

12-去氧佛波醇-13-棕榈酸酯对人乳腺癌 MCF-7 细胞 VEGF 表达的影响及其相关机制

杨莹¹, 刘吉成^{2*}, 丛欢², 韩翠翠¹, 马立威², 简白羽²

(1. 黑龙江中医药大学基础医学院, 哈尔滨 150040; 2. 齐齐哈尔医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

[摘要] 目的:观察狼毒大戟根部提取物 12-去氧佛波醇-13-棕榈酸酯(12-deoxyphorbol 13-palmitate, DP)对 MCF-7 细胞血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达的影响,及其是否通过 Von Hippel-Lindau 蛋白(VHL)/低氧诱导因子(HIF-1 α)信号通路进行调节。**方法:**实验分为常氧空白组、常氧实验组(10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DP)、乏氧空白组和乏氧实验组(10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DP),其中乏氧空白组和乏氧实验组用 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl₂ 预处理细胞。当细胞密度达 70% ~ 80% 时进行药物处理;MTT 法检测 DP 对 MCF-7 细胞在 6, 12, 24 h 细胞存活率的影响;酶联免疫吸附测定(ELISA)检测 DP 对 MCF-7 细胞分泌 VEGF 的影响;实时荧光定量 PCR 法(RT-qPCR)检测 DP 对 VEGF mRNA 表达的影响;Western blot 检测 DP 对 MCF-7 细胞中 VEGF, HIF-1 α 和 VHL 蛋白表达;细胞免疫荧光法(IF)检测 DP 对 HIF-1 α 表达及其在细胞中分布的影响。**结果:**MTT 法结果显示,乏氧状态下细胞存活率在 12, 24 h 且 DP 浓度为 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时与对照组相比有显著性差异($P < 0.05$);乏氧条件下,VEGF 和 HIF-1 α 的表达较常氧条件下升高,与乏氧组相比,DP 能降低 VEGF($P < 0.05$)和 HIF-1 α ($P < 0.05$)的表达;乏氧条件下 VHL 表达较常氧条件下降低,当药物处理后,相较于乏氧组,VHL 浓度明显上升($P < 0.05$)。**结论:**DP 可能通过调节 VHL/HIF-1 α 信号通路从而下调 MCF-7 细胞 VEGF 表达。

[关键词] 12-去氧佛波醇-13-棕榈酸酯;人乳腺癌 MCF-7 细胞;血管内皮生长因子;低氧诱导因子;Von Hippel - Lindau 蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)02-0120-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015020120

Effect and Related Mechanism of 12-deoxyphorbol-13-palmitate on Expression of VEGF in Breast Cancer MCF-7 Cells YANG Ying¹, LIU Ji-cheng^{2*}, CONG Huan², HAN Cui-cui¹, MA Li-wei², JIAN Bai-yu² (1. Basic Medical College, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. Qiqihaer Medical University, Qiqihaer 161006, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of 12-deoxyphorbol-13-palmitate (DP) which isolated from the roots of *Euphorbia fischeriana* on the vascular endothelial growth factor (VEGF) expression, and whether it shows anti-VEGF effects via Von Hippel-Lindau (VHL) /hypoxia induced 1 alphas (HIF-1 α) signaling pathway. **Method:** The cells were divided into normoxia control group, normoxia experimental groups (10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DP), hypoxia control group, hypoxia experimental groups (10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DP). The hypoxia control group and experimental groups were pretreated with CoCl₂ (150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). The viability of MCF-7 cells was measured by MTT method at a cell density of 70% -80% and at 6, 12, 24 h. The secretion of VEGF was investigated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA level of VEGF was detected by RT-qPCR. The protein expressions of VEGF, HIF-1 α and VHL were determined by Western blot. The localization and expression of HIF-1 α were detected by immunofluorescence. **Result:** MTT assay showed that DP significantly decreased the cell viability at 12, 24 h ($P < 0.05$) and at DP concentration of 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Under hypoxia condition, the expression of VEGF and HIF-1 α was increased compared with that under normoxia condition. But the up-regulation was reversed ($P < 0.05$) by the addition of DP. The VHL level was down-

[收稿日期] 20140723(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81374021)

[第一作者] 杨莹, 硕士研究生, 从事肿瘤药理学研究, Tel:15164673953, E-mail: yangying2012@126.com

[通讯作者] * 刘吉成, 博士研究生导师, 教授, 从事分子药理学和肿瘤药理学研究, Tel:0452-2663372, E-mail: lj3372@163.com

regulated under hypoxia condition. However after treatment of DP, the expression of VHL was increasing significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** DP could down-regulate VEGF by affecting VHL/HIF-1 α signaling pathway.

