论著

文章编号:1000-5404(2014)22-2292-04

Carfilzomib 联合 Z-VAD-FMK 对肿瘤恶病质的防治作用

王 强[1],李春红[2],王朝义[1],唐 华[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院:胃肠外科[1],肿瘤科[2])

[摘要] **目的** 评价联合运用蛋白酶体抑制剂 Carfilzomib 与 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 对肿瘤恶病质的防治作用及其机制。**方法** BALB/c 小鼠前腋皮下接种结肠腺癌 C26 细胞,建立肿瘤恶病质动物模型。随后在不同时间点给予 Carfilzomib 和 Z-VAD-FMK 单独与联合用药,检测荷瘤小鼠体质量、腓肠肌质量、肿瘤质量和体积、自发性生理活动和生存时间;qRT-PCR 和 Western blot 检测腓肠肌 Caspase3、MuRF1 和 MAFbx 的 mRNA 表达水平和蛋白水平。**结果** Carfilzomib 与 Z-VAD-FMK 联合作用缓解荷瘤小鼠体质量下降,抑制骨骼肌萎缩和肿瘤生长,提高自发性生理活动和延长生存时间;减少腓肠肌 MuRF1、MAFbx 和 Caspase3 表达;联合作用大于单独用药($P<0.05$),预防作用明显大于治疗作用($P<0.05$)。**结论** Carfilzomib 与 Z-VAD-FMK 联合作用抑制了恶病质荷瘤小鼠腓肠肌泛素蛋白酶体通路和凋亡通路,可以预防和治疗肿瘤恶病质的发生、发展。

[关键词] 肿瘤恶病质;carfilzomib;Z-VAD-FMK;泛素蛋白酶体通路;凋亡通路
[中图法分类号] R-332;R589.205;R977.3 [文献标志码] A

Effects of combination of carfilzomib and Z-VAD-FMK on prevention and treatment of in mice of cancer cachexia

Wang Qiang[1], Li Chunhong[2], Wang Chaoyi[1], Tang Hua[1] ([1]Department of Gastrointestinal Surgery, [2]Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of combination of carfilzomib and Caspase inhibitor Z-VAD-FMK on the prevention and treatment of cancer cachexia and its mechanism. **Methods** Murine colon adenocarcinoma cells (C26 cells) were subcutaneously injected into male BALB/c mice to induce cancer cachexia model (with typical cachexia signs and symptoms). Then carfilzomib and Z-VAD-FMK in combination or alone were given at different time points. Body weight, tumor mass and volume, gastrocnemius muscle mass, spontaneous activity and survival time were detected. The mRNA and protein levels of Caspase 3, MuRF1 and MAFbx were detected with qRT-PCR and Western blotting, respectively. **Results** The combination of carfilzomib with Z-VAD-FMK could ameliorate weight loss in tumor-bearing mice, inhibit skeletal muscle atrophy and the growth of tumor, improve the spontaneous physiological activity, prolong the survival time and reduce the expression of MuRF1, MAFbx, and Caspase 3 in gastrocnemius muscle, showing better effects than carfilzomib or Z-VAD-FMK alone ($P<0.05$). The effects of prevention were better than that of treatment ($P<0.05$). **Conclusion** Ubiquitin-proteasome pathway and apoptosis pathway are inhibited by the combination of carfilzomib and Z-VAD-FMK in cancer cachexia mice, indicating that the combination can prevent and treat the development of cancer cachexia.

