

文章编号 1672-6634(2024)01-0085-07

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2023060008

益母草注射液通过其生物碱成分上调 Tie-2、 VEGFR2 和 VEGF 促进斑马鱼血管新生

李玉芝¹, 宋肖敏婷¹, 王雯雯¹, 周欣雨¹, 黎娅琳², 任吉霞², 曹治兴¹

(1. 成都中医药大学 药学院、西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137;

2. 聊城大学 生命科学学院, 山东 聊城 252059)

摘要 目的: 研究益母草注射液在斑马鱼血管损伤模型中的促血管生成作用, 并阐明潜在的物质基础和分子机制。方法: 采用 HPLC-PAD 和 TLC 技术检测益母草注射液的主要成分; 利用舒尼替尼诱导转基因 Tg(*flk1*:eGFP) 斑马鱼血管损伤模型, 益母草注射液干预治疗后, 测量斑马鱼节间血管(ISVs)长度, QT-PCR 检测血管生成相关基因的表达水平。结果: 发现益母草注射液的主要成分是水苏碱、胆碱和葫芦巴碱; 其中, 益母草注射液、葫芦巴碱和胆碱可减轻化学诱导的斑马鱼血管损伤, 其作用机制涉及益母草注射液上调 Tie-2、VEGF 和 VEGFR2 的表达, 其主要成分葫芦巴碱上调 Tie-2 和 VEGF 的表达, 胆碱上调 VEGF 和 VEGFR2 的表达。结论: 益母草注射液及其主要生物碱成分可通过上调 Tie-2、VEGFR2 和 VEGF 来促进血管生成。

关键词 益母草注射液; 血管生成; 葫芦巴碱; 胆碱; Tie-2; VEGFR2; VEGF

中图分类号 Q811

文献标志码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Motherwort Injection Promotes Angiogenesis Via Alkaloid-Induced Upregulation of Tie-2, VEGFR2 and VEGF in Zebrafish Model

LI Yuzhi¹, SONG Xiaominting¹, WANG Wenwen¹, ZHOU Xinyu¹,
LI Yalin², REN Jixia², CAO Zhixing¹

(1. Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, Chengdu 611137, China 2 School of Life Sciences, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract Objective: To study the angiogenic effects of motherwort injection in a zebrafish vascular injury model, and to clarify the potential material basis and molecular mechanism. Methods: Using HPLC-PAD and TLC techniques to detect the main components of motherwort injection. Using sunitinib induced transgenic Tg(*flk1*:eGFP) zebrafish vascular injury model, after intervention with motherwort injection, the length of intersegmental blood vessels (ISVs) of zebrafish was measured, and the expression level of angiogenesis-related genes was detected by QT-PCR. Results: It was found that the main components of Leonurus heterophyllus injection were stachydrine, choline and trigonelline. Among them, motherwort injection,

收稿日期: 2023-06-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(82174193, 82374245)资助

通信作者: 任吉霞, 女, 汉族, 博士, 副教授, 研究方向: 生信和药物设计, E-mail: renjixia@lcu.edu.cn; 曹治兴, 男, 汉族, 博士, 副教授, 研究方向: 药理学, E-mail: caozhixing@cdutcm.edu.cn.

trigonelline and choline can alleviate chemically induced zebrafish vascular damage, and its mechanism involves that motherwort injection upregulates the expressions of Tie-2, VEGF and VEGFR2, and its main component trigonelline up-regulates the expressions of Tie-2 and VEGF, and choline up-regulates the expressions of VEGF and VEGFR2. Conclusion: Motherwort injection and its main alkaloid components can promote angiogenesis by up-regulating Tie-2, VEGFR2 and VEGF.

