

冬凌草甲素抑制血管生成活性及作用机制

田丽莉¹, 盛东来², 朱国福^{1*}

(1. 上海中医药大学 中药学院, 上海 201203; 2. 杭州师范大学 发育与再生研究所, 杭州 310036)

[摘要] **目的:**研究冬凌草甲素抑制血管生成的活性及其作用机制。**方法:**采用体外和体内两种模式,研究冬凌草甲素在血管生成方面的抑制效应。通过体外培养心脏微血管内皮细胞,噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞的活力,酶联免疫吸附(ELISA)法测定血管内皮生长因子(VEGF)的含量;体内选择斑马鱼(Fli1-GFP)生物模式,观察冬凌草甲素对胚胎期血管生成和成鱼期血管损伤后再生的影响,并采用相对荧光定量PCR法检测VEGF通路上主要相关基因VEGFA,血管内皮细胞生长因子受体(VEGFR)2,VEGFR3的表达量。**结果:**冬凌草甲素具有抑制血管生成活性的作用,可抑制体外内皮细胞活力,其半抑制浓度(IC₅₀)8.04 mg·L⁻¹,可使细胞血清中VEGF的表达量明显下降;可抑制斑马鱼胚胎期节间血管生成,且抑制成鱼期血管损伤后再生,可能通过降低体内VEGFA,VEGFR2,VEGFR3基因的表达量从而抑制血管生成。**结论:**冬凌草甲素可有效抑制血管生成,为其抗肿瘤血管生成治疗提供了重要的科学依据。

[关键词] 冬凌草甲素; 心脏微血管内皮细胞; 斑马鱼; 血管内皮生长因子A; 血管内皮细胞生长因子受体2; 血管内皮细胞生长因子受体3

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)05-0166-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016050166

Inhibiting Effect and Mechanism of Oridonin on Angiogenesis Activity

TIAN Li-li¹, SHENG Dong-lai², ZHU Guo-fu^{1*}

(1. School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;
2. Institute of Developmental and Regenerative Biology, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect and mechanism of oridonin on inhibiting angiogenesis. **Method:** *In vitro* and *in vivo* models were used in this paper to study the anti-angiogenic effects of oridonin. Through *in vitro* models, methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to detect the cells vitality and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine vascular endothelial growth factors level (VEGF) in cardiac microvascular endothelial cells (CMEC). Through *in vivo* models, transgenic zebrafish models (Fli1-GFP) were used to observe the effect of oridonin on angiogenesis of embryonic period and regeneration after vascular injury in adult zebrafish. Expressions of main related genes VEGFA, VEGFR2 and VEGFR3 in VEGF pathways were detected with relative fluorescence quantitative PCR method. **Result:** Oridonin inhibited angiogenesis and endothelial cells *in vitro*, with IC₅₀ of 8.04 mg·L⁻¹, and significantly reduced VEGF expression in the cell serum. What's more, oridonin inhibited angiogenesis in zebrafish embryos vascular assay and inhibited regeneration after vascular injury in adult zebrafish. Our study elucidated the mechanism of the anti-angiogenic activity of oridonin at least in part, which may be related to down-regulating the expression of VEGFA, VEGFR2 and VEGFR3 genes. **Conclusion:** Oridonin can effectively inhibit angiogenesis, which will provide greater contribution for anti-tumor angiogenesis therapy.

[Key words] oridonin; cardiac microvascular endothelial cells; zebrafish; vascular endothelial growth factor A; vascular endothelial growth factor R2; vascular endothelial growth factor R3

[收稿日期] 20150813(015)

