

血管生成评价方法和模型研究进展

崔鹤蓉¹, 李红艳², 姜文艳³, 马涛¹, 王鹏龙^{1*}, 雷海民^{1*} (1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600; 3. 北京工业大学生命科学与生物工程学院, 北京 100124)

摘要:血管生成(angio genesis)系指从已有的毛细血管或毛细血管后静脉发展形成新血管的过程。血管生成主要发生在出生后,是许多血管结构形成的基础,参与体内多种生理、病理过程。由于研究对象的特殊性和种属的差异性,某一种模型得到的实验结果未必能在另一种模型上得到确证,目前全面评价受试因素对血管生成的影响一般需要不同模型结果的相互印证。笔者综述了国内外近十年血管生成相关文献,从细胞、组织、整体水平对目前公认度较高的主要评价方法与实验模型进行归纳,以期对血管生成相关药物研发及活性评价提供依据。

关键词:血管生成;实验方法;评价模型

doi:10.11669/cpj.2019.09.001 中图分类号:R965 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2019)09-0677-05

Advances in Evaluation Methods and Models on Angiogenesis

CUI He-rong¹, LI Hong-yan², JIANG Wen-yan³, MA Tao¹, WANG Peng-long^{1*}, LEI Hai-min^{1*} (1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 2. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China; 3. College of Life Science and Biotechnology, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China)

ABSTRACT: Angiogenesis, the process of shaping new vessels from existing or posterior vessels. It occurs mainly after birth and is the basis for the formation of many vascular structures and participates in a variety of physiological and pathological processes. Due to the particularity of the research objects and the diversity of the species, the experimental results obtained from one model may not be confirmed on the other model. At present, the comprehensive evaluation of angiogenesis requires mutual verification of different model results. Herein, this review mainly summarizes the literatures on the evaluation of angiogenesis activity within recent ten years. From three parallel dimensions of cell, tissue, and animal, the up-to-date evaluation methods and angiogenesis models with wide recognitions are reviewed, in order to provide the reference for related drug research and development.

KEY WORDS: angiogenesis; experimental method; evaluation model

心血管系统是脊椎动物胚胎发育过程中形成的第一个功能器官系统,其发展是一个复杂的过程。血管的生成主要经历两个不同过程,即血管新生(vasculogenesis)和血管生成(angio genesis)(图1)^[1]。探索这一过程形成机制的系列研究已经成为了生物学历史上一个代表性贡献(图2)^[2]。

血管生成是指在现有血管基础上通过内皮细胞(endothelial cells, ECs)的出芽、增殖、迁移形成新血管的过程。相对于血管新生而言,血管生成不涉及内皮细胞的再分化,仅是响应血管内皮生成因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)信号后,对现有血管网的重组和/或细化^[2-3],主要

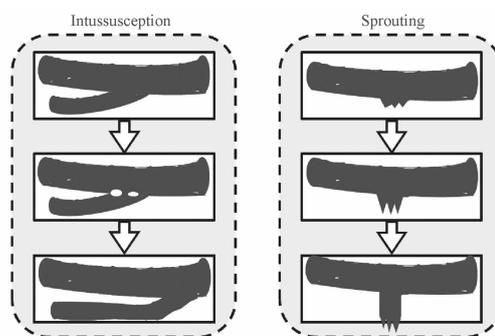


图1 血管生成的两种类型示意图^[1]

基金项目:国家自然科学基金项目资助(81173519, 81603256);中央高校基金科研业务项目(2019-JYB-TD005, BUCM-2018-2020, BUCM-2019-JCRC002);北京中医药大学研究生自主课题(2019-JYB-XS-076);北京中医药基础与新药研究重点实验室项目(100102);中华中医药学会青年人才托举工程项目(CACM-2018-QNRCZ-B08)

作者简介:崔鹤蓉,女,博士研究生 研究方向:中药活性评价 *通讯作者:雷海民,男,教授,博士生导师 研究方向:中药成分合成及活性评价 E-mail:hm_lei@126.com;王鹏龙,男,副教授 研究方向:复方物质基础 E-mail:wpl581@126.com

