

当归补血汤抑制与肿瘤共培养血管内皮细胞的增殖及其分子机制

张三印*, 冯蓓, 杨苗
(成都中医药大学, 成都 611137)

[摘要] 目的:通过当归补血汤对与肿瘤共培养血管内皮细胞增殖及分子表达的研究,探讨当归补血汤抑制肿瘤血管生成的可能机制。方法:应用 Transwell 建立与肿瘤共培养血管内皮细胞模型(以下简称共培养模型),在不同剂量当归补血汤的干预下,通过 CCK-8 法观察与肿瘤共培养血管内皮细胞的增殖作用;通过 ELISA 法检测与肿瘤共培养血管内皮细胞血管内皮生长因子(VEGF)及其受体(VEGFR1, VEGFR2, sVEGFR1, sVEGFR2)的表达。结果:当归补血汤能够促进正常血管内皮细胞增殖,与正常组比较,高、中、低剂量组均有差异性($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$);抑制与肿瘤共培养血管内皮细胞增殖,且与剂量呈正相关,与共培养模型组比较,各剂量组均有显著差异($P < 0.01$)。当归补血汤各剂量组均能促进与肿瘤共培养血管内皮细胞 VEGF 的表达;抑制与肿瘤共培养血管内皮细胞 VEGFR1, VEGFR2 的表达,且与剂量呈正相关;促进与肿瘤共培养血管内皮细胞 sVEGFR1, sVEGFR2 的表达。结论:当归补血汤能够抑制与肿瘤共培养血管内皮细胞的增殖,其机制可能与其调节 VEGF 与 VEGFR 和 sVEGFR 两种受体的结合有关。

[关键词] 当归补血汤; 与肿瘤共培养血管内皮细胞; 细胞增殖; 分子机制

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0163-05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121107.1345.016.html>

[网络出版时间] 2012-11-7 13:45

Effect of Danggui Buxue Decoction on Proliferation and its Molecular Mechanism in Tumor Vascular Endothelial Cells

ZHANG San-yin*, FENG Pei, YANG Miao
(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Danggui Buxue decoction (DBD) on proliferation in tumor vascular endothelial cells, and to explore the mechanism of inhibition of tumor angiogenesis. **Method:** After different doses of DBD acting on vascular endothelial cells (EA. Hy926) co-cultured with the tumor cells (A549) model, CCK-8 assay was used to observe the proliferation of vascular endothelial cells co-cultured with the tumor cells; enzyme-cinked immunosorbant assay (ELISA) was used for assay of vascular endothelia growth factor (VEGF) and its receptors (VEGFR1, VEGFR2, sVEGFR1, sVEGFR2) and expression of vascular endothelial cells co-cultured with the tumor cells. **Result:** Compared with normal group, vascular endothelial cells co-cultured with tumor cells proliferation capacity increased ($P < 0.01$); DBD each dose group could promote the proliferation of normal endothelial cells, inhibit the proliferation of vascular endothelial cells co-cultured with tumor cells with a manner of dose and effect, compared with model group, there was significant difference ($P < 0.01$). DBD each dose could promote vascular endothelial cell co-cultured with tumor cells expression of VEGF, compared with model group, co-cultured of high dose group and dose group showed a significantly different ($P < 0.01$). Co-culture

[收稿日期] 20120821(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81001497);国家教育部博士点新教师基金项目(20095132-120008);四川省科技厅杰出青年学术技术带头人培育计划项目(2011JQ0030)

[通讯作者] *张三印,副教授, Tel:028-61800157, E-mail: tcmzsy@126.com

model group was significantly up-regulate VEGFR1, VEGFR2 expression, the groups DBD inhibited the expression of VEGFR1, VEGFR2 and showed a dose relationship. Co-cultured with tumor vascular endothelial cells in model group decreased expression of sVEGFR1 and sVEGFR2, each dose group of DBD could promote sVEGFR1 and sVEGFR2 expression, showed a dose relationship. **Conclusion:** DBD can Inhibit proliferation of vascular endothelial cells co-cultured with the tumor cells. The mechanism might be related to regulation of VEGF and its receptors

