

# 靶向血管内皮生长因子基因的微小RNA真核表达载体的构建\*\*\*★

熊建宁<sup>1,2</sup>, 孙建<sup>2</sup>, 区应亮<sup>2</sup>, 简志祥<sup>2</sup>

## Construction of a microRNA expressing eukaryotic vector targeting vascular endothelial growth factor

Xiong Jian-ning<sup>1,2</sup>, Sun Jian<sup>2</sup>, Ou Ying-liang<sup>2</sup>, Jian Zhi-xiang<sup>2</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** Studies have shown that the microRNA (miRNA) and its potential target gene play an important role in hepatocellular carcinoma, but the exact mechanism is still unclear.

**OBJECTIVE:** To construct a vascular endothelial growth factor (VEGF) miRNA expressing eukaryotic vector and to identify biological activity of VEGF miRNA transfected into HepG-2 cells.

**METHODS:** According to the sequence of VEGF mRNA, the VEGF miRNA was designed and synthesized, and then cloned into the pcDNA6.2-GW/EmGFP-miRNA vector and transfected into HepG-2 cell lines. The integrity of the insert fragment was detected using colony PCR and sequencing analysis. The biological activity of VEGF miRNA by way of real-time PCR and Western blot was determined.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Sequences of the inset fragment in the four miRNA expressing recombinants were correct. VEGF mRNA expression of the four miRNA recombinants were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), especially in the VEGF-miRNA-3 with an inhibitory rate of 87%. Four VEGF-targeting miRNA expressing recombinants were successfully constructed which can significantly inhibit VEGF gene expression in HepG2 cells.

Xiong JN, Sun J, Ou YL, Jian ZX. Construction of a microRNA expressing eukaryotic vector targeting vascular endothelial growth factor. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(15): 2737-2740. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 有研究表明微小RNA及潜在靶基因在肝癌中起重要作用,但具体机制仍不清楚。

**目的:** 构建靶向血管内皮生长因子基因微小RNA真核表达载体,评估其转染人肝癌细胞株HepG2后血管内皮生长因子基因的干扰效果。

**方法:** 根据血管内皮生长因子序列设计合成4对微小RNA不同干扰片段,克隆到pcDNA6.2-GW/EmGFP-微小RNA真核表达载体上,测序分析鉴定插入序列的完整性;并将其转染至HepG-2细胞株中。采用实时荧光定量聚合酶链式反应分析血管内皮生长因子微小RNA干扰效果,蛋白印迹技术测定重组体对血管内皮生长因子基因蛋白表达情况。

**结果与结论:** 构建的4组重组体插入片段的碱基序列完全正确,重组体能干扰肝癌细胞HepG2细胞血管内皮生长因子基因的表达,4组重组体基因的mRNA的表达水平和蛋白表达水平与阴性对照组相比明显降低( $P < 0.05$ ),其中血管内皮生长因子微小RNA-3表达水平最低,抑制率87%。结果证实,实验成功构建血管内皮生长因子微小RNA表达载体,在体外能有效抑制HepG2细胞血管内皮生长因子基因表达。

**关键词:** 血管内皮生长因子;微小RNA;肝癌;肝细胞;抑制;基因表达;组织工程

**缩略语注释:** VEGF: vascular endothelial cell growth factor, 血管内皮生长因子

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.15.017

熊建宁,孙建,区应亮,简志祥. 靶向血管内皮生长因子基因的微小RNA真核表达载体的构建[J].中国组织工程研究,2012,16(15): 2737-2740. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

微小RNA(microRNA)是一组长约22核苷酸的非编码小RNA分子,主要通过与其靶基因序列不完全互补的microRNA抑制mRNA的翻译,而与靶序列完全互补的microRNA引起靶基因mRNA的裂解,即RNA干扰。MicroRNA调控基因表达的功能与来源无关,因此,MicroRNA成为继siRNA之后RNA干扰领域一种重要的研究手段和实验工具<sup>[1]</sup>。

