Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2014; 17(89): 27-34

Assay of Relation between the Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Breast Cancer Tumor Formation

Sadeghi M[1], Hojati Z[1]*, Ghaedi k[1]

1- Depatment of biology, university of Istahan, Isfahan , Iran

Received: 23 Aug 2014, Accepted: 27 Aug 2014

Abstract

Background: vascular endothelial growth factor (vegf) is one of the most important regulator of angiogenesis, there are some reports about the relation of VEGF over expression and progression of tumor in several cancers. The aim of this study is assay of four VEGF isoforms expression in breast cancer tumor samples.

Materials and Methods: 25 breast cancer tumor samples and 25 health samples were used in this study, mRNA was extracted from each sample and then cDNA was made. The expression of four isoforms: VEGF121, VEGF165, VEGF183 and VEGF189 were measured by real time reverse transcription PCR (RT-PCR) and gel electrophoresis.

Results: among the four isoforms, VEGF165 and VEGF 121 had maximum and VEGF 183 and VEGF 189 minimum expression level in all samples. The total expression level of VEGF had a significant increase in tumor samples in comparison with the control samples (4/6, $p<0.01$).

Conclusion: there is a significant relation between the VEGF over expression and breast cancer tumor formation, which it can be used as a prognosis marker of breast cancer in future.

Keywords: Breast Cancer, Gene Expression Ppattern Analysis, Vascular Endothelial Growth factor

*Corresponding Author:
Address: Depatment of biology, university of Istahan, Isfahan , Iran
Email:kamranghaedi@yahoo.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۱۷، شماره ۸ (شماره پیاپی۸۹)، آبان ۱۳۹۳، ۳۴-۲۷

بررسی ارتباط بین میزان بیان فاکتور رشد اندوتلیال عروقی و ایجاد تومور سرطان پستان

مرتضی صادقی[۱]، زهره حجتی[۲*]، کامران قاعدی[۲]

۱- دانشجوی دکتری ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۱ تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۵

چکیده

زمینه و هدف: فاکتور رشد اندوتلیال عروقی یکی از مهم‌ترین تنظیم کننده‌های رگزائی است که ارتباط بین افزایش بیان این فاکتور رشد و پیشروی تومور در چندین سرطان گزارش شده است. هدف این مطالعه بررسی میزان بیان چهار ایزوفرم فاکتور رشد اندوتلیال عروقی در تومور سرطان پستان است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۲۵ نمونه تومور سرطان پستان و ۲۵ نمونه بافت سالم مورد استفاده قرار گرفت، از هر نمونه mRNA استخراج شد و سپس cDNA آن ساخته شد. میزان بیان چهار ایزوفرم: VEGF ۱۲۱, VEGF ۱۶۵, VEGF ۱۸۳ و VEGF ۱۸۹ توسط qRT-PCR و ژل الکتروفورز اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: از بین ۴ ایزوفرم VEGF۱۶۵ و VEGF ۱۲۱ بیشترین و VEGF ۱۸۳ و VEGF ۱۸۹ کم‌ترین بیان را در کل نمونه‌ها داشتند. میزان بیان کلی VEGF در نمونه‌های توموری نسبت به نمونه‌های کنترل افزایش معنی‌داری داشت (۴/۶ برابر، $p<۰/۰۱$).

نتیجه‌گیری: ارتباط بسیار معنی‌داری بین افزایش بیان فاکتور رشد اندوتلیال عروقی و ایجاد تومور سرطان پستان وجود دارد که احتمالا می‌توان در آینده از آن به عنوان مارکر تشخیص زود هنگام سرطان پستان استفاده کرد.

