

蝎毒多肽提取物抑制 H₂₂ 肝癌血管生成的作用机制研究

隋文文^{1,2} 张维东¹ 武利存¹ 张月英¹ 王兆朋¹ 王朝霞¹ 贾青¹

摘要 **目的** 探讨蝎毒多肽提取物抗肿瘤血管生成的机制。**方法** 建立 H₂₂ 肝癌皮下荷瘤模型,随机分为荷瘤对照组(对照组),蝎毒多肽提取物(polypeptide extract from scorpion venom, PESV)高、低剂量组,5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)组,每组 10 只。连续干预 14 天。绘制肿瘤体积生长曲线并计算抑瘤率;HE 染色观察各组肿瘤组织病理变化;采用 SP 法检测各组肿瘤组织微血管密度(microvessel density, MVD)。采用免疫组织化学法及 Western blot 法检测各组磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、磷酸化蛋白激酶 B(phosphoprotein kinase B, P-Akt)、缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)、血管内皮生长因子-A(vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A)蛋白表达。**结果** 5-Fu 组, PESV 高、低剂量组抑瘤率分别为 64.8%、43.7% 和 32.4%。与对照组比较,三个给药组 PI3K、P-Akt、HIF-1 α 、VEGF-A 蛋白表达明显下调($P < 0.05$, $P < 0.01$), PESV 高、低剂量组 MVD 均降低($P < 0.05$)。**结论** PESV 可抑制 H₂₂ 肝癌血管生成,其机制可能与抑制肿瘤微环境中 PI3K、P-Akt、HIF-1 α 、VEGF-A 的表达有关。

关键词 蝎毒多肽提取物; H₂₂ 肝癌; 血管生成; 缺氧诱导因子-1 α ; 血管内皮生长因子-A

Study on the Mechanism of Polypeptide Extract from Scorpion Venom on Inhibition of Angiogenesis of H₂₂ Hepatoma SUI Wen-wen^{1,2}, ZHANG Wei-dong¹, WU Li-cun¹, ZHANG Yue-ying¹, WANG Zhao-peng¹, WANG Zhao-xia¹, and JIA Qing¹ 1 Department of Pathology, Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan (250062), China; 2 School of Medicine and Life Sciences, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan (250062), China

ABSTRACT **Objective** To explore the mechanism of polypeptide extract from scorpion venom (PESV) on inhibiting angiogenesis. **Methods** The H₂₂ hepatoma tumor model was established by subcutaneously implanting H₂₂ hepatoma cells into mice. The tumor-bearing mice were randomly divided into 4 groups, i.e., the control group, the high dose PESV group, the low dose PESV group, and the 5-fluorouracil (5-Fu) group, 10 mice in each group. The intervention was lasted for 14 days. The growth curve of the tumor volume was drawn and the inhibition rate calculated. Pathological changes of the tumors were observed by HE staining. The microvessel density (MVD) was detected using SP method. The protein expression levels of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), phosphoprotein kinase B (P-Akt), hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), and vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) were detected by immunohistochemical assay and Western blot. **Results** The tumor inhibitory rate was 64.8%, 43.7%, and 32.4% in the 5-Fu group, the high dose PESV group, and the low dose PESV group. Compared with the control group, the protein expression of PI3K, P-Akt, HIF-1 α , and VEGF-A were obviously inhibited by PESV and 5-Fu ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The MVD also decreased in the high and low dose PESV groups ($P < 0.05$). **Conclusions** PESV could inhibit the angiogenesis of H₂₂ hepatoma. The mechanisms might be associated with suppressing the expression of PI3K, P-Akt, HIF-1 α , and VEGF-A.