Key words motherwort injection; angiogenesis; trigonelline; choline; Tie-2; VEGF; VEGFR2

0 引言

血管生成在生理和病理生理过程中起着至关重要的作用,它是胎儿发育、伤口愈合和肿瘤生长的重要基础^[1,2]。促进血管生成也是一种潜在的治疗策略,其可通过增加氧和营养供应来促进受损或缺血性组织的修复^[3]。促血管生成疗法有望用于治疗多种组织损伤和缺血性疾病,如外周和冠状动脉疾病、脑梗死、伤口愈合、严重肢体缺血和组织死亡,未来将有超过 5 亿相关患者将受益于该疗法^[4-6]。

益母草(*Leonurus japonicas* Houtt.)是一种草本植物,广泛分布于亚洲,包括中国、韩国、日本和柬埔寨,多被用于调节妇女月经过少,同时,益母草具有活血祛瘀之功效,具有缓解或消除冠心病缺血症状以及通过活血作用治疗心脏病等药理作用^[7,8]。益母草注射液是益母草地上部分提取的生物碱制成,由中国成都第一制药公司研制。临床研究表明,益母草注射液单独使用或联合缩宫素都可有效的减少子宫收缩乏力和产后出血^[9-11]。此外,益母草还被证明可以改善子宫缺血-再灌注损伤,增加子宫平滑肌的收缩强度和收缩频率^[12]。因此,益母草注射液对组织损伤和缺血性疾病都具有一定的治疗作用。

本研究旨在研究益母草注射液的促血管生成活性,并通过鉴定主要生物碱来初步阐明其分子机制。结果发现益母草注射液可通过上调 Tie-2、VEGF 和 VEGFR2 来促进血管生成,其中葫芦巴碱和胆碱(益母草注射液的主要生物碱)是上调这些基因表达的关键成分。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

益母草注射液购自成都第一制药公司;水苏碱、胆碱和葫芦巴碱(纯度 $\geq 98\%$)购自成都 MUST 生物技术公司;将化合物溶解在 DMSO(Sigma-Aldrich, St, Louis, MO)中配制 25 mg/mL 的母液浓度,然后加入到鱼水中以获得所需浓度;TRIzol 试剂购自 Invitrogen(美国加利福尼亚州卡尔斯巴德);iScript cDNA 合成试剂盒和 iQ SYBR Green Supermix 购自 Bio-Rad(Hercules, CA, USA)。

1.2 薄层色谱分离鉴定

益母草注射液样品稀释 4 倍,盐酸水苏碱(4.73 mg)溶于超纯水(4 mL),氢氧化胆碱(6.26 mg)溶于超纯水(4 mL),葫芦巴碱(5.81 mg)溶于超纯水(4 mL),流动相为 EA + 95%乙醇 + H₂O(1:18:24, v/v)的混合物。使用玻璃毛细管将样品点在硅胶板上,15 min 后,将硅胶板从色谱罐中取出,用吹风机干燥,并在日光下使用 Dragendorffs 试剂+碘试剂进行显色观察。

1.3 HPLC-PAD 分析

HPLC-PAD 分析在连接到 SSI Serise 1500 光电二极管检测器(PAD)的 SSI Series 1500 分离模块上进行,使用 Ultimate[®] AQ-C18 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m)分离样品溶液(10 μ L)。检测条件为:流动相 0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液(0.1 mol/L 磷酸氢二钠调节 pH = 5.5),流速 1.0 mL/min,温度 30 $^{\circ}$ C, PAD 扫描范围 210~400 nm。注射前,所有样品均通过 0.22 μ m 微孔膜过滤器进行过滤。

1.4 斑马鱼养殖

血管标记绿色荧光转基因斑马鱼系 Tg(*flk1*; eGFP)得到了成都中医药大学斑马鱼实验平台的支持,根据标准方案培养斑马鱼。成年斑马鱼在鱼水中(pH 7.2~7.5;电导率 500~550 μ S/cm)维持在 28.5 $^{\circ}$ C 的

温度下,14 h 光照和 10 h 黑暗循环,每天两次喂食盐水虾和热带鱼食物。斑马鱼的养护和实验操作依据《美国国立卫生研究院实验动物使用和护理指南》,并经成都中医药大学动物实验伦理委员会批准。

