

## • 基础研究 •

## Tie1-shRNA 对高糖培养的大鼠内皮细胞 Tie1 的表达的影响

福建中医药大学附属人民医院 (福州 350004) 郑永征 杨田野<sup>1</sup> 刘光辉<sup>2</sup> 孟 春<sup>1</sup>

**【摘要】目的** 探讨酪氨酸激酶受体 1 短发夹 RNA (Tie1-shRNA) 对高糖培养的大鼠内皮细胞 (rECs) Tie1 的表达的影响。**方法** 将 rECs 分为对照组、高糖组、高糖+慢病毒组和高糖+Tie1-shRNA 组 4 组。构建 Tie1-shRNA 慢病毒载体, 作用于高糖培养的 rECs, 干扰酪氨酸激酶受体 1 (Tie1) mRNA 的表达; 采用 MTT 法检测细胞增殖情况, 细胞划痕实验检测细胞迁移情况, Western blot 检测 rECs 中 Tie1、血管内皮生长因子-A (VEGF-A)、基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 和基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 的蛋白表达。**结果** 细胞增殖活性 4 组间差异有统计学意义 ( $F=48.937, P<0.01$ ), 其中高糖组细胞增殖活性明显高于对照组 ( $P<0.01$ ), 高糖+Tie1-shRNA 组细胞增殖活性较高糖组和高糖+慢病毒组均明显减弱 (均  $P<0.01$ )。细胞迁移率 4 组间差异有统计学意义 ( $F=26.728, P<0.01$ ), 其中高糖组细胞迁移率比对照组明显增加 ( $P<0.01$ ), 高糖+Tie1-shRNA 组细胞迁移率较高糖组和高糖+慢病毒组均明显减弱 (均  $P<0.05$ )。4 组 rECs 的 Tie1、VEGF-A、MMP-2、MMP-9 蛋白的表达差异有统计学意义 ( $F_{\text{Tie1}}=85.902, P<0.01$ ;  $F_{\text{VEGF-A}}=48.937, P<0.01$ ;  $F_{\text{MMP-2}}=169.857, P<0.01$ ;  $F_{\text{MMP-9}}=130.018, P<0.01$ ), 其中高糖组 rECs 的 Tie1、VEGF-A、MMP-2、MMP-9 蛋白的表达明显高于对照组 (均  $P<0.05$ ), 高糖+Tie1-shRNA 组 rECs 的 Tie1、VEGF-A、MMP-2、MMP-9 蛋白的表达较高糖组和高糖+慢病毒组均明显降低 (均  $P<0.05$ )。**结论** 通过 Tie1-shRNA 技术抑制高糖培养的 rEC 中 Tie1 的表达, 可下调 VEGF-A、MMP-2、MMP-9 蛋白的表达, 减轻高糖诱导的 rEC 的增殖和迁移。

**【关键词】** 血管内皮细胞; 糖尿病; 酪氨酸激酶受体 1; 血管内皮生长因子; 基质金属蛋白酶**【中图分类号】** R587.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2021)04-0122-04

**Effect of Tie1-shRNA on the expression of Tie1 in high glucose cultured rat endothelial cell** ZHENG Yong-zheng, YANG Tianye, LIU Guanghui, MENG Chun. People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350004, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of Tie1-shRNA on the expression of tie1 in high glucose cultured rat endothelial cell (rECs). **Methods** rECs were divided into four groups: control group, high glucose group, high glucose + lentivirus group and high glucose + Tie1-shRNA group. Tie1-shRNA lentiviral vector was constructed and used to interfere the expression of Tie1-mRNA in high glucose cultured rECs. The viability of rEC was detected by MTT, the migration of rEC was detected by cell scratch tests, and the expressions of Tie1, VEGF-A, MMP2 and MMP-9 were detected by Western blot. **Results**