KEYWORDS polypeptide extract from scorpion venom; H₂₂ hepatoma; angiogenesis; hypoxia-inducible factor-1 α ; vascular endothelial growth factor-A

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81073102; No. 30873408); 山东省自然科学基金资助项目(No. ZR2010HQ003)

作者单位:1. 山东省医学科学院基础医学研究所病理室(济南 250062); 2. 山东省医学科学院医学与生命科学学院(济南 250062)

通讯作者:张维东, Tel: 0531-82919939, E-mail: zhangweidongkui@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.05.0581

蝎毒多肽提取物 (polypeptide extract from scorpion venom, PESV) 是从东亚钳蝎蝎毒中提取分离的抗肿瘤有效成分, 为含 50 ~ 60 个氨基酸的多肽混合物, 具有多种生物活性。研究证实, PESV 在体内具有显著的抗肿瘤作用^[1,2], 可改善荷瘤机体免疫功能抑制状态, 但其防治肿瘤血管生成的机制还未完全阐明。肿瘤血管生成在肿瘤的发生发展过程中起着至关重要的作用^[3]。近年来抗肿瘤血管治疗成为防治肿瘤研究的热点。本研究以小鼠 H₂₂ 肝癌为研究对象, 体内观察 PESV 对肿瘤血管生成的影响, 并通过检测 PESV 对肿瘤组织磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、磷酸化蛋白激酶 B (phospho-protein kinase B, P-Akt)、缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)、血管内皮生长因子-A (vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A) 的影响, 探讨 PESV 抑制肿瘤血管生成的可能机制, 为临床肿瘤的治疗提供实验依据。

材料与方法

1 细胞株 H₂₂ 肝癌小鼠腹水瘤种, 由山东省医学科学院药物所提供, 腹水瘤种每 7 天传 1 次, 第 2 代用于实验。

2 实验动物 6 ~ 8 周龄清洁级昆明种小鼠 40 只, 雄性, 体重 18 ~ 22 g, 购自山东大学实验动物中心, 合格证号: SCXK (鲁) 20090001。小鼠适应性饲养 3 天, 本实验在山东省医学科学院基础医学研究所病理实验室进行。

3 药物 蝎毒冻干粉购自邹平县蝎蚁生物科技有限公司, 蛋白含量 $\geq 80\%$; PESV 由本课题组研制, 取蝎毒冻干粉溶解 (0.025 g/mL, pH 7.4), 离心半径 6.95 cm, 5 000 r/min 离心 30 min, 0.45 μ m 和 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 将超滤物冻干。取超滤蝎毒冻干粉 400 mg 加磷酸缓冲液, 经葡萄糖凝胶层析, 收集蝎毒Ⅲ (Ⅳ蛋白峰, 再进行阳离子交换层析, 紫外分光光度计 (吸收波长 280 nm) 检测, 收集 PESV 蛋白峰。PESV 在 HPLC 色谱显示有 4 个峰, 主峰占总面积的 45.1%^[4] 则说明 PESV 制作成功。用前以生理盐水稀释至合适浓度。5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-Fu) 购自天津金耀氨基酸有限公司 (10 mL: 0.25 g, 批号: 1210181)。

4 试剂及仪器 PI3 Kinase p110 α (批号: 4249), Phospho-Akt (批号: Ser473, 批号: 4060) 一抗及 β -actin (批号: 4970) 单克隆抗体购自 Cell Signaling; HIF-1 α (批号: bs-0737R), VEGF-A (批

号: bs-1957R) 一抗及山羊抗兔 IgG/辣根酶标记二抗 (批号: bs-0295G-HRP) 购自北京博奥森生物技术有限公司; DAB 二氨基联苯胺显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司; Western blot 相关试剂购自江苏碧云天生物技术研究; Beckman Allegra 64 R 台式高速冷冻离心机购自美国贝克曼库尔特有限公司; Leica DM4000B 光学显微镜购自德国徕卡仪器有限公司; 德国 Leica QwinV3 图像分析软件; Image J 图像分析软件。

5 模型制备、分组及干预方法 无菌抽取肿瘤细胞, 用生理盐水稀释, 调整细胞密度至 10^7 个/mL 后, 于每只小鼠右腋下注射 0.2 mL 肿瘤细胞悬液 (第 0 天), 接种后第 5 天, 测量肿瘤体积均达 50 ~ 80 mm³, 造模成功率 100%。将成瘤小鼠随机分为荷瘤对照组 (对照组), 5-Fu 组, PESV 高、低剂量组, 每组 10 只。5-Fu 组于接种后第 7、10、13、16、19 天腹腔注射 5-Fu (20 mg/kg^[5]); PESV 高 (40 mg/kg^[6], 0.2 mL)、低剂量 (10 mg/kg, 0.2 mL) 组每天灌胃 1 次; 对照组等体积生理盐水灌胃, 实验共进行 21 天。