واژگان کلیدی: سرطان پستان، آنالیز الگوی بیان ژن، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی

***نویسنده مسئول:** اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم-۲، گروه زیست شناسی، بخش ژنتیک
Email: zh.hojati@sci.ui.ac.ir

مقدمه

واژه رگ‌زائی (Angiogenesis) برای اولین بار توسط فلکمن به کار برده شد، رگ‌زائی به فرایندهای پیچیده درگیر در شکل‌گیری رگ خونی جدید از شبکه مویرگی قبلی اطلاق می‌گردد(۱). در واقع مراحل رشد، تهاجم و متاستاز در بسیاری از سرطان‌ها وابسته به فرایند رگ‌زائی است و توده‌های توموری حتی برای ۱ میلی‌متر مربع رشد نیازمند شکل‌گیری رگ‌های جدید هستند(۲، ۳). مکانیسم‌های مولکولی درگیر در سوئیچ آنژیوژنیکی تومورها هنوز به خوبی شناسائی نشده است ولی به نظر می‌رسد تغییرات تعادل بین فاکتورهای تحریک کننده رگ‌زائی و فاکتورهای ضد رگ‌زائی در طول زمان منجر به تغییر فعالیت رگ‌زائی تومورها می‌شود(۴، ۵). تاکنون چندین فاکتور تحریک کننده و مهارکننده رگ‌زائی شناسائی و تعیین توالی شده است(۶). نتایج مطالعات تجربی نشان می‌دهد که در سرطان پستان پیشرفت و متاستاز تومورها وابسته به فعال شدن فرایند رگ‌زائی است(۷، ۸). در مرحل کلینیکی وایدنر و همکاران برای اولین بار در مطالعه‌ای بر روی ۴۷ بیمار ارتباط بسیار معنی‌داری بین درجه داخل توموری تراکم مویرگ‌ها (Intratumoral microvessel density-IMD) و مراحل مختلف سرطان پستان را گزارش کردند(۹). بعد از این گزارش مطالعات بعدی بسیاری بر روی این موضوع صورت گرفت و تا کنون ۴۳ مطالعه با بررسی ۶۸۰۰ نمونه تومور به اهمیت تشخیصی IMD در سرطان پستان اشاره کرده‌اند(۱۰). با توجه به اهمیت این موضوع روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری بیان و غلظت فاکتورهای درگیر در رگزائی ابداع شدند که از میان این فاکتورها، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (Vascular Endothelial Growth Faetor –VEGF) به عنوان فاکتورهای میتوژن اصلی درگیر در رگ‌زائی مورد توجه خاصی قرار گرفتند(۱۱). در واقع در شرایط موجود زنده VEGF ها باعث ایجاد رگ‌زائی و افزایش نفوذپذیری رگ‌ها می‌گردد که برای رشد تومورها عواملی حیاتی هستند(۱۲). از طریق اسپلایسینگ (حذف اینترون‌ها و باقی ماندن اگزون‌ها در mRNA بالغ) متفاوت ژن VEGF، ۸ ایزوفرم متفاوت ایجاد می‌گردد که از ۱۲۱ تا ۲۰۶ اسید آمینه طول دارند و بر همین اساس نام‌گذاری می‌شوند. تمامی واریانت‌های این ژن دارای اگزون‌های ۱تا ۴ و اگزون ۸ هستند و ۳ اگزون دیگر در ایزوفرم‌های مختلف متفاوت هستند. به طوری که اگزون‌های ۱تا ۴ و اگزون ۸ ایزوفرم ۱۱۱ را می‌سازد، اضافه شدن اگزون ۵ ایزوفرم ۱۲۱ را می‌سازد، اضافه شدن اگزون ۷ ایزوفرم ۱۶۵ را می‌سازد و اضافه شدن اگزون ۶ و ۷ منجر به تولید ایزوفرم ۱۸۹ می‌گردد در حالی که حذف شدن ۱۸ جفت باز انتهائی اگزون 6a ایزوفرم ۱۸۳ را می‌سازد(۱۳-۱۶).