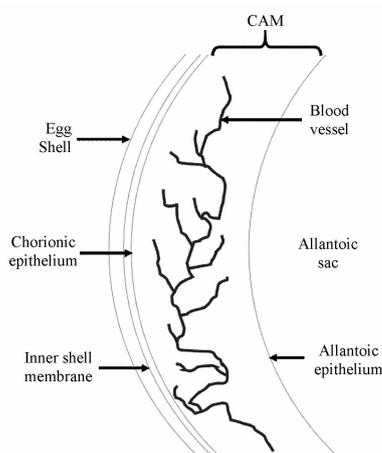


图2 绒毛尿囊膜横断面结构示意图^[2]

包括套叠(分裂) [intussusceptive (splitting) angiogenesis] 和芽生(sprouting angiogenesis) 两种类型,其中,套叠(分裂)是在现有血管中发生的,内皮细胞线形“柱”的形成、延伸(到血管中部)、直径扩大,最终导致原血管分裂生成新血管的过程;芽生(sprouting angiogenesis)系指通过生成血管信号通路启动,内皮尖端(tip)细胞延展板状伪足和丝状伪足到无血管空间,内皮细胞并排促进细胞增殖、延展、形成血管,最终形成垂直于原血管的新血管的过程(图1)^[1]。血管生成是许多血管结构在发育过程中形成的基础,包括但不限于发育中的视网膜、四肢、卵黄囊、心脏等血管以及间血管的形成^[3-10]。血管生成对许多生理病理过程都很重要,比如能促进缺血组织损伤功能恢复(缺血损伤是心肌梗死和中风等疾病的重要致死因素之一),应对缺氧、心血管疾病、风湿性关节炎及成人机体的伤口愈合等^[11-13]。特别是在肿瘤生长供氧及转移方面,因恶性实体肿瘤突破上皮基底膜后进一步生长必须依赖新血管的生成,所以阻断肿瘤组织血液供应途径(血管生成)可抑制实体瘤的生长和转移,这已是目前治疗肿瘤的临床认可疗法^[3,14-16]。

目前评价血管生成的实验模型有很多,但受制于研究对象的特殊性和种属之间的差异性,每一种模型都有其自身局限性,某一种模型得到的结果可能难以在另一种模型上重现,目前比较公认地全面评价血管生成需要不同模型之间的结果相互印证^[1]。笔者通过综述近十年血管生成评价相关文献,从细胞、组织、整体水平,归纳目前用于评价血管生成的公认度较高的主要方法与评价模型,以期对血管生成相关药物研发及活性评价提供参考依据。

1 细胞模型

血管生成依赖于内皮细胞(endothelial cells, ECs)的出芽、增殖、迁移,因此,体外模型中比较经典的是通过综合检测内皮细胞出芽、增殖与迁移能力间接论述研究对象对血管生成的作用^[17]。目前最常用的内皮细胞是人脐带静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs),有商品化的如 HUVEC-12 可直接使用;此外,还有不同器官特异

性 EC 品系,如 BBB ECs、L 型 ECs、H 型 ECs 等;用于评价肿瘤血管生成时常用内皮细胞与肿瘤细胞共培养^[15-16]。细胞模型评价血管生成的系列实验,原理都是基于内皮细胞的各方面能力对该活性的侧面相对评估,实验操作简单,相关技术比较成熟,公认度和重复性比较好,局限性是无法考虑到机体代谢等因素对受试剂的影响,适用于体内实验结果的进一步验证和关键机制分析、以及大规模受试药物的快速评价。根据近些年文章报道,比较公认的用于评价血管生成的常用实验方法如下。

1.1 增殖实验

细胞的增殖能力主要以净细胞数测定和细胞周期分析实验评价。净细胞数测定直观反映了细胞的增殖能力,为细胞周期分析提供表型基础;细胞周期分析初步揭示了受试因素对细胞增殖的干预环节,证实净细胞数测定结果的可靠性。净细胞数测定和细胞周期分析实验结果相互佐证,共同评价细胞的增殖能力。