[第一作者] 田丽莉,在读博士,从事抗肿瘤中药药理药效研究,Tel:18806506097,E-mail:lily777@163.com

[通讯作者] *朱国福,博士,教授,从事中医药教学及抗肿瘤中药研究,Tel:021-51322209,E-mail:zgfzy2015@sina.com

癌症是引起人类死亡的第 2 大类疾病,目前恶性肿瘤对人类的威胁仍很大。1971 年, Folkman^[1]首次提出肿瘤生长和转移具有血管依赖性。相关研究表明,肿瘤的发生、发展、侵袭转移等,都必然伴随着血管形成^[2-3]。因此,抗血管生成治疗肿瘤的意义得到普遍重视。传统的中医药在肿瘤辅助治疗方面颇具特色,在坚持中医基本理论的前提下从中药中筛选和开发具有血管抑制活性的抗肿瘤药物潜力很大。冬凌草甲素为冬凌草等香茶菜属植物叶子中分离提取得到的一种贝壳杉烯二萜类化合物。冬凌草甲素具有很好的抗肿瘤活性,但其是否具有抑制血管生成活性,国内外相关报道较少。本文采用体外和体内两种模式,研究冬凌草甲素对血管内皮细胞活力,斑马鱼胚胎期血管生成,成鱼期血管损伤后再生的抑制作用和具体作用机制,为冬凌草甲素药效的进一步开发提供实验依据。

1 材料

1.1 试药 冬凌草甲素(上海源叶生物科技有限公司,批号 YN1126YA13)经高效液相色谱鉴定,纯度 $\geq 99\%$ 。

1.2 动物 心脏微血管内皮细胞(CMEC)购自中科院上海生命科学院细胞库,无病原体斑马鱼(Fli1-GFP)由中国科学院上海生命科学院提供。斑马鱼饲养于全封闭循环系统,养殖和繁殖均参照 Zebrafish Book 标准,鱼房内光照/黑暗 14 h/10 h,室内温度 26 ℃,水温 28 ℃,pH 6.8 ~ 7.5,电导率 850 ~ 900,各项水质指标均符合要求。

1.3 试剂 RPMI 培养基(HyClone 公司,批号 SH30809.01),胎牛血清(Gibco 公司,批号 100099),3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT),酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(Sigma 公司,批号分别为 M5655,051720);斑马鱼胚胎培养液(EM,参照 Zebrafish Book 标准配制,0.137 mol·L⁻¹ NaCl,5.4 mmol·L⁻¹ KCl,0.25 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄,0.44 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄,1.3 mmol·L⁻¹ CaCl₂,1.0 mmol·L⁻¹ MgSO₄,4.2 mmol·L⁻¹ NaHCO₃),二甲基亚砜(DMSO,上海展化化工有限公司,批号 96),Trizol(Invitrogen 公司,批号 14063028),反转录 RT 试剂盒(Takara 公司,批号 2641A),DRR041A SYBR 荧光定量试剂盒(宝生物工程大连有限公司,批号 TP800)。

1.4 仪器 FORMA311 型 CO₂ 恒温培养箱(美国 THERMO 公司),TagK15670 型酶联免疫检测仪(美国 Multiskan Ascent 公司),Rxz 智能型人工气候箱

(宁波市科技园区新江南仪器有限公司),303-0A 智能型数显电热恒温培养箱(上海叶拓仪器有限公司),Nikon Eelipse 2000 型倒置显微镜(日本尼康公司),UV-2550 型紫外分光光度计(日本岛津公司),Heraeus 型台式高速冷冻离心机(德国 Primo R),7000 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

2 方法

2.1 MTT 比色法测细胞活力 将培养瓶中 CMEC 用 0.25% 和 0.02% 乙二醇四乙酸混合消化液消化,1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,全培养基重悬,计数,接种 96 孔板(每孔 1 × 10⁴ 个),于 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱中孵育 3 d 至细胞 80% 融合,换无 FBS 培养基培养 24 h,使细胞生长同步化。随机分组并设置空白组,DMSO 组,冬凌草甲素低、中、高质量浓度(1,3,9 mg·L⁻¹)组,每组 8 个平行孔,37 ℃ 5% CO₂ 培养箱中继续培养 24 h,弃去培养基,D-Hanks 洗 2 次,每孔加 DMSO 100 μL,立即在酶联免疫检测仪上测定吸光度 A(570 nm 波长)。根据 A 计算细胞抑制率。

$$\text{细胞抑制率} = (A_{\text{空白组}} - A_{\text{试药组}}) / A_{\text{空白组}} \times 100\%$$