6 检测指标及方法

6.1 肿瘤体积增长曲线测绘及抑瘤率计算 从用药当天开始, 隔日用游标卡尺测量肿瘤长径 (A) 和垂直短径 (B), 计算肿瘤体积, 公式: $V = A \times B^2 / 2$, 测绘肿瘤体积增长曲线。末次给药 24 h 后, 脱颈处死小鼠, 完整剥离肿瘤组织, 称重并计算抑瘤率 (inhibitory rate, IR), 公式: $IR (\%) = (\text{对照组平均瘤重} - \text{给药组平均瘤重}) / \text{对照组平均瘤重} \times 100\%$ 。

6.2 H₂₂ 肝癌组织形态学观察 肿瘤组织置于 10% 中性甲醛中固定 24 h, 石蜡包埋切片 (4 μ m), 脱蜡至水, HE 染色 5 min, 盐酸酒精分化, 反蓝, HE 染色 5 min, 脱水, 透明, 中性树胶封片, 观察 H₂₂ 肝癌组织形态。

6.3 H₂₂ 肝癌组织微血管密度 (microvessel density, MVD)、PI3K、P-Akt、HIF-1 α 及 VEGF-A 蛋白表达灰度值检测 每组各取 10 个样本, 以中性福尔马林固定, 石蜡包埋切片 (4 μ m), 采用 SP 检测法。严格按照试剂盒说明书操作, DAB 显色。显微镜下观察结果。CD34 标记血管内皮细胞, 阳性结果以胞浆呈现棕黄色染色。PI3K、P-Akt 阳性结果均为细胞质或细胞膜着色, 胞浆内出现明显的棕褐色颗粒或棕黄色颗粒。HIF-1 α 表达于细胞核和细胞质, VEGF-A 表达于细胞浆或胞浆和胞膜上, 均以呈现棕黄色或褐色为阳性结果。用显微镜图像采集系统采集图像, 采用双盲法检测 CD34、PI3K、P-Akt、HIF-1 α 、VEGF-A 的

染色强度,每张切片随机选取 5 个视野(×200)阳性着色区域,并用 Leica QwinV3 图像分析软件进行灰度值的半定量分析,数值范围:0~255,取其平均值即为该例灰度值。蛋白表达量与灰度值呈负相关,即灰度值越高,蛋白表达越低。MVD 参考 Weidner N 等^[7]方法,即首先在低倍镜(×40 和 ×100)下选取癌视野中微血管最密集的 3 个区域,然后在高倍镜(×400)下进行计数,取平均值进行统计分析。

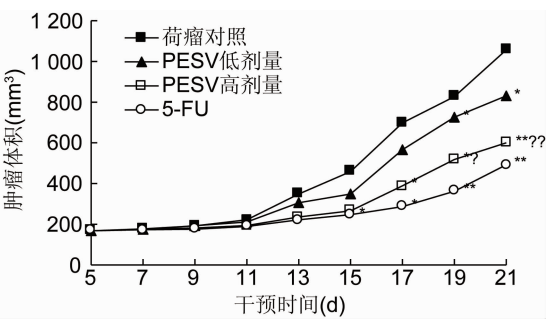
6.4 H₂₂ 肝癌组织 PI3K、P-Akt、HIF-1α 及 VEGF-A 蛋白表达检测 采用 Western blot 半定量检测法。每组取肿瘤组织 100 mg 加裂解液提取组织总蛋白,用 BCA 法测蛋白浓度,总蛋白 100 ℃ 加热变性 10 min。配置 10% 分离胶及 5% 浓缩胶,加样,电泳后转移至 PVDC 膜,经 5% 脱脂奶粉进行抗原封闭后加入相应一抗(兔抗 PI3K、P-Akt 单克隆抗体,兔抗 HIF-1α、VEGF-A 多克隆抗体)4 ℃ 过夜,PI3K 和 P-Akt 按 1:1 000 稀释,HIF-1α 和 VEGF-A 按 1:500 稀释。TBS 洗膜后加入山羊抗兔 IgG/辣根酶标记二抗,室温孵育 1.5 h,DAB 显影,Image J 软件分析 PI3K、P-Akt、HIF-1α、VEGF-A 条带。

