

MASPIN、HPA 在卵巢癌血管生成中的作用

马 瑛^{1,2}, 彭芝兰¹, 陈 欣³

(1.四川大学华西第二医院, 四川 成都 610041; 2. 绵阳市中心医院, 四川 绵阳 621000;

3.成都地奥集团筛选中心, 四川 成都 610041)

摘要: [目的] 研究丝氨酸蛋白酶抑制剂(MASPIN)、乙酰肝素酶(HPA)在卵巢癌的表达和血管生成的作用。[方法] 采用免疫组化法对 31 例正常卵巢组织、35 例上皮性卵巢癌标本进行 MASPIN、HPA 表达检测, CD34 抗体标记血管内皮细胞计数微血管密度(MVD)。MASPIN 真核表达质粒体外转染卵巢癌 SKOV3 细胞, 用细胞免疫化学及半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测转染后卵巢癌细胞中 HPA 蛋白和 HPA mRNA 表达变化。[结果] MASPIN 在正常卵巢生发上皮细胞和卵巢癌细胞的阳性表达率分别为 16.1%(5/31)和 57.1%(20/35)($P<0.05$)。HPA 蛋白在正常卵巢生发上皮细胞未见表达, 在卵巢癌细胞的阳性表达率为 85.7%(30/35)($P<0.05$); MVD 在卵巢癌中增高($P<0.05$)。MASPIN 蛋白表达与卵巢癌病理类型、临床分期和腹水相关($P<0.05$)。HPA 蛋白表达与卵巢癌淋巴结转移和腹水相关($P<0.05$)。细胞免疫组化及 RT-PCR 方法均证实转染 MASPIN cDNA 的 SKOV3 细胞中 HPA 表达在各组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。[结论] MASPIN 在卵巢癌的发展过程中可能发挥着肿瘤抑制作用, 并具有抑制血管生成作用。HPA 表达与卵巢癌的恶性生物学行为密切相关。

关键词: 卵巢癌; 丝氨酸蛋白酶抑制剂; 乙酰肝素酶; 血管生成

中图分类号: R737.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2013)07-0586-06

doi: 10.11735/j.issn1004-0242.2013.07.A015

The Role of MASPIN、HPA Expression on Angiogenesis in Ovarian Cancer

MA Ying^{1,2}, PENG Zhi-lan¹, CHEN Xin³

(1. West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Mianyang Central Hospital, Mianyang 621000, China; 3. Medicine Screening Center, DiAo Group, Chengdu 610041, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of mammary serpin(MASPIN), heparanase(HPA) in ovarian cancer and the role in angiogenesis. [Methods] The expression of MASPIN and HPA was detected immunohistochemically in specimens of normal ovary ($n=31$) and epithelial ovarian cancer ($n=35$). Microvessel density(MVD) was counted by endothelial cells immunostained with anti-CD34 monoclonal antibody. The recombinant plasmid pcDNA3-MASPIN was stable transfected into ovarian cancer cell line SKOV3. The expressions of HPA protein and HPA mRNA were determined by immunocytochemistry and RT-PCR. [Results] The positive expression rate of MASPIN was 57.1% in ovarian cancer and 16.1% in normal tissues ($P<0.05$). The positive expression rate of HPA was 85.7%(30/35) in ovarian cancer and negative expression in normal tissues ($P<0.05$). MVD increased in ovarian cancer as compare with control group ($P<0.05$). MASPIN expression was correlated to pathological type, stage and ascites ($P<0.05$). HPA expression was correlated to lymph node involvement and ascites ($P<0.05$). The expression of HPA in SKOV3-MASPIN cell after transfected by recombinant plasmid pcDNA3-MASPIN was not significantly different among all the groups both by immunocytochemistry and RT-PCR. [Conclusions] MASPIN might play a role in inhibiting tumor and angiogenesis in ovarian cancer. HPA expression correlates to malignant biological behaviors in ovarian cancer.