净细胞数测定的常用方法包括流式细胞术法^[17-18]、免疫细胞荧光法^[19]、MTT 法、SRB 法、^[3H] 胸腺嘧啶核苷参入法^[20],其中重复性较好、公认度较高的是流式细胞术法;细胞周期分析的常用方法包括流式细胞技术^[17-18]、基于 PCR 技术的周期 mRNA 检测、基于 WB 技术的周期蛋白检测^[21],其中流式细胞技术操作简单、方法学成熟、节约成本,广泛应用于内皮细胞周期分析实验。此外,结合免疫组化技术,检测内皮细胞 Ki67 染色的阳性率,也能直观反映细胞增殖能力^[22],该实验涉及到细胞爬片、抗原修复及一抗浓度筛选等技术难点,操作性和性价比局限了其普适性。

1.2 迁移实验

细胞迁移实验以 Transwell 迁移和划痕实验最常用^[17,21,23]。Transwell 迁移实验结果可信度更高,孔径、细胞基质、诱导因子的选择是该实验的重点和难点;相比于前者,划痕实验更易操作,重点是给药剂量的设置要首先排除增殖对迁移的影响,避免出现假阳性结果。

比较公认的 Transwell 迁移实验方法是参照 2011 年 Oommen 等^[23-25]的研究,在适宜孔径的 Transwell 内部接种细胞并诱导迁移,一定时间后,将 Transwell 底部的迁移细胞消化并计数。划痕实验方法是在一定培养条件下,用灭菌枪头对均匀生长的单层细胞造成划痕,显微镜下观察相隔一定时间同一个位置图像情况,结合图像软件统计划痕闭合面积^[19,21,23]。

1.3 Tube 形成实验

Tube 形成实验被广泛用于体外评价内皮细胞的血管生成能力,该实验方法操作简单、条件稳定、公认度很高,重点在于基质胶浓度及培养时间的选择,难点在于成胶体系的构建。2009 年, Borradaile and Pickering^[26]报道了比较规范的管腔形成实验具体操作流程,即基质胶预铺板上种内皮细胞,不同条件刺激细胞后,培养一定时间,用立体显微镜观察统计随机 3 个目镜下、内皮细胞形成管腔网络的分枝点数量、网络总长度^[7,27]。

1.4 球体出芽实验

相对于上述几种实验,球体出芽实验的公认度更高,对培养条件要求很高,实验难点在于细胞板和刺激因子的选择。早在1998年就有学者报道过内皮细胞成球实验^[28-29],每个球体(1 000个细胞)在非吸附圆底培养板中悬浮在处理因素条件下培养,经过一定时间后刺激出芽,结合图像分析软件比较球体宏观图、出芽数量和长度,综合评价各考察因素对血管生成的影响^[5,22,23]。

2 组织模型

细胞模型缺乏正常的血液循环微环境,内皮细胞可能出现分子特征的变化,在一定程度上局限了实验结果的可靠性。组织模型评价血管生成系列实验,原理都是通过分离血管结构发育丰富的组织、立体培养后考察其对受试因素的反映,在分离一定时间内,组织能够在模拟环境中保持体内部分功能,结果直观、可信度高;局限性是相关实验操作复杂,离体培养组织的成活率难以保证,适用于局部组织相关疾病的基础研究,以及在体外实验的基础上从组织水平论证实验结果的可靠性。几种常用的组织实验模型介绍如下。

2.1 动脉环实验

动脉环实验能通过统计自动脉环生长的血管出芽数和出芽长度,直观反映受试因素对血管生成的干预作用,该实验的难点主要是动脉环的离体培养。1990年Nicosia等^[30]就报道了大鼠动脉环的实验细节,2011年,Baker等^[6]规范了动脉环实验的操作流程。将包埋于纤维蛋白胶或胶原蛋白胶的大鼠动脉环在培养液中培养,在一定处理因素刺激后,采用软件统计分析自动脉环生长的血管出芽情况。

2.2 跖骨实验

跖骨实验结果直观、可信度较高,对实验操作及实验条件要求很高,实验难点在于跖骨样本的分离及软骨组织的模糊化处理,对成像系统要求较高。Deckers等^[31]在2001年就报道过小鼠骨移植培养用于评价药物阻断血管生成的方法,主要操作是在给予受试药物/因子刺激后,分离小鼠的跖骨样本,模糊软骨组织,统计管状结构、总血管长度和分枝点数量^[19]。