[**Key words**] 12-deoxyphorbol-13-palmitate; human breast cancer MCF-7 cells; vascular endothelial growth factor; hypoxia induced factor 1 alpha; Von Hippel-Lindau

乳腺癌是女性患癌症死亡率最高的一种恶性肿瘤,近 50 年,乳腺癌的治疗从传统的乳腺癌根治术与放疗转变为多模式、个体化治疗。虽然现代医学技术提高了病人的存活率,但仍存在肿瘤的部分转移,这往往称为致死的主要原因。有研究显示,肿瘤生长的过程依赖肿瘤血管生长,并且是对肿瘤细胞分泌生长因子的反应^[1]。其中血管内皮生长因子(VEGF)是其中非常重要的生长因子,除在新血管生成中起着非常重要的作用外,也参与肿瘤的病理形成过程^[2]、免疫抑制效应^[3]等。VEGF 受上游调控因子低氧诱导因子(HIF)-1 α 的调控作用,HIF-1 α 生成后与 HIF-1 β 聚合形成二聚体并进入细胞核作用于下游靶基因启动子上的缺氧反应元件(HRE),启动下游靶基因的生成,如 VEGF^[4]。而在常氧条件下,抑瘤基因 pVHL 能攻击 HIF-1 α C 端的氧依赖降解区(ODD),导致 HIF-1 α 迅速降解^[5]。而乏氧条件能使 pVHL 迅速与 HIF-1 α 分离,终止 HIF-1 α 蛋白降解过程,导致 HIF-1 α 积聚,进而产生一系列作用。

12-去氧佛波醇-13-棕榈酸酯(DP)为狼毒大戟根部提取、分离并纯化的一种二萜类单体。前期研究表明其能抑制 VEGF 诱导的血管生成^[6],以及诱导 K562 细胞凋亡^[7]。但其对乳腺癌细胞分泌 VEGF 的作用及其作用机制尚无报道。本实验侧重于研究 DP 对 MCF-7 细胞中 VEGF 表达的影响,以及其作用是否通过 VHL/HIF-1 α 信号通路实现。

1 材料

1.1 细胞培养 人乳腺癌 MCF-7 细胞(购自 American Type Culture Collection, ATCC)。

1.2 药品与试剂 DP 为狼毒大戟根部乙酸乙酯层经过硅胶柱色谱柱得到的单体,相对分子质量为 586.84,结构如图 1。MTT, CoCl₂ (美国 Sigma 公司), Valukine Human VEGF Immunoassay Kit (美国 R&D 公司), RNAiso, SYBR[®] Premix Ex Tag[™] 和 PrimeScript[®] RT reagent Kit Perfect Real Time (大连宝生物试剂), 兔抗人 VEGF 抗体(美国 Epitomics 公司), 鼠抗人 HIF-1 α 抗体(美国 BD 公司), 兔抗人 VHL 抗体、鼠二抗和兔二抗(美国 Cell Signaling Technology 公司), 胞浆/胞核蛋白抽提试剂盒、鼠抗

人 GAPDH 抗体、鼠 FITC 标记荧光二抗和 BCA 蛋白定量试剂盒(北京康为世纪)。

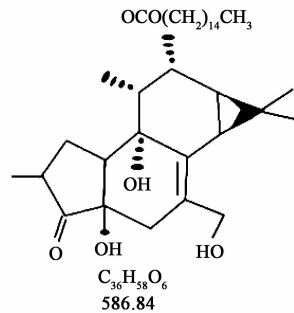


图 1 DP 结构图

Fig. 1 Chemical Structure of DP

1.3 仪器 3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司), 5417R 型离心机(德国 Eppendorf 公司), SAFIRE II -BASIC 型酶标仪(瑞士 TECAN 公司), Eclipse TI-S 型荧光显微镜(日本 Nikon 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 采用含 10% 胎牛血清、青霉素(100 U·mL⁻¹)和链霉素(100 mg·L⁻¹)的 DMEM 培养基, 37 °C 及 5% CO₂ 条件下进行培养 MCF-7 细胞。化学试剂 CoCl₂ (150 μmol·L⁻¹)进行缺氧模型的建立。细胞贴壁后将其在常氧及缺氧条件进行药物处理, DP 处理浓度分别为 0, 10, 20, 40 μmol·L⁻¹。