1.5 斑马鱼胚胎的采集和药物治疗方案

通过 3~4 对的 4~8 个月大的 Tg(*flk1*:eGFP)斑马鱼的自然配对获得斑马鱼胚胎。选择健康的 20 hpf(受精后 20 h)胚胎,将其分配到 24 孔板中(每孔 15 个胚胎),并用 1 μg/mL 舒尼替尼处理,4 h 后,将胚胎洗涤三次,并在水中暴露于 0.25、0.5、1、2.4 μL/mL 益母草注射液或 1.612 5、3.125、6.25、12.5、25 μg/mL 主要生物碱(葫芦巴碱、胆碱、水苏碱),以及 1 μg/mL 舒尼替尼中。在 48 hpf 或 72 hpf 时,使用 Leica M165-FC 荧光立体显微镜获得斑马鱼节间血管(ISVs)的荧光图像。为了量化变化趋势,使用 Image J 软件测量 ISVs 总长度,结果表示为三个独立实验的平均值±标准误差。

1.6 RNA 提取和定量逆转录聚合酶链式反应

选择 20 hpf 胚胎,用 4 μL/mL 益母草注射液、12.5 μg/mL 葫芦巴碱或 12.5 μg/mL 胆碱处理 24 h 后,采用 TRIzol 试剂(Invitrogen, Carlsbad, CA)从斑马鱼胚胎中分离总 RNA,然后根据制造商的说明用 iScript 逆转录试剂盒逆转录产生 cDNA,用 iQ SYBR Green Supermix 进行定量实时 PCR(QT-PCR)。以下循环条件用于实时 PCR 分析:55 ℃ 20 min,95 ℃ 1 min,然后 95 ℃ 10 s 和 60 ℃ 30 s 的 40 个循环。表 1 总结了用于 QT-PCR 的引物。

表 1 QT-PCR 引物表
Table 1 QT-PCR Primer Table

Primer name	Primer sequence
VEGF	Forward 5'-GATGTGATTCCCTTCATGGATGTGT-3'
	Reverse 5'-GGATACTCCTGGATGATGTCTACCA-3'
VEGFR2	Forward 5'-TGGAGTTCACGACCCTTTA-3'
	Reverse 5'-CGTCCTTCTTCACCCCTTCA-3'
Tie2	Forward 5'-AGTACCGCCGCGGCCCCAGAA-3'
	Reverse 5'-CCACGCCGAGCTGCTCCTCACT-3'
MMP-2	Forward 5'-GCTGGTGATGAGATGTGGGTAT-3'
	Reverse 5'-TCTTGGTCTTGTGGAAGGAGTAA-3'
MMP-9	Forward 5'-CATATTTGTCCGTCAGCTTTACC-3'
	Reverse 5'-GGGCTTTGCCTCGTTTTCTAC-3'
β-actin	Forward 5'-CGTGACATCAAGGAGAAGCT-3'
	Reverse 5'-TCGTGGATACCGCAAGATTC-3'

1.7 数据统计

所有实验独立重复三次,每组使用 15 个胚胎,所有数据均表示为三个独立实验的平均值±标准偏差。使用单因素方差分析(ANOVA)和 Dunnett 多重比较检验,确定数据的统计显著性, $p<0.05$ 被认为具有统计学意义,使用 GraphPad 5.0 Prism 软件(GraphPad, San Diego, CA, USA)进行分析并可视化数据。