Key words: ovarian cancer; mammary serpin; heparanase; angiogenesis

丝氨酸蛋白酶抑制剂 (mammary serpin, MASPIN) 是丝氨酸蛋白酶家族的新成员。已有研究显示在乳腺癌、肺癌、胃癌等恶性肿瘤中, MASPIN 具有强烈的抑制血管生成能力^[1-3], 然而在卵巢癌中还没有定

论。本研究通过免疫组织化学 LSAB 方法检测 MASPIN、乙酰肝素酶 (heparanase, HPA) 在上皮性卵巢癌组织中的表达, 分析其与卵巢癌临床病理间的关系; 并体外实验进一步检测卵巢癌细胞中 MASPIN 高表达对细胞增殖能力、血管生成相关基因 HPA 表达的影响, 对卵巢癌中 MASPIN 的生物学

收稿日期: 2013-03-01; 修回日期: 2013-04-10

基金项目: 四川省卫生计生厅科研立项 (070206)

通讯作者: 彭芝兰, E-mail: 1099435982@qq.com

特性及其对血管生成的影响作一初步研究。

1 材料与方法

1.1 标本来源

本研究采用的上皮性卵巢癌组织 35 例,术前未行化疗、放疗或生物治疗,术后病理诊断确诊并且患者临床病理资料完整,病理诊断均由有经验的病理专家复核。35 例上皮性卵巢癌,年龄 35~68 岁,平均年龄为 55.43 ± 10.14 岁。病理类型:浆液性腺癌 22 例(62.9%),黏液性癌 5 例(14.3%),子宫内膜样腺癌 5 例(14.3%),透明细胞癌 3 例(8.5%)。组织细胞学分级:高分化 3 例(8.6%),中分化 6 例(17.1%),低分化 26 例(74.3%)。临床病理分期:I 期 14 例(40.0%),II 期 2 例(5.7%),III 期 11 例(31.4%),IV 期 8 例(22.9%)。淋巴结转移:有转移 8 例(22.9%),无转移 27 例(77.1%)。有腹水 19 例(54.3%),无腹水 16 例(45.7%)。正常卵巢组织 31 例(子宫肌瘤 21 例,子宫腺肌症 10 例)。卵巢组织的获取均取得患者知情同意。

1.2 主要试剂和仪器

兔抗人 MASPIN 抗体(AbS4A)购自 Calbiochem 公司,鼠抗人 CD34 单抗购于北京中杉金桥生物技术有限公司,兔抗人 HPA 多抗购于武汉博士德公司,PCR 引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

Hybaid PCR 仪;Olympus DP70 型显微摄影系统;Kodak 凝胶成像系统及图像分析软件.Wallace Victor² 多功能发光检测仪(PerkinElmer 公司),DU[®] 640(BECKMAN COULTER_{TM})分光光度计;酶标仪 MICROPLATE READER(BIORAD 公司)。BIORAD 扫描仪。

1.3 质粒载体、宿主菌和细胞

pCDNA3-MASPIN、大肠杆菌 JM109、人体正常前列腺组织由成都地奥集团药物筛选中心提供。SKOV3 为人卵巢浆液性上皮癌细胞株,由四川大学华西第二医院实验中心妇科肿瘤实验室提供。

1.4 免疫组织化学检测 MASPIN、HPA、CD34 在卵巢癌组织中的表达

免疫组织化学染色步骤按试剂盒说明进行。MASPIN 抗体(1:400)、HPA 抗体(1:100)、CD34 抗体(1:100)稀释。MASPIN、HPA 阳性为胞浆棕色颗粒沉着,CD34 阳性为血管内皮细胞浆棕色颗粒沉着,由实验室有经验人员采用 Olympus DP70 采图系统捕

获图像,每张切片在 400 倍光镜下,随机选取 5 个视野,采用图像分析仪 Laserpix 进行灰度扫描,测定积分光密度值(IOD),取其平均值。

微血管密度的判定:微血管定义为邻近血管、肿瘤细胞及与其他结缔组织分开的、染成棕色的单个血管内皮细胞或细胞簇,大于 8 个内皮细胞形成的管腔或未染色的管腔不记数。先用 40 倍镜扫视整个切片,选择 4 个微血管高密度区即所谓的“热点”,然后在 400 倍镜下记数,结果以 4 个视野微血管数目的平均数来表示。

1.5 MASPIN 稳定表达细胞株的构建

人卵巢癌细胞株 SKOV3 细胞培养、传代、保种参照司徒振强的《细胞培养》^[4]。用阳离子聚合法介导 DNA 转染,2 周后挑取抗 G418 克隆扩增,分别命名为 SKOV3-MASPIN 和 SKOV3-vector,并进行 RT-PCR 和 Western Blot、ABC 免疫酶染色法鉴定。