血管内皮生长因子(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)是目前已知在原发性肝癌

血管生成中作用最强的血管生成诱导因子,可通过作用于血管内皮细胞、提高血管的通透性、促进肝癌细胞的增殖来促进肝癌的发生、发展、转移<sup>[2]</sup>。黄秋林等<sup>[3]</sup>利用RNAi干扰技术抑制肝癌细胞VEGF的表达。但建立VEGF microRNA真核表达载体干扰技术研究不多。目前对microRNA与肿瘤关系在功能研究主要通过真核表达载体体外转录以及合成等方法为主。由于RNA本身容易收RNA酶污染而降解,合成价格昂贵使用次数有限,使得其他方法的应用有限,而采用真核表达载体具有独特优势。实验通过体外构建靶向VEGF基因的microRNA真核表达载体,并转染HepG2细胞,实验利用特异性RNA干扰技术证

<sup>1</sup>Southern Medical University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China; <sup>2</sup>Department of Hepatobiliary Surgery, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Xiong Jian-ning★, Studying for master's degree, Attending physician, Southern Medical University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China; Department of Hepatobiliary Surgery, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China neilxjn@163.com

Corresponding author: Sun Jian, Doctor, Associate chief physician, Associate professor, Department of Hepatobiliary Surgery, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China akeyman@yahoo.com.cn

Supported by: the Science and Technology Program of Guangdong Province, No. 2009B080701021\*, 2010B080701021\*; the Medical Science Research Foundation of Guangdong Province, No. A2010002\*

Received: 2011-11-03 Accepted: 2012-03-08

<sup>1</sup>南方医科大学, 广东省广州市 510515; <sup>2</sup>广东省人民医院肝胆外科, 广东省广州市 510080

熊建宁★: 男, 1970年生, 甘肃省兰州市人, 汉族, 南方医科大学在读硕士, 主治医师。  
neilxjn@163.com

通讯作者: 孙建, 博士, 副主任医师, 副教授, 广东省人民医院肝胆外科, 广东省广州市 510080  
akeyman@yahoo.com.cn

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225 (2012)15-02737-04

收稿日期: 2011-11-03  
修回日期: 2012-03-08  
(20111103016/WJ-V)

明人肝癌细胞株HepG2中VEGF表达受到抑制, 为应用microRNA靶向VEGF的肝癌基因治疗的研究提供新的思路。

## 1 材料和方法

**设计:** 基因学实验。

**时间及地点:** 于2011-07/11在广东省人民医院生物分子实验室完成。

**材料:**

**试剂及仪器:**

试剂及仪器	来源
线性化 microRNA 表达载体	Invitrogen 公司
pcDNA6.2-GW/ EmGFP-miR, DH5α 大肠杆菌感受态细胞, 肝癌细胞株 HepG2, BLOCK-iT™ Pol II miR RNA I Expression Vector Kit with EmGFP; Lipofectamine 2000	
质粒提取试剂盒	TIANGEN 公司
鼠抗人 VEGF(ab1316)抗体	Abcam 公司
β-actin 鼠抗人单克隆抗体	Santa Cruz 公司
HRP(辣根过氧化物酶)标记的山羊抗鼠、抗兔的二抗 Ig	Sigma 公司
荧光定量 PCR 仪	OLYMPUS 公司

**方法:**

microRNA的设计合成与构建: 引物序列见表1。

表1 pre-microRNA 寡核苷酸序列  
Table 1 pre-microRNA oligo sequence

Gene	Sequences (5'-3')
VEGF-microRNA-1	F TGC TGG ACA GCA GAA AGT TCA TGG TTT TGG CCA CTG ACT GAC AAC CAT GAT TTC TGC TGT C R CCT GGA CAG CAG AAA TCA TGG TTG TCA GTC AGT GGC CAA AAC AAC CAT GAA CTT TCT GCT GTC C
VEGF-microRNA-2	F TGC TGT GAT GAT TCT GCC CTC CTC CTG TTT TGGC CAC TGA CTG ACA GGA GGA GCA GAA TCA TCA R CCT GTG ATG ATT CTG CTC CTC CTG TCA GTC AGT GGC CAA AAC AGG AGG AGG GCA GAA TCA TCA C
VEGF-microRNA-3	F TGC TGT ACT CCT GGA AGA TGT CCA CCG TTT TGG CCA CTG ACT GAC GGT GGA CAT TCC AGG AGT A R CCT GTA CTC CTG GAA TGT CCA CCG TCA GTC AGT GGC CAA AAC GGT GGA CAT CTT CCA GGA GTA C
VEGF-microRNA-4	F TGC TGT GAA GAT GTA CTC GAT CTC ATG TTT TGG CCA CTG ACT GAC ATG AGA TCG TAC ATC TTC A R CCT GTG AAG ATG TAC GAT CTC ATG TCA GTC AGT GGC CAA AAC ATG AGA TCG AGT ACA TCT TCA C

