002	34.0 ± 6.6*	35.2 ± 5.6	26.3 ± 2.6
BDNF + PD98059	71.5 ± 9.8	22.1 ± 5.4	5.9 ± 1.4

EA: early apoptosis; LA: late apoptosis. * P < 0.05 vs the control group; * P < 0.05 vs the BDNF - treated group.

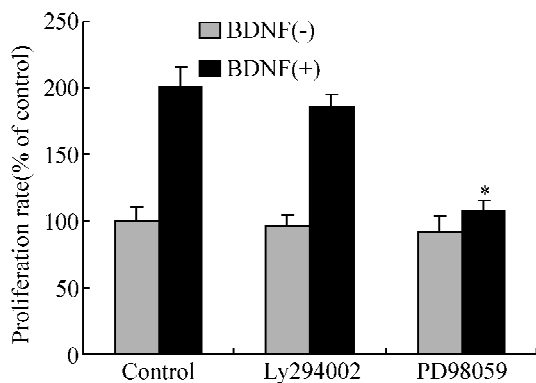


Fig 7 The rate of proliferation. $\bar{x} \pm s, n = 9, * P < 0.05$ vs the BDNF - treated group.

图 7 不同处理组 HUVECs 的增殖率

讨 论

血管新生,指的是在原始血管丛或已存在血管的基础上以发芽的方式形成新生血管的过程,受多种血管新生因子的调控,如 VEGF、bFGF、Ang1、IGF 等^[9]。它们通过与内皮细胞膜上的特异性受体结合,启动下游一系列信号转导分子的瀑布式磷酸化,调控转录因子,从而促进其小管形成、迁移和增殖,并抑制其凋亡^[5,6]。然而,迄今为止,有关血管新生的调节机制尚未完全阐明。

最新研究发现 BDNF 参与内皮细胞的调节,可能与血管新生有一定的关系。BDNF 是神经营养因子家族一员,对神经细胞的生长发育、损伤修复有重要作用^[10]。Donovan 等^[11]证实 BDNF 过度表达的小鼠心脏微血管密度增加,在体外 BDNF 能抑制心脏微血管内皮细胞凋亡; BDNF 能增强脑源性内皮细胞在二维基质胶上形成完整的微管状结构^[2]。而且新近我们的研究发现, BDNF 对小鼠体内 matrigel plug 和鸡胚尿囊膜血管生成具有促进作用^[3]。本实验也表明 100 μg/L 的 BDNF 在体外可明显促进 HUVECs 迁移、管腔形成和增殖,其效应与 25 μg/L 的 VEGF 相当,为一种新的促血管新生因子。然而, BDNF 调节血管新生的分子机制和所涉及的信号分子目前并不十分清楚。

PI3K/Akt 通路在诸多血管生成因子促血管新生中均发挥调节作用^[6]。有研究认为, Akt 的活化与外源性 BDNF 介导的内皮细胞分化和存活密切相关^[2]。与此结论相似,我们发现 BDNF 可致使 HUVECs 中的 Akt 磷酸化,应用 PI3K 的特异性抑制剂 Ly294002 可阻断这一效应,同时也阻断了 BDNF 诱导的 HUVECs 迁移、管腔形成,并拮抗其抑制 HUVECs 凋亡的作用。这提示 PI3K/Akt 信号通路不仅在 BDNF 诱导的 HUVECs 体外迁移和管腔形成中发挥重要的调节作用,亦参与 BDNF 诱导的内皮细胞存活,在血管新生过程中维持血管的稳定性。

过去研究表明, Akt 的活化可引发肌球、肌动蛋白细胞骨架的重构,致使细胞移动^[11]; Akt 磷酸化内皮细胞一氧化氮合酶(eNOS),活化的 eNOS 促使内皮细胞源性的一氧化氮(eNO)释放,而后者已证实是调节血管生成和血管张力的重要因子^[6];另外,活化的 Akt 通过上调凋亡抑制因子或下调凋亡促进因子从而抑制内皮细胞的凋亡^[2]。那么在 HUVECs 中, Akt 活化后是通过哪些下游信号分子实现 BDNF 介导的上述效应呢? 这将是我们的下一步深入研究的重点。