2.3 视网膜移植实验

小鼠视网膜移植培养实验在很多文献中用以评价内皮细胞出芽及延展能力^[17-18],结合生物电镜,能直观评价受试因素的血管出芽能力,实验难点在于视网膜的取材及培养。2010年,Sawamiphak等^[32]报道了比较规范的视网膜移植实验具体操作,即取出生后4~5d小鼠视网膜在一定体系下培养,根据实验需要添加不同生长因子,若干小时后染色,比较不同处理因素下血管发育情况^[33]。

3 整体动物模型

细胞和组织所处的环境脱离整体血管环境而导致其特性与体内血管有一定差异,药物的早期开发与筛选,必须建

立与其活性相对应的体内模型,证实活性和安全性后,才能进入下一阶段的研究。整体动物模型评价血管生成系列实验,都是基于某一种动物的发育特点,观察受试因素对血管生成的影响效应与机制,相关技术比较成熟,公认度和重复性好;局限性是实验操作存在一定难度、无法用于大规模受试药物的快速评价。下面介绍了几种血管生成相关的体内模型,从整体水平上进一步评估细胞、组织水平的实验结果。

3.1 绒毛尿囊膜实验

Science上报道了鸡胚绒毛尿囊膜(chick chorioallantoic membrane, CAM)实验模型^[34],具有直观、快速、低成本等优点。CAM一般选用孵化第5~9天的活鸡胚进行实验研究,由胚龄4~5d绒毛膜壁中胚层和尿囊膜脏层中胚层融合而成。其组织学结构有3层:外胚层,位于壳膜下方,由绒毛膜上皮组成;中胚层,富含毛细血管的结缔组织;内胚层,位于尿囊,由尿囊膜内皮形成(图3)。第6~7天的CAM及其血管覆盖了整个卵黄囊表面,且随着胚龄的增加而增大,毛细血管极其丰富。再加上CAM是天然免疫缺陷宿主,并可耐受一定的温度变化,有利于检测某些对温度敏感的肿瘤细胞的生物学行为。通过对比评价给药后CAM上血管发育情况(统计血管数目和发育面积),能够简单评估处理因素对(肿瘤)新生血管形成的作用^[9]。此外,也常作为癌细胞培养的载体,评价处理因素对细胞肿瘤形成能力的作用^[35]。

3.2 斑马鱼实验

基于斑马鱼载体评价血管生成实验对操作技术及实验条件要求较高,实验难点首先是受试因素的转染,其次是培养环境和设备要求,最后是血管渗漏和异常血管系统的排除、以避免出现假阳性结果。取斑马鱼胚胎麻醉并通过微注射方式,转染一定处理过的、适宜菌落数的分支杆菌或大肠杆菌,转染后的胚胎放回正常培养环境。通过微血管造影技术探测血管渗漏和异常脉管系统,评价方式主要是统计由主动脉内的红信号与主动脉右中红色信号分离的比例^[29,36]。

3.3 缺血性视网膜病变模型

氧诱导视网膜病变模型是重复性好、操作简单、结果直观的经典体内模型,广泛用于评价血管生成能力^[11,29,35,37-39],对平台和设备的要求较高。该实验操作流程与评价方法非常成熟,也能通过结合多种设备,从多个角度对血管生成进行较为全面的评价。新生哺乳状态的P8小鼠在85%的氧气中维持3d,放回到一定氧气的室内空气中,诱导视网膜病变模型。此外,也有敲除特定基因诱导视网膜病变模型^[33]。取样前注射预处理试剂,收集小鼠眼睛去核,切去半球,结合光学相干断层成像(optical coherence tomography, OCT)设备、透射电镜、激光共聚焦技术、原位杂交技术等,比较各实验组视网膜微血管形态学、径向血管面积、分枝点、出芽、PECAM-1组化阳性细胞表达等情况^[37-39]。

3.4 颅骨血管成像实验

小鼠颅骨血管成像实验主要基于成像系统的血管重定位技术,从宏观和细胞两个水平,直观评价受试因素对血管

生成的影响。实验重点在于颅骨削薄及成像。具体操作如下:颅骨麻醉小鼠,暴露颅骨,将感觉皮质区上方 1 mm 直径的颅骨区削薄到 30 μm 左右厚度,固定周围的颅骨,以便在成像时稳定头部。重定位颅骨血管进行第一次拍照;小鼠接受处理后,血管重定位并再次成像。成像结果中各类细胞表达情况作为血管生成方面的主要评价指标,并统计各组分枝点数和血管长度、密度变化作为辅助指标^[33,40-41]。