VEGF: vascular endothelial growth factor

从GenBank上搜索获得人VEGF基因的mRNA序列 (NM\_001025366), 使用在线设计

软件 RNA I designer (<http://www.invitrogen.com/rnaidesigner>)根据基因序列设计并合成设计4对针对VEGF基因的pre-microRNA寡核苷酸序列作为干扰片段, 并得到其互补序列, 经NCBI Blast排除其非特异同源性。同样设计一段不针对人体任何 mRNA序列的阴性对照序列 (Neg), 4对 microRNA 寡核苷酸链由 invitrogen 公司合成。

将设计合成好的寡核苷酸链构建入 pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR 真核表达载体并转化至 DH5α 感受态大肠杆菌。重组体分别命名为 VEGF-microRNA-1, 2, 3, 4, Neg。

**重组体的测序鉴定:** 平板上挑取单菌落接种与含有 50 μg 的壮观霉素抗性液体 LB 试管中, 37 °C 摇床培养过夜。挑取 LB 平板上的阳性克隆菌落。质粒提取后由 Invitrogen 公司进行测序, 使用反向测序引物 microRNA reverse sequencing primer (invitrogen, Catalog no. K4936-00, 5'-CTC TAG ATC AAC CAC TTT GT-3') 测序。

**细胞培养和转染:** 选择肝癌细胞株 HepG2 在 DMEM+ 体积分数 10% 胎牛血清+双抗中培养。在转染前 1 d, 选择生长状态良好、70% 以上汇合的细胞, 实验分组为阴性对照 VEGF-microRNA-Neg, 空载体对照, VEGF-microRNA-1, 2, 3, 4。每组设 3 个平行孔。转染比例为 0.5 μg 质粒: 1.25 μL Lipofectamine 2000/24 孔板, 具体转染操作根据 Lipofectamine 2000 脂质体转染说明书进行。

**荧光定量 PCR 检测 microRNA 转染后 VEGF mRNA 的表达:** 收集转染后 48 h 的细胞, 每孔细胞样品中各加入 1 mL Trizol 液, 尽量让细胞全部裂解后抽提总 RNA。取少量用于 RNA 含量及纯度测定。

总 RNA 先用 RNase H 处理后, 用 FQ-PCR 试剂盒进行 cDNA 的合成及 PCR 反应。

**PCR 引物:**

VEGF	F: 5'- CGT GTA CGT TGG TGC CCG CT-3'
	R: 5'- TCC TTC CTC CTG CCC GG CTC-3'
GAPDH	F: 5'- CCT CCA TC G TCC ACC GCA AAT G-3'
	R: 5'- TGC TGT CAC CTT CAC CGT TCC A-3'

荧光定量 PCR 在 BIORAD I cycler 5 通道荧光定量 PCR 仪上进行, 每个标本重复测量 3 次, 标准曲线法分析 VEGF mRNA 的表达量。

**Western blot 检测 microRNA 转染后 VEGF 蛋白的表达:** 收集转染后 24 h 的细胞, PBS 洗涤 2 遍, 细胞总蛋白抽提液提取总蛋白, 并储存于 -70 °C

备用。紫外分光光度计法进行蛋白质定量。进行10% SDS-PAGE电泳, 每孔上样量为30  $\mu\text{g}$ 。样品分离后转移至NC膜, 室温封闭1 h, TBST漂洗, 分别加入鼠抗人VEGF(ab1316)抗体(室温孵育2 h)和鼠抗人 $\beta$ -actin单克隆抗体(室温孵育1 h), TBST漂洗, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗(抗鼠、抗兔)室温孵育1 h, TBS漂洗后ECL显影, 暗室压片。

**主要观察指标:** VEGF microRNA的序列设计结果, 重组体鉴定结果, VEGF mRNA和蛋白的表达水平。

**统计学分析:** 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 应用SPSS 17.0软件进行统计学处理。多组间均数比较用单因素方差分析和LSD-*t*法,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 VEGF microRNA的序列设计结果** 实验结合线性化 pcDNA6.2-GW/EmGFPmicroRNA真核表达载体的特点。设计了4个pre-microRNA寡核苷酸序列, 如表1所见, 其结构为: 5' TGCT overhang+G+21 antisense target sequence+t-loop sequence+18 sense target sequence3'。其互补序列是在去掉pre-MicroRNA寡核苷酸序列5'端的TGCT, 再形成正义链的互补, 然后在5'端添加CCTG, 3'端添加C后形成的, 这样可以在寡核苷酸双链的5'端形成悬垂, 以与线性化 pcDNA6.2-GW/EmGFP-microRNA载体的末端悬垂互补配对, 形成定向克隆。