یکی از ویژگی‌های مهم بیولوژیکی که ایزوفرم‌های VEGF را از یکدیگر متمایز می‌کند توانائی اتصال به هپارین و هپارات است بدین صورت که VEGF111 و VEGF121 به هپارین متصل نمی‌شوند و جزء پروتئین‌های محلول هستند، VEGF165 هم یک پروتئین ترشحی است ولی در خارج دیواره سلولی به ماتریکس خارج سلولی متصل می‌شود، در مقابل ایزوفرم VEGF189به علت تمایل بالا به اتصال به هپارین، کاملا به ماتریکس خارج سلولی متصل می‌شود(۱۹-۱۷). با توجه به ارتباط مستقیم بین بیان ایزوفرم‌های VEGF و تشکیل و پیشرفت تومورها، VEGF ها مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته‌اند و تحقیقات وسیعی بر روی آنها در سرطان‌های مختلف در حال انجام است. در این مطالعه ما تصمیم به بررسی میزان بیان چهار ایزوفرم اصلی VEGF و ارتباط آن با تشکیل تومور در بیماران سرطان پستان پرداختیم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مورد نگاری از ۵۰ نمونه بافت پستان شامل ۲۵ نمونه تومور سرطان پستان و ۲۵ نمونه بافت کنترل سالم که در سال ۱۳۹۱ از بیمارستان امام خمینی تهران تهیه شده بود استفاده شد. تمامی نمونه‌ها از شهر تهران و دارای جنسیت زن با میانگین سنی ۴۷/۳ سال بودند. نمونه‌های بیمار توسط متخصص انکولوژی مشاهده و

وضعیت سرطان آنها مورد تائید قرار گرفت، شرط ورود به گروه هدف تشخیص سرطانی بودن و شرط ورود به گروه کنترل فاقد سرطان بودن نمونه‌ها بود. از کل نمونه‌های گروه هدف ۱۷ نمونه تومور در مرحله اولیه سرطان و فاقد متاستاز و ۸ نمونه دارای متاستاز به غدد لنفاوی زیر بغل و استخوان‌های پهن بودند (جدول ۱). نمونه‌ها تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جدول ۱. الگوی بیانی ایزوفرم های vegf و خصوصیات کلینیکی نمونه های تومور سرطان پستان

	تعداد	درصد	Vegf ۱۲۱		Vegf۱۶۵		Vegf۱۸۳		Vegf۱۸۹	
			+		+	−	+	−	+	−
بیماران	۲۵	۱۰۰	۲۵	۰	۲۵	۰	۹	۱۶	۷	۱۸
اندازه تومور										
T0	۲	۸	۲	۰	۲	۰	۱	۱	۱	۱
T1	۱	۴	۱	۰	۱	۰	۱	۰	۰	۱
T2	۱۲	۴۸	۱۲	۰	۱۲	۰	۴	۸	۴	۸
T3	۹	۳۶	۹	۰	۹	۰	۲	۷	۲	۷
T4	۱	۴	۱	۰	۱	۰	۱	۰	۰	۱
متاستاز لفاوی										
مثبت	۸	۳۲	۱۰	۰	۸	۰	۵	۳	۳	۵
منفی	۱۷	۶۸	۱۵	۶	۱۷	۰	۴	۱۳	۴	۱۳

استخراج RNA و ساخت cDNA

برای بررسی بیان ژن VEGF ابتدا با استفاده از کیت استخراج RNA (کیاژن) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده از تمامی نمونه‌ها RNA استخراج شد، غلظت و خلوص RNA استخراج شده از هر نمونه با استفاده از جذب نوری اسپکتوفوتومتر مشخص شد به طوری که میزان جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر بین ۱/۸ تا ۲/۱ نشان‌گر کیفیت مناسب RNA استخراج شده برای انجام RT-PCR است. آنالیز چهار ایزوفرم ژن VEGF توسط RT- PCR مورد بررسی قرار گرفت، برای این منظور ۱ میکروگرم از RNA هر نمونه با استفاده از کیت رونویسی معکوس(فرمنتاز) با استفاده از آنزیم رونویس ساز معکوس و پرایمرهای الیگو dT و هگزا نوکلئوتید طبق دستورالعمل شرکت سازنده به cDNA تبدیل شد و در مرحله بعد ۳۰ نانوگرم از cDNA برای انجام RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش RT- PCR

با استفاده از نرم افزار Beacon Designer نسخه ۷/۵ دو جفت پرایمر رفت و برگشت برای بررسی ژن هدف طراحی شد، پرایمرهای ژن VEGF به گونه‌ای طراحی شد که پرایمر رفت بر روی اگزون ۳ و پرایمر برگشت بر روی اگزون ۸ قرار گیرد، این جفت پرایمر قابلیت تشخیص هر چهار ایزومر ۱۸۹، ۱۸۳، ۱۶۵ و ۱۲۱ را دارا بود.