2.2 对细胞增殖率的影响 96 孔板培养细胞, 贴壁 12 h 后, 在缺氧条件下分别处理 6, 12, 24 h, 药物浓度为 0, 10, 20, 40 μmol·L⁻¹, 每个浓度每个时间设置 3 个复孔。96 孔板中每孔加入 10 μL MTT (5 g·L⁻¹), 孵育 4 h 后, 将培养基除去, 每孔加入 150 μL DMOS, 充分震荡 10 min, 酶标仪 570 nm 波长下检测吸光度(A)。统计数据, 计算存活率。

2.3 对 VEGF 分泌的影响 6 孔板培养细胞, 分别在常氧及缺氧条件下加药处理 12 h 收集各组培养上清, 按说明书将对照品及样品加入 VEGF 抗体包被的微孔板中, 每孔 100 μL, 室温孵育 2 h 后洗涤, 甩干; 加入 200 μL 酶标检测抗体, 室温孵育 2 h; 洗涤后每孔加入 200 μL 显色底物, 室温孵育 30 min; 加入 50 μL 终止液, 酶标仪测量 450 nm A, 并设定

540 或 570 nm 作为校正波长。每组设 3 个复孔,结果取平均值。

2.4 检测 VEGF 和 HIF-1 α mRNA 表达 收集处理 12 h 后的各组细胞(处理方法同 ELISA), Trizol 法提取各组总 RNA。每组样品加入 1 mL Trizol 刮下细胞静置 5 min, 加入 0.2 mL 三氯甲烷, 震荡 15 s 后静置 5 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min。离心后, 取上清液加入 0.5 mL 异丙醇, 混匀室温静置 10 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 弃上清, 加入 75% 的乙醇 1 mL, 颠倒后离心 5 min。弃乙醇后室温晾干, 加入 20 μL 无 RNase 水, 备用。将每组 RNA 按试剂盒说明书操作, 反转体系为 20 μL 。PCR 扩增反应按试剂盒说明操作, 扩增条件为预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, PCR 反应 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 31 s, 循环 40 次。VEGF 引物序列如下: VEGF, F 5'-GTC-CAACTTCTGGGCTGTTCT-3'; R5'-CCCTCTCCTCTCCTTCTCTTC-3'。结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法处理数据, 得到相对表达量, 取 3 次实验结果求平均值。

2.5 检测 HIF-1 α 表达及分布 将载玻片置于培养皿底部后正常培养细胞, DP 处理后, 取出载玻片, PBS 浸洗 3 \times 3 min; 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 浸洗; 0.5% Triton-X-100 室温通透 20 min, PBS 浸洗; 山羊血清室温封闭 30 min; 一抗入湿盒 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; PBST 浸洗, 加二抗, 室温孵育 1.5 h; PBST 浸洗, 滴加 DAPI, 避光孵育 5 min; PBST 浸洗, 采集图像并观察。

2.6 检测 VEGF, HIF-1 α 和 VHL 蛋白表达 DP 处理细胞后, 分别收集各组蛋白, 胞浆和胞核蛋白按试剂盒说明提取。BCA 法进行蛋白定量, 定量后 100 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 变性。取 30 μg 蛋白上样, 经 10% SDS-PAGE 电泳分离, 转膜至 PVDF 膜, BSA 封闭液室温封闭 2 h 后, VEGF 抗体(1:1 000), HIF-1 α 抗体(1:500), VHL 抗体(1:1 000)和 GAPDH 抗体(1:5 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 羊抗鼠或羊抗兔二抗(1:4 000)室温孵育 1.5 h, TBST 洗膜 3 次后, ECL 发光, 胶片显色。

2.7 数据统计分析 数据统计分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

3 结果

3.1 DP 对 MCF-7 细胞存活率的影响 MTT 结果显示, DP 对 MCF-7 细胞存活率具有抑制作用, 且随着药物剂量的增加和时间的延长, 这种抑制作用更加明显。与乏氧组相比, 6 h 时, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组有