**2.2 重组体鉴定结果** 测序结果见图1。

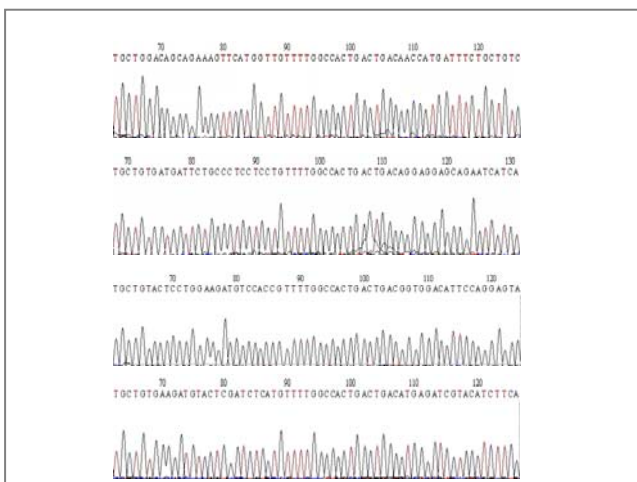


Figure 1 MicroRNA interference vector sequencing report (It was X26--1-3., X26-2N-1, X26-3-2, X26-4-4 from up to down)

图1 MicroRNA 干扰载体的测序报告(由上到下分别是 X26--1-3., X26-2N-1, X26-3-2, X26-4-4)

测序分析证明重组体中含有pre-MicroRNA片段, 且插入片段的碱基序列完整, 没有碱基的突变以及丢失。VEGF-microRNA-1, 2, 3, 4这4个重组体中目的片段

的插入位置分别位于63~126 bp, 68~131 bp, 61~124 bp, 63~126 bp之间。

**2.3 VEGF mRNA表达水平** VEGF-microRNA-1, 2, 3这3个重组体的 VEGF mRNA表达水平和阴性对照组、空载体对照组相比较均明显降低( $P < 0.05$ ); 4个 VEGF microRNA重组体组中, VEGF-microRNA-3组的 VEGF mRNA-2表达水平最低, VEGF-microRNA-2组次之, VEGF-microRNA-1组最高。见表2。

Group	mRNA expression vector ( $\bar{x}\pm s$ )	Inhibited rate (%)
VEGF-microRNA-neg	1.00 $\pm$ 0.12	0
Hep-2 (blank control)	0.97 $\pm$ 0.09	0
VEGF-microRNA-1	0.58 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	42
VEGF-microRNA-2	0.28 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	72
VEGF-microRNA-3	0.13 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	87
VEGF-microRNA-4	1.21 $\pm$ 0.15	-

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs. VEGF-microRNA-neg group; VEGF: vascular endothelial growth factor

**2.4 VEGF蛋白表达水平** 转染质粒48 h后, 以转染阴性质粒组和空白组为对照, 以 $\beta$ -actin为内参, 用Western Blot检测发现, 与空白对照组比较, VEGF-microRNA-1, VEGF-microRNA-2, VEGF-microRNA-3均明显抑制 VEGF蛋白的表达( $P < 0.05$ ), 而且 VEGF-microRNA-3效果最显著。见图2。

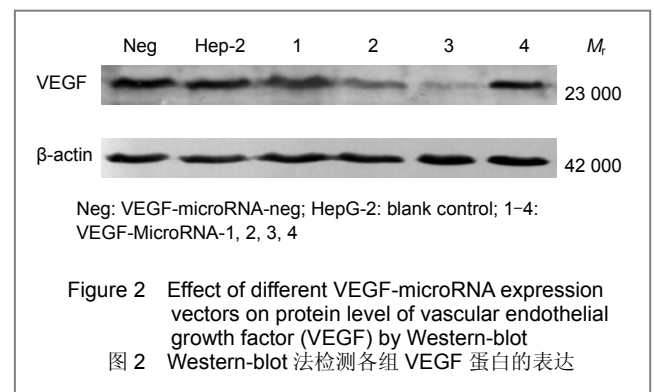


Figure 2 Effect of different VEGF-microRNA expression vectors on protein level of vascular endothelial growth factor (VEGF) by Western-blot