پرایمرهای ژن VEGF:

پرایمر رفت: 5'-C C T G G T G G A C A T C T T C C A G G A G T A-3'

پرایمر برگشت: 5'-C T C A C C G C C T C G G C T T G T C A C A-3'

پرایمرهای ژن کنترل GAPDH:

پرایمر رفت: 5'-G A A G G T G A A G G T C G G A G T C-3'

پرایمر برگشت: 5'-A T G A G T C C T T C C A C G A T A C-3'

cDNA هر نمونه به عنوان الگو برای انجام RT-PCRمورد استفاده قرار گرفت. واکنش در حجم کلی ۲۵ میکرو لیتر انجام شد.

واکنش در ۳۰ سیکل متوالی در دستگاه Applied Biosystems StepOne (کشور آمریکا) با برنامه زمانی ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۵۸ درجه و نهایتا ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. محصولات نهائی بر روی ژل اگارز ۱ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم برماید آنالیز شد.

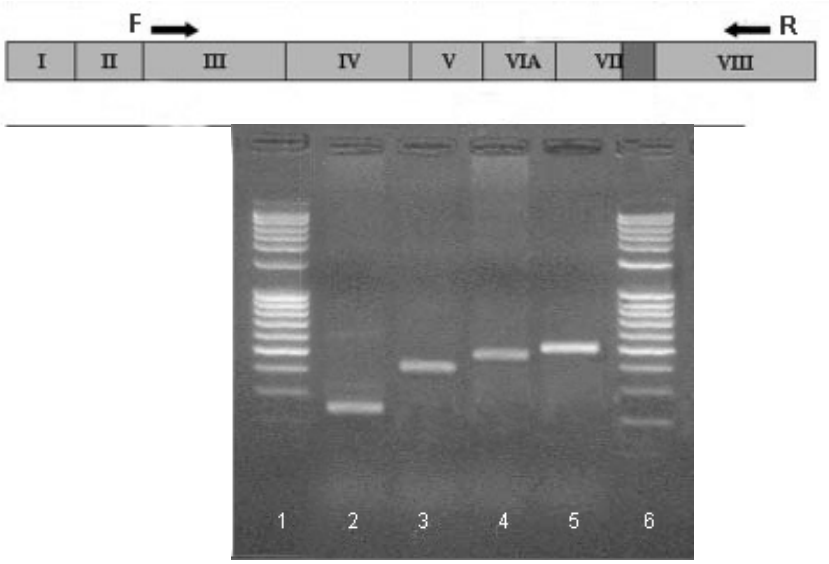
محاسبات آماری

برای تمامی محاسبات نرم افزار SPSS نسخه ۱۱ مورد استفاده قرار گرفت. سطح معنی‌داری نیز کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. بیان کمی ژن مورد نظر با استفاده از روش مقایسه‌ای ΔΔCT محاسبه شد(۲۰). یافته‌های ژن VEGF با یافته‌های ژن داخلی کنترل GAPDH مقایسه شد، در این روش میزان بیان کلی ژن مورد نظر از طریق فرمول زیر محاسبه می‌گردد:

$$2^{(-\Delta\Delta Ct)} = 2^{(-[Ct(VEGF)-Ct(GAPDH)Control]-Ct(VEGF)-(GAPDH)Target)}$$

یافته‌ها

در این مطالعه بیان ۴ ایزوفرم VEGF در ۲۵ نمونه تومور سرطان پستان و ۲۵ نمونه بافت سالم مورد بررسی قرار گرفت، با پرایمرهای طراحی شده روی اگزون ۳ و اگزون ۸ امکان بررسی بیان هر چهار ایزوفرم ۱۲۱، ۱۶۵، ۱۸۳ و ۱۸۹ توسط RT-PCR فراهم شد، محصول RT-PCR هر نمونه بر روی ژل اگارز ۱ درصد با اتیدیوم برماید مشاهده شد (شکل ۱)، در بررسی کلی، ایزوفرم‌های VEGF۱۲۱ و VEGF۱۶۵ بیشترین بیان را در کل نمونه‌ها داشتند. ایزوفرم VEGF۱۸۳ فقط در ۹ (۳۶ درصد) نمونه از ۲۵ نمونه سرطانی و ۱۵ نمونه (۶۰ درصد) از ۲۵ نمونه سالم دارای بیان بود و ایزوفرم VEGF۱۸۹ کمترین بیان را داشت و در ۷ (۲۸ درصد) نمونه از ۲۵ نمونه بافت بدخیم و ۱۴(۵۶ درصد) نمونه از ۲۵ نمونه کنترل مشاهده شد. میزان کلی بیان mRNA ژن VEGF در نمونه‌های سرطانی ۴/۶ برابر بیشتر از نمونه‌های سالم بود($p<0/01$).