2.2 ELISA 法测 VEGF 含量 将生长良好的 CMEC 消化,离心,重悬(同 2.1),接种 48 孔板(每孔 6 × 10⁴ 个),于 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱中孵育 4 d 至细胞 80% 融合,换无 FBS 培养基培养 24 h,使细胞生长同步化。随机分组并设置空白组,DMSO 组,冬凌草甲素低、中、高质量浓度(1,3,9 mg·L⁻¹)组,继续培养 24 h 后,吸取各组上清液,1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。按照试剂盒说明书操作,最终所得混匀液立即在酶联免疫检测仪上测定 A(450 nm 波长)。

2.3 斑马鱼胚胎体节间血管生成 无病原体(Fli1-GFP)斑马鱼,鱼龄 1 年。设置健康雌雄斑马鱼(1:2)交配盒中,透明板隔离雌雄斑马鱼,放置人工气候箱中,过夜;第 2 天,抽掉隔板,雌雄斑马鱼交配繁殖,体外受精,获得受精卵,30 min 后收集受精卵并用 EM 冲洗后移入培养皿,置人工气候箱内继续孵育至 6 h。随机分组并设置空白组,冬凌草甲素低、中、高质量浓度(40,80,160 mg·L⁻¹)组。取 96 孔板,按实验不同分组,每孔加入工作液 200 μL,将孵育 6 h 的健康胚胎随机放入各孔中,每孔 1 枚,即每组 10 枚胚胎。于人工气候箱中继续孵育至 72 h,用 EM 润洗,4% 多聚甲醛液固定,4 ℃ 冰箱内放置过夜,PBS 液冲洗后分别将斑马鱼小仔鱼取出置载玻片上,荧光倒置显微镜下观察体节间血管生长情况。根据体节间血管生成数目计算抑制率。

体节间血管生成抑制率 = (血管生成数_{空白组} - 血管生成数_{试验组}) / 血管生成数_{空白组} × 100%

2.4 成鱼尾部损伤后血管再生检测 健康斑马鱼成鱼, 鱼龄 11 个月, 分别麻醉后, 迅速在操作台上固定, 按同一标准(垂直鱼腹侧尾鳍)剪去部分尾鳍, 迅速放回。随机分组并设置空白组, 冬凌草甲素低、中、高质量浓度(50, 100, 200 mg·L⁻¹)组。各组雌雄对半, 每组 6 只, 饲养于鱼房。第 4 d 将各组斑马鱼取出, 麻醉后在荧光倒置显微镜下观察尾部血管再生情况。

2.5 相对荧光定量 PCR 法检测基因表达量 样本准备同 2.3, 设置空白组, 冬凌草甲素低、中、高质量浓度(40, 80, 160 mg·L⁻¹)组, 每组 20 枚胚胎。总 RNA 提取, 纯度, 浓度测定: 将各实验组样本分别取出置研磨器中, 加 1 mL 总 RNA 抽提试剂 Trizol 研磨均匀, 室温静置 5 min; 加入四氯化碳 0.2 mL, 震荡 15 s, 室温静置 3 min, 于 4 °C, 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min; 取上层水相 0.4 mL, 加入等量异丙醇, 室温静置 10 min, 于 4 °C, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min; 弃上清液, 加 75% 预冷乙醇, 于 4 °C, 7 500 r·min⁻¹ 离心 5 min; 弃去上清液, 晾干沉淀, 加 DEPC 水 20 μL 溶解。采用紫外分光光度计测定并计算浓度, 并用 1% 琼脂糖凝胶电泳辅助检测。cDNA 合成: 取上述合格的 RNA 样品, 根据浓度计算体积配比用量, 使各取样量均为 0.5 μg, 按照 RT 试剂盒说明书具体操作。采用相对荧光定量法, 按 DRR041 SYBR 荧光定量试剂盒的说明书具体操作, 选用 ABI PCR 仪, 并用 Real-time PCR System 软件设置实验程序和进行数据分析处理。基因引物序列分别为: VEGFA (1 498 bp), 5'-CAGCTGTCAAGAGTGCCTACATAC-3', 3'-CATCAGGGTACTCCTGCTGAATTC-5'; VEGFR2 (1 547 bp), 5'-TCACATGTTTGGTAGAGGATCTC-3', 3'-GTGCAGTTGATCCTCTGCAAATGAG-5'; VEGFR3 (1 284 bp), 5'-TCTGTCCGATTTGGATTGGGA-3', 3'-TTGGTGTGTCAAGGCTGGG-5'; β-actin (1 174 bp), 5'-CGAGCAGGAGATGGGAACC-3', 3'-CAACGGAAACGCTCATTGC-5'。