[**Key words**] cancer cachexia; carfilzomib; Z-VAD-FMK; ubiquitin-proteasome pathway; apoptosis pathway

Corresponding author: Tang Hua, E-mail: tanglihua6969@sina.com

恶病质是一个多因子综合征,影响包括晚期肿瘤患者在内的许多慢性疾病患者预后。肿瘤恶病质显著增加肿瘤相关的病死率,高达25%的恶性肿瘤患者的死因归于膈肌衰竭而引起的呼吸衰竭[1-2]。肿瘤恶病质显著的特点是骨骼肌萎缩而引起的体质量减轻,能量负平衡[3-4]。然而,迄今没有有效措施预防和治疗肿瘤恶病质。因此,阐明肿瘤恶病质的发生机制,寻求

[通信作者] 唐 华,E-mail:tanglihua6969@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140930.1156.009.html(2014-09-30)

联合用药方案,对肿瘤恶病质的防治具有重大意义。泛素蛋白酶体系统在骨骼肌萎缩中扮演重要的作用,可以降解肿瘤恶病质患者绝大部分的蛋白质[5-6]。但是泛素蛋白酶体系统只能降解简单蛋白质,而复杂的肌原纤维可由激活的 Caspase3 降解为肌钙蛋白等,为泛素蛋白酶体系统提供底物。因此,联合抑制骨骼肌降解的上、下游信号通路可能有效抑制肿瘤恶病质的发生、发展。本实验移植小鼠结肠腺癌 Colon26 细胞(C26)于 BALB/c 小鼠,构建肿瘤恶病质模型,探讨蛋白酶体抑制剂 Carfilzomib(CFZ)和 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 联合用药抑制蛋白质降解、肌肉萎缩的机制及有效防治肿瘤恶病质的可能。

1 材料与方法

1.1 材料

6~8 周龄雄性 BALB/c 小鼠,体质量 20~22 g,清洁级(由重庆医科大学动物实验中心提供)。小鼠结肠癌细胞株 Colon26 由重庆医科大学肿瘤实验室赠送。Caspase3 抗体购自美国 Abcam 公司,MAFbx 和 MuRFl 抗体购自 Santa Cruz 公司,GAPDH 抗体和二抗购自武汉博世德生物有限公司,Western blot 相关试剂盒购于碧云天,Real-time PCR 引物和相关试剂盒购于 TaKaRa 公司,CFZ 和 Z-VAD-FMK 购于 Selleck 公司。

1.2 动物分组及肿瘤恶病质模型的建立

185 只小鼠经适应性喂养 1 周后按随机数字表法分为健康组 10 只和 7 组荷瘤鼠组(每组 25 只),包括 CFZ 预防组(CP)、Z-VAD-FMK 预防组(ZP)、CFZ 与 Z-VAD-FMK 联合预防组(UP)、CFZ 治疗组(CT)、Z-VAD-FMK 治疗组(ZT)、CFZ 和 Z-VAD-FMK 联合治疗组(UT)和恶病质对照组(CC)。荷瘤组分别取对数生长期 C26 结肠癌细胞悬液 0.1 mL(含 1×10^6 个细胞)接种于右侧前腋皮下,健康组接种等体积的 PBS,接种过程在 0.5 h 内完成。

1.3 治疗和监测

每天按时监测小鼠摄食量、体质量、毛发、精神状态、自发性生理活动,当皮下可触及肿瘤时开始监测肿瘤体积。肿瘤体积计算公式:$V=ab^2/2$,a、b 代表肿瘤的长度与宽度。每组随机取 10 只小鼠,采用 ZH-ZFT 型自发性活动实验视频分析系统记录自发性生理活动总路程。当荷瘤小鼠出现摄食量减少、活动缓慢、毛发粗糙、精神萎靡等表现,并且体质量下降到与健康组有统计学差异时,即进入恶病质期。接种后第 5 天预防组荷瘤小鼠分别给予腹腔注射药物:CP 组给予 CFZ 2.0 mg/kg(每周 2 次),ZP 组给予 Z-VAD-FMK 1.5 mg/kg(每天 1 次),UP 组给予 CFZ 2.0 mg/kg(每周 2 次)和 Z-VAD-FMK 1.5 mg/kg(每天 1 次)联合用药;第 12 天进入恶病质,给治疗组腹腔注射药物:CT 组给予 CFZ 2.0 mg/kg(每周 2 次),ZT 组给予 Z-VAD-FMK 1.5 mg/kg(每天 1 次),UT 组给予 CFZ 2.0 mg/kg(每周 2 次)和 Z-VAD-FMK 1.5 mg/kg(每天1 次)联合用药;健康组和 CC 组给予等体积生理盐水。第 19 天每组随机取 10 只小鼠脱颈椎处死,分离腓肠肌和肿瘤组织,称量小鼠、肿瘤、左侧腓肠肌质量,测量肿瘤体积;腓肠肌组织先经液氮速冻,后置于 -80 ℃保存备用。荷瘤组每组剩余 15 只继续给药至其死亡,记录每只生存时间。