7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件,所有计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间数据比较采用 One-way ANOVA 进行检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠一般状态比较 对照组与 PESV 高、低剂量组及 5-Fu 组比较,小鼠状态较差,饮食量较少,活动度欠佳。在接种后第 19 天时,对照组小鼠死

亡 1 只,可能原因为肿瘤体积过大,超过机体消耗。
2 各组小鼠体质量、瘤重、肿瘤体积及 IR 比较 (图 1,表 1) 随着干预时间的增长,各组小鼠移植瘤的体积逐渐增加,5-Fu 组,PESV 高、低剂量组分别从第 15、17、19 天起与对照组肿瘤体积比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组比较,三个给药组瘤重降低,肿瘤体积缩小($P < 0.01, P < 0.05$),与 PESV 低剂量组比较,PESV 高剂量组瘤重降低,肿瘤体积缩小($P < 0.05, P < 0.01$)。



注:与对照组同期比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 PESV 低剂量组同期比较,Δ $P < 0.05$,ΔΔ $P < 0.01$

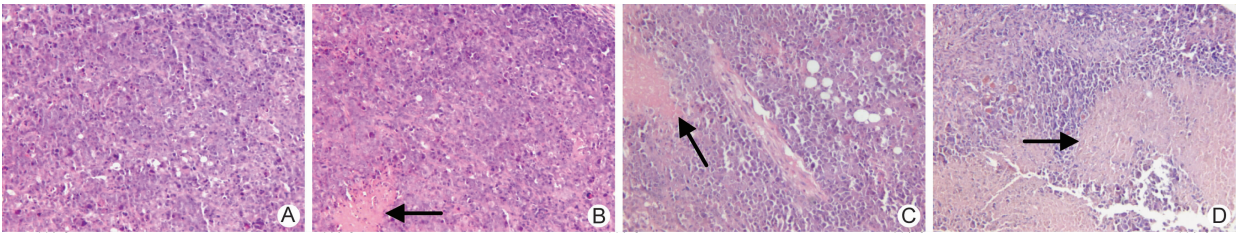
图 1 各组 H₂₂ 肝癌小鼠肿瘤体积增长曲线

3 各组肿瘤组织形态学结果比较(图 2) 对照组新生血管丰富,坏死区较少且面积较小,少见核固缩、核碎裂等凋亡形态学改变。5-Fu 组可见多个大面积片状坏死区,大部分肿瘤细胞呈现核固缩、核碎裂等多种凋亡形态学改变。PESV 高、低剂量组肿瘤组织内可见多个片状坏死,微血管减少,肿瘤细胞可见核固缩,核碎裂等多种凋亡形态学改变,癌巢周围有单核细胞浸润。

表 1 各组小鼠体质量、瘤重、肿瘤体积及 IR 比较 ($\bar{x} \pm s$)