2 结果和讨论

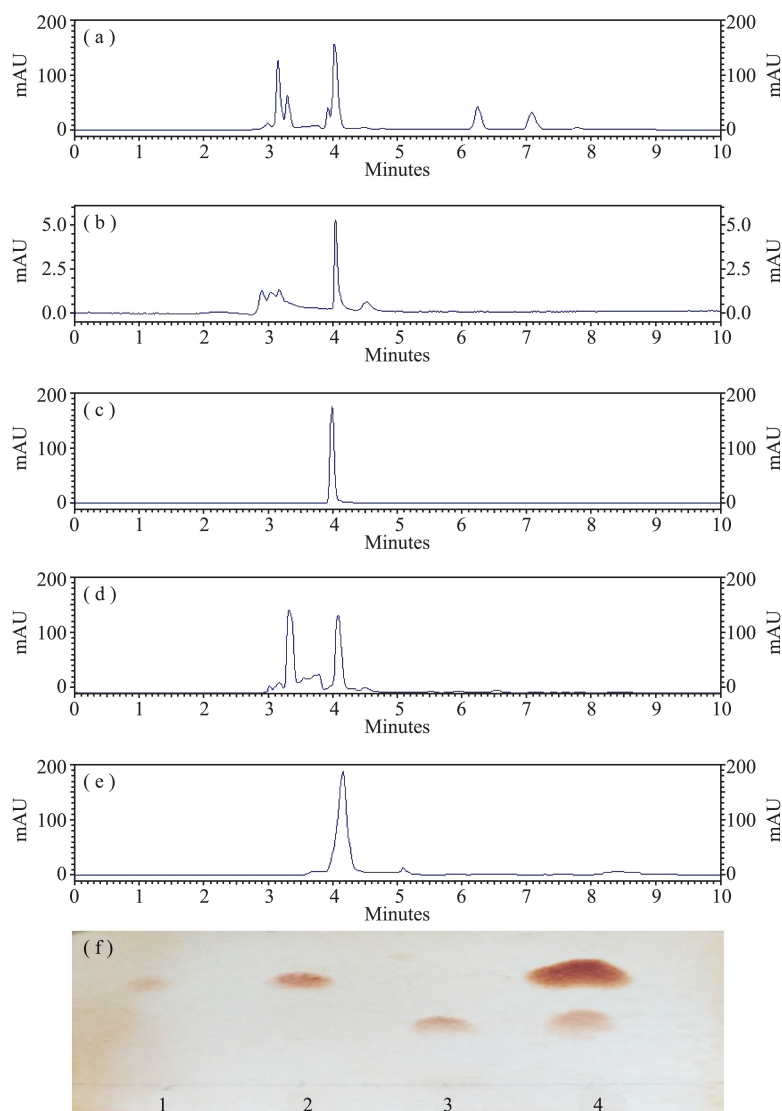
2.1 HPLC/TLC 检测益母草注射液主要成分

He 等人通过大孔树脂/硅胶/Sephadex LH-20/重结晶从 1.6 L 益母草注射液中纯化了 15 种成分,包括 20 g 水苏碱、5 g 胆碱和 2 g 葫芦巴碱^[16]。通过 HPLC-PAD 和 TLC 分析,我们证实了水苏碱、胆碱和葫芦巴碱是益母草注射液的主要成分。HPLC-PAD 结果显示,在 242 nm 的波长下,可检测到样品内两个峰(盐酸水苏碱占 29.4%,葫芦巴碱占 5.1%),它们出现在保留时间(*t*R)约为 4 min 的峰群中。此外,在柱上分离后,胆碱(占 30.1%)在 210 nm 波长下,4.1 min 左右出现。TLC 图片显示,益母草注射液中胆碱是主要成分。

2.2 益母草注射液对斑马鱼血管损伤的影响

使用舒尼替尼建立 *flk1* 启动子 eGFP 转基因斑马鱼系 Tg(*flk1*:eGFP)血管损伤模型,并通过荧光显微镜测量转基因斑马鱼节间血管(ISVs)的长度,以研究益母草注射液的促血管生成作用。结果如图 2 所示,1 μg/mL 的舒尼替尼对血管形成造成显著损伤,并缩短了 Tg(*flk1*:eGFP)斑马鱼胚胎的 ISVs。然而,用舒