[Key words] DBD; vascular endothelial cells co-cultured with the tumor cells; cell proliferation; molecular mechanism

当归补血汤(Danggui Buxue decoction, DBD)出自金元时期《内外伤辨惑论》,组成为炙黄芪一两、当归二钱。具有补气生血,扶正固本等功效,为治疗血虚的名方,主治劳倦内伤,气血虚弱,以及妇人经行、产后血虚发热、头痛,或疮疡溃后久不愈合等症。有研究显示 DBD 能诱导血管内皮生长因子(VEGF) mRNA 的表达^[1],促进内皮细胞增殖、迁移而诱导血管生成^[2]。但同时 DBD 在临床治疗肿瘤时,可使患者生活质量、Karnofsky 评分、症状缓解等都有明显的改善^[3],基础研究也显示其可减慢肿瘤生长速度,延长荷瘤小鼠的生存时间^[4]。我们课题组前期研究发现,DBD 可抑制肿瘤组织微血管密度(MVD)。DBD 通过诱导 VEGF 表达促进血管生成的同时,为什么又能通过抑制肿瘤组织微血管密度而抑制肿瘤生长呢?本实验通过 DBD 调控与肿瘤共培养血管内皮细胞的增殖及分子表达,探讨其抑制肿瘤血管生成的可能机制。

1 材料

1.1 试剂 RPMI 1640 细胞培养基(Gibco,美国),标准胎牛血清(FBS, Boster, 中国),0.25%胰酶消化液(Hyclone, 美国),HAT Supplement(GIBCO, 美国),双抗(Penicillin-Streptomycin Solution, Hyclone, 美国)。二甲基亚砷(DMSO, Sigma, 美国),VEGF(ELISA 试剂盒,欣博盛,中国),VEGFR1 ELISA 试剂盒,VEGFR2 ELISA 试剂盒,Cell Counting Kit-8 试剂盒(CCK-8)羊抗兔 IgG-Biotin,兔 IgG-1/2KIT, DAB 显色试剂盒,兔抗人-八因子试剂盒(均为 Boster, 武汉),sVEGFR1 ELISA 试剂盒,sVEGFR2 ELISA 试剂盒(均为 Bio-Swamp, 中国)。

1.2 仪器 MCO-15AC 型恒温孵育箱(日本三洋),SW-CJ-2F 型超净工作台(中国苏州),Varioskan Flash 多功能酶联免疫检测仪(美国 Thermo)。

1.3 DBD 药液的配制 当归(批号 110517)、黄芪(批号 110509691)均购自成都中医药大学附属医院

中药房。取黄芪、当归适量(黄芪-当归 5:1),依照传统方法水煎煮 3 次混合加热浓缩成 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DBD,冷却后装瓶置于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。将浓缩后的 DBD,以 $5\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 10 min,小心吸取上清液,反复离心 3 次,吸取上清液,置于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,长期保存置于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中待用。用时将浓缩后的 DBD 以 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 的滤网过滤除菌,以 1640 培养基稀释。

1.4 细胞株 人脐静脉内皮细胞系(EA.hy926)细胞由四川电子科技大学生物物理学实验室提供。人肺癌细胞系(A549)引自中科院上海细胞生物研究所细胞库。

2 方法

2.1 人脐静脉内皮细胞系(EA.hy926)的培养、传代和鉴定 EA.hy926 细胞在含 10% 胎牛血清(FBS)、2 mL 双抗(青霉素 $10\,000 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,链霉素 $10\,000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)和 2 mL HAT Supplement 的 RPMI 1640 培养基中于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 混合空气的恒温孵箱中常规培养,隔天换液 1 次。细胞生长融合后,以 0.25% 的胰酶等体积消化细胞,显微镜下观察细胞变小变圆后,弃消化液,加入含 10% 胎牛血清(FBS)、双抗和 HAT Supplement 的 RPMI-1640 培养基,吹打并调整细胞密度至 1×10^5 个/mL,传代于 25 cm^2 一次性培养瓶中继续培养。采用 SABC 免疫组化法经第八因子鉴定为内皮细胞。