1.4 Real-time PCR 检测 Caspase3、MuRF1 和 MAFbx 基因表达

Trizol 试剂提取腓肠肌组织 RNA,测 RNA 纯度和浓度,逆转录合成 cDNA。采用 SYBR Green Realtime PCR Master Mix 荧光试剂盒,以逆转录的 cDNA 为模板进行扩增反应,所需引物见表 1。10 μL 反应体系:2 μL cDNA, 0.6 μL 上、下游引物,5 μL 混合染料,2.4 μL 双蒸水;反应条件:95 ℃预变性 1 min,95 ℃变性 5 s,60 ℃退火 15 s,72 ℃延伸 15 s,循环 40 次。目的基因 mRNA 的相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 公式计算。实验重复 3 次。

表 1 引物序列及产物长度

基因	引物序列	产物长度(bp)
Caspase3	上游:5′-GGACTGATGAGGAGATGGCTTG-3′	127
	下游:5′-AGGGACTGGATGAACCACGAC-3′	
MAFbx	上游:5′-GAAGAGAGCAGTATGGGGTCAC-3′	126
	下游:5′-CTTGAGGGGAAAGRGAGACG-3′	
MuRF1	上游:5′-GGAACACGAAGACGAGAAAATC-3′	240
	下游:5′-TGGCTATTCTCCTTGGTCACTC-3′	
GAPDH	上游:5′-GGTGAAGGTCGGTGTGAACG-3′	233
	下游:5′-CTCGCTCCTGGAAGATGGTG-3′	

1.5 Western blot 检测 Caspase3、MuRF1 和 MAFbx 蛋白表达

将 0.5 g 腓肠肌组织加入 RIPA 组织裂解液匀浆,离心、取上清液后测蛋白质浓度(BCA 法),用 10% SDS-PAGE 分离胶电泳,PVDF 膜转膜,5% 脱脂牛奶封闭,并与 Caspase3(1∶2 000)、MAFbx(1∶1 500)和 MuRFl(1∶1 500)、GAPDH(1∶1 000)抗体孵育 4 ℃过夜,洗膜,再与相应二抗孵育后洗膜,显影。重复 3 次实验。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK-q 分析,生存曲线采用 log-rank 分析。

2 结果

2.1 CFZ 和 Z-VAD-FMK 联合作用对恶病质小鼠体质量、骨骼肌和肿瘤的影响

接种后第 5 天,荷瘤小鼠皮下可以触及肿瘤,但各组小鼠体质量没有发生显著变化($P>0.05$)。第 12 天,各组荷瘤小鼠体质量和肿瘤体积发生明显差异($P<0.05$)。第 19 天,各用药组小鼠体质量、腓肠肌质量明显大于 CC 组,但小于健康组;联合组大于单药组,预防组大于治疗组($P<0.05$);单独预防和治疗组之间体质量差异没有统计学意义($P>0.05$);给药组荷瘤小鼠瘤质量和体积明显小于 CC 组,预防组小于治疗组,但是单药预防和治疗时,CFZ 抑制肿瘤生长的作用明显优于 Z-VAD-FMK($P<0.05$,表 2)。