1.6 半定量逆转录聚合酶链反应 RT-PCR 分析

用于半定量 RT-PCR 分析的引物序列 Primer Premier 5.0 设计软件设计,同时设计内对照基因 GAPDH 引物,扩增片段大小约 485 bp。RT-PCR 分析采用 TAKARA 公司的 ONE STEP RT-PCR 试剂盒,依据说明书进行。用 Kodak 凝胶成像系统及图像分析软件存储图像并分析结果,以 MASPIN、HPA 与 GAPDH 基因扩增产物电泳带的光密度比值,反映 MASPIN、HPA 表达水平。

1.7 ABC 免疫酶染色法检测 MASPIN、HPA 蛋白的表达

采用 ABC 免疫酶染色法,操作按试剂盒说明书完成。每批实验中均设立阳性和阴性对照,试剂公司提供的阳性切片作阳性对照,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。MASPIN 抗体(1:100)、HPA 抗体(1:100)。

1.8 SKOV3、SKOV3-pcDNA3、SKOV3-MASPIN 细胞采用 Western Blot 方法

用 BIORAD 扫描仪捕获图像,Kodak 图像分析软件分析结果,以 MASPIN 与 β -actin 带的光密度比值,反映 MASPIN 的表达水平。

1.9 统计学处理

数据分析采用 SPSS13.0 软件,分类资料率的比较采用卡方检验,MASPIN、HPA、MVD 与临床各病理指标的比较采用两组独立样本的 *t* 检验(independent-samples T test)。MASPIN、HPA、MVD 之间的相

关性比较采用相关分析。三组及以上资料的比较,首先进行方差齐性检验,方差齐者用多组计量资料的方差分析进行比较,如有意义则采用 q 检验两两比较。采用Kodak软件对RT-PCR条带进行光密度值分析,分别以磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)和肌动蛋白(β -actin)作系统内参。通过计算目的基因的表达进行半定量分析。目的基因的表达指数=目的基因条带的光密度值/相应内参照条带的光密度值。 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MASPIN、HPA在卵巢癌中的表达

2.1.1 MASPIN、HPA、CD34在卵巢癌中的表达

MASPIN蛋白主要为细胞浆表达(Figure 1),在正常卵巢生发上皮细胞和卵巢癌细胞的阳性表达率分别为16.1%(5/31),57.1%(20/35),差异有显著性($P<0.05$)。CD34阳性为血管内皮细胞浆棕色颗粒沉着(Figure 2),微血管密度在正常卵巢组织和卵巢癌中分别为 2.99 ± 1.71 , 17.09 ± 8.97 ,差异有显著性($P<0.05$)。HPA蛋白的阳性表达定位于细胞浆(Figure 3),在正常卵巢生发上皮细胞和卵巢癌细胞的阳性表达率分别为0,85.7%(30/35),差异有显著性($P<0.05$)。

2.1.2 MASPIN、HPA、CD34表达与卵巢癌临床病理特征间关系

MASPIN蛋白表达率在非浆液性卵巢癌中高于

浆液性卵巢癌,在早期卵巢癌中MASPIN表达率高于晚期,在无腹水组中高于有腹水组($P<0.05$)。HPA蛋白表达率在有淋巴结转移组高于无淋巴结转移组,有腹水组高于无腹水组($P<0.05$)。MVD在早期病例中表达明显高于晚期病例,在有淋巴结转移组高于无淋巴结转移组($P<0.05$)(Table 1)。

2.1.3 MASPIN与HPA、MVD相关性

MASPIN与MVD呈负相关($r=-0.655$, $P<0.05$),其余各指标间无明显相关性($P>0.05$)。

2.2 转染克隆的鉴定

2.2.1 ABC免疫酶染色法结果

SKOV3、SKOV3-pcDNA3、SKOV3-MASPIN组的

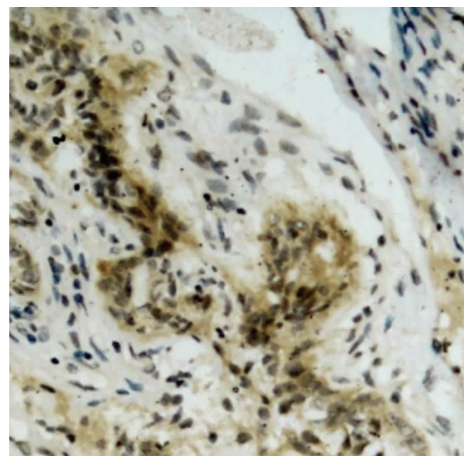


Figure 1 Maspin positive expression in epithelial ovarian cancer ($\times 200$)