丝裂原活化的蛋白激酶(MAPK)的 ERK1/2 是介导血管新生的另一类重要的信号蛋白,通过胞浆或胞核中其下游的信号分子发挥调节多种内皮细胞迁移、分化和增殖的作用^[12,13]。本实验的结果表明, BDNF 可致使 HUVECs 中的 ERK1/2 磷酸化, MEK 特异性抑制剂 PD98059 阻断 BDNF 的促 HUVECs 增殖效应,而 Ly294002 对其无影响,此结果与过去的文献^[12]相符。另外,在 BDNF 诱导的 HUVECs 体外迁移和小管形成中,MEK1/ ERK 信号通路亦发挥了调节作用,但其作用弱于 PI3K/Akt 信号通路。然而 Bullard 等^[13]提出了相反的观点,其认为 ERK 的活化仅与内皮细胞的增殖有关,与小管形成无关。这可能是因为实验中内皮细胞种属来源和所用刺激因子不同的缘故。

Ly294002 + BDNF 组的迁移细胞数明显低于空白对照组,说明除直接拮抗了 BDNF 的作用外, Ly294002 可能还影响了导致血管新生的其它因素。曾有报道^[14]指出,PI3K/Akt/eNOS 途径活化后,释放的 eNO 可上调 VEGFmRNA 的表达,故推测 Ly294002 通过阻断 BDNF 活化的 PI3K/Akt/eNOS/eNO 途径,减少 VEGF 的合成,从而间接影响了 VEGF 的促血管新生效应。然而,有关 BDNF 与 VEGF 等其它促血管生成因子的相互作用及其机制有待进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] Donovan MJ, Lin MI, Wiegand P, et al. Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization[J]. Development, 2000, 127(21): 4531 - 4540.

[2] Kim H, Li Q, Hempstead BL, et al. Paracrine and autocrine functions of brain - derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain - derived endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2004, 279 (32): 33538 - 33546.

[3] 胡 豫,孙春艳,王雅丹,等. 脑源性神经营养因子在多发性骨髓瘤患者血浆中的表达增高及其意义的初步探讨[J]. 中国实验血液学杂志,2005, 13(1): 104 - 109.

[4] 孙春艳,胡 豫,吴 涛,等. 多发性骨髓瘤细胞脑源性神经营养因子对血管新生作用的研究[J]. 中华血

液学杂志, 2005, 26(10):602 - 606.

[5] Suzuma K, Naruse K, Suzuma I, et al. Vascular endothelial growth factor induces expression of connective tissue growth factor via KDR, Flt1, and phosphatidylinositol 3 - kinase - Akt - dependent pathways in retinal vascular cells[J]. J Biol Chem, 2000, 275(52): 40725 - 40731.

[6] Babaei S, Teichert - Kuliszewska K, Zhang QW, et al. Angiogenic actions of angiopoietin - 1 require endothelium - derived nitric oxide[J]. Am J Pathol, 2003, 162(6): 1927 - 1936.

[7] Kawasaki K, Smith RS, Hsieh CM, et al. Activation of the phosphatidylinositol 3 - kinase/protein kinase Akt pathway mediates nitric oxide - induced endothelial cell migration and angiogenesis[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(16): 5726 - 5737.

[8] Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, et al. Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 is essential for vascular endothelial growth factor - induced human dermal microvascular endothelial cell migration and tube formation[J]. J Biol Chem, 2003, 278(41): 40026 - 40034.

[9] Beck L Jr, D'Amore PA. Vascular development: cellular and molecular regulation[J]. FASEB J, 1997, 11(5): 365 - 373.

[10] 方秀斌. 神经肽与神经营养因子[M]. 北京:人民卫生出版社,2002. 289 - 294.

[11] Morales - Ruiz M, Fulton D, Sowa G, et al. Vascular endothelial growth factor - stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/ threonine kinase Akt[J]. Circ Res, 2000, 86(8): 892 - 896.

[12] Secchiero P, Gonelli A, Carnevale E, et al. TRAIL promotes the survival and proliferation of primary human vascular endothelial cells by activating the Akt and ERK pathways[J]. Circulation, 2003, 107(17): 2250 - 2256.

[13] Bullard LE, Qi X, Penn JS. Role for extracellular signal - responsive kinase - 1 and - 2 in retinal angiogenesis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(4): 1722 - 1731.

[14] Dulak J, Jozkowicz A, Dembinska - Kiec A, et al. Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20(3): 659 - 666.