尼替尼和益母草注射液(0.5、1、2、4 $\mu\text{L}/\text{mL}$)联合治疗斑马鱼胚胎可显著减轻化学诱导的血管损伤。图 2B 显示了受精后 48 h 和 72 h(hpf)不同组中每个幼虫的 ISVs 总长度。空白对照组的 ISVs 长度分别为 $2\,602 \pm 431(48\text{ h})\mu\text{m}$ 和 $4\,037 \pm 623(72\text{ h})\mu\text{m}$,舒尼替尼治疗组的 ISVs 长度为 $926 \pm 517\mu\text{m}(48\text{ h})$ 和 $1\,768 \pm 583\mu\text{m}(72\text{ h})$,抑制率分别为 65.41%(48 h)和 57.21%(72 h)。1、2、4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 益母草注射液处理后的 ISVs 长度分别为 $1\,539 \pm 534(48\text{ h})\mu\text{m}$ 和 $2\,825 \pm 583(72\text{ h})\mu\text{m}$ 、 $2\,263 \pm 458(48\text{ h})\mu\text{m}$ 和 $3\,687 \pm 684(72\text{ h})\mu\text{m}$ 、 $2\,473 \pm 424(48\text{ h})\mu\text{m}$ 和 $3\,915 \pm 637(72\text{ h})\mu\text{m}$,抑制率分别为 41.85%(48 h)和 26.07%(72 h),14.03%(48 h)和 9.67%(72 h),5.96(48 h)和 4.02(72 h)。

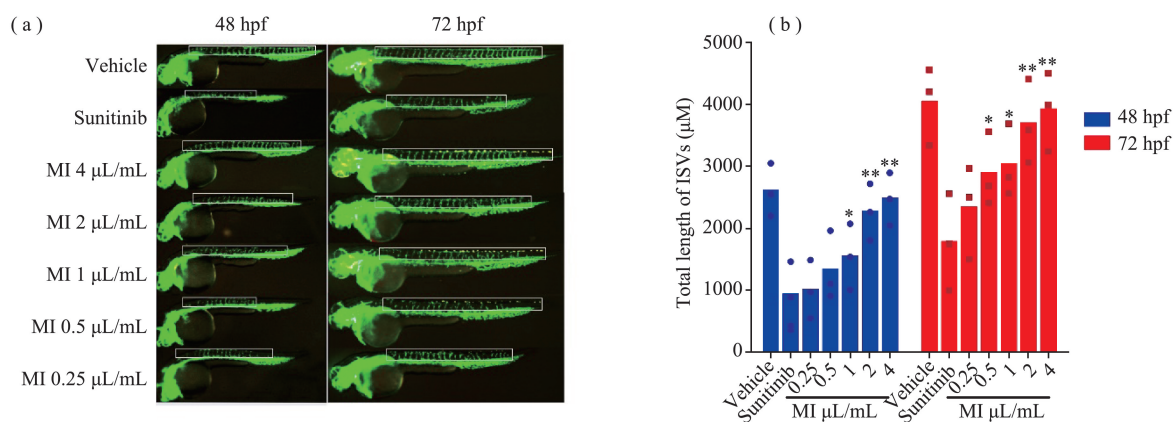


注:(a) 益母草注射液(242nm)的 HPLC 色谱图;(b) 盐酸水苏碱(242nm)的 HPLC 色谱图;(c) 葫芦巴碱(242nm)的 HPLC 色谱图;(d) 益母草注射液(210nm)的 HPLC 色谱图;(e) 氢氧化胆碱(210nm)的 HPLC 色谱图;(f) 薄层色谱图,从左到右依次为 1 葫芦巴碱、2 盐酸水苏碱、3 氢氧化胆碱、4 益母草注射液。

Note: (a) HPLC chromatogram of Matherwort injection samples(242nm); (b) HPLC chromatogram of Stachydrine hydrochloride(242nm); (c) HPLC chromatogram of Trigonelline(242nm); (d) HPLC chromatogram of Matherwort injection samples(210nm); (e) HPLC chromatogram of Choline hydroxide(210nm); (f) Thin layer chromatogram, from left to right, showing 1) Trigonelline 2) Stachydrine hydrochloride 3) Choline hydroxide 4) Leonurns japonicus injection samples.