Table 1 Relationship of Maspin, VEGF expression and clinicopathological features in epithelial ovarian cancer

Variable	N	MASPIN (IOD)			HPA (IOD)			MVD (IOD)		
		$\bar{x}\pm s$	t	P	$\bar{x}\pm s$	t	P	$\bar{x}\pm s$	t	P
Histology										
Serous	22	1.2677 $\pm$ 0.9919	3.78	0.001	1.9277 $\pm$ 1.5801	0.173	0.864	18.38 $\pm$ 7.51	1.111	0.275
Other	13	2.9165 $\pm$ 1.5980			2.0086 $\pm$ 0.7487			14.91 $\pm$ 11.01		
Stage										
I~II	17	2.5085 $\pm$ 1.5872	2.669	0.012	1.8746 $\pm$ 1.0409	0.357	0.723	13.41 $\pm$ 9.39	2.540	0.016
III~IV	18	1.2866 $\pm$ 1.0888			2.0363 $\pm$ 1.5651			20.57 $\pm$ 7.19		
Grade										
G ₁ ~G ₂	9	2.7468 $\pm$ 1.8612	2.159	0.063	1.8023 $\pm$ 1.0331	0.405	0.688	12.56 $\pm$ 7.55	1.819	0.078
G ₃	26	1.5801 $\pm$ 1.2116			2.0116 $\pm$ 1.4195			18.66 $\pm$ 9.01		
Lymph node status										
Negative	27	2.1187 $\pm$ 1.5761	1.823	0.077	1.5402 $\pm$ 1.1157	4.195	0.001	15.09 $\pm$ 9.14	2.617	0.013
Positive	8	1.0748 $\pm$ 0.5613			3.3670 $\pm$ 0.9451			23.82 $\pm$ 3.66		
Ascites										
No	16	2.7486 $\pm$ 1.5535	3.782	0.001	1.3003 $\pm$ 1.0366	3.008	0.005	13.88 $\pm$ 9.48	2.034	0.055
Yes	19	1.1488 $\pm$ 0.9154			2.5114 $\pm$ 1.2985			19.80 $\pm$ 7.76		

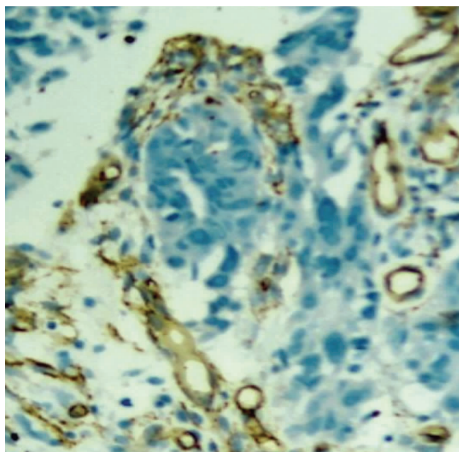


Figure 2 CD34 positive expression in epithelial ovarian cancer($\times 200$)

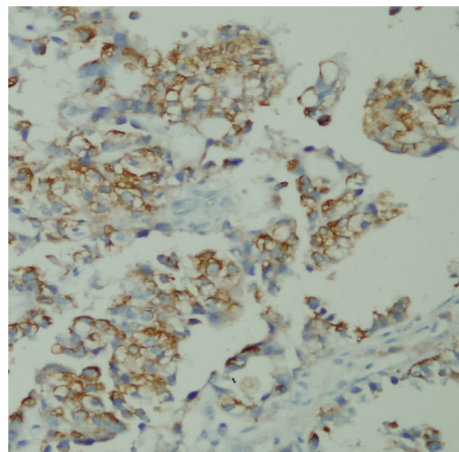


Figure 3 HPA positive expression in epithelial ovarian cancer($\times 200$)