3.5 肿瘤模型

肿瘤模型是用来检测药物抗血管生成和抗肿瘤作用的最终模型。通过给小鼠注射相应的肿瘤诱发因子、建立不同部位的肿瘤模型,结合免疫荧光技术分析同尺寸大小肿瘤中脉管系统发展情况,通过血管数、血管长度、血管分枝数、微血管密度、活体成像观察微血管形成过程等分析手段,对血管生成作用综合评估^[12-14,42-46];也可以通过检测样本中 pro-VEGFA、VEGFA 等基因/蛋白表达情况^[19,41], CD31⁺、Ki67⁺ 阳性细胞数间接评价受试因素对血管生成的影响^[4,17,42]。

肿瘤的抗血管生成作用理论相对比较成熟,然而,近年的临床试验^[3]发现,目前对肿瘤疾病的抗血管生成疗法存在一个瓶颈,即有部分患者经过这种疗法不仅没有明显的疗效、甚至会产生促进肿瘤生长的副作用^[47];因此,对哪部分患者适用于这种疗法的深入研究成为近几年的研究重点^[48-50],如结合肿瘤微环境对血管生成的影响以及适用于抗血管生成疗法的 biomarker 研究等。

4 小结

药物研发的早期阶段一般先经过分子、细胞水平的体外筛选,再通过组织、器官水平的实验验证,最后应用于体内模型进行有效性、安全性的全面评价。体外筛选简单高效,实验误差容易控制;体内筛选操作复杂,实验结果相对更可靠,适用于体外筛选结果的进一步验证。笔者综述了近 10 年血管生成评价相关文献,从细胞、组织、整体 3 个水平,总结了目前用于评价血管生成的公认度比较好的主要评价方法及实验模型(图 3),以期对相关药物研发提供参考依据。