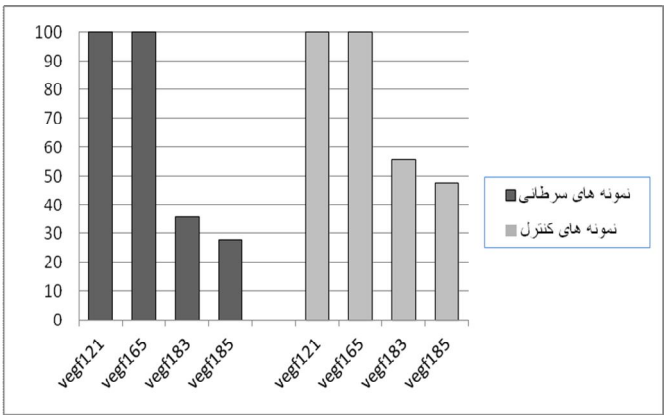
شکل ۱. آنالیز ایزوفرم های VEGF از طریق Real time PCR. (A) موقعیت پرایمرهای طراحی شده برای بررسی بیان ۴ ایزوفرم و ۸ اگزون ژن VEGF. (B) ژل الکتروفورز محصولات Real time PCR بر روی ژل اگارز ۱ درصد. ستون ۱ مارکر DNA 100bp، ستون ۲ ایزوفرم ۱۲۱، ستون ۳ ایزوفرم ۱۶۵، ستون ۴ ایزوفرم ۱۸۳، ستون ۵ ایزوفرم ۱۸۹، ستون ۶ مارکر DNA 100bp.

الگوی بیانی ایزوفرم‌های VEGF در نمونه‌های سرطانی

در بررسی ۲۵ نمونه بافت سرطانی، در ۱۶(۶۴ درصد) نمونه از ۲۵ نمونه فقط دو ایزوفرم VEGF۱۲۱ و VEGF۱۶۵ دارای بیان بودند، در ۷(۲۸ درصد) نمونه تمامی ۴ ایزوفرم دارای بیان بودند و در ۲(۸ درصد) نمونه باقی مانده ۳ ایزوفرم VEGF۱۲۱، VEGF۱۶۵ و VEGF۱۸۳ دارای بیان بودند(نمودار ۱).

الگوی بیانی ایزوفرم‌های VEGF در نمونه‌های سالم

در کل در بررسی نمونه‌های بافت سالم در ۱۲(۴۸ درصد) نمونه هر چهار ایزوفرم دارای بیان بودند و در ۱۱(۴۴ درصد) نمونه فقط ۲ ایزوفرم ترشحی VEGF۱۲۱ و VEGF۱۶۵ مشاهده شد، در ۲(۸ درصد) نمونه باقی مانده ۳ ایزوفرم VEGF۱۲۱، VEGF۱۶۵ و VEGF۱۸۳ به طور همزمان دارای بیان بودند (نمودار ۱).



نمودار ۱. میزان درصد بیان ۴ ایزوفرم مورد بررسی در دو گروه نمونه های سرطانی و نمونه های کنترل

بحث

در این مطالعه در بررسی ارتباط بین بیان ایزوفرم‌ها و ایجاد سرطان پستان دو ایزوفرم VEGF۱۲۱ و VEGF۱۶۵ بیشترین بیان را در کل نمونه‌ها داشتند و ارتباط بسیار معنی‌داری بین میزان کلی بیان mRNA ژن VEGF و ایجاد سرطان پستان مشاهده شد($p<0/01$). اهمیت VEGF در رگ‌زائی بافت های سالم و سرطانی به طور وسیعی در مطالعات دهه قبل گزارش شده است(۲۱). هم‌چنین VEGF به عنوان یک فاکتور رشد عامل رگ‌زائی در سرطان پستان معرفی شده است(۲۲). در گزارش‌های جدیدتر VEGF به عنوان یک هدف عمده در درمان سرطان تومورهای جامد معرفی شده است و چندین داروی هدف گیرنده VEGF در مراحل کلینیکی هستند(۲۳).