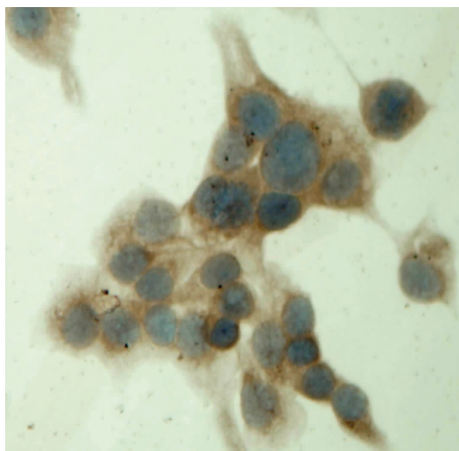
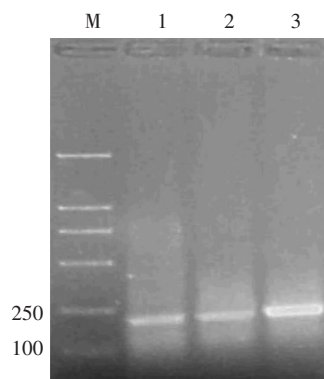


Figure 4 Maspin positive expression in SKOV3-maspin($\times 400$)



M;DL200 DNA maker 1;SKOV3 2;SKOV3/pcDNA3 3;SKOV3/ pcDNA3-MASPIN

Figure 5 Identifying the screening clone by PCR

IOD 值分别为 493.5075 ± 394.3448 , 415.5225 ± 144.8998 和 3629.547 ± 1602.8288 。未转染及空载体两组细胞中 MASPIN 表达无显著性差异 ($P > 0.05$), 转染组与转染前及空载体组相比, MASPIN 表达增强 ($P < 0.05$) (Figure 4)。

2.2.2 RT-PCR 结果

SKOV3、SKOV3-pcDNA3、SKOV3-MASPIN 组的光密度比值分别为 0.6720 ± 0.0131 , 0.6674 ± 0.0128 和 1.0560 ± 0.0052 。转染 MASPIN 组的 MASPIN 表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。而未转染 MASPIN 组的 MASPIN 表达变化无统计学意义 ($P > 0.05$) (Figure 5)。

2.2.3 Western Blot 结果

SKOV3、SKOV3-pcDNA3、SKOV3-MASPIN 组的

光密度比值分别为 0.7823 ± 0.0108 , 0.7653 ± 0.0186 和 1.6549 ± 0.1074 。转染 MASPIN 组的 MASPIN 表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。未转染 MASPIN 的两组 MASPIN 表达无统计学意义 ($P > 0.05$) (Figure 6)。

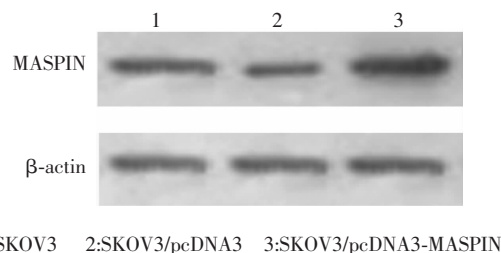


Figure 6 Stable transfection of MASPIN expression in SKOV3 by Western Blot

2.3 MASPIN 过表达对 HPA 表达的影响

2.3.1 MASPIN 过表达对 HPA mRNA 表达的影响

SKOV3、SKOV3-pcDNA3、SKOV3-MASPIN 组 HPA 表达的光密度比值分别为 0.630 ± 0.070 、 0.620 ± 0.070 和 0.543 ± 0.067 。三组 HPA mRNA 无统计学差异 ($P > 0.05$)。

2.3.2 MASPIN 过表达对 HPA 蛋白表达的影响

采用 ABC 免疫酶染色法检测转染 MASPIN 前后 HPA 蛋白表达的变化。SKOV3、SKOV3-pcDNA3、SKOV3-MASPIN 组中 HPA 表达的 IOD 值分别为 411.3525 ± 253.4453 、 367.1675 ± 87.9781 、 411.4700 ± 261.7932 。三组细胞中 HPA 表达无显著性差异 ($P > 0.05$) (Figure 7)。