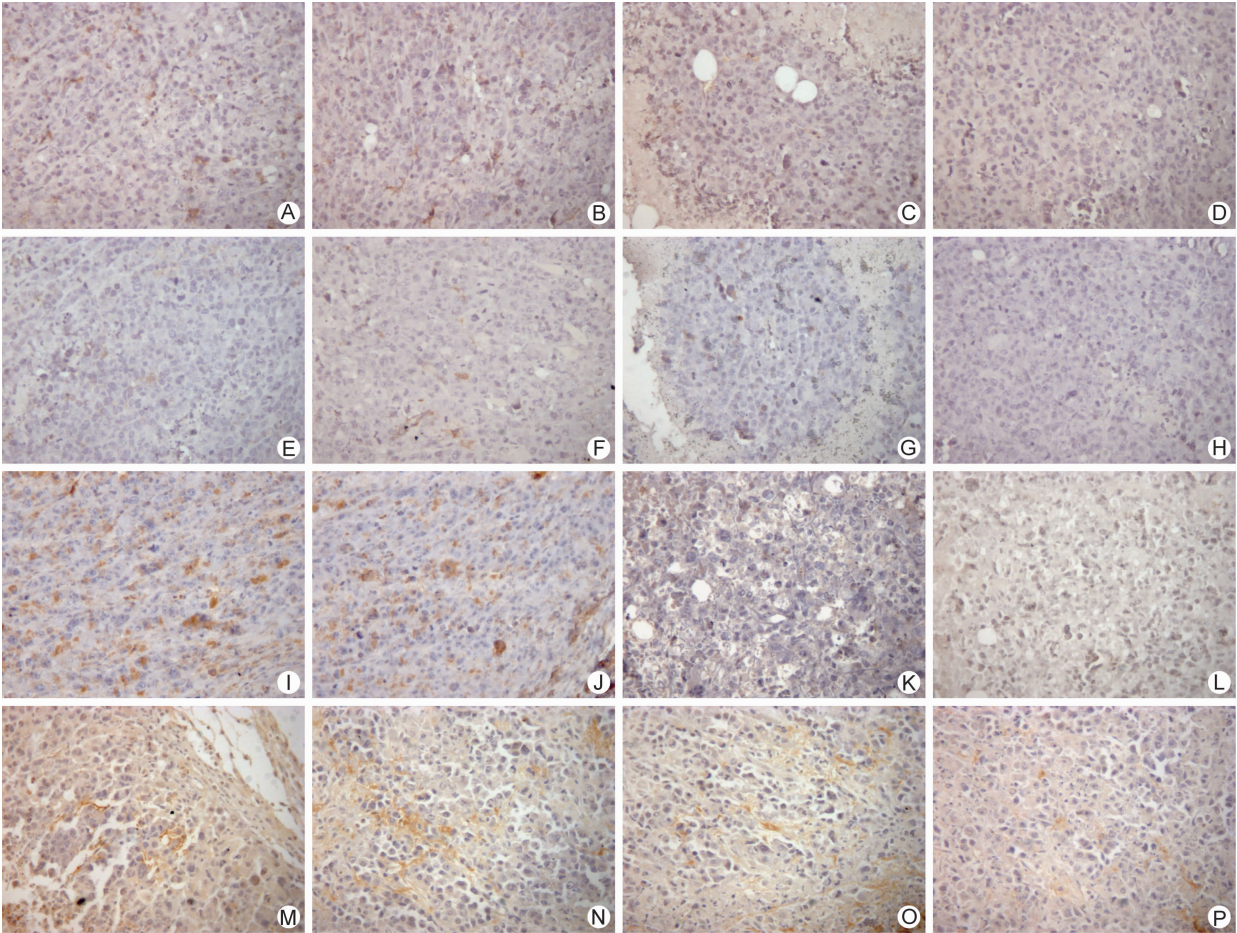
组别	剂量(mg/kg)	n	小鼠体质量(g)		瘤重(mg)	肿瘤体积(mm ³)	IR(%)
			干预前	干预后			
对照	—	9	22.8±2.2	25.6±3.7	0.71±0.13	1 057±16	—
5-Fu	20	10	23.5±1.4	23.9±1.5	0.25±0.06**	834±8**	64.8
PESV 低剂量	10	10	22.9±1.0	24.6±4.5	0.49±0.04*	600±9*	32.4
PESV 高剂量	40	10	24.0±2.5	25.2±2.9	0.40±0.05**Δ	492±7**ΔΔ	43.7

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 PESV 低剂量组比较,Δ $P < 0.05$,ΔΔ $P < 0.01$;下表同



注:A 为对照组;B 为 PESV 低剂量组;C 为 PESV 高剂量组;D 为 5-Fu 组;黑色箭头表示坏死区

图 2 各组 H₂₂ 肝癌组织形态学结果 (HE, ×200)



注:A、E、I、M 为对照组;B、F、J、N 为 PESV 低剂量组;C、G、K、O 为 PESV 高剂量组;D、H、L、P 为 5-Fu 组;A ~ D 为 PI3K 表达;E ~ H 为 P-Akt 表达;I ~ L 为 HIF-1 α 表达;M ~ P 为 VEGF-A 表达

图 3 各组肿瘤组织 PI3K、P-Akt、HIF-1 α 、VEGF-A 蛋白表达 (SP, $\times 400$)