The difference of cell viability among the four groups was statistically significant ( $F=48.937, P<0.01$ ). The cell viability of high glucose group was significantly higher than that of control group ( $P<0.01$ ). The cell viability of high glucose + Tie1-shRNA group was lower than that of high glucose group and high glucose + lentivirus group (both  $P<0.01$ ). The difference of cell migration rate among the four groups was statistically significant ( $F=26.728, P<0.01$ ). The cell migration rate of high glucose group was significantly higher than that of control group ( $P<0.01$ ), and the cell migration rate of high glucose + Tie1-shRNA group was significantly lower than that of high glucose group and high glucose + lentivirus group (both  $P<0.05$ ). The differences of the expression of Tie1, VEGF-A, MMP-2 and MMP-9 protein among the four groups were statistically significant ( $F_{\text{Tie1}}=85.902, P<0.01$ ;  $F_{\text{VEGF-A}}=48.937, P<0.01$ ;  $F_{\text{MMP-2}}=169.857, P<0.01$ ;  $F_{\text{MMP-9}}=130.018, P<0.01$ ). The expression of Tie1, VEGF-A, MMP-2 and MMP-9 protein of high glucose group were significantly higher than those of control group (all  $P<0.05$ ). The expression of Tie1, VEGF-A, MMP-2 and MMP-9 protein in high glucose + Tie1-shRNA group were significantly lower than those in high glucose + lentivirus group and high glucose group (all  $P<0.05$ ). **Conclusion** Tie1-shRNA can decrease the expression of Tie1, VEGF-A, MMP-2 and MMP-9, suppress cell viability and cell migration induced by high glucose.

**【Key words】** vascular endothelial cells; diabetes; Tie1; vascular endothelial growth factor; matrix metalloproteinase

糖尿病视网膜 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病严重并发症, 可引起不可逆性致盲。DR 主要特征是血管异常增生。新生血管形成涉及细胞外基质降解和内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 侵袭。细胞外基质降解与基质金属

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81774369); 福建省自然科学基金资助项目 (2020J011037)

1 福州大学生物科学与工程学院; 2 通信作者, Email: latiny@gmail.com

蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 密切相关<sup>[1]</sup>。血管生成素 (angiopoietin, Ang) /酪氨酸激酶受体 (tyrosine kinase receptor, Tie) 信号通路是调节血管新生的重要信号通路<sup>[2-3]</sup>, 与血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达存在交互作用, 参与血管增殖<sup>[4-5]</sup>。短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 是一种 RNA 干扰技术, 可有效沉默或抑制目标基因表达。本实验通过 shRNA 技术, 研究 Tie1-shRNA 对高糖培养的大鼠血管内皮细胞 (rat vascular endothelial cells, rECs) 的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料:

1.1.1 实验动物: 健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 30 只, 50~100 g, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司 [动物质量合格证号: 20170005041537; 许可证号 SCXK (沪) 2007-0005]。实验过程中, 操作者严格遵守动物福利与伦理原则。

1.1.2 主要试剂: 血管内皮细胞培养基 (ECM 培养基, 美国 sciencell 公司), MTT 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), 兔抗 VEGF-A 多克隆抗体 (美国 Abcam 公司, ab231260), 兔抗 MMP-2 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司, ab181286), 兔抗 MMP-9 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司, ab76003), 兔抗 Tie1 单克隆抗体 (武汉博士德生物, A02206), 生物素标记的羊抗兔 IgG (美国 Abcam 公司, ab7090)。

### 1.2 方法:

1.2.1 rECs 的分离、纯化、鉴定及培养: 按我们前期研究方法<sup>[6]</sup>进行原代 rECs 的分离、纯化、培养、鉴定。在无菌条件下分离出大鼠腹主动脉, 采用眼科显微手术器械将主动脉内膜外翻, 采用消化压片法将内膜面接种在明胶包被的培养瓶中, 加入含 200 mL/L 胎牛血清的 ECM 培养基, 置于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱内培养, 每 3 天换液 1 次。当原代细胞长满孔底 80% 左右时进行消化, 按照 1:3 的比例进行传代培养。培养的细胞表现出典型的鹅卵石样。免疫荧光法鉴定显示, 99% 的细胞及其子代细胞凝血因子 VIII、vWF 和 CD31 呈阳性染色。

1.2.2 实验分组及处理: 取第 3 代至第 5 代生长良好的对数期 rECs 按随机数字表法分为 4 组: 对照组、高糖组、高糖+慢病毒组和高糖+Tie1-shRNA 组。对照组采用葡萄糖浓度 5.5 mmol/L 的 ECM 培养基。高糖组、高糖+慢病毒组和高糖+Tie1-shRNA 组采用葡萄糖浓度 25 mmol/L 的 ECM 培养基。

1.2.3 Tie1-shRNA 慢病毒质粒载体构建: 根据美国国家生物信息中心 (National center for biotechnology information, NCBI) 查询 Tie1 mRNA (NM\_053545.1), 使用 Ambition 软件, 设计合成 Tie-shRNA 序列 (GGGAG-GAAGTATATGTGAAGA), 根据 pU6 质粒的 XhoI 和 HpaI 双酶切位点, 设计合成 Tie1-shRNA。Tie1-shRNA 病毒滴度为  $1 \times 10^9$  IU/mL。