图 1 益母草注射液的主要成分

Fig. 1 The main components in Matherwort injection



注: (a) 胚胎侧视图; (b) ISVs 总长度量化图 ($n=15$), 与舒尼替尼组相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

Note: (a) Lateral view of embryos; (b) Quantification of total length of ISVs ($n=15$), Compared with the sunitinib group,

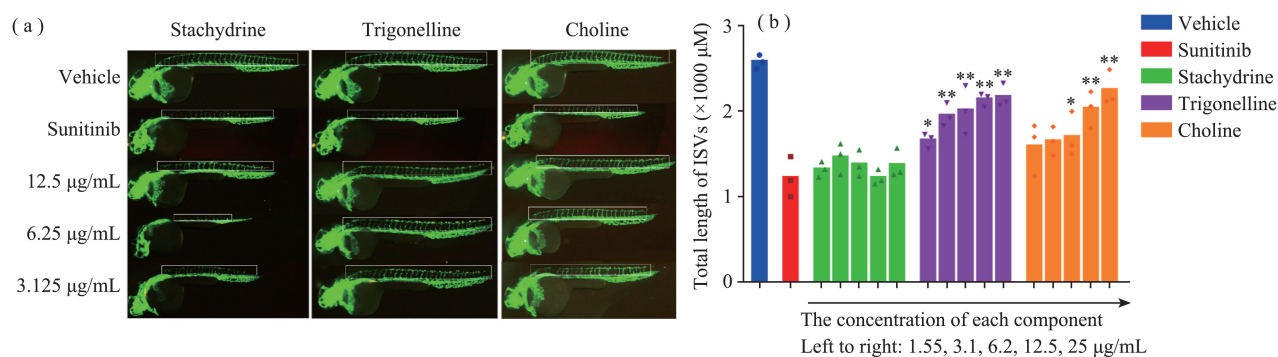
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

图 2 益母草注射液对斑马鱼血管生成损伤的影响

Fig. 2 Effects of Matherworth injection on Angiogenesis Damage in Zebrafish

2.3 益母草注射液内生物碱对斑马鱼血管损伤的影响

通过测定用益母草注射液处理后的转基因斑马鱼体内 ISVs 的长度,研究了益母草注射液及主要生物碱的血管生成作用。如图 3 所示,葫芦巴碱和胆碱可以减轻舒尼替尼诱导的斑马鱼血管损伤,但水苏碱对斑马鱼没有促血管生成作用。当浓度大于 $6.25 \mu\text{g/mL}$ 时,葫芦巴碱可显著减少血管损伤,6.25、12.5、25 $\mu\text{g/mL}$ 葫芦巴碱对 ISVs 形成的抑制率分别为 35.10%、22.32%、13.80%,当浓度大于 $1.5 \mu\text{g/mL}$ 时,胆碱可显著减轻血管损伤,6.25、12.5、25 $\mu\text{g/mL}$ 胆碱对 ISVs 形成的抑制率分别为 23.10%、18.05%、16.89%。总之,这些结果表明,益母草注射液可以减轻化学性阻断的斑马鱼 ISVs 形成,而葫芦巴碱和胆碱是益母草注射液促进血管生成的主要有效成分。



注: (a) 胚胎侧视图; (b) ISVs 总长度量化图,与舒尼替尼组相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

Note: (a) Lateral view of embryos; (b) Quantification of total length of ISVs ($n=15$), Compared with the sunitinib group,

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

图 3 葫芦巴碱、胆碱或水苏碱对化学诱导的血管生成损伤的影响

Fig. 3 Effects of Stachydrine, Trigonelline or Choline on chemically induced angiogenesis damage

2.4 益母草注射液、葫芦巴碱、胆碱对 Tie-2、VEGF 和 VEGFR2 表达的影响

进一步通过 QT-PCR 检测血管生成相关基因的表达,以探究益母草注射液促血管生成作用的潜在机制。QT-PCR 结果显示,益母草注射液可显著上调斑马鱼胚胎内 Tie-2、VEGF 和 VEGFR2 mRNA 表达,而不改变 MMP-2 或 MMP-9 mRNA 表达(图 4)。同时,QT-PCR 结果还表明,葫芦巴碱上调 Tie-2 和 VEGF 的表达,胆碱主要上调 VEGF 和 VEGFR2 的表达。因此,益母草注射液上调斑马鱼胚胎内 Tie-2、VEGF 和 VEGFR2 mRNA 表达,而葫芦巴碱和胆碱可能是其主要活性成分。