表 2 各组肿瘤组织 PI3K、P-Akt、HIF-1 α 、VEGF-A 蛋白表达平均灰度值比较 (平均灰度值, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	n	PI3K	P-Akt	HIF-1 α	VEGF-A
对照	—	9	122 $\pm$ 8	146 $\pm$ 4	104 $\pm$ 3	107 $\pm$ 6
PESV 低剂量	10	10	135 $\pm$ 5 *	160 $\pm$ 10 *	117 $\pm$ 5 *	119 $\pm$ 5 *
PESV 高剂量	40	10	156 $\pm$ 7 ** Δ	189 $\pm$ 4 ** Δ	142 $\pm$ 9 ** Δ	144 $\pm$ 5 ** Δ
5-Fu	20	10	166 $\pm$ 6 **	195 $\pm$ 4 **	174 $\pm$ 6 **	168 $\pm$ 7 **

4 各组肿瘤组织 PI3K、P-Akt、HIF-1 α 、VEGF-A 蛋白表达比较(图 3,表 2) 与对照组比较,三个给药组 PI3K、P-Akt、HIF-1 α 、VEGF-A 蛋白表达平均灰度值升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 PESV 低剂量组比较,PESV 高剂量组 PI3K、P-Akt、HIF-1 α 、VEGF-A 蛋白表达平均灰度值均升高($P < 0.05$)。

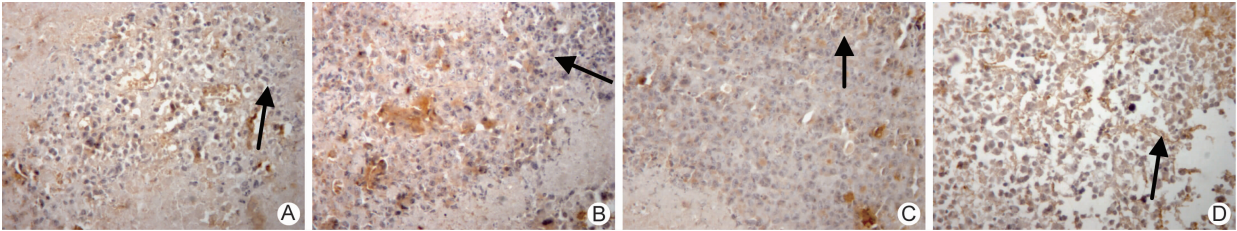
5 各组肿瘤组织 MVD 比较(表 3,图 4) 与对照组比较,三个给药组 MVD 均降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 PESV 低剂量组 MVD 比较,PESV 高剂量组 MVD 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

6 各组肿瘤组织 PI3K、P-Akt、HIF-1 α 、VEGF-A

表 3 各组肿瘤组织 MVD 比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	n	MVD
对照	—	9	7.7 $\pm$ 1.4
PESV 低剂量	10	10	5.4 $\pm$ 1.5 *
PESV 高剂量	40	10	5.3 $\pm$ 1.6 *
5-Fu	20	10	4.4 $\pm$ 1.8 **

蛋白表达比较(表 4,图 5) 与对照组比较,三个给药组 PI3K、P-Akt、HIF-1 α 、VEGF-A 表达均降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 PESV 低剂量组比较,PESV 高剂量组 PI3K、P-Akt、HIF-1 α 、VEGF-A 蛋白表达均降低($P < 0.05$)。

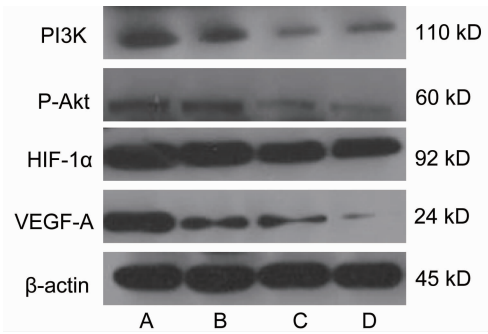


注:A 为对照组;B 为 PESV 低剂量组;C 为 PESV 高剂量组;D 为 5-Fu 组;箭头指示血管

图 4 各组肿瘤组织 MVD 结果 (SP, ×400)

表 4 各组肿瘤组织 PI3K、P-Akt、HIF-1α、VEGF-A 相对蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	n	PI3K	P-Akt	HIF-1α	VEGF-A
对照	—	5	0.898 ± 0.013	1.054 ± 0.005	1.028 ± 0.008	1.038 ± 0.008
PESV 低剂量	10	5	0.794 ± 0.011 *	1.030 ± 0.007 *	0.988 ± 0.008 *	0.912 ± 0.008 *
PESV 高剂量	40	5	0.708 ± 0.008 **△	0.968 ± 0.008 **△	0.938 ± 0.008 **△	0.800 ± 0.010 **△
5-Fu	20	5	0.672 ± 0.008 **	0.910 ± 0.007 **	0.878 ± 0.008 **	0.604 ± 0.008 **