در مطالعات بررسی ایزوفرم‌های VEGF لیندرهلم و همکاران در مطالعه‌ای بر روی ۵۲۵ ارتباط بسیار معنی‌داری بین افزایش میزان بیان ایزوفرم VEGF165 و ایجاد و پیشروی تومور پستان را گزراش کردند(۲۴). در مطالعه‌ای دیگر کاسپاراینی و همکاران با مطالعه ۱۶۴ بیمار سرطان پستان ارتباط معنی‌دار بین افزایش بیان VEGF و به خصوص دو ایزوفرم ۱۲۱ و ۱۶۵ و ایجاد سرطان پستان را گزارش کردند که یافته‌های این مطالعات بیان‌گر اهمیت و نقش دو ایزوفرم ۱۲۱ و ۱۶۵ در ایجاد و پیشروی تومور پستان است(۲۵).

مطالعات نشان می‌دهد در بیماران سرطان پستانی که هورمون تراپی در آنها بی‌نتیجه است یا در آنهائی که عود مجدد بیماری مشاهده می‌شود میزان بیان پروتئین VEGF افزایش یافته که پیشنهاد شده در این افراد VEGF نه تنها در تشکیل رگ‌های خونی جدید ایفای نقش می‌کند بلکه از طریق مکانیسم‌هائی که هنوز شناخته نشده است مستقیما باعث تقسیم و ماندگاری سلول‌های توموری می‌شود، جالب اینجاست که در این مطالعات مشاهده شده است که VEGF در قبال ترشح استروژن یا پروژسترون در

بیماران سرطان پستان افزایش بیان پیدا می‌کند(۲۶)، از آنجائی که دو ایزوفرم VEGF121 و VEGF165 از بین دو گیرنده کلی VEGFR1&2 با تمایل بالاتری به گیرنده VEGFR2 اتصال پیدا می‌کنند وVEGF با تاثیر بر روی گیرنده‌های VEGFR در سلول‌های سرطانی باعث تحریک تقسیم این سلول‌ها می‌شود(۲۷)، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ارتباط بین افزایش بیان دو ایزوفرم VEGF121 و VEGF165 و تشکیل تومور پستان مشاهده شده در مطالعه حاضر می‌تواند ناشی از همین ارتباط باشد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی طبق یافته‌های ما ارتباط معنی‌داری بین افزایش میزان بیان VEGF و ایجاد سرطان پستان مشاهده شد. از بین ایزوفرم‌های VEGF دو ایزوفرم ۱۶۵ و ۱۲۱ بیشترین بیان را در نمونه‌های سرطانی داشتند که این یافته بیان‌گر اهمیت تشخیصی بیشتر دو ایزوفرم ۱۲۱ و ۱۶۵ در سرطان می‌باشد. احتمالا در آینده بتوان از این ایزوفرم‌ها به عنوان مارکرهای تشخیص زود هنگام سرطان پستان استفاده کرد، با توجه به اطلاعات ما این مطالعه برای اولین بار در ایران انجام می‌شود و انجام مطالعات با تعداد نمونه‌های بیشتر و بررسی میزان بیان تک تک ایزوفرم‌ها در مرحل مختلف سرطان برای معرفی ایزوفرم‌های VEGF به عنوان تومور مارکر پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از پژوهشگاه ژنتیک دانشگاه بقیه ا.. و گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان به خاطر فراهم نمودن امکانات و تجهیزات این مطالعه و از آقای روح الله نبی پور به خاطر در اختیار گذاشتن نمونه‌ها صمیمانه تشکر می‌شود.