2.6 数据处理 采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析, 组间差异采用 *t* 检验, 计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 冬凌草甲素对 CMEC 的抑制效应 冬凌草甲素能明显抑制 CMEC 的活性, 半数抑制浓度(IC₅₀) 8.04 mg·L⁻¹。与空白组比较, DMSO 组、冬凌草甲

素各浓度组中血管内皮细胞的细胞活力, VEGF 含量明显降低(*P* < 0.05, *P* < 0.01), 细胞抑制率升高。见表 1。

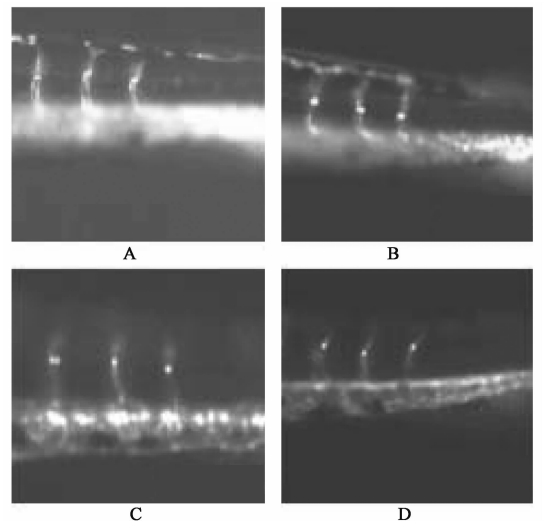
表 1 冬凌草甲素对 CMEC 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of oridonin on CMEC ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	A ₅₇₀	细胞抑制率/%	A ₄₅₀
空白	-	0.62 ± 0.018	-	66.15 ± 3.15
DMSO	-	0.61 ± 0.025	1.61	67.58 ± 1.33
冬凌草甲素	1	0.57 ± 0.046 ¹⁾	8.06	56.60 ± 3.61 ²⁾
	3	0.47 ± 0.033 ²⁾	24.19	46.63 ± 7.98 ²⁾
	9	0.29 ± 0.041 ²⁾	53.22	34.48 ± 3.92 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01 (表 2~4 同)。

3.2 冬凌草甲素对斑马鱼胚胎体节间血管生成的抑制效应 冬凌草甲素能抑制斑马鱼胚胎期体节间血管发育, 主要表现在使体节间血管直径明显减少, 见图 1。以尾部倒数三根体节间血管直径平均值对比各组血管生成情况, 中、高浓度冬凌草甲素组明显使血管直径减少, 但体节间血管生成数量没有明显差异, 见表 2。



A. 空白组; B~D. 冬凌草甲素低、中、高(40, 80, 160 mg·L⁻¹)组
图 1 冬凌草甲素对斑马鱼胚胎期体节间血管生成的影响(荧光显微镜, ×20)

Fig. 1 Comparison of intersegment vessels growth in zebrafish (fluorescent microscope, ×20)

3.3 冬凌草甲素对成鱼尾部损伤后血管再生的抑制效应 冬凌草甲素可抑制成鱼尾部损伤后血管再生的密度, 使同一截面血管节点数减少, 与空白组比较, 低、中、高浓度冬凌草甲素组血管节点数和血管再生长度明显减少或降低(*P* < 0.05, *P* < 0.01)。见图 2, 表 3。