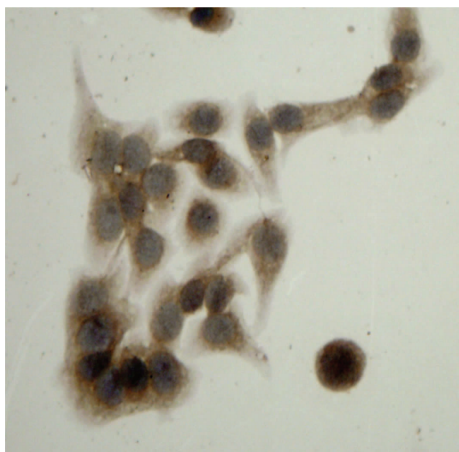


Figure7 HPA positive expression in SKOV3-maspin($\times 400$)

3 讨论

MASPIN 最早是从人正常乳腺上皮细胞分离出来的,Zou 等^[5]发现 MASPIN 的表达随肿瘤的发展逐渐消失,恢复肿瘤细胞中 MASPIN 的表达,能够抑制肿瘤细胞生长、运动、转移能力。然而,在对 MASPIN 的认识不断深入过程中,人们逐渐发现 MASPIN 表达并非在所有肿瘤组织中都呈降低趋势,发挥的作用也不尽相同。

Solomon 等^[6]研究发现在 118 例进展期卵巢癌患者中,81.4% MASPIN 表达阳性,21.2%在细胞核中表达预示着较好的预后,并发现 MASPIN 与 VEGF 及环氧合酶-2(COX-2)呈负相关,认为 MASPIN 在卵

巢癌中高表达,其亚细胞定位在肿瘤血管生成和肿瘤进展中发挥着重要作用。Bolat 等^[7]发现 MASPIN、VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D 在卵巢癌中高表达, MASPIN 可能促进了卵巢癌中血管生成及淋巴结转移等恶性过程。

本研究结果发现 MASPIN 蛋白主要为细胞浆表达, MASPIN 蛋白在卵巢癌组织中高表达(57.1%),在正常卵巢组织中为阴性或弱阳性表达(16.1%),差异有显著性($P < 0.01$)。进一步分析 MASPIN 蛋白表达与卵巢癌临床病理特征的关系,发现 MASPIN 蛋白在非浆液性卵巢癌、早期、无腹水组中表达高于对照组($P < 0.05$)。临床病理分期、病理类型、有无腹水对于上皮性卵巢癌的预后极为重要,非浆液性卵巢癌、早期、无腹水组患者均有较长的生存率^[8,9]。CD34 作为评价肿瘤血管生成活性的指标,已成为一个预测肿瘤预后的有力指标。本研究结果发现在卵巢上皮性肿瘤中 CD34 在卵巢癌组织中明显高于正常卵巢组织,且与临床病理分期、淋巴结转移呈正相关,且 MASPIN 表达与 MVD 呈负相关($P < 0.05$)。从以上结果推测, MASPIN 在卵巢癌的发展过程中可能发挥着肿瘤抑制基因的作用,并可能通过抑制新生血管生成发挥肿瘤抑制活性。

研究显示 MASPIN 能够调节血管生成, MASPIN 的肿瘤抑制活性可能主要依赖其对新生血管生成的抑制能力,其作用机制可能是:①抑制内皮细胞增殖、迁移、管道形成,诱导内皮细胞凋亡;②作用于肿瘤细胞,抑制血管生成相关因子及其受体的表达^[10,11]。

为了探讨 MASPIN 在卵巢癌中抑制血管生成的可能机制,本研究进一步分析 MASPIN 与血管生成相关因子 HPA 的相关性。HPA 可直接作用于内皮细胞以生芽方式促进血管生成,也能通过血管内皮细胞释放 HS-bFGF 复合物和产生 HS 降解片段以促进 bFGF 活性来间接诱发血管生成。同时,HPA 与 VEGF 促血管形成有协同作用,共同诱导肿瘤新生血管形成。因此,HPA 也被看作是一种重要的血管生成因子^[12]。本研究结果显示 HPA 在正常卵巢上皮细胞和卵巢癌细胞的阳性表达率分别为 0 和 85.7% (30/35),HPA 表达与腹水形成和淋巴结转移相关,与组织学分级、病理类型和临床分期无相关性。因此,HPA 对卵巢癌的侵袭和转移可能有着重要的影响。但 HPA 蛋白表达与 MASPIN 无明显相关性($P > 0.05$)。