2.2 CFZ 与 Z-VAD-FMK 联合作用对恶病质小鼠自发性生理活动和存活时间的影响

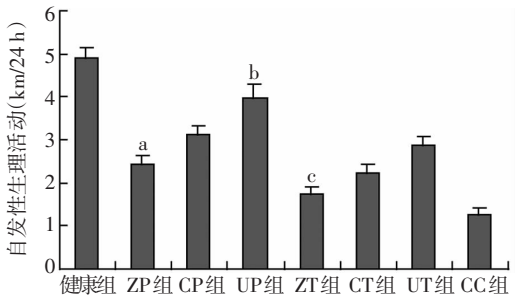
与健康组比较,CC 组小鼠显著降低了自发性生理活动

(图1),CFZ与Z-VAD-FMK预防可以提高荷瘤小鼠的活动量,且CFZ的作用明显好于Z-VAD-FMK,CFZ与Z-VAD-FMK联合作用明显强于单独用药,而当恶病质已经形成后再治疗,效果显著降低。记录荷瘤小鼠的生存时间,绘制Kaplan-Meier生存曲线(图2),可见CFZ与Z-VAD-FMK早期预防用药可显著提高中位数生存时间,且单独用CFZ的作用优于Z-VAD-FMK。

表2 第19天CFZ和Z-VAD-FMK联合作用对小鼠体质量、腓肠肌和肿瘤的影响($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	体质量(g)	腓肠肌质量(mg)	瘤质量(g)	瘤体积(cm^3)
健康组	24.85 ± 1.36^{a}	137.6 ± 13.3^{a}	—	—
ZP组	22.11 ± 0.99^{ab}	98.5 ± 6.0^{ab}	3.43 ± 0.27^{ab}	3.92 ± 0.32^{ab}
CP组	22.50 ± 1.36^{ab}	115.8 ± 13.2^{abd}	2.26 ± 0.35^{abd}	2.62 ± 0.40^{abd}
UP组	23.45 ± 0.74^{a}	126.5 ± 10.6^{a}	1.91 ± 0.33^{a}	2.21 ± 0.44^{a}
ZT组	19.48 ± 1.01^{ac}	85.2 ± 10.3^{ac}	4.25 ± 0.43^{ac}	4.82 ± 0.44^{ac}
CT组	20.08 ± 0.81^{ac}	102.9 ± 9.8^{ace}	3.38 ± 0.40^{ace}	3.90 ± 0.47^{ace}
UT组	21.16 ± 1.11^{a}	114.3 ± 14.1^{a}	2.67 ± 0.27^{a}	3.12 ± 0.45^{a}
CC组	16.44 ± 0.78	74.6 ± 6.0	4.87 ± 0.39	5.47 ± 0.48

a:$P<0.05$,与CC组比较;b:$P<0.05$,与UP组比较;c:$P<0.05$,与UT组比较;d:$P<0.05$,与ZP组比较;e:$P<0.05$,与ZT组比较



a:$P<0.05$,与CP组比较;b:$P<0.05$,与UT组比较;c:$P<0.05$,与CT组比较

图1 CFZ与Z-VAD-FMK联合治疗对荷瘤小鼠自发性生理活动的影响

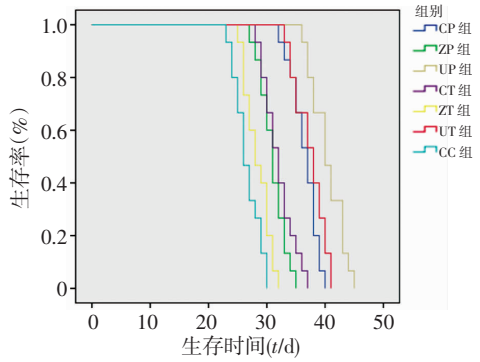
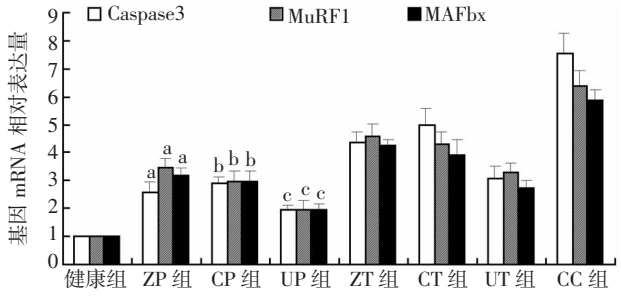