1.2.4 rECs 慢病毒最佳感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 值的筛选: rECs 经慢病毒感染 72 h 后于倒置荧光显微镜下观察 GFP 蛋白阳性表达率, 当 MOI=100 时, 感染效率相对较高且没有出现死亡情况, 选用 rECs 慢病毒最佳

感染复数 MOI 值为 100。

1.2.5 MTT 法检测 Tie1-shRNA 对高糖培养的 rECs 增殖的影响: rECs 胰酶消化后离心, 用 ECM 培养基重悬, 将浓度稀释为  $1 \times 10^5$  /mL 的细胞悬液, 按照 100  $\mu$ L/孔的密度接种于 96 孔板中, 每组设置 6 个复孔。按照对照组、高糖组、高糖+慢病毒组、高糖+Tie1-shRNA 组更换培养基。培养 48 h 后, 按 MTT 说明书操作在酶标仪上测定各孔吸光度并记录结果, 以时间为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.2.6 细胞划痕实验检测 Tie1-shRNA 对高糖培养的 rECs 迁移的影响: rECs 消化, 稀释至  $1 \times 10^5$  /mL 的细胞悬液, 按照 1 mL/孔的密度接种于 6 孔板, 每孔补充 1 mL 培养基, 每组设置 6 个复孔, 按照对照组、高糖组、高糖+慢病毒组、高糖+Tie1-shRNA 组更换培养基, 培养 48 h 达细胞融合。小心吸除孔内培养上清液, 将六孔细胞培养板背面用 marker 笔画宽为 2 mm 直线, 用细胞刮沿划线刮除细胞, 擦除 marker 笔画线, 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 清洗刮除细胞, 重新加入新的培养基, 培养 48 h 后倒置像差显微镜观察划痕处细胞迁移情况并拍照储存。计算细胞迁移率 = (刮除面积-刮除后 48 h 面积) / 刮除面积  $\times 100\%$ 。

1.2.7 Western blot 检测 Tie1-shRNA 对高糖环境培养 rECs 的 Tie1、VEGF-A、MMP-2、MMP-9 表达的影响: rECs 消化, 稀释至  $1 \times 10^5$  /mL 的细胞悬液, 按照 1 mL/孔的密度接种于 6 孔板, 每孔补充 1 mL 培养基, 每组设置 3 板, 按照对照组、高糖组、高糖+慢病毒组、高糖+Tie1-shRNA 组更换培养基, 培养 48 h, 消化成细胞悬液, 1 500 g 离心 5 min, 将离心后的细胞团置于无蛋白酶的 1.5 mL 离心管中, 每 20 mg 加入 180  $\mu$ L RIPA 裂解液 (含 1% 蛋白酶抑制剂), 组织匀浆, 冰上孵育后离心取上清, 测量蛋白浓度。SDA-PAGE 电泳, 转印, 丽春红染液染色, 0.5% 脱脂奶中 4 °C 孵育过夜封闭, 一抗 (VEGF-A 稀释比例: 1:1 000; MMP-2 稀释比例: 1:1 000; MMP-9 稀释比例: 1:1 000; Tie1 稀释比例: 1:500) 4 °C 孵育过夜, 回收抗体, 1 $\times$ TBST 洗 3 次, 每次 5 min; 生物素标记的羊抗兔 IgG (稀释比例: 1:500) 室温孵育 2 h, 显影拍照。

1.3 统计学分析: 所有数据采用 SPSS 25.0 统计软件进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用单因素 ANOVA 检验分析组间差异, LSD-t 法进行组间两两比较。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 Tie1-shRNA 对高糖培养 rECs 增殖的影响: 将 rECs 接种于培养板中培养 48 h 后, MTT 检测各组细胞增殖活性, 对照组测量值为  $0.808 \pm 0.033$ , 高糖组为  $1.088 \pm 0.090$ , 高糖+慢病毒组为  $1.026 \pm 0.050$ , 高糖+Tie1-shRNA 组为  $0.878 \pm 0.032$ , 4 组间差异具有统计学意义 ( $F=48.937$ ,  $P<0.01$ )。高糖组细胞增殖活性明显高于对照组 ( $P<0.01$ ), 高糖+Tie1-shRNA 组细胞增殖活性较高糖组和高糖+慢病毒组均明显减弱 (均  $P<0.01$ )。