2.2 A549 的培养和传代 A549 在含 10% 胎牛血清(FBS)和双抗(青霉素 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,链霉素 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$)的 RPMI-1640 培养基中于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 混合空气的恒温孵箱中常规培养,隔天换液 1 次。细胞生长融合后,以 0.25% 的胰酶等体积消化细胞,收集, $1\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 5 min,弃上清,加入含 10% 胎牛血清(FBS)、双抗(青霉素 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,链霉素 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$)的 RPMI-1640 培养基,调整细胞密度至 1×10^5 个/mL,传代于 25 cm^2 1 次性培养瓶中继续培养。

2.3 与肿瘤共培养血管内皮细胞模型的建立 参照 Nikolai N. Khodarev^[5] (图1) 实验组共培养方法,将生长融合的 A549 细胞和 EA.hy926 细胞以 0.25% 的胰酶等体积消化,吹打,离心,收集细胞并调整密度为 1×10^4 个/mL 和 1×10^5 个/mL,以 1:10 的比例分别接种在 Transwell 小室的上室和下室中,下室以无血清 1640 培养基培养,上室以含 10% FBS 的 1640 培养基培养,共培养 24 h。

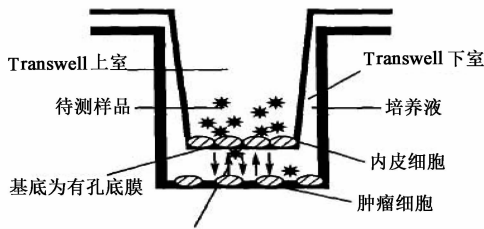


图1 Transwell 模型(引用张巧奇,《肿瘤》2004,24(3):226)

2.4 DBD 对正常血管内皮细胞增殖的影响 实验分为正常内皮细胞组(以下简称正常组)、DGD 高剂量组($15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、DGD 中剂量组($7.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、DGD 低剂量组($3.75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),细胞接种密度为 1×10^5 个/mL,24 孔板每孔接种 500 μL ,每组 6 个复孔,各组按照前述方法进行培养,24 h 后各组分别给予含有相应浓度 DBD 药液的培养基,24 h 后,弃培养液,每孔加入 200 μL 1640 培养基后,再加入 CCK-8 溶液 20 μL (避光),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,将 24 孔板中液体移出 100 μL 至 96 孔板中,450 nm 波长下,在酶联免疫检测仪上测定各孔的吸光度(A)。

2.5 DBD 对与肿瘤共培养血管内皮细胞增殖的影响 实验分为正常内皮细胞组(以下简称正常组)、内皮细胞与 A549 细胞共培养组(以下简称共培养组)、DGD 高、中、低剂量组($15, 7.5, 3.75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。按上述方法进行共培养、给药并测定各孔的 A。

2.6 DBD 对与肿瘤共培养血管内皮细胞 VEGF 及其受体表达的影响 根据 2.5 方法进行细胞培养及给药,收集各组细胞及培养上清液于已灭菌的 1.5 mL EP 管中,将培养上清以 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min 后,小心吸取上清液于已灭菌的 1.5 mL EP 管中用 ELISA 方法测定 VEGF 含量;将收集的细胞先以 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,弃去上清液,加入少量去离子水清洗两次,再次离心,弃上清,在每个 EP 管中加入 100 μL 的去离子水,使用细胞破碎仪破碎细胞 2 min,再次以 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,小心收集上清液于 EP 管中,如有云絮状物质,则再次离心,收集上清液用 ELISA 方法测定受体的表达。

2.7 统计分析 采用 SPSS 17.0 统计程序包对计

量资料进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析比较多组均数间差异的显著性,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对正常血管内皮细胞增殖的影响 DBD 能够促进正常血管内皮细胞增殖,与正常组比较,高、中、低剂量组均有差异性($P < 0.01, P < 0.05$),见表 1。