图2 Western-blot 法检测各组 VEGF 蛋白的表达

## 3 讨论

microRNA属于调控RNA家族一员。当非编码小RNA与靶mRNA完全或不完全配对时, 可引起mRNA降解(RNA干扰), 或发生在mRNA水平上诱导特异性序列基因表达部分或完全抑制的过程<sup>[4]</sup>。现已经成为研究基因治疗和寻找药物靶点的重要工具。与siRNA异同是microRNA调控基因表达功能与来源无关。近来研究人员开始利用内源microRNA前体结构表达人工外源性microRNA来进行RNAi研究。构建真核microRNA表达载体具有以下优势: ①能调控用来抑制特定靶基因的人

工microRNA的表达。②多个microRNA序列可以一前一后的插入, 这个特点可以从单个载体构建的表达调控发展到多个microRNAs的表达调控。③microRNA质粒载体很容易转化为真核表达重组载体, 为其应用于治疗提供了多种方法。RNA干扰在mRNA水平上诱导特异型序列基因表达部分或完全抑制过程, 具有稳定性高, 特异性强, 靶向性高特点, 现常用于基因功能研究<sup>[5]</sup>。有研究于2005年第一次构建了基于MicroR-30前体结构的人工microRNA干扰载体<sup>[6]</sup>。随后, 其他一些关于microR-30的载体也被经常应用到RNAi的研究中, 而最近则发现了一种基于鼠microR-155基因序列的pol II启动子表达载体。

正常肝组织中VEGF表达量极低, 而肝细胞癌中VEGF表达量明显升高, 并且VEGF与肝细胞癌形成生长侵袭复发预后密切相关, 所以进行有效抑制VEGF的表达是肝癌抗血管生成的治疗方法之一<sup>[7]</sup>。已有研究鉴定出一部分肝癌具有VEGF及其相应基因增加的高表达水平基因组<sup>[8]</sup>。由于VEGF mRNA有5种多肽: VEGF121, VEGF 145, VEGF 165, VEGF 189, VEGF 206, 其中与肝癌关系密切的是VEGF 165<sup>[2]</sup>。Zhang等<sup>[9]</sup>研究发现VEGF受体表达与肿瘤发展密切相关, 通过shRNA干扰抑制VEGF可以增加p53抑癌基因表达量, 说明肝细胞癌中VEGF基因功能是受抑癌基因p53即时调控的。靶向VEGF165基因作为抗肿瘤治疗措施的研究主要包括以下几点: ①小分子的VEGF抑制剂。②单克隆抗体。③反义寡核苷酸的构建等。贝伐单抗是一种靶向VEGF的人类单克隆抗体, 已经被用来治疗一些特定的癌症, 比如结直肠癌、非小细胞性肺癌, 乳腺<sup>[10]</sup>。因VEGF microRNA序列特异性, 可以特异降解VEGF mRNA, 从而降低VEGF蛋白表达水平, 改变肿瘤的生物行为<sup>[11]</sup>。黄建等<sup>[12]</sup>利用人工合成的VEGF siRNA体外瞬时转染人肝癌细胞株SMMC-7721, 发现VEGF siRNA明显抑制肿瘤组织VEGF表达及致瘤性。

实验采用在肝癌HepG2细胞株中构建表达与VEGF mRNA序列互补的人工外源性microRNA真核表达载体干扰片段。经测序鉴定证实4个重组载体均构建成功, 将其脂质体转染肝癌细胞后, 荧光定量qPCR结果显示转染VEGF-MicroRNA-1, 2, 3质粒后VEGF mRNA的表达分别下降到原来的42%, 72%和87%。由此实验可以证明此种与靶基因mRNA序列互补的microRNA是通过对mRNA的降解达到抑制基因表达。结果证明microRNA介导的RNAi能够成功地抑制靶基因的表达, 进一步证实microRNA干扰载体片段较高特异性, 实验可能为肝癌分子靶向治疗铺垫实验基础。