体外实验结果也显示 MASPIN 真核表达质粒体外转染卵巢癌 SKOV3 细胞后, 卵巢癌细胞中 HPA 蛋白和 HPA mRNA 表达无显著性变化。

MASPIN 与 HPA 间无相关性, 可能是由于: ①在不同肿瘤中, MASPIN 对血管生成调节的靶点、信号通路不同有关。例如, 在前列腺肿瘤中 MASPIN 可以通过阻断细胞外周的 uPA/uPAR 系统抑制血管生成, 在乳腺癌中 MASPIN 可能是通过包括 Bcl-2 家族基因和线粒体在内的信号传导途径诱导内皮细胞的凋亡来发挥抑制血管生成作用的; ②与 MASPIN 蛋白发生相互作用的相关蛋白在不同类型细胞中有特定的表达^[10,13]。

本研究还发现 HPA 与 MVD 之间无相关性, 这可能是因为 HPA 在卵巢癌中通过调节血管生成以外的途径来促进卵巢癌的浸润和转移。例如, 肝素酶通过降解 HSPG 与蛋白水解酶协同作用, 破坏、改变细胞外基质和基底膜结构, 促进肿瘤细胞侵袭和转移^[14]。

综上所述, MASPIN 在卵巢癌的发展过程中可能仍发挥着肿瘤抑制基因的作用, 并具有抑制血管生成作用。HPA 表达与卵巢癌的恶性生物学行为密切相关。MASPIN 在卵巢癌中抑制血管生成的确切机制还有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] Hojo T, Akiyama Y, Nagasaki K, et al. Association of MASPIN expression with the malignancy grade and tumor vascularization in breast cancer tissues[J]. *Cancer Lett*, 2001, 171(1): 103-110.
- [2] Wu S, Yu L, Cheng Z, et al. Expression of maspin in non-small cell lung cancer and its relationship to vasculogenic mimicry[J]. *Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2012, 32(3): 346-352.
- [3] Yang Y, Shi H, Li X, et al. Effects of shRNA targeting maspin on invasion of gastric carcinoma SGC7901 cell line[J]. *Oncol Rep*, 2011, 25(1): 259-265.
- [4] Situ ZQ, Wu JZ. Cell culture[M]. Xi'an: Xi'an World Publishing Cooperation, 2004: 78-88. [司徒振强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司西安分公司, 2004: 78-88.]
- [5] Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJ, et al. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells[J]. *Science*, 1994, 263(5146): 526-529.
- [6] Solomon LA, Munkarah AR, Schimp VL, et al. Maspin expression and localization impact on angiogenesis and prognosis in ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2006, 101(3): 385-389.
- [7] Bolat F, Gumurdulu D, Erkanli S, et al. Maspin overexpression correlates with increased expression of vascular endothelial growth factors A, C and D in human ovarian carcinoma[J]. *Pathol Res Pract*, 2008, 204(6): 379-387.
- [8] Karamurzin Y, Leitao MM Jr, Soslow RA. Clinicopathologic analysis of low-stage sporadic ovarian carcinomas: a reappraisal[J]. *Am J Surg Pathol*, 2013, 37(3): 356-367.
- [9] Liang B, Guo Z, Li Y, et al. Elevated VEGF concentrations in ascites and serum predict adverse prognosis in ovarian cancer[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2013, Mar 11. [Epub ahead of print].
- [10] Li Z, Shi HY, Zhang M. Targeted expression of maspin in tumor vasculatures induces endothelial cell apoptosis[J]. *Oncogene*, 2005, 24(12): 2008-2019.
- [11] Cher ML, Biliran HR Jr, Bhagat S, et al. Maspin expression inhibits osteolysis, tumor growth, and angiogenesis in a model of prostate cancer bone metastasis[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, 100(13): 7847-7852.
- [12] Mikami S, Ohashi K, Katsube K, et al. Coexpression of heparanase, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in human esophageal carcinomas[J]. *Pathol Int*, 2004, 54(8): 556-563.
- [13] Blacque OE, Worrall DM. Evidence for a direct interaction between the tumor suppressor serpin, maspin, and types I and III collagen[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(13): 10783-10788.
- [14] Barash U, Cohen-Kaplan V, Doweik I, et al. Proteoglycans in health and disease: new concepts for heparanase function in tumor progression and metastasis[J]. *FEBS J*, 2010, 277(19): 3890-3903.