表1 当归补血汤 DBD 对正常血管内皮细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	A
正常	-	0.716 ± 0.005
当归补血汤	15	$1.113 \pm 0.012^{2)}$
	7.5	$1.036 \pm 0.041^{2)}$
	3.75	$0.816 \pm 0.009^{1)}$

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 对与肿瘤共培养血管内皮细胞增殖的影响 与正常组比较,与肿瘤共培养血管内皮细胞增殖能力增加($P < 0.01$);DBD 能够抑制与肿瘤共培养血管内皮细胞增殖,且与剂量呈正相关,与模型组比较,各剂量组均有显著差异($P < 0.01$)。见表 2。

表2 当归补血汤对与肿瘤共培养血管内皮细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	A
正常	-	0.716 ± 0.005
共培养模型	-	$1.137 \pm 0.046^{1)}$
当归补血汤	15	$0.813 \pm 0.012^{2)}$
	7.5	$0.905 \pm 0.011^{3)}$
	3.75	$0.981 \pm 0.001^{3)}$

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与共培养模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 3~5 同)。

3.3 DBD 对与肿瘤共培养血管内皮细胞 VEGF 表达的影响 在 VEGF 的表达上,DBD 各剂量组均能促进与肿瘤共培养血管内皮细胞 VEGF 的表达,与模型组比较,高剂量组和中剂量组有显著差异($P < 0.01$)。见表 3。

3.4 DBD 对与肿瘤共培养血管内皮细胞 VEGFR1, VEGFR2 表达的影响 在 VEGFR 的表达上,共培养模型组 VEGFR1, VEGFR2 表达显著升高,而 DBD 各剂量组能够抑制共培养模型 VEGFR1, VEGFR2 的表达,且与剂量呈正相关。见表 4。

3.5 DBD 对与肿瘤共培养血管内皮细胞 sVEGFR1, sVEGFR2 表达的影响 在 sVEGFR 的表达上,共培养模型组 sVEGFR1, sVEGFR2 表达下降, DBD 各剂量组均能促进共培养模型 sVEGFR1,

表 3 当归补血汤对共培养血管内皮细胞 VEGF 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $g \cdot L^{-1}$	VEGF/ $ng \cdot L^{-1}$
正常		14.75 ± 1.38
共培养模型		5.37 ± 0.38
当归补血汤	15	55.51 ± 10.34 ¹⁾
	7.5	34.00 ± 4.58 ¹⁾
	3.75	8.79 ± 1.59

表 4 当归补血汤对共培养血管内皮细胞 VEGFR 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$) $ng \cdot L^{-1}$

组别	剂量/ $g \cdot L^{-1}$	VEGFR1	VEGFR2
正常	-	1 303.13 ± 67.97	1 326.94 ± 58.07
共培养模型	-	2 127.08 ± 217.20 ¹⁾	1 806.11 ± 48.62 ¹⁾
当归补血汤	15	1 428.13 ± 76.70 ³⁾	1 422.78 ± 112.19 ³⁾
	7.5	1 753.13 ± 145.49 ²⁾	1 563.06 ± 68.12 ²⁾
	3.75	2 011.46 ± 97.06	1 789.44 ± 149.04

sVEGFR2 的表达,并与剂量呈正相关。见表 5。

表 5 当归补血汤对共培养血管内皮细胞 sVEGFR 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$) $ng \cdot L^{-1}$

组别	剂量/ $g \cdot L^{-1}$	sVEGFR1	sVEGFR2
正常	-	1 143.15 ± 78.35	1 232.50 ± 79.01
共培养模型	-	794.07 ± 30.53 ¹⁾	697.87 ± 46.04 ¹⁾
当归补血汤	15	1 376.48 ± 85.45 ³⁾	1 134.63 ± 100.28 ³⁾
	7.5	1 272.49 ± 83.34 ³⁾	986.16 ± 74.45 ³⁾
	3.75	986.67 ± 64.67 ²⁾	876.75 ± 62.21 ²⁾