总之, 实验应用microRNA前体序列为基础的表达载体合成VEGF microRNA干扰片段, 从mRNA基因水平和蛋白水平上均证实能抑制肝癌HepG2细胞体外

VEGF的表达, 通过靶向阻断VEGF表达途径抑制VEGF促血管形成从而向肝癌发展与转移提供了相关的实验依据, 具有较重要的理论意义及实践价值。

致谢: 感谢广东省人民医院分子生物实验室各位老师对本次实验提供的帮助。

#### 4 参考文献

- [1] Ross JS, Carlson JA, Brock G. miRNA: the new silence. *Am J Clin Pathol* 2007;128(5):830-836.
- [2] Xu B, Li Q, Fu L, et al. *Zhong hua Gandan Waike Zazhi*. 2007; 1(13): 67-68.  
徐斌, 李强, 付丽, 等. 四种血管特异性生长因子mRNA在肝癌中的表达[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2007, 1(13):67-68.
- [3] Huang QL, Yu YZ, Yang Y, et al. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi*. 2009;2(17):186-189.  
黄秋林, 于永政, 阳勇, 等. 靶向肝癌HepG2细胞VEGF基因的siRNA表达载体构建及体外抑制作用[J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 2(17): 186-189.
- [4] Vriens MR, Weng J, Suh I, et al. MicroRNA expression profiling is a potential diagnostic tool for thyroid cancer. *Cancer*. 2011;10(7): 144-148.
- [5] Shankar P, Manjunath N, Lieberman J. The prospect of silencing disease using RNA interference. *JAMA*. 2005;93(11):1367-1373.
- [6] Zeng Y, Cai X, Cullen BR. Use of RNA polymerase II to transcribe artificial microRNAs. *Methods Enzymol*. 2005;3(392):371-380.
- [7] Zhang H, Jing C X. *Zhongguo Binglishenglixue Zazhi*. 2006;4(22): 771-775.  
张恒, 荆春霞. VEGFsiRNA 对肝癌SMMC7721细胞株VEGF表达和增殖的抑制作用[J]. *中国病理生理学报*, 2006, 4(22):771-775.
- [8] Chiang DY, Villanueva A, Hoshida Y, et al. Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2008;68(16):6779-6788.
- [9] Zhang L, Wang JN, Tang JM, et al. VEGF is essential for the growth and migration of human hepatocellular carcinoma cells. *Mol Biol Rep*. 2011;12(7):113-118.
- [10] English BC, Price DK, Figg WD. VEGF inhibition and metastasis: possible implications for antiangiogenic therapy. *Cancer Biol Ther*. 2009;8(13):1214-1225.
- [11] Xu HG, Zhao YF, Miao XY, Jiepaoxue Jinzhan. 2009;1(15):40-43.  
徐恒瑰, 赵永福, 苗小艳. VEGF-A siRNA 对人肝癌HepG2细胞增殖侵袭及化疗敏感性的影响[J]. *解剖学进展*, 2009, 1(15):40-43.
- [12] Huang J, Wang HB, Ge SF, et al. *Fenzhi shengwu Xuebao*. 2007; 5(40):277-285.  
黄建, 王海波, 葛盛芳, 等. VEGFsiRNA降低人肝癌细胞株SMMC-7721的致瘤性[J]. *分子生物学报*, 2007, 5(40):277-285.

#### 来自本文课题的更多信息--

**基金声明:** 广东省科技计划项目(2009B080701021, 2010B080701021), 广东省医学科研基金(A2010002)。

**作者贡献:** 熊建宁, 孙建设和成文; 实验由熊建宁, 孙建, 区应亮, 简志祥操作完成; 数据分析由熊建宁完成。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

#### 文章概要:

**文章要点:** 构建 VEGF microRNA 真核表达载体干扰片段。研究转染后干扰片段对肝癌细胞 HepG2 抑制作用。

**关键信息:** microRNA 功能研究主要通过真核表达载体体外转录以及合成 3 种方法为主。由于 RNA 本身容易受 RNA 酶污染而降解, 合成价格昂贵使用次数有限, 使得后两种方法的应用有限, 而采用真核表达载体, 却有独特优势。

**研究创新之处与不足:** 构建 microRNA 真核表达载体并鉴定其相关功能, 具有一定的临床参考和借鉴价值。国内外利用 RNA 干扰抑制肝癌 HepG2 细胞 VEGF 表达相关研究已有报道, 创新性和先进性一般。