2.2 Tie1-shRNA 对高糖培养 rECs 迁移的影响: 细胞划痕检测 4 组细胞迁移情况, 结果见图 1。对照组细胞迁移率为

0.553±0.065, 高糖组为 0.805±0.057, 高糖+慢病毒组为 0.772±0.054, 高糖+Tie1-shRNA 组为 0.603±0.056, 4 组间差异有统计学意义 ( $F=26.728$ ,  $P<0.01$ )。高糖组

细胞迁移率比对照组明显增加 ( $P<0.01$ ), 高糖+Tie1-shRNA 组细胞迁移率较高糖组和高糖+慢病毒组均明显减弱 (均  $P<0.05$ )。

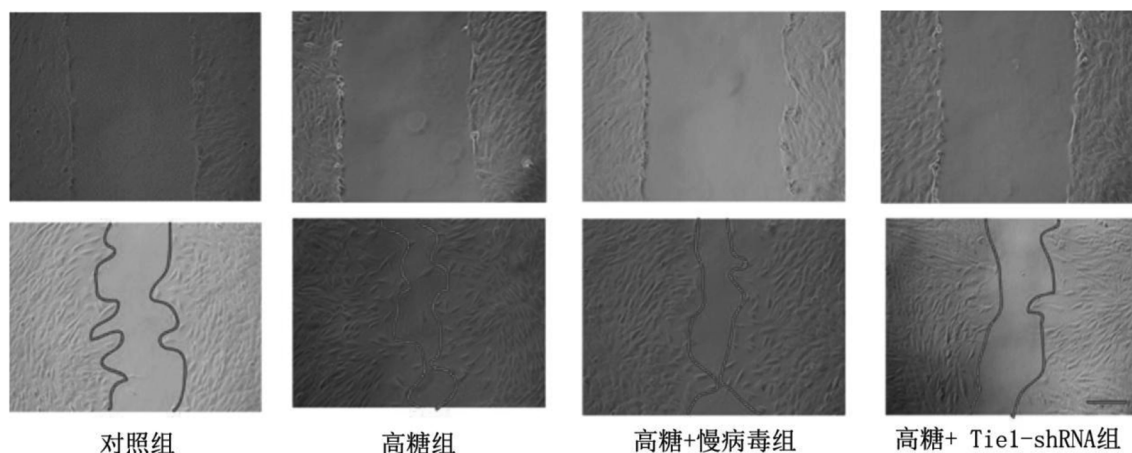
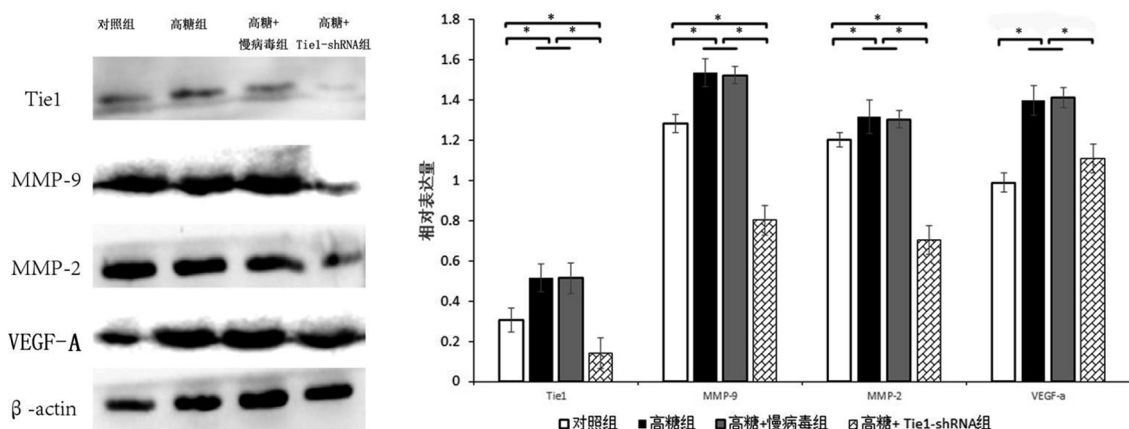


图 1 4 组 rECs 迁移情况 (标尺=500  $\mu\text{m}$ )