注:A 为对照组;B 为 PESV 低剂量组;C 为 PESV 高剂量组;D 为 5-Fu 组

图 5 各组肿瘤组织 PI3K、P-Akt、HIF-1α、VEGF-A 蛋白表达

讨 论

新生血管的形成是肿瘤生长和发展的关键。新生血管的生成不仅为肿瘤生长提供氧气和营养物质,而且在肿瘤的侵袭和转移中也发挥着重要作用。因此,抗血管生成治疗是很有前景的癌症治疗策略。蝎毒具有镇痛、抗肿瘤、抗癫痫、免疫调节等多种生物学作用,并作为一种传统中药被应用于多种疾病的治疗。前期研究发现 PESV 具有抗血管生成活性,能抑制人脐静脉内皮细胞的增殖活性,抑制鸡胚尿囊膜新生血管生成^[1,8]。进一步研究还发现 PESV 可通过影响血管生成因子 VEGF、HIF-1α 和第 10 号染色体同源性丢失性张力蛋白-磷酸酶基因 (phosphatase and tensin homology deleted on chromosome Ten, PTEN) 的表达而直接抑制细胞增殖、抑制血管生成^[4]。研究已证实,68% 的人类常见恶性肿瘤 (胃癌、食管癌、肺癌、乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌等) 和癌前病变中均有 HIF-1α 蛋白的高表达^[9,10]。肿瘤组织缺氧是新生血

管形成的始动因素,缺氧反应基因的调控主要是由 HIF-1 来实现^[11,12]。缺氧时肿瘤组织内 HIF-1α 的活性增加,通过多种途径上调 VEGF 的表达,进而促进肿瘤血管生成^[13]。VEGF 能够直接刺激血管内皮细胞的分裂增殖,最直接地参与和诱导肿瘤血管的形成^[14]。MVD 通常用来判断肿瘤微血管的生长情况,是评价血管生成的金标准。有文献报道 VEGF 的表达与 MVD 值呈正相关^[15]。本实验发现 PESV 低剂量组 H₂₂ 肝癌小鼠移植瘤生长明显减慢,随着给药剂量的增加,高剂量组移植瘤体积较低剂量组明显缩小。PESV 高、低剂量组间瘤重及肿瘤体积差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。本实验研究结果也表明了 PESV 干预后 H₂₂ 肝癌组织中 HIF-1α、VEGF-A 的表达减少。PESV 高、低剂量组 HIF-1α、VEGF-A 蛋白表达组间比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

PI3K/Akt 信号通路为细胞内重要的信号转导通路,该通路能通过激活激酶 p70S6K1 和 HDM2 调控 VEGF 和 HIF-1 的表达,促进血管生成^[16]。Akt 是 PI3K 下游作用的靶蛋白,是 PI3K/Akt 信号转导通路的核心,其持续活化与肿瘤的发生密切相关^[15]。抑制内皮细胞中 Akt 的活化能够抑制生长因子诱导的血管生成^[18]。张蕾等^[19]发现 PESV 较好地抑制了 PI3K/AKT 信号转导途径及该通路作用的下游通路,通过影响调控因子促进 K562 细胞的凋亡。本研究利用免疫组织化学法和 Western blot 法检测肿瘤组织中 PI3K、P-Akt 的表达,结果表明与对照组比较, PESV 低剂量能显著降低 H₂₂ 肝癌肿瘤组织中 PI3K、P-Akt 的表达 ($P < 0.05$),且两个蛋白的表达随 PESV 剂量的增大下调更为明显 ($P < 0.01$),与其抑

制血管生成的效应相一致。说明 PESV 较好地抑制了 PI3K/AKT 信号转导途径中 PI3K、P-Akt 信号蛋白的表达,从而通过减少下游信号通路中 HIF-1 α 、VEGF-A 的表达抑制肿瘤血管生成,并藉此抑制肿瘤生长。