表 2 冬凌草甲素对体节间血管直径和体节间血管数量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of oridonin on diameter and total number of intersegment vessels ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	直径/μm	数量/个
空白	-	9.53 ± 1.47	28.8 ± 0.63
冬凌草甲素	40	9.13 ± 0.64	28.3 ± 0.67
	80	7.45 ± 0.39 ¹⁾	28.2 ± 0.58
	160	3.02 ± 0.96 ²⁾	28.2 ± 0.79

表 4 冬凌草甲素对斑马鱼体内相关基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 4 Effect of oridonin on gene expression in the larvae of experimental groups ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

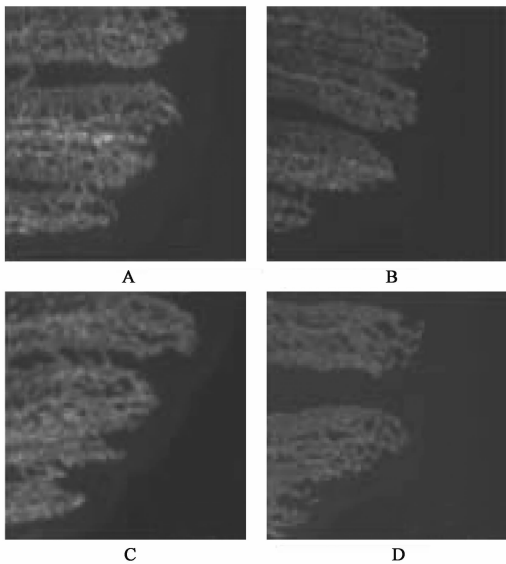
组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	VEGFA	VEGFR2	VEGFR3
空白	-	7.21 ± 0.29	6.37 ± 0.57	9.62 ± 2.91
冬凌草甲素	40	5.65 ± 0.64 ¹⁾	5.43 ± 0.30 ¹⁾	6.83 ± 0.43
	80	4.07 ± 0.37 ¹⁾	4.68 ± 0.22 ¹⁾	5.12 ± 0.39 ¹⁾
	160	2.95 ± 0.41 ²⁾	2.73 ± 0.73 ¹⁾	3.56 ± 0.41 ¹⁾

4 讨论

目前抑制血管生成药物的筛选模型主要有血管内皮细胞增殖、移行、成管分析,鸡胚血管生成,大鼠动脉环微血管模型等,但这些体外实验结果最终仍需要借助整体模型评价和验证^[4]。斑马鱼自 20 世纪 70 年代受到关注以来,在相关研究领域倍受青睐。2012 年,国家斑马鱼资源中心在中国科学院水生生物研究所正式挂牌成立;我国现有 250 多个实验室利用斑马鱼开展有关科研工作^[5]。近些年斑马鱼生物模式在中医药研究中的应用非常多^[6]。斑马鱼是一种具有高通量,操作较简单,实验周期短,药品用量少等优点的整体动物模型。

一些血管生成药物作用于斑马鱼与其在哺乳动物中的效果相近,证明利用斑马鱼筛选血管生成药物的有效性^[7]。人类很多基因也已在斑马鱼中克隆得到,且具有相似功能^[8]。Fli-GFP 转基因斑马鱼在荧光显微镜下观察血管再生情况更加便捷和可靠。因此,Fli-GFP 转基因斑马鱼是研究血管生成的独特模型^[9]。斑马鱼胚胎早期发育过程中,血管生成模式比较简单,主要出现在头部和躯干部体节间,即体节间血管^[10]。斑马鱼的鱼鳍均可再生,但尾鳍结构相对简单,手术操作容易,损伤后不影响生存,因此成为研究创伤愈合和恢复的首选模型^[11]。另外,相关文献已证明 DMSO 助溶剂 (< 0.1%) 对斑马鱼相关实验无影响^[12-13],因此本实验分组未设置 DMSO 溶剂组。本实验选择 Fli-GFP 转基因斑马鱼,研究冬凌草甲素对斑马鱼胚胎期血管生成和成鱼期尾部损伤后血管再生的活性,证明冬凌草甲素具有很好的抑制血管生成的作用;很好地检验和证实了体外冬凌草甲素具有抑制心脏微血管内皮细胞活性。