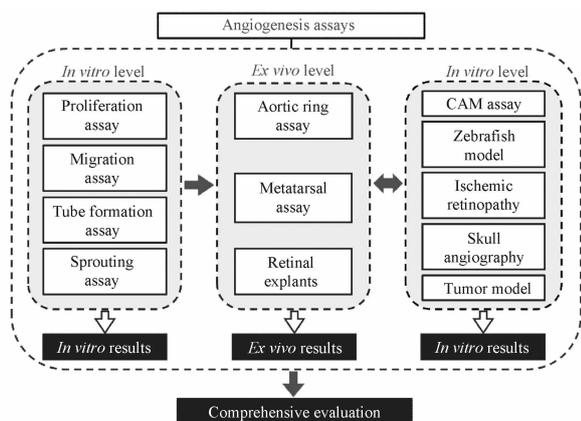


图 3 近 10 年文献报道血管生成的主要评价方法与实验模型

REFERENCES

- [1] UDAN R S, CULVER J C, DICKINSON M E. Understanding vascular development [J]. *Develop Biol*, 2013, 2(3):327-346.
- [2] RIBATTI D, NICO B, CRIVELLATO E. The development of the vascular system: a historical overview [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1214: 1-14.
- [3] JAYSON G C, KERBEL R, ELLIS L M, et al. Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions [J]. *Lancet*, 2016, 388(10043):518-529.
- [4] BONAPACE L, COISSIEUX M M, WYCKOFF J, et al. Cessation of CCL2 inhibition accelerates breast cancer metastasis by promoting angiogenesis [J]. *Nature*, 2014, 515(7525):130-133.
- [5] DE BOCK K, GEORGIADOU M, SCHOORS S, et al. Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting [J]. *Cell*, 2013, 154(3): 651-663.
- [6] BAKER M, ROBINSON S D, LECHERTIER T, et al. Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis [J]. *Nat Protoc*, 2011, 7(1): 89-104.
- [7] HONG X, ZHONG C, NUDLEMAN E, et al. Evidence for pro-angiogenic functions of VEGF-Ax [J]. *Cell*, 2016, 167(1): 275-284.
- [8] ADAMS R H, EICHMANN A. Axon guidance molecules in vascular patterning [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2(5):a001875.
- [9] RAMESHBABU A P, BANKOTI K, DATTA S, et al. Silk sponges ornamented with placenta-derived extracellular matrix augments full-thickness cutaneous wound healing by stimulating neovascularization and cellular migration [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(20):16977-16991.
- [10] RED-HORSE K, UENO H, WEISSMAN I L, et al. Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells [J]. *Nature*, 2010, 464(7288):549-553.
- [11] TAMMELA T, ZARKADA G, WALLGARD E, et al. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation [J]. *Nature*, 2008, 454(7204):656-660.
- [12] ZAHALKA A H, ARNAL-ESTAPÉ A, MARYANOVICH M, et al. Adrenergic nerves activate an angio-metabolic switch in prostate cancer [J]. *Science*, 2017, 358(6361): 321-326.
- [13] RAHBARI N N, KEDRIN D, INCIO J, et al. Anti-VEGF therapy induces ECM remodeling and mechanical barriers to therapy in colorectal cancer liver metastases [J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8: 360ra135.
- [14] SEANO G, CHIAVERINA G, GAGLIARDI P A, et al. Endothelial podosome rosettes regulate vascular branching in tumour angiogenesis [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(10):931-941.
- [15] POTENTE M, MÄKINEN T. Vascular heterogeneity and specialization in development and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(8): 477-494.
- [16] KIM M H, JEONG Y J, CHO H J, et al. Delphinidin inhibits angiogenesis through the suppression of HIF-1 α and VEGF expression in A549 lung cancer cells [J]. *Oncol Reports*, 2016, 37(2): 777-784.
- [17] LONGCHAMP A, MIRABELLA T, HINE C, et al. Angiogenesis is triggered by nutrient deprivation via Gcn2/atf4-dependent regulation of Vegf and H2S production [J]. *Cell*, 2018, 173(1):117-129.
- [18] DAS A, HUANG G S, BONKOWSKI M S, et al. Impairment of an endothelial NAD⁺-H₂S signaling network is a reversible cause of vascular aging [J]. *Cell*, 2018, 173(4):74-89.
- [19] YU L, WU X, CHENG Z, et al. Interaction between bevacizumab and murine VEGF-A: a reassessment [J]. *Invest Ophthalmol*