综上所述,PESV 能够通过抑制 PI3K、P-Akt 信号蛋白表达,调节 HIF-1 α 、VEGF-A 的表达,从而抑制肿瘤血管生成,这可能是 PESV 抑制肿瘤血管生成的机制,这为 PESV 防治肿瘤提供了新的实验依据,并为开发新的抗肿瘤药物提供了新的思路。对于 PESV 抗肿瘤血管生成的具体成分及其对肿瘤的作用和作用机制还需要进一步研究证实。

参 考 文 献

- [1] 张维东,崔亚洲,姚成芳,等.蝎毒多肽提取物抗肿瘤血管生成作用的实验研究[J].中国药理学通报,2005,21(6):708-711.
- [2] 张维东,张月英,王朝霞,等.蝎毒多肽提取物对肿瘤生长和细胞免疫功能的影响[J].山东大学学报(医学版),2007,45(3):286-289.
- [3] Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(6):401-410.
- [4] 王晓慧,王兆朋,张月英,等.蝎毒多肽提取物对 A549 细胞增殖抑制作用机制研究[J].中国中药杂志,2012,37(11):1620-1623.
- [5] 张晓月,张维东,王兆朋,等.阿司匹林对小鼠 S180 肉瘤生长及血管和淋巴管生成的影响[J].山东大学学报(医学版),2013,51(1):1-6.
- [6] 宁云娜,张维东,武利存.等.蝎毒多肽提取物促进环磷酸胺抑制 Lewis 肺癌的作用机制研究[J].中国中西医结合杂志,2012,32(4):537-542.
- [7] Weider N, Carroll PR, Flax J, et al. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma[J]. Am J Pathol, 1993, 143(2):401-409.
- [8] 张维东,崔亚洲,贾青,等.蝎毒多肽提取物对小鼠 S180 肉瘤和 H₂₂ 肝癌血管生成抑制作用的实验研究[J].山东中医药大学学报,2005,29(2):152-155.
- [9] Jiao M, Nan KJ. Activation of PI3 kinase/Akt/HIF-1 (pathway contributes to hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in hepatocellular carcinoma [J]. Int J Oncol, 2012, 40(2):461-468.
- [10] Eckert AW, Kappler M, Schubert J, et al. Correlation of expression of hypoxia-related proteins with prognosis in oral squamous cell carcinoma patients[J]. Oral Maxillofac Surg, 2012, 16(2):189-196.
- [11] Bridges JP, Lin S, Ikegami M, et al. Conditional hypoxia inducible factor-1 α induction in embryonic pulmonary epithelium impairs maturation and augments lymphangiogenesis [J]. Dev Biol, 2012, 362(1):24-41.
- [12] Hu YL, DeLay M, Jahangiri A, et al. Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma[J]. Cancer Res, 2012, 72(7):1773-1783.
- [13] 隋文文,张维东.缺氧诱导因子促进肿瘤血管生成的研究[J].国际肿瘤学杂志,2013,40(6):416-418.
- [14] Feng J, Zhang Y, Xing D. Low-power laser irradiation (LPLI) promotes VEGF expression and vascular endothelial cell proliferation through the activation of ERK/Sp1 pathway[J]. Cell Signal, 2012, 24(6):1116-1125.
- [15] Costa AF, Tasso MG, Mariano FV, et al. Levels and patterns of expression of hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor, glucose transporter-1 and CD105 in adenoid cystic carcinomas with high-grade transformation[J]. Histopathology, 2012, 60(5):816-825.
- [16] Jiang BH, Liu LZ. AKT signaling in regulating angiogenesis[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2008, 8(1):19-26.
- [17] Kumar CC, Madison V. AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors [J]. Oncogene, 2005, 24(50):7493-7501.
- [18] Mehta RR, Yamada T, Taylor BN, et al. A cell penetrating peptide derived from azurin inhibits angiogenesis and tumor growth by inhibiting phosphorylation of VEGFR-2, FAK and Akt [J]. Angiogenesis, 2011, 14(3):355-369.
- [19] 张蕾,杨文华,于文俊,等.PESV 干预 K562 细胞 PI3K/Akt 信号通路凋亡调控的研究[J].天津中医药,2012,29(3):274-277.

(收稿:2013-07-23 修回:2014-02-20)