**2.3 Tie1-shRNA 对高糖环境培养 rECs 的 Tie1、VEGF-A、MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响:** Western blot 检测结果如图 2。4 组 rECs 的 Tie1、VEGF-A、MMP-2、MMP-9 蛋白的表达差异具有统计学意义 ( $F_{\text{Tie1}}=85.902$ ,  $P<0.01$ ;  $F_{\text{MVEGF-A}}=48.937$ ,  $P<0.01$ ;  $F_{\text{MMP-2}}=169.857$ ,  $P<0.01$ ;

$F_{\text{MMP-9}}=130.018$ ,  $P<0.01$ )。高糖组 rECs 的 Tie1、VEGF-A、MMP-2、MMP-9 蛋白的表达明显高于对照组 (均  $P<0.05$ ), 高糖+Tie1-shRNA 组 rECs 的 Tie1、VEGF-A、MMP-2、MMP-9 蛋白的表达较高糖组和高糖+慢病毒组均明显降低 (均  $P<0.05$ )。



注: 组间比较, \*  $P<0.05$ 。

图 2 Tie1-shRNA 对高糖培养 rECs Tie1、VEGF-A、MMP-2、MMP-9 表达的影响

### 3 讨论

DR 是糖尿病常见的微血管并发症, 也是 40 岁以上人群主要致盲眼病之一。糖尿病持续的高糖环境, 导致视网膜微血管病变, 视网膜缺血缺氧, 新生血管形成, 引起渗出、出血, 进而影响视力<sup>[7]</sup>。这一基本病理过程伴随 ECs 增殖与迁移。

本研究结果提示, 高糖环境会促进 rEC 的增殖和迁移, 促进 VEGF-A 蛋白的表达。VEGF 是目前所知最强的 ECs 选择性促有丝分裂因子和血管生成因子, 它是 DR 发展的重要因素。VEGF-A 是 VEGF 家族的始创成员, 它的产生是

对高糖、缺血和缺氧的反应。VEGF-A 通过与受体 VEGFR-2 结合, 诱导 VEGFR-2 磷酸化, 激活其下游信号级联反应, 如有丝分裂原活化蛋白激酶, 导致 ECs 增殖。活化的 ECs 表达整合素, 有助于降解细胞外基质, 促进 ECs 迁移。ECs 增殖和迁移后形成新的微血管基底膜, 最终促进新生血管生成<sup>[8-9]</sup>。

新生血管的形成涉及到 ECs 侵袭和细胞外基质降解两个基本过程, 降解细胞外基质与 MMPs 有关。MMPs 是一组内肽酶家族, 除了能够降解细胞外基质的多种蛋白质成分, 还可以降解生长因子、细胞因子和细胞受体等其他蛋

白,引起血管渗漏<sup>[10]</sup>。MMPs 在增殖性 DR 中起重要作用,其中 MMP-2 和 MMP-9 被认为是新生血管生成的必要条件<sup>[11-12]</sup>。MMP-2 和 MMP-9 通过调控细胞外基质合成和降解的代谢平衡,调节血管渗透性和血管新生。在血管生成过程中,活化的 ECs 分泌 MMP-2 和 MMP-9。这可能是通过 PI3K/Akt 信号通路调节<sup>[13-15]</sup>,这一信号级联反应刺激 MMP-2 和 MMP-9 的产生。此外,在糖尿病大鼠视网膜中,VEGF 的调控也由 PI3K/Akt 信号通路介导<sup>[16-17]</sup>。本研究发现,高糖环境可上调 rEC 中 VEGF-A、MMP-2、MMP-9 的表达。本研究结果提示高糖环境可上调 rEC 中 VEGF-A 的表达,进而刺激 ECs 释放 MMP-2 和 MMP-9,导致细胞外基质降解,促进 ECs 迁移。

Ang/Tie 信号通路与 VEGF 的表达之间存在交互作用,二者在 DR 的发生和发展中起重要作用。Ang/Tie 信号通路可通过调控其下游的 PI3K/Akt 信号级联反应调节血管新生<sup>[18]</sup>。本研究发现,高糖环境可上调 rEC 中 Tie1 的表达。Tie1 是一种特异性 ECs 跨膜受体,在病理性血管新生过程中,Tie1 在血管生成端细胞中高表达,充当 Tie2 的拮抗剂,破坏血管结构稳定性,增强 ECs 对 VEGF 的敏感性,最终导致新生血管形成<sup>[19]</sup>。shRNA 是一种 RNA 干扰技术,通过抑制靶 mRNA 的翻译,阻断其蛋白表达,从而抑制该蛋白的功能。本研究采用 Tie1-shRNA 抑制高糖培养 rEC 的 Tie1 表达,研究发现 Tie1-shRNA 可减少高糖诱发的 Tie1、VEGF-A、MMP-2、MMP-9 蛋白的表达,抑制高糖引起的 rEC 增殖和迁移。研究结果提示通过 shRNA 技术抑制 Tie1 表达,可下调 rEC 中 VEGF-A 的表达,抑制 rEC 释放 MMP-2 和 MMP-9,从而减轻高糖诱导的 rEC 增殖、迁移。