图2 CFZ与Z-VAD-FMK联合治疗对荷瘤小鼠生存时间的影响(Log-Rank检验)

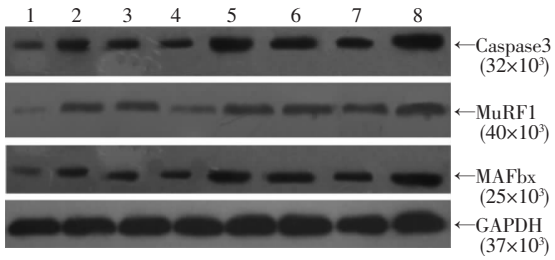
2.3 CFZ与Z-VAD-FMK联合作用对腓肠肌Caspase3、MuRF1和MAFbx基因和蛋白表达水平的影响

用Real-time PCR和Western blot检测腓肠肌Caspase3、MuRF1及MAFbx的mRNA和蛋白表达水平。CFZ与Z-VAD-FMK都能抑制Caspase3的表达,且CFZ与Z-VAD-FMK没有显著差异($P>0.05$),联合作用优于单独用药($P<0.05$),早期预防用药作用明显优于恶病质已经形成后治疗作用($P<0.05$);蛋白的变化趋势大致与其基因mRNA变化相一致。CFZ与Z-VAD-FMK同样都能抑制MuRF1及MAFbx的mRNA表达,但是CFZ作用优于Z-VAD-FMK($P<0.05$),联合作用优于单独用药($P<0.05$),结果见图3、4,表3。



a:$P<0.05$,与ZT组比较;b:$P<0.05$,与CT组比较;c:$P<0.05$,与UT组比较

图3 Real-time PCR检测CFZ与Z-VAD-FMK联合作用调控Caspase3、MuRF1和MAFbx基因表达



1:健康组;2:CP组;3:ZP组;4:UP组;5:CT组;6:ZT组;7:UT组;8:CC组

图4 Western blot检测CFZ与Z-VAD-FMK联合作用调控Caspase3、MuRF1和MAFbx蛋白表达

表3 第19天腓肠肌目的蛋白Caspase3、MuRF1、MAFbx与内参GAPDH的相对表达水平($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	Caspase3	MuRF1	MAFbx
健康组	0.27 ± 0.04^{a}	0.13 ± 0.05^{a}	0.23 ± 0.03^{a}
ZP组	0.51 ± 0.03^{ab}	0.33 ± 0.03^{ab}	0.43 ± 0.02^{ab}
CP组	0.47 ± 0.03^{ab}	0.31 ± 0.04^{abd}	0.41 ± 0.02^{abd}
UP组	0.37 ± 0.04^{a}	0.22 ± 0.03^{a}	0.31 ± 0.06^{a}
ZT组	0.74 ± 0.07^{ac}	0.50 ± 0.06^{ac}	0.65 ± 0.09^{ac}
CT组	0.65 ± 0.04^{ac}	0.47 ± 0.04^{ace}	0.62 ± 0.06^{ace}
UT组	0.54 ± 0.07^{a}	0.36 ± 0.08^{a}	0.46 ± 0.06^{a}
CC组	0.91 ± 0.03	0.60 ± 0.07	0.88 ± 0.04

a:$P<0.05$,与CC组比较;b:$P<0.05$,与UP组比较;c:$P<0.05$,与UT组比较;d:$P<0.05$,与ZP组比较;e:$P<0.05$,与ZT组比较