منابع

1. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl j Med. 1971;285:1182-6.
2. Folkman J. Angiogenesis. Annu Rev Med. 2006;57:1-18.
3. Ruan K, Song G, Ouyang G. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. Journal of cellular biochemistry. 2009;107(6):1053-62.
4. Semenza G. HIF-1 inhibitors for cancer therapy: from gene expression to drug discovery. Current pharmaceutical design. 2009;15(33):3839-43.
5. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. Science. 1994;265(5178):1582-4.
6. Polonsky K, Sturis J, Bell G. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Non-insulin-dependent diabetes mellitus-a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. The New England journal of medicine. 1996; 334(12): 777-83.
7. Brem SS, Gullino PM, Medina D. Angiogenesis: a marker for neoplastic transformation of mammary papillary hyperplasia. Science. 1977; 195(4281):880-2.
8. Zajchowski DA, Band V, Trask DK, Kling D, Connolly JL, Sager R. Suppression of tumor-forming ability and related traits in MCF-7 human breast cancer cells by fusion with immortal mammary epithelial cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1990; 87(6):2314-8.
9. Zhang H-T, Craft P, Scott PA, Ziche M, Weich HA, Harris AL, et al. Enhancement of Tumor Growth and Vascular Density by Transfection of Vascular Endothelial Cell Growth Factor Into MCF–7 Human Breast Carcinoma Cells. Journal of the National Cancer Institute. 1995;87(3):213-9.
10. Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. Journal of the National Cancer Institute. 1992;84(24):1875-87.
11. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. Kidney international. 1999;56(3):794-814.
12. Kranenburg O, Gebbink MF, Voest EE. Stimulation of angiogenesis by Ras proteins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer. 2004;1654(1):23-37.

13. Tee M, JaffeA R. A precursor form of vascular endothelial growth factor arises by initiation from an upstream in-frame CUG codon. Biochem J. 2001;359:219-26.
14. Ladomery MR, Harper SJ, Bates DO. Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm. Cancer letters. 2007; 249(2):133-42.
15. Harper SJ, Bates DO. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? Nature Reviews Cancer. 2008;8(11):880-7.
16. Kawamura H, Li X, Harper SJ, Bates DO, Claesson-Welsh L. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165b is a weak in vitro agonist for VEGF receptor-2 due to lack of coreceptor binding and deficient regulation of kinase activity. Cancer research. 2008;68(12):4683-92.
17. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. Journal of cell science. 2001;114(5):853-65.
18. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. Nature medicine. 2003;9(6):669-76.
19. Rennel E, Varey A, Churchill A, Wheatley E, Stewart L, Mather S, et al. VEGF121b, a new member of the VEGFxxxb family of VEGF-A splice isoforms, inhibits neovascularisation and tumour growth in vivo. British journal of cancer. 2009;101(7):1183-93.
20. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2< sup>− ΔΔCT</sup> Method. Methods. 2001; 25(4): 402-8.
21. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. Endocrine reviews. 2004; 25(4):581-611.
22. Liang Y, Brandt SL, Hyder SM. Proliferation of endothelial and tumor epithelial cells by progestin-induced VEGF from human breast cancer cells: paracrine and autocrine effects. Proceedings of the American Association for Cancer Research. 2005; 2005(1): 300-641.
23. Jain RK. Lessons from multidisciplinary translational trials on anti-angiogenic therapy of cancer. Nature Reviews Cancer. 2008;8(4):309-16.
24. Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R. Vascular endothelial growth factor is of high prognostic value in node-negative breast carcinoma. Journal of Clinical Oncology. 1998;16(9):3121-8.
25. Gasparini G, Toi M, Miceli R, Vermeulen P, Dittadi R, Biganzoli E, et al. Clinical relevance of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase in patients with node-positive breast cancer treated with either adjuvant chemotherapy or hormone therapy. The cancer journal from Scientific American. 1998; 5(2):101-11.
26. Hyder S, Stancel G. Regulation of VEGF in the reproductive tract by sex-steroid hormones. Histology and histopathology. 2000;15(1):325-34.
27. Liang Y, Brekken RA, Hyder SM. Vascular endothelial growth factor induces proliferation of breast cancer cells and inhibits the anti-proliferative activity of anti-hormones. Endocrine-related cancer. 2006;13(3):905-19.