4 讨论

血管生成是指在原有的毛细血管或微静脉基础上通过血管内皮细胞的增殖和迁移,从已存在的血管处以出芽或内填的方式生成新的、以毛细血管为主的血管系统的过程。肿瘤的生长和转移依赖于肿瘤血管新生,如果没有血管生成增加,原发性肿瘤一般不会超过 2 mm³,肿瘤细胞可合成和释放多种细胞因子,诱导血管内皮细胞的增殖和迁移,参与肿瘤血管新生^[6],美国哈佛大学及波士顿儿童医院 Folkman 证实抑制血管新生就可抑制肿瘤生长以后^[7],肿瘤血管内皮细胞来源于周围的正常血管内皮细胞,血管内皮细胞长期处于肿瘤微环境中,即体外建立肿瘤细胞与血管内皮细胞共培养模型,可使内皮细胞表现出肿瘤血管内皮细胞的生物学特性,可作为体外研究肿瘤血管的理想模型^[8]

当归补血汤出自金元时期《内外伤辨惑论》卷

之《暑伤胃气论》,由黄芪和当归以 5:1 比分组成的,功效补气生血,为治疗血虚的名方,主治劳倦内伤,气血虚弱,以及妇人经行、产后血虚发热、头痛,或疮疡溃后久不愈合等症^[9-14]。现代药理研究证明,当归补血汤能通过诱导血管内皮细胞分泌 VEGF,促进血管内皮细胞增殖、迁移及血管生成,治疗缺血性疾病^[1-2,15-16]。本实验研究也显示当归补血汤能诱导正常血管内皮细胞分泌 VEGF,促进其增殖,与文献报道一致^[1,16],同时,本实验也表明当归补血汤也能促进与肿瘤共培养血管内皮细胞 VEGF 的表达,但抑制与肿瘤共培养血管内皮细胞的增殖。也就是说,当归补血汤作用于不同的内皮细胞均能诱导其分泌 VEGF,但对能促进正常内皮细胞增殖,而对肿瘤内皮细胞表现出抑制其增殖作用。为了进一步探讨其机制,我们研究了当归补血汤对肿瘤血管内皮细胞 VEGF 受体表达的影响。

VEGF 的受体主要包括两类:①VEGFR(血管内皮细胞生长因子受体)为血管生成中的关键性促血管生成因子,与 VEGF 结合后,促进内皮细胞增殖和血管生成^[17]。②sVEGFR(可溶性血管内皮生长因子受体)是 VEGF 跨膜受体的剪接变体,有很强的抗血管生成作用,它能竞争性与 VEGF 结合,阻断 VEGF 发挥生物学效应,从而抑制血管内皮细胞增殖,阻挠血管生成^[18-19]。sVEGFR 包括 sVEGFR1 和 sVEGFR2 两种可溶性受体。天然存在血管化角膜的动物体及先天性无虹膜症患者的角膜上无 sVEGFR 的表达^[20],而在海牛同属海牛目的儒艮等动物的角膜上有 SVEGFR 的表达,角膜透明无血管^[21]。可见 sVEGFR 的表达与抑制血管生成相关。VEGF 与 sVEGFR1 结合后,不再具有酪氨酸蛋白激酶的功能,VEGF 胞内信号传导通路被阻断,失去原有刺激血管内皮细胞增生的作用。sVEGFR1 还是一个拮抗受体,它能阻断 VEGF 与内皮细胞结合,进而与内皮细胞膜上 VEGFR 的结合,从而阻断内皮细胞增殖及血管生成^[22]。VEGF/KDR (VEGFR2) 在 VEGF 信号传导和血管内皮细胞生成中起主导作用^[23],而 sVEGFR2 能竞争性的结合 VEGF,从而阻断 VEGF/KDR,抑制血管内皮细胞增殖和血管生成^[7]。VEGFR 和 sVEGFR 作为 VEGF 的两种作用截然相反的受体,与 VEGF 结合后分别产生促进血管生成和抑制血管生成的作用。本研究结果显示当归补血汤作用于与肿瘤共培养血管内皮细胞时能抑制 VEGFR1 和 VEGFR2 的表达,促进 sVEGFR1 和 sVEGFR2 的表达。由此可见当归补血汤抑制血管

内皮细胞增殖的分子机制可能与其调控 VEGF 与 VEGFR 和 sVEGFR 两种受体的结合有关。

[参考文献]

[1] 王培利,雷燕,林燕林,等.当归补血汤含药血清对培养内皮细胞生长因子受体表达的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2006,4(3):209.