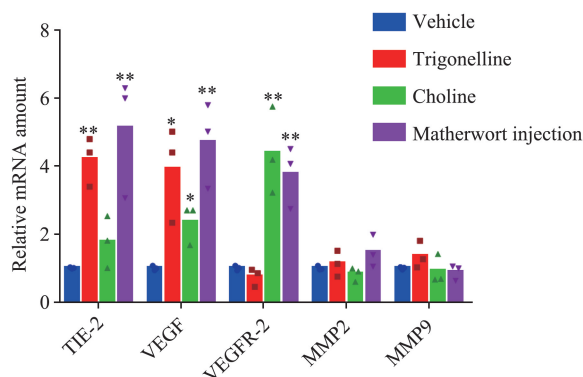
3 结论

血管生成对机体是一把双刃剑。一方面,血管生成不足会影响组织的营养供应,导致缺血性疾病,如冠心病、心肌梗死、脑血栓等;另一方面,过度的血管生成会促进糖尿病视网膜病变、类风湿性关节炎、银屑病、动脉粥样硬化、肿瘤等疾病的发展^[13-16]。目前,许多抗血管生成药物,如 sorafenib 和 Razumab,已被用于肿瘤和年龄相关性黄斑变性等疾病的治疗^[17,18]。然而,目前仍缺乏促血管生成药物来治疗缺血性疾病。

在中医学中,血瘀证的症状和发病机制与缺血密切相关。中药成分对血瘀有许多治疗作用,包括抗血栓、抗凝血剂和内皮细胞保护剂。近年来,许多用于治疗血瘀的中药和提取物已被证明可促进血管生成,如川芎、丹参和当归^[19-21]。益母草在临床上应用于血瘀证已有多年历史。在本研究中,我们证明了益母草注射液可以减轻化学诱导的斑马鱼血管损伤,并证明葫芦巴碱和胆碱是益母草注射液促进血管生成的主要活性成分。因此益母草注射液具有明显的促进血管生成的作用,益母草对血瘀证的作用可能与其促进血管生成的作用有关。

血管生成是一个复杂的生物学过程,包括已有血管的萌发、分支和分化生长,以及在组织中形成更成熟的血管网络^[22]。许多促血管生成因子和细胞因子参与促进血管生成,其中,VEGF、VEGFR2 和 Tie-2 是血管生成过程中内皮细胞增殖、迁移和分化的重要信号转导蛋白^[23,24]。同时,MMPs(基质金属蛋白酶)分解 ECM(细胞外基质)并促进内皮细胞的迁移,在血管生成中主要发挥侵袭作用^[25]。在本研究中,我们证明益母草注射液及其两种主要成分(葫芦巴碱和胆碱)可以显著上调 Tie-2、VEGF 和 VEGFR2 的表达,而不调节 MMPs 的表达。由此可见,益母草注射液只促进血管生长,而不会引起侵袭。

综上所述,益母草注射液的主要生物碱成分为水苏碱、胆碱和葫芦巴碱。我们证明益母草可以通过上调血管生成基因 Tie-2、VEGFR2 和 VEGF 的表达来促进血管生成,而这种作用可能源于葫芦巴碱和胆碱的生物活性。



注:与对照组相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

图4 葫芦巴碱、胆碱、益母草注射液对 Tie-2、VEGF、VEGFR2 mRNA 表达的影响

Fig. 4 Effects of Trigonelline, Choline and Motherwort injection on the expression of Tie-2, VEGF and VEGFR2 mRNA

参 考 文 献

- [1] TIWARI A, MUKHERJEE B, DIXIT M. MicroRNA key to angiogenesis regulation: miRNA biology and therapy[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2018, 18(3): 266-277.
- [2] SAJIB S, ZAHRA F T, LIONAKIS M S, et al. Mechanisms of angiogenesis in microbe-regulated inflammatory and neoplastic conditions[J]. Angiogenesis, 2018, 21(1): 1-14.
- [3] DIPIETRO L A. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough[J]. J Leukoc Biol, 2016, 100(5): 979-984.
- [4] KONTOS C D, ANNEX B H. Angiogenesis[J]. Curr Atheroscler Rep, 1999, 1(2): 165-171.
- [5] NARASIMHAN B, NARASIMHAN H, LORENTE-ROS M, et al. Therapeutic angiogenesis in coronary artery disease: a review of mechanisms and current approaches[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2021, 30(9): 947-963.
- [6] GRIFFIOEN A W, DUDLEY A C. The rising impact of angiogenesis research[J]. Angiogenesis, 2022, 25(4): 435-437.
- [7] MIAO L L, ZHOU Q M, PENG C, et al. Leonurus japonicus (Chinese motherwort), an excellent traditional medicine for obstetrical and gynecological diseases: a comprehensive overview[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 117: 109060.