显著性差异 ($P < 0.05$); 12, 24 h 时, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组有显著性差异 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 DP 对 CoCl_2 模拟乏氧状态下 MCF-7 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of DP on cell proliferation of MCF-7 cells under hypoxia condition ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞存活率/%		
		6 h	12 h	24 h
乏氧	-	100.0 \pm 7.1	100.0 \pm 11.5	100.0 \pm 15.7
DP	10	101.4 \pm 7.7	90.5 \pm 3.7	80.4 \pm 10.4
	20	89.9 \pm 9.2	60.0 \pm 9.7 ²⁾	45.5 \pm 5.1 ²⁾
	40	63.4 \pm 15.7 ¹⁾	31.1 \pm 8.0 ²⁾	18.8 \pm 1.8 ²⁾

注: 与乏氧组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 常氧和乏氧条件下 DP 对 MCF-7 细胞 VEGF 表达的影响 ELISA, RT-PCR 和 Western blot 法检测结果显示, 当 CoCl_2 化学乏氧后, VEGF 蛋白表达及 mRNA 水平明显增高。当 DP 处理之后, 常氧条件下, VEGF 蛋白表达及 mRNA 表达明显下降 ($P < 0.01$), 乏氧条件下, 这种药物抑制作用更加明显, VEGF 翻译及转录水平显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 如图 2, 表 2。

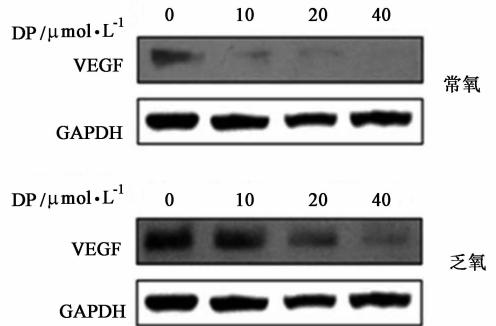


图 2 Western blot 法检测常氧和缺氧情况下 VEGF 的表达情况
Fig. 2 Western blot detected the expression of VEGF under normoxia and hypoxia conditions

3.3 缺氧条件下 DP 对 MCF-7 细胞 HIF-1 α 表达的影响 Western blot 法检测结果显示, 见图 3A, 同常氧空白组相比, 乏氧组 HIF-1 α 表达显著增高 ($P < 0.01$)。DP 处理后, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组与乏氧组有显著性差异 ($P < 0.05, P < 0.01$), 见表 3。细胞免疫荧光结果如图 3B 所示, 乏氧条件下, 用药后细胞核内 HIF-1 α 荧光强度较用药前明显减弱, 且总体荧光强度随药物浓度增高而下降。

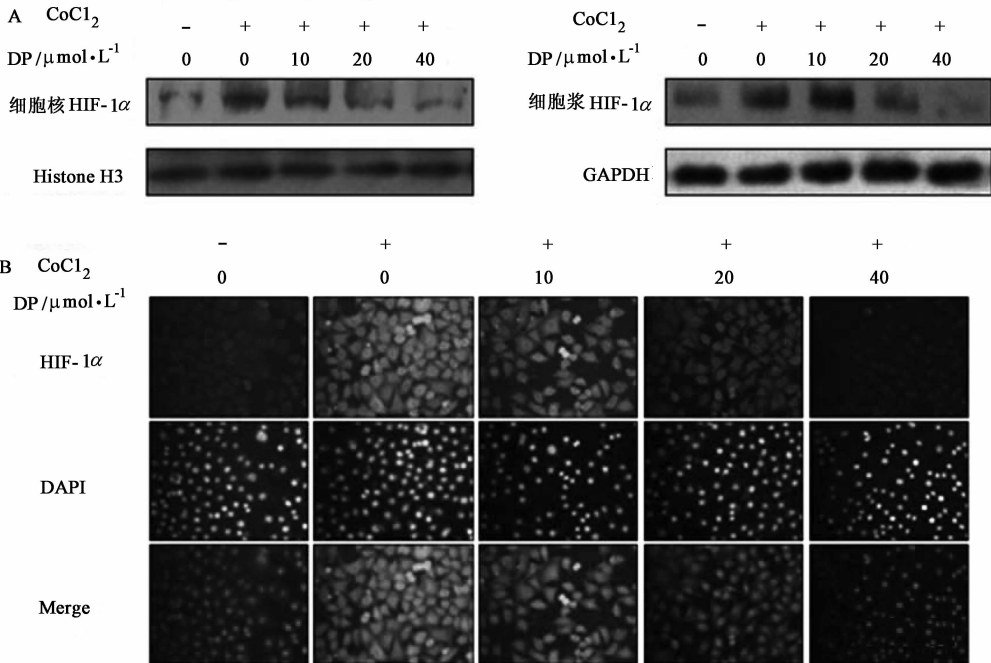
3.4 缺氧条件下 DP 降低 VHL 蛋白表达 乏氧条件下 VHL 表达较常氧条件下显著下降 ($P < 0.05$), 随着药物浓度增加, 其表达量显著增加 ($P < 0.05$),