[2] 雷燕,王培利,林燕林,等.当归补血汤煎剂对实验性心肌梗死衰老大鼠缺血心肌的促血管生成作用[J].中国中医基础医学杂志,2005,11(12):892.

[3] 朱栋元,马廷行.当归补血口服液对肿瘤患者生活质量及免疫功能影响的临床研究[J].中华现代内科学杂志,2006,3(4):1021.

[4] 袁国红,庞晓静,马鹤超.当归补血汤对疝瘤小鼠的影响及对环磷酰胺化疗的增效减毒作用[J].中西医结合学报,2008,6(1):83.

[5] Nikolai N Khodarev, Jianqing Yu, Edwardine Labay, et al. Tumour-endothelium interactions in co-culture: coordinated changes of gene expression profiles and phenotypic properties of endothelial cells [J]. J Cell Science, 2003, 116 (6):1013.

[6] 刘锐,王海杰.内皮祖细胞与肿瘤血管新生[J].国际病理科学与临床杂志,2006,26(4):325.

[7] Folkman J. Tumor angiogenesis; therapeutic implications [J]. N Engl J Med, 1971, 258: 1182.

[8] 王新红,殷莲华,金惠铭. VEGF 高表达的胶质瘤细胞对体外共培养微血管内皮细胞的作用[J]. 中国微循环,2002,6(1):11.

[9] 李霞,马家骅,李楠,等.当归补血汤表征参数与其补气功效的关系初探[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(12):146.

[10] 马家骅,李霞,熊永爱,等.当归补血汤表征参数与其益气补血功效的关系初探[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(22):111.

[11] 李霞,马家骅,李楠,等.当归补血汤相状态的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(2):1.

[12] 徐瑞荣,崔兴,王琰,等.当归补血汤促进小鼠骨髓移植后造血组织重建的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(10):39.

[13] 范颖,陈信义.当归补血汤源流及配伍效用关系研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(10):61.

[14] 阴赅宏,李兰芳,金亚宏,等.当归补血汤的实验研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,1998,4(6):58.

[15] 杨丽霞,卢雯玲,牛洁,等.当归注射液、黄芪注射液不同配比促鸡胚绒毛尿囊膜模型血管生成的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(9):51.

[16] 吴岩,毕立夫,龚莉.当归补血汤对内皮细胞和骨髓造血细胞的增殖和分化的作用[J]. 内蒙古医学院学报,2005,27(3):169.

[17] Tuomas Tammela, Berndt Enholm, Kari Alitalo, et al. The biology of vascular endothelial growth factors [J]. Cardiovascular Research,2005,65:550.

[18] 李然伟,刘禄成,李哲,等.可溶性血管内皮生长因子受体 2 片段的表达及其对血管内皮细胞增殖的影响[J]. 中国生物制品学杂志,2008,21(2):85.

[19] TSATSARIS V, GOFFIN F, MINAUT C. Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(1):5555.

[20] Ramaesh T, Collinson J M, Ramaesh K, et al. Corneal abnormalities in Pax6 small eye mice mimic human aniridia-related keratopathy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2003,44:1871.

[21] Harper J Y, Samuelson D A, Reep R L. Corneal vascularization in the Florida Manatee and three-dimensional reconstruction of vessels [J]. Vet Ophthalmol,2004,8:89.

[22] Roeck W, Hecht D, Sztajer H, et al. Differential binding characteristics and cellular inhibition by soluble VEGF receptor 1 and 2 [J]. Exp Cell Res,1998,141(1):161.

[23] Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis [J]. Exp Cell Res, 2006, 312 (5):549.

[24] Byrne A M, Bouchier-Hayes D J, Harmey J H. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor(VEGF) [J]. J Cell Mol Med, 2005,9(4):777.

[责任编辑 聂淑琴]