3 讨论

肿瘤恶病质是以进行性骨骼肌消耗为显著特征的多因子综合征,减弱抗肿瘤效果,降低生活质量,而且预后不佳[7-8]。到目前为止,临床上还没有一个有效的预防和治疗恶病质的方案。抑制骨骼肌降解的Caspase途径和泛素蛋白酶体途径可能是缓解肿瘤恶病质的有效措施。为了验证这个假设,我们建立了一个肿瘤恶病质模型,在荷瘤小鼠不同阶段给予联合应用CFZ与Z-VAD-FMK,发现可以有效抑制骨骼肌降

解途径而缓解骨骼肌萎缩,并抑制肿瘤生长。

Caspase家族是哺乳动物细胞凋亡的启动者和执行者,其中Caspase3是Caspase家族级联"瀑布"下游最关键的凋亡蛋白酶。在消耗性疾病中,激活Caspase3是一个加速肌肉蛋白质降解的起始步骤,降解肌纤凝蛋白[6],同时Caspase3也可以裂解骨骼肌特异的19S蛋白酶体亚单位,增加肌小管的泛素蛋白酶体活性[9]。而蛋白质降解增加主要通过激活和上调泛素蛋白酶体途径[10],且泛素蛋白酶体途径负责降解所有细胞的大部分蛋白质[11]。泛素蛋白酶体通路的关键酶是泛素连接酶E3,其中MuRF1和MAFbx在骨骼肌中特异性表达。文献报道抑制MuRF1和MAFbx表达可以有效抑制骨骼肌萎缩和蛋白质降解[12]。

CFZ是一种新的不可逆性26S蛋白酶体抑制剂[13]。CFZ可以剂量依赖性地抑制除脑组织外的所有组织糜蛋白酶样蛋白酶体活性,同时可以剂量和时间依赖性减少VEGF生成,进而抑制裸鼠移植瘤血管形成,达到抑制肿瘤生长[14-15]。而Z-VAD-FMK是一种非选择性不可逆性的Caspase抑制剂,可以有效抑制Caspase3引起的凋亡及缓解长时间压力引起的骨骼肌肌肉损伤[16-17]。在体内血管新生实验中,Z-VAD-FMK可以抑制依赖VEGF的血管形成[18],这可能有利于抑制肿瘤细胞的生长。本实验观察到ZP、ZT组肿瘤质量和体积比CC组减少,Z-VAD-FMK对肿瘤患者是安全的。本实验还发现,恶病质小鼠由于肿瘤迅速生长,骨骼肌Caspase3、MuRF1和MAFbx mRNA和蛋白表达水平显著升高,造成骨骼肌明显萎缩,体质量显著下降,自发性生理活动和生存时间显著降低;联合应用CFZ与Z-VAD-FMK缓解了荷瘤小鼠体质量下降,肿瘤质量及体积减少,提高了自发性生理活动,延长了生存时间,降低了Caspase3、MuRF1和MAFbx mRNA和蛋白表达水平,这些可能与CFZ与Z-VAD-FMK抑制了骨骼肌降解的两个关键环节,同时抑制了肿瘤生长有关;而单独应用CFZ与Z-VAD-FMK疗效没有联合应用明显,可能与只有抑制骨骼肌降解的单一途径有关;在肿瘤生长早期给予预防用药效果显著增加,可能因为早期肿瘤负荷小而对机体刺激少,骨骼肌Caspase3、MuRFl和MAFbx的表达少,药物作用效果好,因此腓肠肌降解减少,支持早期干预肿瘤恶病质具有显著作用的观点[1]。