表型的改变往往涉及相关基因的变化。VEGF 是血管内皮细胞生长和分化的首要因子,在血管生成过程中非常关键^[14-16]。另外,VEGF 能刺激内皮



A. 空白组; B ~ D. 冬凌草甲素低、中、高 (50, 100, 200 mg·L⁻¹) 组
图 2 冬凌草甲素对成鱼尾部损伤及尾部血管再生的影响 (荧光显微镜, ×20)

Fig. 2 Effect of oridonin on tail-cutting model of adult fish and comparison of vascular regeneration (fluorescent microscope, ×20)

表 3 冬凌草甲素对血管再生长度和血管节点数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of oridonin on vascular regeneration length and number of vascular nodes ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	血管再生长度 /μm	血管节点数 /个
空白	-	159.84 ± 22.78	19.9 ± 1.37
冬凌草甲素	50	134.98 ± 12.92 ¹⁾	16.6 ± 0.84 ²⁾
	100	120.73 ± 11.06 ¹⁾	15.7 ± 0.53 ²⁾
	200	83.19 ± 8.46 ²⁾	14.3 ± 1.56 ²⁾

3.4 冬凌草甲素抑制体内 VEGF 信号通路上相关基因的表达 与空白组比较,冬凌草甲素各剂量组 VEGFA, VEGFR2, VEGFR3 基因的表达量均明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4。

细胞芽生并形成新的血管,在骨骼分化和伤口愈合中也发挥重要作用^[17-19]。因此,VEGF 信号通路为潜在的抗血管生成治疗研究方向。VEGF 信号通路中,VEGFA 在 VEGF 家族中对血管生成有重要影响,在生理性和病理性血管的调节中发挥重要作用^[20-23]。VEGFR2 是首要的调节血管生成活性的受体,可通过 VEGF 通路调节内皮细胞生成、迁移、分化和成管^[24-25]。沉默的 VEGFR2 可抑制血管生成活性^[26-28]。此外,VEGFR3 在早期参与血管形成和造血,尤其在脑部和肾小管的发育中可能起重要作用^[29]。斑马鱼 VEGF 介导的血管生成模型研究血管生成便捷、有效^[30]。本研究结果显示,冬凌草甲素主要通过抑制 VEGF 通路中 VEGFA, VEGFR2, VEGFR3 基因的表达,从而起到抑制血管生成的作用。

抗血管生成因子治疗相关疾病具有一些严重的副作用,如血压升高、出血等,限制了其在疾病早期以及疾病人群的使用^[31-32]。因此,研究者更倾向开发安全有效的基于 VEGF 信号通路的靶向小分子药物。已有研究表明,冬凌草甲素具有一定的抑制血管生成活性;且冬凌草甲素可通过 Notch 信号通路抑制肿瘤生长和转移^[33-34]。本研究主要从 VEGF 信号通路探讨冬凌草甲素的抗血管生成活性及作用机制,对冬凌草甲素的抗肿瘤血管生成治疗提供依据,冬凌草甲素可以通过抗血管生成作用抑制肿瘤生长,为冬凌草甲素药效的进一步开发提供了基本资料。

[参考文献]

[1] Folkman J. Tumor angiogenesis:therapeutic implications [J]. N Engl J Med,1971,285(21):1182-1186.
[2] Carmeliet P. Angiogenesis in life,disease and medicine [J]. Nature,2005,438(7070):932-936.
[3] Carmeliet P, Jain R K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis[J]. Nature,2011,473(7347):298-307.
[4] 吴家明,陆茵,郝明,等. 血管生成实验模型研究进展 [J]. 中国药理学通报,2008,24(1):11-14.
[5] 孙永华. 国家斑马鱼资源中心简介[J]. 遗传,2013,35(4):549-550.
[6] 田丽莉,朱国福. 斑马鱼在中药研究中的应用[J]. 中国中药杂志,2015,40(5):822-827.
[7] Serbedzija G N, Flynn E, Willett C E. Zebrafish angiogenesis: a new model for drug screening [J]. Angiogenesis,1999,3(4):353-359.