- [8] ZHANG M X, SONG Y, XU W L, et al. Natural herbal medicine as a treatment strategy for myocardial infarction through the regulation of angiogenesis[C]. //Evid Based Complement Alternat Med, 2022.
- [9] CHEN W, YU J, TAO H, et al. Motherwort injection for preventing postpartum hemorrhage in pregnant women with cesarean section; a systematic review and meta-analysis[J]. J Evid Based Med, 2018, 11(4):252-260.
- [10] LI M X, LIU C R, CHEN M, et al. Effects of motherwort injection versus intramuscular oxytocin for preventing postpartum hemorrhage among women who underwent cesarean section[J]. Front Pharmacol, 2022, 13:859495.
- [11] YU J, CAI Y, SU G, et al. Motherwort injection for preventing postpartum hemorrhage in women with vaginal delivery; a systematic review and meta-analysis of randomized evidence[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019(3): 1-9.
- [12] 蔡红霞,殷红岩,朱袁君,等. 益母草注射液对大鼠子宫缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国中医急症, 2019, 28(3):410-413.
- [13] TATSUMI T. Current treatments for diabetic macular edema[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(11):9591.
- [14] WANG Y, WU H, DENG R. Angiogenesis as a potential treatment strategy for rheumatoid arthritis[J]. Eur J Pharmacol, 2021, 910: 174500.
- [15] DUDLEY A C, GRIFFIOEN A W. Pathological angiogenesis: mechanisms and therapeutic strategies[J]. Angiogenesis, 2023:1-35. [published online ahead of print, 2023 Apr 15].
- [16] CAO Y, LANGER R, FERRARA N. Targeting angiogenesis in oncology, ophthalmology and beyond[J]. Nat Rev Drug Discov, 2023, 22(6):476-495.
- [17] TANG W, CHEN Z, ZHANG W, et al. The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: theoretical basis and therapeutic aspects[J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1):87.
- [18] AREPALLI S, KAISER P K. Pipeline therapies for neovascular age related macular degeneration[J]. Int J Retina Vitreous, 2021, 7(1): 55.
- [19] JIA H, QI X, WU H, et al. Danshensu enhances cerebral angiogenesis in mice by regulating the PI3K/Akt/Mtor/VEGF signaling axis[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2023, 22(4):607-613.
- [20] CHEN M C, HSU W L, CHANG W L, et al. Antiangiogenic activity of phthalides-enriched Angelica Sinensis extract by suppressing WSB-1/pVHL/HIF-1 α /VEGF signaling in bladder cancer[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):5376.
- [21] SHI W L, ZHAO J, YUAN R, et al. Combination of ligusticum chuanxiong and radix paeonia promotes angiogenesis in ischemic myocardium through notch signalling and mobilization of stem cells[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 1-12.
- [22] KRETSCHMER M, RÜDIGER D, ZÄHLER S. Mechanical aspects of angiogenesis[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(19):4987.
- [23] GOEL S, DUDA DG, XU L, et al. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases[J]. Physiol Rev, 2011, 91(3):1071-1121.
- [24] SHAH A A, KAMAL M A, AKHTAR S. Tumor angiogenesis and VEGFR-2: mechanism, pathways and current biological therapeutic interventions[J]. Curr Drug Metab, 2021, 22(1):50-59.
- [25] SAYRES L, JI S H, DIAZ C R, et al. The role of extracellular matrix proteins on placental angiogenesis in severe fetal growth restriction [J]. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2023, 228(1S):202211095.

(责任编辑:刘庆松)