表 2 常氧和乏氧条件下 DP 对 MCF-7 细胞 VEGF 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of DP on expression of VEGF under normoxia and hypoxia conditions ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	VEGF 分泌量/ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot 10^6\text{ cells}$		VEGF 蛋白相对表达/%		VEGF mRNA 相对表达/%	
		常氧	乏氧	常氧	乏氧	常氧	乏氧
空白	-	90.1 ± 6.8	198.3 ± 20.3	25.1 ± 3.4	100.0 ± 33.2	103.1 ± 5.3	258.2 ± 14.7
DP	10	79.6 ± 9.3	118.3 ± 13.6 ³⁾	12.2 ± 6.3	74.8 ± 3.5	85.4 ± 6.0 ¹⁾	119.3 ± 15.8 ⁴⁾
	20	34.7 ± 7.4 ²⁾	63.5 ± 2.2 ⁴⁾	5.1 ± 2.0 ²⁾	37.1 ± 13.7 ³⁾	53.8 ± 12.6 ²⁾	64.4 ± 10.1 ⁴⁾
	40	17.6 ± 1.5 ²⁾	18.0 ± 1.1 ⁴⁾	1.7 ± 0.4 ²⁾	15.6 ± 5.2 ³⁾	31.1 ± 4.2 ²⁾	39.5 ± 1.2 ⁴⁾

注:与常氧组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与乏氧组相比³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。



A. Western blot 分别检测细胞核和细胞浆 HIF-1 α 蛋白水平; B. IF 检测 MCF-7 细胞内 HIF-1 α 表达及分布情况

图 3 Western blot, 免疫荧光法检测 DP 对 HIF-1 α 表达的影响 (免疫荧光 FITC 染色, $\times 200$)

Fig. 3 Western blot, IF detected the effect of DP on HIF-1 α expression (Immunofluorescent assay FITC stain, $\times 200$)

甚至高过常氧对照组。见表 3, 图 4。

表 3 Western blot 检测 DP 对 MCF-7 细胞 HIF-1 α 和 VHL 蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Western blot detected the effect of DP on HIF-1 α and VHL expression in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	HIF-1 α /%		VHL/%
		胞核	胞浆	
常氧	-	100.0 ± 32.3	100.0 ± 9.1	100.0 ± 28.5
乏氧	-	322.1 ± 74.2 ²⁾	237.7 ± 20.6 ²⁾	48.0 ± 11.3 ¹⁾
乏氧-DP	10	268.3 ± 78.6	237.9 ± 40.3	159.6 ± 55.4 ³⁾
	20	170.9 ± 29.5 ³⁾	119.0 ± 19.1 ⁴⁾	275.8 ± 76.9 ³⁾
	40	87.6 ± 26.2 ⁴⁾	63.9 ± 11.2 ⁴⁾	293.0 ± 70.7 ³⁾

4 讨论

乳腺癌是一种起源于健康乳房腺细胞的恶性肿瘤^[8],且有研究显示,肿瘤生长的过程就是肿瘤血管生长的过程,并且是对肿瘤细胞分泌生长因子的

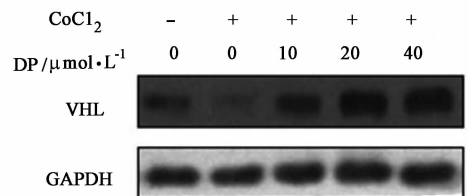


图 4 Western blot 检测 DP 对 VHL 表达的影响

Fig. 4 Western blot detected the effect of DP on VHL expression

反应^[9]。笔者从抑制肿瘤血管生成促进因子的角度出发,研究狼毒大戟提取单体 DP 对 VEGF 表达的作用,为进一步研究 DP 相关作用提供依据。

为构建乏氧模型,笔者用浓度为 $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CoCl_2 模拟乏氧。 CoCl_2 能模拟乏氧状态,其产生作用的机制可能与其作用于 VHL 和 HIF-1 α 连接区域并阻断了 HIF-1 α 的降解有关^[10]。笔者的研究结果显示,20,40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DP 处理后,在 12,24 h 时