[8] Dooley K, Zon L I. Zebrafish: a model system for the study of human disease [J]. Curr Opin Genet Dev, 2000,10(3):252-256.
[9] Kidd K R, Weinstein B M. Fish for novel angiogenictherapies [J]. Br J Pharmacol, 2003, 140(4):585-594.
[10] Childs S, Chen J N, Garrity D M, et al. Patterning of angiogenesis in the zebrafish embryo[J]. Development, 2002,129(4):973-982.
[11] 严丽锋,顾爱华. 斑马鱼在再生医学研究中得应用及进展[J]. 遗传,2013,35(7):856-866.
[12] Hallare A, Nagel K, Köhler H R, et al. Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (Danio rerio) embryos [J]. Ecotoxicol Environ Saf,2006,63(3):378-388.
[13] 田丽莉,董建勇,黄长江,等. 莪术醇对斑马鱼的血管生成活性及作用机制研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(12):1822-1825.
[14] Dumont D J, Fong G H, Puri M C, et al. Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development[J]. Dev Dyn,1995,203(1):80-92.
[15] Tufro A, Norwood V F, Carey R M, et al. Vascular endothelial growth factor induces nephrogenesis and vasculogenesis[J]. J Am Soc Nephrol,1999,10(10):2125-2134.
[16] Rousseau S, Houle F, Huot J. Integrating the VEGF signals leading to actin-based motility in vascular endothelial cells[J]. Trends Cardiovasc Med,2000,10(8):321-327.
[17] Gerhardt H. VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting [J]. Organogenesis,2008,4(4):241-246.
[18] Gerber H P, Vu T H, Ryan A M, et al. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation [J]. Nat Med,1999,5(6):623-628.
[19] Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene [J]. Nature, 1996, 380 (6573): 439-442.
[20] Holmes D I, Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease[J]. Genome Biol,2005,6(2):209.
[21] Smith B D, Smith G L, Carter D, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein levels in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma [J]. J Clin Oncol, 2000, 18 (10):

- 2046-2052.
- [22] Foekens J A, Peters H A, Grebenchtchikov N, et al. High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2001, 61 (14): 5407-5414.
- [23] Ferrara N. VEGF and the quest for tumor angiogenesis factors [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2 (10): 795-803.
- [24] Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis [J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312 (5): 549-560.
- [25] Olsson A K, Dimberg A, Kreuger J, et al. VEGF receptor signalling-in control of vascular function [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7 (5): 359-371.
- [26] Ferrara N, Gerver H P, Le Couter J. The biology of VEGF and its receptors [J]. *Nat Med*, 2003, 9 (6): 669-676.
- [27] Kowanetz M, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways; therapeutic perspective [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12 (17): 5018-5022.
- [28] Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2006, 39 (5): 469-478.
- [29] 姜利军,周晓曦,于飞,等. FLT4 基因在斑马鱼早期发育过程中的表达 [J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12 (12): 2224-2227.
- [30] 杨少丽,薛钦昭,王艳,等. 血管内皮生长因子及其受体在斑马鱼胚胎血管发育中的作用 [J]. *生物物理学报*, 2009, 25 (1): 1-8.
- [31] Kamba T, Mc Donald D M. Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer [J]. *Br J Cancer*, 2007, 96 (12): 1788-1795.
- [32] Noble M E, Endicott J A, Johnson L N. Protein kinase inhibitors; insights into drug design from structure [J]. *Science*, 2004, 303 (5665): 1800-1805.
- [33] Meade Tollin L C, Wijeratne E M, Cooper D, et al. Ponicidin and oridonin are responsible for the antiangiogenic activity of *Rabdosia rubescens*, a constituent of the herbal supplement PC SPES [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67 (1): 2-4.
- [34] Dong Y, Zhang T, Li J, et al. Oridonin inhibits tumor growth and metastasis through anti-angiogenesis by blocking the Notch signaling [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (12): e113830.

[责任编辑 张丰丰]