- Vis Sci*, 2008, 49(2):522-527.
- [20] XING Y H, LIU G, CHEN H P. Models of tumor angiogenesis assay [J]. *Lett Biotechnol*, 2012, 3: 444-447.
- [21] YU P, WILHELM K, DUBRAC A, *et al.* FGF-dependent metabolic control of vascular development [J]. *Nature*, 2017, 545(7653):224-228.
- [22] WANG X, ABRAHAM S, MCKENZIE J A, *et al.* LRG1 promotes angiogenesis by modulating endothelial TGF- β signaling [J]. *Nature*, 2013, 499(7458):306-311.
- [23] SCHOORS S, BRUNING U, MISSIAEN R, *et al.* Fatty acid carbon is essential for dNTP synthesis in endothelial cells [J]. *Nature*, 2015, 520(7546):192-197.
- [24] FINISGUERRA V, DI G C, DI M M, *et al.* MET is required for the recruitment of anti-tumoural neutrophils [J]. *Nature*, 2015, 522(7556):349-353.
- [25] OOMMEN S, GUPTA S K, VLAHAKIS N E. Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) induces endothelial and cancer cell migration through direct binding to integrin $\alpha 9 \beta 1$: identification of a specific $\alpha 9 \beta 1$ binding site [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(2): 1083-1092.
- [26] BORRADAILE N M, PICKERING J G. Nicotinamide phosphoribosyltransferase imparts human endothelial cells with extended replicative lifespan and enhanced angiogenic capacity in a high glucose environment [J]. *Aging Cell*, 2009, 8(2): 100-112.
- [27] ARNAOUTOVA I, KLEINMAN H K. *In vitro* angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract [J]. *Nat Protoc*, 2010, 5(4):628-635.
- [28] KORFF T, AUGUSTIN H G. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation [J]. *J Cell Biol*, 1998, 143(5): 1341-1352.
- [29] DE B K, GEORGIADOU M, SCHOORS S, *et al.* Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting [J]. *Cell*, 2013, 154(3):651-663.
- [30] NICOSIA R F, OTTINETTI A. Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis *in vitro* [J]. *Lab Invest*, 1990, 63(1):115-122.
- [31] DECKERS M, VAN D P G, DOOLJEWAAARD S, *et al.* Effect of angiogenic and antiangiogenic compounds on the outgrowth of capillary structures from fetal mouse bone explants [J]. *Lab Invest*, 2001, 81(1):5-15.
- [32] SAWAMIPHAK S, RITTER M, ACKER-PALMER A. Preparation of retinal explant cultures to study *ex vivo* tip endothelial cell responses [J]. *Nat Protoc*, 2010, 5(10):1659-1665.
- [33] YUEN T J, SILBEREIS J C, GRIVEAU M, *et al.* Oligodendrocyte-encoded HIF function couples postnatal myelination and white matter angiogenesis [J]. *Cell*, 2014, 158(2):383-396.
- [34] MOSCONA A, CARNECKAS Z I. Etiology of keratogenic metaplasia in the chorioallantoic membrane [J]. *Science*, 1959, 129(3365):1743-1744.
- [35] BANERJEE R, RUSSO N, LIU M, *et al.* TRIP13 promotes error-prone nonhomologous end joining and induces chemoresistance in head and neck cancer [J]. *Nat Commun*, 2014, 5:4527-4563.
- [36] OEHLERS S H, CRONAN M R, SCOTT N R, *et al.* Interception of host angiogenic signalling limits mycobacterial growth [J]. *Nature*, 2015, 517(7536): 612-615.
- [37] OKABE K, KOBAYASHI S, YAMADA T, *et al.* Neurons limit angiogenesis by titrating VEGF in retina [J]. *Cell*, 2014, 159(3):584-596.
- [38] WILHELM K, HAPPEL K, EELEN G, *et al.* FOXO1 couples metabolic activity and growth state in the vascular endothelium [J]. *Nature*, 2016, 529(7585):216-220.
- [39] ZHOU H J, XU Z, WANG Z, *et al.* Sumoylation of VEGFR2 regulates its intracellular trafficking and pathological angiogenesis [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3303.
- [40] WHITEUS C, FREITAS C, GRUTZENDLER J. Perturbed neural activity disrupts cerebral angiogenesis during a postnatal critical period [J]. *Nature*, 2014, 505(7483):407-411.
- [41] CROCI D O, CERLIANI J P, DALOTTOMORENO T, *et al.* Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors [J]. *Cell*, 2014, 156(4):744-758.
- [42] ZHAO L G, LIU Z G, YANG A H. Stachydrine inhibits the growth of colon cancer by regulating the expression of ACTG2 [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2018, 53(13):1077-1082.
- [43] LIU T, MA W, XU H, *et al.* PDGF-mediated mesenchymal transformation renders endothelial resistance to anti-VEGF treatment in glioblastoma [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3439-3441.
- [44] WANG Y, WU B, LU P, *et al.* Uncontrolled angiogenic precursor expansion causes coronary artery anomalies in mice lacking Pofut 1 [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1):578-590.
- [45] WU S Y, RUPAIMOOLE R, SHEN F, *et al.* A miR-192-EGR1-HOXB9 regulatory network controls the angiogenic switch in cancer [J]. *Nat Commun*, 2016, 7:11169.
- [46] ZHANG Y, ZHENG D Y, ZHOU T, *et al.* Androgen deprivation promotes neuroendocrine differentiation and angiogenesis through CREB-EZH2-TSP1 pathway in prostate cancers [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4080.
- [47] DONNEM T, REYNOLDS A R, KUCZYNSKI E A, *et al.* Non-angiogenic tumours and their influence on cancer biology [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(5):323-336.
- [48] SEANO G, CHIAVERINA G, GAGLIAROI P A, *et al.* Endothelial podosome rosettes regulate vascular branching in tumour angiogenesis [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(10): 931-941.
- [49] NIH L R, GOJGINI S, CARMICHAEL S T, *et al.* Dual-function injectable angiogenic biomaterial for the repair of brain tissue following stroke [J]. *Nat Mater*, 2018, 17(7):642-651.
- [50] LI X, CARMELIET P. Targeting angiogenic metabolism in disease [J]. *Science*, 2018, 359(6382):1335-1336.

(收稿日期:2018-09-26)