综上所述,抑制血管新生是治疗 DR 最主要的靶点。本研究表明,Tie1 可能是预防和治疗 DR 相关微血管病变的合适靶标。通过 Tie1-shRNA 技术抑制 Tie1 的表达,可下调高糖诱导的 rEC 中 VEGF-A、MMP-2、MMP-9 的表达,减轻 rEC 的增殖和迁移,进而抑制新生血管生成。

### 参考文献

- [1] Solanki A, Bhatt L K, Johnston T P, et al. Targeting matrix metalloproteinases for diabetic retinopathy: the way ahead? [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2019, 20 (4): 324-333.
- [2] Patel J I, Hykin P G, Gregor Z J, et al. Angiopoietin concentrations in diabetic retinopathy [J]. *Br J Ophthalmol*, 2005, 89 (4): 480-483.
- [3] Cai J, Kehoe O, Smith G M, et al. The angiopoietin/Tie-2 system regulates pericyte survival and recruitment in diabetic retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49 (5): 2163-2171.
- [4] Khan M, Aziz A A, Shafi N A, et al. Targeting angiopoietin in retinal vascular diseases: a literature review and summary of clinical trials involving faricimab [J]. *Cells*, 2020, 9 (8): 1869.
- [5] Pang B, Ni Q, Di S, et al. Luo tong formula alleviates diabetic retinopathy in rats through micro-200b target [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 551766.
- [6] 林翠红, 刘光辉, 杨田野, 等. 大鼠主动脉内皮细胞改良型分离培养方法 [J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2018, 39 (6): 911-916.
- [7] Heng L Z, Comyn O, Peto T, et al. Diabetic retinopathy: pathogenesis, clinical grading, management and future developments [J]. *Diabet Med*, 2013, 30 (6): 640-650.
- [8] Antonetti D A, Barber A J, Hollinger L A, et al. Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274 (33): 23463-23467.
- [9] Witmer A N, Vrensen G F, Van Noorden C J, et al. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2003, 22 (1): 1-29.
- [10] Hamilton N B, Attwell D, Hall C N. Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease [J]. *Front Neuroenergetics*, 2010, 21 (2): 5.
- [11] Rodrigues M, Xin X, Jee K, et al. VEGF secreted by hypoxic Müller cells induces MMP-2 expression and activity in endothelial cells to promote retinal neovascularization in proliferative diabetic retinopathy [J]. *Diabetes*, 2013, 62 (11): 3863-3873.
- [12] Pepper M S. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21 (7): 1104-1117.
- [13] Abu EAM, Mohammad G, Nawaz M I, et al. Relationship between vitreous levels of matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factor in proliferative diabetic retinopathy [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (12): e85857.
- [14] Marron M B, Hughes D P, Edge M D, et al. Evidence for heterotypic interaction between the receptor tyrosine kinases TIE-1 and TIE-2 [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (50): 39741-39746.
- [15] Kaur J, Adya R, Tan B K, et al. Identification of chemerin receptor (ChemR23) in human endothelial cells: chemerin-induced endothelial angiogenesis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391 (4): 1762-1768.
- [16] Yao J S, Chen Y, Zhai W, et al. Minocycline exerts multiple inhibitory effects on vascular endothelial growth factor-induced smooth muscle cell migration: the role of ERK1/2, PI3K, and matrix metalloproteinases [J]. *Circ Res*, 2004, 95 (4): 364-371.
- [17] Ma Y, Dong C, Chen X, et al. Silencing of miR-20b-5p exerts inhibitory effect on diabetic retinopathy via inactivation of THBS1 gene induced VEGF/Akt/PI3K Pathway [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2021, 16 (14): 1183-1193.
- [18] Bilimoria J, Singh H. The Angiopoietin ligands and Tie receptors: potential diagnostic biomarkers of vascular disease [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2019, 39 (3): 187-193.
- [19] La Porta S, Roth L, Singhal M, et al. Endothelial Tie1-mediated angiogenesis and vascular abnormalization promote tumor progression and metastasis [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128 (2): 834-845.