细胞存活率显著降低,但24 h降低的程度较12 h变化不明显,因此在进一步研究中,采用12 h作为药物处理时间。在对VEGF转录及翻译水平研究过程中,笔者发现药物处理后,常氧条件下其表达随药物剂量的增加显著下降,而乏氧条件下这种抑制作用更明显,因此,推测DP抑制VEGF的表达在乏氧的乳腺癌肿瘤中作用更明显。病理性VEGF的高表达则是肿瘤的疾病产生的重要因素,其作用不仅表现在促进肿瘤血管生成和增加血管通透性,促进肿瘤细胞侵袭和转移,并且对细胞免疫功能也有一定损伤^[11]。目前国内研究在探索从中药及其组分中提取出高效、副作用小并能抑制肿瘤血管生成的中药复方制剂取得了很大的成功^[12]。在研究中药方剂抑制VEGF的表达,尚广彬等人发现滋阴方二至丸能降低二甲基苯蒽诱发的乳腺癌大鼠肿瘤组织中VEGF、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)表达^[13]。

本研究结果显示,DP能减少细胞总体HIF-1 α 表达,且阻碍进入细胞核的HIF-1 α ,推测其对靶因子VEGF表达下调起到非常重要的作用。这些结论与一些相关研究表达观点一致^[14]。De Francesco E M等人通过ChIP检测发现缺氧条件下VEGF表达上调需要HIF-1 α 作用于启动子上HRE区^[15]。故推测本研究中DP下调VEGF的表达是通过HIF-1 α 介导的。

本研究表明CoCl₂有效降低了VHL的表达,但随着DP处理浓度的增加,VHL的表达逐渐增加,且当DP浓度达到10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上时,VHL的表达甚至超过了CoCl₂处理之前。因此,推测DP通过上调VHL的表达,增强了与羟基化HIF-1 α 结合的能力,从而抑制了VEGF的表达。

以上结果均表明,DP能通过VHL/HIF-1 α 通路降低VEGF的表达,从而对减弱VEGF对肿瘤生成的促进作用。而DP对血管内皮细胞的作用仍需要在以后的实验中进一步的研究。

[参考文献]

[1] Zervoudis S, Iatrakis G, Tomara E, et al. Main controversies in breast cancer [J]. *World J Clin Oncol*, 2014, 5(3):359-373.
[2] Takahashi S. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for

antiangiogenic tumor therapy [J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(12):1785-1787.
[3] Voron T, Marcheteau E, Pernot S, et al. Control of the immune response by pro-angiogenic factors [J]. *Front Oncol*, 2014(4):70, doi:10.3389/fonc.2014.00070.
[4] Patel-Hett S, D'Amore P A. Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis [J]. *Int J Dev Biol*, 2011, 55(4/5):353-363.
[5] Shen C, Kealin W G Jr. The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma [J]. *Semin Cancer Biol*, 2013, 23(1):18-25.
[6] Xu H Y, Pan Y M, Chen Z W et al. 12-Deoxyphorbol 13-palmitate inhibit VEGF-induced angiogenesis via suppression of VEGFR-2-signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 146(3):724-733.
[7] 马立威,简白羽,许惠玉,等. 12-去氧佛波醇-13-棕榈酸酯诱导K562细胞凋亡的实验研究[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2014, 35(2):157-158.
[8] Alphandéry E. Perspectives of breast cancer therapeutics [J]. *J Cancer*, 2014, 5(6):472-479.
[9] Kubota Y. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy [J]. *Keio J Med*, 2012, 61(2):47-56.
[10] Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, et al. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor- α and von hippel-lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor- α [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(18):15911-15916.
[11] Goel H L, Mercurio A M. VEGF targets the tumour cell [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(12):871-882.
[12] 奚胜艳,王彦晖,赵育芳,等. 传统中药复方防止肿瘤血管生成的现状、问题分析及对策[J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(10):1352-1356.
[13] 尚广彬,曾莉萍,赵益,等. 二至丸对诱发性乳腺癌组织中VEGF和MMP-9表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(13):270-273.
[14] Ahluwalia A, Tarnawski A S. Critical role of hypoxia sensor- HIF-1 α in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing [J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19(1):90-97.
[15] De Francesco E M, Lappano R, Santolla M F, et al. HIF-1 α /GPER signaling mediates the expression of VEGF induced by hypoxia in breast cancer associated fibroblasts (CAFs) [J]. *Breast Cancer Res*, 2013, 15(4):R64-81.

[责任编辑 聂淑琴]