总之,CFZ与Z-VAD-FMK联合应用可以通过抑制肿瘤生长,同时抑制骨骼肌降解的Caspase通路和泛素蛋白酶体通路而抑制骨骼肌萎缩,有效地缓解肿瘤恶病质;而且早期联合应用可以更好地缓解肿瘤恶病质的发生、发展,可为临床预防肿瘤恶病质提供实验与理论依据。

参考文献:

[1] Kumar N B, Kazi A, Smith T, *et al*. Cancer cachexia: traditional therapies and novel molecular mechanism-based approaches to treatment [J]. Curr Treat Options Oncol, 2010, 11(3/4): 107-117.
[2] Tisdale M J. Mechanisms of cancer cachexia[J]. Physiol Rev, 2009, 89(2): 381-410.
[3] Tsoli M, Robertson G. Cancer cachexia: malignant inflammation, tumorkines, and metabolic mayhem [J]. Trends Endocrinol Metab, 2013, 24(4): 174-183.
[4] Julienne C M, Dumas J F, Goupille C, *et al*. Cancer cachexia is associated with a decrease in skeletal muscle mitochondrial oxidative capacities without alteration of ATP production efficiency [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2012, 3(4): 265-275.
[5] Fearon K, Arends J, Baracos V. Understanding the mechanisms and treatment options in cancer cachexia[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2013, 10(2): 90-99.
[6] 王强, 郑日勇, 彭旭东, 等. Carfilzomib缓解肿瘤恶病质骨骼肌消耗及其分子机制[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(20): 2113-2117.
[7] Fearon K, Strasser F, Anker S D, *et al*. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus[J]. Lancet Oncol, 2011, 12(5): 489-495.
[8] Johns N, Stephens N A, Fearon K C. Muscle wasting in cancer [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45(10): 2215-2229.
[9] Wang X N, Zhang L, Mitch W E, *et al*. Caspase-3 cleaves specific 19 S proteasome subunits in skeletal muscle stimulating proteasome activity [J]. J Biol Chem, 2010, 285(28): 21249-21257.
[10] Workeneh B T, Mitch W E. Review of muscle wasting associated with chronic kidney disease[J]. Am J Clin Nutr, 2010, 91(4): 1128S-1132S.
[11] Furuno K, Goldberg A L. The activation of protein degradation in muscle by Ca^{2+} or muscle injury does not involve a lysosomal mechanism[J]. Biochem J, 1986, 237(3): 859-864.
[12] Zhang L, Tang H , Kou Y, *et al*. MG132-mediated inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway ameliorates cancer cachexia [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2013, 139(7): 1105-1115.
[13] Khan M L, Stewart A K. Carfilzomib: a novel second-generation proteasome inhibitor[J]. Future Oncol, 2011, 7(5): 607-612.
[14] Jakubowiak A J. Evolution of carfilzomib dose and schedule in patients with multiple myeloma: a historical overview[J]. Cancer Treat Rev, 2014, 40(6): 781-790.
[15] Mansour M A, Aljoufi M A, Al-Hosaini K, *et al*. Possible role of selective, irreversible, proteasome inhibitor (carfilzomib) in the treatment of rat hepatocellular carcinoma[J]. Chem Biol Interact, 2014, 215: 17-24.
[16] Teng B T, Tam E W, Benzie I F, *et al*. Protective effect of Caspase inhibition on compression-induced muscle damage [J]. J Physiol, 2011, 589(Pt 13): 3349-3369.
[17] Stratos I, Li Z D, Rotter R, *et al*. Inhibition of Caspase mediated apoptosis restores muscle function after crush injury in rat skeletal muscle[J]. Apoptosis, 2012, 17(3): 269-277.
[18] Segura I, Serrano A, De-Buitrago G G, *et al*. Inhibition of programmed cell death impairs *in vitro* vascular-like structure formation and reduces *in vivo* angiogenesis[J]. FASEB J, 2002, 16(8): 833-841.

(**收稿**:2014-06-08;**修回**:2014-06-18)
(编辑 龙 亮)